



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

Isabela Brandão de Sousa Machado

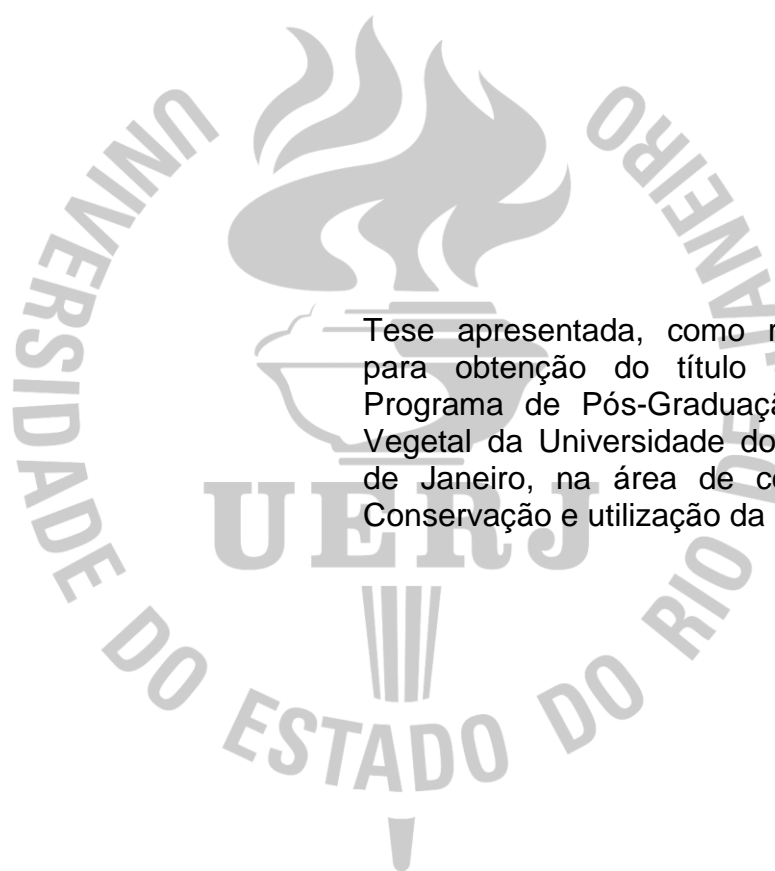
Avaliação fitoquímica e de atividades biológicas de sementes e sistemas *in vitro* de *Arachis pintoi* Krapov. & W.C. Greg.

Rio de Janeiro

2019

Isabela Brandão de Sousa Machado

Avaliação fitoquímica e de atividades biológicas de sementes e sistemas *in vitro* de *Arachis pintoi* Krapov. & W.C. Greg.



Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, na área de concentração de 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
2019

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

M149 Machado, Isabela Brandão de Sousa
Avaliação fitoquímica e de atividades biológicas de sementes e sistemas *in vitro* de *Arachis pintoi* Krapov. & W. C. Greg. / Isabela Brandão de Sousa Machado. - 2019.
158f. : il.

Orientadora: Elisabeth Atalla Mansur de Oliveira
Coorientadora: Georgia Pacheco Peters de Almeida
Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes.

1. Amendoim - Teses. 2. Matéria médica vegetal – Propagação in vitro – Teses. 3. Resveratrol – Teses. 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.

Patricia Bello Meijinhos – CRB7/5217 – Bibliotecária responsável pela elaboração da ficha catalográfica.

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

Assinatura

Data

Isabela Brandão de Sousa Machado

Avaliação fitoquímica e de atividades biológicas de sementes e sistemas *in vitro* de *Arachis pintoï* Krapov. & W.C. Greg.

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, na área de concentração de Conservação e utilização da biodiversidade.

Aprovada em 03 de julho de 2019.

Orientadores: Prof.^a Dra. Elisabeth Atalla Mansur de Oliveira
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof.^a Dra. Georgia Pacheco Peters de Almeida
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Banca examinadora:

Prof.^a Dra. Norma Albarello
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof. Dr. André Mesquita Marques
Farmanguinhos - FIOCRUZ

Prof.^a Dra. Helena Regina Pinto Lima
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

Prof. Dr. Danilo Ribeiro de Oliveira
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro

2019

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha família, amigos e professores.

AGRADECIMENTOS

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para que este trabalho fosse realizado.

À CAPES, à FAPERJ e ao CNPq pelo suporte financeiro, em especial pela oportunidade de realizar o doutorado sanduíche.

À Universidade do Estado do Rio de Janeiro por nos proporcionar ensino, pesquisa e atividades de extensão.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal pela iniciativa em fornecer um ensino de pós-graduação de qualidade.

Ao Núcleo de Biotecnologia Vegetal, todos seus professores, alunos e funcionários, por compartilharem o amor pela Biotecnologia e pela Botânica. Em particular às professoras Beth, Georgia, Norma, Rachel e Cláudia por gerenciarem este grupo e oferecerem a oportunidade aos alunos de participar da pesquisa e crescerem com ela.

À minha orientadora Beth Mansur que recebeu a missão de me conduzir, dar suporte e ainda me manter na linha durante mais de 10 anos. Ser orientador(a) é receber uma semente e com paciência plantar, regar e cuidar até que cresça, tenha suas próprias raízes e dê frutos. Não há frutos sem o trabalho do orientador! Obrigada pela paciência e por acreditar em mim!

À minha coorientadora Georgia Pacheco, que também me recebeu como aluna, por toda a sua contribuição no meu aprendizado, pela sua ajuda e companheirismo. Muito obrigada!

À minha grande colaboradora Renata Garcia, sempre pronta a ajudar, tirar dúvidas, dar conselhos, motivar e dar carinho para todos ao seu redor. Seu apoio sempre foi muito importante para mim!

Ao farmacêutico do NBV, Eduardo Fonseca, pela participação e orientação nos experimentos de fitoquímica.

Aos professores que colaboraram com o desenvolvimento deste trabalho: Davyson Moreira (análise fitoquímica), Mônica Marques (fitoquímica), Katia Sabino (atividade antitumoral), Graça Justo (atividade antitumoral) e Lygia Dolores (anatomia).

A todo o grupo de pesquisa do Arkansas Biosciences Institute, que me recebeu com tanto carinho. Em especial ao professor Dr. Medina-Bolivar, Dr. Lucho, Lingling, Sepideh, Abbas, Patrick, Rokib e Maria Elena, com quem aprendi e vivi bons momentos.

A todos os especialistas em *Arachis*, cuja paixão pelo gênero é uma grande inspiração para meu trabalho.

A todos os meus amigos e colegas do LABMIT, com quem compartilhei muitos momentos bons e ruins, que me apoiaram e me chamaram a atenção, sem os quais a rotina no laboratório não teria graça. Em especial aos “da minha leva” Jamine Pettinelli, Bianka Oliveira, Raphaela Reis, e às minhas madrinhas de casamento Mariela Simão, Ana Pinheiro e Marcela Gomes. Obrigada por tudo!

A todos os meus amigos, que participam da minha vida e me dão seu apoio e sua compreensão em todos os meus momentos de ausência, incertezas e de comemoração. Quero compartilhar esta vitória com vocês!

Aos meus “irmãos” de caminhada na fé cristã, em especial da Paróquia São Judas Tadeu onde sirvo, pois sem a espiritualidade, para mim, seria impossível sair da inércia.

Aos meus familiares, não somente pelos laços sanguíneos, mas pelo amor que nos une. Em especial aos meus pais João Vieira de Sousa e Lêda Maria Brandão de Sousa por todas as renúncias que fizeram para que eu fosse adiante, para me proporcionar o melhor. A família é, com certeza, o maior tesouro que alguém pode ter!

Ao meu marido, Marlon Machado, e toda sua família. Desde que te conheci, você tem sido um dos maiores motivos para eu seguir em frente! Não tenho palavras para te agradecer.

A Deus, por me permitir conviver com todos que mencionei acima, pelos aprendizados, pelas oportunidades, pela sabedoria, por tudo.

O que vale na vida não é o ponto de partida e sim a caminhada.

Caminhando e semeando, no fim terás o que colher.

Cora Coralina

RESUMO

MACHADO, I. B. Sousa. **Avaliação fitoquímica e de atividades biológicas de sementes e sistemas *in vitro* de *Arachis pintoii* Krapov. & W.C. Greg.** 2019. 150f. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2019.

Arachis pintoii Krapov. & W.C. Greg é uma espécie herbácea perene de amendoim originária do Brasil, utilizada como forrageira e também como cobertura viva para controle de erosão e recuperação de áreas degradadas. Apesar da existência de diversos trabalhos que demonstram a presença de metabólitos de interesse, como o resveratrol, no amendoim utilizado para consumo humano (*A. hypogaea* L.), estudos sobre a fitoquímica e atividades biológicas das demais espécies do gênero ainda são reduzidos. O objetivo deste trabalho foi investigar o potencial citotóxico de extratos de sementes e a indução *in vitro* de raízes adventícias a partir de cotilédones, além de avaliar o perfil fitoquímico e a presença de resveratrol por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) em raízes e calos obtidos de sementes. Extratos etanólicos e hexânicos de sementes e as frações combinadas 34-40 e 41 do extrato hexânico apresentaram citotoxicidade contra linhagens tumorais (MCF-7, PC3 e A549) e leucêmicas (Jurkat e K562). A linhagem K562 foi a mais sensível e sofreu uma redução de 71 e 73% da viabilidade celular pelo ensaio MTT em resposta às frações 34-40 e 41, respectivamente. Na fração 41, foram detectados os ácidos hexanóico, palmítico, 13-*cis*-octadecanóico e linoleico. Para a multiplicação de raízes, segmentos radiculares induzidos a partir de explantes de cotilédones em resposta a auxinas na ausência de luz foram cultivados em meio líquido sob ponte de papel filtro, obtendo-se melhor resultado com 2 cm de comprimento em resposta ao ácido indolbutírico (AIB) a 0,49 μ M. A análise histológica evidenciou o intumescimento da região proximal do cotilédone com a formação de projeções radiculares, cujo tecido vascular não apresentou conexão com o do explante. A análise por CLAE das raízes adventícias produzidas em resposta a AIB, ácido α -naftalenoacético (ANA) e ácido indolacético (AIA) e evidenciou semelhança entre os sinais presentes nas amostras. Tanto as amostras de raízes quanto as de calos apresentaram maior número de sinais entre tR 7 a 9 min, próximo ao do resveratrol (9,11 min). O conteúdo de fenóis totais pelo ensaio Folin-Ciocalteu foi maior nos extratos de sementes e cotilédones que nos de calos. Por outro lado, o resveratrol foi detectado apenas em extratos de calos (obtidos de cotilédones, eixos e folíolos embrionários) e de raízes de plantas mantidas em condições naturais, sendo o maior teor observado em calos de cotilédones (8,37 μ g/g peso fresco). A maior atividade antioxidante pelo ensaio DPPH foi detectada em raízes de plantas *in vivo* (CE_{50} = 0,99 mg/mL). A atividade do extrato de sementes com tegumento foi quase três vezes maior que as sem tegumento ou cotilédones, sendo similar às dos materiais produzidos *in vitro*. Os resultados indicam que as culturas avaliadas neste trabalho podem constituir em novas fontes de substâncias antioxidantes, cuja síntese poderá ser estimulada pelo uso de agentes eliciadores.

Palavras-chave: Amendoim forrageiro. Culturas de calos. Culturas de raízes adventícias. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. Resveratrol.

ABSTRACT

MACHADO, I. B. Sousa. **Phytochemical evaluation and biological activities of seeds and *in vitro* systems of *Arachis pintoii* Krapov. & W.C. Greg.** 2019. 150f. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2019.

Arachis pintoii Krapov. & W.C. Greg is an herbaceous perennial peanut species from Brazil, used as forage and also as green cover for erosion control and recovery of degraded areas. Despite the existence of several studies demonstrating the presence of metabolites, such as resveratrol, in peanuts used for human consumption (*A. hypogaea* L.), studies on phytochemistry and biological activities of other species of the genus are still limited. The aim of this work was to investigate the antitumor potential of seed extracts as well as the *in vitro* induction of adventitious roots from cotyledons, in addition to evaluating the phytochemical profile and the presence of resveratrol by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) in roots and callus from seeds. Ethanolic and hexanic seed extracts and the combined fractions 34-40 and 41 of the hexanic extract showed cytotoxicity against tumor (MCF-7, PC3 and A549) and leukemic (Jurkat and K562) cell lines. K562 cell line was the most sensitive and showed 71% and 73% reduction in cell viability by the MTT assay in response to fractions 34-40 and 41, respectively. Hexanoic, palmitic, 13-*cis*-octadecanoic and linoleic acids were detected in fraction 41. For root multiplication, root segments induced from cotyledons explants in response to auxins in absence of light were cultured in liquid media under filter paper bridge, obtaining the best result with 2 cm length in response to 0.49 μ M indole-3-butyric acid (IBA). The histological analysis revealed the swelling of the proximal region of the cotyledons with the formation of root primordium, whose vascular tissue did not show connection to that of the explant. HPLC analysis of extracts from adventitious roots produced in response to IBA, α -naphthaleneacetic acid (NAA) and indole-3-acetic acid (IAA) evidenced similarity among the peaks present in the samples. Both the root and callus samples displayed a higher number of peaks between tR 7 and 9 min, similar to that of resveratrol (9.11 min). The total phenolic content observed by the Folin-Ciocalteu assay was higher in extracts from seeds and cotyledons than in those from calluses. On the other hand, resveratrol was detected only in extracts from calluses (obtained from cotyledons, embryonic axes and leaflets) and roots from plants maintained in natural conditions, being the highest content observed in calluses from cotyledons (8.37 μ g/g fresh weight). The highest antioxidant activity obtained by the DPPH assay was detected in *in vivo*-plant roots (EC_{50} = 0.99 mg/mL). The activity of extracts from seeds with coat was almost three times higher than the ones from seeds without coat or cotyledons, being similar to that of materials produced *in vitro*. These results indicate that the cultures evaluated in this work may constitute new sources of antioxidant compounds, whose synthesis could be optimized by the use of elicitors.

Keywords: Forage peanut. Callus cultures. Adventitious root cultures. High Performance Liquid Chromatography. Resveratrol.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Áreas de ocorrência das Secções taxonômicas do gênero <i>Arachis</i>	24
Figura 2 -	Colar com frutos de amendoim moldados em ouro e prata, encontrado na tumba do Lorde de Sipán, um importante sacerdote da cultura Moche, que viveu no Peru, século III	25
Figura 3 -	Mapa de produção mundial de amendoim (<i>A. hypogaea</i>) no ano de 2014	26
Figura 4 -	Morfologia de <i>Arachis pintoï</i>	29
Figura 5 -	Via biossintética mista de flavonoides e estilbenoides	39
Figura 6 -	Fórmulas estruturais de alguns dos estilbenoides encontrados em <i>Arachis</i>	42
Figura 7 -	Fracionamento de extrato hexânico bruto de sementes de <i>A. pintoï</i> por cromatografia em coluna com gel de sílica	56
Figura 8 -	Cromatografia em camada delgada das frações combinadas 1 a 5 e 6 a 12 obtidas a partir de extratos hexânicos brutos de <i>A. pintoï</i>	57
Figura 9 -	Cromatografia em camada delgada das frações 13 a 21 obtidas a partir de extratos hexânicos brutos de <i>A. pintoï</i>	58
Figura 10 -	Cromatografia em camada delgada das frações 26 a 38 obtidas a partir de extratos hexânicos brutos de <i>A. pintoï</i>	59
Figura 11 -	Cromatografia em camada delgada das frações 40 a 50 obtidas a partir de extratos hexânicos brutos de <i>A. pintoï</i>	60
Figura 12 -	Cromatografia em camada delgada das frações 48 a 55 obtidas a partir de extratos hexânicos brutos de <i>A. pintoï</i>	60
Figura 13 -	Cromatografia de íons totais (CITs) da fração 41 do extrato hexânico de sementes de <i>A. pintoï</i> por CG-EM	61
Figura 14 -	Espectros de massas das substâncias presentes na fração 41 do extrato hexânico de sementes de <i>A. pintoï</i> por CG-EM	62

Figura 15 - Atividade citotóxica de extratos etanólico (EES) e hexânico (EHS) de sementes e de frações combinadas do extrato hexânico 34-40 (Fr34-40) e 41 (Fr41) de <i>A. pintoii</i> contra linhagens tumorais pelo ensaio do MTT	64
Figura 16 - Atividade citotóxica de diferentes concentrações das frações de extrato hexânico de sementes de <i>A. pintoii</i> contra a linhagem leucêmica K562 pelo ensaio MTT	65
Figura 17 - Curva padrão de atividade antioxidante da quercetina utilizando o método de captura do radical DPPH	76
Figura 18 - Raízes adventícias induzidas a partir de cotilédones de <i>A. pintoii</i> após 30 dias de cultivo em meio MS suplementado com diferentes auxinas	77
Figura 19 - Multiplicação de raízes de <i>A. pintoii</i> a partir de segmentos radiculares de 2 cm de comprimento em meio suplementado com AIB a 0,49 μ M em sistema de ponte de papel filtro, por 60 dias	80
Figura 20 - Análise histológica de cotilédones de <i>A. pintoii</i> cultivados em meio MS suplementado com ANA a 54 μ M por diferentes períodos	81
Figura 21 - Análise histológica das raízes adventícias originadas a partir de cotilédones de <i>A. pintoii</i> cultivados em meio MS suplementado com ANA a 54 μ M	83
Figura 22 - Comparação estrutural entre raiz adventícia obtida <i>in vitro</i> a partir de cotilédones e raiz de planta de <i>A. pintoii</i> mantida em casa de vegetação	84
Figura 23 - Perfil cromatográfico de extrato etanólico de raízes de plantas de <i>A. pintoii</i> mantidas em casa de vegetação por 30 dias, por CLAE-DAD-UV em 306 nm	85
Figura 24 - Perfis cromatográficos de extratos etanólicos de raízes adventícias obtidas <i>in vitro</i> a partir de cotilédones de <i>A. pintoii</i> cultivados na presença das auxinas, por CLAE-DAD-UV em 306 nm, e espectro de absorção dos sinais majoritários	86

Figura 25 -	Potencial antioxidante de extratos etanólicos de cotilédones e raízes de <i>A. pinto</i> pelo ensaio do DPPH	87
Figura 26 -	Curva padrão de ácido gálico pelo ensaio Folin-Ciocalteu	97
Figura 27 -	Calos formados a partir de explantes de sementes de <i>A. pinto</i> , após 60 dias de cultivo no escuro	99
Figura 28 -	Rendimento dos extratos etanólicos de calos e sementes de <i>A. pinto</i>	99
Figura 29 -	Perfil cromatográfico de extratos etanólicos de calos derivados de cotilédones e de sementes com tegumento de <i>Arachis pinto</i> , por CLAE-DAD-UV em 306 nm	101
Figura 30 -	Cromatograma de análise quantitativa para detecção de resveratrol em extrato etanólico de calos derivados de cotilédones de <i>Arachis pinto</i> , por CLAE-DAD-UV	103
Figura 31 -	Potencial antioxidante de extratos etanólicos de diferentes amostras de calos e sementes de <i>A. pinto</i> pelo ensaio DPPH ...	104

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Atividades biológicas já descritas no gênero <i>Arachis</i>	35
Quadro 2 - Estilbenoides identificados em <i>Arachis</i> com base em sua massa e espectro ultravioleta	43
Quadro 3 - Gradiente de solventes e frações do extrato hexânico de sementes de <i>A. pinto</i> i obtidas por cromatografia em coluna com gel de sílica	51
Quadro 4 - Gradiente de fase móvel para análise quantitativa do <i>trans</i> -resveratrol por CLAE-DAD-UV	74

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2,4-D	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético
2iP	Isopenteniladenina
4CL	4-Cumarato CoA Ligase
Aa	Absorbância da amostra
Ac	Absorbância do controle negativo
AIA	Ácido indolacético
AIB	Ácido indolbutírico
ANA	Ácido α -naftalenoacético
BAP	6-benzilaminopurina
C	Controle
C	Córtex
C4H	Ácido Cinâmico 4-Hidroxilase
Ca	Câmbio Vascular
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CE ₅₀	Concentração efetiva para 50%
CG – EM	Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas
CI ₅₀	Concentração Inibitória de 50% da viabilidade
CIN	Cinetina
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLUE	Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência
cv.	Cultivar
CYP	Gene Citocromo P450
DAD	<i>Diode Array Detector</i>
DGL	Depressão da Gordura do Leite
DMSO	Dimetilsulfóxido
E	Epiderme
EAG	Equivalentes de Ácido Gálico
EES	Extrato Etanólico de Sementes
EHS	Extrato Hexânico de Sementes
F	Floema

Fr34-40	Frações combinadas 34 a 40
Fr41	Fração 41
FV	Feixe Vascular
IPD	Isopentadienilresveratrol
L	Lacuna
LDL	<i>Low Density Lipoproteins</i>
M	Medula
MIP	3,5,3'-triidroxi-4'-metoxi-5'-isopentenil-estilbeno
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio bromida
ND	Não detectado
<i>nom. alt.</i>	<i>nomen alternativum</i>
OS	Peso Seco
P	Parênquima
PAL	Fenilalanina Amonialiase
PBS	Tampão fosfato-salino
Pe	Periderme
PF	Peso Fresco
PIC	Picloram
PR	Parênquima de Reserva
Rf	Fator de retenção
SB-1	Estilbenoide 1
SDS	Dodecilsulfato de sódio
SFB	Soro Fetal Bovino
STS	Estilbeno Sintase
TDZ	Tidiazuron
tR	Tempo de Retenção
UFRJ	Universidade Federal do Rio de Janeiro
X	Xilema
ZEA	Zeatina

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	19
1	REVISÃO DA LITERATURA	19
1.1	Substâncias bioativas de origem vegetal	19
1.2	Uso da biotecnologia para a produção de metabólitos secundários	20
1.3	Gênero <i>Arachis</i> L.	23
1.3.1	<u><i>Arachis pintoi</i> Krapov. & W. C. Greg.</u>	28
1.3.2	<u>Potencial biológico e produção de substâncias bioativas no gênero <i>Arachis</i></u>	34
1.3.3	<u>Sistemas de produção de metabólitos <i>in vitro</i> em <i>Arachis</i></u>	44
2	OBJETIVOS	47
2.1	Objetivo geral	47
2.2	Objetivos específicos	47
3	ATIVIDADE CITOTÓXICA DE EXTRATOS DE SEMENTES E IDENTIFICAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DE UMA FRAÇÃO ATIVA DO ÓLEO POR CROMATOGRAFIA COM FASE GASOSA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS (CG-EM)	48
3.1	Introdução	48
3.2	Metodologia	50
3.2.1	<u>Preparo dos extratos brutos</u>	50
3.2.2	<u>Fracionamento do extrato hexânico bruto por cromatografia em coluna</u>	51
3.2.3	<u>Esterificação da fração selecionada de extrato hexânico</u>	52
3.2.4	<u>Cromatografia com fase gasosa acoplada a espectrometria de massas</u>	52
3.2.5	<u>Avaliação da atividade citotóxica</u>	53
3.3.5.1	Cultivo das linhagens celulares	53
3.2.5.2	Determinação da citotoxicidade das amostras pelo ensaio MTT	54
3.3	Resultados	55
3.3.1	<u>Fracionamento do extrato bruto hexânico</u>	55

3.3.2	<u>Análise por CG-EM</u>	61
3.3.3	<u>Avaliação da atividade citotóxica</u>	63
3.4	Discussão	65
4	CULTURA DE RAÍZES ADVENTÍCIAS: ANÁLISES ANATÔMICA, FITOQUÍMICA E DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	68
4.1	Introdução	68
4.2	Metodologia	71
4.2.1	<u>Indução de raízes adventícias</u>	71
4.2.2	<u>Multiplificação de raízes adventícias</u>	71
4.2.3	<u>Análise histológica das raízes adventícias</u>	72
4.2.4	<u>Avaliação fitoquímica</u>	73
4.2.4.1	Preparo de extratos dos materiais <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	73
4.2.4.2	Análise fitoquímica qualitativa e quantificação do resveratrol	73
4.2.5	<u>Avaliação da atividade antioxidante</u>	75
4.2.6	<u>Análise estatística</u>	76
4.3	Resultados	77
4.3.1	<u>Indução das raízes adventícias</u>	77
4.3.2	<u>Multiplificação de raízes adventícias</u>	78
4.3.3	<u>Caracterização histológica</u>	80
4.3.4	<u>Avaliação fitoquímica e da atividade antioxidante de raízes induzidas</u>	84
4.4	Discussão	87
5	AVALIAÇÃO FITOQUÍMICA E DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS ETANÓLICOS DE CALOS E SEMENTES	92
5.1	Introdução	92
5.2	Metodologia	94
5.2.1	<u>Indução de culturas de calos</u>	94
5.2.2	<u>Avaliação fitoquímica</u>	95
5.2.2.1	Preparo de extratos	95
5.2.2.2	Análise fitoquímica qualitativa e quantificação de resveratrol	95
5.2.2.3	Determinação do conteúdo de fenóis totais	96
5.2.3	<u>Avaliação da atividade antioxidante</u>	97
5.2.4	<u>Análise estatística</u>	98
5.3	Resultados	98

5.3.1	<u>Indução de calos e análise fitoquímica qualitativa</u>	98
5.3.2	<u>Quantificação dos teores de resveratrol e fenóis totais</u>	102
5.3.3	<u>Avaliação da atividade antioxidante</u>	103
5.4	Discussão	104
6	DISCUSSÃO GERAL	109
	CONCLUSÕES	113
	PERSPECTIVAS	114
	REFERÊNCIAS	115
	ANEXO – Artigo “Total phenolics, resveratrol content and antioxidant activity of seeds and calluses of Pinto peanut (<i>Arachis pinto</i> Krapov. & W.C. Greg.)”, publicado na revista Plant, Cell, Tissue and Organ Culture (SOUSA-MACHADO et al., 2018)	146

INTRODUÇÃO

1 REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Substâncias bioativas de origem vegetal

Com o crescimento e as novas descobertas da pesquisa sobre produtos naturais, diversas espécies vegetais vêm sendo estudadas com o intuito de gerar novos produtos, especialmente medicamentos fitoterápicos. Dessa forma, muitas espécies já utilizadas na medicina popular em diferentes países e culturas têm tido sua importância reconhecida e suas atividades farmacológicas comprovadas cientificamente (DUTRA et al., 2016).

O potencial biológico de extratos vegetais está relacionado à presença de diferentes grupos de substâncias provenientes do metabolismo secundário. Os metabólitos secundários ou especiais, como são chamados os produtos desse metabolismo, são fundamentais para as plantas, sendo produzidos em resposta a diversos estímulos e atuando na proteção contra patógenos, na inibição da herbivoria e na atividade alelopática, entre outros (FUMAGALI et al., 2008). Muitas vezes, a energia gasta para sua produção é maior que a investida no metabolismo primário, que engloba vias metabólicas constituintes de funções celulares essenciais, como fotossíntese, respiração, crescimento e desenvolvimento (BÖTTGER et al., 2018; KENNEDY; WIGHTMAN, 2011; SCHULTZ et al., 2013; WAR et al., 2012).

Existe uma grande diversidade de metabólitos secundários, produzidos por vias biossintéticas distintas e, algumas vezes, compartilhadas, o que pode dificultar a classificação dessas substâncias. De acordo com Hussain et al. (2012a), os metabólitos secundários podem ser classificados em três grandes classes, alcaloides, terpenoides e substâncias fenólicas, com base nas suas características químicas. Neste último grupo, encontram-se ácidos fenólicos, flavonoides, estilbenoides, cumarinas e taninos, sendo os flavonoides e os ácidos fenólicos considerados os mais importantes do ponto de vista farmacológico, por

apresentarem diversas atividades nos organismos humano e animal, podendo ser utilizados no combate a doenças (GHASEMZADEH; GHASEMZADEH, 2011; KIM; JEONG; LEE, 2003; LIU, 2013).

Cerca de 200.000 substâncias oriundas do metabolismo secundário vegetal já eram conhecidas até 2014 (TISSIER; ZIEGLER; VOGT, 2014). Como a síntese desses metabólitos envolve moléculas-chave do metabolismo primário em nível molecular e enzimático (TISSIER; ZIEGLER; VOGT, 2014), a combinação entre diferentes mecanismos pode levar à produção, em uma mesma planta, de substâncias distintas em órgãos ou tecidos, para adaptação a cada tipo de estímulo. Alguns metabólitos podem ser exclusivos de um determinado táxon e, por essa razão, podem ser considerados como marcadores quimiosistemáticos (KENNEDY; WIGHTMAN, 2011). Ácidos fenólicos, alcaloides, terpenoides e aminoácidos não-proteicos, por exemplo, vêm sendo amplamente utilizados como marcadores devido às suas características de diversidade química, distribuição e função (SINGH, 2016).

Os produtos naturais, que podem ser derivados dos metabolismos primário ou secundário, recebem este nome devido à sua origem, diferenciando-os dos produtos sintéticos. Devido às suas diferentes atividades biológicas, apresentam grande potencial para uso humano, além do uso medicinal, podendo também ser utilizados como aromatizantes, corantes e aditivos alimentares, pigmentos e pesticidas (HUSSAIN et al., 2012a).

1.2 Uso da biotecnologia para a produção de metabólitos secundários

A cultura de tecidos tem sido utilizada como ferramenta para diversas finalidades no campo da biotecnologia, incluindo a produção massal de mudas através de micropropagação, a produção de sementes sintéticas e a transformação genética. Sistemas *in vitro* são também adotados para a produção de metabólitos e como um método complementar para a conservação de espécies ameaçadas e de produtos biotecnológicos (CARVALHO; QUESENBERRY; GALLO, 2010; CARVALHO; VIDAL, 2003; GÓMEZ-AGUIRRE et al., 2012; MULABAGAL; TSAY, 2004).

As técnicas da cultura de tecidos baseiam-se na totipotência celular, que é a capacidade de desdiferenciação e rediferenciação de células vegetais por diferentes vias, em resposta a estímulos químicos ou físicos. Dessa forma, pequenos segmentos de órgãos vegetais (explantes), incluindo segmentos foliares, radiculares e caulinares, podem dar origem a diferentes sistemas de cultura, como culturas de brotos ou de raízes (organogênese), de embriões (embriogênese somática), ou ainda levar à formação de massas desorganizadas de células, denominadas de calos (calogênese).

A obtenção de plantas *in vitro* pode ocorrer pelo desenvolvimento dos meristemas pré-existentes contidos nos explantes, por organogênese ou embriogênese somática. Nos sistemas organogênicos e embriogênicos, a formação de plantas pode ocorrer diretamente a partir das células do explante ou de forma indireta, com a ocorrência de uma fase intermediária de calogênese (ANDRADE, 2002; GEORGE; HALL; KLERK, 2008; LANDA et al., 2000).

Muitos sistemas *in vitro* utilizados para a síntese de metabólitos secundários, baseiam-se em culturas de calos e de células em suspensão (VIJAYA SREE et al., 2010). Os calos produzidos para esse fim podem ser morfogênicos, quando há formação de plantas, órgãos ou embriões, ou não-morfogênicos, quando não originam estruturas diferenciadas (GŁOWACKA; JEŻOWSKI; KACZMAREK, 2010). Além disso, apresentam diferentes colorações e graus de compactação, podendo ser friáveis, compactos ou mistos, quando apresentam essas características em regiões distintas (BRAGA; COIMBRA; CASTRO, 2015; IJAZ et al., 2019; SELDIMIROVA et al., 2017). As culturas de calos podem ser estabelecidas em meios sólidos ou líquidos, sendo a última condição utilizada geralmente para o estabelecimento de suspensões celulares (NATH; BURAGOHAIN, 2005; PACHECO et al., 2012).

Como os sistemas de culturas desorganizadas podem apresentar baixa capacidade de produção de metabólitos, uma vez que isso requer o controle tecido-específico do metabolismo, culturas de órgãos, como as culturas de raízes também são adotadas para a produção *in vitro* de substâncias bioativas (SIVANESAN; JEONG, 2009). As raízes adventícias *in vitro* podem ser obtidas a partir de diferentes tipos de explantes, pela manipulação das condições da cultura ou pela transformação genética com *Agrobacterium rhizogenes* (BASKARAN; JAYABALAN, 2009).

A modulação da morfogênese *in vitro* pode ser realizada por meio da variação de parâmetros das culturas, que são mantidas em condições controladas, sob fotoperíodo e temperatura específicos e em meio asséptico (ANDRADE, 2002). Os meios de cultura podem apresentar diferentes composições, sendo adotados diferentes tipos e concentrações de sais, vitaminas e carboidratos, utilizados como fonte de carbono e energia. As culturas podem ser realizadas em meios solidificados ou líquidos, mantidos em condição estática ou sob agitação. Reguladores de crescimento, que controlam a diferenciação e a multiplicação das células e induzem determinadas vias de regeneração são também componentes importantes dos meios de cultura (NETO et al., 2004). Entre eles, auxinas e citocininas apresentam um papel antagonístico na diferenciação celular, estão diferentemente distribuídas entre os tecidos e atuam por vias de sinalização distintas (CHANDLER; WERR, 2015). Dessa maneira, a combinação e a concentração dos reguladores de crescimento devem ser avaliadas para cada espécie ou genótipo estudados, bem como para os diferentes explantes.

A seleção dos explantes também constitui um fator crucial, pois seus estados fisiológicos e de desenvolvimento também podem influenciar a resposta morfogênica (ANDRADE, 2002). Alguns dos fatores avaliados consistem no tipo e na idade dos explantes (DHAR; JOSHI, 2005; PRAKASH; GURUMURTHI, 2010). Diferentes tipos de explantes podem ser utilizados para o estabelecimento de sistemas *in vitro*, incluindo aqueles derivados de sementes (ISLAM; AHMED; MAHALDAR, 2005; PACHECO et al., 2007a; 2008b), plantas mantidas *in vivo* (NURAZAH et al., 2009; PASSEY; BARRETT; JAMES, 2003) ou materiais obtidos *in vitro* (GARCIA et al., 2011; JAYANAND; SUDARSANAM; SHARMA, 2003). Além disso, fatores físicos, como intensidade e qualidade da luz (AHMAD; RAB; AHMAD, 2016; SHIN et al., 2008), umidade, temperatura (CHA-UM et al., 2010) e aeração (NEWELL; GROWNS; MCCOMB, 2003; 2006), afetam a morfogênese *in vitro*.

Tendo em vista as diferenças fisiológicas de cada tipo de material, os parâmetros de cultura devem ser adaptados a cada explante segundo suas necessidades particulares para a obtenção de um protocolo adequado ao estabelecimento de sistemas de cultura de tecidos.

As diferentes técnicas de cultura de tecidos oferecem, portanto, condições favoráveis para a produção *in vitro* de metabólitos que possuem atividades biológicas, especialmente os de difícil síntese química. Para isso, podem ser

utilizadas estratégias como a manipulação das condições de cultura, o uso de precursores, a imobilização celular, a biotransformação, a bioconversão e a adição de eliciadores (PATEL; KRISHNAMURTHY, 2013; SHAKYA et al., 2019). As vantagens dos sistemas *in vitro* em relação ao uso de plantas desenvolvidas em condições naturais incluem eliminação da influência de variações ambientais e da fase do ciclo vital pelo uso de condições controladas e otimizáveis, eliminando também a possível contaminação por herbicidas e pesticidas. Adicionalmente, esses sistemas criam possibilidades de obtenção de clones mais produtivos por engenharia genética ou seleção *in vitro*, além do maior controle do produto final, da produção de substâncias puras e de substâncias que não são normalmente produzidas pela planta em condições naturais (DIAS et al., 2016). Dessa forma, as abordagens da cultura de tecidos são amplamente reconhecidas e vêm sendo aplicadas de forma crescente para produção de metabólitos de diferentes espécies em escala industrial (NARAYANI; SRIVASTAVA, 2017).

1.3 Gênero *Arachis* L.

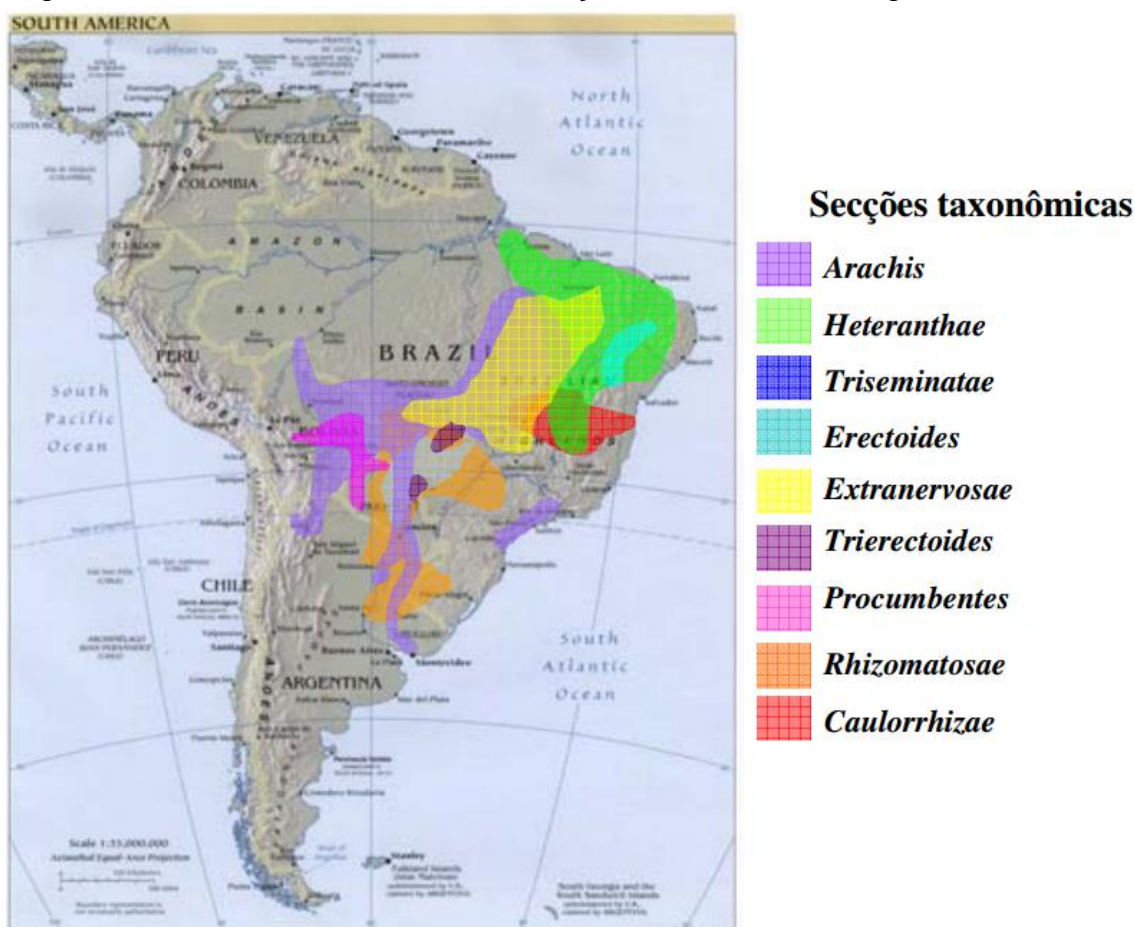
O gênero *Arachis* está inserido na família Fabaceae ou Leguminosae *nom. alt.* (subfamília Faboideae), que é a terceira maior família de plantas terrestres (Embryophyta), sendo a segunda entre as eudicotiledôneas, com 766 gêneros e mais de 19.500 espécies descritas (LEWIS, 2016; STEVENS, 2012). A família é constituída por espécies arbóreas, arbustivas e herbáceas, que se encontram amplamente distribuídas, principalmente em florestas tropicais pluviais ou secas na América e na África (BURNHAM; JOHNSON, 2004). As leguminosas, como são chamadas essas espécies, possuem uma grande importância econômica, na alimentação e na geração de produtos. Além disso, são importantes do ponto de vista cultural, considerando que muitas espécies acompanharam a evolução do homem desde civilizações mais primitivas até hoje (GRUSAK, 2005).

O gênero *Arachis* possui, atualmente, 81 espécies descritas (KRAPOVICKAS; GREGORY, 2007; VALLS; DA COSTA; CUSTÓDIO, 2013; VALLS; SIMPSON, 2005). A primeira descrição taxonômica foi feita por Linnaeus (1753), para *Arachis hypogaea* L., o amendoim utilizado para consumo humano e as primeiras espécies

silvestres foram descritas por Bentham (1839). O gênero é subdividido em nove Secções taxonômicas (*Arachis*, *Trirectoides*, *Erectoides*, *Procumbentes*, *Rhizomatozæ*, *Caulorrhizæ*, *Extranervosæ*, *Triseminatæ* e *Heteranthæ*), que agrupam as espécies segundo suas características morfológicas e filogenéticas e sua compatibilidade para cruzamentos (KRAPOVICKAS; GREGORY, 2007; VALLS; SIMPSON, 2005).

A maioria das espécies de *Arachis* tem sua área de distribuição limitada à América do Sul, nos países Argentina, Bolívia, Paraguai, Uruguai e Brasil (Figura 1) (KRAPOVICKAS; GREGORY, 2007), sendo geralmente associadas à distribuição das bacias hidrográficas. Acredita-se que os rios tenham um papel importante na dispersão de frutos geocárpicos, carregando-os pela remoção de terra das margens (OTTO, 2007). O gênero é originário do Brasil, onde são encontrados representantes de todas as Secções, sendo mais da metade das espécies endêmicas (KRAPOVICKAS; GREGORY, 2007; VALLS; SILVA; MONÇATO, 2000).

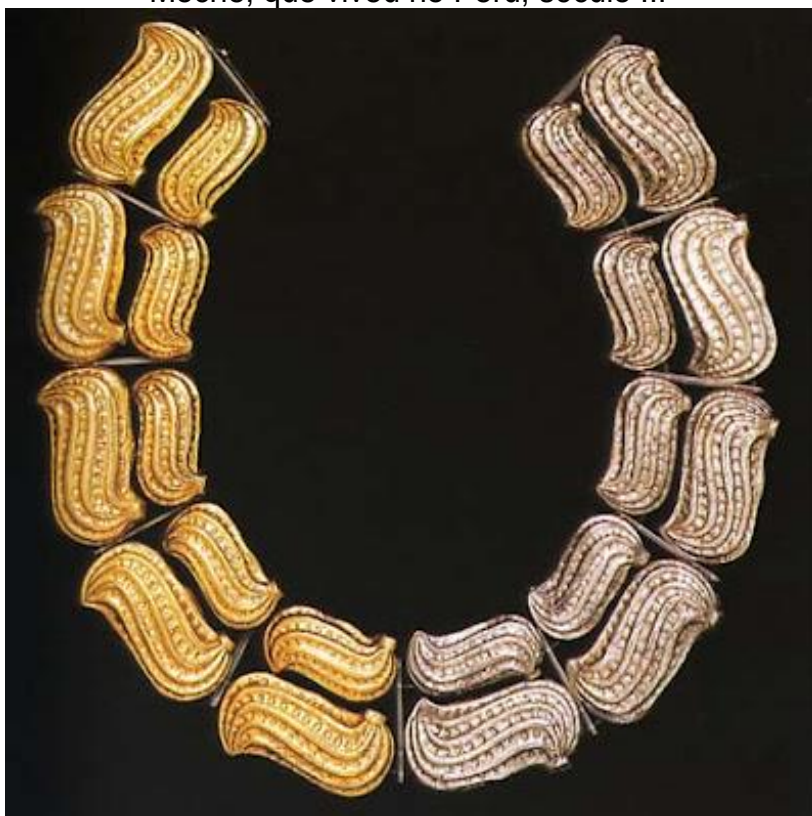
Figura 1 – Áreas de ocorrência das Secções taxonômicas do gênero *Arachis*



Fonte: Silva, 2008.

Arachis hypogaea (Secção *Arachis*) é cultivado há milhares de anos, já tendo sido encontradas sementes em registros arqueológicos realizados no Peru, datados de 7.840 anos (DILLEHAY et al., 2007). Acredita-se que sua presença seja decorrente de ação antrópica, visto que não há nenhuma comprovação de ocorrência natural de espécies do gênero na vertente oeste dos Andes. A importância do amendoim para os povos pré-históricos da América do Sul tornou-se evidente para os pesquisadores após os achados da cultura Moche, civilização que viveu na costa do Peru entre os séculos I e XVII. Entre os materiais presentes no sítio arqueológico, destacou-se um colar com frutos de amendoim moldados em ouro e prata (Figura 2), encontrado na tumba de um importante sacerdote do Século III, indicando que a espécie não somente era cultivada, mas possuía um significado cultural (FREITAS; PEÑALOZA; VALLS, 2003). Também no Peru, os Incas costumavam oferecer frutos de amendoim ao deus sol como parte de suas cerimônias religiosas (ARYA; SALVE; CHAUHAN, 2016).

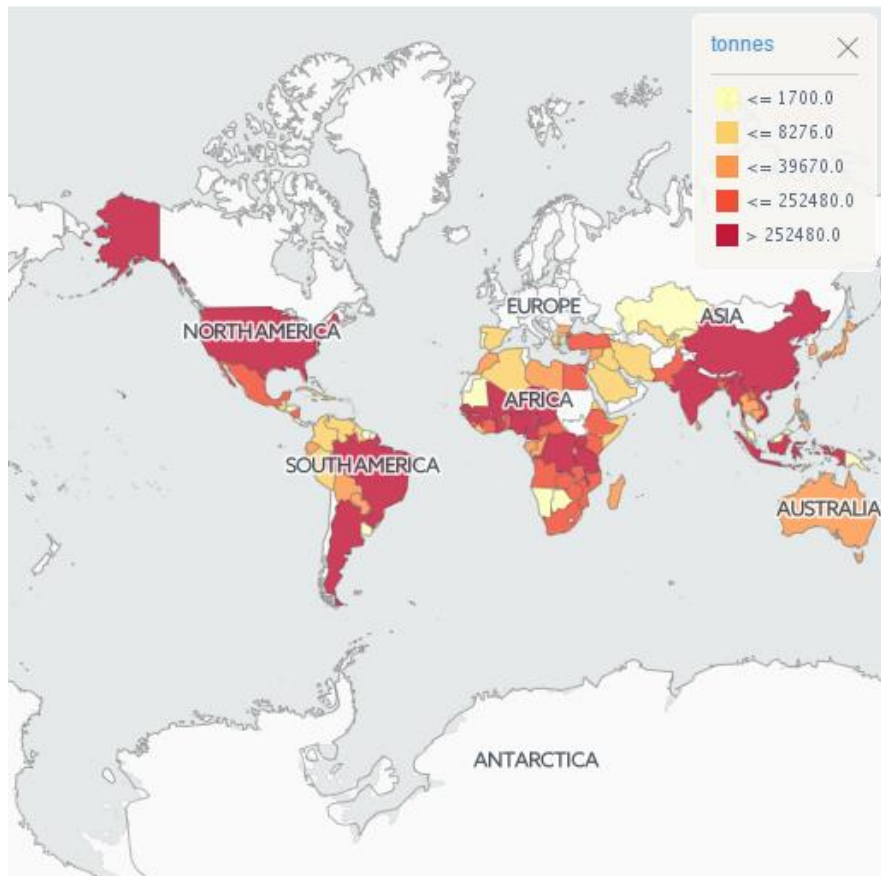
Figura 2 – Colar com frutos de amendoim moldados em ouro e prata, encontrado na tumba do Lorde de Sipán, um importante sacerdote da cultura Moche, que viveu no Peru, século III



Fonte: Stone-Miller, 2002.

Arachis hypogaea é a espécie mais conhecida entre as cultivadas. Devido ao seu uso para alimentação humana, representa a quarta oleaginosa de maior importância econômica no mundo (SILVA et al., 2010), sendo cultivada em mais de 100 países (HUANG et al., 2012), com uma produção de quase 44 milhões de toneladas no ano de 2014, de acordo com a FAO (*Food and Agriculture Organization of the United Nations*) (Figura 3). Suas sementes apresentam grande valor nutritivo, sendo constituídas por cerca de 50% de óleo e 25% de proteína, o que as torna um importante alimento para seres humanos e animais, constituindo uma importante fonte de proteínas na agricultura familiar de comunidades remotas (SCHÄFFER, 2012). O amendoim pode ser utilizado *in natura* ou em derivados, sendo importante ainda para produção de óleo, que é utilizado na culinária de diversos países e constitui também uma matéria-prima promissora para a produção de biodiesel (MACEDO; NOGUEIRA, 2004).

Figura 3 – Mapa de produção mundial de amendoim (*A. hypogaea*) no ano de 2014



Fonte: FAO, 2017.

O amendoim comestível inclui duas subespécies, seis variedades botânicas e grande diversidade de cultivares e raças (KOCHERT et al., 1991; KRAPOVICKAS, 2010a, 2010b; SRINIVASAN; KUMAR; KIRTI, 2010). Entretanto, o processo de domesticação resultou em uma uniformização genética, reduzindo drasticamente sua variabilidade e tornando as culturas susceptíveis a pragas e doenças. Portanto, estudos que visem ao conhecimento e à conservação das demais espécies do grupo, que apresentam ampla variabilidade genética e resistência a doenças, constituem uma ação importante para o melhoramento de *A. hypogaea* (BERTIOLI et al., 2003; DWIVEDI et al., 2007; GALGARO; VALLS; LOPES, 1997).

Outras espécies do gênero, que passaram a ser comercializadas mais recentemente, são utilizadas para alimentação animal, cobertura viva em terrenos inclinados, ornamentação e prevenção da erosão (SRINIVASAN; KUMAR; KIRTI, 2010). São também adotadas na recuperação de solos degradados (VALLS; SIMPSON, 1994; VIJAYA LAXMI; GIRI, 2003), os quais englobam, pelo menos, 150 milhões de hectares no Brasil (EMBRAPA, 2008). A capacidade de fixação de nitrogênio dessas espécies, como das demais leguminosas, deve-se à simbiose com bactérias diazotróficas dos gêneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* e *Azorhizobium*, que formam nódulos ao colonizar as raízes das plantas, resultando no incremento no valor proteico da pastagem (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Dessa forma, as leguminosas forrageiras podem ser utilizadas como adubação verde, no cultivo em sucessão ou em consórcio (GLIESSMAN; ENGLES; KRIEGER, 2000).

O uso consorciado de forrageiras e gramíneas tem como objetivo antecipar e aumentar o período de utilização das pastagens, reduzindo o desmatamento de novas áreas para essa finalidade e promovendo um aumento na disponibilidade de proteína bruta na dieta animal, que gera um aumento no peso vivo do gado e na produção de leite (AZEVEDO et al., 2014; AZEVEDO et al., 2016; CARVALHO; PIRES, 2008; CHEN et al., 2003; LUDWIG et al., 2010). A consorciação com espécies de *Brachiaria* e *Cynodon* tem sido principalmente estudada com o uso de *Arachis glabrata* Benth., *Arachis repens* Handro e *Arachis pintoii* Krapov. & W.C. Greg. (FELTRE, 2013; SIMPSON; VALLS; MILES, 1994; VALLS; SIMPSON, 1994).

Arachis glabrata (Secção *Rhizomatosae*) ocorre no Brasil, Paraguai e na Argentina, tendo sido coletada por W. Andrew Archer e A. Gehrtem, do Departamento Americano de Agricultura (*United States Department of Agriculture - USDA*), em Campo Grande (Mato Grosso do Sul, Brasil) e Posadas (Misiones,

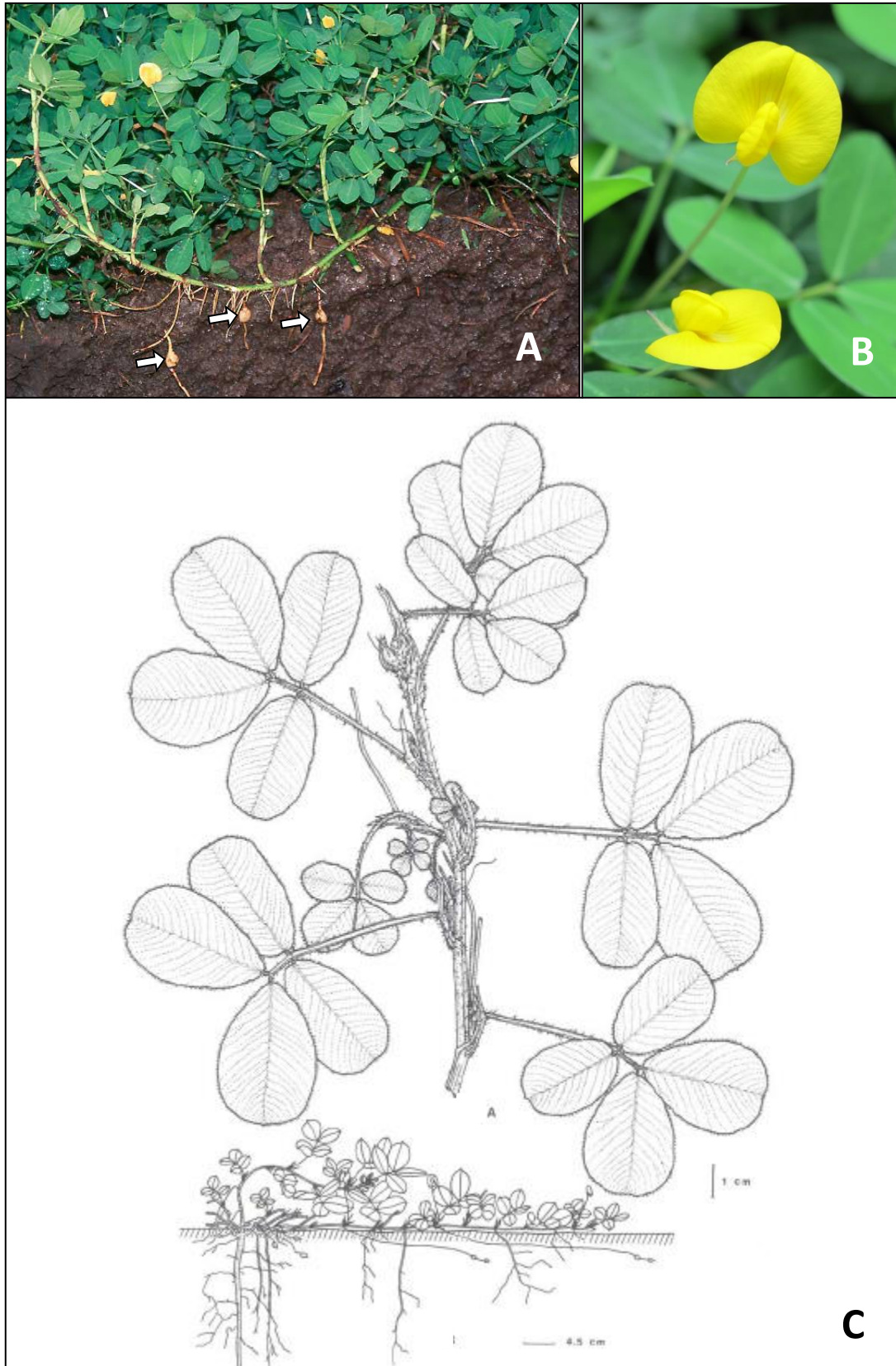
Argentina), e introduzida na Flórida, onde passou a ser cultivada como forrageira. A espécie possui duas variedades, *A. glabrata glabrata* e *A. glabrata hagenbeckii* e é utilizada também na cobertura de solos. Suas folhas são altamente nutritivas, com persistência em longo prazo sob diversos sistemas de pastejo (MAAS; ANDERSON; QUESENBERRY, 2010). A propagação da espécie é principalmente vegetativa, com produção reduzida de sementes (WILLIAMS et al., 2008).

As duas únicas espécies da Secção *Caulorrhizae*, *A. repens* e *A. pintoii*, são nativas do Brasil, dos vales do Paraná e da região dos rios São Francisco e Jequitinhonha (KRAPOVICKAS; GREGORY, 2007). Possuem como principal característica a capacidade de enraizamento dos nós, diferentemente da Secção *Rhizomatosae*, o que facilita a propagação vegetativa. *Arachis repens*, conhecido como grama amendoim, apresenta produção reduzida de sementes e propagação principalmente por meio do desenvolvimento de estolões, sendo utilizada como ornamental e forrageira (AZEVEDO; SILVA; ASSIS, 2011; VEIGA et al., 2003).

1.3.1 *Arachis pintoii* Krapov. & W. C. Greg.

Arachis pintoii, conhecido como amendoim forrageiro, é uma espécie herbácea perene, que alcança de 20 a 60 cm de altura, com crescimento rasteiro, hábito estolonífero (Figura 4A) e um sistema de raízes pivotantes, com profundidade de 0,3 a 1,6 metros. Suas sementes são bastante numerosas e com alta taxa de sobrevivência, protegidas em frutos subterrâneos (Figura 4A). Os frutos são secos do tipo vagem com coloração castanha e apresentam uma ou duas sementes em seu interior. As sementes são constituídas de cotilédones carnosos e não possuem endosperma (exospermadas), sendo envoltas em tegumento (testa) de coloração castanho-clara. Suas flores apresentam coloração amarelada (Figura 4B) e as folhas são tetrafoliadas (Figura 4C), alternadas e compostas, formadas por folíolos obovais cuja razão entre comprimento e largura é menor que dois, apresentando ainda cerdas (emergências septiformes) no caule, estípula, pecíolo e raquis (KRAPOVICKAS; GREGORY, 2007). Seu genoma é diploide ($2n = 20$), embora já tenha sido descrito um acesso que apresenta citotipo triploide ($3n = 30$) (LAVIA et al., 2011).

Figura 4 – Morfologia de *Arachis pintoii*



Legenda: (A) planta completa apresentando floração e formação de vagens geocárpicas indicadas pelas setas; (B) flor; (C) esquema do ramo e da planta completa.

Fontes: http://az.wikipedia.org/wiki/Arachis_pintoii, http://www.tropicalforages.info/key/Forages/Media/Html/Arachis_pintoii.htm, Krapovickas; Gregory (2007).

A espécie tem assumido importância crescente na produção de forragem em áreas tropicais e subtropicais, devido à sua alta qualidade nutritiva, com elevados teores de proteína bruta, associados a uma boa digestibilidade e excelente palatabilidade (KHAMSEEKHIEW; LIANG; JELAN, 2002; MACHADO LADEIRA et al., 2002). Possui tolerância ao sombreamento e boa adaptação a solos ácidos e de baixa fertilidade, sendo também empregada na cobertura de solos em sistemas agroflorestais, jardins e pomares, além do controle de erosão em encostas, devido à sua plasticidade fenotípica (LAVIA et al., 2011; PERIN; GUERRA; TEIXEIRA, 2003; WANG et al., 2013). Em condições de baixa luminosidade, as plantas crescem mais verticalmente com o alongamento do caule e menor densidade de folhas, enquanto que, em condições de pastejo intenso, ocorre redução no tamanho das folhas e no espaçamento dos entrenós, o que resulta na proteção das regiões de crescimento (NASCIMENTO, 2006). No entanto, as plantas apresentam capacidade de manutenção de uma área foliar residual satisfatória, mesmo quando submetidas a pastejo contínuo e intenso (CARVALHO; PIRES, 2008; CARVALHO; QUESENBERRY, 2009; MONTENEGRO; PINZÓN, 1997).

Arachis pintoii é também usada na recuperação de áreas degradadas como pastagens deterioradas e solos empobrecidos pela monocultura, já que sua associação a micro-organismos como fungos e bactérias promove a aceleração das taxas de decomposição e liberação dos nutrientes da matéria orgânica e a agregação do solo, além do acúmulo de nitrogênio e fósforo orgânico nas camadas superficiais (MIRANDA; SAGGIN JÚNIOR; SILVA, 2008; OLIVEIRA et al., 2002, 2003). É importante destacar que *A. pintoii*, assim como *A. repens*, outra espécie da Secção Caulorrhizae, é pouco seletivo, formando nódulos com uma diversidade de rizóbios (bactérias) e associação com um grande variedade de espécies de fungos micorrízicos arbusculares (GÓMEZ-CARABALÍ; RAO; OTERO, 2011; SOARES et al., 2006). A cobertura do solo com *A. pintoii* em sistema de plantio direto, por exemplo, pode reduzir os custos de produção de milho, assim como de outras espécies, sendo equivalente à adubação com 80 kg/ha de nitrogênio (PURCINO et al., 2004). Como cobertura viva, foi estimado que a utilização da espécie proporcionaria a redução ou a eliminação da adubação nitrogenada com fertilizantes sintéticos em pomares (PERIN; GUERRA; TEIXEIRA, 2003). Adicionalmente, devido à sua boa resistência ao fogo, é utilizada também como cerca viva ao redor de

culturas perenes como prevenção contra queimadas acidentais (VALENTIM; CARNEIRO; SALES, 2001).

A propagação de *A. pinto* ocorre através de sementes, estolões ou por meio da coroa contendo parte da raiz (SILVA, 2004). A propagação por sementes caracteriza-se por uma maior velocidade de multiplicação e por plantas com maior produção de sementes do que as multiplicadas vegetativamente (FERGUSON, 1994; FISHER; CRUZ, 1994). Por exemplo, Balzon e Valentim (2005) obtiveram uma produção média de sementes de 816 kg/ha através do plantio de mudas, equivalente a 40% da obtida pelo plantio de sementes.

A distribuição geográfica natural de *A. pinto* compreende os estados de Goiás, Bahia e Minas Gerais, estendendo-se por toda a costa Atlântica no Brasil (CARVALHO, 2004). A primeira coleta da espécie foi realizada em 1954, pelo professor Geraldo C. Pinto, na foz do rio Jequitinhonha, em Boca do Córrego, município de Belmonte (BA), como um único acesso identificado inicialmente como GK 12787 e armazenado no banco de germoplasma da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia como BRA-013251 (PAGANELLA; VALLS, 2002). Essa coleta foi resultado de um trabalho espontâneo de alguns agrônomos brasileiros que realizaram várias expedições a diferentes regiões do Brasil a partir de 1930, com o objetivo de coletar germoplasma de espécies que apresentassem potencial forrageiro.

A partir do primeiro acesso, coletado pelo Prof. Geraldo Pinto em 1954, a espécie foi introduzida em diversos países, onde foram desenvolvidas diferentes cultivares. Na Austrália, após sua introdução em 1987, o acesso deu origem à cultivar Amarillo, que adquiriu reconhecimento comercial. Esse acesso originou também as cultivares Maní Forrageiro Perene (Colômbia), Pico Bonito (Honduras) e Maní Mejorador (Costa Rica). Outras cultivares (Maní Forrageiro e Porvenir) foram desenvolvidas a partir do acesso CIAT 18744, inicialmente coletado pelos pesquisadores J. Valls e W. Werneck em Minas Gerais, em 1981, e armazenado pela Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia como o acesso BRA-012122.

No Brasil, o grupo Sementes Matsuda, em São Paulo, desenvolveu a cultivar Amarillo MG-100, lançada em 1995, que é a mais difundida no país (NASCIMENTO, 2006; SILVA, 2004). Além disso, um clone triploide foi identificado no cultivo de Maní Forrageiro Perenne na Costa Rica, armazenado no Brasil como acesso BRA-031895 (LAVIA et al., 2011; PEÑALOZA; POZZOBON; VALLS, 1996).

Além da Amarillo MG-100, três novas cultivares (Alqueire-1, Belmonte e BRS Mandobi) foram lançadas no Brasil e estão atualmente inscritas no Registro Nacional de Cultivares do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (RNC-MAPA). Essas cultivares têm sido bastante estudadas quanto ao seu potencial agrônomo, sendo seu cultivo implementado em diferentes regiões.

A cultivar Alqueire-1 foi desenvolvida em 1998, no município de Rio Pardo no Rio Grande do Sul, pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), a partir de diferentes acessos fornecidos pela EMBRAPA, sendo utilizada em grande escala pelos produtores do Sul do país, devido à alta tolerância ao frio (PEREZ, 2001).

A cultivar Belmonte, inicialmente reconhecida como *A. repens*, foi reidentificada como *A. pintoi* (PEREIRA; REZENDE; MORENO-RUIZ, 2004). Após seu lançamento, ainda permaneceu pouco difundida, sendo cultivada em cerca de 300 ha por produtores locais em Itabela, na Bahia. Somente após sua divulgação por uma reportagem sobre *Arachis* no programa de TV Globo Rural em 2003, produtores de vários estados do Brasil, incluindo São Paulo, Minas Gerais e Bahia, começaram a solicitar o material para plantio (PEREIRA; REZENDE; MORENO-RUIZ, 2004).

A cultivar Belmonte foi desenvolvida a partir do acesso BRA-0311828 registrado na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia e armazenada, em 1999, na Superintendência da Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira (CEPLAC), em Ilhéus. Embora tenha baixa produção de sementes, possui grande adaptação às condições do sul da Bahia, que apresenta pluviosidade anual entre 1.200 e 1.400 mm e solos ácidos, de baixa e média fertilidade, demonstrando boa adaptação a solos de textura franca (mistura de areia, silte e argila em proporções semelhantes) e tolerância mediana a encharcamentos, sendo altamente produtiva, com grande resistência a pragas e doenças (BARCELLOS et al., 2008; PEREIRA; REZENDE; MORENO-RUIZ, 2004).

No Acre, a introdução da cultivar Belmonte foi um recurso bem-sucedido para transformar os sistemas produtores convencionais, cujas áreas sofriam pastejo intenso e empobrecimento do solo. A adoção do sistema de plantio consorciado entre *A. pintoi* e diferentes gramíneas resultou no desenvolvimento de sistemas agropecuários com alta produtividade e rentabilidade, com redução da utilização de fertilizantes químicos e pesticidas caros e poluentes (VALENTIM; ASSIS; SÁ, 2009).

Dessa maneira, através de um programa de pesquisa e desenvolvimento da EMBRAPA Acre, que já havia introduzido com sucesso outra leguminosa forrageira, *Pueraria phaseoloides* (Roxb.) Benth., com ganhos econômicos de US\$ 33 milhões anuais aos produtores (SHELTON; FRANZEL; PETERS, 2005; VALENTIM; ANDRADE, 2005a; VALENTIM; ASSIS; SÁ, 2009), o amendoim forrageiro foi recomendado como alternativa para recuperação de pastagens que sofriam a síndrome da morte do capim-marandu (*Brachiaria brizantha* (Hochst.) Stapf. cv. Marandu).

Em 2004, mais de 1.000 pequenos, médios e grandes produtores do Acre possuíam pastagens consorciadas de diferentes espécies de gramíneas com amendoim forrageiro com renda anual de US\$ 4 milhões (ANDRADE; VALENTIM, 2007; SHELTON; FRANZEL; PETERS, 2005; VALENTIM; ANDRADE, 2005b; VALENTIM; ASSIS; SÁ, 2009). Em 2013, 138 mil hectares da cultivar Belmonte estavam sendo cultivados em consórcio com *Stylosanthes spp.* 'Campo Grande', com benefícios a milhares de produtores e um ganho anual de R\$ 95 milhões (VALENTIM; ANDRADE, 2015). Devido à sua alta persistência, pastagens de diferentes gramíneas em consórcio com *A. pintoi* vêm sendo mantidas por muitos anos no estado, sem perda da produtividade (PEREIRA, 2002; VALENTIM; ASSIS; SÁ, 2009).

A cultivar BRS Mandobi, registrada em 2008, foi desenvolvida pela EMBRAPA Acre a partir de seleção massal. Tem como características grande produção de sementes, embora apresente altas porcentagens de dormência associada ao tegumento (ASSIS, 2011), ampla faixa de adaptação, desde o nível do mar até 1.800 m de altitude, sobrevivendo a períodos de seca superiores a quatro meses e a geadas em regiões subtropicais (CARVALHO; QUESENBERRY; GALLO, 2010). O potencial forrageiro dessa cultivar vem sendo explorado pela EMBRAPA Acre. Embora seu uso seja mais recente que as demais cultivares, resultados positivos vêm sendo observados, incluindo alto vigor, bom estabelecimento, boa tolerância a terrenos alagados, grande produção de matéria seca e sementes, que são vendidas a preços baixos no mercado (ASSIS; SILVA; AZEVEDO, 2013). O cultivo em consórcio dessa cultivar com capim-marandu e *Pueraria phaseoloides* tem sido realizado com sucesso, atingindo uma taxa de pastoreio de 2,5 animais por hectare, sem irrigação ou adubação nitrogenada. Uma boa persistência em sistemas de consórcio com *Cynodon nlemfuensis* Vanderyst, *Brachiaria brizantha* (Hochst.) Stapf.

e *B. humidicola* (Rendle.) Schweickert. com intenso pastoreio também já foi observada (ASSIS; SILVA; AZEVEDO, 2013).

1.3.2 Potencial biológico e produção de substâncias bioativas no gênero *Arachis*

Além das importantes e reconhecidas características agronômicas das espécies de *Arachis*, um número crescente de trabalhos tem relatado atividades biológicas de extratos obtidos de algumas espécies, apontando possibilidades de prevenção ou tratamento de doenças (LOPES et al., 2011).

Arachis hypogaea vem sendo bastante utilizada como alimento funcional, através do consumo de suas sementes *in natura* ou germinadas, íntegras ou em pó, além de derivados como a pasta de amendoim (KIM; CHANG; KWAK, 2014; ARYA; SALVE; CHAUHAN, 2016). Diversos trabalhos sugerem que o consumo regular desses alimentos está relacionado à prevenção de patologias que comumente acometem pessoas idosas, como doenças cardiovasculares, Alzheimer e artrite reumatoide, assim como a prevenção de diabetes, obesidade e câncer (ARYA; SALVE; CHAUHAN, 2016; GROSSO; ESTRUCH, 2016; RUDKOWSKA, 2009).

Diferentes atividades biológicas já foram descritas para espécies de *Arachis*, incluindo ações antioxidante, anti-inflamatória, antitumoral, antifúngica, antibacteriana, amebicida, anti-helmíntica, hipoglicêmica e hipolipidêmica, antiplaquetária e inibidora de enzimas associadas ao HIV, além de efeitos sedativo e hipnótico (Quadro 1). Para *A. pintoi*, a espécie estudada neste trabalho, já foram observados o efeito alelopático de extratos foliares na germinação de sementes de tomate, pimentão, picão-preto e corda-de-viola (CUNHA et al., 2010; MONTELES et al., 2011), além de atividade antioxidante (SANG et al., 2014) e anti-helmíntica contra *Haemonchus contortus* (VON SON-DE FERNEX et al., 2012).

Quadro 1 – Atividades biológicas já descritas no gênero *Arachis* (continua)

Espécie	Atividade	Material vegetal	Fonte
<i>A. hypogaea</i>	Alelopática	Extratos etanólicos de diferentes regiões das plantas e das sementes	Casimiro et al., 2017b
	Amebicida contra <i>Acanthamoeba</i>	Extrato de cascas de vagens	El-Sayed et al., 2012
	Antibacteriana	Extrato de folhas	Parekh; Chanda, 2008
		Polissacarídeos hidrossolúveis de sementes	Jiang; Ma; Yan, 2014
	Antibacteriana e antifúngica	Proteína hipogina isolada de sementes	Wang et al., 2007
	Antifúngica	Proteína hipogina isolada de sementes	Abdou, 1966
		Proteínas de raízes	Devi; Vashista; Sharma, 2005
		Flavonoide isolado de cascas de vagens	Vaughn, 1995
	Anti-hipertensiva	Proteína araquina isolada de sementes	Jimsheena; Gowda, 2011
	Anti-inflamatória	Proantocianidinas isoladas do tegumento de sementes	Tatsuno et al., 2012
		Estilbenoides isolados de sementes	Chang et al., 2006, Djoko et al., 2007
		Nanopartículas de sementes germinadas	Kim; Chang; Kwak, 2014
	Antioxidante	Extrato metanólico de brotos	Hsu et al., 2002
		Substâncias fenólicas isoladas do exsudato de amendoins germinados	Lee et al., 2007
		Fração solúvel em água de extrato de tegumentos	Monagas et al., 2009
		Fração solúvel em água de extrato de sementes	Duncan; Gorbet; Talcott, 2006
		Substâncias fenólicas extraídas de tegumentos	Sales; Resurreccion, 2010
Proantocianidinas da fração solúvel em água de extrato de tegumentos		Lou et al., 2004	
Estilbenoides de sementes		Chang et al., 2006	
Extrato metanólico de cascas de vagens		Yen; Duh, 1995	

Quadro 1 – Atividades biológicas já descritas no gênero *Arachis* (continuação)

<i>A. hypogaea</i>	Antioxidante	Diferentes extratos de plantas e sementes	Green, 2004
		Fração volátil de extrato de amendoim paquistanês	Abbasi et al., 2009
		Sementes in natura	Emekli-Alturfan; Kasikci; Yarat, 2008, Nouran et al., 2010
		Proantocianidinas isoladas do tegumento	Oldoni et al., 2016
		Polissacarídeos hidrossolúveis de sementes	Jiang; Ma; Yan, 2014
	Antiplaquetária	Flavonoides isolados de cascas de vagens	Tsai et al., 2003
	Antitumoral contra cânceres de cólon, próstata e mama	Fitoesteróis de sementes	Awad et al., 2000, Awad; Williams; Fink, 2001
	Antitumoral contra câncer de próstata	Resveratrol isolado de caules	Chen et al., 2017
	Antitumoral contra leucemia	Estilbenoides isolados de extrato metanólico de amendoins germinados	Huang et al., 2010
	Hipocolesterolêmica	Sementes in natura	Emekli-Alturfan; Kasikci; Yarat, 2008, Lokko et al., 2007, Nouran et al., 2010, Sales et al., 2008
		Sementes, óleo e farinha de amendoim livre de gordura	Stephens et al., 2010
	Hipoglicêmica e hipolipidêmica	Extrato aquoso de sementes	Bilbis; Shehu; Abubakar, 2002
	Hipoglicêmica	Sementes <i>in natura</i>	Emekli-Alturfan; Kasikci; Yarat, 2008, Jenkins et al., 2008
	Hipolipidêmica	Extrato etanólico de cascas de vagens	Moreno et al., 2006
		Sementes <i>in natura</i>	Sales et al., 2008
		Extrato dos brotos	Kang et al., 2014
	Termogênica	Sementes <i>in natura</i>	Alves et al., 2014
	Imunomodulatória	Estilbenoides de sementes	Djoko et al., 2007
		Fitoesteróis de sementes	Bouic, 2001

Quadro 1 – Atividades biológicas já descritas no gênero *Arachis* (conclusão)

<i>A. hypogaea</i>	Inibição enzimática de proteases	Proteínas isoladas de sementes	Norioka; Ikenaka, 1983a, 1983b, Norioka; Omichi; Ikenaka, 1982
	Inibição enzimática em infecção pelo vírus HIV	Proteína hipogina isolada de sementes	Ye; Ng, 2001
	Sedativa e hipnótica	Extrato aquoso de folhas	Zu et al., 2010
	Inibição da fertilidade de pulgão preto (<i>Aphis craccivora</i>)	Tanino condensado procianidina isolado de extratos de pecíolos	Grayer et al., 1992
	Inseticida contra <i>Callosobruchus</i>	Saponinas isoladas de extratos de sementes	Applebaum; Marco; Birk, 1969, Boughdad; Gillon; Gagnepain, 1987
	Larvicida contra vetores da malária e Chikungunya	Extratos etanólicos e metanólicos do tegumento	Velu et al., 2015
<i>A. paraguariensis</i>	Inibição do desenvolvimento de larvas de <i>Spodoptera litura</i>	Derivados do ácido caféico e flavonoides isolados de extrato metanólico de folhas	Stevenson et al., 1993
<i>A. repens</i>	Antioxidante	Extratos metanólicos de folhas	Garcia et al., 2016
<i>A. pintoi</i>	Alelopática	Extrato aquoso de folhas	Cunha et al., 2010, Monteles et al., 2011
	Anti-helmíntica contra <i>Haemonchus contortus</i>	Extrato de folhas	Von Son-De Fernex et al., 2012
	Antioxidante	Extrato hidroalcoólico de folhas	Sang et al., 2014

As atividades biológicas das espécies de *Arachis* estão associadas à presença de substâncias de diferentes grupos, incluindo ácidos fenólicos, fitoesteróis, triterpenos, flavonoides, estilbenoides, alcaloides, ácidos graxos e policosanois (CHERIF et al., 2010; LOPES et al., 2011).

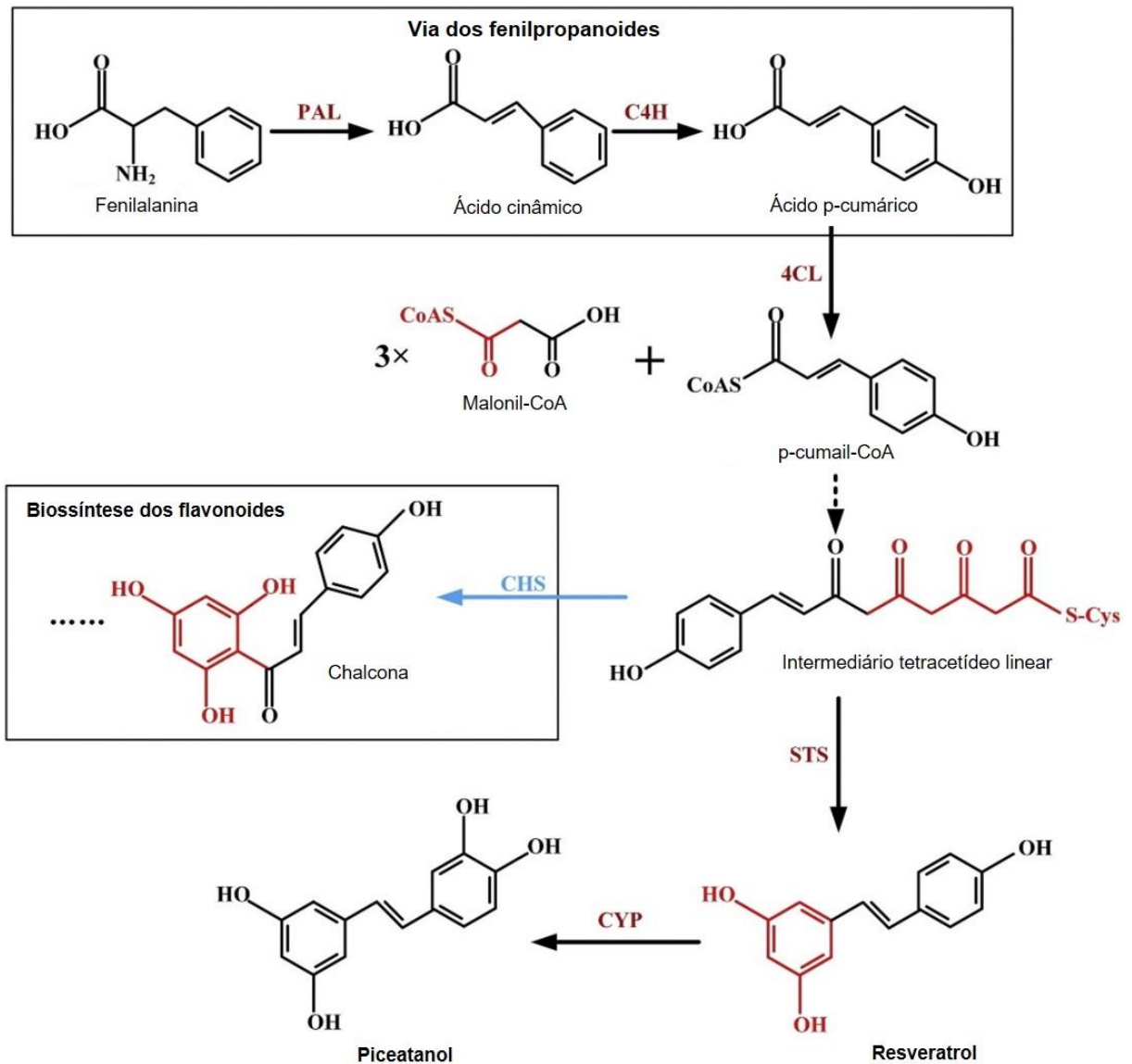
As substâncias fenólicas vêm sendo bastante estudadas em *Arachis* e são essenciais para o crescimento e a reprodução das plantas, sendo produzidas em resposta a fatores ambientais, como luminosidade, temperatura e poluição, ou injúrias, como ataque de patógenos e herbivoria. Essa classe inclui substâncias com

estrutura molecular bastante diversa, sendo caracterizadas pela presença de anéis aromáticos hidroxilados (GHASEMZADEH; GHASEMZADEH, 2011; LIU, 2013; MANDAL; CHAKRABORTY; DEY, 2010). A presença desses grupamentos hidroxila está associada ao potencial antioxidante apresentado por essas substâncias, as quais são capazes de neutralizar espécies reativas de oxigênio (CHANG; HSU; CHEN, 2010).

Os estilbenoides e flavonoides são as substâncias fenólicas mais comumente encontradas no gênero *Arachis* (LOPES et al., 2011) e apresentam uma vasta gama de atividades biológicas. Essas moléculas são derivadas de via biossintética mista, cujos precursores diretos são o *p*-cumaroil-CoA e o malonil-CoA, um intermediário da síntese de lipídios. A estrutura básica dessas moléculas é formada por dois anéis aromáticos ligados por uma ponte de dois carbonos, no grupo dos estilbenoides, ou de três carbonos, no grupo dos flavonoides (Figura 5).

Entre os flavonoides encontrados em *Arachis*, encontram-se diversas isoflavonas (biochanina A, daidzina, daidzeína, genistina e genisteína) e um flavonol (quercetina). Essas substâncias podem atuar como sinalizadores no processo de fixação do nitrogênio e na proteção contra estresses, já tendo sido detectadas em sementes e plântulas de diferentes genótipos de *A. hypogaea* (CHUKWUMAH et al., 2007; KIRAKOSYAN et al., 2007; SALES; RESURRECCION, 2010). Nas sementes, principalmente nos extratos de tegumento, foram também observadas proantocianidinas, oligômeros de flavonoides conhecidos como taninos condensados, e monômeros de flavonoides, como catequina, epicatequina, epigallocatequina, catequina galato e epigallocatequina galato (OLDONI et al., 2016; YU et al., 2006). Além disso, a presença de flavonas foi detectada nas cascas dos frutos (QIU et al., 2012).

Figura 5 – Via biossintética mista de flavonoides e estilbenoides



Legenda: PAL: fenilalanina amonialiase, C4H: ácido cinâmico 4-hidroxilase, 4CL: 4-cumarato CoA ligase, CYP: gene citocromo P450, STS: estilbeno sintase.

Fonte: adaptado de Deng et al., 2017.

Flavonoides foram também encontrados em raízes (MARKA et al., 2013; NGUYEN KIM et al., 2013) e flores de plantas de *A. hypogaea* cultivadas em casa de vegetação (SOBOLEV; SY; GLOER, 2008). Nas flores, foram observados flavonoides conjugados derivados de quercetina, isoramnetina e espermidina (SOBOLEV; SY; GLOER, 2008). Utilizando eliciadores bióticos, Rao, Wadia e

Strange (1996) obtiveram daidzeína, isoflavanona, formononetina e medicarpina em folhas de plantas mantidas em casa de vegetação. Em partes aéreas de plantas de *A. pintoi*, cultivares Belmonte e Amarillo MG-100, foram detectados os derivados fenólicos vanilina e quercetina, além de taninos e outros ácidos fenólicos (LAGE, 2009).

Estilbenoides, como o resveratrol e o piceatanol (3,4,3',5'-tetraidroxi-trans-estilbeno), também têm sido amplamente estudados em espécies de *Arachis* (Quadro 2), principalmente devido às suas atividades na prevenção e tratamento de doenças cardiovasculares, cânceres, processos inflamatórios e doenças relacionadas à idade (KING; BOMSER; MIN, 2006). O resveratrol pode ser encontrado sob as formas *cis* e *trans* (Figura 6), sendo a segunda a mais frequente e com maior atividade biológica (KING; BOMSER; MIN, 2006). Embora tenha sido inicialmente identificada em uvas, essa substância é também produzida por diversos grupos de plantas em resposta a estresses bióticos e abióticos, como ataque de fungos e patógenos, injúrias mecânicas e radiação UV, entre outros (TOKUŞOĞLU; ÜNAL; YEMİŞ, 2005).

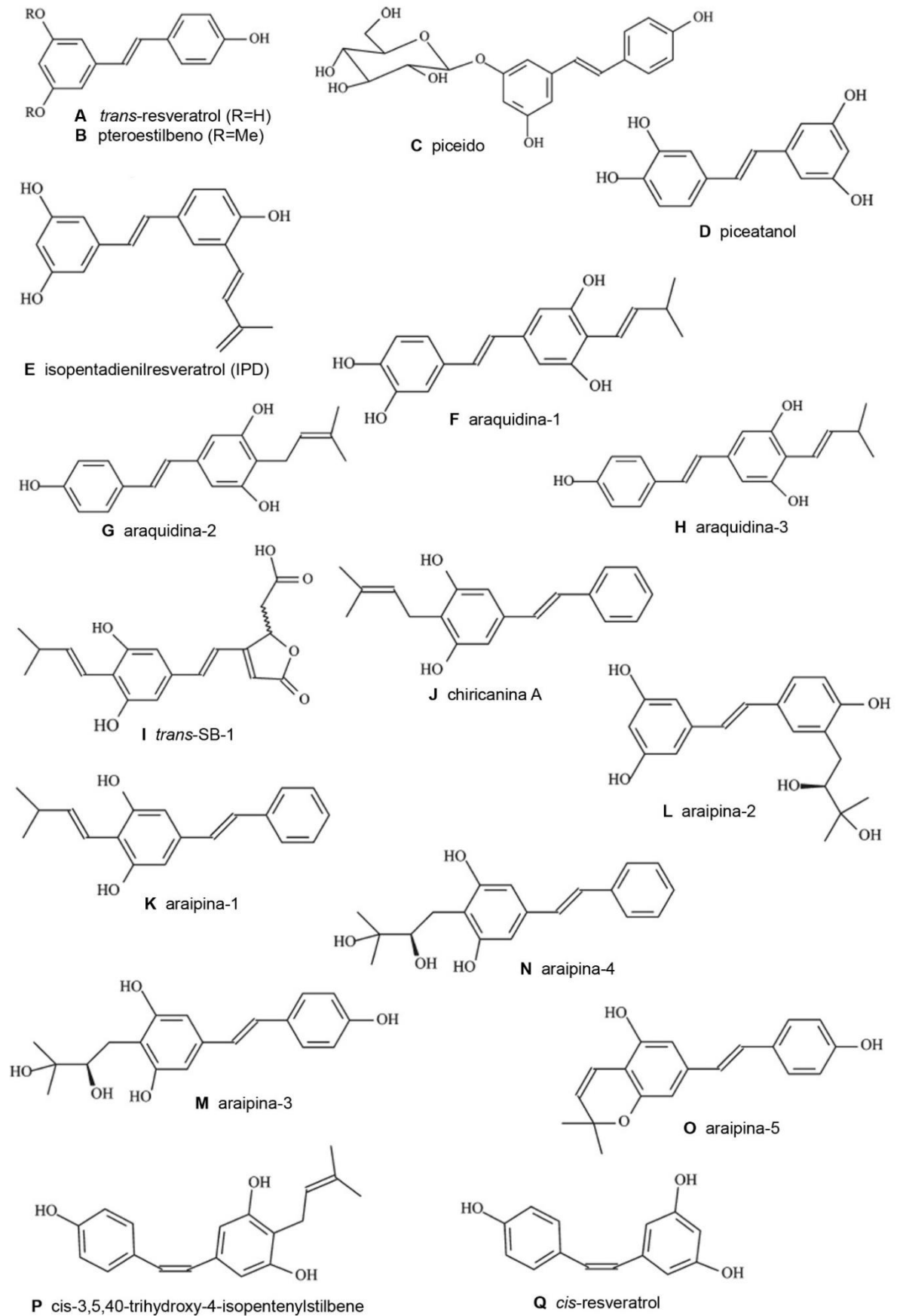
O amendoim e seus derivados são considerados, juntamente com as uvas, as principais fontes de resveratrol na alimentação humana (CASSIDY; HANLEY; LAMUELA-RAVENTOS, 2000). Em *A. hypogaea*, o resveratrol foi encontrado em raízes, folhas, sementes, vagens e em sistemas de cultura de tecidos e células (CASIMIRO et al., 2017a; KU et al., 2005; MEDINA-BOLIVAR et al., 2007; PARK et al., 2003). Nas demais espécies do gênero, o resveratrol já foi descrito em folhas de espécies das Secções *Arachis*, *Extranervosae*, *Triseminatae*, *Procumbentes* e *Caulorrhizae* (GARCIA et al., 2016; LOPES et al., 2013), incluindo *A. pintoi* Krapov. & W.C. Greg (CARVALHO, 2017). Mais recentemente, a produção de resveratrol também foi descrita em culturas de calos de *A. repens* estabelecidas a partir de segmentos caulinares e foliares excisados de plantas *in vitro* (GARCIA et al., 2018).

Além do resveratrol, outros estilbenoides já foram descritos em espécies do gênero *Arachis* (Figura 6, Quadro 2). Entre os de ocorrência natural, encontram-se piceido, isopentadienilresveratrol (IPD) (*trans*-3'-isopentadienil-3,5,4'-triidroxiestilbeno), piceatanol, araquidina-1 [*trans*-4-(3-metil-1-butenil)-3,5,3',4'-tetraidroxiestilbeno], araquidina-2, araquidina-3 [*trans*-4-(3-metil-1-butenil)-3,5,4'-triidroxiestilbeno] e *trans*-SB-1. No entanto, alguns estilbenoides somente foram descritos em materiais expostos a diferentes tipos de eliciadores, ou seja, de

agentes físicos, químicos ou biológicos que simulam condições de estresse. Entre esses, destacam-se a chiricanina A (*trans*-4'-desoxiaraquidina-2), araipina-1 (*trans*-4'-desoxiaraquidina-3), araipina-2 [*trans*-3'-(2'',3''-diidroxi-3''-metilbutil)-resveratrol], araipina-3 [*trans*-4-(2'',3''-diidroxi-3''-metilbutil)-resveratrol], araipina-4 [*trans*-4-(2'',3''-diidroxi-3''-metilbutil)-4'-desoxiresveratrol] e araipina-5 (LOPES et al., 2011).

A análise de substâncias fenólicas em *Arachis*, principalmente do grupo dos estilbenoides, tem sido realizada por diferentes técnicas analíticas acopladas a métodos cromatográficos de separação (HURTADO-GAITÁN et al., 2017). Para detecção de *trans*-resveratrol, por exemplo, os principais métodos utilizados são a cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG – EM), a cromatografia líquida em fase reversa e a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detecção por espectroscopia UV-visível e fluorescência e a cromatografia líquida de ultra eficiência (CLUE) (BRIZZI; BRIZZI; CORRADINI, 2008; CARERI et al., 2003; HURTADO-GAITÁN et al., 2017; KARACABEY; MAZZA, 2008; OMAR et al., 2014).

Figura 6 – Fórmulas estruturais de alguns dos estilbenoides encontrados em *Arachis*



Fonte: adaptado de Lopes et al., 2011.

Quadro 2 – Estilbenoides identificados em *Arachis* com base em sua massa e espectro ultravioleta (continua)

Substância	Massa [M+H] ⁺ (m/z)	Massa [M-H] ⁻ (m/z)	UV _{máx} (nm)	Referência
Piceido	391	389	217, 307, 320	Potrebko e Resurreccion (2009)
Pterostilbeno	-	255	219, 309, 320	Sobolev et al. (2011)
Piceatanol	245	-	240, 324	Yang et al. (2016)
<i>trans</i> -resveratrol	229	-	237, 306, 317	Yang et al. (2016)
<i>trans</i> -araquidina-1	313	-	243, 341	Yang et al. (2016)
<i>trans</i> -araquidina-2	297	-	239, 311, 323	Yang et al. (2016)
<i>trans</i> -araquidina-2 derivativo	295	-	238, 350	Yang et al. (2016)
<i>trans</i> -araquidina-3	297	-	243, 335	Yang et al. (2016)
<i>trans</i> -araquidina-5	313	-	240, 327	Yang et al. (2016)
<i>trans</i> -araquidina-5 derivativo	311	-	240, 355	Yang et al. (2016)
<i>trans</i> -araquidina-6	311	309	342	Bruijn et al. (2018)
<i>trans</i> -IPD	295	293	295	Sobolev, Potter e Horn (2006), Huang et al. (2010)
mucilagina-A	325	-	212, 241, 338	Sobolev, Potter e Horn (2006)
SB-1	345	-	363	Sobolev, Deyrup e Gloer (2006)
chiricanina A	281	-	209, 312	Sobolev, Neff e Gloer (2009)
chiricanina B	297	-	234, 301, 311	Sobolev, Krausert e Gloer (2016)
araipina-1	281	-	217, 327	Sobolev, Neff e Gloer (2009)
araipina-2	331	-	213, 306, 317	Sobolev, Neff e Gloer (2009)
araipina-3	331	-	210, 306, 320	Sobolev, Neff e Gloer (2009)
araipina-4	315	-	311	Sobolev, Neff e Gloer (2009)
araipina-5	295	-	217, 270, 339	Sobolev, Neff e Gloer (2009)

Quadro 2 – Estilbenoides identificados em *Arachis* com base em sua massa e espectro ultravioleta (conclusão)

araipina-6	607	-	224, 272, 339	Sobolev, Neff e Gloer (2010)
araipina-7	623	-	224, 270, 247	Sobolev, Neff e Gloer (2010)
araipina-8	-	587	222, 314	Liu, Wu e Huang (2013a)
araipina-9	-	605	227, 320	Liu, Wu e Huang (2013a)
araipina-10	-	293	230, 275, 323	Liu, Wu e Huang (2013a)
araipina-11	-	587	221, 312	Liu, Wu e Huang (2013b)
araipina-12	-	603	225, 320	Liu, Wu e Huang (2013b)
araipina-13	279	-	233, 267, 334	Sobolev, Krausert e Gloer (2016)
araipina-14	313	-	236, 305	Sobolev, Krausert e Gloer (2016)
araipina-15	313	-	229, 307, 321	Sobolev, Krausert e Gloer (2016)
acetonida de araipina-4	356	-	237, 307	Sobolev, Krausert e Gloer (2016)
MIP	-	325	223, 309	Liu, Wu e Huang (2013b)
4,5'-diidroxil-6''-hidroximetil,6''-metilpirano [2'',3'':3',4']estilbeno	310	-	340	Chiou et al. (2017)
3,4,5'-triidroxil-6''-6''-dimetilpirano [2'',3'':3',4']estilbeno	310	-	340	Chiou et al. (2017)

1.3.3 Sistemas de produção de metabólitos *in vitro* em *Arachis*

Diversos sistemas de cultura de tecidos já foram desenvolvidos para o gênero *Arachis*, e alguns já vêm sendo explorados com o objetivo da produção de metabólitos secundários (KU et al., 2005). Para *A. hypogaea*, já foram estabelecidas culturas de calos, células em suspensão e raízes induzidas por *Agrobacterium rhizogenes* (CONDORI et al., 2010; GUPTA; SINGHAL, 1996; KU et al., 2005;

MEDINA-BOLIVAR et al., 2007; SEAL et al., 2001; VENKATACHALAM; SUBRAMANIAMPILLAI; JAYABALAN, 1996). Algumas abordagens têm sido ainda adotadas para otimização desses sistemas, como por exemplo, a utilização de biorreatores em co-cultivo de raízes de *A. hypogaea* com raízes de *Artemisia annua* L. ou empregando agentes eliciadores (CONDORI et al., 2010; YANG et al., 2010a). No entanto, ao contrário do que ocorre com *A. hypogaea*, a produção de metabólitos em sistemas *in vitro* é relativamente pouco investigada para as demais espécies do gênero.

Estudos de cultura de tecidos do gênero *Arachis* vêm sendo realizados no Laboratório de Micropropagação e Transformação de Plantas (LABMIT) do Núcleo de Biotecnologia Vegetal da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (NBV-UERJ) nos últimos 20 anos, para *A. hypogaea* e outras espécies das Secções *Arachis*, *Extranervosae*, *Erectoides*, *Procumbentes*, *Triseminatae*, *Heteranthae* e *Caulorrhizae*. Esses estudos resultaram no desenvolvimento de sistemas de calogênese, organogênese, embriogênese somática e rizogênese, os quais serviram de base para o estabelecimento de estratégias eficientes para a conservação *in vitro*, avaliação da estabilidade genética de materiais *in vitro* e transformação genética, além de avaliação fitoquímica e de atividades biológicas (CASIMIRO et al., 2017a, 2017b; GAGLIARDI et al., 2000, 2002a, 2002b, 2003, 2004, 2007; GARCIA et al., 2016; 2018; PACHECO et al., 2006, 2007a, 2007b, 2008a, 2008b, 2009; SANTOS-TIERNO, 2017; SOUSA, 2015).

Para *A. pintoii*, a espécie estudada neste trabalho, os primeiros protocolos de cultura de tecidos foram desenvolvidos na Argentina, no *Instituto de Botánica del Nordeste* (IBONE). A produção de plantas *in vitro* foi obtida por organogênese (REY et al., 2000) e embriogênese somática (REY; MROGINSKI, 2006), utilizando como explantes folhas de plantas de campo. Adicionalmente, foram também estabelecidos protocolos de conservação *in vitro* por meio da criopreservação (REY et al., 2009).

Mais recentemente, *A. pintoii* tem sido objeto de estudos biotecnológicos no LABMIT/UERJ, visando aprofundar o conhecimento e agregar valor à espécie através da investigação da produção de substâncias bioativas, principalmente de estilbenoides. A morfogênese *in vitro* foi então estudada utilizando explantes de sementes e de plantas produzidas *in vitro*, tendo sido estabelecidas condições para a obtenção de plantas por organogênese, para a indução de raízes adventícias e

para a produção de diferentes tipos de calos morfogênicos e não-morfogênicos (friáveis, compactos, heterogêneos e mucilaginosos) (SOUSA, 2015).

Desta forma, dando continuidade aos estudos já realizados com essa espécie, o potencial citotóxico de extratos hexânicos e etanólicos das sementes de *A. pintoii* contra linhagens de células tumorais foi investigado neste trabalho. O extrato hexânico foi ainda fracionado, buscando identificar os constituintes com maior atividade presentes no óleo. As culturas de raízes estabelecidas anteriormente foram otimizadas, visando ao aumento das suas taxas de multiplicação. Além disso, o processo morfogênico de indução das raízes a partir de cotilédones foi investigado, definindo sua origem e estrutura. Extratos etanólicos de calos e de raízes adventícias foram ainda analisados com enfoque na produção de resveratrol e no potencial antioxidante.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Este trabalho teve como objetivo geral aprofundar o estudo de sementes e materiais produzidos *in vitro* de *Arachis pintoi*, visando ao estudo da produção de substâncias bioativas e à avaliação de atividades biológicas.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar o potencial citotóxico de extratos etanólicos e hexânicos e de frações selecionadas do extrato hexânico obtidos a partir de sementes contra cinco linhagens tumorais;
- Realizar estudo histológico de raízes adventícias induzidas a partir de explantes de cotilédones;
- Otimizar as taxas de multiplicação de raízes adventícias usando diferentes tipos e concentrações de auxinas;
- Avaliar extratos etanólicos de raízes adventícias e de calos derivados de explantes de sementes por meio da determinação do conteúdo de fenóis totais, da atividade antioxidante e do perfil fitoquímico por CLAE.

3 ATIVIDADE CITOTÓXICA DE EXTRATOS DE SEMENTES E IDENTIFICAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DE UMA FRAÇÃO ATIVA DO ÓLEO POR CROMATOGRÁFIA COM FASE GASOSA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS (CG-EM)

3.1 Introdução

Nos últimos anos, o consumo de sementes de amendoim (*A. hypogaea*) tem sido relacionado à prevenção de doenças cardiovasculares, diabetes tipo dois, Alzheimer e vários tipos de câncer (ARYA; SALVE; CHAUHAN, 2016; BISHI et al, 2015; REIS et al., 2013). Outras atividades, incluindo proteção contra a resistência à insulina pela redução no processo inflamatório do tecido adiposo (VASSILIOU et al., 2009), redução os níveis de colesterol e triglicerídeos (EMEKLI-ALTURFAN; KASIKCI; YARAT, 2008) e promoção da perda de peso pelo aumento da termogênese e pelo controle da saciedade (ALVES et al., 2014; HIGGS, 2005) foram também relatadas. Esses efeitos vêm sendo relacionados à presença de esteroides, substâncias que pertencem à classe dos terpenoides e que são encontradas em altas concentrações em grãos, óleos vegetais e sementes oleaginosas (ALISSA; FERNS, 2012), bem como à alta concentração de determinados ácidos graxos benéficos à saúde humana no óleo obtido a partir das sementes (ARYA; SALVE; CHAUHAN, 2016).

Os ácidos graxos são os principais constituintes de triacilgliceróis, fosfolipídios e outros lipídios complexos. Em *Arachis*, são importantes para determinação da qualidade das sementes, incluindo benefícios à saúde, sabor e durabilidade de seus produtos. Os principais ácidos graxos encontrados nessas espécies são o oleico e o linoleico, que correspondem a cerca de 80% do óleo, além de palmítico, esteárico, araquídico, gadoleico, behênico e lignocérico, encontrados em menor quantidade (WANG et al., 2015). Alguns ácidos graxos insaturados e poli-insaturados já foram identificados por sua atuação na prevenção de doenças cardiovasculares e cânceres, na regulação do colesterol e da pressão sanguínea, além de outros efeitos benéficos à saúde (CALDER, 2015).

Os esteroides são produzidos nas plantas pela via do mevalonato, sendo que sua biossíntese, composição e concentração são reguladas por níveis hormonais e

pelas condições ambientais (MATHUR, 2012; MOREAU; WHITAKER; HICKS, 2002; PAVLÍK et al., 2010). Os esteroides atuam na estabilidade da membrana fosfolipídica, de forma homóloga ao colesterol (MOREAU; WHITAKER; HICKS, 2002; THIMMAPPA et al., 2014) e também atuam como hormônios ou precursores hormonais (MATHUR, 2012). Os fitoesteróis mais comumente encontrados são o sitosterol, o campesterol e o estigmasterol (MOREAU; WHITAKER; HICKS, 2002).

O teor e os tipos de fitoesteróis variam em sementes de *Arachis*. Enquanto que Formo e Bailey (1979) obtiveram cerca de 0,5% de fitoesteróis em óleo de *Arachis hypogaea*, uma avaliação mais recente da composição do óleo de quatro variedades mostrou que o teor varia de acordo com o genótipo, tendo sido encontrados entre 63,3 e 126,9 mg de fitoesteróis/100g de sementes secas, sendo o β -sitosterol o mais abundante (AWAD et al., 2000).

Grosso et al. (1997) avaliaram a presença de fitoesteróis em sementes de diferentes acessos de *A. correntina* (Burkart) Krapov. & W.C. Greg. (sin. *A. villosa* Benth.), *A. durannensis* Krapov. & W.C. Greg. (sin. *A. argentinensis* Speg., *A. spegazzinii* M. Greg. & W.C. Greg.), *A. monticola* Krapov. & Rigoni, *A. batizocoi* Krapov. & W.C. Greg. e *A. cardenasii* Krapov. & W.C. Greg. coletados na Argentina e na Bolívia. A extração foi realizada em Soxhlet com éter de petróleo, tendo sido detectados campesterol, estigmasterol, Δ^5 -avenasterol, Δ^7 -avenasterol, Δ^7 -estigmasterol e o mais predominante, β -sitosterol, que correspondeu a 55,7 a 58,7% do conteúdo total de fitoesteróis. Posteriormente, Grosso, Nepote e Guzmán (2000) também estudaram a composição de fitoesteróis em sementes de espécies de diferentes Seções, incluindo *A. pintoii* (*Caulorrhizae*), utilizando a mesma metodologia para preparo dos extratos. Foi observada uma variação entre 55,7 e 60,2% no conteúdo de β -sitosterol em relação aos fitoesteróis totais, semelhante ao que foi encontrado nas espécies estudadas anteriormente.

Diversas atividades biológicas já foram associadas aos fitoesteróis, como antiaterosclerótica, antiulcerogênica (BERGER; JONES; ABUMWEIS, 2004), antifúngica (SMANIA et al., 2003), antioxidante (YOSHIDA; NIKI, 2003), angiogênica em casos de danos isquêmicos cerebrais (CHOI et al., 2002), quimiopreventiva (IMANAKA et al., 2008), imunomodulatória (BOUIC, 2001) e anti-inflamatória (BACKHOUSE et al., 2008). Além disso, alguns fitoesteróis podem atuar no tratamento e na prevenção de respostas proliferativas de linfócitos, tuberculose pulmonar, infecção pelos vírus de imunodeficiência felina e HIV, supressão imune

induzida por estresse, artrite reumatoide, sinusite e rinite alérgicas (BERGER; JONES; ABUMWEIS, 2004).

Estudos com alimentos nutracêuticos demonstraram ainda que a ingestão de sitosterol inibe a absorção intestinal de colesterol (BARTNIKOWSKA, 2009), previne doenças cardiovasculares (GENSER et al., 2012) e reduz o risco de cânceres de pulmão, mama, estômago, esôfago, próstata, cólon, reto, endométrio e ovário (BIN SAYEED; AMEEN, 2015). Além da prevenção, também já foi demonstrada sua atividade citotóxica contra tumores de cólon (BASKAR et al., 2010), próstata (AWAD et al., 2000) e mama (AWAD et al., 2007; AWAD; WILLIAMS; FINK, 2001). Dessa forma, por apresentar altas concentrações de fitoesteróis, principalmente β -sitosterol, o óleo de amendoim pode ser considerado uma opção mais saudável para a substituição de outros tipos de óleos usados na alimentação.

Considerando o potencial de aplicações do óleo de sementes de *Arachis* e o número reduzido de trabalhos com foco nesse aspecto, um dos objetivos do presente trabalho foi avaliar o potencial citotóxico de extratos etanólicos e hexânicos (óleo) de sementes de *A. pintoi*, assim como de suas frações. A composição de uma das frações foi investigada por CG-EM.

3.2 Metodologia

3.2.1 Preparo dos extratos brutos

Frutos de *Arachis pintoi* (cv. Amarillo MG-100) adquiridos comercialmente (BRSEEDS Produção e Comércio de Sementes LTDA) foram descascados manualmente para retirada das sementes. Um total de 1,5 kg de sementes foram secas em estufa a 40°C e trituradas em moinho. O óleo foi extraído por maceração com *n*-hexano até esgotamento. O resíduo da amostra foi extraído novamente por maceração com etanol até esgotamento para extração dos componentes mais polares. O solvente foi evaporado sob pressão reduzida (Evaporador Rotativo Marconi – M120) a 50°C e o extrato bruto foi armazenado a -20°C.

3.2.2 Fracionamento do extrato hexânico bruto por cromatografia em coluna

Uma amostra de 100 g do óleo bruto extraído das sementes foi fracionada por cromatografia em coluna (5 cm de diâmetro por 100 cm de altura), utilizando-se como fase estacionária gel de sílica. A fase móvel foi constituída por uma mistura de solventes em gradiente crescente de polaridade (hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol - Vetec®), de acordo com o quadro 3.

O monitoramento das frações coletadas foi realizado por cromatografia em camada delgada (CCD). Para isso, as amostras foram aplicadas em placas de cromatografia de gel de sílica com auxílio de capilares, utilizando diferentes fases móveis. A revelação foi realizada com solução de ácido sulfúrico em etanol a 10%, seguida de aquecimento a 100°C. Para a diferenciação das substâncias, foi determinado o valor de R_f, que consiste na razão entre a distância percorrida pela mancha, medida no centro da mancha, a partir da linha base e a percorrida pela fase móvel.

Quadro 3 – Gradiente de solventes e frações do extrato hexânico de sementes de *A. pintoii* obtidas por cromatografia em coluna com gel de sílica

Solvente	Fração
Hexano 100%	1 a 7
Hexano e diclorometano (9:1)	8 a 11
Hexano e diclorometano (3:1)	12 a 18
Hexano e diclorometano (1:1)	19 a 27
Hexano e diclorometano (1:3)	28 a 31
Diclorometano 100%	32 a 36
Diclorometano e acetato de etila (8:2)	37 a 43
Diclorometano e acetato de etila (1:1)	44 a 47
Diclorometano e acetato de etila (2:8)	48 a 49
Acetato de etila 100%	50 a 52
Acetato de etila e metanol (1:1)	53 a 56
Metanol 100%	57 a 63

3.2.3 Esterificação da fração selecionada de extrato hexânico

Com base nos resultados da CCD, a fração 41 do extrato hexânico foi selecionada para as análises por Cromatografia com fase Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM). Para isso, foi realizada uma esterificação prévia dessa amostra, com a adição de 20 mL de solução contendo 0,9 mL de metóxido de sódio em metanol + 9,1 mL de metanol + 10 mL de éter etílico a 400 mg de extrato hexânico. Em seguida, foram acrescentados 60 mL de solução aquosa de cloreto de sódio a 10%. A reação ocorreu em banho ultrassônico por 15 minutos. Para solubilizar os ésteres formados, foram adicionados 12 mL de diclorometano e a reação foi novamente levada a banho ultrassônico por 10 minutos. A fase inferior, diclorometano, foi coletada e filtrada com sulfato de sódio anidro. O solvente foi evaporado e a amostra ressuspensa em 1 mL de diclorometano antes da análise por CG-EM.

3.2.4 Cromatografia com fase gasosa acoplada a espectrometria de massas

A amostra esterificada foi analisada por CG-EM, em colaboração com a professora Dra. Mônica Marques, da Central Analítica Fernanda Coutinho da UERJ.

As frações (solução 1% em diclorometano) foram analisadas em equipamento Scion 456-GC-TQ-MS Brucker, utilizando uma Coluna SMS-30m Brucker. As condições empregadas foram temperatura do injetor de 250°C com divisão de fluxo de 1:10; interface a 240°C; temperatura do detector 300°C e fonte de íons (70 eV), hélio a fluxo constante de 0,5 mL/min e programação de temperatura de 60 a 270°C, 3°C/min.

3.2.5 Avaliação da atividade citotóxica

A avaliação da atividade citotóxica dos extratos hexânicos e etanólicos brutos das sementes, assim como das frações combinadas 34-40 e 41 produzidas a partir do extrato bruto hexânico foi realizada no Laboratório de Imunologia Aplicada e Bioquímica de Proteínas e Produtos Naturais da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, em colaboração com as professoras Dras. Kátia Costa de Carvalho Sabino, Maria da Graça Justo de Araújo e Gislaine Pereira da Silva.

As amostras foram submetidas ao ensaio MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio bromida). O MTT é reduzido a formazan pela atividade mitocondrial, sendo assim utilizado para determinar a sobrevivência das células tumorais em resposta aos tratamentos e, portanto, avaliar a citotoxidez dos extratos (VAN MEERLOO; KASPERS; CLOOS, 2011).

3.3.5.1 Cultivo das linhagens celulares

Foram utilizadas cinco diferentes linhagens celulares, incluindo duas leucêmicas: leucemia mieloide crônica humana (K562) e leucemia linfoblástica aguda de células T humanas (Jurkat), e três linhagens provenientes de tumores sólidos: adenocarcinoma de mama (MCF7), adenocarcinoma de próstata (PC3) e adenocarcinoma alveolar basal (A549). As células foram cultivadas em meio RPMI 1640 contendo 10% de Soro Fetal Bovino (SFB), 70 mg/L de penicilina G potássica e 100 mg/L de estreptomicina (meio completo) e mantidas a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO₂, sendo subcultivadas três vezes por semana. As células aderentes eram destacadas das garrafas por tratamento com 0,25% de tripsina + 0,53 mM de EDTA, seguido de neutralização com meio contendo 10% soro fetal bovino, centrifugação (400 x g) por 5 min e suspensão em meio completo.

3.2.5.2 Determinação da citotoxicidade das amostras pelo ensaio MTT

As amostras foram inicialmente solubilizadas em dimetilsulfóxido (DMSO) a 100 mg/mL. Os volumes foram ajustados para as concentrações desejadas com meio de cultura, sendo padronizada a concentração final de 100 µg/mL na primeira etapa dos experimentos. O CI_{50} das amostras (concentração inibitória de 50% da viabilidade) com maior atividade foi determinado usando as concentrações finais de 0, 1, 10, 20, 40, 60, 80 e 100 µg/mL.

As células tumorais em concentração de 5×10^4 /mL foram cultivadas por 70 horas a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO_2 em placa de 96 poços contendo os diferentes extratos em um volume final de 100 µL por poço. Como controle negativo, as células foram incubadas sem a presença de extratos. Após este período, 10 µL de solução de MTT (Sigma®, EUA) a 5 mg/mL em tampão fosfato-salino (PBS) e pH 7,4 foi adicionado a cada poço, seguido de incubação por mais 2 horas nas mesmas condições já descritas. Os cristais de formazan produzidos foram solubilizados pela adição de 100 µL de solução de dodecilsulfato de sódio (SDS, Sigma®) a 10% com HCl a 0,01 N (Merck®) em cada poço. O material foi novamente incubado por mais 24 horas e a absorbância foi então aferida a 570 nm utilizando leitor de microplaca (μ Quant, Bio-Tek Instruments). Os experimentos foram realizados em triplicata.

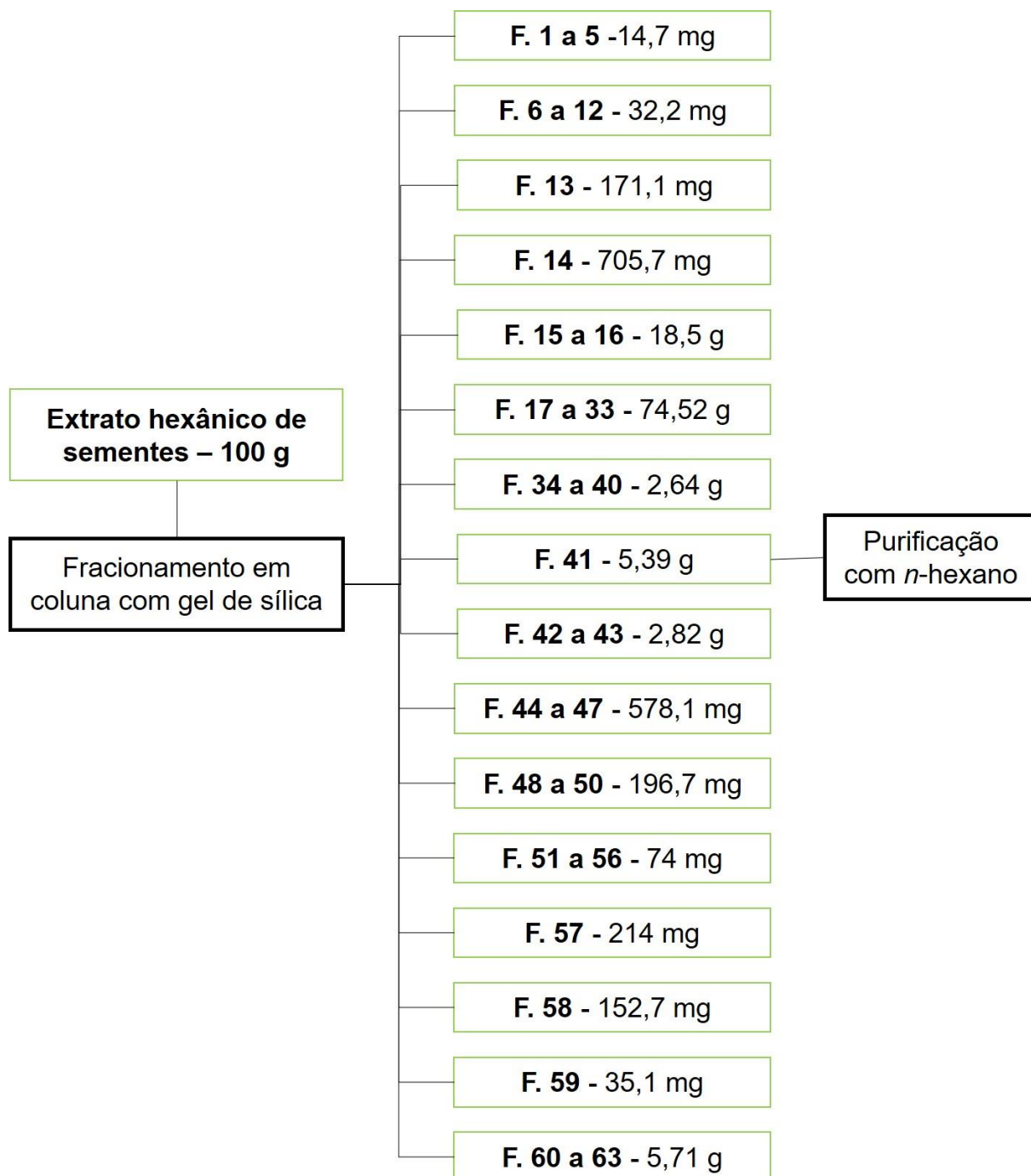
Os resultados foram expressos em percentual de viabilidade celular, considerando-se o controle negativo como 100% de células viáveis e subtraindo-se dos dados das amostras o valor correspondente ao seu branco. Os dados obtidos foram submetidos a análise de variância pelo teste One-way ANOVA. A significância das diferenças das amostras em relação ao controle foi avaliada pelo teste t de Student, utilizando o programa Graphpad Prism 5®. Foi adotado um intervalo de confiança de 95% e considerados significativos os valores de $p \leq 0,05$.

3.3 Resultados

3.3.. Fracionamento do extrato bruto hexânico

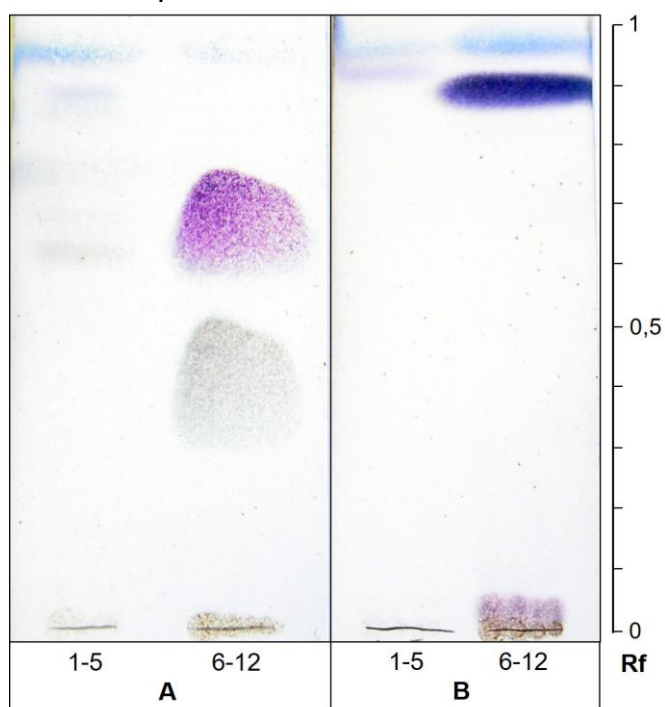
O extrato hexânico bruto das sementes foi submetido a fracionamento por cromatografia em coluna com gel de sílica, através de gradiente crescente de polaridade. Foi obtido um total de 63 frações (Figura 7), que foram analisadas por CCD e agrupadas de acordo com a similaridade entre o perfil de manchas obtido. Frações contendo substâncias isoladas ou com pouca mistura não foram agrupadas.

Figura 7 – Fracionamento de extrato hexânico bruto de sementes de *A. pinto* por cromatografia em coluna com gel de sílica



As frações 1 a 5 e 6 a 12 foram analisadas utilizando duas fases móveis, hexano a 100% ou hexano com diclorometano na proporção 8,5:1,5. As frações 1 a 5 apresentaram manchas mais claras, quando comparadas com as frações 6 a 12, nas quais foram observadas manchas maiores e arroxeadas, em ambas as fases móveis utilizadas (Figura 8). Na presença de diclorometano, foi visualizada ainda uma nova mancha na base da placa ($R_f = 0,04$, Figura 8B), que não havia sido evidenciada em hexano puro (Figura 8A).

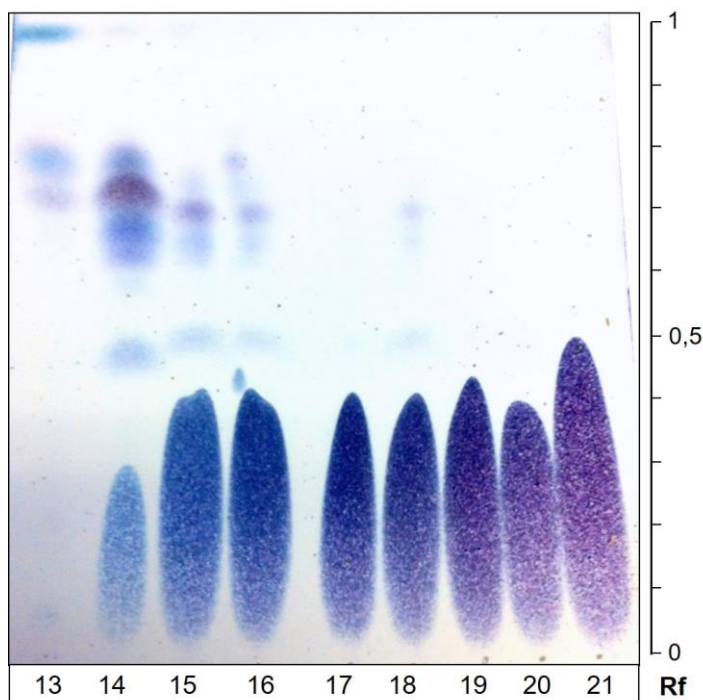
Figura 8 – Cromatografia em camada delgada das frações combinadas 1 a 5 e 6 a 12 obtidas a partir de extratos hexânicos brutos de *A. pinto*



Legenda: Fases móveis: (A) hexano a 100%; (B) solução de hexano com diclorometano (8,5:1,5).

A avaliação preliminar das frações 14 a 40 mostrou a presença de uma mancha azul alongada ($R_f = 0,15$ a $0,25$), que corresponde, provavelmente, a um ácido graxo (Figuras 9 e 10). As frações 13 e 14 foram agrupadas separadamente, uma vez que a primeira não apresentou a mancha observada nas outras amostras, e a segunda, por ter apresentado manchas superiores ($R_f = 0,6$ a $0,8$), de coloração mais intensa. Cabe destacar que essas mesmas substâncias foram também encontradas nas frações 13, 15 e 16 (Figura 9).

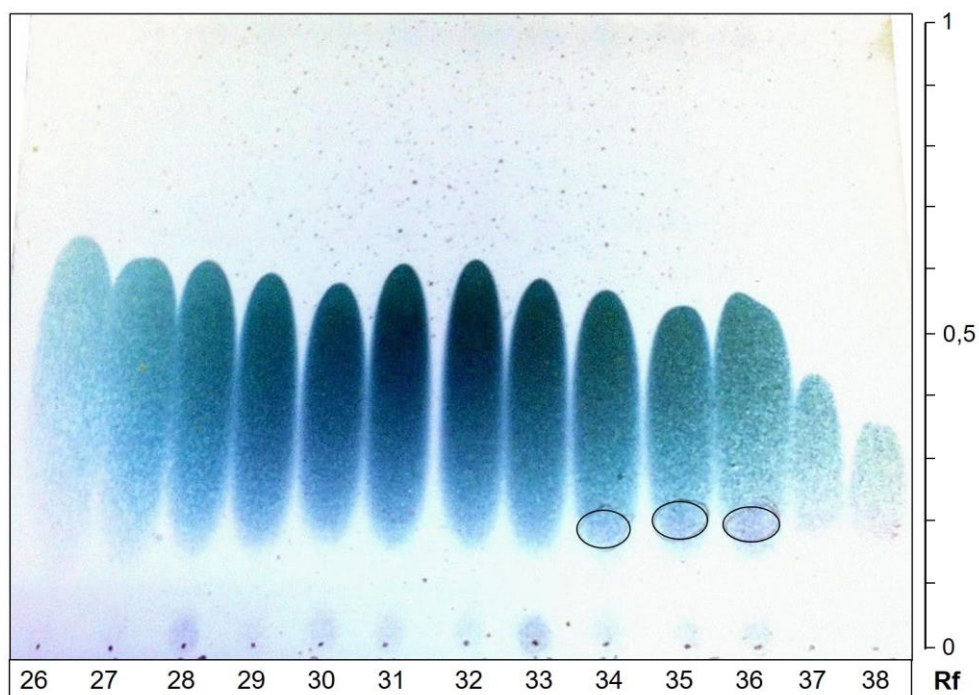
Figura 9 – Cromatografia em camada delgada das frações 13 a 21 obtidas a partir de extratos hexânicos brutos de *A. pintoii*



Legenda: Fase móvel: solução de hexano e diclorometano (6:4).

Nas frações 34 a 40 foi também detectada uma mancha de coloração arroxeada ($R_f = 0,2$), mais intensa nas frações 34-36 (Figura 10). Por essa razão, essas frações foram agrupadas conjuntamente.

Figura 10 – Cromatografia em camada delgada das frações 26 a 38 obtidas a partir de extratos hexânicos brutos de *A. pintoi*

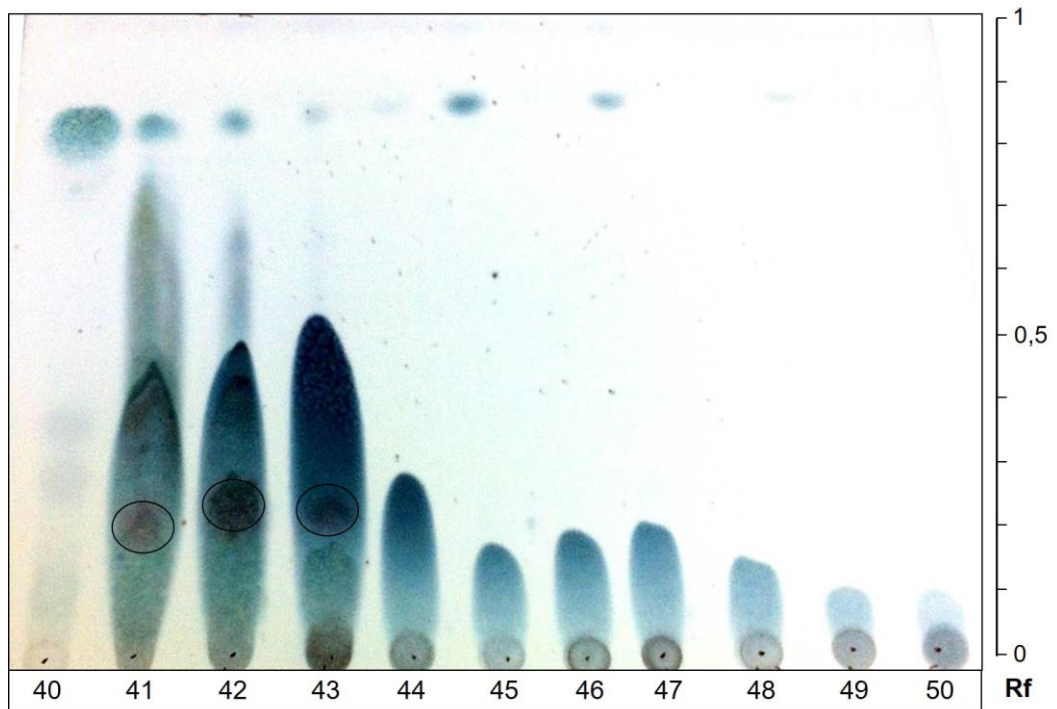


Legenda: Fase móvel: solução de hexano e diclorometano (4:6). Manchas arroxeadas estão destacadas nas frações 34, 35 e 36.

A mancha azulada contínua presente nas frações 34 a 40 foi ainda observada nas frações 41 a 47, embora em menor intensidade. Nessas amostras, essa mancha apresentou $R_f = 0,85$ devido à fase móvel utilizada (diclorometano a 100%) (Figura 11). As frações 41 a 43 apresentaram também outras manchas em comum, embora a 41 não tenha sido agrupada com as demais devido à presença de maior quantidade de um resíduo sólido (Figura 11). Esta fração foi purificada seis vezes com hexano, para realizar a separação entre o restante do óleo e o sólido.

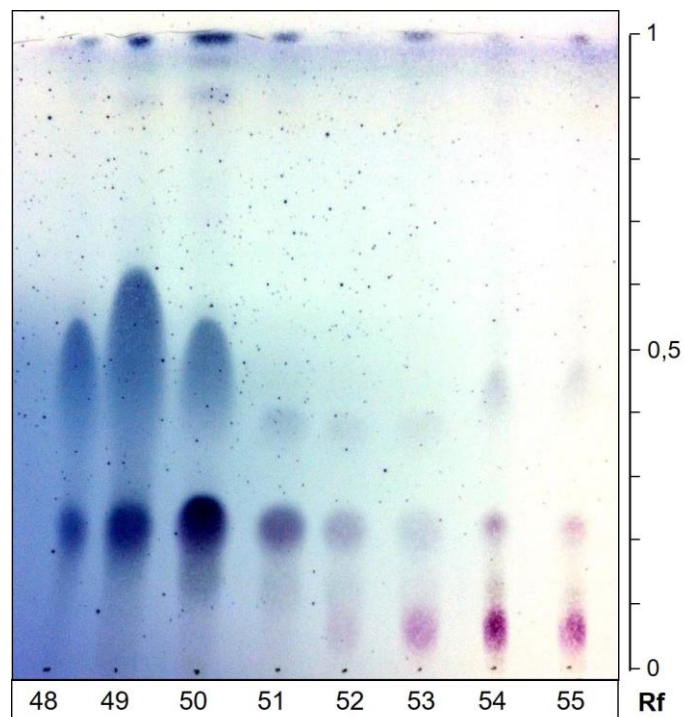
A fase móvel com diclorometano e acetato de etila (7:3) permitiu a visualização de novas manchas na base da cromatografia das frações 48 a 55 (Figura 12).

Figura 11 – Cromatografia em camada delgada das frações 40 a 50 obtidas a partir de extratos hexânicos brutos de *A. pintoi*



Legenda: Fase móvel: diclorometano 100%. Manchas mais escuras estão destacadas nas frações 41, 42 e 43.

Figura 12 – Cromatografia em camada delgada das frações 48 a 55 obtidas a partir de extratos hexânicos brutos de *A. pintoi*



Legenda: Fase móvel: diclorometano e acetato de etila (7:3).

3.3.2 Análise por CG-EM

A fração 41 obtida a partir do extrato hexânico bruto de sementes de *A. pinto* foi avaliada por CG-EM, visando à identificação das substâncias presentes. Essa amostra foi selecionada por apresentar a mesma mancha alongada que as demais, além de outras manchas e um resíduo sólido. Foram identificadas os ácidos graxos hexanóico, palmítico, 13-*cis*-octadecanóico e linoleico (Figuras 13 e 14).

Figura 13 – Cromatografia de íons totais (CITs) da fração 41 do extrato hexânico de sementes de *A. pinto* por CG-EM

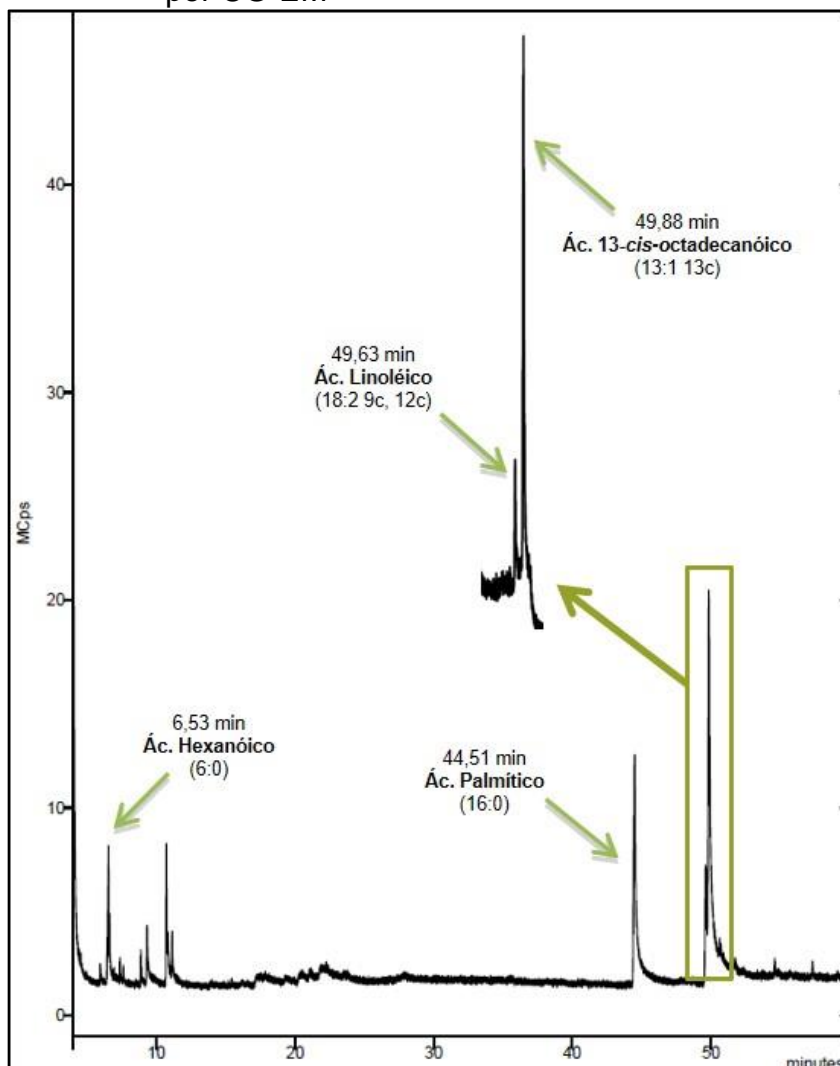
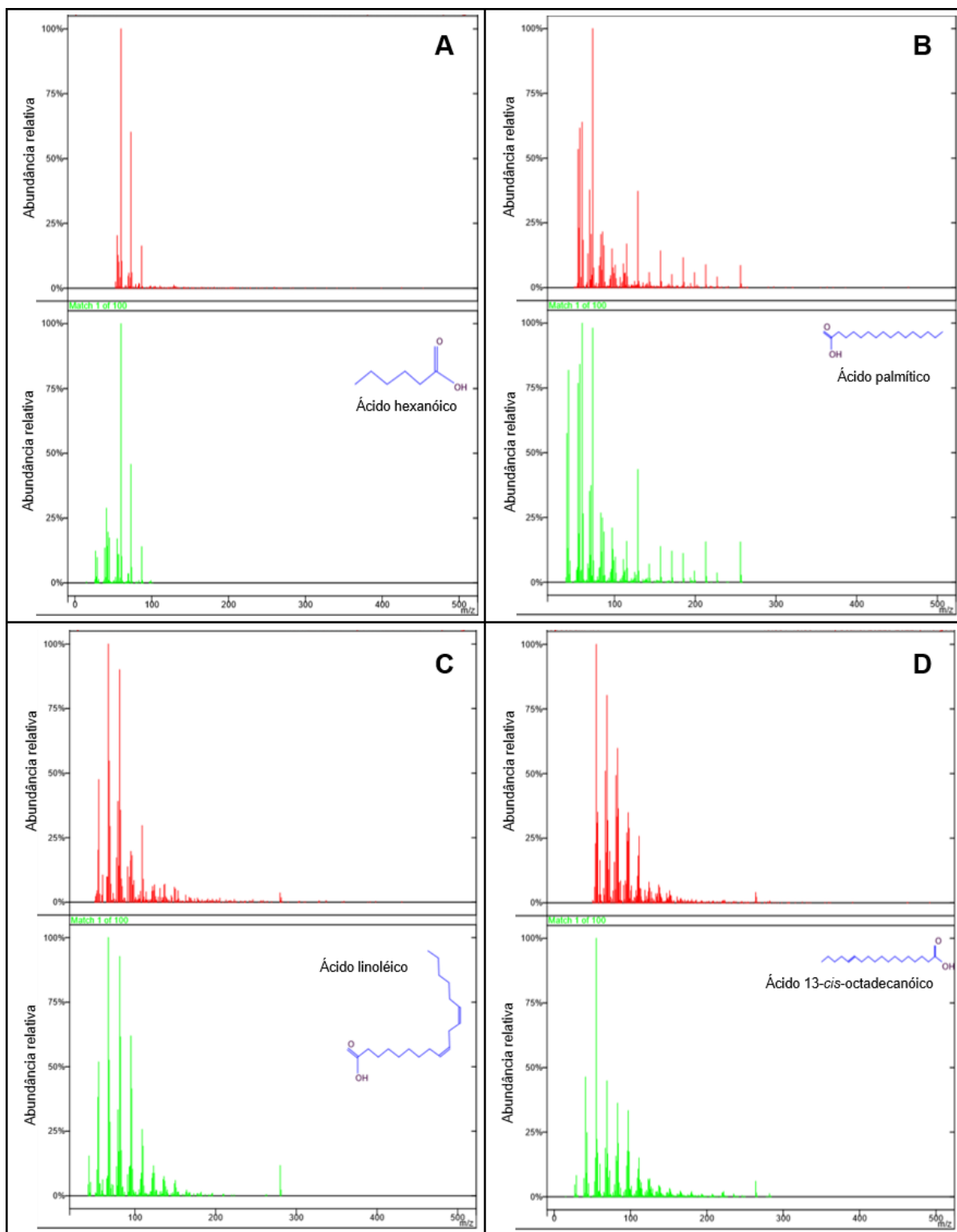


Figura 14 – Espectros de massas das substâncias presentes na fração 41 do extrato hexânico de sementes de *A. pinto* por CG-EM

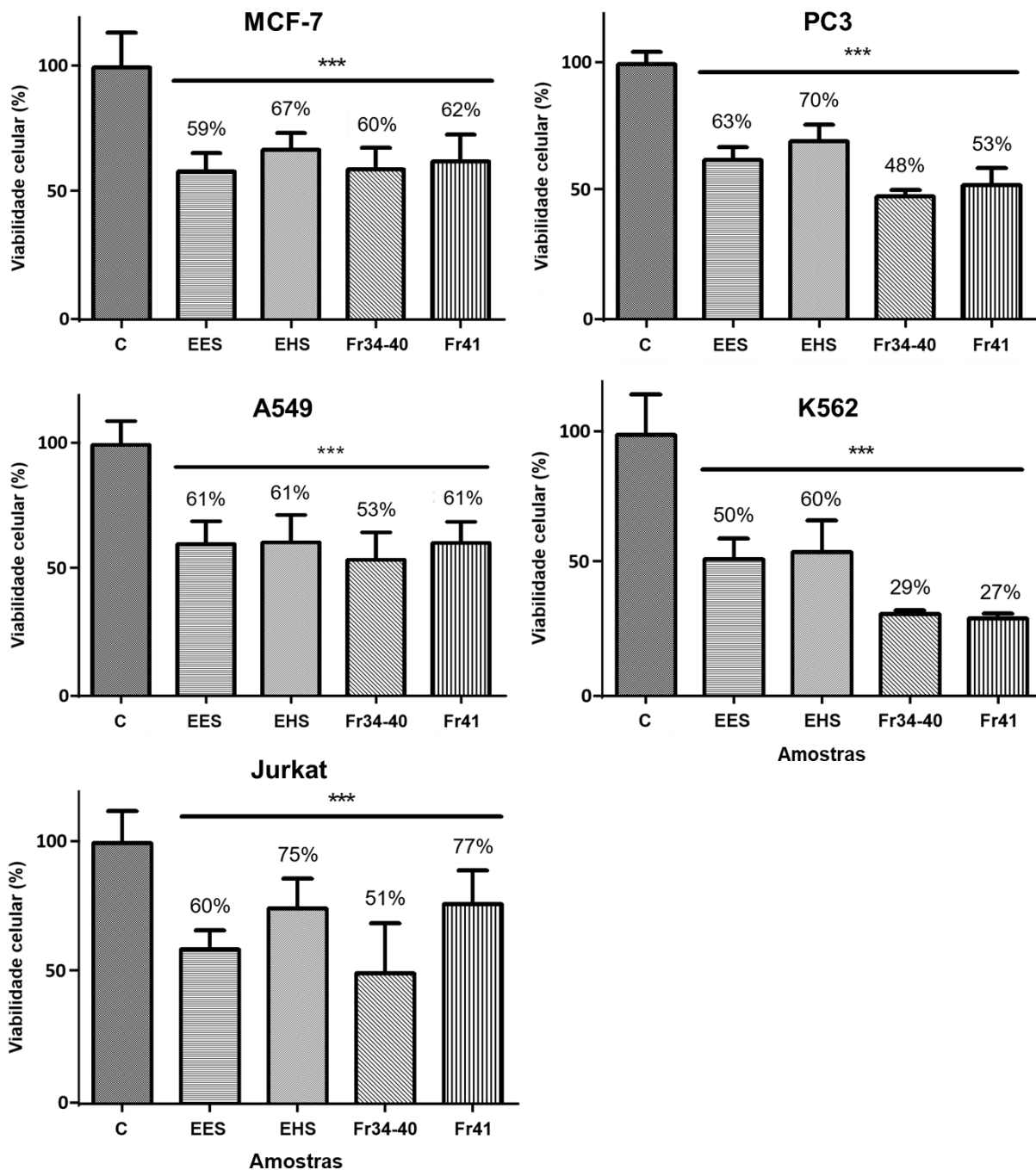


Legenda: Espectros de massas das substâncias presentes nas amostras (vermelho) e de seus prováveis correspondentes (verde). Os dados das substâncias padrões são oriundos da biblioteca de espectros de massas.

3.3.3 Avaliação da atividade citotóxica

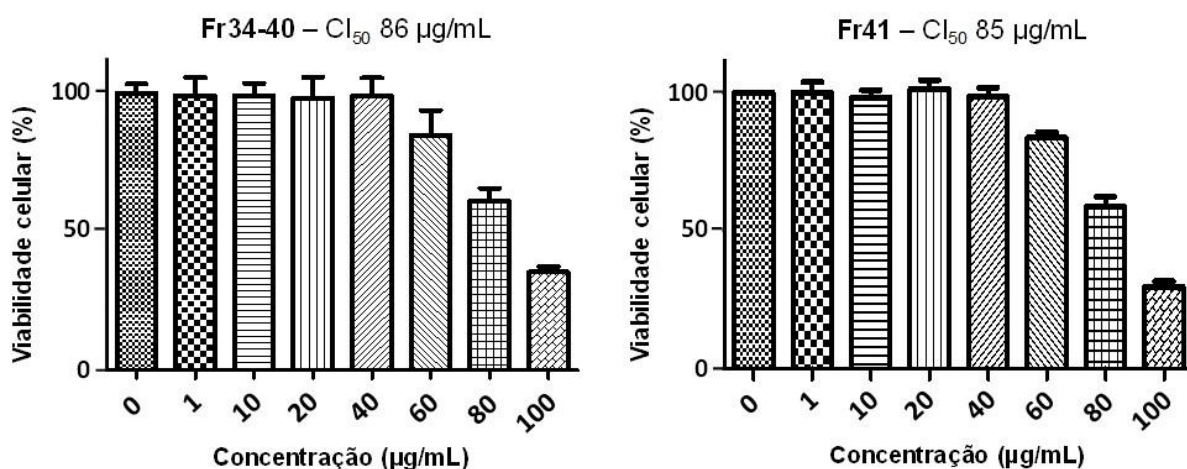
Todas as amostras avaliadas (extratos hexânicos e etanólicos de sementes e as frações combinadas 34-40 e 41 do extrato hexânico) apresentaram citotoxicidade contra as diferentes linhagens tumorais, quando comparadas ao controle (Figura 15). As frações apresentaram, em geral, maior atividade citotóxica que o extrato hexânico bruto, sendo a linhagem K562 mais sensível que a outra linhagem leucêmica testada (Jurkat) e que as linhagens tumorais MCF-7 (mama), PC3 (próstata) e A549 (pulmão). No tratamento com as frações combinadas 34-40 e 41, a viabilidade da linhagem K562 foi reduzida em 71 e 73%, respectivamente, em relação ao controle. Assim, essas frações foram avaliadas em concentrações de 1 a 100 µg/mL, obtendo-se valores semelhantes de CI_{50} , de 86 µg/mL para as frações 34-40 e 85 µg/mL para a fração 41 (Figura 16).

Figura 15 – Atividade citotóxica de extratos etanólico (EES) e hexânico (EHS) de sementes e de frações combinadas do extrato hexânico 34-40 (Fr34-40) e 41 (Fr41) de *A. pintoii* contra linhagens tumorais pelo ensaio do MTT



Legenda: As células foram tratadas com os extratos a 100 µg/mL por 72h. Os resultados foram expressos em percentual de viabilidade celular das linhagens tumorais humanas MCF-7 (mamária), PC3 (prostática), A549 (pulmonar), K562 (leucêmica) e Jurkat (leucêmica de células T). C – controle, EES – extrato etanólico de sementes, EHS – extrato hexânico de sementes, Fr34-40 – frações combinadas 34 a 40 do extrato hexânico, Fr41 – fração 41 do extrato hexânico. Os dados representam a média e os desvio padrão de três experimentos independentes em triplicata. Foram considerados significativos os valores de $p \leq 0,05$. *** representa diferença estatística de $p < 0,001$ em relação ao controle pelo teste t de Student.

Figura 16 – Atividade citotóxica de diferentes concentrações das frações de extrato hexânico de sementes de *A. pintoii* contra a linhagem leucêmica K562 pelo ensaio MTT



Legenda: Determinação do CI₅₀ de Fr34-40 (A) e Fr41 (B). As células foram tratadas com as amostras em diferentes concentrações por 72 h. Resultados expressos em percentual de viabilidade celular representam a média e o desvio padrão de três experimentos em triplicata.

3.4 Discussão

A composição de sementes de *A. pintoii* foi estudada por Grosso, Nepote e Guzmán (2000), que determinaram o conteúdo de óleo (49,7%), cinzas (2,5%), proteínas (27,1%), carboidratos (21,4%) e fitoesteróis. O β -sitosterol, substância que possui atividade antitumoral (AWAD et al., 2000) corresponde a 59,7% dos fitoesteróis encontrados nessa espécie (GROSSO; NEPOTE; GUZMÁN, 2000). Desta forma, sementes de *A. pintoii* podem constituir uma fonte de substâncias com atividades biológicas, como os fitoesteróis ou outros componentes frequentemente detectados em sementes e plantas de *A. hypogaea*.

Apesar da extensa literatura existente sobre *A. hypogaea*, *A. pintoii* vem sendo pouco estudada sob o enfoque fitoquímico, tendo sido apenas descrita a presença de ácidos graxos e fitoesteróis nas sementes, assim como de resveratrol, associado ao potencial antioxidante de extratos de folhas de plantas *in vivo* (GROSSO; NEPOTE; GUZMÁN, 2000; LOPES, 2011; LOPES et al., 2011). No presente trabalho, foram investigadas a atividade citotóxica de extratos etanólicos e hexânicos

de sementes de *A. pinto*, assim como de duas de suas frações combinadas 34-40 e 41. A composição da fração mais representativa foi investigada por CG-EM.

A análise por CG-EM indicou a presença de quatro ácidos graxos: um insaturado, o ácido 13-*cis*-octadecanóico (18:1); um poli-insaturado, o ácido linoleico (18:2); e dois saturados, os ácidos hexanóico (6:0) e palmítico (16:0). Esse resultado está de acordo com o encontrado por Grosso, Nepote e Guzmán (2000) em sementes de *Arachis*, incluindo *A. pinto*, no qual foi descrita a presença de oito ácidos graxos: palmítico (16:0), esteárico (18:0), oleico (18:1), linoleico (18:2), araquídico (20:0), eicosenóico (20:1), behenico (22:0) e lignocérico (24:0). Entretanto, o ácido hexanóico (6:0), saturado de cadeia curta, também denominado ácido capróico, e o ácido 13-*cis*-octadecanóico (18:1), insaturado e de cadeia longa, não foram detectados em sementes das espécies estudadas por esses autores. Os resultados podem ter sido influenciados pelo solvente utilizado nas duas metodologias, tendo em vista que Grosso, Nepote e Guzmán (2000) empregaram éter de petróleo, enquanto que no presente trabalho foi utilizado o *n*-hexano.

O ácido oleico, classificado como um ômega-9, e o ácido linoleico, um ômega-6, são essenciais para o metabolismo humano, relacionados com a redução do risco de doenças cardiovasculares (HARRIS, 2017). Em sementes de *A. hypogaea*, o óleo apresenta um alto teor de ácidos graxos insaturados, incluindo os ácidos oleico e linoleico, constituindo cerca de 50% do perfil lipídico (ARYA; SALVE; CHAUHAN, 2016). Características como estabilidade, sabor, menor oxidação e benefícios nutricionais dos óleos possuem uma correlação direta com os valores da razão entre os teores de ácido oleico e ácido linoleico (O/L) (CHAMBERLIN et al., 2011). O ácido oleico também está associado à redução da pressão arterial e do colesterol ruim (LDL), além de ter um efeito benéfico no diabetes tipo II e em processos inflamatórios associados à obesidade (TERES et al., 2008; VASSILIOU et al., 2009). Por outro lado, o ácido linoleico conjugado, que consiste em uma mistura de isômeros, foi originariamente descrito pelo seu potencial antitumoral e vem sendo estudado quanto aos benefícios de regulação homeostase da glicose e contra o estresse oxidativo, a esteatose hepática e a depressão da gordura do leite (DGL) (KIM et al., 2016).

O potencial citotóxico do óleo das sementes de *A. pinto* foi avaliado neste trabalho, em comparação às suas frações e ao extrato etanólico, tendo sido

observada uma redução da atividade mitocondrial celular em resposta a todas as amostras testadas, especialmente por parte de células leucêmicas K562.

Algumas outras espécies já foram estudadas quanto ao potencial citotóxico do óleo das sementes, como a *Nigella sativa*, cujo principal princípio ativo são as timoquinonas (RANDHAWA, ALGHAMDI, 2011), e *Coix lacryma-jobi* L., cujo óleo contém quatro tipos de ácidos graxos que formam triglicerídeos (YU et al., 2008). Um maior número de trabalhos tem indicado o potencial citotóxico de extratos alcoólicos de sementes, como extratos polifenólicos de uvas (KAUR; AGARWAL; AGARWAL, 2009), extratos hidroalcoólicos de *Ziziphus mauritiana*, uma árvore indiana com propriedades medicinais (MISHRA, KHULLAR, BHATIA, 2011), extrato metanólico de *Syzygium fruticosum*, uma espécie medicinal utilizada popularmente em Bangladesh (ISLAM et al., 2013), entre outros. No caso de extratos de sementes de *Petroselinum sativum*, os extratos alcóolicos e o óleo foram investigados e apresentaram atividade citotóxica contra a linhagem de câncer de mama MCF-7, tendo o extrato alcoólico apresentado a maior atividade (FARSHORI et al., 2013).

Dois grupos de substâncias presentes em *A. hypogaea* já foram relacionados a atividades antitumorais, os fitoesteróis (AWAD et al., 2000; JONNALA; DUNFORD; DASHIELL, 2006; BRADFORD, AWAD, 2007) e as substâncias fenólicas, incluindo o resveratrol (KU et al., 2005; HUANG et al., 2010; SOBOLEV et al., 2011). Neste trabalho, o extrato etanólico de *A. pintoii* apresentou uma citotoxidez de 37 a 50% de inibição da viabilidade celular a 100 µg/mL. Valores próximos foram observados para o extrato bruto do óleo, que reduziu em até 40% a viabilidade celular da linhagem de leucemia K562. Entretanto, as frações do óleo estudadas (frações combinadas 34-40 e fração 41) demonstraram atividades antitumorais significativamente maiores (de 71 e 73% de redução da viabilidade celular). Este resultado pode estar relacionado a alguns dos ácidos graxos presentes nas amostras, como palmítico, linoleico e octadecanoico. O ácido palmítico, presente em extratos de alga vermelha marinha (*Amphiroa zonata*), já foi identificado como um componente com toxicidade seletiva contra linhagens de leucemia em testes *in vitro* e em camundongos (HARADA et al., 2002). Os ácidos palmítico, (Z)-9-octadecanoico e octadecanoico também apresentaram citotoxidez contra diferentes linhagens tumorais, induzindo a apoptose pela ativação da caspase-3 (YOO et al., 2007). Além disso, o efeito inibitório do ácido linoleico contra diferentes estágios de carcinogênese também foi estudado *in vivo* e *in vitro* (YANG et al., 2015).

4 CULTURA DE RAÍZES ADVENTÍCIAS DE *ARACHIS PINTOI* KRAPOV. & W.C. GREG.: ANÁLISES ANATÔMICA, FITOQUÍMICA E DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

4.1 Introdução

Raízes adventícias, assim como raízes primárias e laterais, possuem um papel importante no desenvolvimento de plantas em condições naturais. Diferentemente das laterais, que se desenvolvem a partir de raízes já existentes, as adventícias desenvolvem-se a partir de células derivadas de outros órgãos, como caules e folhas. Este processo é mais complexo e envolve diversos fatores, como fitorreguladores, luz, estado nutricional, injúrias ou características genéticas (GEISS, GUTIERREZ, BELLINI, 2018).

No âmbito da biotecnologia vegetal, raízes adventícias são amplamente estudadas tanto para o enraizamento de explantes caulinares e brotos na micropropagação, quanto para a cultura de raízes isoladas, que vêm sendo bastante exploradas para a produção de substâncias bioativas (GAO et al., 2018; GÓMEZ-AGUIRRE et al., 2012; SAIMAN et al., 2012; SILJA, SATHEESHKUMAR, 2015; SIMÃO et al., 2016; SIMONETTI et al., 2016; ZHANG; MOONEY; REILLY, 2012). O emprego dessa metodologia para produção de metabólitos não somente torna-se importante para o suprimento da demanda de produtos terapêuticos, mas constitui também uma alternativa para evitar a superexploração de espécies e a degradação de ecossistemas, tendo em vista que o processo de coleta das raízes geralmente resulta na morte da planta. Esses sistemas já foram utilizados para produção de metabólitos de algumas espécies, tais como *Pelargonium sidoides*, utilizado como fitoterápico para doenças do trato respiratório e que também possui atividade anti-HIV (HELFER et al., 2014), e *Pueraria lobata*, que vem sendo utilizada no tratamento de diabetes e de doenças cardiovasculares (WONG et al., 2011).

As auxinas constituem o principal grupo de reguladores de crescimento utilizados para indução das raízes adventícias *in vitro*. As mais utilizadas são o ácido α -naftalenoacético (ANA), o ácido indolacético (AIA) e o ácido indolbutírico (AIB), além de reguladores com função de auxina, como o ácido 2,4-diclorofenoxiacético

(2,4-D). Outros reguladores de crescimento já foram estudados e podem afetar o processo de formação das raízes adventícias, como etileno, strigolactonas (RASMUSSEN et al., 2017), metil-jasmonato (KIM et al., 2007) e poliaminas (GILL; TUTEJA, 2010; NAG; SAHA; CHOUDHURI, 2001). A influência de moléculas sinalizadoras também foi investigada, como o peróxido de hidrogênio (LIAO, XIAO, ZHANG, 2009; NAG; SAHA; CHOUDHURI, 2001) e o óxido nítrico (LIAO, XIAO, ZHANG, 2009).

A multiplicação e o acúmulo de biomassa de raízes, assim como o tipo e a quantidade de metabólitos produzidos são influenciados pelas condições de cultura adotadas (KIM et al., 2007). A concentração de sais do meio de cultura, bem como de diferentes componentes, como nitrogênio, fósforo e sacarose, afetaram a produção de biomassa e a síntese de flavonoides e outras substâncias fenólicas em culturas de raízes adventícias de *Echinacea pallida* Nutt. (GAO et al., 2018). Em *Eurycoma longifolia*, o balanço entre nitrato e amônia e o tipo de acondicionamento das culturas, em frascos ou biorreatores, também demonstraram ser fatores importantes na produção de biomassa e de substâncias fenólicas (LULU et al., 2015).

As culturas de raízes podem ser estabelecidas a partir de diferentes tipos de explantes, incluindo segmentos de folhas, raízes e caules de plantas propagadas *in vivo* ou *in vitro* (BAQUE; HAHN; PAEK, 2010; BASKARAN et al., 2016; DESHPANDE et al., 2015; SIMÕES et al., 2009), caules, folhas, hipocótilos e epicótilos de plântulas obtidas de germinação *in vitro* (AUMOND et al., 2017; COSTA et al., 2018), cotilédones (JAYAKODI et al., 2014; LI et al., 2008; PAZ et al., 2013; ZAHEER; GIRI, 2017) e culturas de calos (FAZAL; ABBASI; AHMAD, 2014). Raízes adventícias também podem ser produzidas via transformação genética por *Agrobacterium rhizogenes* (*hairy roots*) (JIAO et al., 2018; SIVANANDHAN et al., 2015; YANG et al., 2015).

Culturas de raízes transformadas com diferentes linhagens de *Agrobacterium rhizogenes* já foram estabelecidas para *A. hypogaea*, utilizando explantes de folhas cotiledonares (CONDORI et al., 2010), hipocótilos (GENG et al., 2012; KARTHIKEYAN et al., 2007), folhas, pecíolos, entrenós, cotilédones e nós cotiledonares (HALDER; JHA, 2016; KIM; LEE; PARK, 2008; 2009; MEDINA-BOLIVAR et al., 2007). A produção de resveratrol, piceatanol, araquidina-1 e araquidina-3 nessas raízes foi estimulada com o uso de eliciadores, incluindo

acetato de sódio (MEDINA-BOLIVAR et al., 2007), peróxido de hidrogênio, metiljasmonato e metil- β -ciclodextrina (YANG et al., 2015). O resveratrol destaca-se entre esses estilbenos devido à sua reconhecida importância na prevenção e no tratamento de doenças neurológicas, cardiovasculares, câncer e diabetes (BERMAN et al., 2017).

A indução de raízes adventícias *in vitro* de *A. pintoii* foi estudada pela primeira vez em culturas de cotilédones (SOUSA, 2015). Em uma etapa inicial do estudo, esses explantes produziram calos, brotos e raízes em resposta a diferentes combinações de 6-benzilaminopurina (BAP) e ANA. Meios contendo maior proporção de citocinina (BAP) induziram a formação de brotos por organogênese indireta, enquanto o balanço entre os dois reguladores promoveu a formação de calos não morfogênicos e altas concentrações de auxina (ANA) induziram a formação de raízes. Dessa forma, o trabalho foi continuado avaliando a indução de raízes adventícias a partir de cotilédones em resposta às auxinas ANA, AIA ou AIB (SOUSA, 2015). Visando à multiplicação, segmentos de raízes obtidas em ANA a 54 μ M, AIA a 57 μ M e AIB a 14,7 μ M foram inoculados em cinco diferentes condições: meio sólido em frasco ou placa de Petri, meio líquido sob agitação ou sob pontes de papel de filtro, além de meio em dupla-fase (sólido e líquido). Os meios foram suplementados com mesmo tipo e concentração do regulador utilizado na indução. O desenvolvimento de raízes com potencial para o estabelecimento de culturas foi alcançado em resposta a AIB e ANA, nos dois sistemas de meio líquido, tendo sido observada maior ramificação dos explantes quando cultivados no sistema de pontes de papel de filtro.

No presente trabalho, foram determinadas condições para a multiplicação das culturas, dando continuidade aos estudos de cultura de raízes adventícias de *A. pintoii*. Foi também realizada uma análise anatômica do processo de indução, visando determinar a origem e a estrutura das raízes. Extratos das raízes na etapa de indução foram analisados por CLAE para determinação do perfil fitoquímico, sendo também avaliada sua atividade antioxidante pelo ensaio de DPPH.

4.2 Metodologia

4.2.1 Indução de raízes adventícias

Sementes de *Arachis pintoi* (cv. Amarillo MG-100) obtidas comercialmente (BRSEEDS Produção e Comércio de Sementes LTDA) foram utilizadas para o estabelecimento das culturas *in vitro*. Para isso, as sementes foram submetidas ao protocolo de descontaminação estabelecido anteriormente (SOUSA, 2015), que consistiu em imersão em álcool a 70% por 2 minutos e, em seguida, em solução de NaClO a 1,5% contendo Tween 80 a 0,02% (v/v) por 45 minutos, sob agitação. Após esse procedimento, as sementes foram lavadas três vezes com água deionizada estéril em capela de fluxo laminar e os diferentes explantes excisados e inoculados em meios de cultura.

Nos experimentos de cultura de tecidos, foi utilizado o meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) contendo sacarose a 3% e gelificado com ágar a 0,7%, quando utilizado meio sólido. O pH final era ajustado para 5,8 antes da esterilização em autoclave (15 minutos a 121 °C e 1 atm). Para a indução de raízes, cotilédones foram excisados de sementes descontaminadas e inoculados em meio MS suplementado com ANA a 54 µM, AIB a 14,7 µM ou AIA a 57 µM. As culturas foram mantidas por até 30 dias na ausência de luz, de acordo com metodologia estabelecida previamente (SOUSA, 2015).

4.2.2 Multiplicação de raízes adventícias

A multiplicação das raízes adventícias induzidas a partir de cotilédones em resposta a ANA a 54 µM foi realizada em sistema de meio líquido sob pontes de papel filtro, na ausência de luz, por 60 dias, segundo Sousa (2015). Para isso, foram utilizados frascos de cultura (268 mL) contendo esferas de vidro como suporte e discos de papel de filtro na altura superfície do meio, sobre o qual os explantes foram acondicionados. As culturas foram iniciadas utilizando segmentos apicais

radiculares de 1 ou 2 cm, obtidos nas condições descritas anteriormente. Os explantes foram inoculados em frascos contendo 20 mL meio MS líquido suplementado com diferentes concentrações de ANA (0,54; 5,4; 27 e 54 μM) ou AIB (0,49; 4,9; 24,5 e 49 μM). Para cada tratamento, foram utilizados cinco frascos, sendo distribuídos três explantes por frasco. Os experimentos foram realizados em duplicatas, somando-se 30 explantes por tratamento.

Após 60 dias de cultivo, foram avaliados o alongamento dos explantes inoculados, quanto ao percentual de resposta e ao comprimento, e a ramificação, quanto ao percentual, número de ramificações por explante e a faixa de comprimento das ramificações.

4.2.3 Análise histológica das raízes adventícias

A análise das raízes adventícias induzidas *in vitro* foi realizada pela observação anatômica dos explantes de cotilédones cultivados em meio suplementado com ANA por diferentes períodos (0, 3, 6, 9, 12, 15, 18 e 28 dias). Também foi realizada uma análise anatômica comparativa com as raízes de plantas com 15 dias obtidas *in vivo*, em casa de vegetação. Todos os materiais foram fixados em paraformaldeído a 4% + glutaraldeído a 2,5% em tampão fosfato de sódio 0,05 M (pH 7,2). As amostras foram lavadas em solução Karnovsky, desidratadas em série alcoólica (etanol em água a 30, 50, 70, 90 e 100%), com passagem por acetona (etanol e acetona nas proporções 3:1, 1:1, 1:3, 1:1 e 3:1), incluídas em historesina (Leica Historesin embedding kit®) e seccionadas em micrótomo rotativo (Spencer) com navalha de vidro. Secções de 2-3 μm de espessura foram coradas com azul de toluidina (GAHAN, 1984).

Esta análise foi realizada no Departamento de Botânica do Museu Nacional da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), em colaboração com a professora Dra. Lygia Dolores Ribeiro de Santiago Fernandes e sua aluna de mestrado Lareska Zironi Cássero.

4.2.4 Avaliação fitoquímica

4.2.4.1 Preparo de extratos dos materiais *in vivo* e *in vitro*

Raízes de plantas obtidas *in vivo* e raízes adventícias, produzidas a partir de cotilédones em resposta a diferentes auxinas (ANA, AIA e AIB) conforme descrito anteriormente, foram secas em estufa a 50°C por 48 horas, sendo em seguida trituradas em moinho. Os materiais foram deslipidificados por extração em ultrassom com *n*-hexano (Vetec®) a 50 mL/g de material seco por 30 minutos, filtrados e re-extraídos por ultrassonicação com etanol (Vetec®) a 80% (v/v), na proporção de 50 mL/g de material seco, por 30 minutos (SANTOS, 2016). Os extratos obtidos foram filtrados e concentrados sob pressão reduzida (Evaporador Rotativo Marconi – M120) a 40°C, sendo armazenados a - 20°C.

4.2.4.2 Análise fitoquímica qualitativa e quantificação do resveratrol

A análise dos extratos etanólicos foi realizada por CLAE acoplada a detector de ultravioleta em rede de diodos (*diode array detector* - DAD-UV), em equipamento da marca Shimadzu® Nexera XR equipado com controlador CBM20A, desgaseificador DGU20A, bomba binária LC20AD, forno CTO20A, injetor automático SILA20A, sistema de detecção por DAD-UV-VIS SPDM20A. A área dos sinais foi integrada automaticamente pelo programa Shimadzu LabSolutions. Os diferentes extratos foram dissolvidos em metanol grau CLAE (Tedia®, Brasil) a uma concentração final de 10 mg/mL e filtrados em filtro Milipore 0,45 µm.

As análises qualitativas foram feitas em coluna C18 Thermo (250 mm x 4,6 mm i.d. x 5 µm), com fluxo de 1,0 mL/min, temperatura do forno em 50°C, com leitura nos comprimentos de onda 254 nm e 306 nm. O volume injetado para todas as amostras foi de 20 µL. A fase móvel foi composta de: (A) água ultrapura (MiliQ) acidificada com ácido acético glacial (pH = 3,0) e (B) acetonitrila grau espectroscópico (Tedia, Brasil). A eluição foi feita em modo gradiente, começando

em 95% de A e 5% de B até atingir 5% de A e 95% de B, em 80 minutos, e mais 10 minutos para estabilizar a coluna na fase móvel inicial, sendo o tempo total de análise de 90 minutos. A solução padrão de *trans*-resveratrol (Sigma-Aldrich, Brasil) foi preparada no dia das análises, a uma concentração estoque de 1 mg/mL em metanol grau espectroscópico (Tedia, Brasil) e analisada nas mesmas condições das amostras (soluções de trabalho a 1 µg/mL ou 500 ng/mL). O *trans*-resveratrol nas amostras foi detectado a 306 nm. Os valores percentuais de área foram obtidos pela integração dos sinais, com auxílio do programa LabSolutions (Shimadzu). O percentual relativo de cada substância identificada está relacionado ao somatório de área de todos os sinais do cromatograma, em um determinado comprimento de onda, que representa 100%. O valor de uma determinada área representa o percentual relativo da substância correspondente.

Para a quantificação do resveratrol, os extratos foram analisados em coluna analítica Supelco Ascentis® Phenyl (250 mm x 4,6 mm i.d. x 5 µm), sendo utilizados como fase móvel: (A) água ultrapura (MiliQ) acidificada com ácido acético glacial (pH 3,0), (B) acetonitrila grau espectroscópico (Tedia, Brasil) e (C) metanol grau espectroscópico (Tedia, Brasil), em sistema de gradiente (Quadro 4). O volume de injeção foi de 20 µL e o fluxo foi de 1 mL/min. O monitoramento foi feito em 306 nm. Foram adotados os parâmetros analíticos validados de acordo com normas nacionais e internacionais (ICH-Q2A, 1995; ICH-Q2B, 1996; INMETRO, 2007) para a dosagem do *trans*-resveratrol, de acordo com Moreira et al. (*apud* SANTOS, 2016).

Essas avaliações foram realizadas em colaboração com o professor Dr. Davyson Moreira, do Instituto de Tecnologia em Fármacos da Fundação Oswaldo Cruz, no Laboratório de Toxicologia Ambiental do DCB/ ENSP/ FIOCRUZ.

Quadro 4 – Gradiente de fase móvel para análise quantitativa do *trans*-resveratrol por CLAE-DAD-UV

Tempo	A	B	C
Inicial	90%	2%	8%
0 a 3 min.	80%	12%	8%
3 a 9 min.	5%	95%	0%
9 a 11 min.	90%	2%	8%

4.2.5 Avaliação da atividade antioxidante

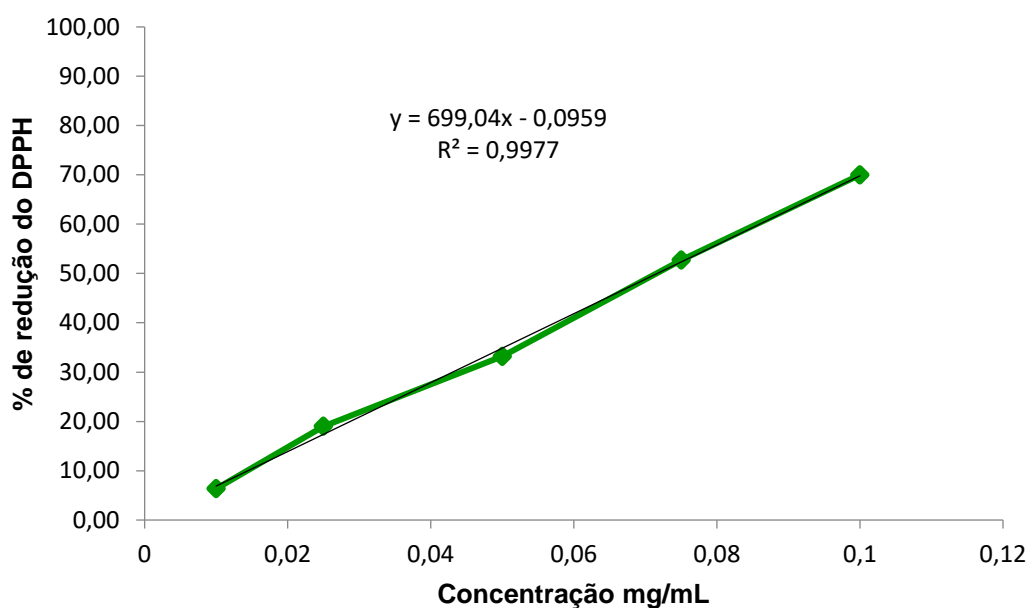
A avaliação do potencial antioxidante dos extratos etanólicos foi realizada utilizando-se o ensaio de captura do radical livre DPPH•, com base no método de Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995). A atividade antioxidante foi determinada pela sua atividade sequestradora do DPPH• (Sigma-Aldrich®, Milwaukee, Wisconsin, EUA), reduzindo-o a difenil-picril-hidrazina. Os extratos foram ressuspensos em metanol em diferentes concentrações (0,1 - 40 mg/mL). Amostras de 25 µL foram incubadas com 975 µL de solução metanólica do radical DPPH (0,6 mM) por 1 h no escuro, em triplicata. Em seguida, a absorbância foi medida a 515 nm em espectrofotômetro UV-Vis BioMate 3S (Thermo Scientific). Metanol absoluto foi utilizado como branco para calibrar o equipamento. A porcentagem de captura foi determinada pela equação:

$$\% \text{ DPPH sequestrado} = \frac{(A_c - A_a)}{A_c} \times 100$$

Onde: A_c = Absorbância do controle negativo (solução de DPPH);
 A_a = Absorbância da amostra.

O valor de CE_{50} (concentração necessária de extrato para reduzir em 50% a concentração inicial do DPPH) foi calculado a partir de curva analítica, obtida por regressão linear (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; Berset, 1995). O controle negativo consistiu em solução metanólica de DPPH. Como controle positivo, foi utilizada a quercetina, cuja curva padrão foi construída utilizando concentrações entre 0,01 a 0,1 mg/mL (Figura 17). Todos os experimentos foram realizados em duplicata.

Figura 17 – Curva padrão de atividade antioxidante da quercetina utilizando o método de captura do radical DPPH



4.2.6 Análise estatística

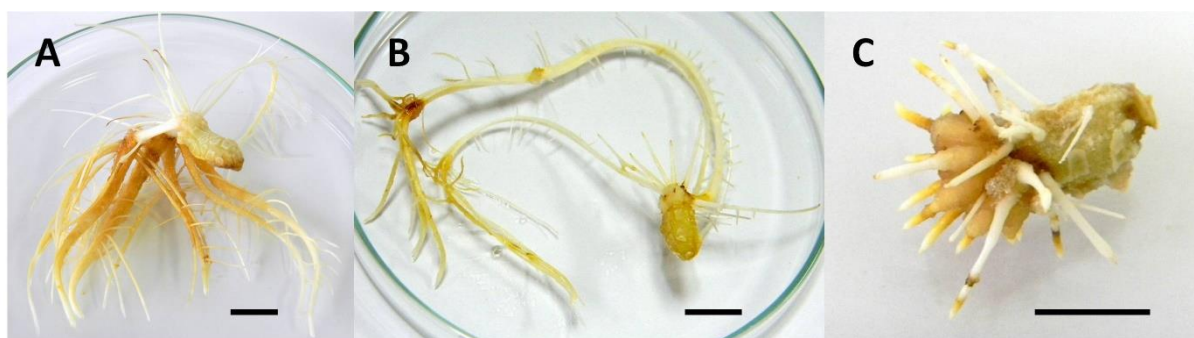
A avaliação estatística dos dados experimentais foi realizada através da análise de variância (ANOVA) e do teste de comparação de Tukey-Kramer, com o auxílio do programa GraphPad Prism 6 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA). Foram considerados significativos os valores de $p \leq 0,05$, adotando-se um intervalo de confiança de 95%.

4.3 Resultados

4.3.1 Indução das raízes adventícias

As raízes adventícias foram induzidas a partir de cotilédones em resposta a ANA a 54 μM , AIB a 14,7 μM ou AIA a 54 μM (Figura 18), visando à utilização nos diferentes experimentos. Conforme observado anteriormente (SOUSA, 2015), os explantes apresentaram diferentes tipos de raízes de acordo com o regulador de crescimento utilizado. Em resposta a AIA, as raízes eram curtas e não ramificadas, com calogênese na base. Na presença de AIB, os explantes apresentaram raízes alongadas, com menor percentual de resposta e maior acúmulo de biomassa. Meios suplementados com ANA promoveram a indução de numerosas raízes com ramificações, com potencial para a utilização na etapa de multiplicação.

Figura 18 – Raízes adventícias induzidas a partir de cotilédones de *A. pintoi* após 30 dias de cultivo em meio MS suplementado com diferentes auxinas



Legenda: Raízes obtidas em resposta a ANA (A), AIB (B) ou AIA (C). Barra = 1 cm.

4.3.2 Multiplicação de raízes adventícias

Visando à otimização da multiplicação das raízes adventícias de *A. pintoii*, segmentos (1 ou 2 cm) excisados de raízes induzidas na presença de ANA a 54 μM foram cultivados em meio MS suplementado com diferentes concentrações das auxinas ANA e AIB, utilizando o sistema de meio líquido sob pontes de papel de filtro.

Em relação ao tamanho dos explantes, de uma maneira geral, os segmentos com 2 cm de comprimento apresentaram melhores resultados que os de 1 cm, tanto quanto ao alongamento, quanto à ramificação das raízes desenvolvidas (Tabela 1).

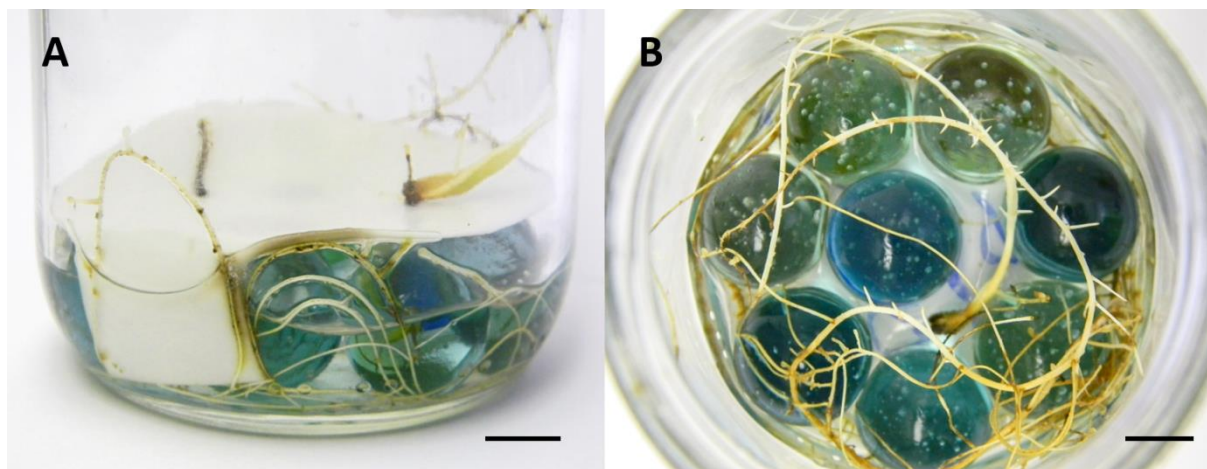
Em resposta a ANA, os explantes apresentaram 20 a 63,4% de alongamento e 0 a 23,4% de ramificação, tendo sido obtido o maior alongamento e o maior número de raízes por explante em resposta à menor concentração de ANA testada (0,54 μM) (Tabela 1). Por outro lado, na presença de AIB, o alongamento dos explantes ocorreu em um percentual de 36,7 a 73,3% e a ramificação em 10 a 30%. O maior alongamento foi observado a partir de explantes de 2 cm, em resposta à concentração de 0,49 μM (Figura 19). Nesta condição, os segmentos radiculares apresentaram crescimento de 13,2 cm a partir da região apical. Na mesma concentração, explantes de 2 cm originaram 10,3 ramificações por explante, o maior valor observado. Além disso, as ramificações obtidas em meios contendo AIB, principalmente na concentração mais baixa (0,49 μM), foram mais longas que aquelas produzidas em meios suplementados com ANA (dados não mostrados).

Tabela 1 – Multiplicação de raízes adventícias de *A. pintoi* mantidas no sistema de pontes de papel de filtro, após 60 dias de cultivo em meio MS suplementado com diferentes concentrações de ANA ou AIB

Regulador de crescimento (μM)	Explante (cm)	Alongamento		Ramificação	
		% resposta	Comprimento (cm)	% resposta	Nº/explante
ANA 0,54	1	56,6	$5,0 \pm 4,4^c$	6,7	$9,5 \pm 10,6^{ab}$
	2	63,4	$6,4 \pm 4,6^{bc}$	16,7	$4,6 \pm 3,0^{ab}$
ANA 5,4	1	30	$4,0 \pm 3,8^c$	0	-
	2	63,4	$3,5 \pm 2,5^c$	23,4	$2,0 \pm 1,8^b$
ANA 27	1	36,7	$2,1 \pm 1,7^c$	13,4	$2,0 \pm 1,2^b$
	2	63,4	$3,8 \pm 3,3^c$	20	$4,5 \pm 2,7^{ab}$
ANA 54	1	20	$1,1 \pm 0,7^c$	3,3	1*
	2	33,4	$3,9 \pm 3,5^c$	13,4	$2,5 \pm 1,9^{ab}$
AIB 0,49	1	56,7	$6,3 \pm 7,5^{bc}$	16,7	$4,2 \pm 3,3^{ab}$
	2	43,4	$13,2 \pm 8,4^a$	16,7	$10,3 \pm 8,0^a$
AIB 4,9	1	36,7	$12,2 \pm 4,7^{ab}$	27,5	$4,3 \pm 3,2^{ab}$
	2	66,7	$4,9 \pm 4,1^c$	10	$6,0 \pm 2,6^{ab}$
AIB 24,5	1	56,7	$7,4 \pm 6,6^{abc}$	30	$6,5 \pm 3,2^{ab}$
	2	53,4	$6,1 \pm 5,1^{bc}$	26,7	$3,5 \pm 3,1^{ab}$
AIB 49	1	43,4	$1,8 \pm 1,0^c$	16,7	$3,0 \pm 1,2^{ab}$
	2	73,3	$3,7 \pm 4,0^c$	20	$3,5 \pm 2,1^{ab}$

Legenda: Para o parâmetro de comprimento, foi considerado apenas o tamanho da região de alongamento, excluindo o comprimento inicial do explante (1 ou 2 cm). Os valores de comprimento e número de ramificações por explante correspondem à média e ao desvio padrão. Letras iguais na mesma coluna indicam valores estatisticamente iguais considerando $p \leq 0,05$. O símbolo de asterisco (*) sinaliza que não foi possível determinar a média e o desvio padrão da amostra.

Figura 19 – Multiplicação de raízes de *A. pintoi* a partir de segmentos radiculares de 2 cm de comprimento em meio suplementado com AIB a 0,49 μM em sistema de ponte de papel filtro, por 60 dias



Legenda: crescimento das raízes em direção ao meio de cultura sob a ponte de papel (A) e detalhe das raízes submersas após remoção do papel filtro (B). Barra = 1cm.

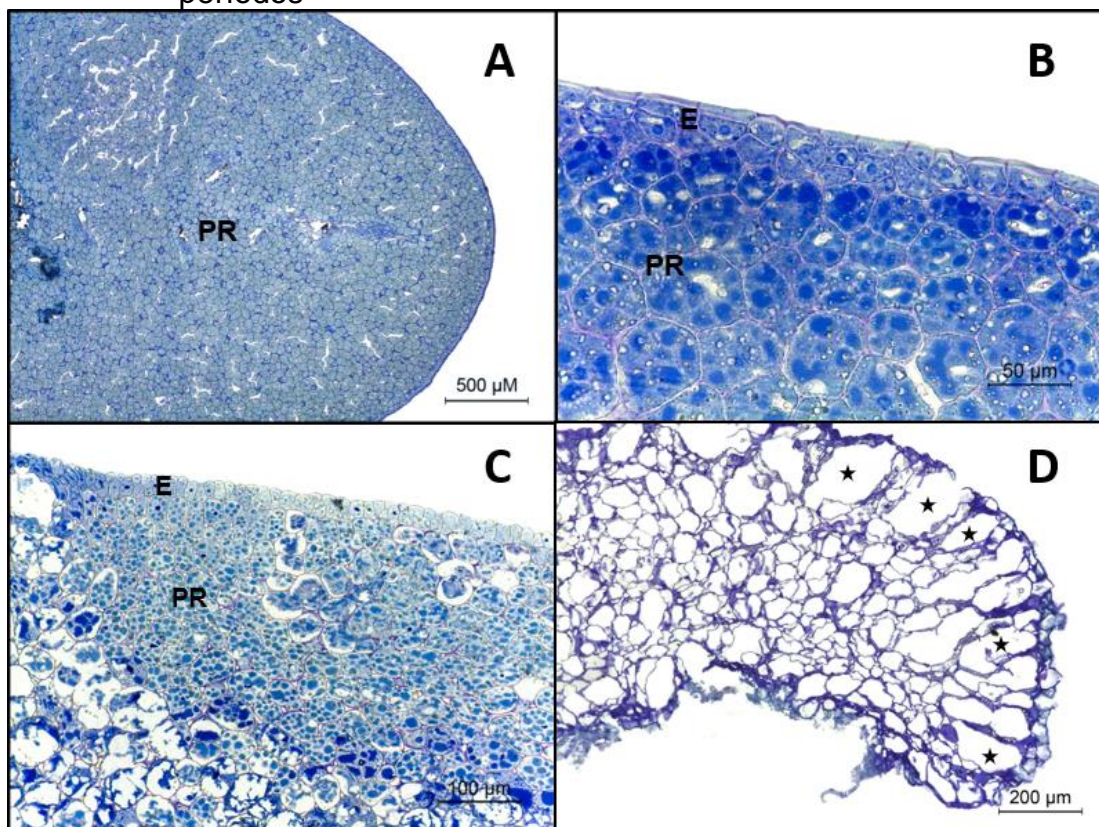
4.3.3 Caracterização histológica

Análises histológicas de cotilédones cultivados em meio MS suplementado com ANA a 54 μM em diferentes tempos de incubação, das raízes adventícias obtidas dos cotilédones e de raízes de plantas *in vivo* foram realizadas, visando à caracterização do processo morfogênico e à análise comparativa da estrutura radicular.

Cotilédones fixados antes da incubação apresentaram um extenso parênquima de reserva, com denso conteúdo citoplasmático (Figura 20A e B). Neste estágio, a epiderme era desorganizada e suas células apresentavam diferentes formas e tamanhos (Figura 20B). No nono dia de cultura, os cotilédones apresentaram diferenciações nos tecidos, preservando algumas regiões com as características iniciais, com conteúdo de reserva em coloração mais intensa e epiderme desorganizada (Figura 20C). A maior parte do explante apresentou uma epiderme delgada uniestratificada, as células parenquimáticas tornaram-se maiores e o tecido mais desorganizado, com a formação de espaços e lacunas entre as células. Estas lacunas apresentaram-se principalmente nas regiões mais externas

do explante, em sentido longitudinal, e nas extremidades, sendo observadas de forma alongada nas secções longitudinais e circulares nas secções transversais (Figura 20D). Com o crescimento do tecido, foram observadas rupturas na superfície dos cotilédones, atingindo a epiderme e algumas camadas do parênquima. Até o nono dia, não foram observadas diferenciações de tecidos que indicassem o desenvolvimento das raízes adventícias.

Figura 20 – Análise histológica de cotilédones de *A. pinto* cultivados em meio MS suplementado com ANA a 54 μ M por diferentes períodos

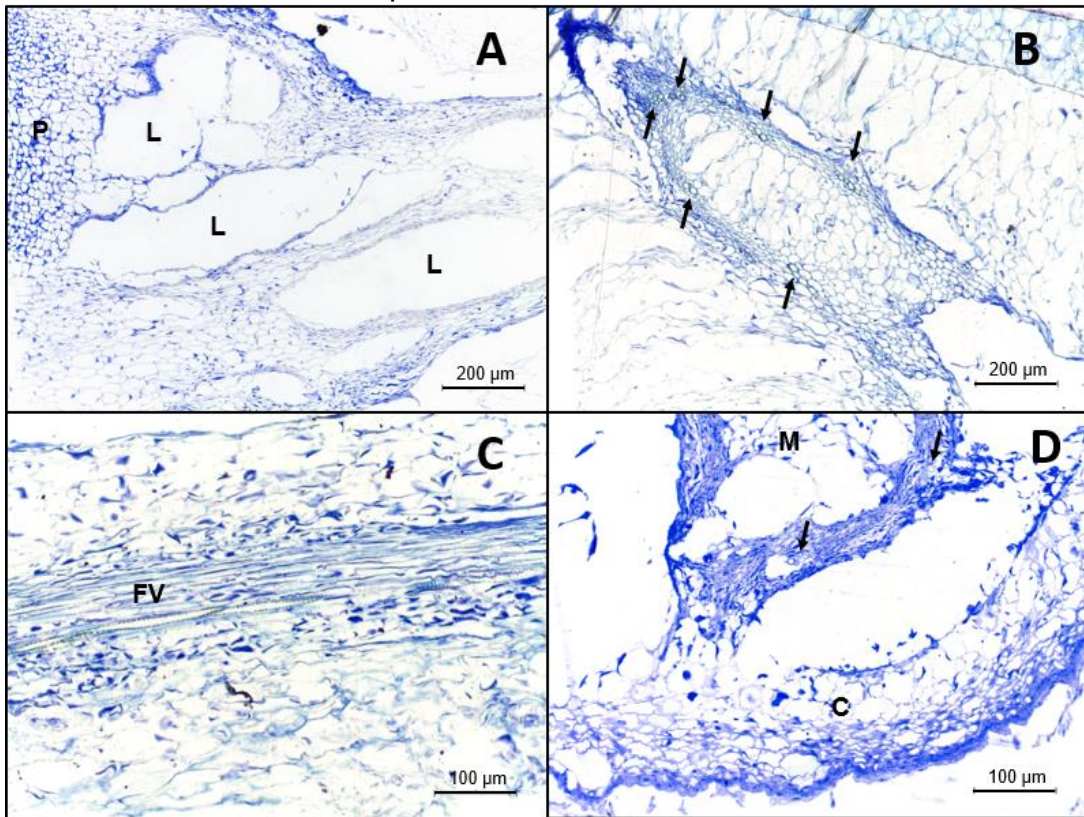


Legenda: A) Secção longitudinal de cotilédone, apresentando extenso parênquima de reserva (PR); B) Secção longitudinal de cotilédone, com detalhe do tecido de reserva e epiderme (E); C) Secção longitudinal de cotilédone após 9 dias de cultura, região com tecido de reserva preservado circundado por tecido parenquimático no qual parte das reservas foram consumidas; D) Secção transversal da extremidade proximal de cotilédone com 9 dias de cultura, apresentando lacunas marcadas com estrela próximo a superfície externa.

A avaliação de explantes com 15 dias de cultura, que apresentavam intumescimento na extremidade de onde foi excisado o embrião, evidenciou intensa divisão celular e a formação de projeções na área do intumescimento. Estas projeções apresentaram grandes lacunas, semelhantes às encontradas nos cotilédones (Figura 21A). Agrupamentos celulares de elementos de vaso com forma circular foram observados em diferentes pontos das projeções menores, que ainda não haviam emergido do tecido parenquimático, indicando o início da diferenciação de tecido vascular (Figura 21B). Em algumas secções, foi possível visualizar a união das células do xilema, formando um tubo longitudinal desde a base até a extremidade da projeção radicular. Contudo, neste estágio, os elementos de vaso ainda apresentavam formato oval. Raízes já desenvolvidas foram também isoladas de explantes de 15 dias, apresentando tecido vascular diferenciado, com a visualização de xilema e floema nas secções longitudinais (Figura 21C). Nestas secções, tanto os elementos de vaso quanto os elementos de tubo crivado apresentavam o formato alongado característico.

Após 18 dias de cultivo, as secções transversais das raízes evidenciaram a presença de córtex bem delimitado e uma região medular parenquimática ao centro. No cilindro central, foram observadas células vasculares organizadas dando forma ao estelo (Figura 21D).

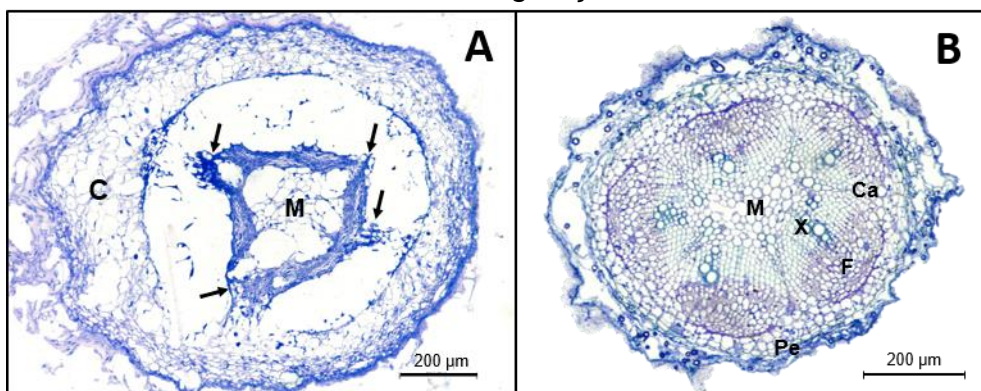
Figura 21 – Análise histológica das raízes adventícias originadas a partir de cotilédones de *A. pinto* cultivados em meio MS suplementado com ANA a 54 μ M



Legenda: A) Secção longitudinal da região proximal de cotilédone após 15 dias de cultura apresentando região de parênquima (P) e formação de projeção radicular com amplas lacunas (L) na base; B) Secção longitudinal da região apical da projeção radicular emergindo do tecido parenquimático em explante com 15 dias de cultura, apresentando grupos de células de xilema apontadas pelas setas; C) Secção longitudinal de raiz excisada do explante após 15 dias de cultura, com feixe vascular (FV) já desenvolvido; D) Secção transversal de raiz após 18 dias de cultura, apresentando córtex (C) e medula (M) bem definidos e tecido vascular indicado pelas setas.

Embora tenha ocorrido lise de células mais delgadas nas raízes adventícias de cotilédones, foi observada a presença das regiões anatômicas características de raízes primárias de plantas *in vivo* (Figura 22A e B). Nas plantas *in vivo*, o cilindro central também foi bastante evidente, com a organização do tecido vascular formando o estelo e a presença de medula parenquimática ao centro.

Figura 22 – Comparação estrutural entre raiz adventícia obtida *in vitro* a partir de cotilédones e raiz de planta de *A. pintoii* mantida em casa de vegetação

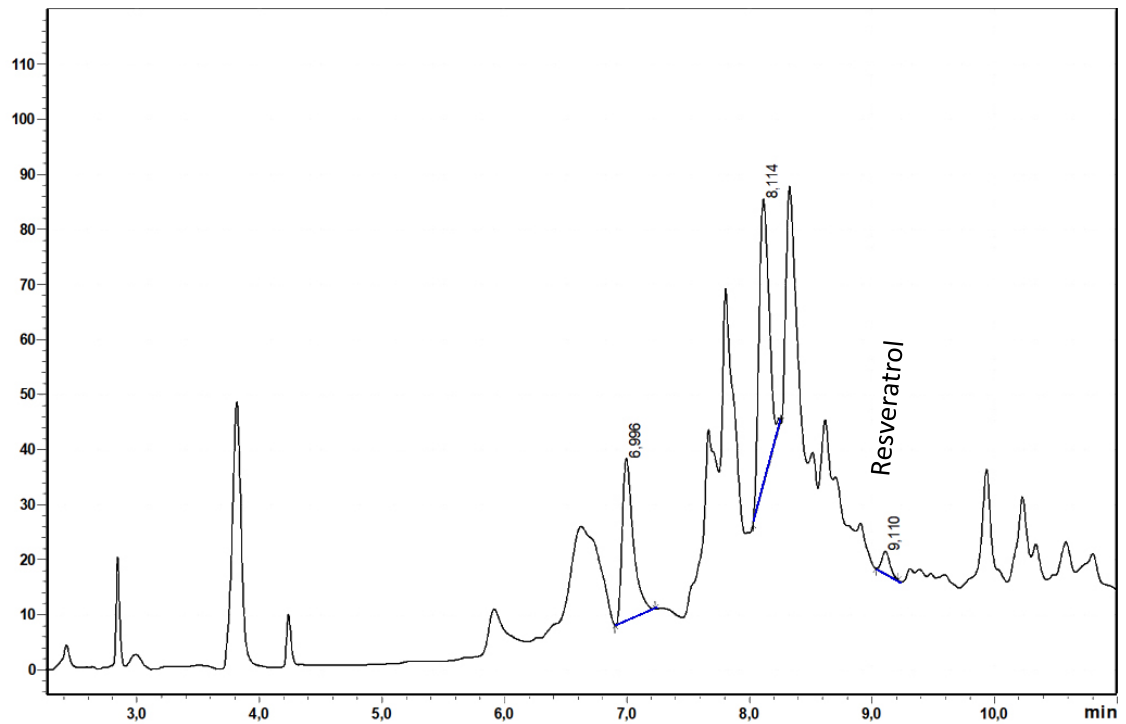


Legenda: A) Secção transversal de raiz adventícia após 18 dias de cultura, apresentando córtex (C) e medula (M) bem definidos e tecido vascular indicado pelas setas; B) Secção transversal da raiz principal de planta *in vivo* com 15 dias de cultivo, apresentando medula (M) parenquimática, xilema (X), floema (F), câmbio vascular (Ca) e início do desenvolvimento da periderme (Pe).

4.3.4 Avaliação fitoquímica e da atividade antioxidante de raízes induzidas

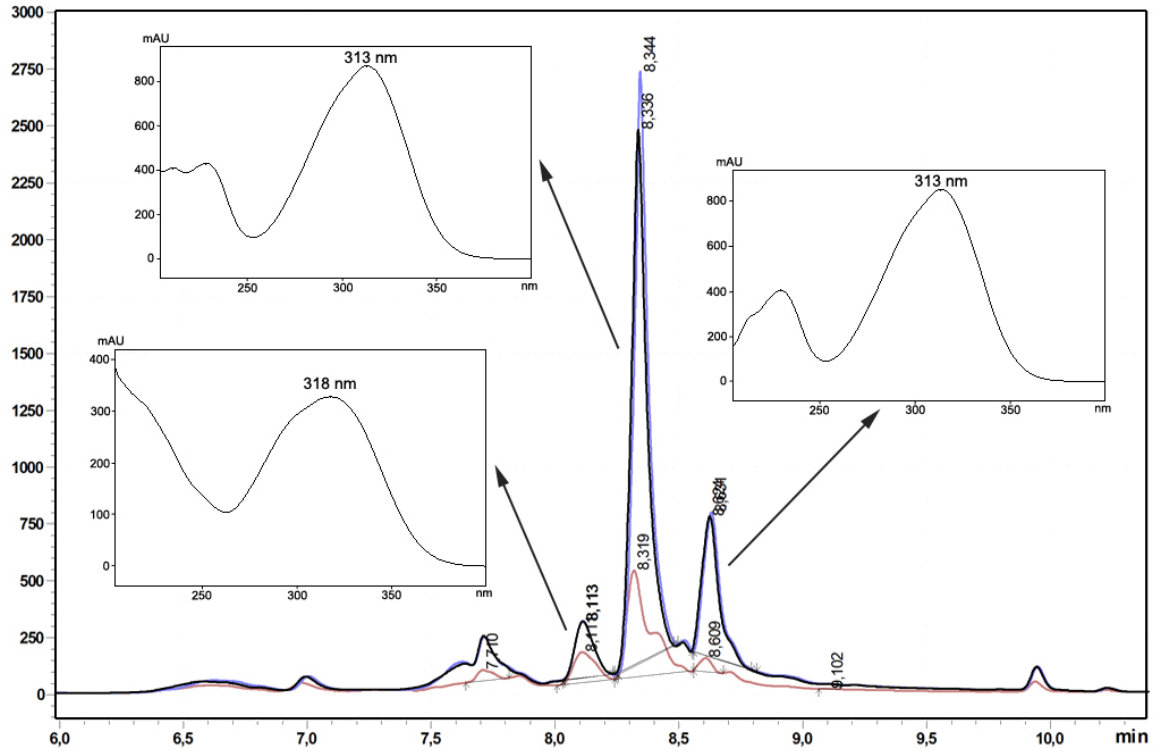
As raízes adventícias induzidas *in vitro* a partir de cotilédones em resposta a diferentes auxinas (ANA, AIA e AIB) e as raízes de plantas cultivadas em condições naturais foram também submetidas às análises fitoquímica e de atividade antioxidante. Entre as amostras avaliadas, o resveratrol foi apenas detectado nas raízes das plantas produzidas *in vivo* em casa de vegetação (Figura 23). Nessas mesmas amostras foram também observados outros sinais com tempos de retenção (tR) de 6,996 e 8,114 minutos, que apresentaram espectro de UV compatível com o de estilbenoides (Figura 23). Nas amostras de raízes adventícias produzidas em resposta a ANA a 54 µM, foram observados três sinais compatíveis com estilbenoides, entre tR 8 e 9 min (Figura 24). As raízes induzidas na presença de AIA a 57 µM apresentaram perfil semelhante ao obtido com ANA, embora com um sinal mais forte da segunda substância (Figura 24). As raízes produzidas em resposta a AIB a 14,7 µM também apresentaram substâncias com espectro compatível com estilbenoides, com os sinais mais baixos que os das outras duas amostras (Figura 24).

Figura 23 – Perfil cromatográfico de extrato etanólico de raízes de plantas de *A. pintoi* mantidas em casa de vegetação por 30 dias, por CLAE-DAD-UV em 306 nm



Legenda: sinal relativo ao resveratrol em tR = 9,11 minutos.

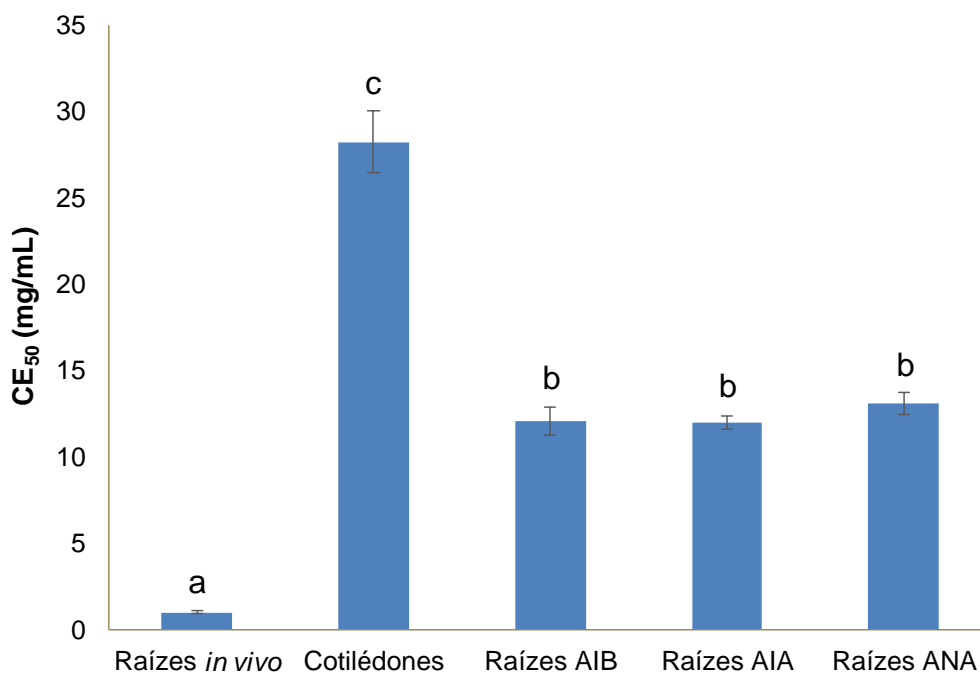
Figura 24 – Perfis cromatográficos de extratos etanólicos de raízes adventícias obtidas *in vitro* a partir de cotilédones de *A. pintoi* cultivados na presença das auxinas, por CLAE-DAD-UV em 306 nm, e espectro de absorção dos sinais majoritários



Legenda: sobreposição dos perfis das raízes induzidas em resposta a ANA (linha preta), AIA (linha azul) e AIB (linha vermelha).

A atividade antioxidante foi maior nos extratos de plantas cultivadas em condições naturais, com um CE_{50} de 0,99 mg/mL. As raízes adventícias apresentaram CE_{50} entre 11,94 e 13,09 mg/mL, metade do valor apresentado para os cotilédones ($CE_{50} = 28,26$ mg/mL), usados como explantes para indução das raízes (Figura 25).

Figura 25 – Potencial antioxidante de extratos etanólicos de cotilédones e raízes de *A. pintoii* pelo ensaio do DPPH



Legenda: letras iguais indicam valores estatisticamente iguais considerando $p \leq 0,05$.

4.4 Discussão

Sistemas de cultura de raízes são produzidos em condições controladas, permitindo a variação dos parâmetros para otimização da produção de biomassa e substâncias de interesse (HUSSAIN et al., 2012b). Diferentes parâmetros podem ser ajustados com essa finalidade, tais como a concentração de fitorreguladores, a composição de sais inorgânicos e a consistência do meio de cultura, além das condições de iluminação, temperatura e outros fatores físicos (KIM et al., 2007).

Em um trabalho anterior, a indução de raízes adventícias de *A. pintoii* foi obtida a partir de explantes de cotilédones cultivados na ausência de luz em meios suplementados com ANA, AIA e AIB (SOUSA, 2015). Em resposta a AIA, as raízes eram curtas e não ramificadas. Por outro lado, raízes com alta produção de biomassa e grande número de ramificações foram obtidas em resposta a ANA e AIB, sendo o melhor resultado observado na presença de ANA a 54 μ M. A capacidade de

multiplicação dos segmentos radiculares também foi estudada, utilizando-se cinco sistemas de cultura, porém mantendo-se o tipo e a concentração dos fitorreguladores utilizados na fase de indução. Em meios contendo AIA, foi obtida apenas calogênese e, portanto, este fitorregulador não foi utilizado na continuação do trabalho. Os explantes cultivados em AIB a 14,7 μM originaram raízes alongadas e sem ramificações em meio líquido sob agitação, entretanto, ramificações foram observadas em meio líquido sob pontes de papel de filtro. Nesse mesmo sistema, foram obtidas raízes mais espessas e ramificadas em resposta a ANA a 54 μM . Nos demais sistemas, foi observado, além da calogênese, uma intensa oxidação dos explantes. Considerando esses resultados, no presente trabalho, a otimização do processo de multiplicação das raízes induzidas a partir de cotilédones de *A. pintoi* foi avaliada comparando-se dois tamanhos de explantes, os quais foram incubados no sistema de pontes de papel de filtro sobre meio líquido suplementado com diferentes concentrações de ANA e AIB.

Explantes com 2 cm de comprimento cultivados na presença de AIB a 0,49 μM apresentaram maior comprimento das raízes principal e secundárias e do número de ramificações por explante. Este resultado evidencia a importância de avaliar os tipos e concentrações de fitorreguladores em ambas as etapas, indução e multiplicação, visto que a melhor condição para indução a partir dos explantes cotiledonares foi em resposta a suplementação com ANA a 54 μM (SOUSA, 2015).

A diferença em relação ao tipo e à concentração de auxinas requeridas para a indução e proliferação de raízes adventícias pode estar relacionada ao explante utilizado em cada etapa e ao seu balanço interno de fitorreguladores. Em *A. pintoi*, enquanto que para a indução foi necessária uma suplementação com altas concentrações de auxinas, o desenvolvimento de raízes a partir de segmentos radiculares ocorreu na presença de baixas concentrações. De forma semelhante, a indução de raízes adventícias em avelã (*Corylus avellana*) a partir de explantes de cotilédones foi melhor na maior concentração de auxinas testada, que consistiu em AIA ou AIB a 50 μM (GONZÁLES et al., 1991). O mesmo ocorreu com segmentos cotiledonares de manga (*Mangifera indica* L. cv. Zihua) submetidos a pré-tratamentos de 1 hora com altas concentrações de auxinas, obtendo-se a maior rizogênese em resposta a AIA a 2.900 μM , AIB a 2.500 μM e ANA a 2.700 μM (LI et al., 2008).

Na indução de raízes adventícias a partir de cotilédones de *A. pinto* descrita por Sousa (2015), os cotilédones apresentaram formação de diferentes tipos de raízes na presença de AIA, AIB e ANA, tendo este último fitorregulador estimulado a produção de raízes mais longas e ramificadas que os demais. Com exceção de AIB, os melhores resultados foram obtidos nas maiores concentrações testadas. Li et al. (2008) também observaram diferentes padrões de formação de raízes em resposta a AIB e AIA (apenas região proximal) ou ANA (região proximal e face abaxial), provavelmente relacionados ao transporte polar de auxina em direção à região proximal do explante e ao transporte de ANA por difusão para a região abaxial. A forma como ocorre o transporte das diferentes auxinas influencia diretamente o tipo e a eficiência de indução de raízes. Por ser uma auxina natural, AIA possui alta afinidade pelos carreadores de infuxo e efluxo (YANG et al., 2006). A auxina sintética ANA, apesar de ser um bom substrato para carreadores de efluxo de auxinas, possui natureza lipofílica e é transportada principalmente por difusão (STIEGER; REINHARDT; KUHLEMEIER, 2002), sendo absorvida e transportada de forma mais rápida que as demais auxinas (PARRY et al., 2001).

O processo de formação das raízes adventícias é dividido em três etapas: indução, iniciação e expressão (NAG, SAHA, CHOUDHURI, 2001). De acordo com Nag, Saha e Choudhuri (2001), um alto nível de auxina é necessário na fase de indução (0 a 24 h) para iniciar a divisão celular, e o pico de auxina constitui o marco do fim desta fase. Na fase de iniciação (24 a 72 h), há uma redução de auxina livre no tecido devido à atuação de enzimas específicas, como a AIA-oxidase. Nesta fase, alguns tipos de fenóis teriam uma atuação importante como cofatores. Na fase de expressão (após 72 h), há uma redução na taxa desses fenóis, devido à sua oxidação na fase anterior. Nesta última fase, é observado o desenvolvimento radicular.

No presente trabalho, a fase de expressão das raízes adventícias a partir de cotilédones em resposta a ANA foi investigada histologicamente. O explante apresentou uma expansão do tecido parenquimático nos primeiros dias de cultura, formando um intumescimento na extremidade proximal, onde estava localizado o embrião. O processo de rizogênese ocorreu a partir do tecido parenquimático, que apresentou o desenvolvimento de projeções com amplas lacunas no interior da região intumescida. A diferenciação de tecidos vasculares foi observada em diferentes pontos após a formação da projeção radicular, seguido de alongamento e

conexão dessas células, formando o primórdio radicular, que continuou se desenvolvendo até emergir.

Li et al. (2008) também descreveram a rizogênese a partir de cotilédones de manga, na região de excisão do embrião, evidenciando a influência do transporte polar das auxinas no interior do explante em direção à extremidade proximal. Entretanto, o desenvolvimento da estrutura radicular diferiu do observado em *A. pintoii*, uma vez que houve a formação de células meristemáticas a partir da divisão celular do parênquima adjacente ao floema no tecido vascular, seguido da conexão com o sistema vascular do explante e formação do primórdio radicular, cujo alongamento levou à emergência da raiz.

De forma semelhante à rizogênese em manga, cotilédones de avelã foram utilizados como explantes para a indução de raízes adventícias. Ermel et al. (2000) descreveram a formação de uma estrutura com aparência de pecíolo na região de conexão com o embrião e o desenvolvimento de raízes a partir do seu tecido vascular. Embora, no presente trabalho, cotilédones de *A. pintoii* também tenham apresentado o intumescimento da região proximal, não foi observada a diferenciação de tecido vascular nessa região, apenas no interior das projeções radiculares.

As raízes adventícias de *A. pintoii* formadas em resposta a ANA foram também comparadas com raízes de plantas cultivadas em condições naturais. Células mais delgadas presentes nas raízes adventícias apresentaram rompimento, devido ao processo de desidratação e emblocamento, conforme observado na secção transversal de raízes após 18 dias de cultura. Apesar disso, a comparação dos materiais não foi comprometida, ficando bastante evidente a semelhança na organização estrutural, com a presença de regiões cortical e medular, formadas de tecido parenquimático, e o cilindro vascular bem definido.

Um outro aspecto estudado neste trabalho foi a caracterização fitoquímica e a avaliação das raízes adventícias induzidas a partir de cotilédones de *A. pintoii*. Os extratos de raízes de plantas de casa de vegetação apresentaram uma alta atividade antioxidante ($CE_{50} = 0,99$ mg/mL), que pode estar relacionada à presença de diferentes substâncias fenólicas, incluindo o resveratrol, detectado nas análises cromatográficas por CLAE (2,64 μ g/g peso fresco ou 8,38 μ g/g peso seco). Chen, Wu e Chiou (2002) analisaram raízes de amendoim (*A. hypogaea*) coletadas em diferentes estações do ano, obtendo 0,13 a 1,33 mg/g de resveratrol no outono e 0,015 a 0,063 mg/g na primavera. Esses valores mais altos em relação ao obtido

neste trabalho podem ser justificados pelas condições de cultura, visto que as plantas de *A. pintoii* utilizadas neste estudo foram cultivadas em casa de vegetação. Embora sejam diferentes condições, Liu et al. (2003) submeteram plantas de amendoim ao cultivo em solo e em água, obtendo 0,074 mg/g de resveratrol em cultivo em água e 0,114 mg/g cultivado em campo.

Os extratos de raízes adventícias induzidas em resposta a AIA, AIB e ANA apresentaram menor atividade antioxidante que raízes de plantas *in vivo* e maior que cotilédones, não tendo sido detectada a presença de resveratrol. Entretanto, foram observados alguns outros sinais nas análises cromatográficas das raízes adventícias, provavelmente correspondentes a outros estilbenos não identificados, o que poderia estar associado ao potencial antioxidante, além da presença de outras substâncias fenólicas.

5 AVALIAÇÃO FITOQUÍMICA E DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS ETANÓLICOS DE CALOS E SEMENTES

5.1 Introdução

Linhagens celulares estabelecidas *in vitro* podem apresentar o potencial para síntese de substâncias bioativas em níveis comparáveis ao da planta original, consistindo em fontes renováveis de produção (RAZAVIZADEH et al., 2019). Dessa forma, culturas de calos e de células em suspensão têm sido amplamente utilizadas para obtenção de substâncias de uso terapêutico sintetizadas por diversas espécies medicinais, com um aumento considerável na produção em relação às quantidades observadas em condições naturais (CHARLET et al., 2000; TRIPATHI; TRIPATHI, 2003; WILSON; ROBERTS, 2012). Por exemplo, o paclitaxel, empregado no tratamento de diversos tipos de câncer, tem sido produzido em larga escala a partir de culturas de células e raízes de *Taxus brevifolia* Nutt. (FETT-NETO; ZHANG; DICOSMO, 1994; FURMANOWA; SYKLOWSKA-BARANEK, 2000; ZHANG; WU, 2003; ZHONG, 2002). Essa substância, encontrada em baixas concentrações em cascas do caule dessa espécie rara e de crescimento lento, era antes obtida por extrativismo, causando danos graves a várias populações nativas na China e na Índia (TABATA, 2004).

A indução, a proliferação e o acúmulo de metabólitos secundários de calos são processos que podem ser modulados pela adição de reguladores de crescimento aos meios de cultura, em especial de substâncias dos grupos das auxinas e citocininas (COIMBRA et al., 2017). Esses dois grupos de fitorreguladores podem apresentar interações sinérgicas, aditivas ou antagônicas, na sinalização e nas respostas fisiológicas, que dependem ainda da espécie e do tipo de tecido vegetal (CHANDLER, WERR, 2015).

O estabelecimento de culturas de calos em espécies de *Arachis* vem sendo descrito há algumas décadas com vistas à regeneração de plantas (STILL; PLATA; NIBLETT, 1985; PACHECO et al., 2009), obtenção de protoplastos (LI; JARRET; DEMSKI, 1995), transformação genética (CLEMENTE et al., 1992), indução de

variabilidade genética para o melhoramento (JAIN, BHATNAGAR, SARIN, 1999), estudos bioquímicos (JAIN et al., 2002) e produção de metabólitos (KU et al., 2005).

Estudos em *A. hypogaea* têm indicado a presença de estilbenoides em calos, como resveratrol, piceatanol e isopentenilresveratrol, sem eliciação (SANTOS, 2016) ou com o uso de agentes eliciadores abióticos e bióticos (YANG et al. 2010a; 2010b). Entre os abióticos, foram utilizados agentes físicos, como luz UV-C (FRITZEMEIER et al., 1983; KU et al., 2005), e químicos, como metil jasmonato e sacarose (YANG et al., 2010a). Para a eliciação biótica, foram utilizados suspensões do micélio do cogumelo *Ganoderma lucidum*, utilizado na medicina chinesa (YANG et al., 2010a) e fitopatógenos, como os fungos *Botryodiplodia theobromae* e *Botrytis cinerea* (YANG et al., 2010b) e as bactérias *Xanthomonas campestris* pv. *citri* e *Pseudochrobactrum asaccharolyticum*, sendo esta última isolada de sementes de amendoim (YANG et al., 2010b). Além disso, foi utilizada a quitina como agente eliciador biótico, uma substância isolada da parede celular de fungos que atua como fator de sinalização na resistência a doenças em plantas (KORSANGRUANG et al., 2010; YANG et al., 2010b). O estabelecimento dessas culturas de calos foi realizado a partir de explantes caulinares de plantas *in vivo* (KU et al., 2005) e explantes de sementes (YANG et al., 2010a; 2010b). Culturas de calos foram obtidas para *A. repens* a partir de explantes nodais, internodais e foliares de plantas produzida *in vitro*, em resposta a diferentes reguladores de crescimento e qualidades de luz. O resveratrol foi detectado nessas culturas, na ausência de agentes eliciadores (GARCIA et al., 2018; SANTOS-TIerno, 2017).

Sistemas de cultura de calos foram também estabelecidos para *A. pintoi*. Calos organogênicos foram obtidos em resposta a BAP e ANA a partir de explantes foliares de plantas *in vitro* (BURTNIK; MROGINSKI, 1985; PITTMAN et al., 1983) e em resposta a BAP e AIA sob diferentes fotoperíodos (NGO; QUESENBERRY, 2000). Calos organogênicos foram ainda descritos em resposta a ANA e 2,4-D em combinação com BAP, cinetina (CIN) ou isopenteniladenina (2iP) a partir de explantes de folhas de plantas mantidas em condições naturais (REY et al., 2000). No mesmo trabalho, foram obtidos calos embriogênicos em meios suplementados com picloram (PIC) em combinação com CIN, BAP, 2iP ou zeatina (ZEA). Além disso, calos embriogênicos foram produzidos em resposta a combinações de PIC e BAP utilizando explantes de ápices caulinares (REY; MROGINSKI, 2006).

Mais recentemente, culturas calos de *A. pintoii* foram estabelecidas por Sousa (2015) a partir de explantes de sementes (cotilédones, folíolos e eixos embrionários) cultivados na presença de PIC, 2,4-D, tidiazuron (TDZ) e combinações de BAP e ANA. Foram estabelecidos calos provenientes de três tipos de explantes, selecionando as melhores condições para cada, que consistiram em maior proporção de ANA (BAP a 4,4 μM e ANA a 10,8 μM) para cotilédones e eixos embrionários, e maior proporção de BAP (BAP a 17,6 μM e ANA a 5,4 μM) para folíolos embrionários.

Considerando o potencial deste tipo de sistema para produção de substâncias bioativas, o objetivo desta parte do trabalho foi realizar um estudo comparativo do teor de fenóis totais e do perfil fitoquímico, incluindo a quantificação de resveratrol, além da atividade antioxidante de extratos de calos e sementes de *A. pintoii*.

5.2 Metodologia

5.2.1 Indução de culturas de calos

Culturas de calos foram estabelecidas de acordo com Sousa (2015). Sementes de *A. pintoii* foram descontaminadas conforme descrito anteriormente no item 4.2.1. Cotilédones e eixos embrionários sem os folíolos foram inoculados em meio MS suplementado com BAP a 4,4 μM e ANA a 10,8 μM . Os folíolos embrionários foram incubados em meio contendo BAP a 17,6 μM e ANA a 5,4 μM .

Cotilédones e eixos embrionários foram distribuídos em número de quatro explantes por frasco. Os oito folíolos embrionários pertencentes a cada embrião foram inoculados em um mesmo frasco. As culturas foram mantidas a $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ na ausência de luz.

O acúmulo de biomassa foi avaliado após 60 dias de cultivo pela aferição dos pesos fresco (PF) e seco (PS). Para a determinação do peso seco, os calos foram secos em estufa a 50°C por 48 horas. Após a secagem, os materiais foram congelados a -20°C até o preparo dos extratos.

5.2.2 Avaliação fitoquímica

5.2.2.1 Preparo de extratos

Sementes com ou sem tegumento, cotilédones e calos derivados de cotilédones, eixos e folíolos embrionários foram secos em estufa a 50°C por 48 horas, sendo em seguida triturados em moinho (IKA® A11 basic). Os materiais foram deslipidificados por extração em ultrassom (Unique® UltraCleaner 1400) com *n*-hexano (Vetec®) a 50 mL/g de material seco por 30 minutos, filtrados e re-extraídos por ultrassonicação com etanol (Vetec®) a 80% (v/v), na proporção de 50 mL/g de material seco, por 30 minutos (SANTOS, 2016). Os extratos obtidos foram filtrados e concentrados sob pressão reduzida (Evaporador Rotativo Marconi – M120) a 40°C, sendo armazenados a - 20°C.

5.2.2.2 Análise fitoquímica qualitativa e quantificação de resveratrol

A análise fitoquímica qualitativa e a quantificação do teor de resveratrol dos extratos etanólicos dos diferentes materiais foi realizada por CLAE acoplada a detector de ultravioleta em rede de diodos (*diode array detector* - DAD-UV), como descrito no item 4.2.4.2, em equipamento da marca Shimadzu® Nexera XR equipado com controlador CBM20A, desgaseificador DGU20A, bomba binária LC20AD, forno CTO20A, injetor automático SILA20A, sistema de detecção por DAD-UV-VIS SPDM20A. Para quantificação do resveratrol, foram adotados os parâmetros analíticos validados de acordo com normas nacionais e internacionais (ICH-Q2A, 1995; ICH-Q2B, 1996; INMETRO, 2007) para a dosagem do *trans*-resveratrol, de acordo com Moreira et al. (*apud* SANTOS, 2016).

Os diferentes extratos foram dissolvidos em metanol grau HPLC (Tedia®, Brasil) a uma concentração final de 10 mg/mL, e filtrados em filtro Milipore 0,45 µm. As análises qualitativas foram feitas em coluna C18 Thermo (250 mm x 4,6 mm i.d. x 5 µm), com fluxo de 1,0 mL/min, temperatura do forno em 50°C, com leitura nos

comprimentos de onda 254 nm e 306 nm. O volume injetado para todas as amostras foi de 20 µL. A fase móvel foi composta de: (A) água ultrapura (MiliQ) acidificada com ácido acético glacial (pH = 3,0) e (B) acetonitrila grau espectroscópico (Tedia, Brasil). A eluição foi feita em modo gradiente, começando em 95% de A e 5% de B até atingir 5% de A e 95% de B, em 80 minutos, e mais 10 minutos para estabilizar a coluna na fase móvel inicial, sendo o tempo total de análise de 90 minutos. A solução padrão de *trans*-resveratrol (Sigma-Aldrich, Brasil) foi preparada no dia das análises, a uma concentração estoque de 1 mg/mL em metanol grau espectroscópico (Tedia, Brasil) e analisada nas mesmas condições das amostras (soluções de trabalho a 1 µg/mL ou 500 ng/mL). O *trans*-resveratrol nas amostras foi detectado a 306 nm. Os valores percentuais de área foram obtidos pela integração dos sinais, com auxílio do programa LabSolutions (Shimadzu). O percentual relativo de cada substância identificada está relacionado ao somatório de área de todos os sinais do cromatograma, em um determinado comprimento de onda, que representa 100%. O valor de uma determinada área representa o percentual relativo da substância correspondente.

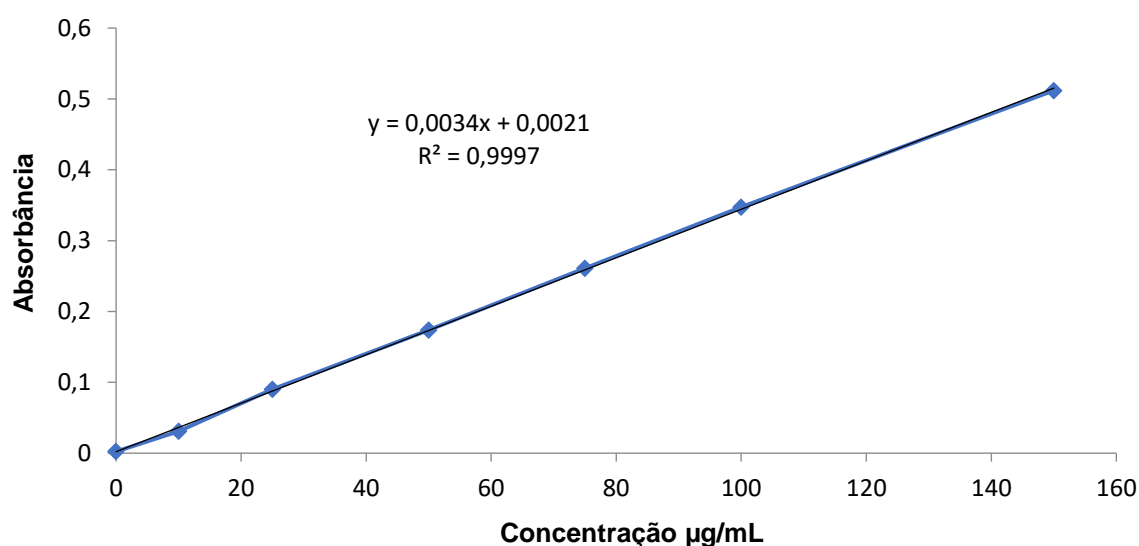
Para a quantificação do resveratrol, os extratos foram analisados em coluna analítica Supelco Ascentis® Phenyl (250 mm x 4,6 mm i.d. x 5 µm), sendo utilizados como fase móvel: (A) água ultrapura (MiliQ) acidificada com ácido acético glacial (pH 3,0), (B) acetonitrila grau espectroscópico (Tedia, Brasil) e (C) metanol grau espectroscópico (Tedia, Brasil), em sistema de gradiente (Quadro 4). O volume de injeção foi de 20 µL e o fluxo foi de 1 mL/min. O monitoramento foi feito em 306 nm. Essas avaliações foram realizadas em colaboração com o professor Dr. Davyson Moreira, do Instituto de Tecnologia em Fármacos da Fundação Oswaldo Cruz, no Laboratório de Toxicologia Ambiental do DCB/ ENSP/ FIOCRUZ.

5.2.2.3 Determinação do conteúdo de fenóis totais

O conteúdo de fenóis totais nos extratos etanólicos foi determinado usando o método colorimétrico de Folin-Ciocalteu utilizando a metodologia estabelecida por Holland et al. (2011), com modificações. Os extratos foram ressuspensos em solução aquosa de etanol a 80%, a uma concentração de 50 µg/mL. 90 µL de cada

amostra foram adicionados a 180 μL de solução de Folin-Ciocalteu a 10% (v/v), sendo então acrescentados 730 μL de Na_2CO_3 a 100 mM. Os materiais foram mantidos no escuro, em temperatura ambiente, por 2 h. A absorbância foi medida a 765 nm em espectrofotômetro UV-Vis BioMate 3S (ThermoScientific). A quantificação foi realizada com base na curva analítica do ácido gálico (Figura 26) e os resultados expressos em miligramas equivalentes de ácido gálico (EAG) por grama de amostra.

Figura 26 – Curva padrão de ácido gálico pelo ensaio Folin-Ciocalteu



5.2.3 Avaliação da atividade antioxidante

A avaliação da atividade antioxidante dos extratos etanólicos foi realizada utilizando-se o ensaio de captura do radical livre DPPH• (2,2-difenil-1-picril hidrazil), com base no método de Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995). Os extratos foram ressuspensos em metanol, em diferentes concentrações (0,1 a 40 mg/mL), e submetidos à metodologia descrita no item 4.2.4.

Os resultados foram expressos em valor de CE_{50} (concentração necessária de extrato para reduzir em 50% a concentração inicial do DPPH). Todos os experimentos foram realizados em duplicata.

5.2.4 Análise estatística

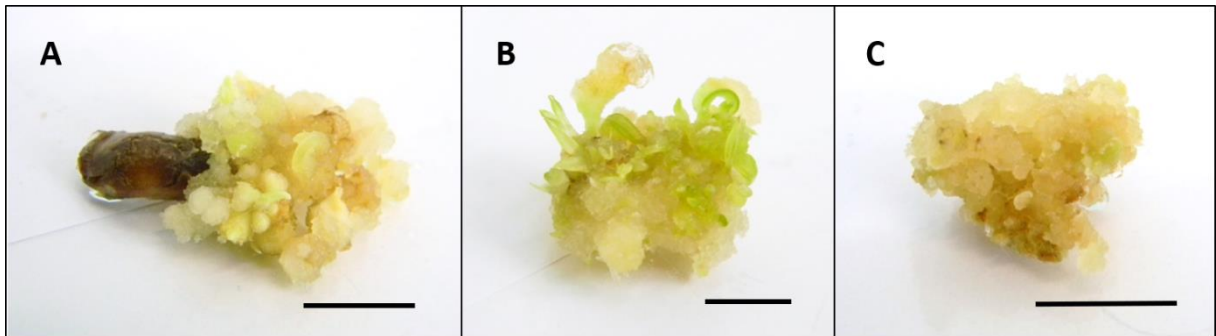
A avaliação estatística dos dados experimentais foi realizada através da análise de variância (ANOVA) e do teste de comparação de Tukey-Kramer, com o auxílio do programa GraphPad Prism 6 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA). Foram considerados significativos os valores de $p \leq 0,05$, adotando-se um intervalo de confiança de 95%.

5.3 Resultados

5.3.1 Indução de calos e análise fitoquímica qualitativa

Os explantes de cotilédones e eixos embrionários produziram calos heterogêneos, com base compacta e superfície friável, enquanto folíolos embrionários originaram apenas calos friáveis (Figura 27), confirmando os resultados obtidos anteriormente (SOUSA-MACHADO et al., 2018, ANEXO). A massa friável dos calos heterogêneos de cotilédones e eixos embrionários foi coletada, apresentando uma média de $0,209 \pm 0,020$ g e $0,251 \pm 0,030$ g de peso seco por explante, respectivamente. Calos friáveis provenientes de folíolos embrionários apresentaram $0,313 \pm 0,030$ g de peso seco por explante.

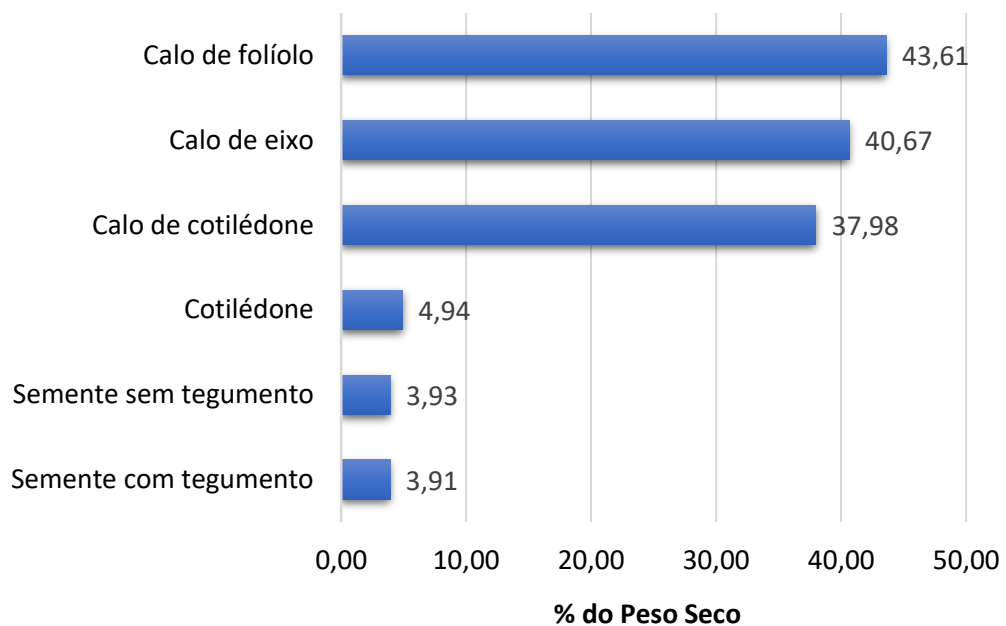
Figura 27 – Calos formados a partir de explantes de sementes de *A. pinto*, após 60 dias de cultivo no escuro



Legenda: Calos derivados de cotilédones (A) e eixos embrionários (B) cultivados na presença de BAP a $4,4 \mu\text{M}$ e ANA a $10,8 \mu\text{M}$; C) Calo derivado de folíolo embrionário em resposta a BAP a $17,6 \mu\text{M}$ e ANA a $5,4 \mu\text{M}$.

Extratos de calos apresentaram rendimentos (37,98 a 43,61% da amostra seca) cerca de 10 vezes maiores que os obtidos nos diferentes extratos derivados de sementes (3,91 a 4,94% da amostra seca) (Figura 28).

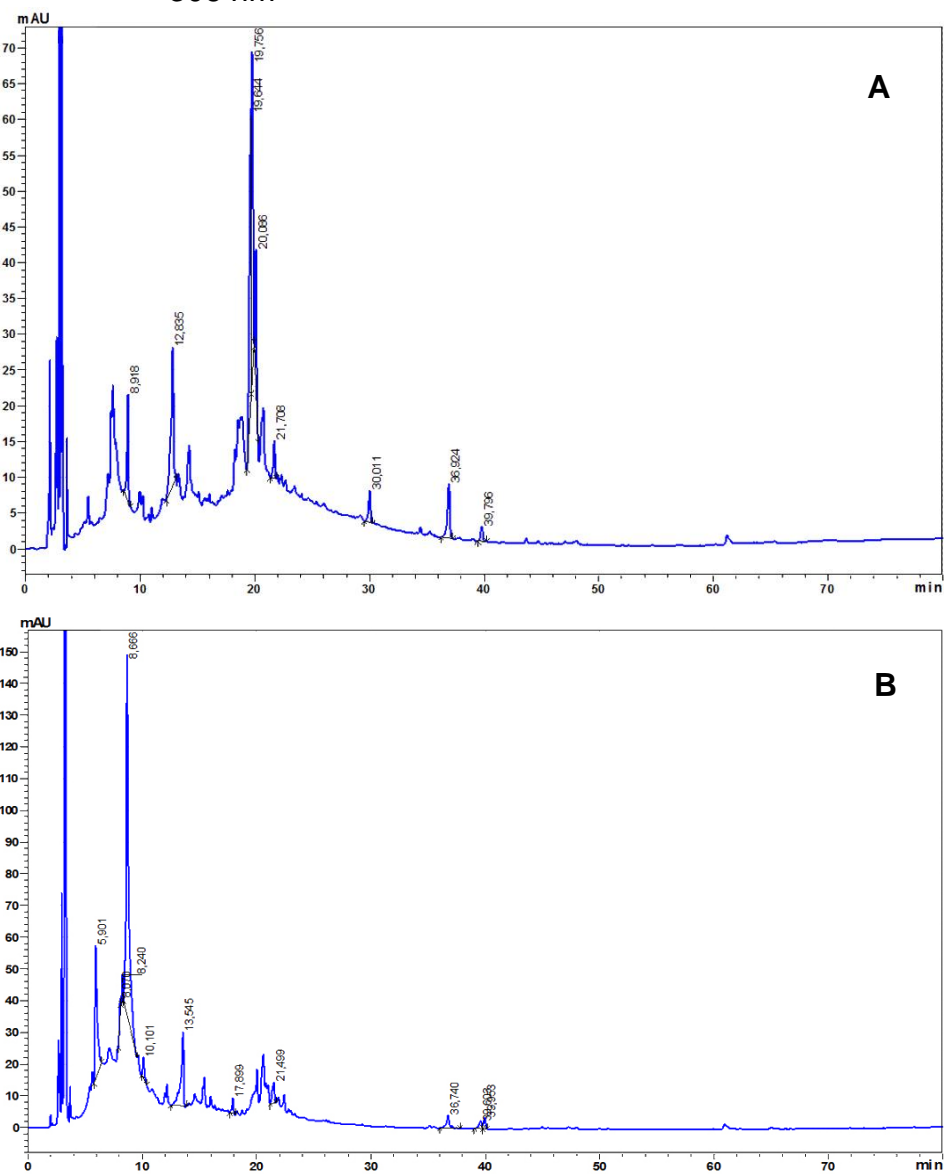
Figura 28 – Rendimento dos extratos etanólicos de calos e sementes de *A. pinto*



A análise fitoquímica qualitativa das amostras por CLAE evidenciou que os calos derivados de explantes de sementes apresentam perfis fitoquímicos semelhantes (dados não mostrados). Esses extratos eram complexos e mais ricos em substâncias de polaridade média, cujos tempos de retenção (tR) variaram entre 12 a 22 minutos, apresentando sinais com características de estilbenos ($\lambda_{\text{máx}} = 306$ nm) em tR em torno de 20 min (Figura 29A).

Os extratos de cotilédones e sementes com ou sem tegumento também eram complexos e apresentaram substâncias polares, de polaridade média, e apolares, visualizadas em diferentes comprimentos de onda. Os três materiais apresentaram uma substância apolar em tR em torno de 71,9 min quando analisadas a 254 nm, não detectada em extratos de calos (dados não mostrados), além de grupos de estilbenos com maior concentração entre tR de 6 a 10 min, observados em 306 nm. O extrato de sementes com tegumento apresentou um estilbeno com sinal majoritário a 306 nm, com tR em 8,6 min (Figura 29B).

Figura 29 – Perfil cromatográfico de extratos etanólicos de calos derivados de cotilédones e de sementes com tegumento de *Arachis pintoj*, por CLAE-DAD-UV em 306 nm



Legenda: Análise qualitativa (tempo total = 90 min) em 306 nm de: A) extrato de calos derivados de cotilédones; B) extrato de sementes com tegumento.

5.3.2 Quantificação dos teores de resveratrol e fenóis totais

Calos obtidos a partir de cotilédones e eixos embrionários apresentaram teores de fenóis semelhantes ($0,57 \pm 0,04$ e $0,53 \pm 0,02$ mg EAG/ g de PF, respectivamente), enquanto calos derivados de folíolos embrionários apresentaram um valor significativamente menor ($0,39 \pm 0,04$ mg EAG/g de PF) (Tabela 2). Extratos de cotilédones e sementes com ou sem tegumento apresentaram maior conteúdo fenólico quando comparados aos calos, embora a presença de resveratrol não tenha sido detectada nesses materiais.

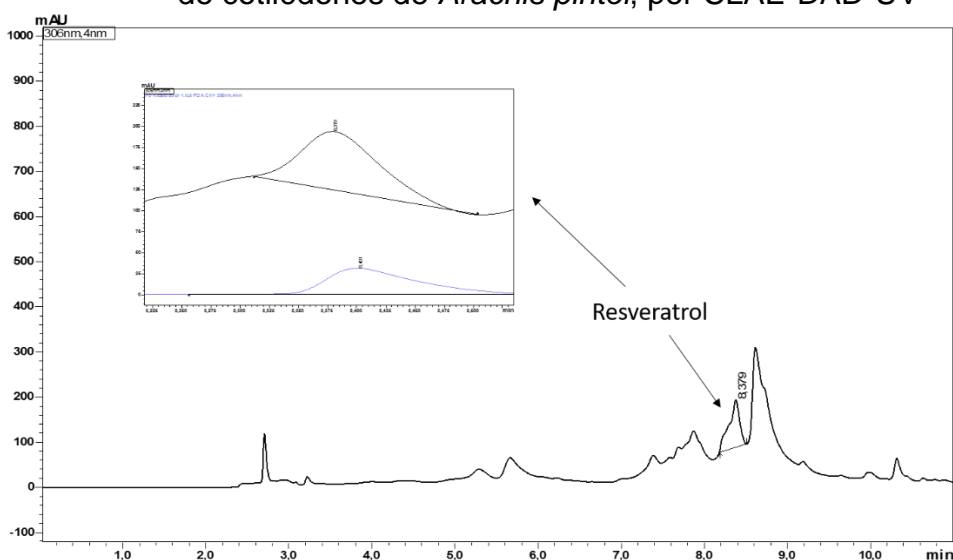
Extratos de calos obtidos de cotilédones apresentaram o maior teor de resveratrol ($8,37 \pm 0,23$ μ g/g de PF), 10 vezes superior ao observado em calos de eixos e folíolos embrionários (Tabela 2, Figura 30).

Tabela 2 – Conteúdo de fenóis totais e teor de resveratrol de extratos etanólicos de diferentes amostras de calos e sementes de *A. pintoii*

Amostra	Fenóis totais (mg EAG/g PF)	Resveratrol (μg/g PF)
Sementes com tegumento	$1,27 \pm 0,15^b$	ND
Sementes sem tegumento	$1,37 \pm 0,20^b$	ND
Cotilédones	$1,68 \pm 0,20^a$	ND
Calos de cotilédones	$0,54 \pm 0,02^c$	$8,37 \pm 0,23^a$
Calos de eixos embrionários	$0,57 \pm 0,04^c$	$0,62 \pm 0,02^b$
Calos de folíolos embrionários	$0,39 \pm 0,04^d$	$0,69 \pm 0,00^b$

Legenda: letras iguais na mesma coluna indicam valores estatisticamente iguais considerando $p \leq 0,05$. EAG – equivalentes de ácido gálico; PF – peso fresco; ND – não detectado.

Figura 30 – Cromatograma de análise quantitativa para detecção de resveratrol em extrato etanólico de calos derivados de cotilédones de *Arachis pintoi*, por CLAE-DAD-UV



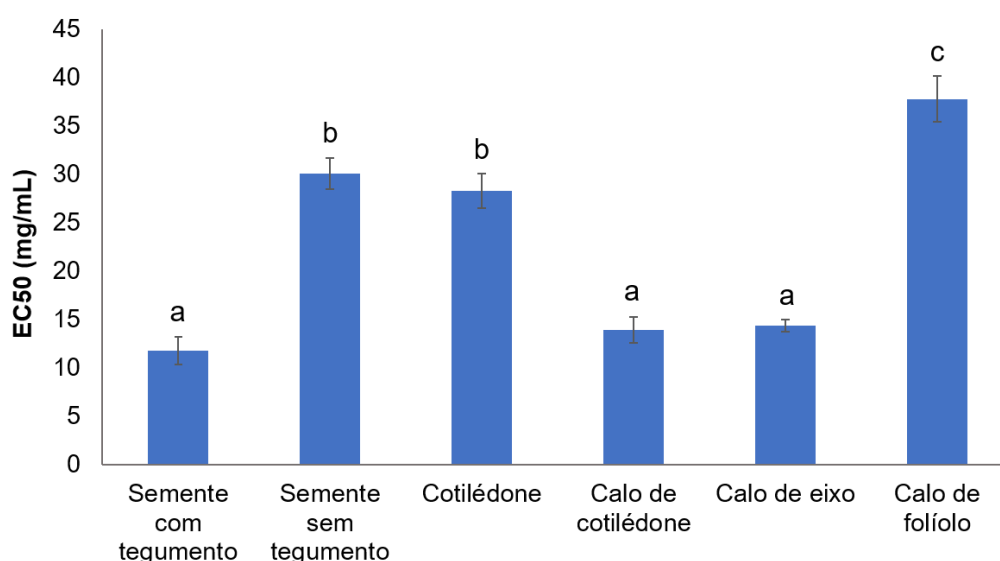
Legenda: Tempo total = 11 min, com expansão da região do sinal referente ao resveratrol ($t_R = 8,4$ min) em sobreposição ao sinal do padrão (linha azul) em 306 nm.

5.3.3 Avaliação da atividade antioxidante

A maior atividade antioxidante foi observada no extrato de sementes com tegumento ($CE_{50} = 11,7$ mg/mL), seguido dos extratos de calos derivados de cotilédones e de eixos embrionários (Figura 31). Entre os extratos de sementes, as amostras com tegumento apresentaram uma atividade antioxidante quase três vezes maior que as de sementes sem tegumento e cotilédones.

Na análise comparativa entre os extratos de calos, as amostras oriundas de eixos embrionários e cotilédones também apresentaram uma atividade quase três vezes maior que os calos derivados de folíolos embrionários. O extrato de calos de cotilédones apresentou ainda um potencial antioxidante alto quando comparado ao de cotilédones, com um valor de CE_{50} de 13,9 mg/mL de extrato, correspondendo à metade daquele obtido para o explante original (28,26 mg/mL) (Figura 31).

Figura 31 – Potencial antioxidante de extratos etanólicos de diferentes amostras de calos e sementes de *A. pinto* pelo ensaio DPPH



Legenda: letras iguais indicam valores estatisticamente iguais considerando $p \leq 0,05$.

5.4 Discussão

Culturas de calos são importantes ferramentas biotecnológicas para produção de metabólitos de interesse. Neste trabalho, o estudo dos calos derivados de explantes de sementes de *A. pinto* estabelecido anteriormente no NBV/UERJ (SOUSA, 2015) foi ampliado com a avaliação fitoquímica e do potencial antioxidante dessas culturas, em comparação com sementes íntegras, sementes sem o tegumento e cotilédones isolados.

A análise qualitativa dos extratos evidenciou bastante similaridade entre os diferentes tipos de calos estudados. Os perfis das amostras de sementes também foram semelhantes entre si e apresentaram substâncias apolares não detectadas nos extratos de calos, devido à composição lipídica desses tecidos de reserva. Além disso, sementes apresentaram estilbenos majoritários entre tR de 6 a 10 minutos, enquanto que, nos extratos de calos, foram observados grupos de estilbenos com maior concentração em torno de tR de 20 min.

Embora não tenha sido evidenciada a produção de resveratrol nas amostras de sementes analisadas, calos de *A. pinto* avaliados neste estudo produziram entre

0,62 e 8,37 μg de resveratrol/g PF, sem eliciação. Esses resultados contrastam com os descritos na literatura para calos de *A. hypogaea*, que só se mostraram capazes de sintetizar resveratrol ou piceatanol na presença de diferentes eliciadores bióticos e abióticos (KU et al., 2005; YANG et al., 2010a; 2010b). Nestes trabalhos, o teor de resveratrol variou conforme a condição e o tipo de eliciador utilizado. Calos derivados de segmentos caulinares produziram entre 0,25 e 11,97 μg de resveratrol/g de PF quando expostos a irradiação com luz ultravioleta (KU et al., 2005). Yang et al. (2010a) obtiveram um conteúdo de resveratrol de até 58,84 $\mu\text{g/g}$ de PF após 12 horas de incubação com esporos esterilizados de *Botryodiplodia theobromae*, enquanto Yang et al. (2010b) detectaram entre 1,77 e 2,72 μg de resveratrol/g PF, usando bactérias, e 5,86 e 10,43 μg de resveratrol/g PF, utilizando quitina como eliciadores.

Outros aspectos avaliados neste trabalho foram o conteúdo fenólico e o potencial antioxidante dos diferentes materiais de *A. pintoii*. Entre as amostras analisadas, extratos de sementes apresentaram teores de fenóis totais superiores aos observados nos extratos de calos. Além disso, não foram observadas diferenças entre o conteúdo fenólico de sementes com ou sem tegumento, em contraste com as informações apresentadas na literatura para *A. hypogaea*, cujas sementes apresentam, em seu tegumento, uma grande concentração de substâncias fenólicas com atividade antioxidante (ATTREE; DU; XU, 2015; OLDONI et al., 2016; SHEMTOV et al., 2012). Os resultados aqui observados podem ser decorrentes da interferência de outros componentes dos extratos no ensaio, em especial os altos teores de proteínas nas sementes, que correspondem a cerca de 27% da sua composição total (GROSSO et al., 2000). Apesar do ensaio de Folin-Ciocalteu ser, atualmente, amplamente aceito e difundido como método de determinação do teor de fenóis totais de amostras vegetais, outros grupos de substâncias presentes nos extratos, como proteínas, tióis, derivados de vitaminas e íons orgânicos, podem interagir com o reagente de Folin Ciocalteu, causando interferência na avaliação (EVERETTE et al., 2010).

Diferentemente do ensaio de fenóis totais, a avaliação da capacidade antioxidante evidenciou uma diferença considerável entre extratos de sementes com o tegumento e os demais extratos de sementes analisados. O potencial antioxidante dos extratos de sementes com tegumento foi maior, com um valor de CE_{50} quase três vezes menor que os valores encontrados nos extratos das sementes sem

tegumento, indicando que, nesses materiais, não há uma relação entre o teor de fenóis e a atividade antioxidante observada. Esses resultados diferem do observado em sementes, plantas e materiais *in vitro* de *A. hypogaea*, cuja atividade antioxidante tem sido associada à presença de substâncias fenólicas, como os ácidos clorogênico, caféico, cumárico, ferúlico e metoxicinâmico, flavonoides e estilbenos (ATTREE; DU; XU, 2015; DEAN et al., 2008; SOBOLEV et al., 2006; 2011; YANG et al., 2015; YU; AHMEDNA; GOKTEPE, 2005), ácido quinínico (FRANCISCO; RESURRECCION, 2009), catequinas, procianidina e proantocianidinas (MA et al., 2014).

Quando comparados os extratos de sementes sem tegumento e de cotilédones isolados, cuja diferença é apenas a presença ou ausência do eixo embrionário, foi observado um valor de CE_{50} um pouco menor em extratos de cotilédones, embora não significativo estatisticamente. Este resultado pode indicar uma baixa atividade antioxidante do eixo embrionário, cuja presença acarretou um leve aumento no valor do CE_{50} . Em *A. hypogaea*, o resveratrol, uma das principais substâncias antioxidantes estudadas no gênero, foi detectado em todas as partes da planta, exceto em embriões oriundos de sementes secas ou embebidas, assim como no epicótilo, onde estão localizados os folíolos embrionários, no ápice radicular e na mucilagem de sementes em germinação (SOBOLEV et al., 2006). Além disso, trabalhos que avaliaram a germinação de sementes de *A. hypogaea* descreveram a atuação de várias enzimas antioxidantes (superóxido dismutase, glutathione redutase, ascorbato peroxidase, peroxidase e catalase), especialmente quando a germinação ocorria sob condições de estresse, como salinidade, calor ou irradiação com UV (BASHA et al., 2011; DINAKAR et al., 2008; TANG et al., 2010). Como essas enzimas são responsáveis por neutralizar radicais livres e garantir a integridade celular (DINAKAR et al., 2008), é possível que sua atuação possa ser mais significativa do que a de substâncias antioxidantes no embrião.

Em extratos de calos de *A. pinto*, a atividade antioxidante foi diretamente proporcional ao teor de fenóis totais, tendo os extratos de calos derivados de eixos embrionários e de cotilédones apresentado valores próximos entre si, enquanto que os extratos de calos derivados de folíolos embrionários apresentaram menor conteúdo fenólico e menor atividade antioxidante. Cabe destacar também que a presença de resveratrol parece não estar relacionada a esses dois parâmetros avaliados. Calos derivados de eixos embrionários e cotilédones apresentaram teores

fenólicos e atividades antioxidantes similares, embora o conteúdo de resveratrol dos calos de cotilédones tenha sido dez vezes maior que o de calos de eixos embrionários. Além disso, essa substância não foi detectada em nenhum dos extratos de sementes analisados, mesmo o de sementes com tegumento, que apresentou elevada atividade antioxidante. Estes resultados indicam que a atividade antioxidante dos extratos de *A. pintoii* analisados neste trabalho está, possivelmente, relacionada à presença de diferentes substâncias, e não somente ao resveratrol.

No presente trabalho, os extratos de calos de eixos embrionários e de cotilédones apresentaram uma atividade antioxidante alta em comparação com os demais materiais analisados, com valores semelhantes aos observados em sementes com tegumento, cujo CE_{50} foi o menor entre os materiais avaliados. Entretanto, os extratos de calos apresentaram menor teor fenólico que os de sementes. Esta falta de correlação entre os dois parâmetros pode estar relacionada não somente à presença de substâncias interferentes no ensaio de fenóis totais, mas também indicar a participação de outros grupos de substâncias no potencial antioxidante ou a presença de fenóis com maior ação antioxidante nas amostras de sementes com tegumento. O mesmo foi observado por Sang et al. (2014), que obtiveram uma correlação negativa entre os teores de fenóis totais e as atividades antioxidantes de diferentes leguminosas, incluindo *A. pintoii*.

Além disso, a composição das sementes é altamente lipídica (cerca de 50%), com a presença de substâncias apolares que são removidas com *n*-hexano durante o processo de deslipidificação. Ao contrário, os extratos dos materiais *in vitro* apresentam alto rendimento em etanol 80% (37,98 a 43,61% da amostra seca), devido à presença de diversas substâncias não-fenólicas com afinidade pelo solvente. Dessa forma, é esperado que as substâncias fenólicas estejam mais concentradas nos extratos de sementes que nos de calos. Outro dado importante é a comparação das atividades antioxidantes de calos obtidos de cotilédones e dos cotilédones isolados, utilizados como explante inicial. Os extratos de calos apresentaram valor de CE_{50} de 13,9 mg de extrato/mL, um valor consideravelmente maior que o apresentado pelo explante inicial (28,26 mg de extrato/mL), indicando que substâncias antioxidantes são produzidas pelas novas células durante o processo de calogênese. Esses resultados sugerem que os calos produzem diferentes substâncias antioxidantes em resposta às condições de estresse da cultura *in vitro*, as quais também podem estar relacionadas ao nível de diferenciação

celular, à alta capacidade proliferativa e à intensa atividade metabólica destas células.

Estes resultados constituíram o artigo “Total phenolics, resveratrol content and antioxidant activity of seeds and calluses of Pinto peanut (*Arachis pinto* Krapov. & W.C. Greg.)”, publicado na revista *Plant, Cell, Tissue and Organ Culture* (SOUSA-MACHADO et al., 2018, ANEXO).

6 Discussão geral

Várias atividades biológicas já foram identificadas em espécies do gênero *Arachis*, sendo geralmente associadas à presença de derivados de fenilpropanoides, como os estilbenoides (LOPES et al., 2011). O amendoim utilizado para consumo humano (*Arachis hypogaea*) também é reconhecido como fonte de óleos e proteínas, atuando como alimento funcional e apresentando efeitos benéficos à saúde (ARYA; SALVE; CHAUHAN, 2016). Embora muito seja conhecido sobre a composição de *A. hypogaea*, poucos estudos foram realizados com outras espécies do gênero para avaliar seu potencial na produção de substâncias bioativas. Diante da importância de expandir esse conhecimento para as demais espécies, este estudo foi desenvolvido com sementes de *A. pinto* e buscou inicialmente investigar o seu potencial citotóxico. Além disso, sementes foram utilizadas como fonte de explantes para o estabelecimento de sistemas *in vitro* para produção de metabólitos secundários.

Com o crescimento da incidência de câncer, diferentes classes de substâncias com potencial antitumoral vêm sendo investigadas, incluindo substâncias fenólicas, como taninos, lignanas, flavonoides e estilbenoides, glicosinolatos, terpenoides, carotenoides e fitoesteroides (KING, YOUNG, 1999; NICHENAMETLA et al., 2006). Essas substâncias podem estar presentes na dieta humana em alimentos como frutas, sementes e outras partes da planta, em extratos de ervas e em bebidas como vinho, chá e café (HERTOG et al. 1993; KAUR; AGARWAL; AGARWAL, 2009).

A investigação de novas fontes de substâncias antitumorais é importante para oferecer alternativas de tratamento. Neste trabalho, o potencial citotóxico de sementes de *A. pinto* foi estudado em extratos etanólicos e hexânicos (óleo), em conjunto com frações selecionadas do óleo. O extrato etanólico, no qual são encontrados os ácidos fenólicos, apresentou, em geral, atividade menor que a observada no óleo. Em contraste, uma atividade significativamente maior foi detectada nas frações do óleo, indicando a presença de substâncias com maior citotoxicidade contra a linhagem leucêmica K562. Estes dados indicam que o potencial citotóxico do óleo pode estar relacionado a uma substância ou a um grupo de substâncias presentes nestas frações, provavelmente a ácidos graxos encontrados

nas amostras. A atividade antitumoral *in vivo* e *in vitro* dos ácidos palmítico, linoleico e octadecanoico já foi descrita em outros trabalhos (HARADA et al., 2002; YANG et al., 2015; YOO et al., 2007).

A cultura de tecidos vegetais constitui uma abordagem alternativa para produção de metabólitos secundários que possuem importância nutricional e farmacêutica, além de outras aplicações industriais. Para o estabelecimento das culturas, diferentes parâmetros precisam ser estudados, tais como o uso de reguladores de crescimento e fatores físicos, como temperatura, qualidade e intensidade luminosa, pH do meio, agitação, aeração e a composição de gases no frasco (oxigênio, dióxido de carbono e etileno) (MURTHY; LEE; PAEK, 2014). Algumas outras estratégias também podem ser empregadas, como a seleção de linhagens com alta produção de biomassa e metabólitos e a otimização da composição do meio de cultura (tipo e concentração de açúcares e sais, especialmente de nitrogênio e fosfato) (MURTHY; LEE; PAEK, 2014).

No presente trabalho, foram aprofundados os estudos com culturas de calos e de raízes adventícias de *A. pintoii*, desenvolvidos anteriormente (SOUSA, 2015). Devido à diversidade de respostas obtidas a partir de explantes de cotilédones, capazes de gerar brotos por organogênese indireta, raízes adventícias por organogênese direta e calos não morfogênicos, estes sistemas podem constituir um modelo experimental adequado para investigação dos mecanismos que levam aos diferentes processos morfogênicos (SOUSA, 2015).

Na etapa de indução de raízes descrita anteriormente por Sousa (2015), os cotilédones desenvolveram raízes adventícias morfologicamente distintas em função do tipo de auxina utilizada (ANA, AIB ou AIA). Raízes com maior potencial para estabelecimento de culturas foram obtidas em resposta à maior concentração de ANA testada (54 μM), na ausência de luz. Por outro lado, neste trabalho, os melhores resultados quanto ao alongamento e à ramificação dos explantes radiculares foram observados em resposta a outro tipo de auxina na menor concentração avaliada (AIB a 0,49 μM), utilizando explantes com 2 cm de comprimento. Isto demonstra que as etapas de indução e multiplicação devem requerer mecanismos moleculares distintos, que podem ser induzidos por diferentes tipos e concentrações de fitorreguladores. Estes resultados também podem estar relacionados aos diferentes tipos de transporte das auxinas nos tecidos, visto que o transporte polar das auxinas via carreadores ou por difusão pode afetar a sua

distribuição (PARRY et al., 2001; STIEGER; REINHARDT; KUHLEMEIER, 2002; YANG et al., 2006).

As raízes adventícias também foram investigadas quanto à sua origem e estrutura anatômica, tendo sido demonstrada a ausência de uma conexão inicial com o sistema vascular do explante, já que a diferenciação de tecido vascular ocorreu após a formação da projeção radicular. Ao contrário, explantes de cotilédones de espécies de manga (LI et al., 2008) e avelã (ERMEL et al., 2000) descritos na literatura apresentaram o desenvolvimento dos primórdios radiculares a partir do parênquima ao redor do tecido vascular.

As raízes adventícias e os calos induzidos em resposta a diferentes reguladores de crescimento foram também submetidos, neste trabalho, a avaliação fitoquímica e da atividade antioxidante, em comparação com raízes de plantas mantidas em condições naturais e sementes, respectivamente. Os perfis fitoquímicos por CLAE das raízes obtidas em resposta a ANA, AIA e AIB foram bastante similares, embora o extrato de raízes de AIB tenha apresentado sinais menores do que aqueles obtidos na presença de outros reguladores de crescimento. Os perfis dos extratos de calos apresentaram semelhanças com os de raízes induzidas *in vitro*, visto que em ambos os grupos de amostras foi detectado maior número de sinais na região entre tR 7 a 9 min (306 nm), próximo do tR do resveratrol (9,11 min).

A análise por CLAE também possibilitou verificar a capacidade dos calos oriundos de três tipos de explantes de sementes em produzir resveratrol, também detectado nas raízes e não observado nos diferentes extratos de sementes. Considerando a função do resveratrol como precursor para a síntese de outros estilbenos, estes resultados sugerem que os sistemas *in vitro* desenvolvidos podem vir a contribuir para a produção dessas substâncias. Além disso, estratégias como a eliciação, a adição de precursores e o balanço de nutrientes podem ser aplicadas para aumentar a capacidade proliferativa e a produção de metabólitos nessas culturas. Os calos produzidos podem ainda ser utilizados para o estabelecimento de células em suspensão, estratégia bastante utilizada par essa finalidade. Análises cromatográficas dos extratos de materiais obtidos *in vitro* indicaram também a possível presença de outros estilbenos, cuja identificação foi dificultada devido à ausência de padrões adequados no mercado. Paralelamente a este trabalho, padrões de estilbenos foram produzidos em colaboração com o Dr. Fabricio Medina-

Bolivar do Instituto de Biociências do Arkansas, nos Estados Unidos. As análises preliminares dos extratos produzidos não indicaram a presença de araquidinas, conforme esperado para materiais que não foram submetidos a eliciação. A utilização dos padrões de araquidinas permitirá monitorar a produção dessas substâncias e sua secreção para o meio de cultura nos sistemas desenvolvidos neste trabalho, em resposta a tratamentos com agentes eliciadores.

O ensaio de captura do radical DPPH evidenciou a presença de substâncias antioxidantes nos extratos etanólicos de sementes íntegras, sementes sem tegumento, cotilédones isolados, raízes de plantas cultivadas em condições naturais, raízes adventícias produzidas em resposta a ANA, AIA e AIB, e em calos provenientes de explantes de cotilédones, eixos e folíolos embrionários. A atividade antioxidante do extrato de sementes com tegumento foi mais alta que a observada nos demais extratos de sementes, com um CE_{50} menor que a metade do obtido para o extrato de sementes com tegumento. Este resultado está de acordo com o descrito para *A. hypogaea*, cujo tegumento apresentou atividade antioxidante muito mais alta que a de cotilédones, devido à presença de substâncias fenólicas antioxidantes concentradas nesta região da semente (ATTREE; DU; XU, 2015). Um alto teor de substâncias fenólicas, como os ácidos fenólicos, os flavonoides e os taninos no tegumento das sementes, também vem sendo demonstrado para várias outras espécies de leguminosas alimentícias (SINGH et al., 2017).

A atividade antioxidante do extrato de raízes das plantas cultivadas em condições naturais, foi a maior entre os materiais analisados neste estudo. A presença de substâncias antioxidantes, principalmente o resveratrol, nas raízes de *A. hypogaea* também já foi descrita, evidenciando a capacidade de estruturas radiculares em sintetizar substâncias de defesa em resposta a microorganismos presentes no solo, que atuam como agentes eliciadores (CHEN; WU; CHIOU, 2002). Os extratos das raízes adventícias produzidas neste trabalho, assim como os de calos de cotilédones e eixos embrionários, apresentaram atividades antioxidantes semelhantes à do extrato de sementes com tegumento. Este resultado indica que os calos e as raízes adventícias produzidos possuem o potencial para constituir sistemas para a síntese de substâncias antioxidantes ou associadas a outras atividades biológicas.

CONCLUSÕES

- Extratos brutos etanólicos e hexânicos de sementes de *A. pintoii*, assim como das frações combinadas 34-40 e 41 do extrato hexânico, demonstraram atividade citotóxica contra linhagens tumorais e leucêmicas;
- A atividade citotóxica das frações foi maior que dos extratos brutos, sendo mais ativas contra a linhagem leucêmica K562;
- A maior eficiência na multiplicação de raízes foi obtida em resposta a AIB a 0,49 μM a partir de segmentos apicais de 2 cm, na ausência de luz, em sistema de ponte de papel;
- A avaliação histológica de raízes adventícias induzidas a partir de cotilédones em resposta a ANA a 54 μM evidenciou a formação do tecido vascular do primórdio radicular de forma independente ao sistema vascular do explante;
- A análise do perfil cromatográfico por CLAE das raízes adventícias e dos calos induzidos a partir de explantes de sementes evidenciou a presença de maior número de sinais entre tR 7 a 9 min (306 nm), próximo do tR do resveratrol (9,11 min);
- O resveratrol foi detectado em extratos dos calos oriundos de três tipos de explantes de sementes e no de raízes de plantas mantidas em condições naturais, estando em maior concentração no extrato de calos oriundos de cotilédones ($8,37 \pm 0,23 \mu\text{g/g PF}$);
- O teor de fenóis totais foi maior nos extratos de sementes que nos de calos, embora não tenha sido observada a presença de resveratrol nas amostras provenientes de sementes;
- A atividade antioxidante foi maior em extratos de raízes de plantas mantidas em condições naturais ($\text{CE}_{50} = 0,99 \text{ mg/mL}$);
- Os valores de CE_{50} dos diferentes materiais produzidos *in vitro* foram próximos entre si e também ao de sementes com tegumento, que apresentou atividade antioxidante quase três vezes maior que os de sementes sem tegumento e cotilédones.

PERSPECTIVAS

- Avaliação de outras atividades biológicas do óleo de sementes de *A. pintoii*, visando aprofundar o conhecimento e agregar valor à espécie;
- Utilização de tratamentos com agentes eliciadores nas culturas de raízes e calos estabelecidas, visando à produção de estilbenoides;
- Estabelecimento de culturas de células em suspensão a partir de calos obtidos de explantes de sementes;
- Análise fitoquímica de extratos das culturas eliciadas utilizando os novos padrões de estilbenos produzidos em paralelo a este trabalho.

REFERÊNCIAS

- ABBASI, M. A. et al. Chemical composition of volatile fraction of Pakistani peanut and its antiradical activities. *J. Chem. Soc. Pak.*, v. 31, n. 6, p. 955-959, 2009.
- ABDOU, Y. A. M. *The sources and nature of resistance in Arachis L. species to Mycosphaerella arachidicola Jenk. and Mycosphaerella berkeleyii Jenk., and factors influencing sporulation of these fungi*. Raleigh, NC: North Carolina State University, 1966.
- AHMAD, N.; RAB, A.; AHMAD, N. Light-induced biochemical variations in secondary metabolite production and antioxidant activity in callus cultures of *Stevia rebaudiana* (Bert). *J. Photochem. Photobiol. B Biol.*, v. 154, p. 51-56, 2016.
- ALISSA, E. M.; FERNS, G. A. Functional foods and nutraceuticals in the primary prevention of cardiovascular diseases. *J. Nutr. Metab.*, v. 2012, 2012.
- ALVES, R. D. M. et al. High-oleic peanuts increase diet-induced thermogenesis in overweight and obese men. *Nutr. Hosp.*, v. 29, n. 5, p. 1024-1032, 2014.
- ANDRADE, C. M. S.; VALENTIM, J. F. *Síndrome da Morte do Capim-brizantão no Acre: Características, Causas e Soluções Tecnológicas*. Documentos. Rio Branco, AC: Embrapa Acre, 2007.
- ANDRADE, S. R. M. *Princípios da Cultura de Tecidos Vegetais*. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, v. 58, p. 9, 2002.
- APPLEBAUM, S. W.; MARCO, S.; BIRK, Y. Saponins as possible factors of resistance of legume seeds to the attack of insects. *J. Agric. Food Chem.*, v. 17, n. 3, p. 618-622, 1969.
- ARYA, S. S.; SALVE, A. R.; CHAUHAN, S. Peanuts as functional food: a review. *J. Food Sci. Technol.*, v. 53, n. 1, p. 31-41, 2016.
- ASSIS, G. M. L. Produção de sementes de *Arachis pintoi* cv. BRS Mandobi no Acre. *Sistemas de Produção*, Acre, v. 4, 2011.
- ASSIS, G. M. L. DE; SILVA, R. A.; AZEVEDO, H. N. Período para condução do teste de germinação em sementes de amendoim forrageiro (*Arachis pintoi*). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE SEMENTES, 2013, Florianópolis. *Anais...* Florianópolis, Brasil: Informativo Abrates, 2013.
- ATTREE, R.; DU, B.; XU, B. Distribution of phenolic compounds in seed coat and cotyledon, and their contribution to antioxidant capacities of red and black seed coat peanuts (*Arachis hypogaea* L.). *Ind. Crops Prod.*, v. 67, p. 448-456, 2015.

- AUMOND, M. L. et al. Events associated with early age-related decline in adventitious rooting competence of *Eucalyptus globulus* Labill. *Front. Plant Sci.*, v. 8, p. 1734, 2017.
- AWAD, A. B. et al. Peanut as a source of β -sitosterol, a sterol with anticancer properties. *Nutr. Cancer*, v. 36, n. 2, p. 238-241, 2000.
- AWAD, A. B. et al. β -Sitosterol activates Fas signaling in human breast cancer cells. *Phytomedicine*, v. 14, n. 11, p. 747-754, 2007.
- AWAD, A. B.; WILLIAMS, H.; FINK, C. S. Phytosterols reduce *in vitro* metastatic ability of MDA-MB-231 human breast cancer cells. *Nutr. Cancer.*, v. 40, n. 2, p. 157-164, 2001.
- AZEVEDO, H. S. F. S. et al. Genetic diversity of the forage peanut in the Jequitinhonha, São Francisco, and Paranã River valleys of Brazil. *Genet. Mol. Res.*, v. 15, n. 153, 2016.
- AZEVEDO, J. M. A. et al. Riqueza e frequência de espécies de fungos micorrízicos arbusculares em genótipos de amendoim forrageiro no Acre, Norte do Brasil. *Acta Amaz.*, v. 44, n. 2, p. 157-168, 2014.
- AZEVEDO, J.; SILVA, H.; ASSIS, G. Genetic divergence among accessions of *Arachis repens* based on vegetative morphological traits. *R. Bras. Zootec.*, v. 40, n. 10, p. 2067-2073, 2011.
- BACKHOUSE, N. et al. Analgesic, anti-inflammatory and antioxidant properties of *Buddleja globosa*, Buddlejaceae. *J. Ethnopharmacol.*, v. 116, n. 2, p. 263-269, 2008.
- BALZON, T. A.; VALENTIM, J. F. Efeito do material propagativo e de métodos de plantio na produção de biomassa e de sementes do *Arachis pintoi* Ap 65. In: SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 2005, Rio Branco. *Anais...* Rio Branco, AC, Brasil: 2005.
- BAQUE, M. A.; HAHN, E. J.; PAEK, K. Y. Induction mechanism of adventitious root from leaf explants of *Morinda citrifolia* as affected by auxin and light quality. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant*, v. 46, n. 1, p. 71-80, 2010. <https://doi.org/10.1007/s11627-009-9261-3>
- BARCELLOS, A. O. et al. Sustentabilidade da produção animal baseada em pastagens consorciadas e no emprego de leguminosas exclusivas, na forma de banco de proteína, nos trópicos brasileiros. *R. Bras. Zootec.*, v. 37, n. especial, p. 51-67, jul. 2008.
- BARTNIKOWSKA, E. Biological activities of phytosterols with particular attention to

- their effects on lipid metabolism. *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, v. 59, n. 2, p. 105-112, 2009.
- BASHA, S. M. et al. Lipid peroxidation, antioxidant enzymes and lipoxygenase activities during salinity stress and early seedling growth of groundnut (*Arachis hypogaea* L). *Vegetos*, v. 24, n. 2, p. 175-179, 2011.
- BASKAR, A. A. et al. Chemopreventive potential of β -Sitosterol in experimental colon cancer model - an *in vitro* and *in vivo* study. *BMC Complement. Altern. Med.*, v. 10, n. 1, p. 24, 2010.
- BASKARAN, P. et al. Acetylcholinesterase-Inhibition and Antibacterial Activity of *Mondia whitei* Adventitious Roots and *Ex vitro*-Grown Somatic Embryogenic-Biomass. *Front. Pharmacol.*, v. 7, p. 335, 2016.
<https://doi.org/10.3389/fphar.2016.00335>
- BASKARAN, P.; JAYABALAN, N. Psoralen production in hairy roots and adventitious roots cultures of *Psoralea coryfolia*. *Biotechnol. Lett.*, v. 31, n. 7, p. 1073-1077, 2009.
- BENTHAM, G. On the Structure and Affinities of *Arachis* and *Voandzeia*. *Trans. Linn. Soc. Lond.*, v. 18, n. 2, p. 155-162, maio 1839.
- BERGER, A.; JONES, P. J. H.; ABUMWEIS, S. S. Plant sterols: factors affecting their efficacy and safety as functional food ingredients. *Lipids Health Dis.*, v. 3, p. 5, 2004.
- BERMAN, A. Y. et al. The therapeutic potential of resveratrol: a review of clinical trials. *NPJ Precis. Oncol.*, v. 1, n. 1, p. 35, 2017.
- BERTIOLI, D. J. et al. A large scale analysis of resistance gene homologues in *Arachis*. *Mol. Genet. Genomics*, v. 270, n. 1, p. 34-45, 2003.
- BILBIS, L. S.; SHEHU, R. A.; ABUBAKAR, M. G. Hypoglycemic and hypolipidemic effects of aqueous extract of *Arachis hypogaea* in normal and alloxan-induced diabetic rats. *Phytomedicine*, v. 9, n. 6, p. 553-555, 2002.
- BIN SAYEED, M. S.; AMEEN, S. S. Beta-Sitosterol: A Promising but Orphan Nutraceutical to Fight Against Cancer. *Nutr. Cancer*, v. 67, n. 8, p. 1214-1220, 2015.
- BISHI, S. K. et al. Quality traits of Indian peanut cultivars and their utility as nutritional and functional food. *Food Chem.*, v. 167, p. 107-114, 2015.
- BÖTTGER, A. et al. Plant Secondary Metabolites and Their General Function in Plants. In: *Lessons on Caffeine, Cannabis & Co.* Springer, 2018. p. 3-17.
- BOUGHADAD, A.; GILLON, Y.; GAGNEPAIN, C. Effect of *Arachis hypogaea* seed fats on the larval development of *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera: Bruchidae). *J. Stored Prod. Res.*, v. 23, n. 2, p. 99-103, 1987.
- BOUIC, P. J. The role of phytosterols and phytosterolins in immune modulation: a

- review of the past 10 years. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care*, v. 4, n. 6, p. 471-475, 2001.
- BRADFORD, P. G.; AWAD, A. B. Phytosterols as anticancer compounds. *Mol. Nutr. Food Res.*, v. 51, n. 2, p. 161-170, 2007.
- BRAGA, K.; COIMBRA, M. C.; CASTRO, A. H. *In vitro* germination, callus induction and phenolic compounds contents from *Pyrostegia venusta* (Ker Gawl.) Miers. *Acta Sci.*, v. 37, n. 2, 2015.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Sci. Technol.*, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995.
- BRIZZI, A.; BRIZZI, V.; CORRADINI, D. Identification and Quantification of *Trans*-Resveratrol in Dietary Supplements by a Rapid and Straightforward RP-HPLC Method. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.*, v. 31, n. 14, p. 2089-2100, 14 jul. 2008.
- BRUIJN, W.J. et al. Antibacterial prenylated stilbenoids from peanut (*Arachis hypogaea*). *Phytochem. Lett.*, v. 28, p. 13-18, 2018.
- BURNHAM, R. J.; JOHNSON, K. R. South American palaeobotany and the origins of neotropical rainforests. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.*, v. 359, n. 1450, p. 1595-1610, 29 out. 2004.
- BURTNIK, O. J.; MROGINSKI, L. A. Regeneration of *Arachis pinto* plants (Leguminosae) by *in vitro* leaf tissue culture. *Oleagineux*, v. 40, p. 609-612, 1985.
- CALDER, P. C. Functional roles of fatty acids and their effects on human health. *J. Parenter. Enteral Nutr.*, v. 38, p. 18S-32S, 2015.
- CARERI, M. et al. Direct HPLC Analysis of Quercetin and *trans*-Resveratrol in Red Wine, Grape, and Winemaking Byproducts. *J. Agric. Food Chem.*, v. 51, p. 5226-5231, 2003.
- CARVALHO, G. P. P.; PIRES, A. J. V. Leguminosas tropicais herbáceas em associação com pastagens. *Arch. Zootec.*, v. 57 (R), p. 11, 2008.
- CARVALHO, J. M. F. C.; VIDAL, M. S. Crioconservação no melhoramento vegetal. *Documentos*. Campina Grande, PB, Brasil: EMBRAPA, 2003.
- CARVALHO, M. A. *Germlasm characterization of Arachis pinto* Krap. and Greg. (Leguminosae). Florida: University of Florida, 2004.
- CARVALHO, M. A.; QUESENBERRY, K. H. Morphological characterization of the USA *Arachis pinto* Krap. and Greg. collection. *Plant Sys. Evol.*, v. 277, n. 1-2, p. 1-11, 2009.
- CARVALHO, M. A.; QUESENBERRY, K. H.; GALLO, M. Comparative assessment of

- variation in the USA *Arachis pintoi* (Krap. and Greg.) germplasm collection using RAPD profiling and tissue culture regeneration ability. *Plant Sys. Evol.*, v. 288, n. 3-4, p. 245-251, 2010.
- CARVALHO, P. A. S. V. Teor de resveratrol no gênero *Arachis* L. e alotetraploides sintéticos e comportamento da Resveratrol sintase em espécies de *Arachis*. 2017. 118 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências, UNESP, Botucatu, SP, 2017.
- CASIMIRO, G. et al. *Trans-resveratrol* Extraction in Four Brazilian *Arachis hypogaea* L. Cultivars with Microwave-Assisted Extraction: Optimization with Response Surface Methodology and Comparison with Conventional Maceration. *J. Adv. Biol. Biotechnol.*, v. 13, p. 1-13, 2017a.
- CASIMIRO, G. S. et al. Allelopathic Activity of Extracts from Different Brazilian Peanut (*Arachis hypogaea* L.) Cultivars on Lettuce (*Lactuca sativa*) and Weed Plants. *Sci. World J.*, v. 2017, p. 7, 2017b.
- CASSIDY, A.; HANLEY, B.; LAMUELA-RAVENTOS, R. M. Isoflavones, lignans and stilbenes – origins, metabolism and potential importance to human health. *J. Sci. Food Agric.*, v. 80, n. 7, p. 1044-1062, 2000.
- CHAMBERLIN, K. D. et al. Determining the oleic/linoleic acid ratio in a single peanut seed: a comparison of two methods. *Peanut Sci.*, v. 38, n. 2, p. 78-84, 2011.
- CHANDLER, J. W.; WERR, W. Cytokinin-auxin crosstalk in cell type specification. *Trends Plant Sci.*, v. 20, p. 291, 2015.
- CHANG, J. C. et al. Biosynthesis enhancement and antioxidant and anti-inflammatory activities of peanut (*Arachis hypogaea* L.) arachidin-1, arachidin-3, and isopentadienylresveratrol. *J. Agric. Food Chem.*, v. 54, n. 26, p. 10281-10287, 2006.
- CHANG, S. C.; HSU, B. Y.; CHEN, B. H. Structural characterization of polysaccharides from *Zizyphus jujuba* and evaluation of antioxidant activity. *Int. J. Biol. Macromol.*, v. 47, n. 4, p. 445-453, 2010.
- CHARLET, S. et al. Immobilisation of *Solanum chrysotrichum* plant cells within Calcium alginate gel beads to produce an antimycotic spirostanol saponin. *Plant Physiol. Biochem.*, v. 38, n. 11, p. 875-880, nov. 2000.
- CHA-UM, S. et al. Effects of Temperature and Relative Humidity During *in vitro* Acclimatization, on Physiological Changes and Growth Characters of *Phalaenopsis* Adapted to *in vivo*. *Aust. J. Crop Sci.*, v. 4, n. 9, p. 750, 2010.

- CHEN, R. S.; WU, P. L.; CHIOU, R. Y. Y. Peanut roots as a source of resveratrol. *J. Agric. Food Chem.*, v. 50, n. 6, p.1665-1667, 2002.
- CHEN, W.-M. et al. Nodulation of *Mimosa spp.* by the β -Proteobacterium *Ralstonia taiwanensis*. *Mol. Plant Microbe Interact.*, v. 16, n. 12, p. 1051-1061, 2003.
- CHEN, Y.-A. et al. Sensitization of Radioresistant Prostate Cancer Cells by Resveratrol Isolated from *Arachis hypogaea* Stems. *PLOS One*, v. 12, n. 1, p. 15, 2017.
- CHERIF, A. O. et al. Comparison of the concentrations of long-chain alcohols (Policosanol) in three Tunisian peanut varieties (*Arachis hypogaea* L.). *J. Agric. Food Chem.*, v. 58, n. 23, p. 12143-12148, 2010.
- CHIOU, R. Y.-Y. et al. Discovery of New Stilbene Antioxidants of the Bio-Elicited Peanut Sprout Powder (BPSP) and Longevity Extension of Mice Fed with BPSP-Supplemented Diets. *Food Nutr. Sci.*, v. 8, p. 141-162, 2017. DOI: 10.4236/fns.2017.81010
- CHOI, S. et al. Angiogenic activity of beta-sitosterol in the ischaemia/reperfusion-damaged brain of Mongolian gerbil. *Planta Med.*, v. 68, n. 4, p. 330-335, 2002.
- CHUKWUMAH, Y. et al. Changes in the phytochemical composition and profile of raw, boiled, and roasted peanuts. *J. Agric. Food Chem.*, v. 55, n. 22, p. 9266-9273, 2007.
- CLEMENTE, T. E. et al. Evaluation of peanut (*Arachis hypogaea* L.) leaflets from mature zygotic embryos as recipient tissue for biolistic gene transfer. *Transgenic Res.*, v. 1, n. 6, p. 275-284, 1992.
- COIMBRA, M. C. et al. Influence of plant growth regulators and light on callus induction and bioactive phenolic compounds production in *Pyrostegia venusta* (Bignoniaceae). *Indian J. Exp. Biol.*, v. 55, p. 584-590, 2017.
- CONDORI, J. et al. 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 Physiol. Biochem.*, v. 48, n. 5, p. 310-318, 2010.
- COSTA, C. T. et al. Comparative adventitious root development in pre-etiolated and flooded *Arabidopsis* hypocotyls exposed to different auxins. *Plant Physiol. Biochem.*, v. 127, p. 161-168, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2018.03.022>
- CUNHA, A. J. et al. Allelopathy effect of *Arachis pintoi* in the *Bidens pilosa* germination and *Ipomoea triloba*. *Cerrado Agrocíncias*, v. 1, p. 15-25, 2010.

- DEAN, L. L. et al. Phenolic profiles and antioxidant activity of extracts from peanut plant parts. *Open Nat. Prod. J.*, v. 1, p. 1-6, 2008.
- DENG, N. et al. High temperature and UV-C treatments affect stilbenoid accumulation and related gene expression levels in *Gnetum parvifolium*. *Electron. J. Biotechnol.*, v. 25, p. 43-49, 2017.
- DESHPANDE, J. A. et al. *In vitro* Induction and Proliferation of Adventitious roots and Estimation of Plumbagin content from *Plumbago auriculata* Lam. *Adv. Biores.*, v. 6, n. 6, 2015.
- DEVI, S. I.; VASHISTA, P.; SHARMA, C. B. Purification to homogeneity and characterization of two antifungal proteins from the roots of *Arachis hypogaea* L. *Natl. Acad. Sci. Lett.*, v. 28, n. 1-2, p. 21-28, 2005.
- DHAR, U.; JOSHI, M. Efficient plant regeneration protocol through callus for *Saussurea obvallata* (DC.) Edgew. (Asteraceae): effect of explant type, age and plant growth regulators. *Plant Cell Rep.*, v. 24, n. 4, p. 195-200, 2005.
- DIAS, M. I. et al. Exploring plant tissue culture to improve the production of phenolic compounds: A review. *Ind. Crops Prod.*, v. 82, p. 9-22, 2016.
- DILLEHAY, T. D. et al. Pre-ceramic Adoption of Peanut, Squash, and Cotton in Northern Peru. *Science*, v. 316, n. 2007, p. 1890-1893, 29 jun. 2007.
- DINAKAR, N. et al. Phytotoxicity of cadmium on protein, proline and antioxidant enzyme activities in growing *Arachis hypogaea* L. seedlings. *J. Environ. Sci.*, v. 20, n. 2, p. 199-206, 2008.
- DJOKO, B. et al. Characterization of immunological activities of peanut stilbenoids, arachidin-1, piceatannol, and resveratrol on lipopolysaccharide-induced inflammation of RAW 264.7 macrophages. *J. Agric. Food Chem.*, v. 55, n. 6, p. 2376-2383, 2007.
- DUNCAN, C. E.; GORBET, D. W.; TALCOTT, S. T. Phytochemical content and antioxidant capacity of water-soluble isolates from peanuts (*Arachis hypogaea* L.). *Food Res. Int.*, v. 39, n. 8, p. 898-904, 2006.
- DUTRA, R. C. et al. Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. *Pharmacol. Res.*, v. 112, p. 4-29, 2016.
- DWIVEDI, S. L. et al. Peanut: Genome Mapping and Molecular Breeding in Plants. In: _____. *Oilseeds*. Berlin: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2007. v. 2, cap. 3, p. 115-151.
- EL-SAYED, N. M. et al. *In vitro* amoebicidal activity of ethanol extracts of *Arachis hypogaea* L., *Curcuma longa* L. and *Pancreatium maritimum* L. on *Acanthamoeba*

- castellanii* cysts. *Parasitol. Res.*, v. 110, n. 5, p. 1985-1992, 2012.
- EMBRAPA. *Balanço social: pesquisa agropecuária*. Brasília, DF: Embrapa, 2008.
- EMEKLİ-ALTURFAN, E.; KASIKCI, E.; YARAT, A. Peanut (*Arachis hypogaea*) consumption improves Glutathione and HDL - cholesterol levels in experimental diabetes. *Phytother. Res.*, v. 22, n. 2, p. 180-184, 2008.
- ERMEL, F. F. et al. Mechanisms of primordium formation during adventitious root development from walnut cotyledon explants. *Planta*, v. 211, n. 4, p. 563-574, 2000.
- EVERETTE, J. D. et al. Thorough study of reactivity of various compound classes toward the Folin–Ciocalteu reagent. *J. Agric. Food Chem.*, v. 58, n. 14, p. 8139-8144, 2010.
- FAO. FAOSTAT. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize>>. Acesso em: 3 maio 2017.
- FARSHORI, N. N. et al. Anticancer activity of *Petroselinum sativum* seed extracts on MCF-7 human breast cancer cells. *Asian. Pac. J. Cancer Prev.*, v. 14, n. 10, p. 5719-5723, 2013.
- FAZAL, H.; ABBASI, B. H.; AHMAD, N. Optimization of adventitious root culture for production of biomass and secondary metabolites in *Prunella vulgaris* L. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, v. 174, n. 6, p. 2086-2095, 2014. DOI 10.1007/s12010-014-1190-x
- FELTRE, K. *Introdução de Coastcross-1 em área com amendoim forrageiro sob doses de fósforo e densidade de mudas*. 2013. 71 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, Brazil, 2013.
- FERGUSON, J. Seed biology and seed systems for *Arachis pintoi*. In: KERRIDGE, P. C.; HARDY, B. (Eds.). *Biology and Agronomy of forage Arachis*. Cali, Colômbia: Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), 1994. p. 122–133.
- FETT-NETO, A. G.; ZHANG, W. Y.; DICOSMO, F. Kinetics of taxol production, growth, and nutrient uptake in cell suspensions of *Taxus cuspidata*. *Biotechnol. Bioeng.*, v. 44, n. 2, p. 205-210, 1994.
- FISHER, M. J.; CRUZ, P. A. Some ecophysiological aspects of *Arachis pintoi*. In: KERRIDGE, PETER C. HARDY, B. (Ed.). *Biology and agronomy of forage Arachis*. Cali, Colômbia: Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), 1994. p. 53–70.
- FORMO, M.; BAILEY, A. *Bailey's industrial oil and fat products*. 4. ed. New York, NY: John Wiley & Sons, 1979.
- FRANCISCO, M. L.; RESURRECCION, A. V. A. Development of a reversed-phase

- high performance liquid chromatography (RPHPLC) procedure for the simultaneous determination of phenolic compounds in peanut skin extracts. *Food Chem.*, v. 117, p. 356-363, 2009. Doi: 10.1016/j.foodchem.2009.03.110
- FREITAS, F. O.; PEÑALOZA, A. D. P. D. S.; VALLS, J. F. M. *O amendoim contador de história*. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2003.
- FRITZEMEIER, K. H. et al. Action of ultraviolet-C on stilbene formation in callus of *Arachis hypogaea*. *Planta*, v. 159, n. 1, p. 25-29, 1983.
- FUMAGALI, E. et al. Produção de metabólitos secundários em cultura de células e tecidos de plantas: O exemplo dos gêneros *Tabernaemontana* e *Aspidosperma*. *Braz. J. Pharmacog.*, v. 18, n. 4, p. 627-641, 2008.
- FURMANOWA, M.; SYKLOWSKA-BARANEK, K. Hairy root cultures of *Taxus x media* var. *Hicksii* rehd. as a new source of paclitaxel and 10-deacetylbaccatin III. *Biotechnol. Lett.*, v. 22, n. 8, p. 683-686, 2000.
- GAGLIARDI, R. F. et al. *In vitro* plant regeneration from seed explants of wild groundnut species (genus *Arachis*, section *Extranervosae*). *Biodivers. Conserv.*, v. 9, n. 7, p. 943-951, 2000.
- GAGLIARDI, R. F. et al. Cryopreservation of cultivated and wild *Arachis* species embryonic axes using desiccation and vitrification methods. *Cryoletters*, v. 23, n. 1, p. 61-68, 2002a.
- GAGLIARDI, R. F. et al. Germplasm preservation of wild *Arachis* species through culture of shoot apices and axillary buds from *in vitro* plants. *Biol. Plant.*, v. 45, n. 3, p. 353-357, 2002b.
- GAGLIARDI, R. F. et al. Cryopreservation of *Arachis* species by vitrification of *in vitro*-grown shoot apices and genetic stability of recovered plants. *Cryoletters*, v. 24, n. 2, p. 103-110, 2003.
- GAGLIARDI, R. F. et al. Rescue of a non-viable accession and RAPD analysis of recovered plants of *Arachis retusa*. *Pesq. Agropec. Bras.*, v. 39, n. 2, p. 197-199, 2004.
- GAGLIARDI, R. F. et al. Assessment of Genetic Stability Among *In Vitro* Plants of *Arachis retusa* Using RAPD and AFLP Markers for Germplasm Preservation. *J. Integr. Plant Biol.*, v. 49, n. 3, p. 307-312, 2007.
- GAHAN, P. B. *Plant histochemistry and cytochemistry: An introduction*. Londres: Academic Press, 1984.
- GALGARO, L.; VALLS, J. F. M.; LOPES, C. R. Study of the genetic variability and

- similarity among and within *Arachis villosulicarpa*, *A. pietrarellii* and *A. hypogaea* through isoenzyme analysis. *Genet. Resour. Crop. Evol.*, v. 44, n. 1, p. 9-15, 1997.
- GAO, Y. et al. Optimization of culture medium components and culture period for production of adventitious roots of *Echinacea pallida* (Nutt.) Nutt. *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, v. 135, n. 2, p. 299-307, 2018. <https://doi.org/10.1007/s11240-018-1464-z>
- GARCIA, L. et al. Optimized Extraction of Resveratrol from *Arachis repens* Handro by Ultrasound and Microwave: A Correlation Study with the Antioxidant Properties and Phenol Contents. *Sci. World J.*, p. 10, 2016.
- GARCIA, L. C. et al. Comparative analysis of resveratrol production in plants and *In Vitro* materials of *Arachis repens* (Handro). *Acta Hortic.*, v. 1198, p. 23-26, 2018.
- GARCIA, R. et al. Influence of type of explant, plant growth regulators, salt composition of basal medium, and light on callogenesis and regeneration in *Passiflora suberosa* L.(Passifloraceae). *Plant Cell, Tissue and Organ Cult.*, v. 106, n. 1, p. 47-54, 2011.
- GEISS, G.; GUTIERREZ, L.; BELLINI, C. Adventitious root formation: new insights and perspectives. *Annu. Plant Rev.*, p. 127-156, 2018.
- GENG, L. et al. Efficient production of *Agrobacterium rhizogenes*-transformed roots and composite plants in peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, n. 109, v. 3, p. 491-500, 2012.
- GENSER, B. et al. Plant sterols and cardiovascular disease: A systematic review and meta-analysis. *Eur. Heart J.*, v. 33, n. 4, p. 444-451, 2012.
- GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; KLERK, G.-J. DE. Plant Tissue Culture Procedure - Background. In: _____ *Plant Propagation by Tissue Culture*. 3. ed. Basingstoke, UK: Exegetics, 2008. v. 1, p. 1–28.
- GHASEMZADEH, A.; GHASEMZADEH, N. Flavonoids and phenolic acids: Role and biochemical activity in plants and human. *J. Med. Plants Res.*, v. 5, n. 31, p. 6697-6703, 2011.
- GILL, S. S.; TUTEJA, N. Polyamines and abiotic stress tolerance in plants. *Plant Signal. Behav.*, v. 5, n. 1, p. 26-33, 2010.
- GLIESSMAN, S. R.; ENGLES, E.; KRIEGER, R. *Agroecology: ecological processes in sustainable agriculture*. Boca Raton: CRC Press, 2000.
- GŁOWACKA, K.; JEŻOWSKI, S.; KACZMAREK, Z. The effects of genotype, inflorescence developmental stage and induction medium on callus induction and

- plant regeneration in two *Miscanthus* species. *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, v. 102, n. 1, p. 79-86, 2010.
- GÓMEZ-AGUIRRE, Y. A. et al. Adventitious root cultures of *Castilleja tenuiflora* Benth. as a source of phenylethanoid glycosides. *Ind. Crops Prod.*, v. 36, n. 1, p. 188-195, 2012.
- GÓMEZ-CARABALÍ, A.; RAO, I.; OTERO, J. Influence of fertilization, season, and forage species in presence of arbuscular mycorrhizae in a degraded Andisoloil of Colombia. *Acta Agron.*, v. 60, n. 1, p. 84-92, 2011.
- GONZÁLEZ, A. et al. Adventitious root induction in *Corylus avellana* L. cotyledon slices. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant*, v. 27, n. 3, p. 125-131, 1991.
- GRAYNER, R. J. et al. Condensed tannin levels and resistance of groundnuts (*Arachis hypogaea*) against *Aphis craccivora*. *Phytochemistry*, v. 31, n. 11, p. 3795-3800, 1992.
- GREEN, R. J. *Antioxidant Activity of Peanut Plant Tissues*. 2004. 91 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - North Carolina State University, North Carolina, USA, 2004.
- GROSSO, G.; ESTRUCH, R. Nut consumption and age-related disease. *Maturitas*, v. 84, p. 11-16, 2016.
- GROSSO, N. R. et al. Fatty acid, sterol and proximate compositions of peanut species (*Arachis* L.) seeds from Bolivia and Argentina. *Grasas y Aceites*, v. 48, p. 219-225, 1997.
- GROSSO, N. R.; NEPOTE, V.; GUZMÁN, C. A. Chemical composition of some wild peanut species (*Arachis* L.) seeds. *J. Agric. Food Chem.*, v. 48, n. 3, p. 806-809, 2000.
- GRUSAK, M. A. LEGUMES. In: CABALLERO, B.; ALLEN, L.; PRENTICE, A. (Eds.). *Encyclopedia of Human Nutrition*. 2. ed. New York, NY: Elsevier Academic Press, 2005. p. 120–126.
- GUPTA, A.; SINGHAL, G. S. Effect of sodium and calcium chlorides, abscisic acid and proline on callus cultures of *Arachis hypogaea* L. *Biol. Plant.*, v. 38, n. 4, p. 525, 1996.
- HALDER, M.; JHA, S. Enhanced trans-resveratrol production in genetically transformed root cultures of Peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, v. 124, n. 3, p. 555-572, 2016.
- HARADA, H. et al. Antitumor activity of palmitic acid found as a selective cytotoxic

- substance in a marine red alga. *Anticancer Res.*, v. 22, n. 5, p. 2587-2590, 2002.
- HARRIS, W. Omega-3 and omega-6 fatty acids: Roles in cardiometabolic disease. *Nutr. Cardiometabol. Health*, p. 193-208, 2017.
<https://doi.org/10.1201/9781315119410>
- HELPER, M. et al. The Root Extract of the Medicinal Plant *Pelargonium sidoides* Is a Potent HIV-1 Attachment Inhibitor. *PLoS ONE*, v. 9, n. 1, p. e87487, 2014.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087487>
- HERTOG, M. G. et al. Intake of potentially anticarcinogenic flavonoids and their determinants in adults in The Netherlands. *Nutr. Cancer*, v. 20, p. 21-9, 1993.
- HIGGS, J. The potential role of peanuts in the prevention of obesity. *Nutr. Food Sci.*, v. 35, n. 5, p. 353-358, 2005.
- HOLLAND, K. W. et al. ORAChromatography and total phenolics content of peanut root extracts. *J. Food Sci.*, v. 76, n. 3, p. 380-384, 2011.
- HSU, W.-C. et al. A Rapid and Small-Scale Method for Estimating Antioxidative Potency of Peanut Sprouts. *J. Food Sci.*, v. 67, n. 7, p. 2604-2608, 1 set. 2002.
- HUANG, C.-P. et al. Arachidin-1, a Peanut Stilbenoid, Induces Programmed Cell Death in Human Leukemia HL-60 Cells. *J. Agric. Food Chem.*, n. 16, p. 12123-12129, 2010.
- HUANG, L. et al. Abundant Microsatellite Diversity and Oil Content in Wild *Arachis* Species. *PLoS ONE*, v. 7, n. 11, 2012.
- HURTADO-GAITÁN, E. et al. A focused multiple reaction monitoring (MRM) quantitative method for bioactive grapevine stilbenes by ultra-high-performance liquid chromatography coupled to triple-quadrupole mass spectrometry (UHPLC-QqQ). *Molecules*, v. 22, n. 3, p. 1-15, 2017.
- HUSSAIN, M. S. et al. Current approaches toward production of secondary plant metabolites. *J. Pharm. Bioallied Sci.*, v. 4, n. 1, p. 10, 2012a.
- HUSSAIN, A. I. et al. Effect of Extraction Techniques and Solvent Systems on the Extraction of Antioxidant Components from Peanut (*Arachis hypogaea* L.) Hulls. *Food Anal. Method.*, v. 5, n. 4, p. 890-896, 2012b.
- ICH-Q2A. International conference on harmonization (ICH) of technical requirements for the registration of pharmaceuticals for human use, validation of analytical procedures. Geneva: International Conference on Harmonization, 1995.
- ICH-Q2B. International conference on harmonization (ICH) of technical requirements for the registration of pharmaceuticals for human use, validation of analytical

procedures: Methodology. Geneva: International Conference on Harmonization, 1996.

IJAZ, B. et al. Histo-morphological analysis of rice callus cultures reveals differential regeneration response with varying media combinations. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant*, p. 1-12, 2019. <https://doi.org/10.1007/s11627-019-09974-6>

IMANAKA, H. et al. Chemoprevention of tumor metastasis by liposomal beta-sitosterol intake. *Biol. Pharm. Bull.*, v. 31, n. 3, p. 400-404, 2008.

INMETRO. Orientação sobre validação de métodos analíticos DOQ-CGCRE-008. Brasil: INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia, 2007.

ISLAM, M .M.; AHMED, M.; MAHALDAR, D. *In vitro* callus induction and plant regeneration in seed explants of rice (*Oryza sativa* L.). *Res. J. Agric. Biol. Sci.*, v. 1, n. 1, p. 72-75, 2005.

ISLAM, S. et al. Evaluation of antioxidant and anticancer properties of the seed extracts of *Syzygium fruticosum* Roxb. growing in Rajshahi, Bangladesh. *BMC Complement. Altern. Med.*, v. 13, n. 142, p. 1-10, 2013.

JAIN, M.; BHATNAGAR, R. K.; SARIN, N. B. Isolation and biochemical diagnosis of cell lines of groundnut (*Arachis hypogaea* L) selected on glyphosate. *Pestic. Sci.*, v. 55, n. 8, p. 843-849, 1999.

JAIN, M. et al. Salt - and glyphosate - induced increase in glyoxalase I activity in cell lines of groundnut (*Arachis hypogaea*). *Physiol. Plant.*, v. 114, n. 4, p. 499-505, 2002.

JAYAKODI, M. et al. Transcriptome profiling and comparative analysis of *Panax ginseng* adventitious roots. *J. Ginseng Res.*, v. 38, n. 4, p. 278-288, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.jgr.2014.05.008>

JAYANAND, B.; SUDARSANAM, G.; SHARMA, K. K. An efficient protocol for the regeneration of whole plants of chickpea (*Cicer arietinum* L.) by using axillary meristem explants derived from *in vitro*-germinated seedlings. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant*, v. 39, n. 2, p. 171, 2003.

JENKINS, D. J. A. et al. Possible benefit of nuts in type 2 diabetes. *J. Nutr.*, v. 138, n. 9, p. 1752S-1756S, 2008.

JIANG, S.; MA, Y.; YAN, D. Antioxidant and antimicrobial properties of water soluble polysaccharide from *Arachis hypogaea* seeds. *J. Food Sci. Technol.*, v. 51, n. 10, p. 2839-2844, 2014.

- JIAO, J. et al. Remarkable enhancement of flavonoid production in a co-cultivation system of *Isatis tinctoria* L. hairy root cultures and immobilized *Aspergillus niger*. *Ind. Crops Prod.*, v. 112, p. 252-261, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.12.017>
- JIMSHEENA, V. K.; GOWDA, L. R. Angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides derived from arachin by simulated gastric digestion. *Food Chem.*, v. 125, n. 2, p. 561-569, mar. 2011.
- JONNALA, R. S.; DUNFORD, N. T.; DASHIELL, K. E. Tocopherol, phytosterol and phospholipid compositions of new high oleic peanut cultivars. *J. Food Compos. Anal.*, v. 19, n. 6-7, p. 601-605, 2006.
- KANG, N. E. et al. Peanut sprouts extract (*Arachis hypogaea* L.) has anti-obesity effects by controlling the protein expressions of PPAR γ and adiponectin of adipose tissue in rats fed high-fat diet. *Nutr. Res. Pract.*, v. 8, n. 2, p. 158-164, 2014.
- KARACABEY, E.; MAZZA, G. Optimization of solid-liquid extraction of resveratrol and other phenolic compounds from milled grape canes (*Vitis vinifera*). *J. Agric. Food Chem.*, v. 56, n. 15, p. 6318-6325, 2008.
- KARTHIKEYAN, A. et al. Hairy root induction from hypocotyl segments of groundnut (*Arachis hypogaea* L.). *Afr. J. Biotechnol.*, v. 6, n. 15, p. 1817-1820, 2007.
- KAUR, M.; AGARWAL, C.; AGARWAL, R. Anticancer and cancer chemopreventive potential of grape seed extract and other grape-based products. *J. Nutr.*, v. 139, n. 9, p. 1806S-1812S, 2009.
- KENNEDY, D. O.; WIGHTMAN, E. E. L. Herbal extracts and phytochemicals: plant secondary metabolites and the enhancement of human brain function. *Adv. Nutr.*, v. 2, p. 32-50, 2011.
- KHAMSEEKHIEW, B.; LIANG, J. B.; JELAN, Z. A. Fibre degradability of oil palm frond pellet, supplemented with *Arachis pintoii* in cattle. *Songklanakarin J. Sci. Technol.*, v. 24, p. 209-216, 2002.
- KIM, D.-H.; CHANG, Y. H.; KWAK, H.-S. The Preventive Effects of Nanopowdered Peanut Sprout-added Caciocavallo Cheese on Collagen-induced Arthritic Mice. *Korean J. Food Sci. Anim. Resour.*, v. 34, n. 1, p. 49-56, 2014.
- KIM, D.-O.; JEONG, S. W.; LEE, C. Y. Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars of plums. *Food Chem.*, v. 81, n. 3, p. 321-326, jun. 2003.
- KIM, J. H. et al. Conjugated linoleic acid: potential health benefits as a functional food ingredient. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.*, v. 7, p. 221-244, 2016.

- KIM, J. S.; LEE, S. Y.; PARK, S. U. Resveratrol production in hairy root culture of peanut, *Arachis hypogaea* L. transformed with different *Agrobacterium rhizogenes* strains. *Afr. J. Biotechnol.*, v. 7, n. 20, p. 3788-3790, 2008. DOI: 10.5897/AJB08.499
- KIM, J. S.; LEE, S. Y.; PARK, S. U. An efficient protocol for peanut (*Arachis hypogaea* L.) transformation mediated by *Agrobacterium rhizogenes*. *Rom. Biotech. Lett.*, v. 14, n. 5, p. 4641-4647, 2009.
- KIM, Y. S. et al. Combined effects of phytohormone, indole-3-butyric acid, and methyl jasmonate on root growth and ginsenoside production in adventitious root cultures of *Panax ginseng* CA Meyer. *Biotechnol. Lett.*, v. 29, n. 11, p. 1789-1792, 2007.
- KING, A.; YOUNG, G. Characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals. *J. Am. Diet Assoc.*, v. 99, p. 213-218, 1999.
- KING, R. E.; BOMSER, J. A.; MIN, D. B. Bioactivity of resveratrol. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.*, v. 5, n. 3, p. 65-70, 2006.
- KIRAKOSYAN, A. et al. Production of isoflavones in seeds and seedlings of different peanut genotypes. *Crop Sci.*, v. 47, n. 2, p. 717-721, 2007.
- KOCHERT, G. et al. RFLP variability in peanut (*Arachis hypogaea* L.) cultivars and wild species. *Theor. Appl. Genet.*, v. 81, n. 5, p. 565-570, maio 1991.
- KORSANGRUANG, S. et al. Effects of abiotic and biotic elicitors on growth and isoflavonoid accumulation in *Pueraria candollei* var. *candollei* and *P. candollei* var. *mirifica* cell suspension cultures. *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, v. 103, n. 3, p. 333-342, 2010.
- KRAPOVICKAS, A. The domestication and origin of agriculture. *Bonplandia*, v. 19, n. 2, p. 193-199, 2010a.
- KRAPOVICKAS, A. Maníes arqueológicas de Argentina. *Bonplandia*, v. 19, n. 2, p. 183-192, 2010b.
- KRAPOVICKAS, A.; GREGORY, W. C. Taxonomy of the Genus *Arachis* (Leguminosae). *Bonplandia*, v. 16 (SUPL.), p. 1-205, 2007.
- KU, K. L. et al. Production of stilbenoids from the callus of *Arachis hypogaea*: A novel source of the anticancer compound piceatannol. *J. Agric. Food Chem.*, v. 53, n. 10, p. 3877-3881, 2005.
- LAGE, F. F. *Caracterização Química E Quantificação De Compostos Fenólicos Em Forrageiras*. 2009, 107 f. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, 2009.
- LANDA, F. et al. *In vitro* callus induction of *Caryocar brasiliense* Camb. leaf explants.

- Ciênc. Agrotecnol.*, v. 24, n. Edição especial, p. 56-63, 2000.
- LAVIA, G. I. et al. Origin of triploid *Arachis pinto* (Leguminosae) by autopolyploidy evidenced by FISH and meiotic behaviour. *Ann. Bot.*, v. 108, n. 1, p. 103-111, 2011.
- LEE, J. H. et al. Identification of Phenolic Compounds and Antioxidant Effects from the Exudate of Germinating Peanut (*Arachis hypogaea*). *Food Sci. Biotechnol.*, v. 16, p. 29-36, 2007.
- LEWIS, G.P. New Insights into the Systematics and Biology of Brazilian Leguminosae (Fabaceae), *Int. J. Plant Sci.*, v. 177, n. 1, p. 1-2, 2016.
- LIAO, W.; XIAO, H.; ZHANG, M. Role and relationship of nitric oxide and hydrogen peroxide in adventitious root development of marigold. *Acta Physiol. Plant.*, v. 31, n. 6, p. 1279, 2009.
- LINNAEUS, C. Species plantarum. 1. ed. Estocolmo: Laurentius Salvius, 1753. v. 2
- LIU, C. D. et al. Comparative characterization of peanuts grown by aquatic floating cultivation and field cultivation for seed and resveratrol production. *J. Agric. Food Chem.*, v. 51, n. 6, p. 1582-1585, 2003.
- LIU, R. H. Dietary Bioactive Compounds and Their Health Implications. *J. Food Sci.*, v. 78, n. s1, p. A18-A25, 2013.
- LIU, Z.; WU, J.; HUANG, D. New arahypins isolated from fungal-challenged peanut seeds and their glucose uptake-stimulatory activity in 3T3-L1 adipocytes. *Phytochem. Lett.*, v. 6, n. 1, p. 123-127, 2013a.
- LIU, Z.; WU, J. E.; HUANG, D. New stilbenoids isolated from fungus-challenged black skin peanut seeds and their adipogenesis inhibitory activity in 3T3-L1 cells. *J. Agric. Food Chem.*, v. 61, n. 17, p. 4155-4161, 2013b.
- LI, Y. H. et al. Characteristics of adventitious root formation in cotyledon segments of mango (*Mangifera indica* L. cv. Zihua): two induction patterns, histological origins and the relationship with polar auxin transport. *Plant Growth Regul.*, v. 54, n. 2, p.165-177, 2008. DOI 10.1007/s10725-007-9239-2
- LI, Z.; JARRET, R. L.; DEMSKI, J. W. Regeneration of plants from protoplasts of *Arachis* species (peanut). In: _____ *Plant Protoplasts and Genetic Engineering VI*. Berlin: Springer Heidelberg, 1995.
- LOKKO, P. et al. Regular peanut consumption improves plasma lipid levels in healthy Ghanaians. *Int. J. Food Sci. Nutr.*, v. 58, n. 3, p. 190-200, 2007.
- LOPES, R. M. et al. Chemical Composition and Biological Activities of *Arachis* Species. *J. Agric. Food Chem.*, v. 59, n. 9, p. 4321-4330, 2011.

- LOPES, R. M. *Determinação de resveratrol em folhas de amendoim silvestre* (*Arachis* sp.). 2011. 115 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade de Brasília, Brasília, DF, 2011.
- LOPES, R. M. et al. Characterization of resveratrol content in ten wild species of section *Arachis*, genus *Arachis*. *Genet. Resour. Crop. Evol.*, v. 60, n. 8, p. 2219-2226, 2013.
- LOU, H. et al. Polyphenols from peanut skins and their free radical-scavenging effects. *Phytochemistry*, v. 65, n. 16, p. 2391-2399, 2004.
- LUDWIG, R. L. et al. Produção e qualidade do *Arachis pintoï*. *Enciclopédia Biosfera*, v. 6, n. 11, p. 2-15, 2010.
- LULU, T. et al. Production of biomass and bioactive compounds from adventitious roots by optimization of culturing conditions of *Eurycoma longifolia* in balloon-type bubble bioreactor system. *J. Biosci. Bioeng.*, v. 119, n. 6, p. 712-717, 2015.
- MA, Y. et al. Separation and characterization of phenolic compounds from dry-blanching peanut skins by liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, v. 1356, p. 64-81, 2014. DOI: 10.1016/j.chroma.2014.06.027
- MAAS, A. L.; ANDERSON, W. F.; QUESENBERRY, K. H. Genetic variability of cultivated Rhizoma peanut. *Crop Sci.*, v. 50, n. 5, p. 1908-1914, 2010.
- MACEDO, I. C.; NOGUEIRA, L. A. H. Avaliação do biodiesel no Brasil. Cadernos NAE/Núcleo de Assuntos Estratégicos da Presidência da República. *Biocombustíveis*, v. 2, n. 1, p. 9-111, 2004.
- MACHADO LADEIRA, M. et al. Avaliação do Feno de *Arachis pintoï* Utilizando o Ensaio de Digestibilidade *in vivo*. *Rev. Bras. Zootec.*, v. 31, n. 6, p. 2350-2356, 2002.
- MANDAL, S. M.; CHAKRABORTY, D.; DEY, S. Phenolic acids act as signaling molecules in plant-microbe symbioses. *Plant Signal. Behav.*, v. 5, n. 4, p. 359-368, 2010.
- MARKA, R. et al. Preliminary Phytochemical Analysis of Leaf, Stem, Root and Seed Extracts of *Arachis hypogaea* L. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.*, v. 20, n. 1, p. 134-139, 2013.
- MATHUR, M. Variations in phytosterol composition in *Corchorus depressus* and their relation with bottom-up, top-down and plant metabolites Manish. *J. Nat. Prod.*, v. 5, p. 179-187, 2012.
- MEDINA-BOLIVAR, F. et al. Production and secretion of resveratrol in hairy root

- cultures of peanut. *Phytochemistry*, v. 68, n. 14, p. 1992-2003, 2007.
- MIRANDA, E. M.; SAGGIN JÚNIOR, O. J.; SILVA, E. M. R. *Amendoim forrageiro: importância, usos e manejo*. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2008.
- MISHRA, T.; KHULLAR, M.; BHATIA, A. Anticancer potential of aqueous ethanol seed extract of *Ziziphus mauritiana* against cancer cell lines and Ehrlich ascites carcinoma. *J. Evid. Based Complementary. Altern. Med.*, 2011.
- MONAGAS, M. et al. Comparative flavan-3-ol profile and antioxidant capacity of roasted peanut, hazelnut, and almond skins. *J. Agric. Food Chem.*, v. 57, n. 22, p. 10590-10599, 2009.
- MONTELES, F. H. R. et al. *Efeito alelopático dos extratos aquosos de amendoim forrageiro (Arachis pintoi) e da erva-de-touro (Tridax procumbens) sobre a germinação de sementes de tomate (Solanum lycopersicum) e pimentão (Capsicum annum)*. In: VII Congresso Brasileiro de Agroecologia, 2011, Fortaleza. *Resumos...* Fortaleza, CE, 2011.
- MONTENEGRO, R.; PINZÓN, B. *Maní forrajero (Arachis pintoi Krapovickas e Gregory): Una alternativa para el sostenimiento de la ganaderia en Panamá*. Panama: IDIAP, 1997.
- MOREAU, R. A.; WHITAKER, B. D.; HICKS, K. B. Phytosterols, phytostanols, and their conjugates in foods: structural diversity, quantitative analysis, and health-promoting uses. *Progr. Lipid Res.*, v. 41, n. 6, p. 457-500, 2002.
- MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. *Microbiologia e Bioquímica do Solo*. 2. ed. Lavras, MG: Editora UFLA, 2006.
- MORENO, D. A. et al. Effects of *Arachis hypogaea* nutshell extract on lipid metabolic enzymes and obesity parameters. *Life Sci.*, v. 78, n. 24, p. 2797-803, 2006.
- MULABAGAL, V.; TSAY, H. Plant Cell Cultures - An Alternative and Efficient Source for the Production of Biologically Important Secondary Metabolites. *Int. J. Appl. Sci. Engin.*, v. 2, n. 1, p. 29-48, 2004.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiol. Plant.*, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.
- MURTHY, H. N.; LEE, E. J.; PAEK, K. Y. Production of secondary metabolites from cell and organ cultures: strategies and approaches for biomass improvement and metabolite accumulation. *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, v. 118, n. 1, p. 1-16, 2014.

- NAG, S.; SAHA, K.; CHOUDHURI, M. A. Role of auxin and polyamines in adventitious root formation in relation to changes in compounds involved in rooting. *J. Plant Growth Regul.*, v. 20, n. 2, p. 182-194, 2001.
- NARAYANI, M.; SRIVASTAVA, S. Elicitation: a stimulation of stress in *in vitro* plant cell/tissue cultures for enhancement of secondary metabolite production. *Phytochem. Rev.*, v. 16, n. 6, p. 1227-1252, 2017.
- NASCIMENTO, I. S. O cultivo do amendoim forrageiro. *Rev. Bras. Agrociênc.*, v. 12, n. 4, p. 387-393, 2006.
- NATH, S.; BURAGOHAJAN, A. K. Establishment of callus and cell suspension cultures of *Centella asiatica*. *Biol. Plant.*, v. 49, n. 3, p. 411-413, 2005.
- NETO, D. D. et al. Aplicação e influência do fitorregulador no crescimento das plantas de milho. *Rev. FZVA*, v. 11, n. 1, p. 1-9, 2004.
- NEWELL, C.; GROWNS, D.; MCCOMB, J. The influence of medium aeration on *in vitro* rooting of Australian plant microcuttings. *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, v. 75, n. 2, p. 131-142, 2003.
- NEWELL, C.; GROWNS, D.; MCCOMB, J. Aeration is more important than shoot orientation when rooting lentil (*Lens culinaris* Medik.) cv. 'Digger' microcuttings *in vitro*. *In Vitro Cell. Develop. Biol. Plant*, v. 42, n. 2, p. 197-200, 2006.
- NGO, H. L.; QUESENBERRY, K. H. Day length and media effects on *Arachis pintoi* regeneration *in vitro*. *Proc. Soil Crop Sci. Soc. Florida*, v. 59, p. 90-93, 2000.
- NGUYEN KIM, T. P. et al. Phytochemical Constituents and Determination of Resveratrol from the Roots of *Arachis hypogaea* L. *Am. J. Plant Sci.*, v. 4, n. 12, p. 2351-2358, 2013.
- NICHENAMETLA, S. N. et al. A review of the effects and mechanisms of polyphenolics in cancer. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, v. 46, p. 161-183, 2006.
- NORIOKA, S.; IKENAKA, T. Amino acid sequences of trypsin-chymotrypsin inhibitors (A-I, A-II, B-I, and B-II) from peanut (*Arachis hypogaea*): a discussion on the molecular evolution of legume Bowman-Birk type inhibitors. *J. Biochem.*, v. 94, n. 2, p. 589-99, 1983a.
- NORIOKA, S.; IKENAKA, T. Amino Acid Sequence of a Trypsin-Chymotrypsin Inhibitor, B-III, of Peanut (*Arachis hypogaea*). *J. Biochem.*, v. 93, n. 2, p. 479-485, 1983b.
- NORIOKA, S.; OMICHI, K.; IKENAKA, T. Purification and characterization of protease inhibitors from peanuts (*Arachis hypogaea*). *J. Biochem.*, v. 91, n. 4, p.

1427-34, 1982.

NOURAN, M. G. et al. Peanut consumption and cardiovascular risk. *Pub. Health Nutr.*, v. 13, n. 10, p. 1581-1586, 2010.

NURAZAH, Z. et al. Effects of plant growth regulators on callus induction from *Cananga odorata* flower petal explant. *Afr. J. Biotechnol.*, v. 8, n. 12, 2009.

OLDONI, T. L. C. et al. Bioassay-guided isolation of proanthocyanidins with antioxidant activity from peanut (*Arachis hypogaea*) skin by combination of chromatography techniques. *Food Chem.*, v. 192, p. 306-312, 2016.

OLIVEIRA, C. A. et al. Decomposition of *Arachis pintoii* litter intercropped with forage grass in "Cerrado" soil in the dry and wet seasons. *Biol. Fert. Soils*, v. 36, n. 6, p. 405-410, 2002.

OLIVEIRA, C. A. DE et al. Decomposition of *Arachis pintoii* and *Hyparrhenia rufa* litters in monoculture and intercropped systems under lowland soil. *Pesq. Agropec. Bras.*, v. 38, n. 9, p. 1089-1095, set. 2003.

OMAR, J. M. et al. Development of an improved reverse-phase high-performance liquid chromatography method for the simultaneous analyses of *trans-/cis-resveratrol*, quercetin, and emodin in commercial resveratrol supplements. *J. Agric. Food Chem.*, v. 62, n. 25, p. 5812-5817, 2014.

OTTO, J. C. S. *Determinação do grau de homozigose de genótipos selecionados do híbrido natural W34b (BRA 031143) da espécie Arachis pintoii Krapov. & Gregory, por meio de marcadores moleculares*. 2007. 76 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP, 2007.

PACHECO, G. et al. Influence of substrates and *in vitro* preconditioning treatments on *ex vitro* acclimatization of *Arachis retusa*. *Pesq. Agropec. Bras.*, v. 41, n. 1, p. 165-169, 2006.

PACHECO, G. et al. The role of BAP in somatic embryogenesis induction from seed explants of *Arachis* species from Sections *Erectoides* and *Procumbentes*. *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, v. 88, n. 2, p. 121-126, 2007a.

PACHECO, G. et al. *In vitro* regeneration and conservation of wild species of *Arachis*. *J. Hortic. Sci. Biotech.*, v. 82, n. 2, p. 311-315, 2007b.

PACHECO, G. et al. Plant regeneration in *Arachis stenosperma* Krapov. and W. C. Gregory from roots and calluses derived from leaflets of *in vitro* plants. *In vitro Cell. Dev. Biol. Plant*, v. 44, n. 1, p. 14-17, 2008a.

PACHECO, G. et al. Genetic and epigenetic analyses of *in vitro*-grown plants of

Arachis villosulicarpa Hoehne (Leguminosae) obtained from seed explants through different regeneration pathways. *J. Hortic. Sci. Biotech.*, v. 83, n. 6, p. 737-742, 7 jan. 2008b.

PACHECO, G. et al. Micropropagation and *in vitro* conservation of wild *Arachis* species. *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, v. 99, n. 3, p. 239-249, 2009.

PACHECO, G. et al. Plant regeneration, callus induction and establishment of cell suspension cultures of *Passiflora alata* Curtis. *Sci. Hort.*, v. 144, p. 42-47, 2012.

PAGANELLA, M.; VALLS, J. F. M. Caracterização morfológica de cultivares e acessos selecionados de *Arachis pintoii* Krapov. & Gregory. *Pasturas Tropicales*, 2002.

PAREKH, J.; CHANDA, S. Antibacterial activity of aqueous and alcoholic extracts of 34 indian medicinal plants against some *Staphylococcus* species. *Turk. J. Biol.*, v. 32, p. 63-71, 2008.

PARK, M.-R. et al. Content of resveratrol in tissues of peanut plant. *Bull. Agric. Coll.*, v. 34, p. 55-61, 2003.

PARRY, G. et al. Novel auxin transport inhibitors phenocopy the auxin influx carrier mutation aux1. *Plant J.*, v. 25, n. 4, p. 399-406, 2001.

PASSEY, A.; BARRETT, K.; JAMES, D. Adventitious shoot regeneration from seven commercial strawberry cultivars (*Fragaria x ananassa* Duch.) using a range of explant types. *Plant Cell Rep.*, v. 21, n. 5, p. 397-401, 2003.

PATEL, H.; KRISHNAMURTHY, R. Elicitors in Plant Tissue Culture. *J. Pharmacogn. Phytochem.*, v. 2, n. 2, 2013.

PAVLÍK, M. et al. The contents of amino acids and sterols in maize plants growing under different nitrogen conditions. *Plant Soil Environ.*, v. 56, n. 3, p. 125-132, 2010.

PAZ, T. A. et al. Production of the quinone-methide triterpene maytenin by *in vitro* adventitious roots of *Peritassa campestris* (Cambess.) AC Sm. (Celastraceae) and rapid detection and identification by APCI-IT-MS/MS. *BioMed Res. Int.*, 2013.

<http://dx.doi.org/10.1155/2013/485837>

PEÑALOZA, A.; POZZOBON, M.; VALLS, J. Cytogenetic findings in wild species of *Arachis* (Leguminosae). *Rev. Bras. Genét.*, v. 19, n. suplemento, p. 129, 1996.

PEREIRA, J. M. *Leguminosas forrageiras em sistemas de produção de ruminantes: onde estamos? para onde vamos?* In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO ESTRATÉGICO DE PASTAGENS, 2002, Viçosa. *Anais...* Viçosa, MG: 2002.

PEREIRA, J. M.; REZENDE, C. P.; MORENO-RUIZ, M. A. *Desenvolvimento e*

- adoção do amendoim forrageiro (*Arachis pintoi* Krapov & Gregory) cultivar Belmonte. In: IV Encontro Latino Americano de Especialistas em *Arachis*, 2004, Brasília. *Anais...* Brasília, DF: 2004.
- PEREZ, N. B. Maní forrajero en Rio Grande del Sur. 2001. Disponível em: <<http://www.pasturasdeamerica.com/articulos-interes/historias-exito/brasil/mani-forrajero-rio-grande/>>. Acesso em: 24 maio. 2017.
- PERIN, A.; GUERRA, J. G. M.; TEIXEIRA, M. G. Cobertura do solo e acumulação de nutrientes pelo amendoim forrageiro. *Pesq. Agropec. Bras.*, v. 38, n. 7, p. 791-796, 2003.
- PITTMAN, R. N. et al. *In vitro* culture of immature peanut (*Arachis spp.*) leaves: morphogenesis and plantlet regeneration. *Peanut Sci.*, v. 10, n. 1, p.21-25, 1983.
- POTREBKO, I.; RESURRECCION, A. V. Effect of ultraviolet doses in combined ultraviolet-ultrasound treatments on *trans*-resveratrol and *trans*-piceid contents in sliced peanut kernels. *J. Agric. Food Chem.*, v. 57, n. 17, p. 7750-7756, 2009.
- PRAKASH, M. G.; GURUMURTHI, K. Effects of type of explant and age, plant growth regulators and medium strength on somatic embryogenesis and plant regeneration in *Eucalyptus camaldulensis*. *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, v. 100, n. 1, p. 13, 2010.
- PURCINO, H. M. A. et al. *Avaliação da cobertura do solo com Arachis pintoi como fonte de nitrogenio para producao de milho*. In: REUNIAO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 2004, Campo Grande. *Anais...* Campo Grande, MS: SBZ Embrapa Gado de Corte, 2004.
- QIU, J. et al. Screening natural antioxidants in peanut shell using DPPH-HPLC-DAD-TOF/MS methods. *Food Chem.*, v. 135, n. 4, p. 2366-2371, 2012.
- RANDHAWA, M. A.; ALGHAMDI, M. S. Anticancer activity of *Nigella sativa* (black seed) — a review. *Am. J. Chin. Med.*, v. 39, n. 6, p. 1075-1091, 2011.
- RAO, P. V. S.; WADIA, K. D. R.; STRANGE, R. N. Biotic and abiotic elicitation of phytoalexins in leaves of groundnut (*Arachis hypogaea* L). *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, v. 49, n. 5, p. 343-357, 1996.
- RASMUSSEN, A. et al. Ethylene controls adventitious root initiation sites in *Arabidopsis* hypocotyls independently of strigolactones. *J. Plant Growth Regul.*, v. 36, n. 4, p. 897-911, 2017.
- RAZAVIZADEH, R. et al. Physiological and morphological analyses of *Thymus vulgaris* L. *in vitro* cultures under polyethylene glycol (PEG)-induced osmotic stress. *In vitro Cell. Dev. Biol. Plant*, v. 55, n. 3, p. 342-257, 2019.

- REIS, C. E. et al. Acute and second-meal effects of peanuts on glycaemic response and appetite in obese women with high type 2 diabetes risk: a randomised cross-over clinical trial. *Br. J. Nutr.*, v. 109, n. 11, p. 2015-2023, 2013.
- REY, H. Y. et al. Plant regeneration in *Arachis pintoii* (Leguminosae) through leaf culture. *Plant Cell Rep.*, v. 19, n. 9, p. 856-862, 2000.
- REY, H. Y. et al. Cryopreservation of *in vitro* grown shoot tips and apical meristems of the forage legume *Arachis pintoii*. *Cryoletters*, v. 30, n. 5, p. 347-358, 2009.
- REY, H. Y.; MROGINSKI, L. A. Somatic embryogenesis and plant regeneration in diploid and triploid *Arachis pintoii*. *Biol. Plant.*, v. 50, n. 1, p. 152-155, 2006.
- RUDKOWSKA, I. Functional foods for health: Focus on diabetes. *Maturitas*, v. 62, p. 263-269, 2009.
- SAIMAN, M. Z. et al. Induction, characterization, and NMR-based metabolic profiling of adventitious root cultures from leaf explants of *Gynura procumbens*. *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, v. 109, n. 3, p. 465-475, 2012.
- SALES, J. M.; RESURRECCION, A. V. A. Phenolic profile, antioxidants, and sensory acceptance of bioactive-enhanced peanuts using ultrasound and UV. *Food Chem.*, v. 122, n. 3, p. 795-803, 2010.
- SALES, R. L. et al. The effects of peanut oil on lipid profile of normolipidemic adults: a three-country collaborative study. *J. Appl. Res.*, v. 8, n. 3, p. 216-225, 2008.
- SANG, S. Y. et al. Influence of drying treatments on antioxidant capacity of forage legume leaves. *J. Food Sci. Technol.*, v. 51, n. 5, p. 988-993, 2014.
- SANTOS, G. C. L. S. *Análise fitoquímica e avaliação de atividades biológicas de plantas in vivo e materiais obtidos in vitro de cultivares brasileiras de Arachis hypogaea L. (amendoim)*. 2016. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, 2016.
- SANTOS-TIERNO, R. R. *Cultura in vitro de Arachis repens Handro: análise fitoquímica e avaliação da atividade antioxidante de materiais obtidos sob diferentes qualidades de luz*. 2017. 95 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, 2017.
- SCHÄFFER, C. C. *Mapeamento espacial e modelagem da distribuição potencial do gênero Arachis (Fabaceae) no Brasil e análise da ocorrência em unidades de conservação*. 2012. 160 f. Dissertação (Mestrado em Botânica) - Universidade de Brasília, Brasília, DF, 2012.
- SCHULTZ, J. C. et al. Flexible resource allocation during plant defense responses.

Front. Plant Sci., v. 4, p. 324, 2013.

SEAL, A. et al. Exogenous auxin depletion renders an *Arachis hypogea* suspension culture sensitive to water loss without affecting cell growth. *Plant Cell Rep.*, v. 20, n. 6, p. 567-573, 2001.

SELDIMIROVA, O. A. et al. 24-epibrassinolide effects on in vitro callus tissue formation, growth, and regeneration in wheat varieties with contrasting drought resistance. *Russ. J. Plant Physiol.*, v. 64, n. 6, p. 919-929, 2017.

SHAKYA, P. Elicitation as a tool to improve the profiles of high - value secondary metabolites and pharmacological properties of *Hypericum perforatum*. *J. Pharm. Pharmacol.*, v. 71, n. 1, p. 70-82, 2019.

SHELTON, H. M.; FRANZEL, S.; PETERS, M. Adoption of tropical legume technology around the world: analysis of success significance of tropical legumes in agriculture. *Trop. Grasslands*, v. 39, p. 198-209, 2005.

SHEM-TOV, Y. et al. Determination Of Total Polyphenol, Flavonoid And Anthocyanin Contents And Antioxidant Capacities Of Skins From Peanut (*Arachis hypogaea*) Lines With Different Skin Colors. *J. Food Biochem.*, v. 36, n. 3, p. 301-308, 2012.

SHIN, K. S. et al. The effect of light quality on the growth and development of *in vitro* cultured *Doritaenopsis* plants. *Acta Physiol. Plantarum*, v. 30, n. 3, p. 339-343, 2008.

SILJA, P.K.; SATHEESHKUMAR, K. Establishment of adventitious root cultures from leaf explants of *Plumbago rosea* and enhanced plumbagin production through elicitation. *Ind. Crops Prod.*, v. 76, p. 479-486, 2015.

SILVA, G. S. *Contribuição à taxonomia do gênero Arachis Seção Arachis à luz do estudo de espécies e híbridos interespecíficos*. 2008. 114 f. Dissertação (Mestrado em Botânica) - Universidade de Brasília, Brasília, DF, 2008.

SILVA, S. C. et al. Karyological features and banding patterns in *Arachis* species belonging to the *Heterantheae* section. *Plant Syst. Evol.*, v. 285, n. 3, p. 201-207, 2010.

SILVA, M. P. DA. *Amendoim forrageiro – Arachis pintoii* Krapov. & W.C. Gregory. In: Fauna e Flora do Cerrado. Campo Grande, MS: Embrapa Gado de Corte, nov. 2004.

SIMÃO, M. J. et al. Effects of auxins and different culture systems on the adventitious root development of *Passiflora pohlii* Mast. and their ability to produce antioxidant compounds. *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, v. 124, n. 2, p. 419-430, 2016.

<https://doi.org/10.1007/s11240-015-0904-2>

SIMONETTI, G. et al. *In vitro* antifungal activity of extracts obtained from *Hypericum*

- perforatum* adventitious roots cultured in a mist bioreactor against planktonic cells and biofilm of *Malassezia furfur*. *Nat. Prod. Res.*, v. 30, n. 5, p. 544-550, 2016.
- SIMPSON, C.; VALLS, J.; MILES, J. Reproductive biology and the potential for genetic recombination in *Arachis*. In: KERRIDGE, PETER C. HARDY, B. (Ed.). *Biology and agronomy of forage Arachis*. Cali, Colômbia: Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), 1994. p. 43-52.
- SIMÕES, C. et al. New approaches for shoot production and establishment of *in vitro* root cultures of *Cleome rosea* Vahl. *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, v. 98, n. 1, p. 79-86, 2009. <https://doi.org/10.1007/s11240-009-9540-z>
- SINGH, B. et al. Phenolic composition and antioxidant potential of grain legume seeds: a review. *Food Res. Int.*, v. 101, p. 1-16, 2017.
- SINGH, R. Chemotaxonomy: a tool for plant classification. *J. Med. Plants*, v. 4, n. 2, p. 90-93, 2016.
- SIVANANDHAN, G. et al. Expression of important pathway genes involved in withanolides biosynthesis in hairy root culture of *Withania somnifera* upon treatment with *Gracilaria edulis* and *Sargassum wightii*. *Plant Physiol. Biochem.*, v. 91, p. 61-64, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2015.04.007>
- SIVANESAN, I.; JEONG, B. R. Induction and establishment of adventitious and hairy root cultures of *Plumbago zeylanica* L. *Afr. J. Biotechnol.*, v. 8, n. 20, 2009.
- SMANIA, E. F. A. et al. Antifungal activity of sterols and triterpenes isolated from *Ganoderma annulare*. *Fitoterapia*, v. 74, n. 4, p. 375-377, 2003.
- SOARES, P. G. et al. Estabelecimento, produção de fitomassa, acúmulo de macronutrientes e estimativa da fixação biológica de nitrogênio em *Arachis*. *Pasturas Tropicais*, v. 28, n. 2, p. 18-25, 2006.
- SOBOLEV, V. S. et al. Production of stilbenoids and phenolic acids by the peanut plant at early stages of growth. *J. Agric. Food Chem.*, v. 54, n. 10, p. 3505-3511, 2006.
- SOBOLEV, V. S. et al. Biological activity of peanut (*Arachis hypogaea*) phytoalexins and selected natural and synthetic stilbenoids. *J. Agric. Food Chem.*, v. 59, n. 5, p. 1673-1682, 2011.
- SOBOLEV, V. S.; DEYRUP, S. T.; GLOER, J. B. New peanut (*Arachis hypogaea*) phytoalexin with prenylated benzenoid and but-2-enolide moieties. *J. Agric. Food Chem.*, v. 54, n. 6, p. 2111-2115, 2006.
- SOBOLEV, V. S.; KRAUSERT, N. M.; GLOER, J. B. New Monomeric Stilbenoids

- from Peanut (*Arachis hypogaea*) Seeds Challenged by an *Aspergillus flavus* Strain. *J. Agric. Food Chem.*, v. 64, n. 3, p. 579-584, 2016.
- SOBOLEV, V. S.; NEFF, S. A.; GLOER, J. B. New stilbenoids from peanut (*Arachis hypogaea*) seeds challenged by an *Aspergillus caelatus* strain. *J. Agric. Food Chem.*, v. 57, n. 1, p. 62-68, 2009.
- SOBOLEV, V. S.; NEFF, S. A.; GLOER, J. B. New dimeric stilbenoids from fungal-challenged peanut (*Arachis hypogaea*) seeds. *J. Agric. Food Chem.*, v. 58, n. 2, p. 875-881, 2010.
- SOBOLEV, V. S.; POTTER, T. L.; HORN, B. W. Prenylated stilbenes from peanut root mucilage. *Phytochem. Anal.*, v. 17, n. 5, p. 312-322, 2006.
- SOBOLEV, V. S.; SY, A. A.; GLOER, J. B. Spermidine and flavonoid conjugates from peanut (*Arachis hypogaea*) flowers. *J. Agric. Food Chem.*, v. 56, n. 9, p. 2960-2969, 2008.
- 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 pintoï Krapov. & W.C. Greg.* 2015. 135 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, 2015.
- SOUSA-MACHADO, I. B. et al. Total phenolics, resveratrol content and antioxidant activity of seeds and calluses of pinto peanut (*Arachis pintoï Krapov. & WC Greg.*). *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, v. 134, n. 3, p. 491-502, 2018.
- SRINIVASAN, 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 Organ Cult.*, v. 101, n. 3, p. 303-309, 2010.
- STEPHENS, A. M. et al. Peanuts, peanut oil, and fat free peanut flour reduced cardiovascular disease risk factors and the development of atherosclerosis in Syrian golden hamsters. *J. Food Sci.*, v. 75, n. 4, p. H116-H122, 2010.
- STEVENS, P. F. Angiosperm Phylogeny Website. 2012. Disponível em: <<http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>>. Acesso em: 13 maio. 2017.
- STEVENSON, P. C. et al. Developmental inhibition of *Spodoptera litura* (Fab.) larvae by a novel caffeoylquinic acid from the wild groundnut, *Arachis paraguariensis* (Chod et Hassl.). *J. Chem. Ecol.*, v. 19, n. 12, p. 2917-2933, 1993.
- STIEGER, P. A.; REINHARDT, D.; KUHLEMEIER, C. The auxin influx carrier is essential for correct leaf positioning. *Plant J.*, v. 32, n. 4, p. 509-517, 2002.

- STILL, P. E.; PLATA, M. I.; NIBLETT, C. L. Highly Morphogenic Callus of *Arachis Paraguariensis* from Agar and Suspension Cultures. In: _____ *Tissue Culture in Forestry and Agriculture*. Boston, MA: Springer, 1985.
- STONE-MILLER, R. *Art of the Andes: from Chavín to Inca*. Thames & Hudson, 2002.
- TABATA, H. Paclitaxel production by plant-cell-culture technology. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, v. 87, p. 1-23, 2004.
- TANG, K. et al. Changes of resveratrol and antioxidant enzymes during UV-induced plant defense response in peanut seedlings. *J. Plant Physiol.*, v. 167, n. 2, p. 95-102, 2010.
- TATSUNO, T. et al. Anti-inflammatory and Anti-melanogenic Proanthocyanidin Oligomers from Peanut Skin. *Biol. Pharm. Bull.*, v. 35, n. June, p. 909-916, 2012.
- TERES, S. Oleic acid content is responsible for the reduction in blood pressure induced by olive oil. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 105, p. 13811-13816, 2008.
- THIMMAPPA, R. et al. Triterpene biosynthesis in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.*, v. 65, p. 225-257, 2014.
- TISSIER, A.; ZIEGLER, J.; VOGT, T. Specialized Plant Metabolites: Diversity and Biosynthesis. *Ecol. Biochem.*, p. 14-37, 2014.
- TOKUŞOĞLU, Ö. ; ÜNAL, M. K.; YEMİŞ, F. Determination of the phytoalexin resveratrol (3,5,4"-Trihydroxystilbene) in peanuts and pistachios by High-Performance Liquid Chromatographic Diode Array (HPLC-DAD) and Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS). *J. Agric. Food Chem.*, v. 53, n. 12, p. 5003-5009, 2005.
- TRIPATHI, L.; TRIPATHI, J. Role of biotechnology in medicinal plants. *Trop. J. Pharm. Res.*, 2003.
- TSAI, W. et al. Inhibition of Cyclic AMP Phosphodiesterase and Blockage of Arachidonate Metabolism by Antiplatelet Principles from the Seed Hulls of *Arachis hypogaea* L. *Chin. Pharm. J.*, v. 55, n. 5, p. 335-345, 2003.
- VALENTIM, J. F.; ANDRADE, C. M. S. *Tropical kudzu (Pueraria phaseoloides): successful adoption in sustainable cattle production systems in the western Brazilian Amazon*. In: INTERNATIONAL GRASSLAND CONGRESS, 2005. *Anais...* Dublin: Wageningen Academic Publishers, 2005a.
- VALENTIM, J. F.; ANDRADE, C. M. S. *Forage peanut (Arachis pintoi): a high yielding and high quality tropical legume for sustainable cattle production systems in the western Brazilian Amazon*. In: INTERNATIONAL GRASSLAND CONGRESS, 2005.

Anais... Dublin: Wageningen Academic Publishers, 2005b.

VALENTIM, J. F.; ANDRADE, C. M. S. Inovação tecnológica e intensificação dos sistemas de produção de bovinos de corte na Amazônia legal. *Agrofoco*, v. 1, p. 18-19, maio 2015.

VALENTIM, J. F.; ASSIS, G. M. L.; SÁ, C. P. Produção de sementes de amendoim forrageiro (*Arachis pinto*) no Acre. *Ci. Desenv.*, v. 4, n. 8, 2009.

VALENTIM, J. F.; CARNEIRO, J. C.; SALES, M. F. L. Amendoim Forrageiro cv. Belmonte: Leguminosa para a Diversificação das Pastagens e Conservação do Solo no Acre. Rio Branco, AC: Embrapa Acre, 2001. 18 p.

VALLS, J. F. M.; DA COSTA, L. C.; CUSTÓDIO, A. R. A novel trifoliolate species of *Arachis* (Fabaceae) and further comments on taxonomic section *Trierectoides*. *Bonplandia*, v. 22, n. 1, p. 91-97, 2013.

VALLS, J. F. M.; SILVA, G. P.; MONÇATO, L. *Diversidade genética no gênero Arachis e a origem do amendoim*. In: ENCONTRO SOBRE TEMAS DE GENÉTICA E MELHORAMENTO, 2000, Piracicaba. *Anais...* Piracicaba, Brasil: ESALQ/Depto. de Genética, 2000.

VALLS, J. F. M.; SIMPSON, C. E. New species of *Arachis* (Leguminosae) from Brazil, Paraguay and Bolivia. *Bonplandia*, v. 14, n. 1-2, p. 35-63, 2005.

VALLS, J.; SIMPSON, C. Taxonomy, natural distribution, and attributes of *Arachis*. In: KERRIDGE, P. C.; HARDY, B. (Eds.). *Biology and agronomy of forage*. Cali, Colombia: Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), 1994. p. 1-18.

VAN MEERLOO, J.; KASPERS, G. J.; CLOOS, J. Cell sensitivity assays: the MTT assay. *Cancer Cell Cult.*, v. 731, p. 237-245, 2011.

VASSILIOU, E. K. et al. Oleic acid and peanut oil high in oleic acid reverse the inhibitory effect of insulin production of the inflammatory cytokine TNF- α in both *in vitro* and *in vivo* systems. *Lipids Health Dis.*, v. 26, p. 8-25, 2009. doi: 10.1186/1476-511X-8-25.

VAUGHN, S. F. Phytotoxic and antimicrobial activity of 5,7-dihydroxychromone from peanut shells. *J. Chem. Ecol.*, v. 21, n. 2, p. 107-115, fev. 1995.

VEIGA, R. F. A. et al. Amendoins silvestres para uso ornamental. *Rev. Bras. Hortic. Ornam.*, v. 9, n. 1, p. 7-15, 2003.

VELU, K. et al. Phytochemical screening and larvicidal activity of peel extracts of *Arachis hypogaea* against chikungunya and malarial vectors. *Int. J. Mosquito Res.*, v. 2, n. 1, p. 1-8, 2015.

- VENKATACHALAM, P.; SUBRAMANIAMPILLAI, A.; JAYABALAN, N. *In vitro* Callus Culture and Plant Regeneration from Different Explants of Groundnut (*Arachis hypogaea* L.). *Jpn. J. Breed.*, v. 46, n. 4, p. 315-320, 1996.
- VIJAYA LAXMI, G.; GIRI, C. C. Plant regeneration via organogenesis from shoot base-derived callus of *Arachis stenosperma* and *A. villosa*. *Curr. Sci.*, v. 85, n. 11, p. 1624-1629, 2003.
- VIJAYA SREE, N. et al. Advancements in the production of secondary metabolites. *J. Nat. Prod.*, v. 3, p. 112-123, 2010.
- VON SON-DE FERNEX, E. et al. *In vitro* anthelmintic activity of five tropical legumes on the exsheathment and motility of *Haemonchus contortus* infective larvae. *Exp. Parasitol.*, v. 131, n. 4, p. 413-418, 2012.
- WANG, C. T. et al. *Arachis* species: classification, phylogenetic status and uses as ornamental groundcover. *Environ. Res. J.*, v. 7, n. 3, p. 226-245, 2013.
- WANG, M. L. et al. Genetic mapping of QTLs controlling fatty acids provided insights into the genetic control of fatty acid synthesis pathway in peanut (*Arachis hypogaea* L.). *PLoS One*, v. 10, n. 4, p. e0119454, 2015.
- WANG, S. et al. Hypotin, a novel antipathogenic and antiproliferative protein from peanuts with a sequence similar to those of chitinase precursors. *J. Agric. Food Chem.*, v. 55, n. 24, p. 9792-9799, 2007.
- WAR, A. R. et al. Mechanisms of plant defense against insect herbivores. *Plant Signal. Behav.*, v. 7, n. 10, p. 1306, 2012.
- WILLIAMS, M. J. et al. Photoperiod sensitivity of rhizoma peanut germplasm. *Agron. J.*, v. 100, n. 5, p. 1366-1370, 2008.
- WILSON, S. A.; ROBERTS, S. C. Recent advances towards development and commercialization of plant cell culture processes for the synthesis of biomolecules. *Plant Biotechnol. J.*, v. 10, n. 3, p. 249-68, 2012.
- WONG, K. H. et al. Kudzu root: traditional uses and potential medicinal benefits in diabetes and cardiovascular diseases. *J. Ethnopharmacol.*, v. 134, n. 3, p. 584-607, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2011.02.001>
- YANG, B. et al. Review of the roles of conjugated linoleic acid in health and disease. *J. Funct. Foods*, v. 15, p. 314-325, 2015.
- YANG, M. H. et al. Investigation of microbial elicitation of *trans*-resveratrol and *trans*-piceatannol in peanut callus led to the application of chitin as a potential elicitor. *J. Agric. Food Chem.*, v. 58, n. 17, p. 9537-9541, 2010a.

- YANG, M. H. et al. Medicinal mushroom ganoderma lucidum as a potent elicitor in production of *t*-resveratrol and *t*-piceatannol in peanut calluses. *J. Agric. Food Chem.*, v. 58, n. 17, p. 9518-9522, 2010b.
- YANG, T. et al. Enhanced production of resveratrol, piceatannol, arachidin-1, and arachidin-3 in hairy root cultures of peanut co-treated with methyl jasmonate and cyclodextrin. *J. Agric. Food Chem.*, v. 63, n. 15, p. 3942-3950, 2015. DOI: 10.1021/jf5050266
- YANG, T. et al. A stilbenoid-specific prenyltransferase utilizes dimethylallyl pyrophosphate from the plastidic terpenoid pathway. *Plant Physiol.*, v. 171, n. 4, p. 2483-2498, 2016.
- YANG, Y. et al. High-affinity auxin transport by the AUX1 influx carrier protein. *Curr. Biol.*, v. 16, n. 11, p.1123-1127, 2006.
- YE, X. Y.; NG, T. B. Hypogin, a novel antifungal peptide from peanuts with sequence similarity to peanut allergen. *J. Pept. Res.*, v. 57, n. 4, p. 330-336, abr. 2001.
- YEN, G.-C.; DUH, P.-D. Antioxidant activity of methanolic extracts of peanut hulls from various cultivars. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, v. 72, n. 9, p. 1065, 1995.
- YOO, Y. C. et al. Isolation of fatty acids with anticancer activity from *Protoetia brevitarsis* Larva. *Arch. Pharmacol Res.*, v. 30, n. 3, p. 361-365, 2007.
- YOSHIDA, Y.; NIKI, E. Antioxidant effects of phytosterol and its components. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, v. 49, n. 4, p. 277-80, 2003.
- YU, F. et al. Inhibition of *Coix* seed extract on fatty acid synthase, a novel target for anticancer activity. *J. Ethnopharmacol.*, v. 119, n. 2, p. 252-258, 2008.
- YU, J.; AHMEDNA, M.; GOKTEPE, I. Effects of processing methods and extraction solvents on concentration and antioxidant activity of peanut skin phenolics. *Food Chem.*, v. 90, p. 199-206, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.03.048>
- YU, J. et al. Peanut skin procyanidins: Composition and antioxidant activities as affected by processing. *J. Food Compos. Anal.*, v. 19, n. 4, p. 364-371, 2006.
- ZAHEER, M.; GIRI, C. C. Enhanced diterpene lactone (andrographolide) production from elicited adventitious root cultures of *Andrographis paniculata*. *Res. Chem. Intermediat.*, v. 43, n. 4, p. 2433-2444, 2017.
- ZHANG, C. H.; WU, J. Y. Ethylene inhibitors enhance elicitor-induced paclitaxel production in suspension cultures of *Taxus spp.* cells. *Enzyme Microb. Technol.*, v. 32, n. 1, p. 71-77, 2003.
- ZHANG, H.; MOONEY, C. J.; REILLY, M. P. ABO blood groups and cardiovascular

diseases. *Int. J. Vasc. Med.*, v. 2012, 2012.

ZHONG, J.-J. Plant cell culture for production of paclitaxel and other taxanes. *J. Biosci. Bioeng.*, v. 94, n. 6, p. 591-599, 2002.

ZU, X.-Y. et al. Sedative effects of peanut (*Arachis hypogaea* L.) leaf aqueous extracts on brain ATP, AMP, Adenosine and Glutamate/GABA of rats. *J. Biomed. Sci. Eng.*, v. 3, n. 3, p. 268-273, 2010.

ANEXO – Artigo “Total phenolics, resveratrol content and antioxidant activity of seeds and calluses of Pinto peanut (*Arachis pinto* Krapov. & W.C. Greg.)”, publicado na revista Plant, Cell, Tissue and Organ Culture (SOUSA-MACHADO et al., 2018)