



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

Gabriel Casimiro Lopes Silva Santos

**Análise fitoquímica e avaliação de atividades biológicas  
de plantas *in vivo* e materiais obtidos *in vitro* de cultivares  
brasileiras de *Arachis hypogaea* L. (amendoim)**

Rio de Janeiro  
2016

Gabriel Casimiro Lopes Silva Santos

**Análise fitoquímica e avaliação de atividades biológicas  
de plantas *in vivo* e materiais obtidos *in vitro* de cultivares brasileiras  
de *Arachis hypogaea* L. (amendoim)**



Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, como requisito para a obtenção do grau de Doutor em Biologia Vegetal.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Elisabeth Atalla Mansur de Oliveira

Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Georgia Pacheco Peters de Almeida

Rio de Janeiro

2016

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

S237 Santos, Gabriel Casimiro Lopes Silva.  
Análise fitoquímica e avaliação de atividades biológicas de plantas in vivo e materiais obtidos in vitro de cultivares brasileiras de *Arachis hypogaea* L. (amendoim) / Gabriel Casimiro Lopes Silva Santos. - 2016.  
195 f ; il.  
Orientadora: Elisabeth Atalla Mansur de Oliveira  
Coorientadora: Georgia Pacheco Peters de Almeida  
Tese (Doutorado) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Programa de Pós-graduação em Biologia Vegetal.

1. Amendoim – Teses. 2. Matéria médica vegetal – Propagação in vitro - 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 Alcantara Gomes. IV. Título.

CDU 633.368

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

---

Assinatura

---

Data

Gabriel Casimiro Lopes Silva Santos

**Análise fitoquímica e avaliação de atividades biológicas  
de plantas *in vivo* e materiais obtidos *in vitro* de cultivares brasileiras  
de *Arachis hypogaea* L. (amendoim)**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, como requisito para a obtenção do grau de Doutor em Biologia Vegetal.

Aprovada em 13 de dezembro de 2016.

Orientadoras:

Prof<sup>a</sup>. Dra. Elisabeth Atalla Mansur de Oliveira  
Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes – UERJ

Prof<sup>a</sup>. Dra. Georgia Pacheco Peters de Almeida Instituto de Biologia  
Roberto Alcantara Gomes - UERJ

Banca Examinadora:

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Norma Albarello  
Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes – UERJ

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Marsen Garcia Pinto Coelho  
Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes – UERJ

---

Prof. Dr. Leopoldo Clemente Baratto  
Faculdade de Farmácia – UFRJ

---

Prof. Dr. André Mesquita Marques  
Departamento de Química de Produtos Naturais – Fiocruz

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Elisabeth Atalla Mansur de Oliveira  
Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes – UERJ

Rio de Janeiro

2016

## DEDICATÓRIA

A todos que contribuíram para a realização deste trabalho.

## AGRADECIMENTOS

Às orientadoras desta tese, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Elisabeth Atalla Mansur de Oliveira e Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Georgia Pacheco Peters de Almeida, por toda dedicação, sabedoria, compreensão e, acima de tudo, nível de exigência.

Ao Prof. Dr. Marcelo Manzi Marinho, coordenador do Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (PGBV-UERJ).

Aos membros da banca avaliadora desta tese pelas preciosas contribuições.

Às Prof<sup>as</sup>.: Dr<sup>a</sup>. Ivana Correa Ramos Leal e Dr<sup>a</sup>. Naomi Kato Simas, e a todos os demais integrantes do Laboratório de Produtos Naturais e Ensaio Biológicos da Universidade Federal do Rio de Janeiro (LaProNEB/UFRJ), que possibilitaram a realização da etapa de avaliação da atividade alelopática.

Às Prof<sup>as</sup>.: Dr<sup>a</sup>. Kátia Costa de Carvalho Sabino e Dr<sup>a</sup>. Maria da Graça Justo Araújo, e a todos os demais integrantes do Laboratório de Imunologia Aplicada e Bioquímica de Proteínas e Produtos Naturais da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (LIA-BPPN/UERJ), em especial à Dr<sup>a</sup>. Nathália Regina Felizardo Leal, à Dr<sup>a</sup>. Girlaine Pereira da Silva e ao biólogo Márcio Soares, onde foi realizada a etapa de avaliação da atividade antitumoral.

Ao Prof. Dr. Davyson de Lima Moreira, do Laboratório de Toxicologia Ambiental da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) e a Felipe S. Cândido, pela realização das análises qualitativas e quantitativas por CLAE.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) pela bolsa de estudos.

Ao Dr. Ignácio José de Godoy, pesquisador do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), pelo fornecimento das sementes utilizadas neste trabalho.

Ao corpo docente do PGBV, pelo ensino de excelência e pela dedicação aos alunos.

Aos alunos e companheiros do PGBV, pela convivência e por estarem caminhando junto comigo neste desafio.

À Dr<sup>a</sup>. Renata de Oliveira Garcia, pelo apoio e por ter sido uma pessoa de vital importância à realização deste trabalho.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cláudia Simões Gurgel, por ter acompanhado de perto e feito sugestões valiosas para este trabalho.

Aos farmacêuticos Eduardo Nunes da Fonseca e Iranilda Calado Santana pelo auxílio no preparo dos extratos vegetais.

Aos demais integrantes do Núcleo de Biotecnologia Vegetal (NBV), pela convivência imensamente agradável.

Às técnicas-administrativas do PGBV, Vera e Amália, pelo apoio constante.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

“As ciências têm as raízes amargas, porém os frutos são doces.”

*Aristóteles*



## RESUMO

SANTOS, Gabriel Casimiro Lopes Silva. **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. 195f. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2016.

O amendoim (*Arachis hypogaea* L.), que pertence à família Fabaceae, é a quarta oleaginosa mais consumida no mundo e suas sementes são altamente energéticas, contendo lipídios, proteínas, vitaminas e carboidratos. Embora diversas atividades biológicas já tenham sido observadas em extratos de raízes, folhas, tegumentos e sementes, as atividades alelopática e antitumoral foram pouco estudadas. Neste trabalho, essas atividades foram investigadas em extratos brutos, partições e frações oriundos de materiais vegetais *in vivo* e *in vitro* de cinco cultivares brasileiras de *A. hypogaea* (IAC 886, IAC Caiapó, IAC Tatu ST, IAC 8112 e BR-1). O *trans*-resveratrol, um polifenol amplamente relacionado a atividades biológicas, também foi quantificado nas amostras. Para a obtenção de materiais *in vitro*, foi analisada a influência de diferentes tipos de explantes, temperatura e qualidades de luz. Os calos friáveis desenvolvidos a partir de explantes de segmentos foliares cultivados em meio MS suplementado com PIC a 1,25µM, a 25±2°C, sob luz fluorescente ou associação de LEDs azul e vermelho, foram selecionados para a comparação com materiais *in vivo*. Na avaliação da atividade alelopática, calos friáveis da cultivar BR-1 mantidos sob associação de LED azul e vermelho e os extratos de semente da cultivar BR-1, a partição diclorometânica, e as frações diclorometano:acetona (1:1) e diclorometano:acetona (1:4) causaram a maior inibição do crescimento e da germinação de sementes de *Lactuca sativa*. A partição diclorometânica também inibiu o crescimento de algumas espécies daninhas para plantações de *A. hypogaea* (*Commelina benghalensis* e *Ipomoea nil*). Para o estudo da atividade antitumoral, células cancerígenas (K562, PC3, MCF-7 e A549), células mononucleares de sangue periférico (CMNSP) e células de fibroblastos de camundongos (NIH-3T3) foram utilizadas. O extrato de sementes com tegumento da cv. BR-1, sua partição diclorometânica, a fração diclorometano:acetona (1:1) desta partição e o extrato bruto de calo da cv. IAC 886 apresentaram toxicidade maior para as células tumorais, especialmente para a linhagem mielóide crônica (K562), do que para as células CMNSP ou NIH-373. Na análise fitoquímica, o tegumento da cv. BR-1 foi o material que apresentou as maiores concentrações de *trans*-resveratrol (94,55±2,56 µg/g de peso fresco). A eliciação por ultravioleta resultou no aumento do teor de *trans*-resveratrol em partes aéreas da cv. IAC Tatu ST (até 32,18±0,49 µg/g de peso fresco).

Palavras-chave: Fabaceae. Calogênese. Alelopatia. Anticâncer. Resveratrol.

## ABSTRACT

SANTOS, Gabriel Casimiro Lopes Silva. **Phytochemical analysis and evaluation of biological activities of *in vivo* plants and materials obtained *in vitro* of Brazilian cultivars of *Arachis hypogaea* L. (peanut).** 2016. 195f. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2016.

Peanut (*Arachis hypogaea* L.), that belongs to Fabaceae family, is the fourth most consumed oilseed in the world and its seeds are highly energetic, containing lipids, proteins, vitamins, and carbohydrates. Although several biological activities have already been observed in extracts from roots, leaves, seeds and teguments, the allelopathic and antitumor activities have been less studied. In this work, these activities were investigated in crude extracts, partitions and fractions of *in vivo* plants and *in vitro* plant materials from five Brazilian *Arachis hypogaea* cultivars (IAC 886, IAC Caiapó, IAC Tatu ST, IAC 8112 and BR-1). *Trans*-resveratrol, a polyphenol widely related to biological activities, was also quantified in the samples. In order to obtain *in vitro* materials, the influence of different types of explants, temperature, and light qualities was analyzed. The friable calluses developed from explants of leaf segments grown on MS medium supplemented with 1.25  $\mu$ M PIC at 25 $\pm$ 2°C under fluorescent light or association of blue and red LEDs were selected for comparison with *in vivo* materials. In the evaluation of the allelopathic activity, friable calluses of cv. BR-1 maintained under the association of blue and red LEDs and seed extracts of cultivar BR-1, the dichloromethane partition, and fractions dichloromethane: acetone (1:1) and dichloromethane:acetone (1:4) caused the highest inhibition of growth and seed germination of *Lactuca sativa*. The dichloromethane partition also inhibited the growth of some weed species for *A. hypogaea* (*Commelina benghalensis* and *Ipomoea nil*) plantations. For the study of anticancer activity, cancer cells (K562, PC3, MCF-7 and A549), peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and mouse fibroblast cells (NIH-3T3) were used. The extract of seeds with tegument of cv. BR-1, its dichloromethane partition, the dichloromethane:acetone fraction (1:1) of this partition and the crude extract from calluses of cv. IAC 886 showed higher toxicity to tumor cells, especially to the chronic myeloid lineage (K562), than to CMNSP or NIH-373 cells. In the phytochemical analysis, the tegument of cultivar BR-1 was the material that presented the highest concentrations of *trans*-resveratrol (94.55 $\pm$ 2.56  $\mu$ g/g fresh weight). Ultraviolet elicitation resulted in an increase in *trans*-resveratrol content in aerial parts of the cv. IAC Tatu ST (up to 32.18 $\pm$ 0.49  $\mu$ g/g fresh weight).

Keywords: Callogenesis. Allelopathy. Anticancer. Resveratrol.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– Área de ocorrência das seções do gênero <i>Arachis</i> .....	21
Figura 2	– Diferentes órgãos da planta do amendoim ( <i>Arachis hypogaea</i> ).....	24
Figura 3	– Subespécies, variedades botânicas e tipos agrônômicos de <i>Arachis hypogaea</i> .....	25
Figura 4	– Aspecto das sementes das cinco cultivares utilizadas no trabalho...	26
Figura 5	– Principais estilbenos encontrados em <i>A. hypogaea</i> .....	28
Figura 6	– Metabólitos especiais já identificados em espécies do gênero <i>Arachis</i> .....	30
Figura 7	– Sistemas de regeneração da cultura de tecidos.....	34
Figura 8	– Quantidade de artigos sobre cultura de tecidos em <i>A. hypogaea</i> publicados por países.....	38
Figura 9	– Formação de calos friáveis a partir de segmentos foliares de <i>A. hypogaea</i> , cv. BR-1, em resposta a PIC a 1,25µM. Explantes mantidos sob lâmpadas fluorescentes do tipo branca fria, a 25±2°C, por diferentes períodos.....	48
Figura 10	– Formação de calos friáveis a partir de diferentes explantes de <i>A. hypogaea</i> , cv. IAC 886, em resposta a PIC a 1,25µM. Explantes mantidos sob LED branco, a 25±2°C, por diferentes períodos.....	50
Figura 11	– Formação de calos friáveis a partir de diferentes explantes de <i>A. hypogaea</i> , cv. IAC Caiapó, em resposta a PIC a 1,25µM. Explantes mantidos por 60 dias, sob LED azul a 25±2°C.....	52
Figura 12	– Formação de calos friáveis a partir de folíolos embrionários de diferentes cultivares de <i>A. hypogaea</i> , em resposta a PIC 1,25µM, após 60 dias de cultura sob LED vermelho, a 30±2°C.....	54
Figura 13	– Formação de calos friáveis a partir de diferentes explantes de <i>A. hypogaea</i> , cv. BR-1, em resposta a PIC 1,25µM, após 60 dias de cultura sob associação de LED azul e vermelho, a 25±2°C.....	56
Figura 14	– Elementos do metabolismo do carbono em relação às rotas de síntese de metabólitos especiais.....	66

Figura 15 – Esquema da partição líquido-líquido do extrato etanólico de sementes da cv. BR-1 de <i>A. hypogaea</i> para obtenção das partições orgânicas e o resíduo aquoso.....	71
Figura 16 – Avaliação da atividade alelopática de extratos etanólicos de <i>Arachis hypogaea</i> (cv. BR-1) sobre o crescimento de hipocótilos e radículas de <i>L. sativa</i> .....	75
Figura 17 – Avaliação da atividade alelopática das partições dos extratos de sementes de <i>Arachis hypogaea</i> (cv. BR-1) sobre o crescimento de hipocótilos e radículas de <i>L. sativa</i> .....	79
Figura 18 – Avaliação da atividade alelopática das frações da partição diclorometânica do extrato de semente de <i>Arachis hypogaea</i> (cv. BR-1), a 19,70 ppm, sobre o crescimento de hipocótilos e radículas de <i>L. sativa</i> .....	82
Figura 19 – Substâncias com atividade antitumoral.....	89
Figura 20 – Atividade Redutora Mitocondrial (ARM) de linhagem celular leucêmica humana (K562) incubada com extratos etanólicos de partes aéreas e raízes de plantas obtidas <i>in vivo</i> e produzidas <i>in vitro</i> de cinco cultivares de <i>Arachis hypogaea</i> .....	97
Figura 21 – Atividade Redutora Mitocondrial (ARM) de linhagem celular leucêmica humana K562 e linhagens de tumores sólidos incubadas com extratos etanólicos de calos friáveis de <i>Arachis hypogaea</i> cultivados em meio MS suplementado com picloram a 1,25 µM e mantidos a 25°C, sob luz fluorescente branca.....	98
Figura 22 – Atividade Redutora Mitocondrial (ARM) de linhagem celular leucêmica humana K562 incubada com extratos hexânicos de sementes e tegumentos de <i>Arachis hypogaea</i> .....	99
Figura 23 – Atividade Redutora Mitocondrial (ARM) de linhagem celular leucêmica humana K562 incubada com extratos etanólicos de sementes com e sem tegumentos e tegumentos isolados de <i>Arachis hypogaea</i> .....	100

Figura 24 – Atividade Redutora Mitocondrial (ARM) de linhagem celular leucêmica humana K562 incubada com partições de extratos de sementes com ou sem tegumento da cv. BR-1 de <i>Arachis hypogaea</i> .....	102
Figura 25 – Atividade Redutora Mitocondrial (ARM) de linhagem celular leucêmica humana K562 incubada com extratos etanólicos de frações da partição diclorometânica de sementes com tegumento da cv. BR-1 de <i>Arachis hypogaea</i> .....	103
Figura 26 – Comparação do efeito do extrato etanólico de semente com tegumento (cv. BR-1 de <i>Arachis hypogaea</i> ) e suas respectivas partições na Atividade Redutora Mitocondrial (ARM) da linhagem celular leucêmica humana K562 e linhagens celulares de tumores sólidos (PC3, MCF-7 e A549).....	105
Figura 27 – Estrutura molecular do resveratrol.....	112
Figura 28 – Cromatograma por CLAE do padrão de <i>trans</i> -resveratrol.....	124
Figura 29 – Espectro de absorção de luz UV (200-400 nm) do <i>trans</i> -resveratrol e de outros estilbenos.....	125
Figura 30 – Perfil cromatográfico dos extratos de parte aérea de cinco cultivares de <i>A. hypogaea</i> , considerando a presença de <i>trans</i> -resveratrol (A) e SB-1 e SB-2 (B).....	126
Figura 31 – Perfil cromatográfico dos extratos de raiz de cinco cultivares de <i>A. hypogaea</i> , considerando a presença de <i>trans</i> -resveratrol (A), SB-3 (B) e SB-4 (C).....	127
Figura 32 – Perfil cromatográfico dos extratos de tegumento de cinco cultivares de <i>A. hypogaea</i> , considerando a presença de <i>trans</i> -resveratrol (A) e SB-3 (B).....	128
Figura 33 – Perfil cromatográfico dos extratos de semente de cinco cultivares de <i>A. hypogaea</i> , considerando a presença de <i>trans</i> -resveratrol (A), SB-1 e SB-2 (B).....	129
Figura 34 – Perfil cromatográfico dos extratos de partes aéreas da cv. IAC Tatu ST de <i>A. hypogaea</i> após eliciação em luz UV, considerando a presença de SB-1 (A), SB-2 (B) e outro possível estilbeno (C).....	130

Figura 35 – Perfil cromatográfico dos extratos de partes aéreas <i>in vitro</i> de cinco cultivares de <i>A. hypogaea</i> , considerando a presença de SB-1 e SB-2.....	132
Figura 36 – Perfil cromatográfico dos extratos de calos das cvs. IAC 886 e BR-1 de <i>A. hypogaea</i> oriundos de segmentos foliares em meio suplementado com picloram 1,25 µM, a 25°C, sob luz fluorescente ou associação de LED azul e vermelho, considerando a presença de SB-1 e SB-2 (A) e SB-3 (B).....	133
Figura 37 – Cromatograma do padrão <i>trans</i> -resveratrol (1 µg/mL, T <sub>R</sub> = 9,1 min) nas melhores condições de análise.....	135
Figura 38 – Correlação linear entre a atividade redutora mitocondrial (ARM) e a concentração de <i>trans</i> -resveratrol nas amostras de extratos etanólicos brutos (tegumentos das cvs. IAC Tatu ST e IAC 8112 e partes aéreas das cvs. IAC Tatu ST e BR-1).....	137

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Seções e espécies do gênero <i>Arachis</i> .....	22
Quadro 2 – Cultura de tecidos de espécies do gênero <i>Arachis</i> .....	39
Quadro 3 – Quantidade de <i>trans</i> -resveratrol em amendoim ( <i>Arachis hypogaea</i> ) e derivados.....	115
Quadro 4 – Cultura de tecidos e produção de estilbenos em <i>A. hypogaea</i> .....	117
Quadro 5 – Metodologias já descritas para a quantificação de <i>trans</i> -resveratrol em <i>A. hypogaea</i> por CLAE.....	118

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	– Frequência de calogênese (%) a partir de diferentes explantes de cinco cultivares de <i>A. hypogaea</i> em meio MS suplementado com diferentes concentrações de PIC, após 60 dias de cultura sob luz fluorescente branca fria a 25±2°C e a 30±2°C.....	49
Tabela 2	– Frequência de calogênese (%) a partir de diferentes explantes de cinco cultivares de <i>A. hypogaea</i> em meio MS suplementado com diferentes concentrações de PIC, após 60 dias de cultura sob LED branco a 25±2°C e a 30±2°C.....	51
Tabela 3	– Frequência de calogênese (%) a partir de diferentes explantes de cinco cultivares de <i>A. hypogaea</i> em meio MS suplementado com diferentes concentrações de PIC, após 60 dias de cultura sob LED azul a 25±2°C e a 30±2°C.....	53
Tabela 4	– Frequência de calogênese (%) a partir de diferentes explantes de cinco cultivares de <i>A. hypogaea</i> em meio MS suplementado com diferentes concentrações de PIC, após 60 dias de cultura sob LED vermelho a 25±2°C e a 30±2°C.....	55
Tabela 5	– Frequência de calogênese (%) a partir de explantes de cultivares de <i>A. hypogaea</i> em meio MS suplementado com diferentes concentrações de PIC, após 60 dias de cultura sob associação de LED azul e vermelho a 25±2°C e a 30±2°C.....	57
Tabela 6	– Peso fresco e peso seco de calos obtidos a partir de segmentos foliares de cinco cultivares de <i>A. hypogaea</i> em meio MS suplementado com diferentes concentrações de PIC sob luz fluorescente e LED azul e vermelho, após 60 dias, a 25±2°C.....	58
Tabela 7	– Inibição da germinação de sementes de <i>L. sativa</i> por extratos etanólicos de parte aérea, raiz, tegumento e semente da cultivar BR-1 de <i>Arachis hypogaea</i> .....	74
Tabela 8	– CI <sub>50</sub> para a atividade alelopática dos extratos etanólicos da cv. BR-1 de <i>Arachis hypogaea</i> sobre o crescimento de hipocótilos e raízes de <i>L. sativa</i> .....	76



Tabela 9 – Inibição do crescimento de plântulas de <i>L. sativa</i> por extratos brutos das cvs. IAC 886, IAC Caiapó, IAC Tatu ST, IAC 8112 e BR-1 de <i>Arachis hypogaea</i> , utilizando os valores de CI <sub>50</sub> obtidos para a cv. IAC BR-1.....	76
Tabela 10 – Inibição do crescimento de plântulas de <i>L. sativa</i> por extratos de calos obtidos a partir de segmentos foliares de cinco cultivares de <i>A. hypogaea</i> cultivados em meio MS suplementado com picloram 1,25 µM, sob luz fluorescente e diferentes LEDs, após 60 dias, a 25±2°C.....	77
Tabela 11 – Inibição da germinação de <i>Lactuca sativa</i> pelas partições de extratos de sementes da cv. BR-1 de <i>Arachis hypogaea</i> , a 1000 ppm.....	78
Tabela 12 – CI <sub>50</sub> da atividade alelopática das partições do extrato de semente da cv. BR-1 de <i>Arachis hypogaea</i> .....	80
Tabela 13 – Inibição do crescimento de plantas daninhas ( <i>Commelina benghalensis</i> e <i>Ipomoea nil</i> ) pela partição diclorometânica do extrato de semente da cv. BR-1 de <i>Arachis hypogaea</i> .....	81
Tabela 14 – Valores de CI <sub>50</sub> de diferentes materiais da cv. BR-1 e calo da cv. 886 de <i>Arachis hypogaea</i> sobre linhagem celular leucêmica humana K562.....	104
Tabela 15 – Valores de CI <sub>50</sub> da ação de diferentes materiais da cv. BR-1 de <i>Arachis hypogaea</i> sobre células de fibroblastos de camundongos (NIH-3T3).....	106
Tabela 16 – Valores de CI <sub>50</sub> da ação de diferentes materiais da cv. BR-1 de <i>Arachis hypogaea</i> sobre células mononucleares de sangue periférico (CMNSP).....	107
Tabela 17 – Concentração de <i>trans</i> -resveratrol nas amostras de material <i>in vivo</i> das cinco cultivares de <i>Arachis hypogaea</i> .....	136

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2,4D	Ácido 2,4 diclorofenoxiacético
ABA	Ácido abscísico
Acet	Acetona
AcoEt	Partição em acetato de etila
AIA	Ácido indol-3-acético
ANA	Ácido 1-naftalenoacético
AQ	Resíduo aquoso
ARM	Atividade Redutora Mitocondrial
BAP	Benzilaminopurina
BUT	Partição butanólica
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
cv.	Cultivar
DCM	Partição diclorometânica
GA <sub>3</sub>	Ácido giberélico
HEX	Partição hexânica
IAC	Instituto Agronômico de Campinas
KIN	Cinetina
LED	Diodo emissor de luz
MeOH	Metanol
MS	Murashige & Skoog
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazólio
PIC	Picloram
TDZ	Thidiazuron
UV	Ultravioleta

## SUMÁRIO

	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	21
1	<b>O GÊNERO <i>ARACHIS</i></b> .....	21
1.1	<i>Arachis hypogaea</i> L.....	24
1.2	<b>Metabólitos especiais em <i>Arachis</i></b> .....	27
2	<b>OBJETIVOS</b> .....	32
2.1	<b>Objetivo Geral</b> .....	32
2.2	<b>Objetivos Específicos</b> .....	32
3	<b>CULTURA DE TECIDOS</b> .....	33
3.1	<b>Introdução</b> .....	33
3.1.1	<u>Cultura de tecidos de <i>Arachis</i></u> .....	36
3.2	<b>Objetivos</b> .....	45
3.2.1	<u>Objetivo geral</u> .....	45
3.2.2	<u>Objetivos específicos</u> .....	45
3.3	<b>Material e métodos</b> .....	46
3.3.1	<u>Material vegetal</u> .....	46
3.3.2	<u>Cultura <i>in vitro</i></u> .....	46
3.3.3	<u>Análise estatística</u> .....	47
3.4	<b>Resultados</b> .....	48
3.4.1	<u>Calogênese induzida sob luz fluorescente</u> .....	48
3.4.2	<u>Calogênese induzida sob LED branco</u> .....	50
3.4.3	<u>Calogênese induzida sob LED azul</u> .....	52
3.4.4	<u>Calogênese induzida sob LED vermelho</u> .....	54
3.4.5	<u>Calogênese induzida sob associação de LED azul e vermelho</u> .....	56
3.4.6	<u>Acúmulo de biomassa</u> .....	58
3.5	<b>Discussão</b> .....	60
3.6	<b>Conclusões</b> .....	62
4	<b>AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ALELOPÁTICA</b> .....	63
4.1	<b>Introdução</b> .....	63
4.1.1	<u>Substâncias alelopáticas</u> .....	64

4.1.2	<u>Plantas daninhas e herbicidas</u> .....	67
4.1.3	<u>Atividade alelopática de espécies do gênero <i>Arachis</i></u> .....	68
4.2	<b>Objetivos</b> .....	69
4.2.1	<u>Objetivo geral</u> .....	69
4.2.2	<u>Objetivos específicos</u> .....	69
4.3	<b>Material e métodos</b> .....	70
4.3.1	<u>Material vegetal</u> .....	70
4.3.2	<u>Preparo de extratos brutos, partições e frações</u> .....	70
4.3.3	<u>Avaliação da atividade alelopática</u> .....	72
4.3.3.1	Efeito sobre a germinação de sementes de <i>L. sativa</i> e plantas daninhas.....	72
4.3.3.2	Efeito sobre o crescimento de hipocótilos e radículas de <i>L. sativa</i> .....	73
4.3.4	<u>Análise estatística</u> .....	73
4.4	<b>Resultados</b> .....	74
4.4.1	<u>Avaliação dos extratos brutos</u> .....	74
4.4.2	<u>Avaliação das partições</u> .....	77
4.4.3	<u>Avaliação das frações</u> .....	81
4.5	<b>Discussão</b> .....	83
4.6	<b>Conclusões</b> .....	85
5	<b>AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL</b> .....	86
5.1	<b>Introdução</b> .....	86
5.1.1	<u>Substâncias com ação antitumoral</u> .....	87
5.1.2	<u>Atividade antitumoral de espécies do gênero <i>Arachis</i></u> .....	90
5.2	<b>Objetivos</b> .....	91
5.2.1	<u>Objetivo geral</u> .....	91
5.2.2	<u>Objetivos específicos</u> .....	91
5.3	<b>Material e métodos</b> .....	92
5.3.1	<u>Material vegetal</u> .....	92
5.3.2	<u>Linhagens celulares</u> .....	92
5.3.3	<u>Reagentes</u> .....	93
5.3.4	<u>Manutenção das linhagens celulares</u> .....	93

5.3.5	<u>Isolamento e cultura de células mononucleares de sangue periférico..</u>	94
5.3.6	<u>Ensaio de citotoxicidade <i>in vitro</i> das amostras.....</u>	94
5.3.7	<u>Análise estatística.....</u>	95
5.4	<b>Resultados.....</b>	96
5.4.1	<u>Avaliação da toxicidade sobre células da linhagem mieloide crônica (K562).....</u>	96
5.4.1.1	Citotoxicidade dos extratos brutos de parte aérea, raiz e calo.....	96
5.4.1.2	Citotoxicidade dos extratos brutos de sementes e tegumentos.....	98
5.4.1.3	Citotoxicidade das partições de extratos de sementes com tegumentos da cv. BR-1.....	101
5.4.1.4	Citotoxicidade das frações da partição diclorometânica de semente com tegumento da cv. BR-1.....	102
5.4.1.5	Comparação dos valores das amostras ativas da cv. BR-1.....	103
5.4.2	<u>Avaliação da toxicidade sobre células tumorais das linhagens PC3, MCF-7 e A549.....</u>	104
5.4.3	<u>Avaliação da toxicidade sobre células não tumorais do tipo fibroblastos (NIH3T3).....</u>	106
5.4.4	<u>Avaliação da toxicidade sobre células mononucleares de sangue periférico (CMNSP).....</u>	107
5.5	<b>Discussão.....</b>	108
5.6	<b>Conclusões.....</b>	111
6	<b>TEOR DE <i>TRANS</i>-RESVERATROL E ANÁLISE QUALITATIVA DE ESTILBENOS.....</b>	112
6.1	<b>Introdução.....</b>	112
6.2	<b>Objetivos.....</b>	120
6.2.1	<u>Objetivo geral.....</u>	120
6.2.2	<u>Objetivos específicos.....</u>	120
6.3	<b>Material e métodos.....</b>	121
6.3.1	<u>Material vegetal.....</u>	121
6.3.2	<u>Eliciação.....</u>	121
6.3.3	<u>Preparo de extratos brutos, partições e frações.....</u>	122
6.3.4	<u>Determinação do perfil qualitativo das amostras.....</u>	122

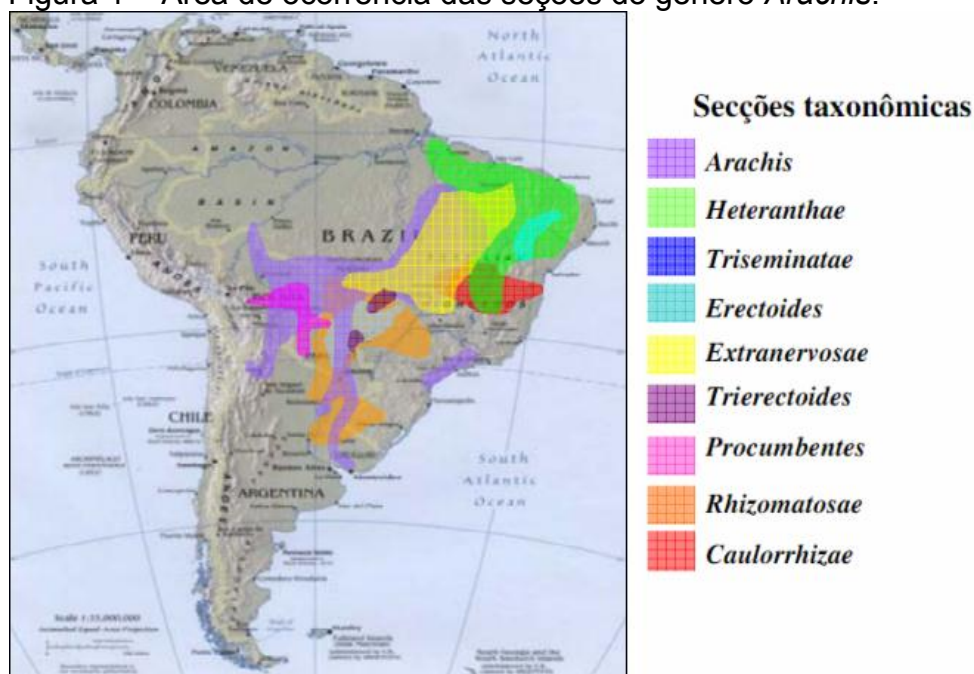
6.3.5	<u>Determinação do perfil quantitativo das amostras</u> .....	123
6.3.6	<u>Análise estatística</u> .....	123
6.4	<b>Resultados</b> .....	124
6.4.1	<u>Determinação do perfil qualitativo das amostras</u> .....	124
6.4.1.1	Avaliação dos extratos de materiais obtidos em condições naturais.....	125
6.4.1.2	Avaliação dos extratos de materiais produzidos <i>in vitro</i> .....	131
6.4.2	<u>Determinação do teor de <i>trans</i>-resveratol nas amostras</u> .....	134
6.5	<b>Discussão</b> .....	138
6.6	<b>Conclusões</b> .....	140
	<b>CONCLUSÕES FINAIS</b> .....	141
	<b>PERSPECTIVAS</b> .....	142
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	143
	<b>APÊNDICE A</b> – Artigo publicado no periódico <i>International Journal of Green and Herbal Chemistry</i> .....	174
	<b>APÊNDICE B</b> – Artigo publicado no periódico <i>The Scientific World Journal</i> .....	184

## INTRODUÇÃO

### 1 O GÊNERO *ARACHIS*

O gênero *Arachis* (Fabaceae, subfamília Papilionoideae) compreende os amendoins, e é originário da América do Sul, sendo a ocorrência natural das espécies restrita a Argentina, Paraguai, Uruguai, Bolívia e Brasil (KRAPOVICKAS; GREGORY, 1994). Acredita-se que os membros da tribo indígena Arawak, um povo pacífico que vivia no norte da América do Sul à época da chegada de Cristóvão Colombo, tenham sido os primeiros a domesticar o amendoim (HOFMAN, 1993). As espécies são divididas em nove seções, cujas áreas de ocorrência distribuem-se conforme mostrado na Figura 1.

Figura 1 – Área de ocorrência das seções do gênero *Arachis*.



Fonte: KRAPOVICKAS; GREGORY, 1994.

Os estudos taxonômicos sobre o amendoim foram iniciados em 1841, quando George Bentham descreveu cinco espécies silvestres (KRAPOVICKAS; GREGORY, 1994). Atualmente, o gênero é constituído por 81 espécies descritas, agrupadas nas seções de acordo com sua morfologia, grau de cruzabilidade e distribuição geográfica (VALLS; SIMPSON, 2005) (Quadro 1).

Quadro 1 – Seções e espécies do gênero *Arachis*.

Seções	Espécies
<i>Trirectoides</i>	<i>A. guaranítica, A. tuberosa</i>
<i>Erectoides</i>	<i>A. archeri, A. benthamii, A. brevipetiolata, A. cryptopotamica, A. douradiana, A. gracilis, A. hatschbachii, A. hermannii, A. major, A. martii, A. oteroi, A. paraguariensis, A. porphyrcalyx, A. stenophylla</i>
<i>Extranervosae</i>	<i>A. burchellii, A. lutescens, A. macedoi, A. marginata, A. pietrarellii, A. prostrata, A. retusa, A. setinervosa, A. submarginata, A. villosulicarpa</i>
<i>Triseminatae</i>	<i>A. triseminata</i>
<i>Heteranthae</i>	<i>A. dardani, A. giacomettii, A. interrupta, A. pusilla, A. seridoensis, A. sylvestris</i>
<i>Caulorrhizae</i>	<i>A. pintoii, A. repens</i>
<i>Procumbentes</i>	<i>A. appressipila, A. chiquitana, A. hassleri, A. kretschmeri, A. lignosa, A. matiensis, A. pflugeae, A. rigonii, A. subcoriacea, A. vallsii</i>
<i>Rhizomatosae</i>	<i>A. burkartii, A. glabrata, A. pseudovillosa, A. nitida</i>
<i>Arachis</i>	<i>A. batizocoi, A. benensis, A. cardenasii, A. cruziana, A. correntina, A. decora, A. diogoi, A. duranensis, A. glandulifera, A. gregoryi, A. helodes, A. herzogii, A. hypogaea, A. hoehnei, A. ipaensis, A. kempff-mercaoi, A. krapovickasii, A. kuhlmannii, A. linearifolia, A. magna, A. microsperma, A. monticola, A. palustris, A. praecox, A. schininii, A. simpsonii, A. stenosperma, A. trinitensis, A. valida, A. vallsii, A. villosa, A. williamsii</i>

Fonte: KRAPOVICKAS; GREGORY, 1994; VALLS; SIMPSON, 2005.

O Brasil é o país com a maior diversidade, possuindo representantes de todas as seções do gênero (STALKER; SIMPSON, 1995), encontrados entre o sudoeste do estado de Mato Grosso do Sul e o sul de Goiás (VALLS, 2000). As seções *Caulorrhizae*, *Extranervosae*, *Heteranthae* e *Triseminatae* são exclusivas do país, que possui 64 das 81 espécies, sendo 47 endêmicas. A área geográfica de distribuição é bastante limitada, exceto a da seção *Arachis*, considerada a mais evoluída (KRAPOVICKAS; GREGORY, 1994).

Embora *Arachis hypogaea* L. (seção *Arachis*) seja a espécie economicamente mais importante, outros representantes do gênero também possuem valor agrônomo. *Arachis glabrata* Benth. e *A. pintoii* Krapov & W.C. Greg. são utilizadas para a alimentação animal, no controle de erosão e ervas daninhas e na cobertura



de solos (KERRIDGE; HARDY, 1994; VALLS, 2000). *Arachis repens* Handro (grama amendoim) é bastante utilizada como ornamental, possuindo folhas verde-escuras e flores amarelas que surgem no verão (STALKER; SIMPSON, 1995). Além dessas, *A. stenosperma* Krapov. & W. C. Greg. e *A. villosulicarpa* Hoehne ainda são utilizadas na alimentação por comunidades indígenas (KRAPOVICKAS et al., 1985; FREITAS, 2004).

O amendoim foi levado do México para o oeste da África durante o século XV. Nesta mesma época, foi transportado pelos portugueses para Portugal e Espanha, de onde foi introduzido na China, quase no início do século XVI. No século XVIII, foi difundido para outros países da Europa e, posteriormente, para os Estados Unidos (KRAPOVICKAS, 1969). Atualmente, espécies do gênero *Arachis* são cultivadas em mais de 100 países, em todos os seis continentes (NWOKOLO, 1996).

A planta do amendoim (Figura 2) possui uma coloração verde claro nos pecíolos, que são firmes e finos, e verde escuro nas folhas, que são extremamente pilosas. As folhas (Figura 2A) são, geralmente, formadas por quatro folíolos pareados dois a dois. Os folíolos superiores são geralmente maiores que os inferiores, sendo quase sempre simétricos e elípticos (VEIGA et al., 1994). As flores (Figura 2B), que costumam aparecer de quatro a seis semanas após a germinação a campo, contêm cinco pétalas e dez estames (COFFELT, 1989). Possuem cor amarelada, por vezes com estrias vermelhas (SILVA, 1997), são hermafroditas e costumam fazer autopolinização (GODOY et al., 1989). Os frutos (Figura 2C) são vagens de coloração amarelo-palha e o número de sementes em seu interior pode variar de um a quatro (SILVA, 1997). As sementes possuem dois cotilédones e um eixo embrionário formado por hipocótilo, epicótilo e radícula (MOSS; RAO, 1995).

As espécies do gênero, assim como várias outras leguminosas, possuem importante papel ecológico na fixação do nitrogênio atmosférico no solo pela ação de bactérias do gênero *Rhizobium*, que formam nódulos em suas raízes. Assim como o nitrogênio, outros elementos como potássio, cálcio, magnésio, fósforo e enxofre também são bastante absorvidos pelas raízes do amendoim (MIRANDA et al., 2003).

Figura 2 – Diferentes órgãos da planta do amendoim (*Arachis hypogaea*).



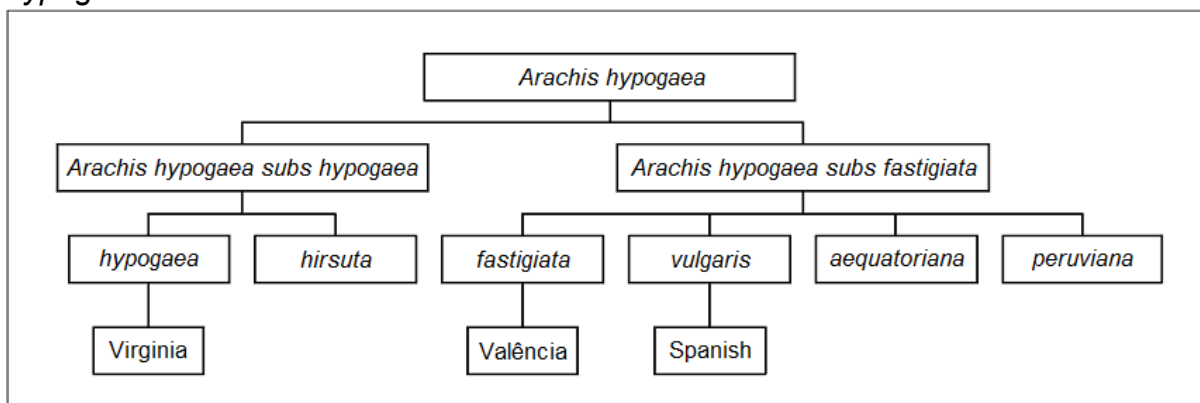
Legenda: (A) Folhas; (B) Flor; (C) Frutos e sementes; (D) Raízes.  
Fonte: PHITOHERB, 2007.

### 1.1 *Arachis hypogaea* L.

*Arachis hypogaea* é a espécie mais cultivada do gênero, sendo subdividida em duas subespécies. A subespécie *fastigiata* engloba quatro variedades (*fastigiata*, *vulgaris*, *peruviana* e *aequatoriana*), enquanto a subespécie *hypogaea* é dividida em duas variedades (*hypogaea* e *hirsuta*). As duas subespécies diferem entre si por características que incluem floração, número de sementes por vagem e tamanho das sementes. A subespécie *fastigiata* possui flores no eixo principal, crescimento ereto, formação de vagens em sequência contínua ao longo dos ramos primários e ciclos de 90 a 110 dias. A subespécie *hypogaea* não possui flores no eixo principal, apresentado porte rasteiro e ciclo longo (130 dias) (KRAPOVICKAS; GREGORY, 1994; GODOY et al., 1996; GODOY et al., 2001).

*Arachis hypogaea* também é agronomicamente classificada nos grupos Spanish, Valência e Virginia. As cultivares inseridas nos grupos Spanish (var. *fastigiata*) e Valência (var. *vulgaris*) possuem eixo central com flores, porte ereto ou semiereto, poucos ramos secundários, ciclo curto e vagens com duas (Spanish), três ou quatro sementes (Valência). As pertencentes ao grupo Virginia (var. *hypogaea*) possuem hábito rasteiro, muita ramificação, ciclo longo, ausência de flores no eixo principal e vagens com duas sementes (BORGES, 2006). A Figura 3 mostra o diagrama taxonômico contendo as subespécies, variedades botânicas e tipos agrônômicos de *A. hypogaea*.

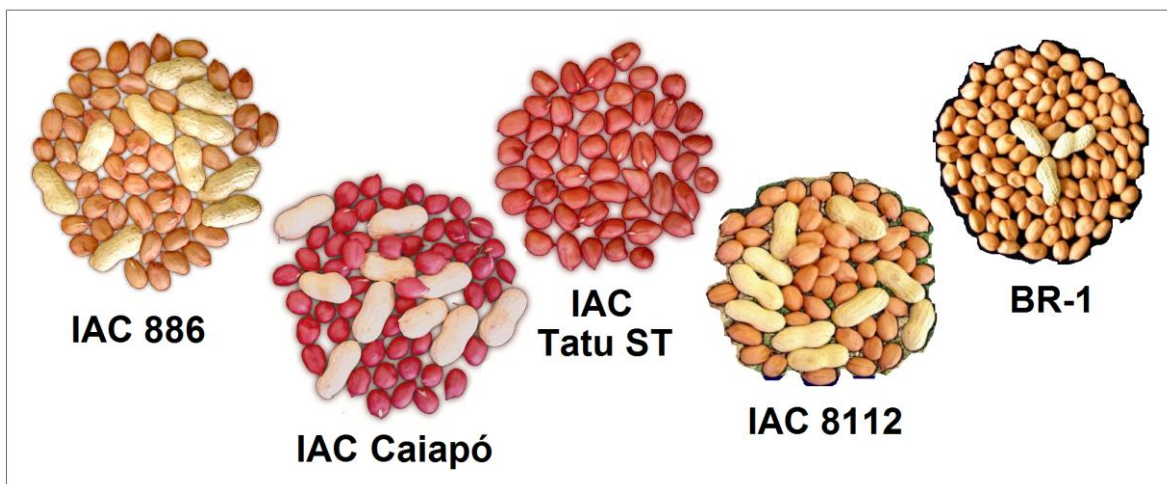
Figura 3 – Subespécies, variedades botânicas e tipos agronômicos de *Arachis hypogaea*.



Fonte: HERSELMAN, 2003.

No presente trabalho foram utilizadas cinco diferentes cultivares de *A. hypogaea*, sendo que quatro delas (IAC 886, IAC Caiapó, IAC Tatu ST e IAC 8112) foram fornecidas pelo Instituto Agronômico de Campinas (IAC) e uma (BR-1) foi fornecida pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA). A cultivar IAC 886 possui alta produtividade, coloração clara e ciclo de 125 a 130 dias, sendo recomendada para áreas com boa distribuição de chuvas e solos bem preparados e adubados, enquanto a cultivar IAC Caiapó apresenta cor avermelhada e ciclo de 130 a 135 dias (FAGUNDES, 2002). A cultivar Tatu ST possui cor avermelhada e ciclo de 90 a 110 dias, com vagens de três a quatro sementes. Seu potencial produtivo é de até 4.500 kg por hectare de vagens (ABICAB, 2012). A cultivar IAC 8112 apresenta coloração clara e ciclo de 110 a 120 dias (FAGUNDES, 2002), enquanto a cultivar BR-1 possui coloração clara e ciclos de 89 dias, em média (SANTOS et al., 2009). As sementes das cultivares são mostradas na Figura 4.

Figura 4 – Aspecto das sementes das cinco cultivares utilizadas no trabalho.



O amendoim é a quarta oleaginosa mais plantada e consumida no mundo, sendo também uma ótima opção para a rotação de culturas (FAGUNDES, 2002; RIOS, 2010). Os maiores produtores são a China, a Índia e os Estados Unidos, com uma produção anual de mais de 35 milhões de toneladas, o que corresponde a 70% da produção mundial. Devido à ainda elevada utilização de sistemas agrícolas extensivos, o Brasil ainda ocupa um lugar pouco expressivo nesse cenário, sendo responsável por menos de 0,7% da produção mundial, oriunda principalmente do estado de São Paulo (AGRIANUAL, 2012).

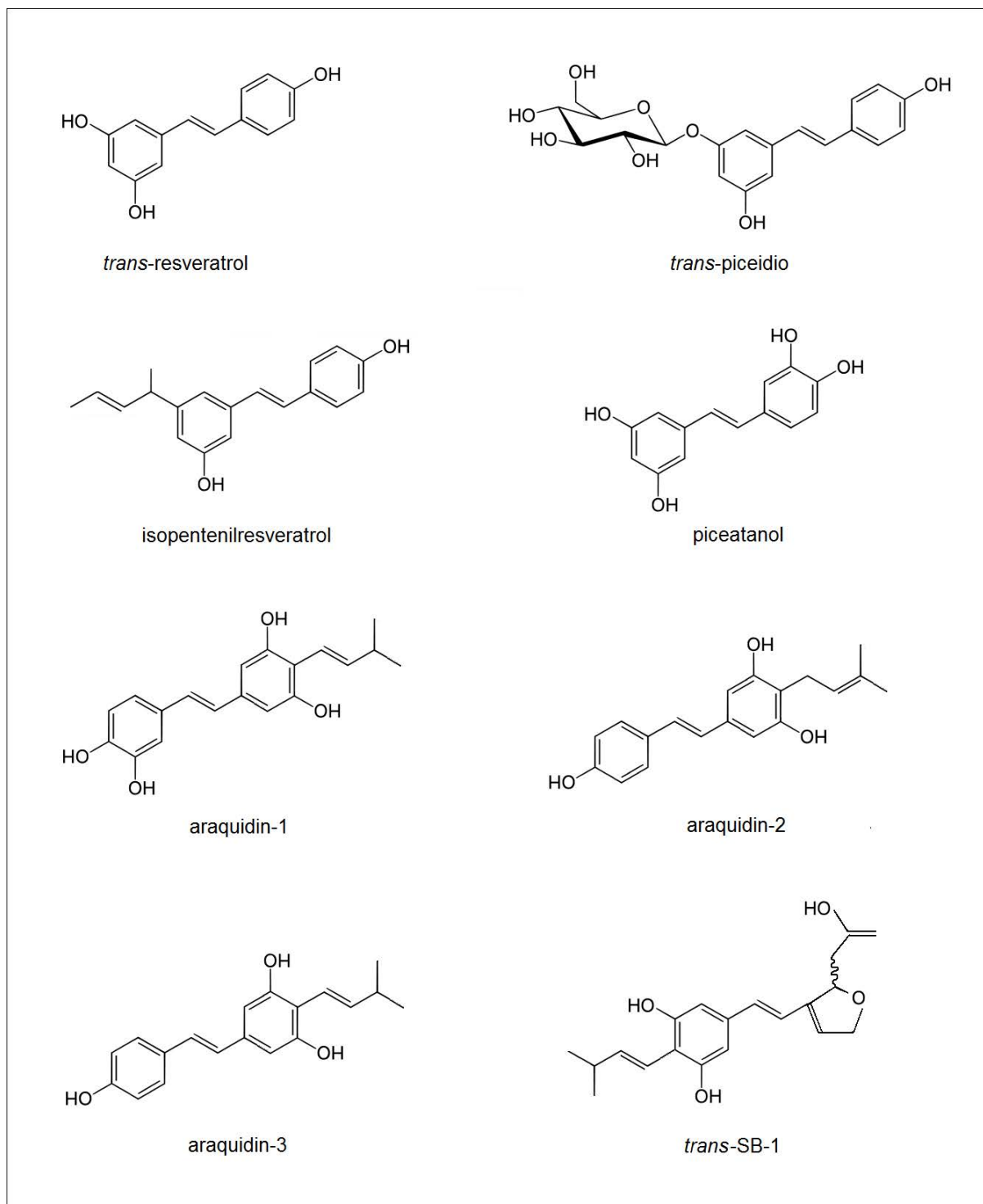
Além de saborosas, as sementes de amendoim possuem elevado teor de lipídios (cerca de 50%) e proteínas (22% a 30%). Contêm ainda sais minerais, vitaminas e carboidratos, sendo também altamente energéticas, possuindo, em média, 585 calorias em cada 100 gramas do grão. Podem ser consumidas sob a forma natural, preparados na indústria de doces, ou ainda podem ser utilizadas para a extração de óleos, na preparação de fármacos e até combustíveis (LOURENZANI; LOURENZANI, 2006). O subproduto da extração do óleo, a torta de amendoim, é utilizado na fabricação de ração animal, devido à sua riqueza em proteínas.

## 1.2 Metabólitos especiais em *Arachis*

Estudos recentes têm demonstrado a importância medicinal e fitofisiológica de metabólitos especiais presentes no amendoim. São substâncias de baixo peso molecular, que não são diretamente relacionadas à sobrevivência dos vegetais. A habilidade para a síntese dos metabólitos especiais foi selecionada ao longo da evolução. Apenas poucos grupos de plantas produzem um tipo de metabólito específico (DUDAREVA; PICHERSKY, 2000) e a função de um mesmo metabólito em diferentes grupos pode variar (KNUDSEN; TOLLSTEN, 1993). Muitas dessas substâncias são amplamente utilizadas para fins medicinais e industriais (KARUPPUSAMY, 2009).

A principal classe de metabólitos presentes no gênero *Arachis* são os derivados de fenilpropanoides, principalmente estilbenos e flavonoides. Podem ser encontrados em todas as partes da planta e estão envolvidos em mecanismos de defesa contra injúrias mecânicas, contaminação microbiana e radiação ultravioleta (PENDSE et al., 1973; LEE et al., 2008; LOPES et al., 2011). Também podem ser encontrados em concentrações menores nas partes da planta que não desenvolveram nenhum mecanismo de defesa (SOBOLEV et al., 2007).

Desde que vários benefícios à saúde humana começaram a ser atribuídos aos estilbenos, como os efeitos antioxidante, antibacteriano e anti-inflamatório, as plantas produtoras dessas substâncias, como o amendoim, passaram a ser alvo de pesquisas científicas com o objetivo de identificar metabólitos relacionados a essas propriedades (STERVBO et al., 2007). Diversos trabalhos já detectaram a presença de estilbenos em órgãos de *A. hypogaea*, tais como folhas (CHUNG et al., 2003), raízes (CHEN et al., 2002) e sementes (SANDERS et al., 2000). Dentre esses estilbenos podem ser citados o *trans*-resveratrol, o *trans*-piceidio (SALES; RESURRECCION, 2009), o isopentenilresveratrol (KU et al., 2005), o piceatanol, o araquidin-1, o araquidin-2, o araquidin-3 e o *trans*-SB-1 (SOBOLEV et al., 2009) (Figura 5).

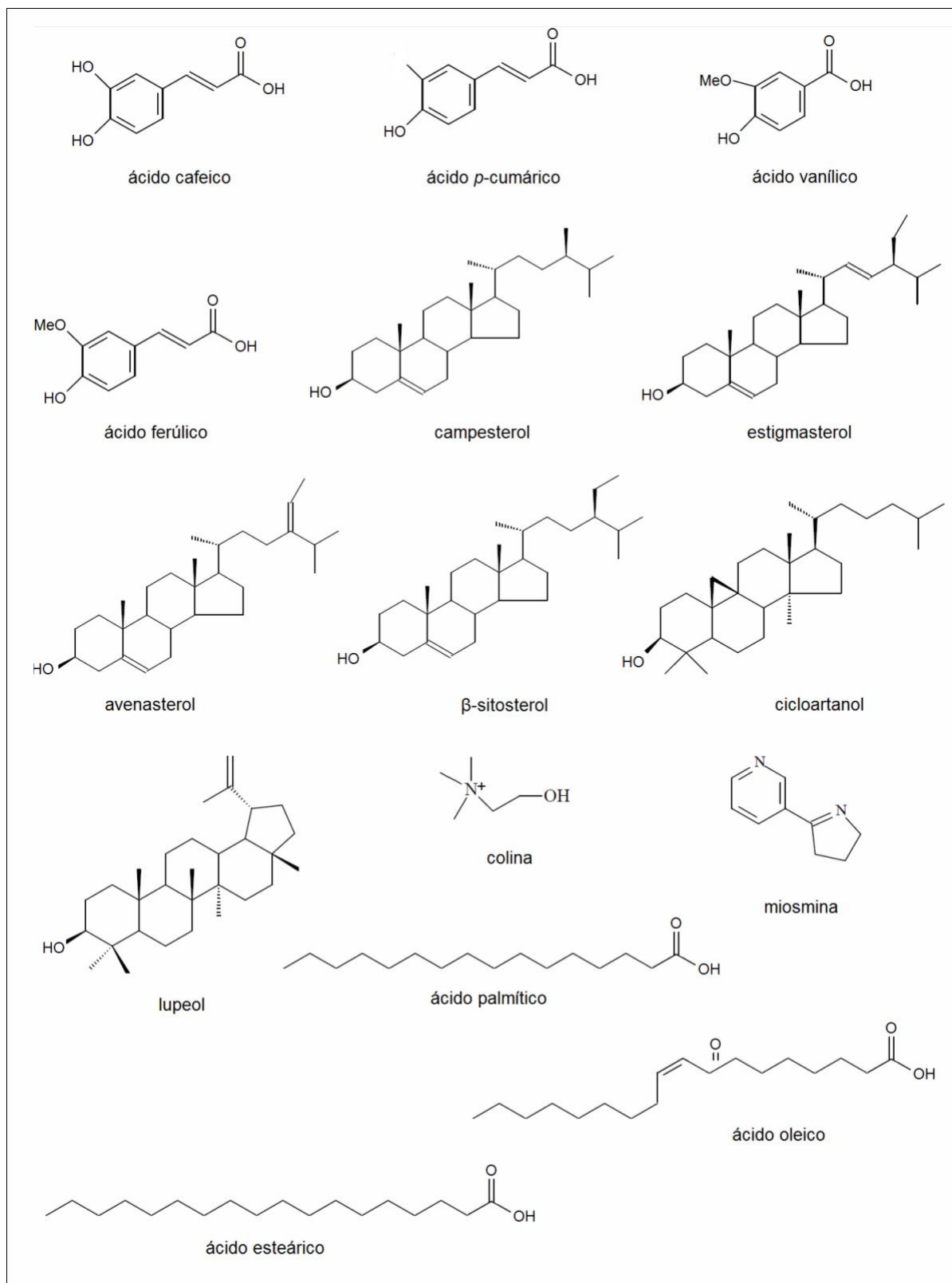
Figura 5 – Principais estilbenos encontrados em *A. hypogaea*.

Um dos grupos de metabólitos especiais mais encontrados no Reino Plantae são os flavonoides e seus derivados. Possuem propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e anticarcinogênicas, entre outras (HARBORNE et al., 1975). Diferentes flavonoides já foram isolados a partir de órgãos do amendoim, incluindo a diidroxicromona, o eriodictiol e a luteolina, na vagem (PENDSE et al., 1973; LEE et al., 2008), a isoramnetina glicosídica, no tegumento (LOU et al., 2001) e a isomedicarpina, nas partes aéreas (LIU et al., 2009).

Além dos estilbenos, outros fenilpropanoides como os ácidos cafeico, *p*-cumárico, ferúlico e vanílico (Figura 6) já foram estudados dentro do gênero *Arachis* e são associados a diversos processos antioxidantes do metabolismo humano (LEE et al., 2008). Vários tipos de fitoesteróis, substâncias estruturalmente análogos ao colesterol e que não são produzidos por mamíferos, também já foram identificados na manteiga e no óleo do amendoim (FRANCISCO; RESURRECCION, 2008). O campesterol, o estigmasterol e o avenasterol (Figura 6) são os fitoesteróis mais comuns. O  $\beta$ -sitosterol (Figura 6) é mais encontrado em *A. hypogaea*, estando presente também em espécies silvestres do gênero (GROSSO et al., 2000; PHILLIPS et al., 2005).

Outros grupos de metabólitos especiais já foram detectados, em concentrações menores, em diferentes partes de plantas do gênero *Arachis*: i) triterpenos (GAYDOU et al., 1983); ii) alcaloides, como a colina e a miosmina (MOLL, 1961; ZWICKENPFLUG et al., 1998), e iii) ácidos graxos, como o palmítico, o esteárico e o oleico (CARRÍN; CARELLI, 2010; WANG et al., 2010) (Figura 5).

Figura 6 – Metabólitos especiais já identificados em espécies do gênero *Arachis*.





A produção de metabólitos especiais por plantas na natureza pode apresentar variações na qualidade e no tipo de substâncias, que são influenciados por diferentes parâmetros, tais como a fase do ciclo, o clima, o estado fitossanitário e a estação de coleta (ABDIN et al., 2003). O desenvolvimento de técnicas de cultivo *in vitro* permite contornar essas questões, tendo em vista que as condições de cultivo são totalmente controladas e não influenciadas por fatores climáticos. Para as plantas medicinais esse fato é de extrema importância, pois permite direcionar a produção de determinados metabólitos, conforme o interesse (NASIM et al., 2010).

Neste trabalho, inicialmente são mostrados os resultados referentes à avaliação de diferentes condições de luz e temperatura para a indução de calos friáveis. Posteriormente, os materiais produzidos *in vitro*, assim como plantas cultivadas *in vivo*, foram avaliados quanto à atividade alelopática e atividade antitumoral. Esses materiais também foram objeto de estudos fitoquímicos com foco na avaliação da produção de *trans*-resveratrol.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Realizar a análise fitoquímica e a avaliação de atividades biológicas de materiais obtidos *in vivo* e *in vitro* de cinco cultivares brasileiras de *Arachis hypogaea* (IAC 886, IAC Caiapó, IAC Tatu ST, IAC 8112 e BR-1).

### 2.2 Objetivos específicos

- Avaliar o efeito da suplementação com fitorregulador, do tipo de explante, da temperatura e da qualidade de luz na indução de calogênese;
- Avaliar a atividade alelopática de materiais obtidos *in vivo* e *in vitro* pelos testes *in vitro* de inibição de germinação e crescimento;
- Avaliar a atividade antitumoral de materiais obtidos *in vivo* e *in vitro* pelo teste de MTT em linhagens de células K562, PC3, MCF-7 e A549;
- Realizar a análise qualitativa e quantitativa de estilbenos, tendo como substância alvo o *trans*-resveratrol.

### 3 CULTURA DE TECIDOS

#### 3.1 Introdução

A cultura de tecidos vegetais é realizada a partir de pequenos fragmentos (explantes), que são isolados da planta doadora, desinfetados e cultivados sob condições assépticas, podendo assim gerar outros tecidos vegetais, que não o de origem. A técnica mais utilizada na cultura de tecidos vegetais é a micropropagação, que possui esse nome devido ao tamanho dos propágulos utilizados. O objetivo principal da micropropagação é a obtenção de novos indivíduos, com genótipos idênticos à planta matriz (TORRES et al., 2000)

Existem três vias de micropropagação: i) proliferação a partir de meristemas apicais e gemas axilares, dos quais são retirados os primórdios foliares e ocorre o surgimento de um único broto; ii) organogênese, que é o surgimento e a proliferação de gemas a partir de tecidos diferenciados e iii) embriogênese somática, que é o processo de formação de embriões a partir de células somáticas. Tanto a organogênese como a embriogênese podem ocorrer de duas maneiras: diretamente a partir do explante ou de forma indireta, que inclui uma fase intermediária constituída pela formação de massas celulares desorganizadas, denominadas calos (GEORGE et al., 2008) (Figura 7).

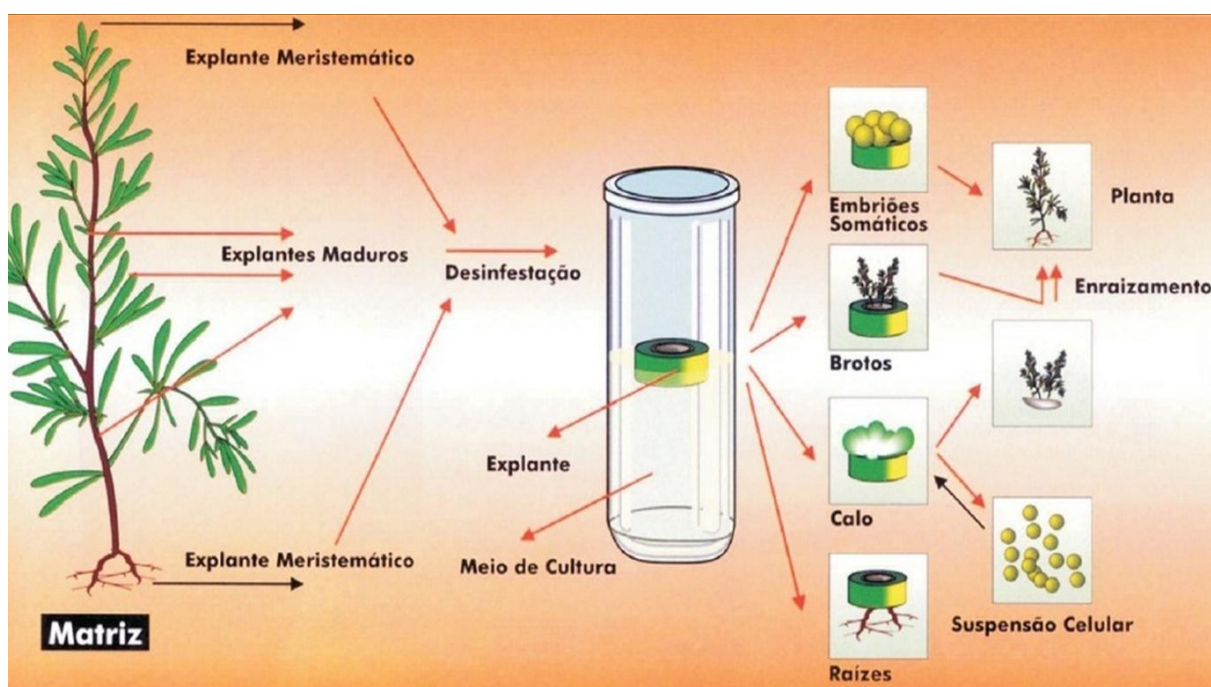
Os calos obtidos *in vitro* podem ser compactos, quando as células estão muito aderidas entre si, ou friáveis, quando o grau de adesão é reduzido. Podem ser multiplicados através de sucessivas subculturas, em meio semissólido ou em células em suspensão. Diante da busca por métodos que permitam otimizar a produção de metabólitos especiais para fins medicinais ou industriais, o cultivo dos calos friáveis é uma alternativa bastante viável para esse fim. A maior parte desses calos produz mais metabólitos durante a fase de desaceleração do crescimento, sendo que certas substâncias produzidas podem não estar presentes na própria planta (FLORES; MEDINA-BOLÍVAR, 1995).

Outro sistema bastante utilizado para a obtenção de metabólitos especiais é a cultura de raízes em cabeleira (“hairy root culture”). Resumidamente, bactérias da espécie *Agrobacterium rhizogenes*, que contêm plasmídeos indutores de raízes

(plasmídeos Ri), infectam raízes de dicotiledôneas e algumas plantas monocotiledôneas, fazendo com que elas produzam opinas (octopina, agropina, nopalina, manopina e cucumopina), que são aminoácidos incomuns. Essas opinas são utilizados pela bactéria como fonte de energia, e ela passa a crescer anormalmente. As raízes transformadas são morfologicamente diferentes das raízes comuns, na medida em que elas apresentam um crescimento meristemático lateral intenso, o que as levará a uma maior biomassa (KORDE et al., 2016). Em várias espécies, esse sistema provou ser bastante eficiente devido à sua estabilidade genética e bioquímica, rápido crescimento e altas taxas de metabólitos produzidos (KIM et al., 2008).

As vantagens do uso da cultura de tecidos para a produção de metabólitos especiais são: i) possibilidade de eliminação da influência de fatores ambientais que afetam a produção de metabólitos especiais; ii) seleção de genótipos com produções mais elevadas e iii) possibilidade do uso de agentes eliciadores. A produção de metabólitos já foi analisada em diferentes sistemas de cultura de tecidos, principalmente cultura de calos e de células em suspensão (JHA et al., 1998; ABDIN et al., 2003; KARUPPUSAMY, 2009; JUNAID et al., 2009).

Figura 7 – Sistemas de regeneração da cultura de tecidos.



Fonte: KERBAUY, 1997.

No cultivo *in vitro*, os explantes são mantidos sob condições controladas de temperatura e luz, que podem variar conforme a espécie. A temperatura é um fator importante, já que influencia o crescimento celular, o desenvolvimento dos órgãos e as atividades enzimáticas, tanto *in vivo* como *in vitro*. Além disso, também afeta as vias morfogênicas, pois boa parte das plantas mantém suas atividades metabólicas normais somente em temperaturas específicas. Outro fator de grande relevância é a luz, que age diretamente sobre a produção primária da planta, principalmente através da ativação de enzimas fotossintéticas. Nesse sentido, fatores como o fotoperíodo e a intensidade luminosa são muito importantes (HUGHES, 1981).

As câmaras de cultivo de material vegetal *in vitro* utilizam, em sua maioria, lâmpadas fluorescentes. Entretanto, a utilização de diodos emissores de luz (LEDs) vem sendo adotada por um número crescente de laboratórios de pesquisa. Inventado na década de 1960, o LED é um tipo único de semicondutor de estado sólido que emite luz quando a corrente elétrica é aplicada através do dispositivo. Dois elementos (anodo e catodo) são colocados em contato direto formando o chip de LED e, quando uma corrente de elétrons flui de um lado para o outro, ocorre liberação de energia sob a forma de fótons de luz visível (GUPTA; JATOTHU, 2013).

As principais desvantagens dos LEDs quando comparados com a luz fluorescente, são os custos iniciais elevados e a impossibilidade de troca de somente um elemento individual em uma lâmpada (GUPTA; JATOTHU, 2013). Entretanto, essas desvantagens são compensadas pelo baixo consumo de energia, especificidade de comprimento de onda, possibilidade de ajuste da intensidade de luz, variabilidade de cores, baixa produção de energia térmica e longa vida útil (BULA et al., 1991; HOENECKE et al., 1992; OKAMOTO et al., 1997).

Desde o final do século XX, melhorias significativas no crescimento e na morfogênese *in vitro* de diversas espécies vegetais têm sido obtidas em resposta a LEDs de diferentes cores (WU; LIN, 2012). Por exemplo, o LED vermelho foi mais eficiente que o LED azul na obtenção de brotos e calos a partir de explantes de pimentão (*Capsicum annum*) (BROWN et al., 1995), batata (*Solanum tuberosum*) (JAO; FANG, 2004), pinheiro (*Pinus* sp) (MERKLE et al., 2005) e antúrio (*Anthurium andreaeanum*) (BUDIARTO, 2010). Ao contrário, o LED azul, quando comparado ao LED vermelho, induziu maior produção de brotos a partir de sementes de trigo (*Triticum aestivum*) (GOINS et al., 1997). A associação dos LEDs azul e vermelho teve maior eficiência do que os dois tipos utilizados isoladamente e do que a luz

fluorescente na obtenção de plântulas a partir de brotos de banana (*Musa* sp.) (NHUT et al., 2000), lírio (*Lilium hybrid*) (LIAN et al., 2002), uva (*Vitis vinifera*) (POUDEL et al., 2008) e orquídea (*Doritaenopsis* sp.) (SHIN et al., 2008). O LED branco proporcionou um aumento de 64% na organogênese a partir de protocormos (estrutura a partir da qual se formam os sistemas radicular e caulinar) de orquídea (*Dendrobium kingianum*), ao contrário do que foi observado sob associação de LED azul e vermelho (HABIBA et al., 2014).

### 3.1.1 Cultura de tecidos de *Arachis*

Nos últimos anos, a cultura de tecidos de *A. hypogaea* foi bastante investigada, tendo sido obtidos sistemas de regeneração com o uso de diferentes genótipos, explantes e fitorreguladores. A indução de organogênese nesta espécie se mostra eficiente em resposta a citocininas isoladas, tais como BAP (6-benzilaminopurina) e TDZ (thidiazuron), ou utilizada em combinação com auxinas.

A organogênese já foi descrita a partir de eixos embrionários (MCKENTLY, 1990; MORRIS et al., 1995; RADHAKRISHNAN et al., 2000), cotilédones (MCKENTLY, 1990; PESTANA et al., 1999; RADHAKRISHNAN et al., 2000), folíolos (MCKENTLY, 1991b; SARKER; ISLAM, 2000; JOSHI et al., 2003), anteras (BAJAJ et al., 1980; WILLCOX et al., 1991; BERA; BHATT, 2008) e folhas (MROGINSKI et al., 1981; GILL; SAXENA, 1992; CHENGALRAYAN et al., 1995; RANI; REDDY, 1999).

A embriogênese somática também foi obtida em estudos com eixos embrionários (SELLARS et al., 1990; EAPEN; GEORGE, 1993b; RANI et al., 2005), cotilédones (GILL; SAXENA, 1992; OZIAS-AKINS, 1992; BAKER; WETZSTEIN, 1995), folíolos (BAKER; WETZSTEIN, 1992; CHENGALRAYAN et al., 1994; BAKER; WETZSTEIN, 1998) e folhas (GILL; SAXENA, 1992; CHENGALRAYAN et al., 1994; MHASKE et al., 1998; CHENGALRAYAN et al., 2001), utilizando-se auxinas isoladas ou em combinação com citocininas.

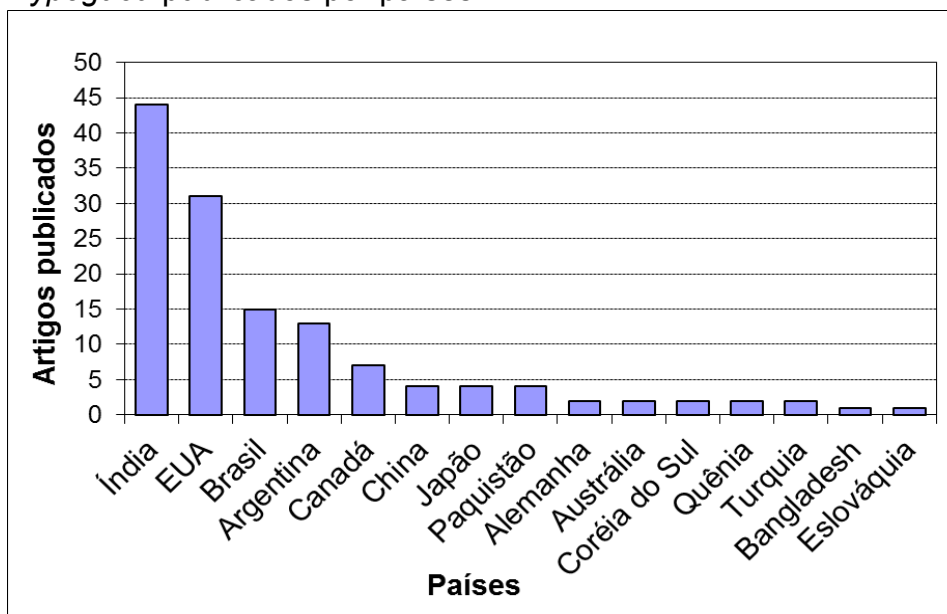
Para as espécies silvestres do gênero, também foram obtidas diferentes vias regenerativas, com o objetivo principal de preservar e aumentar a disponibilidade de germoplasma para utilização em programas de melhoramento. A organogênese foi obtida a partir de cotilédones em meio contendo BAP (GAGLIARDI et al., 2000) e

BAP com ANA (ácido 1-naftalenoacético) (MANSUR et al., 1993), em espécies da seção *Extranervosae*. Pacheco et al. (2007b) obtiveram organogênese direta a partir de eixos embrionários, folíolos e cotilédones de 17 espécies. Utilizando o mesmo explante, mas com espécies da seção *Arachis*, também foi observada organogênese em meios suplementados com BAP e AIA (RANI; REDDY, 1996). A produção de brotos em espécies da seção *Extranervosae* foi também obtida a partir de eixos embrionários na presença de BAP (GAGLIARDI et al., 2000) e de segmentos nodais, em resposta a baixas concentrações de ANA (GAGLIARDI et al., 2002). Adicionalmente, o processo foi induzido em folíolos da seção *Arachis* na presença de ANA e BAP, utilizados separadamente ou em associação (MCKENTLY, 1991b; MANSUR et al., 1993; REY et al., 2000) e TDZ (MROGINSKI et al., 2004).

A embriogênese somática em espécies silvestres de *Arachis* foi obtida em resposta à combinação de PIC e BAP, incluindo folhas de *A. pintoi* (REY et al., 2000) e *A. glabrata* (VIDOZ et al., 2004) e gemas apicais e folíolos de *A. correntina* (VIDOZ et al., 2006). A mesma resposta foi induzida por BAP em eixos e folíolos de *A. archeri*, *A. porphyrocalix* (seção *Erectoides*) e *A. appressipila* (seção *Procumbentes*) (PACHECO et al., 2007b).

Instituições de pesquisa da Índia e dos Estados Unidos possuem o maior número de trabalhos envolvendo cultura de tecidos no gênero *Arachis*. Alguns países asiáticos (Bangladesh, China, Coreia do Sul, Japão e Paquistão), europeus (Alemanha, Eslováquia e Turquia), além de Quênia e Austrália, também possuem ao menos uma publicação relacionada ao tema (Figura 8). No Brasil, 3º colocado, o Núcleo de Biotecnologia Vegetal (NBV) da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, tem contribuído significativamente na área, com estudos sobre cultura de tecidos (MANSUR et al., 1993; GAGLIARDI et al., 2000; GAGLIARDI et al., 2002; PACHECO et al., 2007; PACHECO et al., 2007b; PACHECO et al., 2008), variação somaclonal (GAGLIARDI et al., 2004; GAGLIARDI et al., 2007; PACHECO et al., 2008b), conservação *in vitro* (GAGLIARDI et al., 2002b; GAGLIARDI et al., 2003; PACHECO et al., 2006) e fitoquímica (ARAÚJO, 2011; GARCIA, 2012; CASIMIRO, 2013) de espécies do gênero. O Quadro 2 apresenta um levantamento em ordem cronológica dos mais de 130 trabalhos publicados sobre cultura de tecidos de espécies do gênero *Arachis*.

Figura 8 – Quantidade de artigos sobre cultura de tecidos em *A. hypogaea* publicados por países.





Quadro 2 – Cultura de tecidos de espécies do gênero *Arachis* (continua).

Referência	Espécies	Explantos	Fitorreguladores	Sistemas
RUSSO; VARNELL, 1978	<i>A. hypogaea</i>	Gema apical	2,4D + KIN	Organogênese
MROGINSKI; FERNANDEZ, 1979	<i>A. villosa</i> e <i>A. correntina</i>	Antera	ANA + BAP	Organogênese indireta
MROGINSKI; FERNANDEZ, 1980	<i>A. lignosa</i>	Antera	ANA + BAP	Indução de calos
BAJAJ et al., 1980	<i>A. hypogaea</i> e <i>A. glabrata</i>	Antera	ANA + BAP	Organogênese
MROGINSKI et al., 1981	<i>A. hypogaea</i>	Folha	ANA + BAP	Organogênese indireta
BAJAJ et al., 1981	<i>A. hypogaea</i> e <i>A. villosa</i>	Antera	AIA; ANA+ BAP e KIN	Organogênese
SASTRI et al., 1981	<i>A. hypogaea</i>	Cotilédone e eixo	BAP + ANA	Organogênese
ROLFS et al., 1981	<i>A. hypogaea</i>	Cotilédone	2,4D	Cultura de calos
NARASIMHULU; REDDY, 1983	<i>A. hypogaea</i>	Cotilédone, hipocótilo e eixo	BAP + ANA	Organogênese
PITTMAN et al., 1983	Várias espécies silvestres	Folha	BAP + ANA	Organogênese
PITTMAN et al., 1984	<i>A. villosulicarpa</i>	Folha	BAP + ANA	Organogênese
ATREYA et al., 1984	<i>A. hypogaea</i>	Eixo e cotilédone	ANA + BAP	Organogênese
BURTNIK; MROGINSKY, 1985	<i>A. pintoii</i>	Folha	BAP + ANA	Organogênese indireta
BATHIA et al., 1985	<i>A. hypogaea</i>	Cotilédone desembrionado	BAP + ANA	Organogênese
ILAHÍ; AMEEN, 1986	<i>A. hypogaea</i>	Hipocótilo	BAP + ANA	Organogênese
JOHNSON; PITTMAN, 1986	<i>A. villosulicarpa</i>	Segmento foliar	BAP + ANA	Organogênese
STILL et al., 1987	<i>A. paraguariensis</i>	Estame	BAP + PIC	Organogênese
SEITZ et al., 1987	<i>A. hypogaea</i>	Folíolo embrionário	BAP + ANA	Organogênese indireta
ROLFS et al., 1987	<i>A. hypogaea</i>	Cotilédone	2,4D	Cultura de células em suspensão
PRADO et al., 1988	<i>A. major</i>	Antera	BAP + ANA	Indução de calos
HAZRA et al., 1989	<i>A. hypogaea</i>	Eixo embrionário	2,4D	Embriogênese direta
CHEN et al., 1990	<i>A. hypogaea</i> e <i>A. villosulicarpa</i>	Gema apical	BAP + ANA	Organogênese
SELLARS et al., 1990	<i>A. hypogaea</i> e <i>A. paraguariensis</i>	Cotilédone e eixo	PIC	Embriogênese
MCKENTLY, 1990	<i>A. hypogaea</i>	Cotilédone e eixo	BAP	Organogênese
MCKENTLY, 1991	<i>A. hypogaea</i>	Eixo	PIC	Embriogênese
MCKENTLY, 1991b	<i>A. glabrata</i>	Folha	BAP + ANA	Organogênese

Quadro 2 – Cultura de tecidos de espécies do gênero *Arachis* (continua).

Referência	Espécies	Explantes	Fitorreguladores	Sistemas
DAIMON; MII, 1991	<i>A. hypogaea</i>	Nó cotiledonar	ANA + BAP	Organogênese indireta
WILLCOX et al., 1991	<i>A. hypogaea</i>	Anteras	BAP + ANA	Organogênese
SAXENA et al., 1992	<i>A. hypogaea</i>	Cotilédone	TDZ	Embriogênese somática
GILL; SAXENA, 1992	<i>A. hypogaea</i>	Folha e Cotilédone	BAP e TDZ	Embriogênese e Organogênese
CHENG et al., 1992	<i>A. hypogaea</i>	Pecíolo e epicótilo	BAP + ANA	Organogênese
OZIAS-AKINS et al., 1992	<i>A. hypogaea</i>	Cotilédone e eixo embrionário	PIC + BAP	Embriogênese
DUNBAR; PITTMAN, 1992	<i>A. burkartii</i> , <i>A. lignosa</i> , <i>A. paraguariensis</i> , <i>A. repens</i> , <i>A. rigonii</i> , <i>A. tuberosa</i> , <i>A. villosa</i> e <i>A. villosulicarpa</i>	Folha	ANA+BAP	Organogênese
DURHAM; PARROT, 1992	<i>A. hypogaea</i>	Cotilédone	2,4D	Embriogênese somática
EAPEN; GEORGE, 1993	<i>A. hypogaea</i>	Folha	AIA + BAP	Organogênese
MANSUR et al., 1993	<i>A. villosulicarpa</i>	Folha e cotilédone	PIC + BAP	Células em suspensão
LI et al., 1993	<i>A. paraguariensis</i>	Folha	BAP + ANA	Organogênese indireta
LI et al., 1994	<i>A. hypogaea</i>	Cotilédone e eixo embrionário	TDZ	Organogênese
KANYAND et al., 1994	<i>A. hypogaea</i>	Hipocótilo e cotilédone	TDZ	Organogênese
BRAR et al., 1994	<i>A. hypogaea</i>	Eixo embrionário	BAP + ANA	Organogênese
CHENGALRAYAN et al., 1994	<i>A. hypogaea</i>	Folha	2,4D	Embriogênese indireta
CHENGALRAYAN et al., 1995	<i>A. hypogaea</i>	Folha	ANA + BAP e 2,4D	Embriogênese Organogênese
LIVINGSTONE; BIRCH, 1995	<i>A. hypogaea</i>	Folíolo embrionário	BAP + ANA	Organogênese indireta
ILAHÍ et al., 1995	<i>A. hypogaea</i>	Eixo	2,4D, KIN, BAP e ANA	Organogênese
MURTHY et al., 1995	<i>A. hypogaea</i>	Seedlings	TDZ	Embriogênese somática
BAKER; WETZSTEIN, 1995	<i>A. hypogaea</i>	Cotilédone	2,4D	Embriogênese
MORRIS et al., 1995	<i>A. hypogaea</i>	Eixo embrionário	BAP + ANA	Organogênese
MCKENTLY, 1995	<i>A. hypogaea</i>	Eixo	PIC	Embriogênese
GUPTA; SINGHAL, 1996	<i>A. hypogaea</i>	Calos	ABA	Cultura de calos
RANI; REDDY, 1996	<i>A. hypogaea</i>	Cotilédone	BAP + AIA	Organogênese direta

Quadro 2 – Cultura de tecidos de espécies do gênero *Arachis* (continua).

Referência	Espécies	Explantos	Fitorreguladores	Sistemas
FENG et al., 1996	<i>A. hypogaea</i> , <i>A. glandulifera</i> , <i>A. duranensis</i> , <i>A. batizocoi</i> e <i>A. valida</i>	Gema apical	ANA, GA <sub>3</sub> e BAP	Organogênese
VENKATACHALAM; JAYABALAN, 1996	<i>A. hypogaea</i>	Protoplastos de folíolos	2,4D + BAP e ANA + BAP	Cultura de calos e Embriogênese
VENKATACHALAM; JAYABALAN, 1996b	<i>A. hypogaea</i>	Cotilédone, eixo e hipocótilo	ANA ou AIA + KIN	Organogênese
VENKATACHALAM et al., 1997	<i>A. hypogaea</i>	Hipocótilo	2,4D + BAP	Embriogênese indireta
VENKATACHALAM; JAYABALAN, 1997	<i>A. hypogaea</i>	Cotilédone e nó cotiledonar	BAP + IBA	Organogênese indireta
CHENGALRAYAN et al., 1997	<i>A. hypogaea</i>	Folíolo embrionário	2,4D	Embriogênese indireta
MHASKE et al., 1998	<i>A. hypogaea</i>	Folha	2,4D	Embriogênese
PONSAMUEL et al., 1998	<i>A. hypogaea</i>	Eixo embrionário e folíolo	BAP + ANA	Organogênese
BAKER; WETZSTEIN, 1998	<i>A. hypogaea</i>	Folíolo	2,4D + KIN	Embriogênese
VENKATACHALAM et al., 1998	<i>A. hypogaea</i>	Folha	2,4D, ANA e BAP	Cultura de células em suspensão
VENKATACHALAM et al., 1999	<i>A. hypogaea</i>	Cotilédone	ANA + BAP	Embriogênese direta
VENKATACHALAM et al., 1999b	<i>A. hypogaea</i>	Folha	ANA + KIN	Organogênese indireta
PESTANA et al., 1999	<i>A. hypogaea</i>	Cotilédone	BAP	Organogênese direta
RADHAKRISHNAN et al., 1999	<i>A. stenosperma</i> e <i>A. otavioi</i>	Ápice caulinar	BAP + ANA	Amplificação meristemática
RANI; REDDY, 1999	<i>A. hypogaea</i>	Folha	BAP + AIA	Organogênese direta
VICTOR et al., 1999	<i>A. hypogaea</i>	Cotilédone	BAP e TDZ	Embriogênese Organogênese
VICTOR et al., 1999b	<i>A. hypogaea</i>	Semente	TDZ	Embriogênese somática
MURCH et al., 1999	<i>A. hypogaea</i>	Semente	TDZ	Embriogênese somática
GILL; OZIAS-AKINS, 1999	<i>A. hypogaea</i>	Cotilédone e eixo embrionário	TDZ	Organogênese
REY et al., 2000	<i>A. pintoii</i>	Folha	PIC + BAP	Embriogênese indireta
CUCCO; JAUME, 2000	<i>A. hypogaea</i>	Cotilédone, epicótilo e folíolo	2,4D	Embriogênese indireta
AKASAKA et al., 2000	<i>A. hypogaea</i>	Segmento foliar	TDZ	Organogênese
LITTLE et al., 2000	<i>A. hypogaea</i>	Epicótilo	PIC, Dicamba ou Centrofenoxina	Embriogênese somática
VENKATACHALAM et al., 2000	<i>A. hypogaea</i>	Cotilédone	ANA + BAP	Embriogênese

Quadro 2 – Cultura de tecidos de espécies do gênero *Arachis* (continua).

Referência	Espécies	Explantes	Fitorreguladores	Sistemas
GAGLIARDI et al., 2000	<i>A. villosulicarpa</i> , <i>A. macedoi</i> , <i>A. retusa</i> , <i>A. burchellii</i> , <i>A. pietrarella</i> e <i>A. prostrata</i> ,	Cotilédone e eixo embrionário	BAP	Organogênese direta
CHENGALRAYAN et al., 2001	<i>A. hypogaea</i>	Folha	2,4D	Embriogênese
HLINKOVA, 2001	<i>A. hypogaea</i>	Hipocótilo	BAP	Organogênese
GAGLIARDI et al., 2002a	<i>A. retusa</i> , <i>A. macedoi</i> e <i>A. burchellii</i>	Gema apical e segmento nodal	ANA e BAP	Amplificação meristemática
LAXMI; GIRI, 2003	<i>A. stenosperma</i> e <i>A. villosa</i>	Cotilédone e eixo	BAP + AIA + TDZ	Organogênese
LAXMI; GIRI, 2003b	<i>A. stenosperma</i> , <i>A. duranensis</i> , <i>A. paraguariensis</i> , <i>A. villosa</i> e <i>A. monticola</i>	Cotilédone e eixo	BAP + AIA + TDZ	Organogênese
JOSHI et al., 2003	<i>A. hypogaea</i>	Eixo embrionário	2,4D	Embriogênese
HE; BIN, 2003	<i>A. hypogaea</i>	Epicótilo	ANA + BAP	Organogênese indireta
FURTADO et al., 2003	<i>A. hypogaea</i>	Hipocótilo	BAP + ANA	Organogênese indireta
REY; MROGINSKI, 2003	<i>A. pinto</i>	Nó e ápice caulinar	ANA + BAP	Desenvolvimento de meristemas
VIDOZ et al., 2004	<i>A. glabrata</i>	Folha	PIC	Embriogênese indireta
MROGINSKI et al., 2004	<i>A. correntina</i>	Folha	TDZ	Organogênese indireta
VASANTH et al., 2004	<i>A. hypogaea</i>	Eixo embrionário	BAP + ANA	Organogênese
OZUDOGRU et al., 2004	<i>A. hypogaea</i>	Gema apical	ANA e BAP	Organogênese
RANI et al., 2005	<i>A. hypogaea</i>	Eixo embrionário	2,4D	Embriogênese direta
OZUDOGRU et al., 2005	<i>A. hypogaea</i>	Gema apical	BAP + ANA	Organogênese
REY; MROGINSKI, 2006	<i>A. pinto</i>	Folíolo	PIC + BAP	Embriogênese indireta
VIDOZ et al., 2006	<i>A. correntina</i>	Gema apical e folíolo	PIC	Embriogênese
MATHUSAMY et al., 2007	<i>A. hypogaea</i>	Hipocótilo	2,4D + BAP	Embriogênese
BANERJEE et al., 2007	<i>A. hypogaea</i>	Nó	BAP	Organogênese indireta
KANYAND; PRAKASH, 2007	<i>A. hypogaea</i>	Eixo embrionário	TDZ	Organogênese
FURTADO et al., 2007	<i>A. hypogaea</i>	Hipocótilo e gema cotiledonar	BAP, TDZ e KIN	Organogênese indireta
PACHECO et al., 2007 <sup>a</sup>	<i>A. archeri</i> , <i>A. porphyrocalix</i> e <i>A. appressipila</i>	Eixo e folíolo	BAP	Embriogênese indireta

Quadro 2 – Cultura de tecidos de espécies do gênero *Arachis* (continua).

Referência	Espécies	Explantos	Fitorreguladores	Sistemas
PACHECO et al., 2007b	17 espécies silvestres	Eixo embrionário, folíolo e cotilédone	BAP	Organogênese direta
PACHECO et al., 2008	<i>A. stenosperma</i>	Eixo embrionário, folíolo e cotilédone	BAP	Organogênese indireta
BERA; BHATT, 2008	<i>A. hypogaea</i> e espécies silvestres	Antera	ANA + BAP	Organogênese
JOSHI et al., 2008	<i>A. hypogaea</i>	Eixo embrionário	2,4D	Embriogênese
TIWARI; TULI, 2008	<i>A. hypogaea</i>	Cotilédone desembrionado	2,4D + BAP	Organogênese
FONTANA et al., 2009	<i>A. villosa</i>	Folha	BAP + TDZ	Organogênese
RANI et al., 2009	<i>A. hypogaea</i>	Eixo embrionário	2,4D	Embriogênese direta
SINGH; HAZRA, 2009	<i>A. hypogaea</i>	Porção final da plúmula	2,4D	Organogênese e Embriogênese
SHAN et al., 2009	<i>A. hypogaea</i>	Epicótilo e eixo embrionário	BAP + GA <sub>3</sub>	Organogênese indireta
TIWARI; TULI, 2009	<i>A. hypogaea</i>	Folha imatura	BAP + ANA	Organogênese
SRINIVASAN et al., 2010	<i>A. diogoi</i> , <i>A. stenosperma</i> , <i>A. duranensis</i> , <i>A. cardenasii</i> e <i>A. correntina</i>	Nó cotiledonar	BAP + ANA	Organogênese
MAINA et al., 2010	<i>A. hypogaea</i>	Cotilédone	BAP e 2,4D	Organogênese
MAINA, 2011	<i>A. hypogaea</i>	Cotilédone	BAP e 2,4D	Organogênese
ROBINSON et al., 2011	<i>A. hypogaea</i>	Cotilédone	2,4D + KIN	Embriogênese
NAZIR et al., 2011	<i>A. hypogaea</i>	Cotilédone desembrionado	BAP + ANA	Organogênese
IQBAL et al., 2011	<i>A. hypogaea</i>	Nó cotiledonar	PIC	Embriogênese
GENG et al., 2011	<i>A. hypogaea</i>	Folíolo	ANA + TDZ	Organogênese
ABDULMALIK et al., 2012	<i>A. hypogaea</i>	Microbrotos	ANA	Organogênese
CASTRO et al., 2012	<i>A. hypogaea</i>	Eixo embrionário	BAP	Organogênese
AINA et al., 2012	<i>A. paraguariensis</i>	Semente fragmentada	TDZ + 2ip	Organogênese
AINA et al., 2012b	<i>A. paraguariensis</i>	Semente fragmentada, calo e gema apical	BAP	Organogênese (tetraploides)
BURNS et al., 2012	<i>A. hypogaea</i>	Cotilédone	BAP	Organogênese
REN et al., 2012	<i>A. hypogaea</i>	Folíolo embrionário	ANA + TDZ	Organogênese
WEI et al., 2012	<i>A. hypogaea</i>	Embrião	BAP + ANA	Organogênese
BANERJEE, 2013	<i>A. hypogaea</i>	Eixo embrionário	BAP, 2,4D e GA <sub>3</sub>	Embriogênese
YADAV et al., 2013	<i>A. hypogaea</i>	Segmento nodal	ANA, BAP, KIN, IBA e 2,4D	Multiplicação <i>in vitro</i>
MATAND et al., 2013	<i>A. hypogaea</i>	Cotilédone e raiz	BAP, 2,4D e TDZ	Organogênese

Quadro 2 – Cultura de tecidos de espécies do gênero *Arachis* (conclusão).

Referência	Espécies	Explantos	Fitorreguladores	Sistemas
ZHANG et al., 2013	<i>A. hypogaea</i>	Folíolo embrionário	ANA + BAP	Organogênese
BERA et al., 2014	<i>A. prostrata</i>	Folha	ANA, 2,4D, PIC, BAP e TDZ	Calogênese

De acordo com os dados levantados, os explantes mais utilizados na cultura de tecidos de espécies do gênero *Arachis* até hoje foram cotilédone, eixo embrionário e folha, provavelmente devido à maior facilidade de obtenção e menor taxa de oxidação. Os sistemas mais utilizados foram organogênese e embriogênese, ambas indiretas, e a multibrotação. Estes também são os mais fáceis de serem obtidos.

Considerando o potencial de uso de sistemas *in vitro* para a produção de metabólitos em *A. hypogaea*, os estudos de cultura de tecidos a partir de explantes das cultivares escolhidas para este trabalho foram conduzidos de modo a produzir calos friáveis. Em estudos anteriores realizados com as mesmas cultivares, explantes inoculados em meios suplementados com o fitorregulador picloram (PIC) mostraram grande capacidade de calogênese (CASIMIRO, 2013).

Nesta parte do trabalho foram avaliados os efeitos da concentração de PIC, temperatura e qualidade de luz, com o objetivo de estabelecer culturas de calos a partir de explantes das cinco cultivares de *A. hypogaea* selecionadas para o trabalho.

## 3.2 Objetivos

### 3.2.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito da concentração do fitorregulador, do tipo de explante, da temperatura e da qualidade de luz na indução de calogênese.

### 3.2.2 Objetivos específicos

- Investigar a influência de três concentrações (1,25; 2,5; e 5  $\mu\text{M}$ ) de picloram na formação de calos friáveis;
- Estudar as diferenças entre quatro tipos de explante (cotilédone, eixo embrionário, folíolo embrionário e segmento foliar) na indução de calogênese;
- Averiguar a influência de duas temperaturas ( $25\pm 2^\circ\text{C}$  e  $30\pm 2^\circ\text{C}$ ) na formação de calos friáveis;
- Verificar as diferenças de cinco tipos de iluminação (luz fluorescente, LED branco, LED azul, LED vermelho e associação de LEDs azul e vermelho) na indução de calogênese;
- Mensurar a acumulação de biomassa nos calos com maior frequência de calogênese.

### 3.3 Material e métodos

#### 3.3.1 Material vegetal

Sementes das cultivares de *A. hypogaea* IAC 886 (Virginia Runner), IAC Caiapó (Virginia Runner), IAC Tatu ST (Valencia) e IAC 8112 (Spanish) foram cedidas pelo Dr. Ignácio José de Godoy, do IAC. Sementes da cv. BR-1 (Valencia) foram cedidas pela EMBRAPA. As sementes foram armazenadas na ausência de luz, em baixa umidade e mantidas a 4°C até sua utilização.

Parte dos lotes de sementes foi semeada em vasos retangulares (40 cm x 20 cm x 15 cm) contendo Plantmax® HA, para a obtenção de plantas. As plantas foram mantidas em casa de vegetação, protegidas por Sombrite®, com redução de 70% de incidência solar. Após 30 dias de cultivo, as plantas foram utilizadas para extração.

#### 3.3.2 Cultura *in vitro*

As sementes foram lavadas três vezes com água e detergente. Depois de enxaguadas com água destilada, foram lavadas com etanol a 70% e imersas em hipoclorito de sódio (NaClO) a 2,0% durante 30 min, sob agitação. Após esse período, foram realizadas três lavagens em água destilada, em câmara de fluxo laminar.

Para o estabelecimento das plantas *in vitro*, os eixos embrionários íntegros foram excisados e inoculados em frascos de 250 mL vedados com tampas em polipropileno, contendo 25 mL de meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) semissólido, sacarose a 3% e solidificado com ágar a 7,5%. O pH do meio foi ajustado para 5,8 antes da esterilização em autoclave (15 min a 121°C e 1,0 atm). As culturas foram mantidas a 25±2°C, sob fotoperíodo de 16h, com intensidade luminosa média de 63  $\mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  fornecida por lâmpadas fluorescentes do tipo branca fria.



Para indução de calogênese, cotilédones, folíolos e eixos embrionários foram excisados de sementes. Segmentos foliares foram excisados das plântulas previamente estabelecidas *in vitro*, 30 dias após a subcultura de meristemas. Os explantes foram inoculados em frascos contendo 25 mL (cinco explantes por frasco) de meio MS suplementado com diferentes concentrações de picloram (1,25; 2,5 e 5 $\mu$ M), com base em resultados anteriores obtidos em estudos para indução de calos (CASIMIRO, 2013). As culturas foram mantidas sob duas temperaturas diferentes (25 $\pm$ 2°C ou 30 $\pm$ 2°C) e a iluminação foi fornecida por lâmpadas fluorescentes do tipo branca fria ou por LED branco ( $\lambda$  = 440 nm), azul ( $\lambda$  = 450 nm), vermelho ( $\lambda$  = 660 nm) ou associação de azul e vermelho ( $\lambda$  = 660 nm). A irradiância de todas as fontes luminosas estava na faixa de 60-70  $\mu$ M.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>. Foi utilizado um número amostral de 30 explantes por tratamento, e os experimentos foram realizados em triplicata.

Após 60 dias de cultivo, a frequência de calogênese e o acúmulo de biomassa, por meio da aferição dos pesos de matéria fresca e seca, foram avaliados. O peso seco foi aferido após a secagem em estufa a 45°C por 48 h.

### 3.3.3 Análise estatística

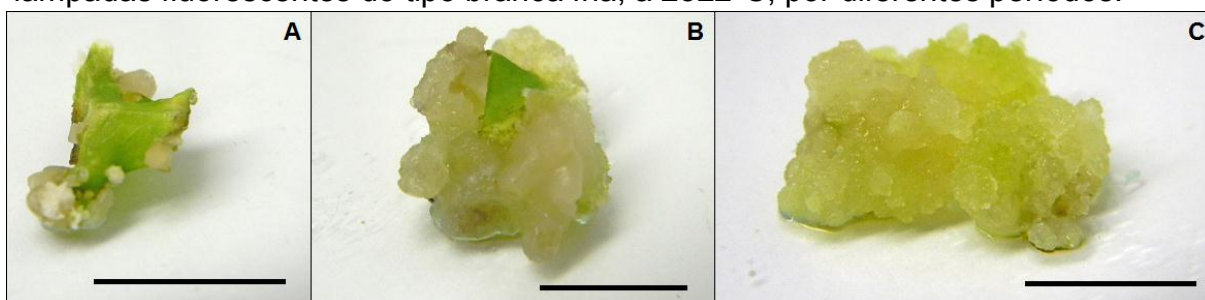
A análise dos dados foi realizada através da análise de variância (ANOVA) e do teste de comparação de Tukey, com o auxílio do programa Graphpad Prism 5<sup>®</sup>. Foram considerados significativos os valores de  $p \leq 0,05$ , tendo sido adotado um intervalo de confiança de 95%.

### 3.4 Resultados

#### 3.4.1 Calogênese induzida sob luz fluorescente

Segmentos foliares foram os explantes mais responsivos (90,0%), principalmente na temperatura de  $25\pm 2^{\circ}\text{C}$  (Tabela 1). A coloração verde-claro também foi bastante intensa quando comparada com os calos obtidos em outros explantes. A produção de calos friáveis foi mais eficiente em resposta à menor concentração de PIC testada ( $1,25\ \mu\text{M}$ ), e as cultivares IAC 886 e BR-1 (Figura 9) foram as mais responsivas (até 90,0%) (Tabela 1).

Figura 9 – Formação de calos friáveis a partir de segmentos foliares de *A. hypogaea*, cv. BR-1, em resposta a PIC a  $1,25\ \mu\text{M}$ . Explantes mantidos sob lâmpadas fluorescentes do tipo branca fria, a  $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ , por diferentes períodos.



Legenda: Após (A) 20 dias; (B) 40 dias; (C) 60 dias.  
Nota: Barra = 1 cm.

Tabela 1 – Frequência de calogênese (%) a partir de diferentes explantes de cinco cultivares de *A. hypogaea* em meio MS suplementado com diferentes concentrações de PIC, após 60 dias de cultura sob luz fluorescente branca fria a 25±2°C e a 30±2°C.

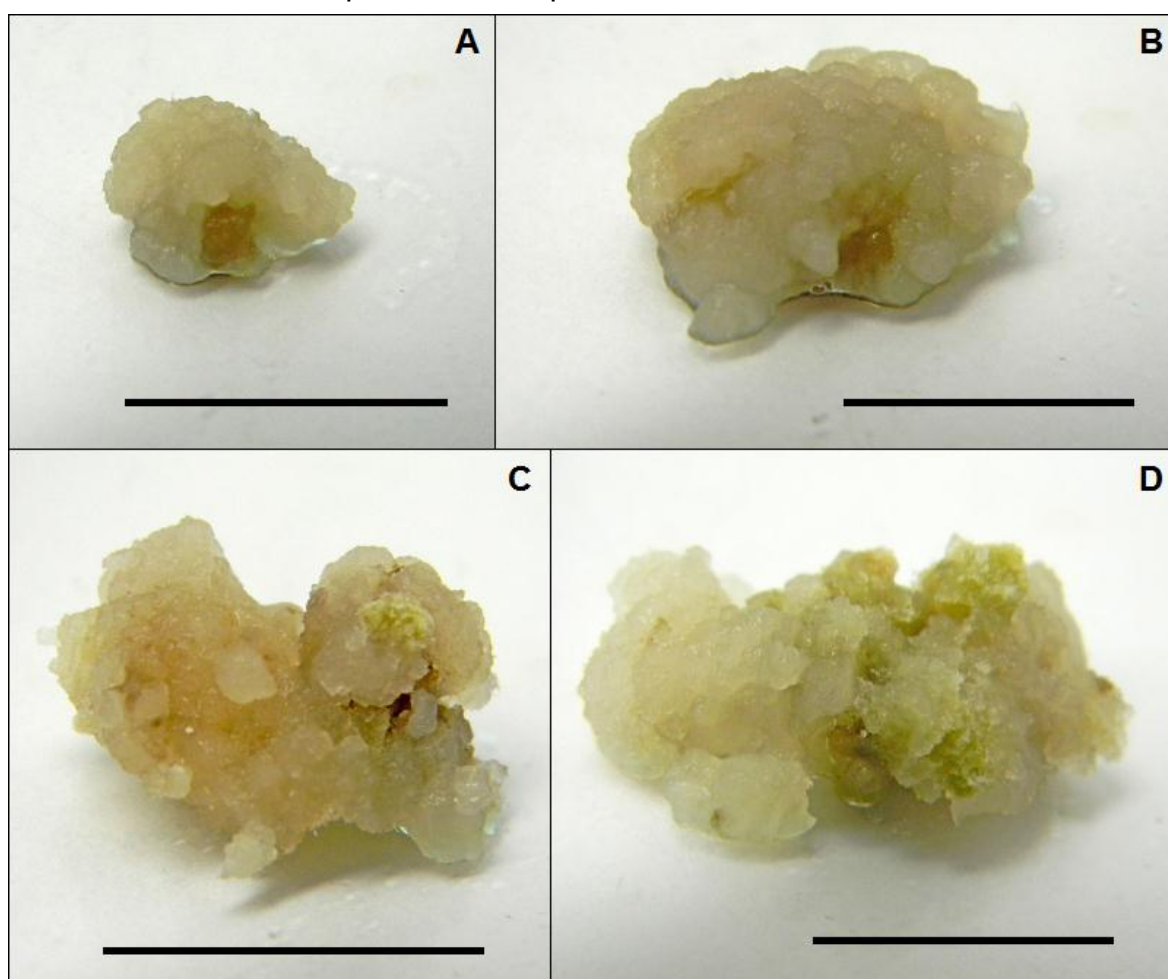
Explante	Concentração de PIC (µM)	IAC 886		IAC Caiapó		IAC Tatu ST		IAC 8112		BR-1	
		25±2°C	30±2°C	25±2°C	30±2°C	25±2°C	30±2°C	25±2°C	30±2°C	25±2°C	30±2°C
Cotilédone	1,25	41,1±9,0	35,6±7,0	27,8±6,5	25,6±5,1	35,6±5,1	32,2±6,5	32,2±8,1	27,8±4,3	42,2±9,4	32,2±8,1
	2,5	32,2±8,1	30,0±6,9	32,2±6,5	22,2±8,1	35,6±7,0	35,6±5,1	30,0±6,9	22,2±6,5	40±6,9	30,0±6,9
	5	37,8±6,5	30,0±4,9	25,6±7,0	20,0±6,9	32,2±8,1	30±4,9	32,2±6,5	25,6±7,0	35,6±7,0	27,8±6,5
Eixo embrionário	1,25	57,8±8,1	50,0±6,9	62,2±6,5	57,8±8,1	55,6±5,1	50,0±6,9	60±6,9	40,0±6,9	65,6±9,8	50,0±4,9
	2,5	55,6±7,0	45,6±7,0	57,8±6,5	55,6±5,1	57,8±8,1	50,0±4,9	52,3±4,3	37,8±6,5	60,0±6,9	47,7±8,1
	5	55,6±7,0	45,6±5,1	57,8±8,1	52,3±4,3	55,6±5,1	45,6±5,1	50,0±6,9	32,2±8,1	55,6±7,0	47,7±6,5
Folíolo embrionário	1,25	68,9±10,2	55,6±5,1	57,8±6,5	55,6±7,0	60±6,9	52,3±4,3	62,2±4,3	57,8±6,5	75,6±5,1	65,6±9,8
	2,5	65,6±9,8	55,6±7,0	62,2±6,5	62,2±4,3	57,8±6,5	50,0±6,9	60±4,9	60±6,9	68,9±10,2	57,8±8,1
	5	65,6±9,8	52,3±4,3	65,6±9,8	65,6±9,8	60±6,9	50,0±4,9	60±4,9	57,8±6,5	65,6±8,6	55,6±5,1
Segmento Foliar	1,25	87,8±4,3*	87,8±4,3*	85,6±8,6*	80,0±4,9*	87,8±4,3*	77,8±4,3*	85,6±8,6*	87,8±4,3*	90,0±4,9*	82,2±6,5*
	2,5	86,7±4,9*	82,3±6,5*	80,0±4,9*	80,0±6,9*	82,2±6,5*	75,6±5,1	80,0±6,9*	85,6±7,1*	87,8±4,3*	77,8±8,1*
	5	80,0±6,9*	76,7±4,9	80,0±4,9*	77,8±8,1*	82,2±4,3*	75,6±5,1	82,2±6,5*	82,2±4,3*	77,8±4,3*	75,6±7,1

Nota: (\*) Valores estatisticamente mais altos em toda a tabela, de acordo com o teste de Tukey (p≤0,05). Número amostral (n) = 90 por tratamento. Frequência de calogênese (%) = Explantes que formaram calos x 100 / 90.

### 3.4.2 Calogênese induzida sob LED branco

De forma similar à calogênese induzida sob luz fluorescente, a maior parte dos calos friáveis induzidos sob LED branco também foi formada a partir de segmentos foliares e na temperatura de  $25\pm 2^\circ\text{C}$ . A calogênese também foi maior em meios suplementados com a concentração mais baixa de PIC ( $1,25\ \mu\text{M}$ ) e as cultivares IAC 886 e BR-1, mais uma vez, foram as que apresentaram maiores percentuais de calogênese (Tabela 2). Entretanto, diferentemente do observado sob luz fluorescente, boa parte dos calos apresentou coloração cinza-claro (Figura 10).

Figura 10 – Formação de calos friáveis a partir de diferentes explantes de *A. hypogaea*, cv. IAC 886, em resposta a PIC a  $1,25\ \mu\text{M}$ . Explantes mantidos sob LED branco, a  $25\pm 2^\circ\text{C}$ , por diferentes períodos.



Legenda: (A) Eixo embrionário após 30 dias de cultura; (B) Eixo embrionário após 60 dias de cultura; (C) Segmento foliar após 30 dias de cultura; (D) Segmento foliar após 60 dias de cultura. Nota: Barra = 1 cm.

Tabela 2 – Frequência de calogênese (%) a partir de diferentes explantes de cinco cultivares de *A. hypogaea* em meio MS suplementado com diferentes concentrações de PIC, após 60 dias de cultura sob LED branco a 25±2°C e a 30±2°C.

Explante	Concentração de PIC (µM)	IAC 886		IAC Caiapó		IAC Tatu ST		IAC 8112		BR-1	
		25±2°C	30±2°C	25±2°C	30±2°C	25±2°C	30±2°C	25±2°C	30±2°C	25±2°C	30±2°C
Cotilédone	1,25	42,2±9,4	30,0±6,9	37,8±6,5	32,2±6,5	32,2±8,1	22,2±6,5	35,6±5,1	35,6±7,0	37,8±6,5	27,8±6,5
	2,5	40±6,9	25,6±5,1	35,6±5,1	32,2±8,1	32,2±6,5	20,0±6,9	32,2±6,5	35,6±5,0	35,6±5,1	25,6±5,1
	5	27,8±4,3	25,6±5,1	35,6±7,0	27,8±6,5	37,8±6,5	20,0±4,9	27,8±6,5	27,8±4,3	35,6±7,0	22,2±6,5
Eixo embrionário	1,25	55,6±7,0	37,8±6,5	45,6±5,1	40,0±6,9	30,0±6,9	30,0±6,9	32,2±8,1	30,0±6,9	47,8±8,1	40,0±4,9
	2,5	52,3±4,3	30,0±6,9	42,2±8,1	40,0±4,9	27,8±6,5	25,6±5,1	32,2±6,5	25,6±5,1	40,0±4,9	40,0±6,9
	5	50,0±6,9	27,8±6,5	42,2±9,4	32,2±8,1	27,8±4,3	25,6±5,1	30,0±6,9	22,2±6,5	37,8±6,5	35,6±5,0
Folíolo embrionário	1,25	52,3±4,3	42,2±9,4	55,6±7,0	42,2±9,4	47,7±8,1	35,6±7,0	45,6±5,1	35,6±5,1	57,8±6,5	45,6±5,1
	2,5	50,0±6,9	37,8±6,5	52,3±4,3	40,0±4,9	47,7±6,5	32,2±6,5	42,2±9,4	32,2±6,5	52,3±4,3	45,6±7,0
	5	50,0±4,9	35,6±5,1	50,0±4,9	37,8±6,5	45,6±7,0	30,0±6,9	42,2±9,4	27,8±6,5	50,0±4,9	40,0±4,9
Segmento Foliar	1,25	85,6±8,6*	70,0±4,9	83,3±4,9*	60,0±6,9	82,2±4,3*	57,8±8,0	80,0±4,9*	66,7±4,9	85,6±7,0*	73,3±6,9
	2,5	82,2±6,5*	70,0±6,9	80,0±6,9*	52,2±4,3	82,2±6,5*	57,8±6,5	75,6±5,1	64,4±11,0	82,2±6,5*	70,0±4,9
	5	82,3±4,3*	66,7±4,9	80,0±4,9*	50,0±6,9	80,0±6,9*	52,2±4,3	72,2±8,1	66,7±8,4	80,0±6,9*	70,0±6,9

Nota: (\*) Valores estatisticamente mais altos em toda a tabela, de acordo com o teste de Tukey (p≤0,05). Número amostral (n) = 90 por tratamento. Frequência de calogênese (%) = Explantes que formaram calos x 100 / 90.

### 3.4.3 Calogênese induzida sob LED azul

Diferentemente do que foi observado na calogênese induzida por luz fluorescente e LED branco, a manutenção dos explantes sob LED azul permitiu uma produção maior de calos (até 82,2%) na temperatura mais elevada ( $30\pm 2^\circ\text{C}$ ). Além disso, as cultivares que apresentaram as maiores taxas de calogênese foram IAC Caiapó e IAC 8112. Entretanto, segmentos foliares cultivados nas concentrações mais baixas de PIC continuaram a apresentar a maior eficiência na produção de calos (Tabela 3). Embora a maior parte dos calos, principalmente os obtidos a partir de segmentos foliares, tenha apresentado coloração verde-claro no material cultivado a  $25\pm 2^\circ\text{C}$ , uma parte dos calos apresentou coloração cinza-escuro (Figura 11).

Figura 11 – Formação de calos friáveis a partir de diferentes explantes de *A. hypogaea*, cv. IAC Caiapó, em resposta a PIC a  $1,25\ \mu\text{M}$ . Explantes mantidos por 60 dias, sob LED azul a  $25\pm 2^\circ\text{C}$ .



Legenda: (A) Segmento foliar; (B) Eixo embrionário; (C) Folíolo embrionário.  
Nota: Barra = 1 cm.

Tabela 3 – Frequência de calogênese (%) a partir de diferentes explantes de cinco cultivares de *A. hypogaea* em meio MS suplementado com diferentes concentrações de PIC, após 60 dias de cultura sob LED azul a 25±2°C e a 30±2°C.

Explante	Concentração de PIC (µM)	IAC 886		IAC Caiapó		IAC Tatu ST		IAC 8112		BR-1	
		25±2°C	30±2°C	25±2°C	30±2°C	25±2°C	30±2°C	25±2°C	30±2°C	25±2°C	30±2°C
Cotilédone	1,25	17,8±6,5	30,0±6,9	32,2±8,1	40,0±4,9	22,2±6,5	27,8±6,5	27,8±4,3	35,6±7,0	17,8±6,5	30,0±6,9
	2,5	12,2±4,3	35,6±5,1	27,8±6,5	35,6±5,1	20,0±6,9	22,2±6,5	22,2±6,5	35,6±5,1	20,0±6,9	30,0±6,9
	5	12,2±4,3	30,0±6,9	25,6±5,1	32,2±8,1	15,6±5,1	17,8±6,5	22,2±6,5	32,2±8,1	17,8±6,5	32,2±8,1
Eixo embrionário	1,25	25,6±5,1	37,8±6,5	30,0±6,9	37,8±6,5	22,2±6,5	32,2±8,1	25,6±7,0	32,2±8,1	37,8±6,5	40,0±6,9
	2,5	22,2±6,5	35,6±5,1	27,8±6,5	27,8±6,5	25,6±5,1	27,8±6,5	22,2±8,1	32,2±6,5	27,8±6,5	37,8±4,3
	5	22,2±6,5	32,2±8,1	32,2±8,1	30,0±6,9	25,6±5,1	27,8±6,5	22,2±8,1	25,6±5,1	25,6±5,1	40,0±4,9
Folíolo embrionário	1,25	32,2±8,1	45,6±5,1	42,2±8,1	52,2±6,5	27,8±6,5	42,2±8,1	40,0±4,9	55,6±7,1	30,0±6,9	45,6±5,1
	2,5	32,2±6,5	40,0±4,9	35,6±5,1	45,6±5,1	30,0±6,9	45,6±5,1	37,8±6,5	50,0±6,9	32,2±8,1	37,8±6,5
	5	30,0±6,9	40,0±6,9	32,2±8,1	37,8±6,5	30,0±6,9	40,0±4,9	35,6±5,1	45,6±5,1	32,2±6,5	37,8±6,5
Segmento Foliar	1,25	52,2±4,3	66,7±4,9	66,7±4,9	82,2±6,5*	55,6±7,1	66,7±4,9	64,4±11,0	80,0±4,9*	57,8±8,1	66,7±4,9
	2,5	52,2±6,5	62,2±6,5	60,0±6,9	76,7±4,9	52,2±6,5	64,4±11,0	66,7±4,9	77,8±4,3*	55,6±7,1	62,2±6,5
	5	50,0±6,9	57,8±6,5	52,2±4,3	77,8±8,1*	52,2±4,3	57,8±8,1	55,6±7,1	75,6±5,1	55,6±5,1	50,0±4,9

Nota: (\*) Valores estatisticamente mais altos em toda a tabela, de acordo com o teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). Número amostral (n) = 90 por tratamento. Frequência de calogênese (%) = Explantes que formaram calos x 100 / 90.

### 3.4.4 Calogênese induzida sob LED vermelho

A calogênese induzida sob LED vermelho a partir de cotilédones e eixos embrionários apresentou percentuais semelhantes nas duas temperaturas testadas. As maiores taxas de calogênese continuaram a ser observadas a partir de segmentos foliares e em resposta às menores concentrações de PIC testadas (Tabela 4). As cultivares que apresentaram maior formação de calos foram a BR-1 e a IAC 886, assim como observado sob LED branco. Os calos apresentaram aspecto menos friável e com colorações que variaram de amarelo a verde (Figura 12).

Figura 12 – Formação de calos friáveis a partir de folíolos embrionários de diferentes cultivares de *A. hypogaea*, em resposta a PIC 1,25  $\mu$ M, após 60 dias de cultura sob LED vermelho, a  $30\pm 2^\circ\text{C}$ .



Legenda: (A) BR-1; (B) IAC 886; (C) IAC 8112.

Nota: Barra = 1 cm.



Tabela 4 – Frequência de calogênese (%) a partir de diferentes explantes de cinco cultivares de *A. hypogaea* em meio MS suplementado com diferentes concentrações de PIC, após 60 dias de cultura sob LED vermelho a 25±2°C e a 30±2°C.

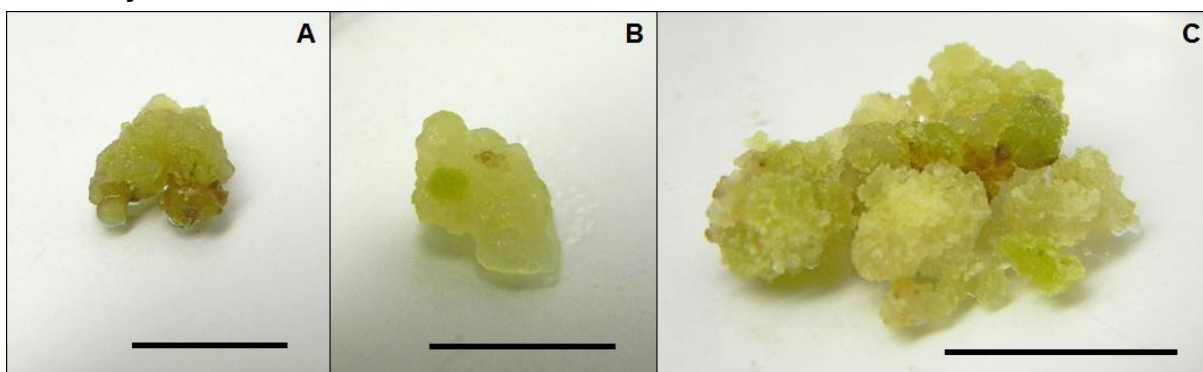
Explante	Concentração de PIC (µM)	IAC 886		IAC Caiapó		IAC Tatu ST		IAC 8112		BR-1	
		25±2°C	30±2°C	25±2°C	30±2°C	25±2°C	30±2°C	25±2°C	30±2°C	25±2°C	30±2°C
Cotilédone	1,25	32,2±8,1	40,0±6,9	40,0±6,9	32,2±8,1	22,2±6,5	35,6±5,1	37,8±6,5	25,6±5,1	35,6±5,1	37,8±6,5
	2,5	35,6±5,1	40,0±6,9	37,8±6,5	30,0±6,9	27,8±6,5	32,2±8,1	35,6±5,1	22,2±6,5	35,6±5,1	32,2±8,1
	5	37,8±6,5	35,6±5,1	30,0±6,9	27,8±6,5	27,8±4,3	30,0±6,9	30,0±6,9	22,2±6,5	32,2±8,1	27,8±6,5
Eixo embrionário	1,25	40,0±6,9	45,6±5,1	37,8±6,5	45,6±5,1	57,8±6,5	57,8±8,1	27,8±6,5	30,0±6,9	45,6±5,1	50,0±6,9
	2,5	40,0±4,9	37,8±6,5	40,0±4,9	37,8±6,5	50,0±6,9	60,0±6,9	22,2±6,5	37,8±6,5	40,0±4,9	45,6±5,1
	5	42,2±8,1	35,6±5,1	37,8±4,3	35,6±5,1	40,0±6,9	37,8±4,3	22,2±6,5	45,6±5,1	45,6±7,1	50,0±4,9
Folíolo embrionário	1,25	60,0±6,9	66,7±4,9	55,6±5,1	50,0±6,9	57,8±8,1	45,6±5,1	55,6±5,1	45,6±5,1	57,8±6,5	70,0±6,9
	2,5	62,2±6,5	66,7±8,4	62,2±4,3	45,6±7,0	55,6±5,1	42,2±8,1	52,2±4,3	45,6±7,0	52,2±4,3	66,7±8,4
	5	55,6±7,0	62,2±6,5	62,2±6,5	45,6±5,1	55,6±7,0	47,8±8,1	52,2±4,3	37,8±6,5	57,8±8,1	60,0±6,9
Segmento Foliar	1,25	82,2±6,5*	70,0±6,9	75,6±5,1	70,0±6,9	66,7±4,9	77,8±4,3*	66,7±8,4	66,7±4,9	70,0±6,9	70,0±4,9
	2,5	72,2±8,1	73,3±4,9	66,7±4,9	66,7±4,9	66,7±8,4	66,7±4,9	62,2±6,5	64,4±5,1	70,0±6,9	62,2±6,5
	5	70,0±4,9	70,0±6,9	62,2±6,5	60,0±6,9	62,2±6,5	60,0±6,9	66,7±8,4	55,6±5,1	66,7±4,9	60,0±6,9

Nota: (\*) Valores estatisticamente mais altos em toda a tabela, de acordo com o teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). Número amostral (n) = 90 por tratamento. Frequência de calogênese (%) = Explantes que formaram calos x 100 / 90.

### 3.4.5 Calogênese induzida sob associação de LED azul e vermelho

A calogênese induzida sob associação de LED azul e vermelho apresentou maior eficiência a  $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ . Na concentração de  $1,25\ \mu\text{M}$ , as cultivares BR-1 e IAC 886 também foram as mais responsivas. Além disso, os valores de formação de calos a partir de segmentos foliares mantidos a  $25\pm 2^{\circ}\text{C}$  foram bastante elevados (Tabela 5). Os calos oriundos de segmentos foliares também apresentaram coloração verde-claro (Figura 13).

Figura 13 – Formação de calos friáveis a partir de diferentes explantes de *A. hypogaea*, cv. BR-1, em resposta a PIC  $1,25\ \mu\text{M}$ , após 60 dias de cultura sob associação de LED azul e vermelho, a  $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ .



Legenda: (A) Eixo embrionário; (B) Folíolo embrionário; (C) Segmento foliar.

Nota: Barra = 1 cm.

Tabela 5 – Frequência de calogênese (%) a partir de explantes de cultivares de *A. hypogaea* em meio MS suplementado com diferentes concentrações de PIC, após 60 dias de cultura sob associação de LED azul e vermelho a 25±2°C e a 30±2°C.

Explante	Concentração de PIC (µM)	IAC 886		IAC Caiapó		IAC Tatu ST		IAC 8112		BR-1	
		25±2°C	30±2°C	25±2°C	30±2°C	25±2°C	30±2°C	25±2°C	30±2°C	25±2°C	30±2°C
Cotilédone	1,25	45,6±5,1	35,6±7,0	37,8±4,3	22,2±6,5	40,0±4,9	30,0±6,9	42,2±8,1	32,2±6,5	40,0±4,9	32,2±8,1
	2,5	40,0±6,9	35,6±5,1	37,8±6,5	25,6±7,0	40,0±6,9	27,8±4,3	37,8±6,5	25,6±5,1	40,0±6,9	32,2±6,5
	5	37,8±6,5	27,8±4,3	32,2±8,1	25,6±5,1	32,2±6,5	27,8±6,5	37,8±4,3	22,2±6,5	42,2±8,1	27,8±6,5
Eixo embrionário	1,25	50,0±6,9	37,8±6,5	45,6±5,1	40,0±6,9	52,2±4,3	40,0±4,9	55,6±5,1	42,2±9,4	50,0±6,9	42,2±8,1
	2,5	42,2±9,4	30,0±6,9	45,6±7,0	30,0±6,9	50,0±6,9	35,6±5,1	50,0±6,9	40,0±4,9	52,2±4,3	40,0±4,9
	5	42,2±8,1	32,2±8,1	37,8±4,3	27,8±4,3	45,6±7,0	27,8±4,3	42,2±9,4	42,2±8,1	52,2±6,5	40,0±6,9
Folíolo embrionário	1,25	66,7±8,4	66,7±4,9	62,2±6,5	57,8±8,1	70,0±6,9	66,7±4,9	68,9±10,2	66,7±4,9	72,2±8,1	66,7±8,4
	2,5	68,9±10,2	57,8±8,1	60,0±4,9	52,2±4,3	62,2±4,3	66,7±8,4	60,0±4,9	52,2±4,3	70,0±6,9	62,2±6,5
	5	68,9±10,2	66,7±8,4	62,2±4,3	50,0±6,9	66,7±4,9	50,0±6,9	66,7±8,4	50,0±4,9	70,0±4,9	60,0±4,9
Segmento Foliar	1,25	87,8±4,3*	77,8±4,3*	82,2±4,3*	77,8±4,3*	85,6±8,6*	80,0±4,9*	85,6±8,6*	75,6±5,1	90,0±4,9*	80,0±4,9*
	2,5	77,8±4,3*	75,6±7,1	82,2±6,5*	75,6±5,1	77,8±8,1*	77,8±8,0*	82,2±6,5*	70,0±4,9	76,7±4,9*	75,6±5,1
	5	75,6±5,1	70,0±6,9	77,8±8,1*	64,4±11,0	75,6±5,1	66,7±8,4	80,0±6,9*	66,7±8,4	66,7±4,9	76,7±4,9

Nota: (\*) Valores estatisticamente mais altos em toda a tabela, de acordo com o teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). Número amostral (n) = 90 por tratamento. Frequência de calogênese (%) = Explantes que formaram calos x 100 / 90.

### 3.4.6 Acúmulo de biomassa

Considerando que as maiores frequências de calogênese foram obtidas a partir de segmentos foliares cultivados sob luz fluorescente e sob associação de LED azul e vermelho, o acúmulo de biomassa dos calos oriundos desses tratamentos foi determinado. As médias dos pesos fresco e seco dos calos das cultivares IAC 886 e BR-1, cultivados em meio suplementado com as concentrações mais baixas de PIC, tanto sob luz fluorescente como sob associação de LED azul e vermelho, foram maiores (Tabela 6).

Tabela 6 – Peso fresco e peso seco de calos obtidos a partir de segmentos foliares de cinco cultivares de *A. hypogaea* em meio MS suplementado com diferentes concentrações de PIC sob luz fluorescente e LED azul e vermelho, após 60 dias, a 25±2°C.

Cultivar	Concentração de PIC (µM)	Luz Fluorescente		LED azul e vermelho	
		Peso Fresco (g)	Peso Seco (g)	Peso Fresco (g)	Peso Seco (g)
IAC 886	1,25	1,289±0,125 <sup>ab</sup>	0,119±0,009 <sup>ab</sup>	1,115±0,093 <sup>b</sup>	0,088±0,018 <sup>bc</sup>
	2,5	0,986±0,145 <sup>cd</sup>	0,117±0,014 <sup>ab</sup>	1,423±0,098 <sup>a</sup>	0,135±0,021 <sup>ab</sup>
	5	0,982±0,091 <sup>cd</sup>	0,056±0,016 <sup>c</sup>	1,114±0,045 <sup>bc</sup>	0,081±0,012 <sup>bc</sup>
IAC Caiapó	1,25	0,781±0,112 <sup>de</sup>	0,056±0,011 <sup>c</sup>	0,652±0,108 <sup>e</sup>	0,067±0,010 <sup>c</sup>
	2,5	0,812±0,098 <sup>d</sup>	0,054±0,009 <sup>c</sup>	0,539±0,097 <sup>e</sup>	0,069±0,004 <sup>c</sup>
	5	0,649±0,039 <sup>e</sup>	0,039±0,009 <sup>d</sup>	0,612±0,119 <sup>e</sup>	0,072±0,004 <sup>c</sup>
IAC Tatu ST	1,25	0,894±0,252 <sup>cde</sup>	0,092±0,013 <sup>ab</sup>	0,998±0,160 <sup>cd</sup>	0,114±0,013 <sup>b</sup>
	2,5	0,824±0,182 <sup>cde</sup>	0,109±0,003 <sup>b</sup>	0,854±0,154 <sup>cde</sup>	0,121±0,011 <sup>b</sup>
	5	0,723±0,045 <sup>de</sup>	0,082±0,014 <sup>bc</sup>	0,635±0,098 <sup>e</sup>	0,099±0,005 <sup>b</sup>
IAC 8112	1,25	0,915±0,093 <sup>cd</sup>	0,050±0,020 <sup>cd</sup>	1,012±0,105 <sup>c</sup>	0,078±0,025 <sup>bc</sup>
	2,5	0,871±0,087 <sup>d</sup>	0,051±0,019 <sup>cd</sup>	0,924±0,098 <sup>cd</sup>	0,069±0,021 <sup>bc</sup>
	5	0,911±0,196 <sup>cde</sup>	0,046±0,017 <sup>cd</sup>	0,789±0,088 <sup>de</sup>	0,058±0,009 <sup>bc</sup>
BR-1	1,25	1,356±0,117 <sup>ab</sup>	0,133±0,009 <sup>a</sup>	1,295±0,165 <sup>ab</sup>	0,129±0,012 <sup>ab</sup>
	2,5	1,141±0,132 <sup>bc</sup>	0,082±0,010 <sup>bc</sup>	1,476±0,113 <sup>a</sup>	0,154±0,029 <sup>a</sup>
	5	1,025±0,054 <sup>c</sup>	0,064±0,018 <sup>c</sup>	1,186±0,089 <sup>b</sup>	0,099±0,013 <sup>b</sup>

Nota: Os dados representam média ± desvio padrão. Letras iguais indicam não haver diferença estatisticamente significativa entre os dados de uma mesma coluna, de acordo com o teste de Tukey (p≤0,05).

Calos oriundos de segmentos foliares cultivados em meio MS suplementado com PIC a  $1,25\mu\text{M}$ , a  $25\pm 2^\circ\text{C}$ , por apresentarem os maiores acúmulos de biomassa, foram selecionados para avaliação de atividades biológicas e determinação do teor de *trans*-resveratrol.

### 3.5 Discussão

Em geral, os explantes das cultivares IAC 886 e BR-1 apresentaram maiores percentagens de formação de calos quando comparados com outras cultivares. Vários autores já relataram diferenças no potencial morfogênico de explantes de diferentes variedades, espécies e híbridos de amendoim (PITTMAN et al., 1983; OZIAS-AKINS et al., 1992; MCKENTLY, 1995; BANERJEE et al., 2007; KANYAND; PRAKASH, 2007; SHAN et al., 2009; NAZIR et al., 2011). Essas diferentes respostas podem ser explicadas pelo perfil genético das cultivares, bem como pelos seus níveis de reguladores de crescimento endógenos (ROY; BAANERJEE, 2000). Segmentos foliares também mostraram altos percentuais de calogênese em resposta a picloram, quando comparados a explantes de semente. Por diversas vezes, na cultura de tecidos, explantes oriundos de plantas *in vitro* apresentam melhores respostas do que os de plantas *in vivo*, uma vez que são fisiologicamente mais uniformes, menos oxidados e não necessitam de desinfestação (CIDADE et al., 2006).

O picloram é frequentemente usado para a indução de calos em *Arachis*, quer isoladamente ou em combinação (LITTLE et al., 2000; REY et al., 2000; REY; MROGINSKY, 2006; BERA et al., 2014). Por exemplo, entre as cinco auxinas utilizadas por Little e colaboradores (2000), o picloram foi a que mais rápido induziu a formação de calos a partir de explantes de *A. hypogaea*, alcançando frequências semelhantes às encontradas no presente trabalho. No entanto, as concentrações utilizadas por estes autores eram muito maiores (12,4 até 124,4  $\mu\text{M}$ ) do que as adotadas aqui.

A temperatura é outro fator que possui um papel vital no crescimento e no desenvolvimento das plantas, sendo que a temperatura ideal pode variar de acordo com a espécie, a cultivar e o sistema de regeneração. No presente trabalho, a formação de calos friáveis em resposta a picloram foi maior a  $25\pm 2^\circ\text{C}$  do que a  $30\pm 2^\circ\text{C}$ . Porém, em outro trabalho com *A. hypogaea*, tanto a organogênese direta a partir de cotilédones como o desenvolvimento de calos a partir de folhas organogênicas em resposta a BAP mostraram melhores taxas na temperatura de  $35^\circ\text{C}$ , quando comparados com  $25^\circ\text{C}$  (PESTANA et al., 1999).

A qualidade da luz também exerce grande influência na cultura de tecidos vegetais. Lian e colaboradores (2002) observaram que a luz fluorescente e a associação de LEDs azul e vermelho foram os mais eficazes para a regeneração de bulbos de um híbrido de *Lilium* oriental. Dois anos mais tarde, Kim e colaboradores (2004) relataram que a luz fluorescente e a associação de LEDs azul e vermelho foram melhores fontes de luz do que os LEDs azul, vermelho ou branco para o crescimento de brotos a partir de meristemas apicais de crisântemo (*Dendranthema grandiflorum*). No trabalho de Shin e colaboradores (2008) com segmentos foliares de *Doritaenopsis* sp., plantas cultivadas sob associação de LEDs azul e vermelho resultaram na maior frequência de parâmetros de crescimento, como massa fresca/massa seca de folhas e raízes e área foliar. Mais recentemente, Nhut e colaboradores (2015) constataram que as melhores taxas de formação da planta de *Panax vietnamensis* foram obtidas com calos embriogênicos cultivadas sob a associação de LEDs azul (40%) e vermelho (60%).

O presente estudo foi o primeiro a avaliar a influência da qualidade da luz na calogênese a partir de explantes de *A. hypogaea*. As maiores taxas de regeneração de calos foram observados sob luz fluorescente e associação de LEDs azul e vermelho, de modo semelhante aos resultados relatados com várias outras espécies. Esses resultados demonstram a possibilidade de os LEDs serem uma importante ferramenta para a regeneração *in vitro* em determinadas espécies.

### 3.6 Conclusões

- A concentração de picloram que mais influenciou positivamente a formação de calos friáveis foi a de 1,25  $\mu\text{M}$ ;
- O explante que propiciou a maior formação de calos friáveis foi o segmento foliar;
- A temperatura de  $25\pm 2^\circ\text{C}$  foi a mais eficiente para a formação de calos friáveis;
- Considerando o tipo de iluminação, a luz fluorescente e a associação de LEDs azul e vermelho foram as que mais influenciaram na indução de calogênese;
- Em relação ao acúmulo de biomassa, os mesmos calos supracitados foram os que apresentaram os maiores pesos secos.



## 4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ALELOPÁTICA

### 4.1 Introdução

Desde a antiguidade o homem já investigava a capacidade de certas plantas interferirem no estabelecimento e desenvolvimento de outras. Referências a esse fenômeno foram encontradas em obras de Demócrito e Theophrastus, dos séculos V a.C. e III a.C, respectivamente (ALMEIDA, 1985). Depois, no século I d.C, Plínio observou que algumas espécies como o grão-de-bico (*Cicer arietinum* L.), a cevada (*Hordeum vulgare* L.) e a ervilha (*Vicia ervilia* (L.) Willd) “danificavam a terra”. Este mesmo autor também relatou que a sombra da noqueira (*Juglans regia* L.) supostamente causaria danos a qualquer coisa plantada em suas redondezas. Mais tarde, no século XVII, Culpeper observou que a alfavaca e a arruda nunca cresciam próximas uma da outra e Browne afirmou que os bons ou maus fluidos das plantas podem estimular ou degradar umas às outras (BARATELLI, 2006).

Em 1804, Young relatou que o trevo vermelho dificilmente crescia em solo saturado pelo crescimento da própria planta, e recomendou um intervalo de sete a oito anos entre seus cultivos. Também no século XIX, De Candolle considerou que as raízes de algumas plantas poderiam ter, além da função de absorção, a de excreção de materiais venenosos para plantas da mesma espécie, gênero ou família. Embora a teoria de De Candolle tenha sido abandonada, a existência de toxinas em solos foi comprovada pela primeira vez em trabalhos produzidos no início do século XX (ALMEIDA, 1985).

Apesar do grande número de observações realizadas na natureza, os estudos sobre alelopatia com caráter científico somente foram iniciados no início do século XX, quando Schreiner e colaboradores descobriram a presença de substâncias vegetais que apresentavam efeitos nocivos sobre outras espécies em solos esgotados (CHOU, 1999). Com o estabelecimento de metodologias bem definidas e resultados experimentais expressivos, a alelopatia adquiriu caráter científico e, atualmente, diferentes grupos de pesquisas no Brasil e no mundo realizam estudos na área (OLIVEIRA, 2009).

A palavra “alelopatia” é derivada dos radicais gregos *allelon* (mútuo) e *pathos* (prejuízo). O termo foi definido por Hans Molisch, em 1937, como sendo o resultado direto ou indireto da transferência de substâncias químicas de uma planta para outra, com efeito inibitório ou estimulatório (MIZUTANI, 1999). Rice (1984) definiu alelopatia como “qualquer efeito direto ou indireto danoso ou benéfico que uma planta exerce sobre outra pela produção de substâncias químicas liberadas no ambiente”. Mais tarde, Grankhov e Didyk (1996) conceituaram a alelopatia como sendo a interação fisiológica e bioquímica entre indivíduos, constatada no espaço (interação alelopática) ou no tempo (ação pós-alelopática). No mesmo ano, a Sociedade Internacional de Alelopatia definiu o fenômeno como “qualquer processo que envolve metabólitos especiais produzidos por plantas, algas, bactérias e fungos, que influem no crescimento e desenvolvimento de sistemas biológicos e agrícolas” (IAS, 1996). Em 2004, Macías considerou a alelopatia como uma ciência que estuda os processos em que substâncias interferentes produzidas por plantas ou micro-organismos são envolvidas, afetando o crescimento e desenvolvimento de sistemas biológicos.

Atualmente, define-se a alelopatia como a capacidade de plantas, algas, bactérias e fungos produzirem substâncias químicas que, liberadas no ambiente de outras, influenciam de forma favorável ou desfavorável seu desenvolvimento, como consequência da liberação de substâncias conhecidas como aleloquímicos, provenientes de plantas vivas ou restos em decomposição de substâncias no solo (TAGHVAEEFARD; SADEGHI, 2014).

#### 4.1.1 Substâncias alelopáticas

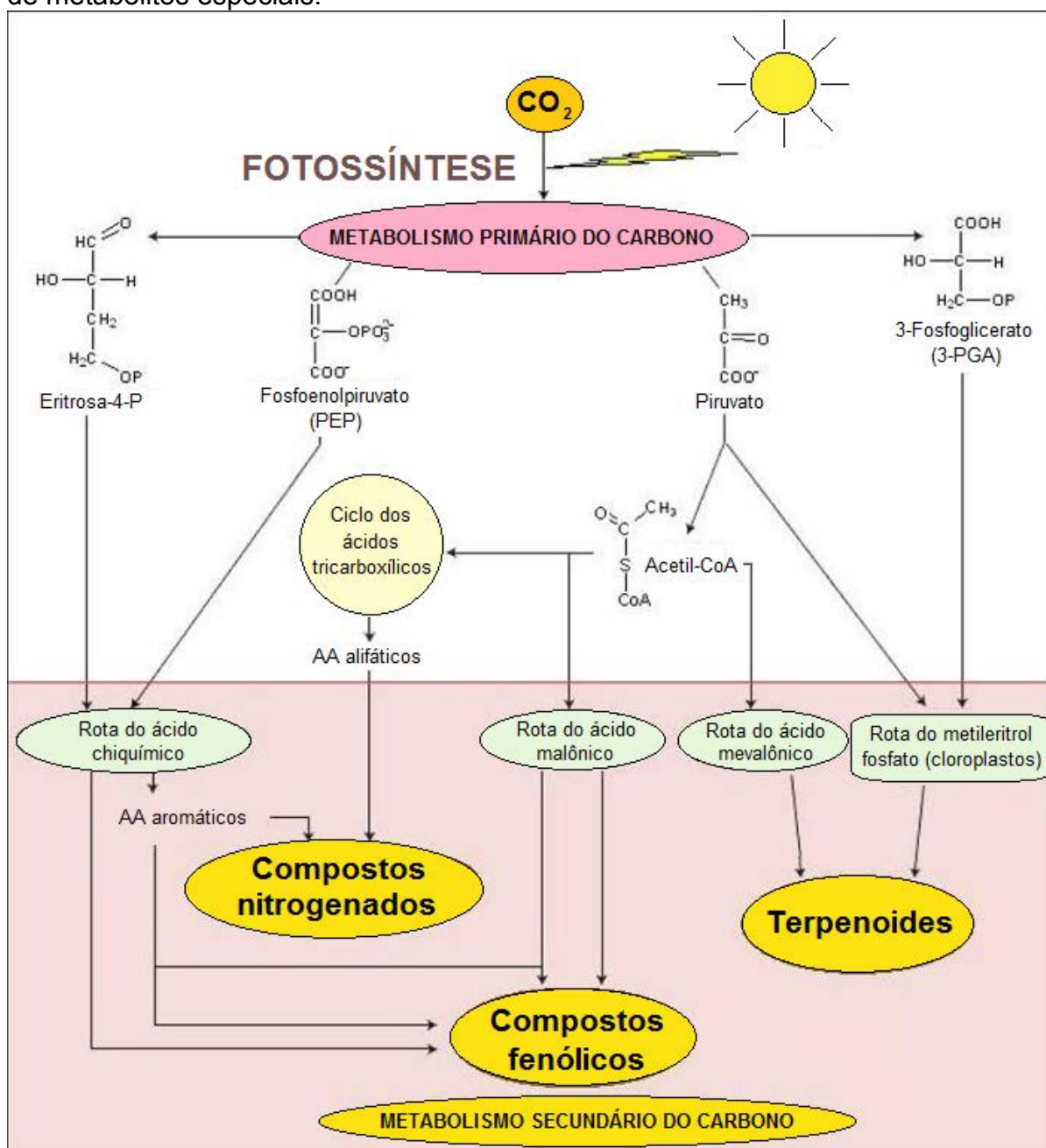
Também chamadas de aleloquímicos ou fitotoxinas, as substâncias com atividade alelopática, em sua maioria, são produtos do metabolismo especial (secundário) de plantas (OLIVEIRA, 2009). Os metabólitos especiais auxiliam nas funções de defesa, pois além de limitar o crescimento de outras plantas, podem constituir barreira física, apresentar paladar desagradável, causar efeitos fisiológicos, liberar toxinas, entre outros. Sendo assim, representam vantagens das plantas contra a ação de pragas, patógenos ou predadores (WALLER, 1999).

Apesar de muitos autores afirmarem que as substâncias alelopáticas são sintetizadas com funções específicas, outros postulam que suas moléculas representam o produto final do metabolismo celular, já que existem em maior quantidade nos vacúolos celulares, onde seriam depositadas a fim de evitar a toxicidade nas próprias células (ALMEIDA, 1990). Qualquer parte da planta pode armazenar substâncias aleloquímicas, embora a quantidade e as vias pelas quais são secretados variem conforme a espécie (FRIEDMAN, 1995).

Aleloquímicos foram detectados em órgãos vegetais de diferentes espécies, principalmente raízes (REESE, 1996; TSANUO et al., 2003; VILES), folhas (OLIVEIRA et al., 2004; OLIVEIRA; CAMPOS, 2006), sementes (NOOR et al., 1995; WESTON, 1996), caules (SMITH, 1990; GATTI et al., 2004), flores (BALLESTER et al., 1982; TEFERA, 2002), frutos (OLIVEIRA et al., 2004; NOGUSHI; TANAKA, 2004) e pólen (MURPHY, 2000).

Vários metabólitos especiais, pertencentes a diversas classes, já demonstraram possuir atividade alelopática (RICE, 1984), incluindo terpenos, ácidos orgânicos solúveis em água, aldeídos alifáticos, cetonas, ácidos graxos de cadeia longa, poliacetilenos, naftoquinonas, antraquinonas e quinonas complexas. Além de aminoácidos, purinas e nucleosídeos, também foram encontrados fenóis simples (que podem ter biossíntese mista), ácidos benzoicos e derivados, ácidos cinâmicos e derivados, cumarinas, glicosídeos, alcaloides (com dois tipos de rotas metabólicas), cianidrina, flavonoides e taninos hidrolisáveis e condensados, alguns provenientes da rota do ácido chiquímico (Figura 14) (REZENDE et al., 2003). Entretanto, as substâncias fenólicas e os terpenoides são os mais amplamente investigados, sendo bastante abundantes na natureza (INDERJIT; DAKSHINI, 1995). A qualidade e a quantidade de substâncias aleloquímicas podem variar de acordo com a espécie, a idade do órgão, a temperatura, a intensidade luminosa, a disponibilidade de nutrientes, a atividade microbiana da rizosfera e a composição do solo (EINHELLIG; LEATHER, 1988; FERREIRA; ÁQUILA, 2000).

Figura 14 – Elementos do metabolismo do carbono em relação às rotas de síntese de metabólitos especiais.



Fonte: adaptada de García e Carril, 2009.

As substâncias aleloquímicas podem causar vários efeitos sobre outras plantas, agindo por inibição e modificação do crescimento ou desenvolvimento das plantas. Essas alterações afetam o metabolismo, estruturas celulares, balanço hormonal, membranas, absorção de minerais, movimento dos estômatos, fotossíntese, respiração, síntese proteica, atividade enzimática, relações hídricas e o material genético (PIRES; OLIVEIRA, 2001).

#### 4.1.2 Plantas daninhas e herbicidas

As plantas daninhas são definidas como qualquer vegetal que cresça onde não é desejado, juntamente com as culturas agrícolas, interferindo no seu desenvolvimento e reduzindo a produtividade (LORENZI, 2000). Devido ao fato de serem tolerantes a condições extremas, podem germinar, desenvolver-se e reproduzirem-se em condições ambientais pouco favoráveis, tais como estresse hídrico, umidade excessiva, temperaturas inadequadas, fertilidade desfavorável e elevada salinidade, acidez ou alcalinidade. São muito importantes do ponto de vista econômico, pois prejudicam diretamente a produção das culturas agrícolas, provocando aumento do custo de produção pelos investimentos necessários ao manejo (KHAN; KHAN, 2015). *Commelina benghalensis* e *Ipomoea nil* são duas espécies de plantas daninhas comumente encontradas em plantações de *A. hypogaea*. De porte herbáceo e perene, ocorrem principalmente em lavouras anuais, dificultando a colheita mecanizada. Além disso, são de difícil controle por herbicidas sintéticos, podendo ser responsáveis por perdas de até 80%. Embora esse valor possa variar de acordo com a cultivar, a densidade da infestação e a época do ano, essas espécies também podem interferir indiretamente no desenvolvimento dos frutos, dificultando a colheita e depreciando a qualidade do produto (AGOSTINHO et al., 2006; NEPOMUCENO et al., 2007; DIAS et al., 2009).

O uso efetivo de herbicidas sintéticos intensificou-se bastante durante a década de 1940 e, no final dos anos 1950, as primeiras resistências em plantas daninhas já eram detectadas. Além disso, o impacto negativo dos herbicidas sobre a saúde humana é outro fato que requer bastante atenção (KISSMANN; GROTH, 1999).

Nos últimos anos, alguns herbicidas tóxicos e não seletivos vêm sendo utilizados em larga escala, como por exemplo o glifosato (N-(fosfometil) glicina, C<sub>3</sub>H<sub>8</sub>NO<sub>5</sub>P). Embora este produto seja metabolizado no solo, não atingindo os lençóis freáticos, seu uso intenso provoca o surgimento de resistência, levando a um aumento progressivo das doses usadas, e assim a uma perda de fertilidade do solo. Além disso, é possível que o glifosato tenha efeitos nocivos sobre a saúde humana, como o aumento de doenças relacionadas aos sistemas cardiovascular,

gastrointestinal, renal, nervoso e respiratório, e até de certos tipos de câncer (DRUILLE et al., 2015; SORAHAN, 2015).

Nesse contexto, a busca de produtos naturais em substituição a herbicidas para o manejo de plantas daninhas tem sido objeto de vários estudos, criando a possibilidade de descoberta de novos produtos para utilização como aleloquímicos. Dessa forma, a atividade alelopática é tida como uma ferramenta importante para o desenvolvimento de cultivos orgânicos (SILVA, 2004).

#### 4.1.3 Atividade alelopática de espécies do gênero *Arachis*

O estudo do potencial alelopático de espécies do gênero *Arachis* ainda é bastante limitado. Em *A. hypogaea*, Ransing e colaboradores (1990) verificaram a atividade inibitória de extratos de sementes na germinação de milho. Fei e Chuihua (2002) investigaram o efeito estimulante de extratos de raiz e folha de *A. hypogaea* sobre arroz, milho, rabanete e *Lolium* sp. Outras espécies do gênero também foram avaliadas quanto ao seu potencial alelopático. Saraiva (2010) avaliou o efeito inibitório de plantas de *A. pinto* e *A. repens* em braquiária (*Brachiaria decumbens* Stapf) e corda-de-viola (*Ipomoea grandifolia*). Ainda em 2010, Cunha e colaboradores verificaram a interferência negativa de extratos aquosos de *A. pinto* sobre a germinação de sementes de picão-preto (*Bidens pilosa*) e corda-de-viola (*Ipomoea triloba*). De maneira similar, Monteles e colaboradores (2011) verificaram um estímulo positivo de extratos aquosos de *A. pinto* sobre a germinação de sementes de tomate (*Solanum lycopersicum*) e pimentão (*Capsicum annum*).

Diante da importância comercial de *A. hypogaea*, dos indícios de sua influência no crescimento de outras espécies e da escassez de dados na literatura sobre o tema, neste trabalho a atividade alelopática de extratos brutos de órgãos e calos de cinco cultivares de *A. hypogaea* foi avaliada sobre *Lactuca sativa*. A atividade de partições e frações de semente de uma das cultivares sobre *L. sativa* e duas espécies daninhas (*Commelina benghalensis* e *Ipomoea nil*) também foram estudadas.

## 4.2 Objetivos

### 4.2.1 Objetivo geral

Avaliar a atividade alelopática de materiais obtidos *in vivo* e *in vitro* das cinco cultivares de *A. hypogaea*.

### 4.2.2 Objetivos específicos

- Investigar a influência de extratos brutos, partições e frações sobre o crescimento e a germinação de *Lactuca sativa*;
- Averiguar a inibição do crescimento de plantas daninhas (*Commelina benghalensis* e *Ipomoea nil*) pela partição diclorometânica do extrato de semente da cv. BR-1;
- Comparar os efeitos dos extratos de materiais vegetais obtidos *in vivo* e *in vitro* das diferentes cultivares na atividade alelopática.

### 4.3 Material e métodos

#### 4.3.1 Material vegetal

Foram utilizados diferentes materiais (partes aéreas, raízes, tegumentos e sementes) de plantas mantidas *in vivo* após 30 dias de cultivo e calos friáveis das cinco cultivares de *Arachis hypogaea*. Os calos foram obtidos 30 dias após a inoculação de explantes foliares de plantas *in vitro* em meio MS suplementado com picloram a 1,25  $\mu\text{M}$  (CASIMIRO, 2013) em diferentes qualidades de luz. As sementes de *L. sativa* foram adquiridas em mercado popular, enquanto as de *C. benghalensis* e *I. nil* foram fornecidas pela Cosmos Agrícola Produtos e Serviços Rurais Ltda.

#### 4.3.2 Preparo de extratos brutos, partições e frações

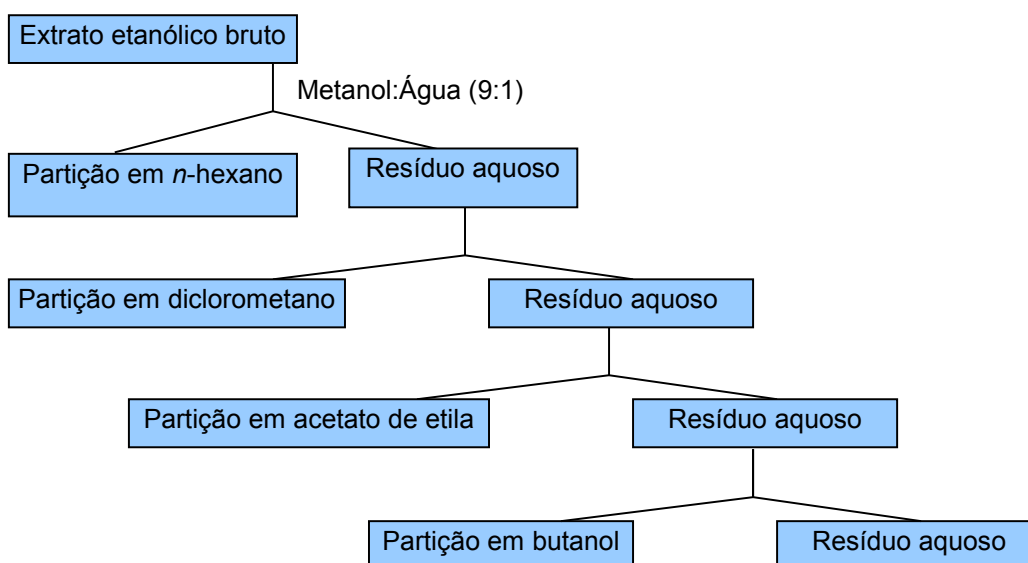
Para o preparo dos extratos brutos, os materiais foram secos em estufa a 45°C, triturados e pesados. Inicialmente, foi realizada uma etapa de desengorduramento com *n*-hexano (cinco estágios de 48 h cada), para a retirada das substâncias mais apolares. Os produtos resultantes foram macerados em etanol (30 mL/g de material seco), em temperatura ambiente, na ausência de luz, em cinco estágios de 48 h cada. Após filtração em papel-filtro e concentração em evaporador rotatório a vácuo a 45°C, os extratos foram pesados e armazenados a -4°C até sua utilização.

Para o preparo das partições, 20 kg de sementes da cultivar BR-1 foram trituradas em processador doméstico e submetidas à secagem em estufa a 50°C até atingir peso constante. Em seguida, foi realizado o desengorduramento com *n*-hexano (cinco vezes, com renovação do solvente em intervalos de 48 horas). Foram realizadas macerações estáticas à temperatura ambiente e. A torta resultante foi submetida à extração com etanol (cinco vezes de 48h). Os extratos obtidos foram reunidos em evaporador rotatório a vácuo a 45°C. O extrato seco obtido (108,59 g)



foi ressolubilizado em metanol:água (9:1) e submetido a sucessivas partições líquido-líquido, utilizando solventes orgânicos de polaridade crescente, resultando na obtenção das partições em *n*-hexano (30,81 g), diclorometano (8,50 g), em acetato de etila (19,40 g), butanol (21,89 g) e resíduo aquoso (23,64 g) (Figura 15). Cada partição foi concentrada em evaporador rotatório a vácuo a 45°C (exceto o resíduo aquoso, que foi concentrado em liofilizador) para obtenção do material seco.

Figura 15 – Esquema da partição líquido-líquido do extrato etanólico de sementes da cv. BR-1 de *A. hypogaea* para obtenção das partições orgânicas e o resíduo aquoso.



Para o preparo das frações, uma alíquota de 6 gramas da partição em diclorometano do extrato etanólico da semente da cultivar BR-1 foi misturada a 80 gramas de Sílica-gel 60 (0,063 – 0,200 mm) (70 – 230 mesh) para cromatografia em coluna SiO<sub>2</sub> (Vetec®). A mistura foi evaporada e a pastilha resultante foi utilizada como fase estacionária para o fracionamento por filtração em coluna a vácuo. A fase móvel foi constituída por 800 mL de cada solvente orgânico em ordem crescente de polaridade, resultando na obtenção das seguintes frações: hexano:diclorometano (1:1) (0,2927 g), diclorometano (0,4395 g), diclorometano:acetona (1:1) (1,9618 g), diclorometano:acetona (1:4) (0,4122 g), diclorometano:metanol (1:1) (1,3811 g) e metanol (0,4166 g). Cada fração foi concentrada em evaporador rotatório a vácuo a 45°C, para obtenção do material seco.

Os procedimentos descritos a seguir foram realizados no Laboratório de Produtos Naturais e Ensaio Biológicos (LaProNEB), da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), em colaboração com as professoras Naomi Kato Simas e Ivana Correa Ramos Leal.

#### 4.3.3 Avaliação da atividade alelopática

##### 4.3.3.1 Efeito sobre a germinação de sementes de *L. sativa* e plantas daninhas

Placas de Petri (d=6 cm, h=1 cm) contendo discos de papel de filtro Whatman nº1 (d=5,7 cm), receberam 0,5 mL de extrato cada uma, nas concentrações selecionadas (até 1000 ppm). Após a evaporação do solvente em temperatura ambiente (2 h), foram adicionados 2,5 mL de água destilada com 0,1% de DMSO e 10 sementes de *L. sativa* (planta-modelo), *C. benghalensis* ou *I. nil*. Todos os experimentos foram realizados em triplicata, com três repetições.

Discos de papel contendo menadiona a 200 ppm foram utilizados como controle positivo. Como controles negativos foram usados discos de papel de filtro contendo 2,5 mL de água ou 2,5 mL de solução de DMSO a 0,1%.

Os experimentos foram conduzidos em câmara de crescimento na ausência de luz, devido à fotoblastia negativa das sementes, com temperatura em torno de 25°C. A avaliação da germinação, com base na protusão radicular, foi efetuada 24h após a inoculação das sementes (ADEGAS et al., 2003)

As percentagens de inibição da germinação foram calculadas por comparação com o controle negativo, utilizando o seguinte cálculo:

% Inibição =  $(C-X)/C \times 100$ , onde C= nº de sementes germinadas no controle e X= nº de sementes germinadas na amostra-teste.

#### 4.3.3.2 Efeito sobre o crescimento de hipocótilos e radículas de *L. sativa*

O crescimento das plântulas foi avaliado medindo-se o comprimento dos hipocótilos e radículas, cinco dias após a inoculação das sementes. As percentagens de inibição do crescimento das raízes e dos hipocótilos foram calculadas por comparação com o controle negativo, utilizando o seguinte cálculo:

% Inibição =  $(C-X)/Cx100$ , onde C= tamanho médio do hipocótilo/raízes no controle e X= tamanho médio do hipocótilo/radículas na amostra-teste (CHIAPUSIO et al., 1997; FUKUHARA; KUBO, 1991).

#### 4.3.4 Análise estatística

A análise dos dados foi realizada através da análise de variância (ANOVA) e do teste de comparação de Tukey, com o auxílio do programa Graphpad Prism 5®. Foram considerados significativos os valores de  $p \leq 0,05$ , tendo sido adotado um intervalo de confiança de 95%.

## 4.4 Resultados

### 4.4.1 Avaliação dos extratos brutos

Inicialmente, foram testados os extratos etanólicos de parte aérea, raiz, tegumento e semente da cultivar BR-1. Os extratos da semente e do tegumento mostraram os maiores percentuais de inibição de germinação (47,78%), quando comparados com o extrato da raiz (35,46%) e da parte aérea (24,44%) (Tabela 7).

Tabela 7 – Inibição da germinação de sementes de *L. sativa* por extratos etanólicos de parte aérea, raiz, tegumento e semente da cultivar BR-1 de *Arachis hypogaea*.

Extratos Etanólicos (BR-1 - 1000 ppm)	Inibição da germinação (%)
Parte aérea	24,44±1,53 <sup>c</sup>
Raiz	35,46±2,08 <sup>b</sup>
Tegumento	47,78±2,52 <sup>a</sup>
Semente	47,78±4,04 <sup>a</sup>

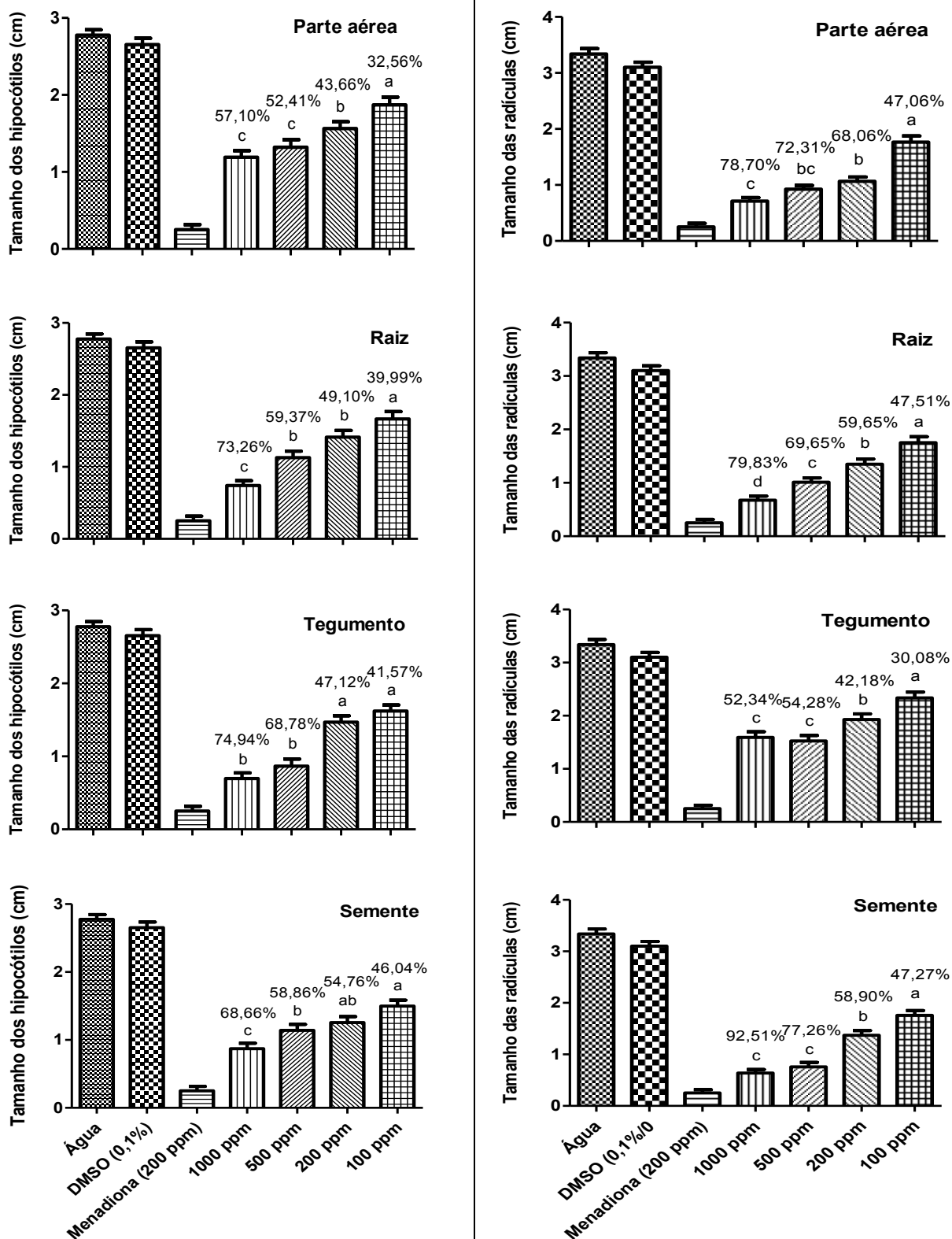
Nota: Os dados representam média ± desvio padrão. Letras iguais indicam não haver diferença estatisticamente significativa entre os dados, de acordo com o teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

O extrato de parte aérea causou maiores percentuais de inibição do crescimento da radícula, quando comparado com o hipocótilo. De forma similar, o extrato de raiz também proporcionou maior inibição sobre o desenvolvimento das radículas. Apesar disso, os percentuais de inibição dos extratos de raiz sobre os hipocótilos foram consideravelmente maiores quando comparados com os aqueles apresentados pelos de partes aéreas. Diferentemente dos outros extratos brutos, o extrato de tegumento promoveu maior inibição sobre os hipocótilos, em comparação com as radículas. Entretanto, o efeito sobre as radículas foi similar ao dos outros extratos, sendo o maior percentual apresentado pelo extrato bruto de sementes (Figura 16).

Figura 16 – Avaliação da atividade alelopática de extratos etanólicos de *Arachis hypogaea* (cv. BR-1) sobre o crescimento de hipocótilos e radículas de *L. sativa*.

I – Crescimento de hipocótilos

II – Crescimento de radículas



Nota: Os dados são apresentados em comprimentos médios de cada órgão e os percentuais de inibição em relação ao controle de água destilada encontram-se nas respectivas barras. Letras iguais indicam não haver diferença estatisticamente significativa entre os dados de um mesmo gráfico, de acordo com o teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

Extratos de semente apresentaram o menor valor de  $CI_{50}$  (concentração dos extratos necessária para inibir 50% do desenvolvimento de plântulas de *L. sativa*) nos experimentos descritos na figura anterior (Tabela 8).

Tabela 8 –  $CI_{50}$  para a atividade alelopática dos extratos etanólicos da cv. BR-1 de *Arachis hypogaea* sobre o crescimento de hipocótilos e raízes de *L. sativa*.

Extrato etanólico	$CI_{50}$ (ppm)	
	Hipocótilo	Radícula
Parte aérea	99,91	96,68
Raiz	367,5	472,5
Tegumento	106,1	91,46
Semente	72,98	77,43

Os menores valores de  $CI_{50}$  obtidos para a cv. BR-1 foram utilizados para a análise comparativa dos extratos das outras cultivares. Com exceção do extrato de parte aérea da cv. IAC 886, todos os materiais causaram percentuais de inibição menores do que os obtidos com a cv. BR-1 (Tabela 9).

Tabela 9 – Inibição do crescimento de plântulas de *L. sativa* por extratos brutos das cvs. IAC 886, IAC Caiapó, IAC Tatu ST, IAC 8112 e BR-1 de *Arachis hypogaea*, utilizando os valores de  $CI_{50}$  obtidos para a cv. BR-1.

Cultivar	Inibição em relação ao controle (%)							
	Parte aérea ( $CI_{50} = 96,68$ )*		Raiz ( $CI_{50} = 367,5$ )*		Tegumento ( $CI_{50} = 91,46$ )*		Semente ( $CI_{50} = 72,98$ )*	
	Hipocótilo	Radícula	Hipocótilo	Radícula	Hipocótilo	Radícula	Hipocótilo	Radícula
IAC 886	52,87 <sup>a</sup>	58,25 <sup>a</sup>	36,14 <sup>bc</sup>	29,07 <sup>b</sup>	29,75 <sup>b</sup>	38,52 <sup>bc</sup>	41,28 <sup>b</sup>	40,15 <sup>ab</sup>
IAC Caiapó	32,18 <sup>c</sup>	35,27 <sup>d</sup>	43,65 <sup>ab</sup>	33,89 <sup>ab</sup>	27,52 <sup>b</sup>	32,97 <sup>c</sup>	27,98 <sup>c</sup>	26,78 <sup>c</sup>
IAC Tatu ST	40,19 <sup>b</sup>	38,59 <sup>cd</sup>	32,13 <sup>c</sup>	29,81 <sup>b</sup>	30,18 <sup>b</sup>	40,10 <sup>b</sup>	39,58 <sup>b</sup>	33,98 <sup>bc</sup>
IAC 8112	42,03 <sup>b</sup>	43,87 <sup>bc</sup>	35,62 <sup>c</sup>	28,32 <sup>b</sup>	41,78 <sup>a</sup>	45,21 <sup>ab</sup>	35,52 <sup>bc</sup>	36,27 <sup>b</sup>
BR-1	46,81 <sup>ab</sup>	50,00 <sup>ab</sup>	50,00 <sup>a</sup>	37,24 <sup>a</sup>	44,09 <sup>a</sup>	50,00 <sup>a</sup>	50,00 <sup>a</sup>	48,51 <sup>a</sup>

Nota: \*concentração dos extratos da cultivar BR-1 necessária para inibir 50% do desenvolvimento de hipocótilos (extratos de raízes e sementes) ou radículas (extratos de parte aérea), conforme tabela 8. Letras iguais indicam não haver diferença estatisticamente significativa entre os dados, de acordo com o teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

A atividade alelopática de extratos dos calos friáveis oriundos de segmentos foliares das cinco cultivares, em resposta a PIC a 1,25  $\mu\text{M}$  e incubados a 25°C, sob diferentes qualidades de luz, foi também avaliada. Os maiores percentuais de inibição foram observados em extratos do material oriundo da cv. BR-1, obtidos sob associação de LEDs azul e vermelho (Tabela 10).

Tabela 10 – Inibição do crescimento de plântulas de *L. sativa* por extratos de calos obtidos a partir de segmentos foliares de cinco cultivares de *A. hypogaea* cultivados em meio MS suplementado com picloram 1,25  $\mu\text{M}$ , sob luz fluorescente e diferentes LEDs, após 60 dias, a 25 $\pm$ 2°C.

Cultivar	Inibição em relação ao controle (%)*									
	Luz fluorescente		LED branco		LED azul		LED vermelho		LEDs azul e vermelho	
	Hip.	Rad.	Hip.	Rad.	Hip.	Rad.	Hip.	Rad.	Hip.	Rad.
IAC 886	55,66 <sup>b</sup>	53,09 <sup>bc</sup>	48,71 <sup>cd</sup>	54,28 <sup>b</sup>	35,21 <sup>ef</sup>	30,28 <sup>f</sup>	50,89 <sup>c</sup>	53,82 <sup>bc</sup>	58,77 <sup>ab</sup>	55,10 <sup>b</sup>
IAC Caiapó	57,51 <sup>b</sup>	52,14 <sup>bc</sup>	49,63 <sup>c</sup>	50,19 <sup>c</sup>	29,14 <sup>f</sup>	31,70 <sup>f</sup>	55,39 <sup>b</sup>	59,14 <sup>ab</sup>	54,89 <sup>b</sup>	58,13 <sup>ab</sup>
IAC Tatu ST	48,97 <sup>cd</sup>	52,61 <sup>bc</sup>	39,23 <sup>e</sup>	41,78 <sup>de</sup>	30,52 <sup>f</sup>	33,29 <sup>f</sup>	36,29 <sup>e</sup>	31,97 <sup>f</sup>	45,95 <sup>d</sup>	48,72 <sup>cd</sup>
IAC 8112	48,18 <sup>cd</sup>	41,07 <sup>de</sup>	42,17 <sup>d</sup>	43,28 <sup>d</sup>	19,72 <sup>g</sup>	22,81 <sup>fg</sup>	40,91 <sup>d</sup>	35,75 <sup>ef</sup>	38,62 <sup>e</sup>	34,28 <sup>ef</sup>
BR-1	58,74 <sup>ab</sup>	57,33 <sup>b</sup>	56,98 <sup>b</sup>	47,20 <sup>cd</sup>	30,81 <sup>f</sup>	27,15 <sup>f</sup>	59,28 <sup>ab</sup>	59,30 <sup>ab</sup>	63,21 <sup>a</sup>	66,89 <sup>a</sup>

Legenda: (Hip.) Hipocótilo; (Rad.) Radícula.

Nota: \*Foi utilizado o menor valor de  $CI_{50}$  obtido com extratos de parte aérea da cv. BR-1 (96,68 ppm), conforme mostrado na tabela 8. Letras iguais indicam não haver diferença estatisticamente significativa entre os dados, de acordo com o teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

#### 4.4.2 Avaliação das partições

A atividade alelopática das partições líquido-líquido dos extratos etanólicos das sementes da cv. BR-1 (hexânica, diclorometânica, em acetato de etila, butanólica e resíduo aquoso) também foi avaliada. A inibição da germinação causadas pelas partições apolares, diclorometânica (68,89%) e hexânica (57,78%), foi significativamente maior que aquelas alcançadas pelas outras partições testadas (13,33 a 16,67%) (Tabela 11).

Tabela 11 – Inibição da germinação de *Lactuca sativa* pelas partições de extratos de sementes da cv. BR-1 de *Arachis hypogaea*, a 1000 ppm.

Partições (1000 ppm)	Inibição da germinação (%)
Hexânica	57,78±4,04 <sup>a</sup>
Diclorometânica	68,89±5,13 <sup>a</sup>
Em acetato de etila	16,67±2,65 <sup>b</sup>
Butanólica	16,67±3,60 <sup>b</sup>
Resíduo aquoso	13,33±2,00 <sup>b</sup>

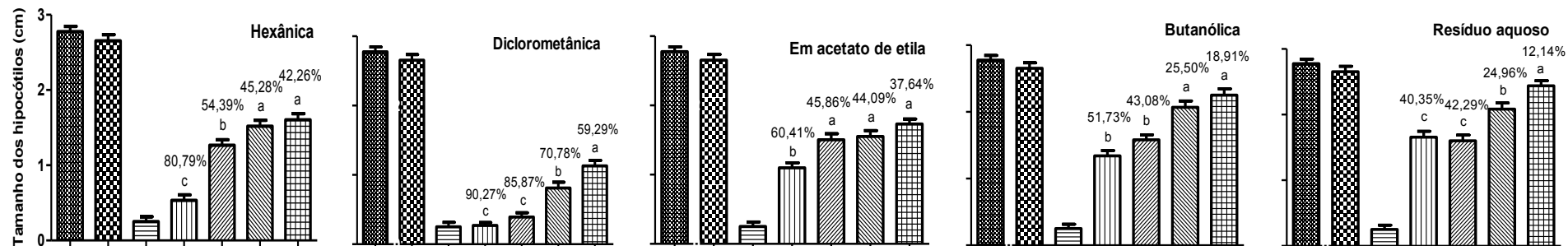
Letras iguais indicam não haver diferença estatisticamente significativa entre os valores de acordo com o teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

As diferentes partições também tiveram efeitos variados no crescimento de hipocótilos e radículas. Os valores obtidos com a partição hexânica (80,79% para hipocótilos e 84,02% para radículas, a 1000 ppm) foram significativamente mais elevados que aqueles apresentados pelo extrato bruto de semente sobre o crescimento de hipocótilos (68,66%, a 1000 ppm). Por outro lado, o valor alcançado em relação ao crescimento de radículas foi menor do que o apresentado com o mesmo extrato (92,51%, a 1000 ppm). As taxas de inibição do crescimento alcançadas pelas partições em acetato de etila (até 63,93%), butanólica (55,57%) e em resíduo aquoso (até 42,29%) foram também menores do que as do extrato bruto de semente (Figura 17). A partição diclorometânica proporcionou os maiores percentuais de inibição do crescimento de hipocótilos e radículas (90,27% e 92,21%, respectivamente, a 1000 ppm).

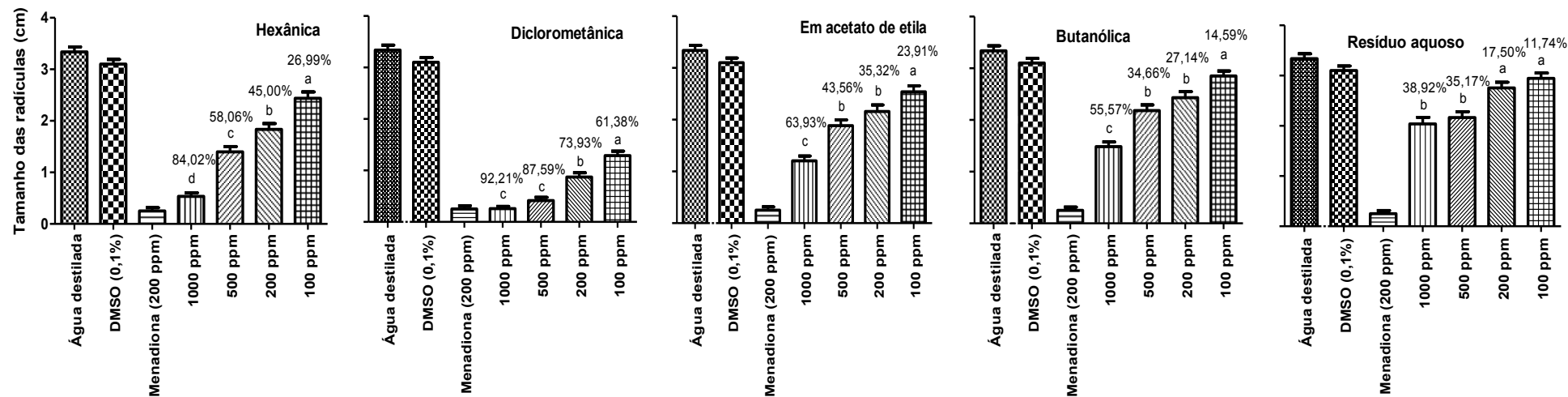


Figura 17 – Avaliação da atividade alelopática das partições dos extratos de sementes de *Arachis hypogaea* (cv. BR-1) sobre o crescimento de hipocótilos e radículas de *L. sativa*.

I – Crescimento dos hipocótilos



II – Crescimento das radículas



Legenda: (C -) Controle negativo; (C +) Controle positivo.

Nota: Os dados são apresentados em comprimentos médios de cada órgão e os percentuais de inibição em relação ao controle de água destilada encontram-se nas respectivas barras. Letras iguais indicam não haver diferença estatisticamente significativa entre os dados de um mesmo gráfico, de acordo com o teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

Conforme esperado, o valor mais baixo para o  $Cl_{50}$  foi encontrado com a partição diclorometânica (19,70 ppm, sobre as radículas), enquanto o mais alto foi apresentado pela partição em resíduo aquoso (1360,0 ppm, sobre as radículas). Todas as partições avaliadas, com exceção da diclorometânica, apresentaram valores de  $Cl_{50}$  mais baixos para hipocótilos quando comparados com radículas (Tabela 12).

Tabela 12 –  $Cl_{50}$  da atividade alelopática das partições do extrato de semente da cv. BR-1 de *Arachis hypogaea*.

Partições do extrato de semente da cv. BR-1 ( <i>Arachis hypogaea</i> )	$Cl_{50}$ (ppm)	
	Hipocótilos	Radículas
Hexânica	93,93	216,8
Diclorometânica	23,88	19,70
Em acetato de etila	42,95	447,6
Butanólica	361,6	976,6
Resíduo aquoso	310,7	1360,0

O valor de  $Cl_{50}$  (19,70 ppm) obtido com a partição diclorometânica foi utilizado para a avaliação da inibição do crescimento sobre duas espécies silvestres de plantas daninhas que afetam plantações de *Arachis hypogaea*, *Commelina benghalensis* e *Ipomoea nil*. Embora a inibição do crescimento de *I. nil* tenha sido maior do que a de *C. benghalensis*, o efeito em ambas as espécies foi menor do que o observado em *L. sativa* (Tabela 13).

Tabela 13 – Inibição do crescimento de plantas daninhas (*Commelina benghalensis* e *Ipomoea nil*) pela partição diclorometânica do extrato de semente da cv. BR-1 de *Arachis hypogaea*.

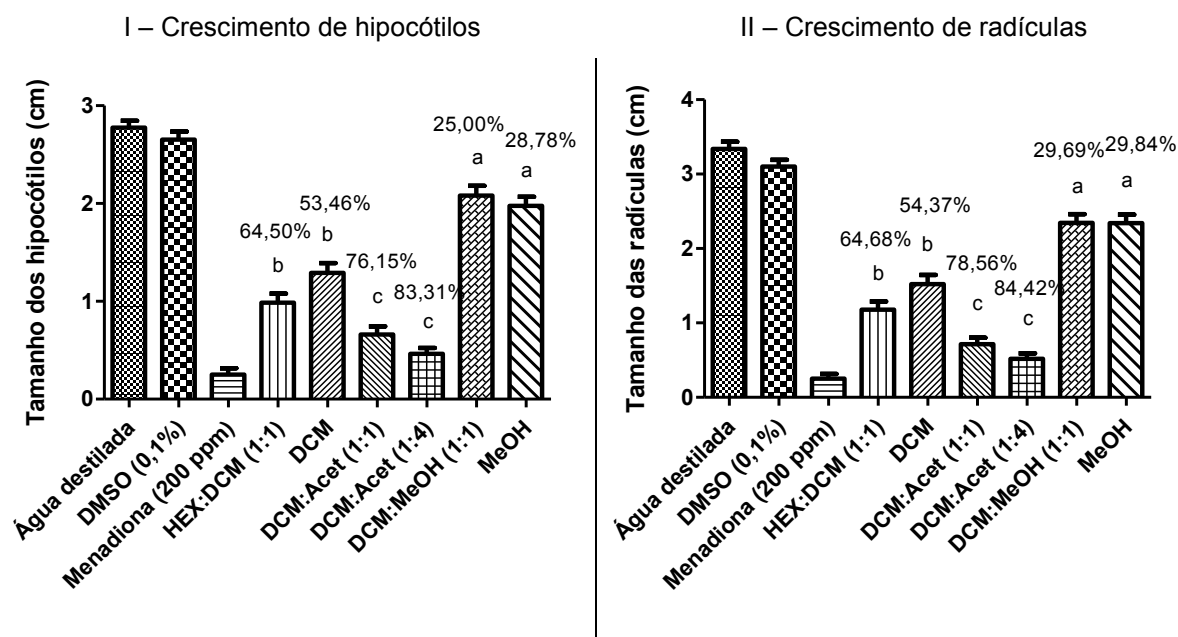
Espécie	Inibição do crescimento de sementes de plantas daninhas pela partição diclorometânica de extrato de semente com tegumento da cv. BR-1 (Cl <sub>50</sub> = 19.70 ppm) (%)	
	Hipocótilo	Radícula
<i>Commelina benghalensis</i>	14,29 <sup>b</sup>	23,56 <sup>b</sup>
<i>Ipomoea nil</i>	33,78 <sup>a</sup>	38,11 <sup>a</sup>

Letras iguais indicam não haver diferença estatisticamente significativa entre os valores de cada coluna, pelo método de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

#### 4.4.3 Avaliação das frações

Nessa etapa foram avaliadas as frações da partição diclorometânica do extrato etanólico de semente da cv. BR-1, utilizando a concentração correspondente ao valor de Cl<sub>50</sub> da partição diclorometânica (19,70 ppm). A inibição da germinação mais elevada foi provocada pelas frações diclorometano:acetona (1:1) (78,56%) e diclorometano:acetona (1:4) (84,42%) (Figura 18).

Figura 18 – Avaliação da atividade alelopática das frações da partição diclorometânica do extrato de semente de *Arachis hypogaea* (cv. BR-1), a 19,70 ppm, sobre o crescimento de hipocótilos e radículas de *L. sativa*.



Legenda: (HEX) hexano; (DCM) diclorometano; (Acet) acetona; (MeOH) metanol.

Nota: Os dados são apresentados em comprimentos médios de cada órgão e os percentuais de inibição em relação ao controle de água destilada encontram-se nas respectivas barras. Letras iguais indicam não haver diferença estatisticamente significativa entre os dados de um mesmo gráfico, de acordo com o teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

Os resultados desta etapa do trabalho constituem os artigos “**Allelopathic activity of callus extracts from different Brazilian peanut (*Arachis hypogaea* L.) cultivars on lettuce (*Lactuca sativa*): effect of light quality and temperature during callogenesis**”, publicado no periódico *International Journal of Green and Herbal Chemistry* (Apêndice A), e “**Allelopathic activity of extracts from different Brazilian peanut (*Arachis hypogaea* L.) cultivars on lettuce (*Lactuca sativa*) and weed plants**”, publicado no periódico *The Scientific World Journal* (Apêndice B).

#### 4.5 Discussão

A atividade alelopática de determinadas espécies é importante para conter a propagação de ervas daninhas em culturas. Dessa forma, alguns extratos vegetais podem atuar como herbicidas naturais, trazendo benefícios para as culturas. As avaliações da atividade alelopática foram realizadas com extratos etanólicos de partes aéreas, raízes, tegumentos e sementes, e calos friáveis oriundos de explantes foliares de plantas *in vitro*, de cinco cultivares de *A. hypogaea*. Estudos sobre alelopatia de extratos dessa espécie de amendoim já foram realizados anteriormente por outros pesquisadores, embora em pequeno número. Gao e colaboradores (2013) analisaram a inibição da germinação de sementes de pepino por extratos aquosos de diferentes órgãos (raiz, caule, folha e flor), tendo encontrado maior atividade alelopática em extratos de raiz ( $CI_{50} = 150$  ppm), não tendo sido avaliados extratos de sementes. No presente trabalho, entretanto, os extratos de semente apresentaram o efeito inibitório mais elevado sobre o crescimento de hipocótilos de *L. sativa* ( $CI_{50} = 72,98$  ppm). Esta diferença mostra que a atividade alelopática de diferentes órgãos da mesma planta pode variar de acordo com o método usado e a espécie-alvo.

A inibição da germinação é um dos parâmetros mais utilizados para avaliar a atividade alelopática. Extratos de partes aéreas de *Equisetum giganteum* e *Nephrolepis exaltata* não tiveram nenhum efeito sobre as sementes de *L. sativa* (FRANCO et al., 2014). Por outro lado, no presente trabalho o extrato etanólico bruto de sementes e tegumento causou quase 50% de inibição da germinação das sementes de *L. sativa*. Partições não polares (hexânica e diclorometânica) de extrato aquoso de folhas de *Sapindus saponaria* (fruta-de-sabão) foram as que mais inibiram a germinação de *L. sativa* (GRISI et al., 2013). Resultado similar foi obtido com as mesmas partições de sementes de *A. hypogaea*, neste trabalho.

Além da germinação das sementes de *L. sativa*, os extratos foram avaliados em relação ao seu efeito sobre o crescimento das plântulas. Entre os órgãos avaliados, extratos de sementes apresentaram os menores valores de  $CI_{50}$  para a inibição do crescimento dos hipocótilos (72,98 ppm) e das radículas (77,43 ppm). Estes valores foram ainda menores do que os relatados por outros autores para a

inibição do crescimento de *L. sativa* pelo *trans*-resveratrol ( $IC_{50} = 90$  ppm), uma substância típica de espécies de *Arachis* (FAN et al., 2010).

As concentrações utilizadas para determinar a atividade inibitória do crescimento de plantas normalmente são mais elevadas do que as encontradas no presente trabalho. Esse fato não é razoável quando se pensa no uso agrícola das substâncias alelopáticas, considerando a possibilidade de danos ao meio ambiente. Por exemplo, as radículas de *L. sativa* mostraram um comprimento médio de 5,78 cm quando tratadas com extratos de *Cuscuta campestris* a uma concentração de 100 ppm. Este valor de tamanho foi quase três vezes superior ao observado com extratos de sementes de *A. hypogaea* para a mesma espécie e na mesma concentração (menos do que 2,00 cm) (OTHMAN et al., 2012). Na avaliação dos extratos de fruto do café (*Coffea arabica*), a concentração necessária para a inibição do crescimento de hipocótilos e radículas de *L. sativa* ser numericamente semelhante à encontrada no nosso trabalho deveria ser dez vezes superior (1000 ppm) (SILVA et al., 2013). Em um estudo sobre a atividade alelopática de extratos de frutos de *Terminalia cattapa* sobre *L. sativa*, demonstrou-se que o  $CI_{50}$  da partição diclorometânica foi 4,5 vezes menor quando comparado com extratos etanólicos brutos (BARATELLI, et al., 2012). Em um trabalho com subfrações de *Cleome arabica* foi necessária uma concentração de 3.000 ppm para inibir 50% do crescimento de *L. sativa* (LADHARI et al., 2013). Estas concentrações foram muito mais elevadas do que a utilizada para a inibição de 50% do crescimento da mesma espécie com a partição diclorometânica (19,70 ppm) no presente estudo. Assim, os valores de  $CI_{50}$  encontrados neste trabalho (77,43 ppm e 19,70 ppm para o extrato bruto e para a partição diclorometânica, respectivamente) referentes à inibição do crescimento das radículas de *L. sativa* fornecem indicações sobre a eficácia do material estudado para se obter substâncias com atividade herbicida potencial.

Na avaliação da partição diclorometânica do extrato etanólico de sementes de *A. hypogaea* realizada no presente estudo, mostrou-se a inibição do crescimento de ervas daninhas de modo semelhante aos resultados relatados por Baratelli e colaboradores (2012) com extratos de frutas de *Terminalia catappa*.

Embora mais estudos sejam necessários a fim de identificar as substâncias aleloquímicas presentes nos extratos investigados, os extratos de materiais *in vivo* e *in vitro* de *A. hypogaea* podem ser considerados ferramentas importantes para o desenvolvimento de herbicidas naturais.

#### 4.6 Conclusões

- Considerando os extratos brutos, a semente da cv. BR-1 apresentou a maior atividade alelopática sobre *Lactuca sativa*;
- Dentre as partições do extrato etanólico de semente da cv. BR-1, a diclorometânica o maior percentual de inibição do crescimento de plântulas de *L. sativa*;
- A espécie daninha *Ipomoea nil* foi mais sensível à partição diclorometânica do extrato etanólico de semente com tegumento da cultivar BR-1 do que a espécie *Commelina benghalensis*;
- Os calos oriundos das cvs. IAC 886 e BR-1, cultivados sob luz fluorescente ou LED azul e vermelho, foram os que mostraram os maiores percentuais de inibição do crescimento de plântulas de *L. sativa*;
- As frações diclorometano:acetona (1:1) e diclorometano:acetona (1:4) apresentaram a maior atividade alelopática sobre plântulas de *L. sativa*.

## 5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL

### 5.1 Introdução

O câncer engloba um conjunto de mais de cem patologias, podendo ter várias causas, tais como má alimentação, sedentarismo, tabagismo, alcoolismo, radiação e hereditariedade. A Organização Mundial de Saúde estima que existam atualmente cerca de 27 milhões de pessoas acometidas por algum tipo de câncer no planeta. Até o ano de 2030, esse número poderá chegar a 75 milhões. Em países em desenvolvimento, as taxas de mortalidade pela doença são ainda maiores, levando à necessidade de maiores investimentos em políticas públicas, principalmente em relação à prevenção (BRITO et al., 2015; SANTOS; FULY, 2015).

Os tumores começaram a despertar a curiosidade dos seres humanos quase cinco séculos antes de Cristo. O termo “carcinomas” foi inicialmente utilizado por Hipócrates (anos 460 a 370 a.C.) para referir-se a certos tipos de tumores. A palavra vem do grego “caranguejo”, devido ao aspecto do tumor, uma vez que as projeções e os vasos sanguíneos no seu entorno remetem às patas desse crustáceo. Em 1930, o patologista Rupert Willis definiu o termo “neoplasia” como sendo uma massa anormal de tecido, cujo crescimento excede o de tecidos saudáveis, e que persiste mesmo após a interrupção dos estímulos que originaram a mudança (KUMAR; MÜLLER, 1999). Atualmente, o câncer caracteriza-se pela alteração do material genético e posterior proliferação desordenada e acelerada de células, que podem ou não se espalhar para outras partes do corpo (metástase). Os tumores ou neoplasias malignas não devem ser confundidos com os tumores benignos, que se multiplicam lentamente e são similares ao seu tecido original, raramente levando a risco de morte (NASCIMENTO et al., 2015; INCA, 2016).

Embora tenha sido incluído na agenda de Políticas Públicas em Saúde somente no ano de 1984, o câncer é reconhecido como um problema nessa área desde 1919. Atualmente, é a segunda doença considerada letal em território nacional, perdendo apenas para as doenças do sistema circulatório. Os tipos mais comuns são os de pele, pulmão, mama e próstata. Para o ano de 2017, são



esperados mais de 600 mil novos casos no país (ZAPPONI; MELO, 2010; SANTOS; FULY, 2015).

Diante de números tão alarmantes, a prevenção e o tratamento são as medidas mais eficazes no combate às neoplasias. A prevenção consiste basicamente em evitar a exposição aos fatores de risco, enquanto que as modalidades de tratamento mais comuns são quimioterapia, radioterapia, iodoterapia, cirurgia e transplante de medula óssea, que causam vários efeitos adversos (MAHAN; ESCOTT-STUMP, 2010).

Diante desse contexto, a busca por produtos naturais de origem vegetal que possam ter atividade protetora, ou mesmo combater determinados tipos de câncer, representa um tema muito importante e bastante estudado em todo o mundo (SREELATHA et al., 2011).

#### 5.1.1 Substâncias com ação antitumoral

Mais da metade dos medicamentos anticâncer aprovados para comercialização nos Estados Unidos e na Europa são originários de recursos naturais, principalmente de plantas terrestres. Esses números são ainda maiores quando se referem a países asiáticos, principalmente a China. Além disso, muitos medicamentos sintéticos também possuem análogos naturais (WANG et al., 2010b).

A atividade antitumoral de extratos e substâncias isoladas a partir de espécies vegetais (Figura 19) tem sido avaliada por vários autores (revisado por SHUKLA; MEHTA, 2015). O paclitaxel, terpeno isolado a partir de espécies da família Taxaceae e utilizado no tratamento de câncer de mama e ovário (MACIEL et al., 2002), é um dos exemplos mais conhecidos. Outros exemplos de terpenos são o limoneno, cujo papel relaciona-se à inibição da isoprenilação de proteínas da família G (VIEGAS et al., 2006), e o ácido oleanólico, que induz apoptose de células tumorais (LASZCZYK, 2009).

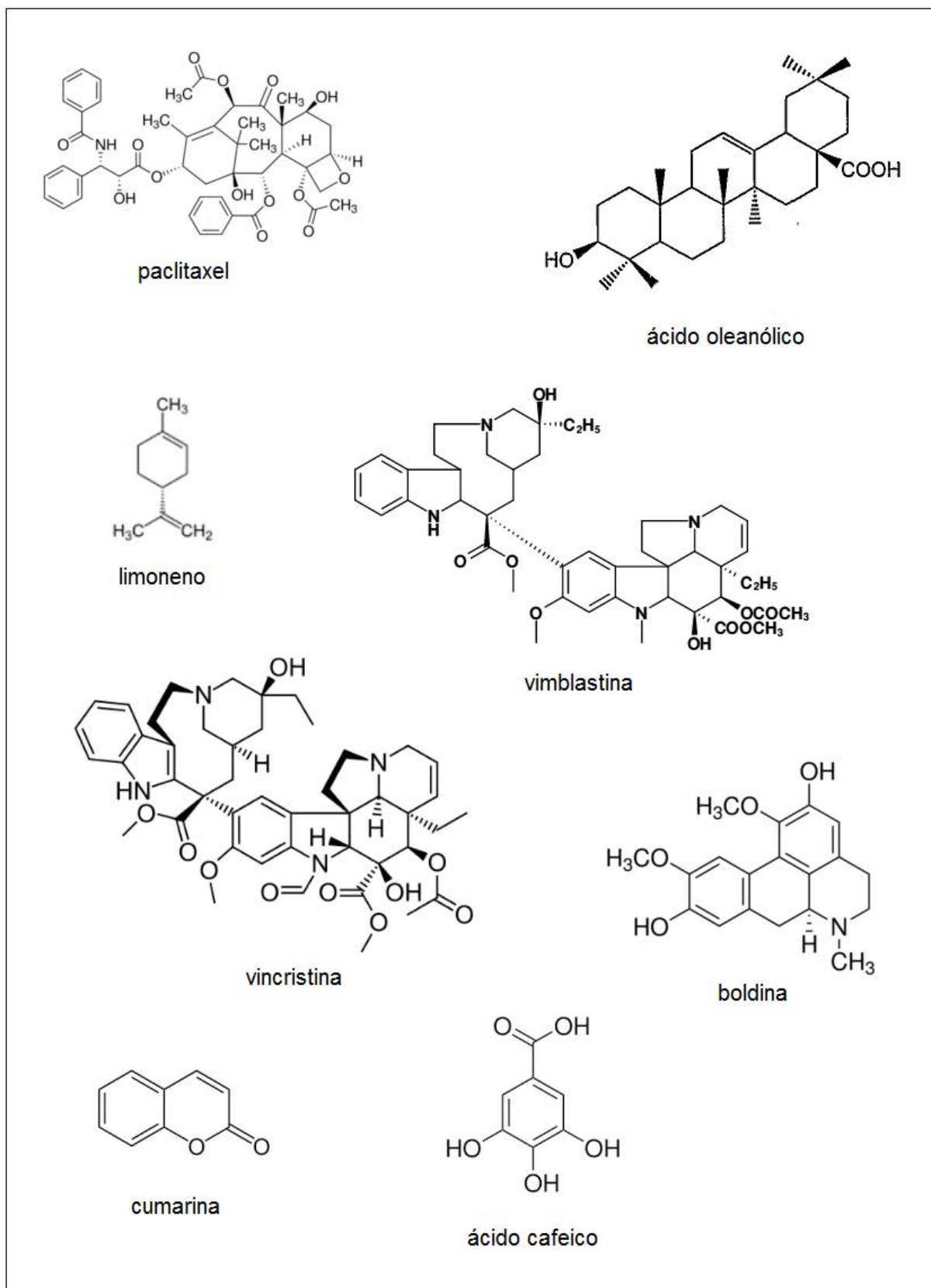
Os alcaloides são outro grupo amplamente estudado no combate a células tumorais. A vimblastina e a vincristina, substâncias extraídas de *Catharanthus roseus*, por exemplo, inibem a polimerização dos microtúbulos, interrompendo a mitose e causando a perda da capacidade de divisão celular (BRANDÃO et al.,

2010). A boldina, por sua vez, é um alcaloide com função comprovada em linhagens de glioma humano e de rato (GERHARDT et al., 2009).

Nos últimos anos, a atividade antitumoral também vem sendo mais intensamente estudada em outros grupos de metabólitos, como antocianinas (KUNTZ et al., 2015), cumarinas (JAMIER et al., 2014), curcuminoides (WRIGHT et al., 2013), polissacarídeos (CAI et al., 2013) e saponinas (LI et al., 2012).

Entretanto, o grupo dos polifenóis ainda é o mais investigado, por estar relacionado com a modulação da atividade enzimática e com a inibição da expressão de oncogenes (LIN et al., 1999; KHAN; MUKHTAR, 2013). Entre os polifenóis que possuem propriedades antitumorais encontram-se flavonoides (RONNEKLEIV-KELLY et al., 2016), taninos (GEORGIEV et al., 2014), lignanas (LOWCOCK et al., 2013), alguns derivados do ácido cafeico (HE et al., 2014) e estilbenos (PAPANDREOU, et al., 2015).

Figura 19 – Substâncias com atividade antitumoral.



### 5.1.2 Atividade antitumoral de espécies do gênero *Arachis*

Até o momento, a capacidade antitumoral do gênero foi investigada apenas em *A. hypogaea*. Alguns autores consideram que o consumo regular de amendoim está associado à redução da incidência de cânceres de próstata, mama, intestino e neuroblastoma, principalmente (AWAD et al., 2000; KING et al., 2005). Esta propriedade parece relacionar-se principalmente com a presença de estilbenos, substâncias de baixo peso molecular encontradas nas folhas, frutos e extremidades radiculares de espécies do gênero *Arachis*, que atuam como fitoalexinas induzidas por estresses biótico e abiótico (BAVARESCO et al., 2007).

Abbott e colaboradores (2010) observaram que *trans*-resveratrol, araquidina-1 e araquidina-3 purificados a partir de extratos de raízes em cabeleira de *A. hypogaea*, apresentaram toxicidade sobre duas linhagens de células cancerosas cervicais (RAW 264.7 e HeLa) *in vitro*. De maneira similar, preparações de araquidina-1 isolada a partir de sementes de amendoim ocasionaram danos à membrana e a ativação de caspases, o que resultou na apoptose de células leucêmicas *in vitro* (HUANG et al., 2010). Além disso, os estilbenos apresentam ainda outros mecanismos anticâncer, relacionados à oxidação de moléculas potencialmente cancerígenas e alteração da expressão gênica (GAGLIANO et al., 2010; GEETHA et al., 2013). Sobolev e colaboradores (2011) também investigaram a atividade antitumoral de vários tipos de estilbenos (SOBOLEV et al., 2011).

Neste trabalho, foi estudada a atividade redutora mitocondrial (ARM) de diferentes extratos, partições e frações de materiais *in vivo* e *in vitro* de cinco cultivares de *A. hypogaea*, visando a avaliar a influência do genótipo sobre a proliferação de células cancerígenas. A ARM é uma medida direta da sobrevivência das células tumorais.

## 5.2 Objetivos

### 5.2.1 Objetivo geral

Avaliar a atividade antitumoral de materiais obtidos de cinco cultivares de *A. hypogaea*.

### 5.2.2 Objetivos específicos

- Investigar a toxicidade de extratos brutos das cinco cultivares *in vivo* e *in vitro* sobre a linhagem de células de leucemia mieloide crônica (K562);
- Comparar a toxicidade do extrato bruto da cultivar mais ativa e suas partições em diferentes linhagens de células carcinogênicas (K562, PC3, MCF7 e A549);
- Biomonitorar o fracionamento da partição mais ativa com a linhagem tumoral mais sensível;
- Determinar a concentração mínima inibitória (CI<sub>50</sub>) do material vegetal mais ativo na linhagem celular tumoral mais sensível;
- Avaliar a toxicidade dos extratos sobre células não tumorais.

### 5.3 Material e métodos

#### 5.3.1 Material vegetal

Foram utilizados materiais derivados de plantas mantidas em condições naturais (partes aéreas, raízes, tegumentos e sementes) e materiais produzidos *in vitro* (partes aéreas, raízes e calos) de cinco cultivares de *Arachis hypogaea*, a saber: IAC 886, IAC Caiapó, IAC Tatu ST, IAC 8112 e BR-1. As plantas *in vitro* foram obtidas a partir de eixos embrionários íntegros excisados de sementes e mantidas a  $25\pm 2^\circ\text{C}$ , sob fotoperíodo de 16h, com intensidade luminosa média de  $63 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  fornecida por lâmpadas fluorescentes do tipo branca fria. Os calos foram obtidos 30 dias após a inoculação de explantes foliares de plantas *in vitro*, em meio MS suplementado com picloram a  $1,25 \mu\text{M}$ , sob as mesmas condições já descritas. Os materiais de plantas cultivadas em condições naturais foram coletados após 30 dias do cultivo de sementes em Plantmax<sup>®</sup> HA.

O preparo de extratos brutos dos diferentes materiais, assim como as partições e frações da amostra mais ativa foi realizado conforme descrito no item 4.3.2. As amostras-teste foram ressolubilizadas em DMSO e o volume foi ajustado para a concentração final de  $100 \mu\text{g}/\text{mL}$  em meio de cultura (solução estoque mantida a  $-20^\circ\text{C}$ ).

Os procedimentos descritos a seguir foram realizados no Laboratório de Imunologia Aplicada e Bioquímica de Proteínas e Produtos Naturais, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ), em colaboração com as professoras Kátia Costa de Carvalho Sabino e Graça Justo, com as Dr<sup>as</sup>. Gislaine Pereira da Silva e Nathália Regina Felizardo Leal, além do biólogo Márcio Soares.

#### 5.3.2 Linhagens celulares

Neste trabalho foram utilizadas linhagens de células de leucemia mieloide crônica humana (K562), adenocarcinoma de próstata (PC3), adenocarcinoma de

mama (MCF7) e adenocarcinoma alveolar basal (A549). Também foi utilizada uma linhagem celular não tumoral de fibroblastos (NIH-3T3) e células mononucleares de sangue periférico (CMNSP), para pesquisa de especificidade da toxicidade das amostras sobre células tumorais. Estas linhagens celulares foram compradas do Banco de Células do Rio de Janeiro e encontram-se criopreservadas em nitrogênio líquido no Departamento de Bioquímica da UERJ, Rio de Janeiro.

### 5.3.3 Reagentes

Meio RPMI 1640, sulfato de estreptomicina, Invitrogen, EUA. Penicilina G potássica, Fontoura-Wyerth, Brasil. Soro Fetal Bovino (SFB), Vitrocell, Brasil. Azul de tripan, Iodeto de propídio (PI), Tripsina, 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5difenil-tetrazol brometo (MTT), Dodecil sulfato de sódio (SDS), ácido sulfanílico, dicloridrato de N-(1-naftil)-etilenodiamina, Lipopolissacarídeo de *E. coli* (LPS), Fitohemaglutinina, Glutamina, Ficoll-Hipaque, Sigma Chemical Co, EUA. Todos os outros reagentes utilizados foram de grau analítico.

### 5.3.4 Manutenção das linhagens celulares

Após o descongelamento, as células K562, PC3, MCF-7, A549 e NIH-3T3 eram 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 CO<sub>2</sub>, com duas ou três passagens por semana. As células aderentes eram destacadas das garrafas por tratamento com 0,25% de tripsina + 0,53 mM EDTA, seguido de neutralização com meio contendo 10% soro fetal bovino, centrifugação (400 x g, 5 min) e suspensão em meio completo. As células foram mantidas em cultura até a vigésima passagem, quando uma nova alíquota de células era descongelada do banco de células.

### 5.3.5 Isolamento e cultura de células mononucleares de sangue periférico

Células mononucleares de sangue periférico (CMNSP) foram isoladas de sangue humano por centrifugação em gradiente de densidade utilizando solução de Ficoll-Hipaque. O sangue foi coletado de voluntários saudáveis, com seringas contendo heparina, e centrifugado por 20 min a 400 x g, a 18-20°C. Após descarte do plasma, a camada rica em leucócitos situada acima das hemácias e conhecida como *buffy coat* foi transferida para um tubo falcon. O volume de células do *buffy coat* foi homogeneizado vagorosamente e diluído quatro vezes em meio RPMI 1640 previamente diluído duas vezes com NaCl 0,9% contendo ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 2 mM. Um volume de 5 mL da suspensão celular assim obtida foi transferido lentamente, pela parede, para um tubo contendo 3 mL de solução de Ficoll-Hipaque. Após centrifugação (400 x g, a 18-20°C, por 30 min), a camada contendo CMNSP foi transferida para outro tubo. Uma alíquota da suspensão celular foi diluída para contagem das células viáveis em câmara de Neubauer. As células foram lavadas (ressuspensas em RPMI-EDTA e centrifugadas a 400 x g por 3 min), o sobrenadante retirado e o precipitado suspenso em RPMI completo suplementado com glutamina (2 mM) e 2-OH-mercaptoetanol (50 µM).

As amostras que apresentaram maior toxicidade sobre a linhagem tumoral mais sensível testada também foram testadas sobre as CMNSPs ( $1 \times 10^6/\text{mL}$ ). Para isto, essas células foram cultivadas por 72 horas a 37°C, em atmosfera úmida e com 5% de CO<sub>2</sub>, em RPMI suplementado, com e sem fitohemaglutinina (PHA) 2,5 µg/mL, na presença e ausência de diferentes concentrações das amostras (volume final de 200 µL/poço, placa de 96 poços).

### 5.3.6 Ensaio de citotoxicidade *in vitro* das amostras

A atividade antitumoral *in vitro* foi determinada pelo teste de MTT (MOSMANN, 1983). Para isso, as células foram incubadas em placas de 96 poços sem (controle negativo) ou com as diferentes amostras-teste na concentração de 100 µg/mL. Também foi realizado *screening*, em diferentes concentrações (de 1 a



200 µg/mL), para determinação do IC<sub>50</sub> (concentração que determina a redução de 50% da viabilidade), ou meio de cultura (controle negativo), sendo o volume final de 100 µL. As células foram incubadas nas mesmas condições descritas anteriormente. Após 70 h, 10 µL da solução estoque de MTT (Sigma<sup>®</sup>, EUA), preparada na concentração de 5 mg/L em tampão salina tamponado com fosfato (PBS), pH 7.4, foram adicionados a cada poço, e as placas foram incubadas a 37°C e CO<sub>2</sub> a 5% por mais duas horas. Após esse tempo, 100 µL de dodecil sulfato de sódio (SDS, Sigma<sup>®</sup>) a 10% contendo HCl 0,01 N (v/v) (Merck<sup>®</sup>) foram adicionados a cada poço e as placas foram novamente incubadas nas mesmas condições por 24 h. A absorvância dos poços foi então medida a 570 nm em espectrofotômetro (µQuant, Bio-Tek Instruments Inc., EUA). Os resultados foram expressos como o percentual de atividade redutora mitocondrial (ARM), que é um parâmetro análogo à taxa de sobrevivência das células em relação ao controle, considerando os valores obtidos no controle como sendo 100%, após a subtração dos valores correspondentes ao branco da amostra. Três experimentos independentes foram realizados em triplicata.

### 5.3.7 Análise estatística

A análise de variância dos dados foi realizada pelo teste One-way ANOVA, enquanto a significância das diferenças dos grupos em relação ao controle foi avaliada pelos pós-testes de Dunnet ou Tukey, utilizando o programa Graphpad Prism 5<sup>®</sup>. Foram considerados significativos os valores de  $p \leq 0,05$ , tendo sido adotado um intervalo de confiança de 95%.

## 5.4 Resultados

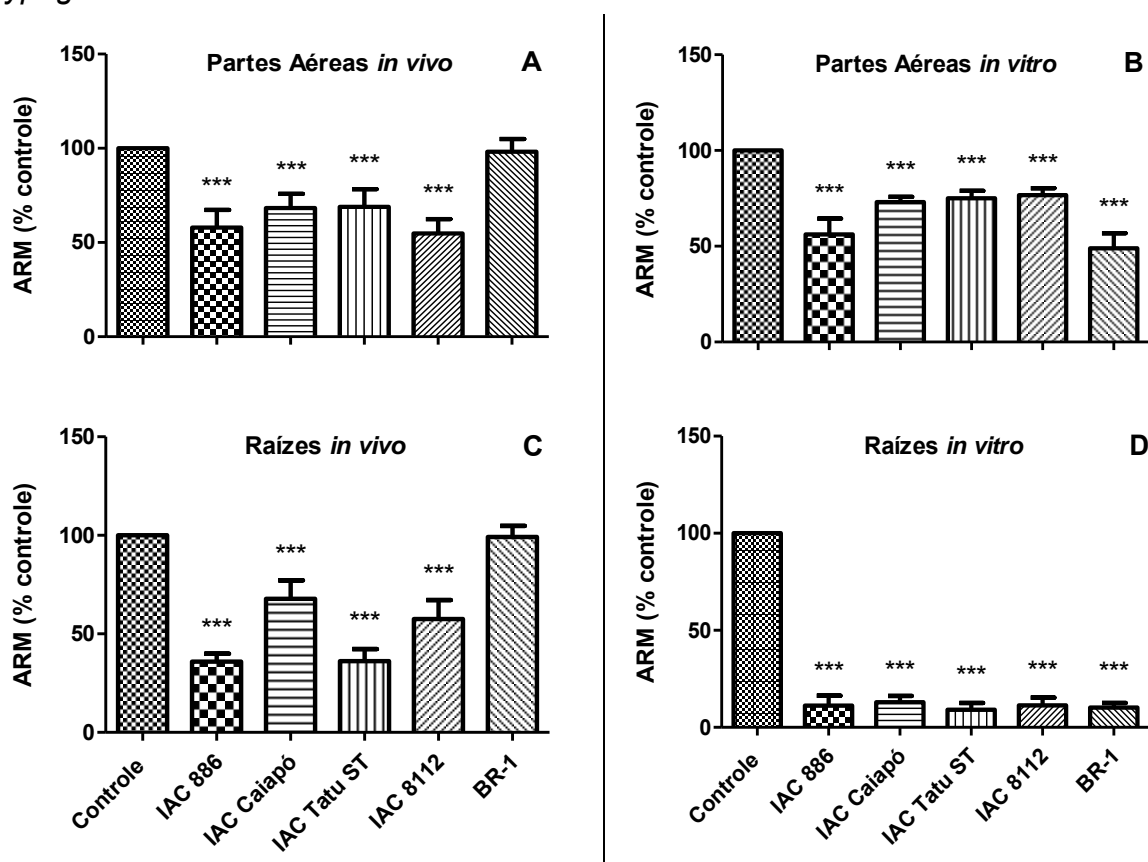
### 5.4.1 Avaliação da toxicidade sobre células da linhagem mieloide crônica (K562)

#### 5.4.1.1 Citotoxicidade dos extratos brutos de parte aérea, raiz e calo

Extratos brutos de partes aéreas de plantas mantidas *in vivo* (Figura 20A) e *in vitro* (Figura 20B) das cultivares IAC886, IAC Caiapó e IAC Tatu ST apresentaram atividades citotóxicas similares sobre as células leucêmicas K562, enquanto a parte aérea *in vivo* da IAC 8112 apresentou maior citotoxicidade (redução da ARM de 45,19%) que a planta *in vitro* (redução da ARM de 23,37%). Por outro lado, o extrato da parte aérea *in vitro* da cultivar BR-1 apresentou maior citotoxicidade (redução da ARM de 51,09%) em relação à planta *in vivo* (redução da ARM de 1,76%).

Com relação aos extratos de raízes de plantas mantidas *in vivo* (Figura 20C), as cultivares IAC 886 e IAC Tatu ST foram as que apresentaram maior toxicidade sobre as células K562 (reduções da ARM de 64,11% e 63,78%, respectivamente), em relação às demais cultivares. Em relação aos extratos de raízes de plantas produzidas *in vitro* (Figura 20D), todas as cultivares testadas mostraram valores de ARM mais baixos em relação aos obtidos com os extratos de partes aéreas, indicando maior efeito citotóxico. As cultivares IAC 886, IAC Caiapó, IAC Tatu ST, IAC 8112 e BR-1 apresentaram citotoxicidade de 88,85%, 87,10%, 90,88%, 88,73% e 89,85%, respectivamente.

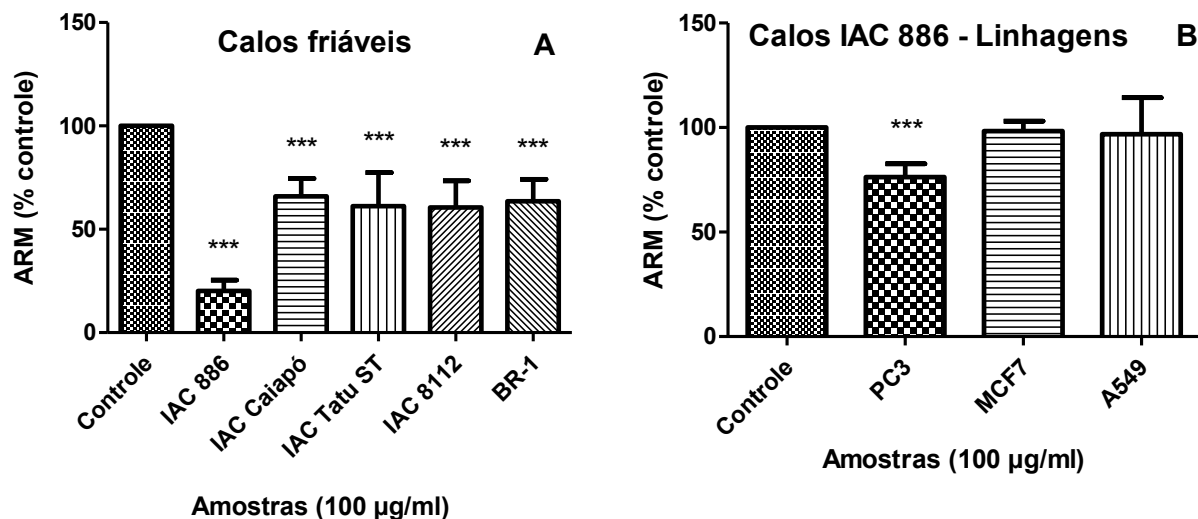
Figura 20 – Atividade Redutora Mitocondrial (ARM) de linhagem celular leucêmica humana (K562) incubada com extratos etanólicos de partes aéreas e raízes de plantas obtidas *in vivo* e produzidas *in vitro* de cinco cultivares de *Arachis hypogaea*.



Nota: As células ( $5 \times 10^4/\text{mL}$ ) foram incubadas na ausência ou presença das amostras ( $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) por 72 h a  $37^\circ\text{C}$ , 5% de  $\text{CO}_2$  e atmosfera úmida. Os dados representam a média  $\pm$  desvio padrão (DP) de 3 experimentos independentes. A absorvância da cultura controle (sem amostras) de cada experimento foi considerada como 100%.  $***p \leq 0,001$ , em relação ao controle (*One-way Anova*, seguido do teste de Dunnet).

No que se refere aos extratos de calos oriundos de explantes de segmentos foliares, a maior citotoxicidade foi observada com o extrato de calo da cv. IAC 886 (redução da ARM de 79,83%), cultivado a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  sob luz fluorescente (Figura 21A). Esse valor para os calos foi mais alto do que os obtidos com extratos de explantes originais *in vivo* e *in vitro* (Figura 20). Comparando os resultados de toxicidade obtidos ao partir do extrato bruto da cv. IAC 886 em K562 com os observados sobre as linhagens de tumores sólidos (Figura 21B), PC3 (redução da ARM de 23,67%), MCF-7 (redução da ARM de 1,63%) e A549 (redução da ARM de 3,16%), observamos que as células K562 se mostraram mais sensíveis aos extratos.

Figura 21 – Atividade Redutora Mitocondrial (ARM) de linhagem celular leucêmica humana K562 e linhagens de tumores sólidos incubadas com extratos etanólicos de calos friáveis de *Arachis hypogaea* cultivados em meio MS suplementado com picloram a 1,25  $\mu$ M e mantidos a 25°C, sob luz fluorescente branca.



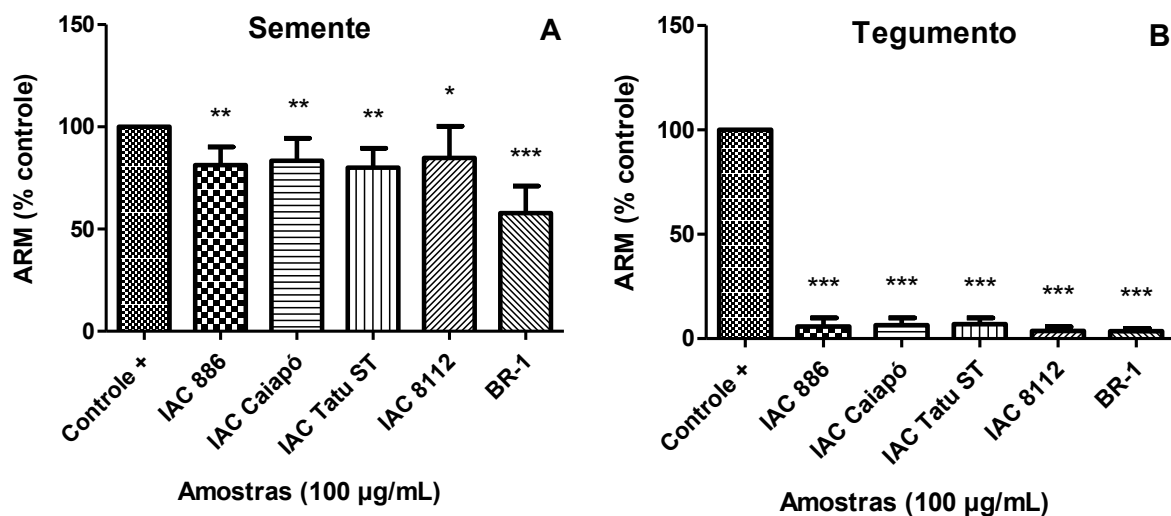
Legenda: (A) Células leucêmicas K562 tratadas com extratos de diferentes cultivares; (B) Células tumorais de próstata (PC3), mama (MCF-7) e pulmão (A549) tratadas com extrato de calos da cv. 886.

Nota: As células ( $5 \times 10^4$ /mL) foram incubadas na ausência ou presença das amostras (100  $\mu$ g/mL) por 72 h a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> e atmosfera úmida. Os dados representam a média  $\pm$  desvio padrão (DP) de 3 experimentos independentes. A absorvância da cultura controle (sem amostras) de cada experimento foi considerada como 100%. \*\*\* $p \leq 0,001$ , em relação ao controle (One-way Anova, seguido do teste de Dunnet).

#### 5.4.1.2 Citotoxicidade dos extratos brutos de sementes e tegumentos

Devido ao elevado teor de óleo presente em sementes e tegumento de *A. hypogaea*, os extratos hexânicos destes materiais também foram avaliados. Se por um lado apenas o extrato hexânico de semente da cv. BR-1 apresentou uma citotoxicidade mais elevada que os demais (42,20%) (Figura 22A), todos os extratos hexânicos de tegumento mostraram elevada citotoxicidade, variando entre 93,05% e 96,44% (Figura 22B).

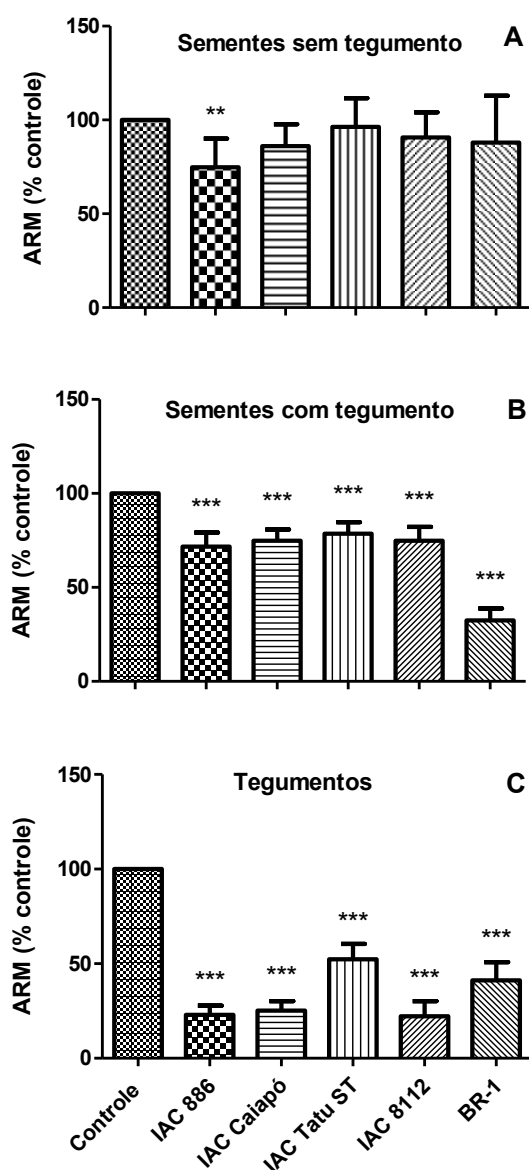
Figura 22 – Atividade Redutora Mitocondrial (ARM) de linhagem celular leucêmica humana K562 incubada com extratos hexânicos de sementes e tegumentos de *Arachis hypogaea*.



Nota: As células ( $5 \times 10^4$ /mL) foram incubadas na ausência ou presença das amostras (100 µg/mL) por 72 h a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> e atmosfera úmida. Os dados representam a média  $\pm$  desvio padrão (DP) de 3 experimentos independentes. A absorvância da cultura controle (sem amostras) de cada experimento foi considerada como 100%. \*\* $p \leq 0,01$  e \*\*\* $p \leq 0,001$ , em relação ao controle (*One-way* Anova, seguido do teste de Dunnet).

Considerando os extratos de sementes sem tegumentos (Figura 23A), apenas os obtidos da cultivar IAC 886 provocaram uma redução significativa de ARM (25,22%). Quando os tegumentos não foram retirados das sementes (Figura 23B), todos os extratos causaram uma redução significativa da atividade, sendo que o maior valor (67,62%) foi observado com a cultivar BR-1. Por outro lado, os extratos brutos de tegumentos isolados foram os que proporcionaram a maior redução de ARM (Figura 23C), comparados com a semente com ou sem tegumento. Os extratos de tegumento isolado das cvs. IAC 886, IAC Caiapó, e IAC 8112 foram as que apresentaram maior citotoxicidade (77,11%, 74,75% e 77,80%, respectivamente).

Figura 23 – Atividade Redutora Mitocondrial (ARM) de linhagem celular leucêmica humana K562 incubada com extratos etanólicos de sementes com e sem tegumentos e tegumentos isolados de *Arachis hypogaea*.



Nota: As células ( $5 \times 10^4/\text{mL}$ ) foram incubadas na ausência ou presença das amostras ( $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) por 72 h a  $37^\circ\text{C}$ , 5% de  $\text{CO}_2$  e atmosfera úmida. Os dados representam a média  $\pm$  desvio padrão (DP) de 3 experimentos independentes. A absorvância da cultura controle (sem amostras) de cada experimento foi considerada como 100%. \*\* $p \leq 0,01$  e \*\*\* $p \leq 0,001$ , em relação ao controle (*One-way* Anova, seguido do teste de Dunnet).

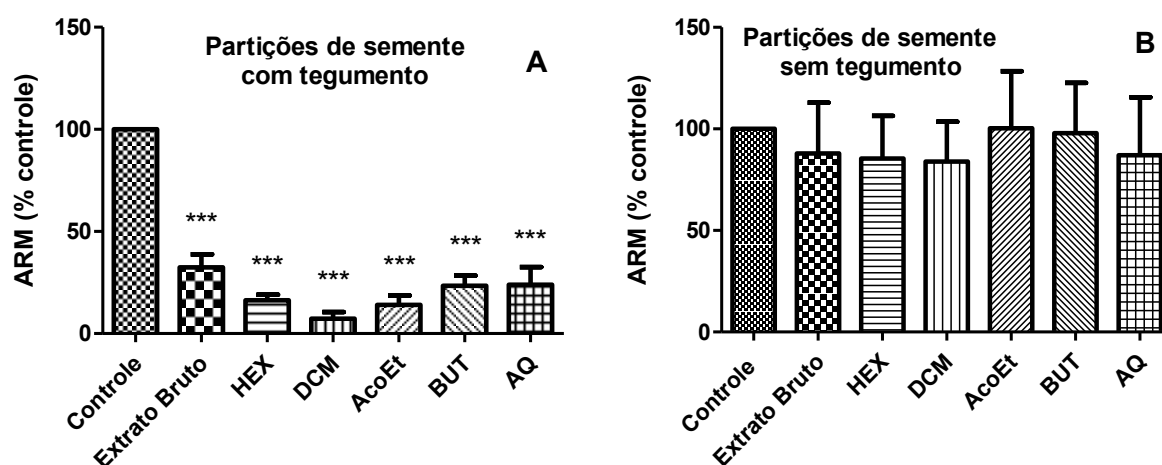
Diante destes resultados e das dificuldades associadas ao particionamento do extrato do tegumento isolado (pouca quantidade de matéria prima vegetal), selecionou-se, para particionar, o extrato etanólico de sementes com tegumentos, e selecionou-se a cultivar BR-1, por esta ter apresentado a maior toxicidade sobre células K562 (Figura 23B). O extrato bruto da semente sem tegumento também foi particionado, para comparação.

#### 5.4.1.3 Citotoxicidade das partições de extratos de sementes com tegumentos da cv. BR-1

Todas as partições do extrato de sementes com tegumentos da cultivar BR-1 (hexânica, diclorometânica, em acetato de etila, butanólica e resíduo aquoso) apresentaram baixa atividade redutora mitocondrial (Figura 24A), indicando citotoxicidade de 83,66%, 92,64%, 85,99%, 76,57% e 76,06%, respectivamente. As respectivas partições do extrato de sementes sem tegumentos, por outro lado, não apresentaram citotoxicidade significativa (Figura 24B).

Comparando a citotoxicidade das diferentes partições, observou-se que a partição diclorometânica (DCM) foi a que induziu maior redução na atividade redutora mitocondrial das células K562 (Figura 24A), comparada à partição hexânica (HEX) ( $p \leq 0,05$ ) e AcoEt ( $p \leq 0,05$ ). Por esta razão, a fração DCM foi selecionada para continuar o fracionamento.

Figura 24 – Atividade Redutora Mitocondrial (ARM) de linhagem celular leucêmica K562 incubadas com partições de extratos de sementes com ou sem tegumento da cv. BR-1 de *Arachis hypogaea*.



Legenda: Partições (HEX) hexânica; (DCM) diclorometânica; (AcoEt) Em acetato de etila; (BUT) Butanólica; (AQ) Resíduo aquoso.

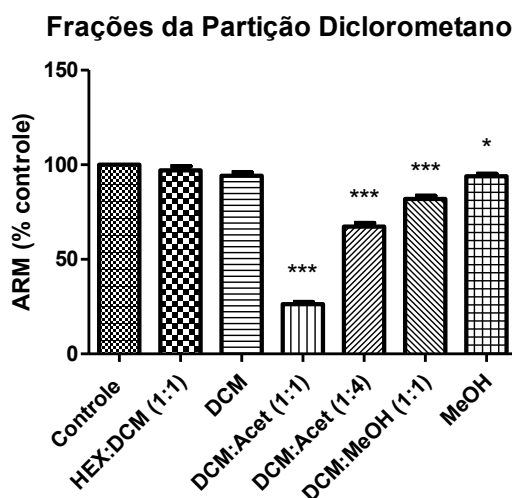
Nota: As células ( $5 \times 10^4$ /mL) foram incubadas na ausência ou presença das amostras (100  $\mu$ g/mL) por 72 h a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> e atmosfera úmida. Os dados representam a média  $\pm$  desvio padrão (DP) de 3 experimentos independentes. A absorvância da cultura controle (sem amostras) de cada experimento foi considerada como 100%. \*\*\* $p \leq 0,001$ , em relação ao controle (One-way Anova, seguido do teste de Dunnet).

#### 5.4.1.4 Citotoxicidade das frações da partição diclorometânica de semente com tegumento da cv. BR-1

Dentre as frações testadas da partição diclorometânica, a fração diclorometano:acetona (1:1) foi a que mostrou a menor atividade redutora mitocondrial (Figura 25), induzindo uma citotoxicidade de 73,74%.



Figura 25 – Atividade Redutora Mitocondrial (ARM) de linhagem celular leucêmica humana K562 incubada com extratos etanólicos de frações da partição diclorometânica de sementes com tegumento da cv. BR-1 de *Arachis hypogaea*.



Legenda: (HEX) hexano; (DCM) diclorometano; (Acet) acetona; (MeOH) metanol.

Nota: As células ( $5 \times 10^4$ /mL) foram incubadas na ausência ou presença das amostras (100  $\mu$ g/mL) por 72 h a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> e atmosfera úmida. Os dados representam a média  $\pm$  desvio padrão (DP) de 3 experimentos independentes. A absorvância da cultura controle (sem amostras) de cada experimento foi considerada como 100%. \* $p \leq 0,05$  e \*\*\* $p \leq 0,001$ , em relação ao controle (One-way Anova, seguido do teste de Dunnett).

#### 5.4.1.5 Comparação dos valores das amostras ativas da cv. BR-1

A  $CI_{50}$  (concentração na qual a amostra induz uma resposta na metade entre a taxa inicial e a máxima) dos materiais que apresentaram os melhores resultados com a linhagem K562 (extratos brutos de sementes com tegumento da cultivar BR-1, partição diclorometânica e fração diclorometano:acetona (1:1), além do extrato de calos da cultivar BR-1) foi calculada para efeito de análise comparativa desses materiais. As amostras vegetais com menores concentrações capazes de inibir 50% da viabilidade celular no ensaio ( $CI_{50}$ ) foram a partição diclorometânica ( $23,95 \pm 4,14$   $\mu$ g/mL), a fração DCM:Acet (1:1) ( $39,06 \pm 4,18$   $\mu$ g/mL) e o calo (IAC 886) ( $41,65 \pm 5,26$   $\mu$ g/mL), que foram estatisticamente diferentes do extrato bruto de semente com tegumento ( $81,08 \pm 19,03$   $\mu$ g/mL) (Tabela 14).

Tabela 14 – Valores de  $CI_{50}$  de diferentes materiais da cv. BR-1 e calo da cv. 886 de *Arachis hypogaea* sobre linhagem celular leucêmica humana K562.

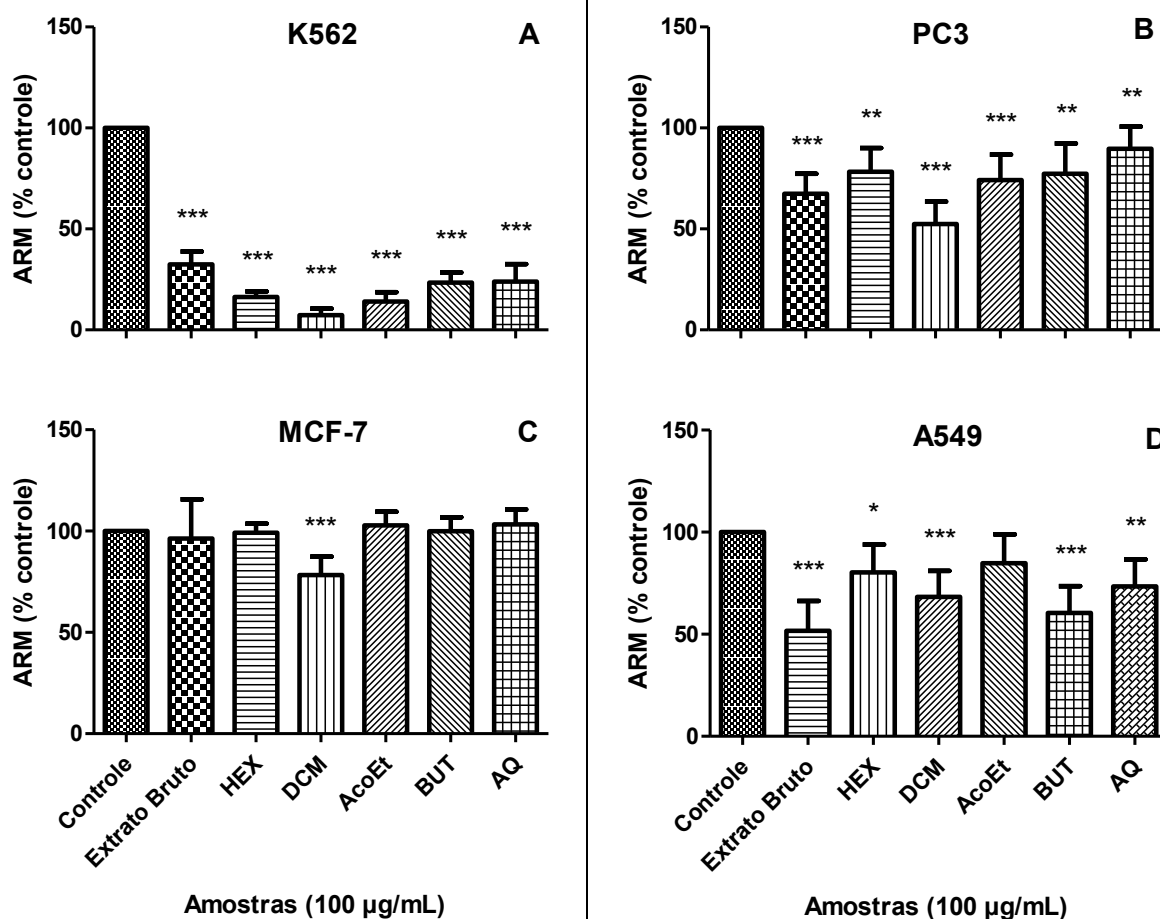
Materiais vegetais ( <i>Arachis hypogaea</i> )	$CI_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )
Semente com tegumento (Extrato bruto) (BR-1)	81,08 $\pm$ 19,03 <sup>a</sup>
Partição DCM (BR-1)	23,95 $\pm$ 4,14 <sup>b</sup>
Fração DCM:Acet (1:1) (BR-1)	39,06 $\pm$ 4,18 <sup>b</sup>
Calo (IAC 886)	41,65 $\pm$ 5,26 <sup>b</sup>

Nota: Os dados representam média  $\pm$  desvio padrão. Letras iguais indicam não haver diferença estatisticamente significativa entre os dados, de acordo com o teste de Tukey.

#### 5.4.2 Avaliação da toxicidade sobre células tumorais das linhagens PC3, MCF-7 e A549

Com o objetivo de comparar a sensibilidade da linhagem celular leucêmica humana K562 (Figura 26A) ao extrato bruto e partições da cv. BR-1 com linhagens celulares de tumores sólidos, foi realizado o ensaio de toxicidade com as linhagens tumorais de próstata (PC3) (Figura 26B), mama (MCF-7) (Figura 26C) e pulmão (A549) (Figura 26D). De uma maneira geral, estas linhagens apresentaram menor sensibilidade aos extratos do que a linhagem K562. Entretanto, assim como na linhagem K562, o extrato da partição diclorometânica foi o que apresentou as maiores atividades citotóxicas em relação às linhagens PC3 (47,54%) e MCF7 (21,73%), como mostrado nas Figuras 26B e 26C, respectivamente.

Figura 26 – Comparação do efeito do extrato etanólico de semente com tegumento (cv. BR-1 de *Arachis hypogaea*) e suas respectivas partições na Atividade Redutora Mitochondrial (ARM) da linhagem celular leucêmica humana K562 e linhagens celulares de tumores sólidos (PC3, MCF-7 e A549).



Legenda: Partições (HEX) hexânica; (DCM) diclorometânica; (AcoEt) Em acetato de etila; (BUT) Butanólica; (AQ) Resíduo aquoso.

Nota: As células ( $5 \times 10^4$ /mL) foram incubadas na ausência ou presença das amostras por 72 h a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> e atmosfera úmida. Os dados representam a média  $\pm$  desvio padrão (DP) de 3 experimentos independentes. A absorvância da cultura controle (sem amostras) de cada experimento foi considerada como 100%. \*\* $p \leq 0,01$  e \*\*\* $p \leq 0,001$ , em relação ao controle (One-way Anova, seguido do teste de Dunnett).

### 5.4.3 Avaliação da toxicidade sobre células não tumorais do tipo fibroblastos (NIH3T3)

Em relação ao estudo da toxicidade sobre células não tumorais, foi utilizada a linhagem de fibroblastos de camundongos (NIH-3T3). Dentre os materiais que apresentaram maior atividade tóxica sobre células leucêmicas K562 (extratos brutos de sementes com tegumento da cultivar BR-1, partição diclorometânica e fração diclorometano:acetona (1:1), além do extrato de calos da cultivar BR-1), todos apresentaram valores de  $CI_{50}$  maiores ( $p \leq 0,05$ ) do que os obtidos com a linhagem K562. O valor de  $CI_{50}$  do extrato de semente com tegumento não pôde ser calculado porque a ação tóxica desta amostra foi praticamente nula em todas as concentrações. Esses dados mostram que as amostras possuem toxicidade maior sobre as células K562 do que sobre as células animais (NIH-3T3) (Tabela 15).

Tabela 15 – Valores de  $CI_{50}$  da ação de diferentes materiais da cv. BR-1 de *Arachis hypogaea* sobre células de fibroblastos de camundongos (NIH-3T3).

Materiais vegetais ( <i>Arachis hypogaea</i> )	$CI_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )
Semente com tegumento (Extrato bruto) (BR-1)	>200,0 <sup>a</sup>
Partição DCM (BR-1)	43,00 $\pm$ 6,18 <sup>c</sup>
Fração DCM:Acet (1:1) (BR-1)	65,33 $\pm$ 8,14 <sup>c</sup>
Calo (IAC 886)	143,8 $\pm$ 18,11 <sup>b</sup>

Nota: Os dados representam média  $\pm$  desvio padrão. Letras iguais indicam não haver diferença estatisticamente significativa entre os dados, de acordo com o teste de Tukey.

#### 5.4.4 Avaliação da toxicidade sobre células mononucleares de sangue periférico (CMNSP)

Quando as amostras foram avaliadas com relação à sua toxicidade sobre células mononucleares do sangue periférico humano, os valores de  $CI_{50}$  foram ainda maiores do que os obtidos em relação às células animais (NIH3T3). O valor de  $CI_{50}$  do extrato de semente com tegumento também não pôde ser calculado porque nenhuma concentração testada apresentou citotoxicidade. Os dados mostrados reforçam a evidência de que os extratos possuem toxicidade maior sobre as células tumorais K562 ( $CI_{50}$  entre 23,95 e 81,08  $\mu\text{g/mL}$ ) do que sobre células não tumorais (Tabela 16).

Tabela 16 – Valores de  $CI_{50}$  da ação de diferentes materiais da cv. BR-1 de *Arachis hypogaea* sobre células mononucleares de sangue periférico (CMNSP).

Materiais vegetais ( <i>Arachis hypogaea</i> )	$CI_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )
Semente com tegumento	>200,0 <sup>a</sup>
Partição diclorometânica	177,32±13,51 <sup>b</sup>
Fração diclorometano:acetona (1:1)	78,52±5,63 <sup>d</sup>
Calo (IAC 886)	108,41±10,28 <sup>c</sup>

Nota: Os dados representam média  $\pm$  desvio padrão. Letras iguais indicam não haver diferença estatisticamente significativa entre os dados, de acordo com o teste de Tukey.

## 5.5 Discussão

Este trabalho avaliou a atividade antileucêmica *in vitro* de extratos etanólicos brutos de diferentes cultivares da planta *in vivo* de *A. hypogaea*, incluindo também estudos *in vitro* de partes aéreas e raízes. O fracionamento do extrato etanólico de semente com tegumento, a amostra mais ativa, foi biomonitorado pela atividade antileucêmica, fornecendo a fração diclorometânica:acetona (1:1) como a mais ativa. Posteriormente, comparou-se o efeito tóxico das amostras mais ativas sobre linhagem celular leucêmica e sobre linhagens de tumores sólidos, e verificou-se a toxicidade sobre células não tumorais.

Extratos etanólicos de diferentes materiais apresentaram atividade citotóxica significativa sobre a linhagem de células humanas de leucemia mieloide crônica (K562), sendo os melhores resultados obtidos a partir de tegumentos das cultivares IAC 886, IAC Caiapó e IAC 8112, com indução de citotoxicidade de 77,11%, 74,75% e 78,80%, respectivamente (Figura 22). Esses valores correspondem ao dobro da inibição obtida com extrato etanólico de parte aérea de agrião (*Lepidium sativum*), utilizado na mesma concentração e após o mesmo período de incubação (ASLANI et al., 2014).

Além da espécie, origem e parte do vegetal a ser estudado, o solvente utilizado para a extração também influencia na atividade citotóxica do extrato. Neste trabalho, os extratos hexânicos de semente e tegumento de *A. hypogaea* também foram avaliados quanto à sua atividade antitumoral. Os extratos hexânicos de sementes não resultaram em altas taxas de inibição (até 42,20%), quando comparados a outros autores que utilizaram o mesmo tipo de solvente (WONG et al., 2014; TOUIHRI et al., 2015). Por outro lado, os extratos de tegumento apresentaram percentuais de inibição do crescimento de células leucêmicas elevados (entre 93,05% e 96,44%). Entretanto, por serem de difícil obtenção, os extratos de tegumento são dificilmente investigados quanto às suas propriedades biológicas. Por esta razão, optou-se prosseguir os estudos com o extrato etanólico de semente mais tegumento, o qual também mostrou atividade antileucêmica significativa.

Em relação aos extratos de materiais *in vitro*, extratos de raízes de *A. hypogaea* de diferentes cultivares (Figura 20D) apresentaram inibições do crescimento de células leucêmicas bastante superiores aos valores obtidos com

extratos de partes aéreas (Figura 20B). Esse fato pode ser devido à presença do *trans-resveratrol*, o principal metabólito com propriedades antitumorais do gênero, encontrado em maior quantidade nas raízes do que nas folhas (CHUNG et al., 2003; PARK et al., 2003). É importante ressaltar que o efeito antileucêmico dos extratos das raízes obtidas *in vitro* foi significativamente maior em relação aos extratos de raízes *in vivo* (Figuras 20D e 20C, respectivamente). Este resultado sugere que o procedimento de cultivo *in vitro* esteja colaborando para aumentar na raiz a concentração de metabólitos com ação antileucêmica (WU et al., 2016). Por outro lado, extratos de calos friáveis da cv. IAC 886, oriundos de segmentos foliares (Figura 21A), provocaram maior inibição do crescimento de células leucêmicas do que as próprias partes aéreas *in vitro* (Figura 20A). Segundo Ku e colaboradores (2005), além do *trans-resveratrol*, outro metabólito presente nos calos oriundos de explantes de *A. hypogaea*, o piceatanol, também possui atividade antitumoral, o que contribui para explicar nossos resultados.

Entre as partições do extrato de semente e tegumento, as mais apolares (hexânica, diclorometânica e em acetato de etila) mostraram os maiores percentuais de inibição do crescimento de células K562, sendo a partição diclorometânica a mais ativa (Figura 24A). Assim como no presente trabalho, Almeida e colaboradores (2013) também verificaram que a partição diclorometânica de sementes de *Jacaranda puberula* apresentou maior atividade de inibição do crescimento de várias linhagens de células, incluindo a K562. Em alguns trabalhos, a eficiência de partições diclorometânicas em testes de atividade biológica deve-se, principalmente, à presença de triterpenos e ácidos graxos (RENA-AGUILA et al., 2016; SPINDOLA et al., 2016).

Comparando-se os efeitos citotóxicos do extrato etanólico de *A. hypogaea*, do extrato de calo da cv. IAC 886 e das partições da cv. BR-1 sobre células leucêmicas humanas K562 e linhagens celulares de tumores sólidos (PC3, MCF-7 e A549), observamos que as células leucêmicas se mostraram mais sensíveis. Tal resultado pode ser explicado pelo fato dos tumores sólidos apresentarem, frequentemente, efluxo ativo de medicamentos através de transportadores do tipo ABC na membrana plasmática (HUBER et al., 2010), conferindo maior resistência múltipla a medicamentos (LAGE, 2008; BRAM et al., 2009). Por outro lado, assim como outros autores recentemente constataram para extratos de *Camellia sinensis* (chá) e *Berberis vulgaris* (uva-espim), sobre células animais de NIH e PBMC,

respectivamente, os extratos de *A. hypogaea* apresentaram menor toxicidade para as células não tumorais do que às células tumorais (KOŇARIKOVÁ et al., 2015; EL-WAHAB et al., 2013). Esse fato é de extrema importância, pois mostra que a atividade antiproliferativa das amostras ocorre preferencialmente na linhagem celular leucêmica.

O ideal para um agente anticâncer é que a sua atividade seja consideravelmente maior nas células tumorais do que nas células saudáveis. Para verificar isso, são realizados testes de toxicidade em células de tecidos vivos também. Assim como nesse trabalho, outros autores também constataram que os extratos das espécies por eles analisadas possuíam maior atividade anticâncer em células tumorais do que em células NIH (BELAYACHI et al., 2014) ou CMSP (DE ARVELO et al., 2013).

Até o momento, alguns trabalhos envolvendo *A. hypogaea* avaliaram as propriedades antitumorais de substâncias isoladas de raízes ou sementes (ABOTT et al., 2010; HUANG et al., 2010; SOBOLEV et al., 2011), sendo que a maioria dos trabalhos relaciona tal propriedade com o *trans*-resveratrol. O presente trabalho foi o primeiro a comparar a atividade antitumoral de diferentes cultivares de *A. hypogaea*. Além disso, mostrou-se que a maior atividade antileucêmica desta espécie encontra-se no tegumento, dentre as amostras *in vivo* estudadas, e que o cultivo *in vitro* de raízes e o fracionamento do extrato etanólico de sementes mais tegumentos enriqueceu significativamente tais amostras em substâncias com ação antileucêmica.

Embora novos estudos sejam necessários, incluindo a avaliação de outros efeitos de *A. hypogaea* nas células K562 e seus mecanismos de ação, os resultados obtidos neste trabalho permitem concluir que determinados extratos desta espécie possuem importante potencial no combate às leucemias.



## 5.6 Conclusões

- Extratos etanólicos e hexânicos de tegumento, extratos de raízes *in vitro* e partições de semente e tegumento da cv. BR-1 apresentaram as mais elevadas atividades antitumorais;

- A linhagem K562 mostrou-se mais sensível aos extratos do que as outras linhagens de células tumorais;

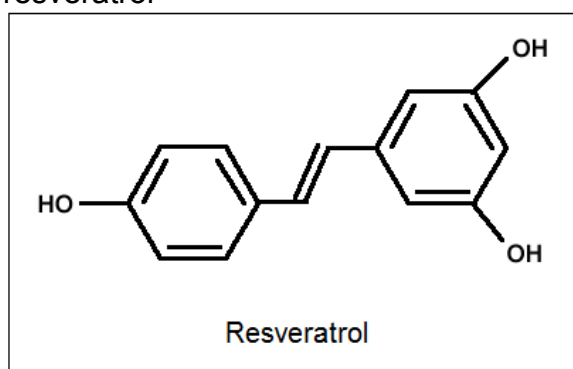
- As linhagens de células não tumorais do tipo CMNSP e NIH-3T3 mostraram-se menos sensíveis aos extratos do que as linhagens de células tumorais.

## 6 TEOR DE *TRANS*-RESVERATROL E ANÁLISE QUALITATIVA DE ESTILBENOS

### 6.1 Introdução

O resveratrol (Figura 27), metabólito especial mais importante da classe dos estilbenos, está presente em mais de 70 tipos de plantas, tais como Kojo-kon (*Polygonum cuspidatum*), Kashuwu (*Polygonum multiflorum*) (KUBO et al., 1981), eucalipto (*Eucalyptus* spp.) (HILLIS et al., 1974), pinheiro (*Pinus* spp.) (PASSOS et al., 2001), uva (*Vitis vinifera* e *Vitis labruscae*) (LANGCAKE et al., 1979) e amendoim (INGHAM, 1976). O resveratrol é um polifenol, sendo sua síntese efetuada pela enzima resveratrol sintase, a partir de uma molécula de cumaroil-CoA e três moléculas de malonil-CoA, em um processo regulado pelos genes RS (CHUNG et al., 2003).

Figura 27 – Estrutura molecular do resveratrol



O resveratrol é encontrado em duas isoformas, *trans*-resveratrol (*trans*-3,5,4'-trihidroxiestilbeno) e *cis*-resveratrol (*cis*-3,5,4' trihidroxiestilbeno). Apesar de o isômero *trans* ser convertido à forma *cis*, mais estável em presença de luz visível, as pesquisas são geralmente direcionadas à investigação das propriedades do isômero *trans*, mais ativo biologicamente. Um dos fatores que mais influenciaram as

pesquisas foi o chamado “Paradoxo Francês”, formulado no final do século XX para indicar porque, mesmo possuindo as mesmas taxas de colesterol que os americanos, os franceses morriam muito menos por aterosclerose. Este fato foi atribuído ao hábito francês de beber vinho, uma vez que a uva possui elevados teores de resveratrol. A partir de então, fontes alternativas para a produção deste metabólito passaram a ser investigadas (SAUTTER et al., 2005).

Entre as diversas atividades farmacológicas do resveratrol, podem-se citar a atividade antioxidante, por meio da inibição da atividade da enzima lipoxigenase ou remoção de radicais livres (PINTO et al., 1999; CHATTERJEE et al., 2011); a capacidade anti-inflamatória, pela inibição das enzimas ciclo-oxigenase (COX-1 e COX-2), assim inibindo a síntese de tromboxanas (SUBBARAMAIAH et al., 1998; O’LEARY et al., 2004); a redução do risco de aterosclerose, aumentando os níveis de colesterol sob a forma de HDL e reduzindo o LDL (GALFI et al., 2005); o aumento do apetite e atraso do envelhecimento celular (DAVID et al., 2007) e a capacidade de atuar de maneira análoga ao estrogênio, pois possui estrutura química similar, podendo ser utilizado em estudos de reposição hormonal (RATNA; SIMONELLI, 2002).

O resveratrol possui também atividade anticarcinogênica, tendo sido sugeridas diversas possibilidades para seu mecanismo de atuação (SAUTTER et al., 2005): i) inibição da proteína C-quinase, mediadora no surgimento de tumores (STEWART et al., 2000); ii) indução de apoptose (morte celular programada), inibindo a proliferação de tumores (RATNA; SIMONELLI, 2002); iii) inibição da gênese de tumores pelo bloqueio da cascata do ácido araquidônico (SUBBARAMAIAH et al., 1998) e iv) inibição da proteína NF-Kappa- $\beta$ , reguladora da proliferação celular, contendo o avanço de tumores (RIVAS et al., 2008).

Em *A. hypogaea*, o resveratrol é produzido em plântulas, hipocótilos (ARORA; STRANGE, 1991), sementes (SANDERS et al., 2000), raízes (CHEN et al., 2002), folhas, vagens, tegumento (PARK et al., 2003), além de materiais *in vitro*, como brotos e calos (CHANG et al., 2006). Também já foi relatado que a planta jovem possui uma capacidade maior de produção de resveratrol do que a planta madura, devido à necessidade de defesa contra patógenos em razão do crescimento (DORNER et al., 1989). Além disso, é encontrado em produtos industrializados oriundos do amendoim (YOSHIHIRO; IWAO, 2003; LEE et al., 2004) (Quadro 3).

Outros trabalhos também mostraram a detecção de outros estilbenos, mas a partir de extratos de materiais de *A. hypogaea* obtidos *in vitro* (Quadro 4).

A eliciação é um dos processos mais eficientes para induzir ou aumentar a produção de metabólitos especiais em espécies vegetais. Os eliciadores são substâncias que estimulam processos de defesa das plantas, fazendo com que os metabólitos produzidos possam defender suas células e todo o resto. De acordo com sua origem, os eliciadores podem ser divididos em dois grupos: bióticos e abióticos. Os eliciadores abióticos não possuem origem biológica, e podem ser substâncias inorgânicas, como sais, ou fatores físicos como radiação ultravioleta, injúria mecânica, ultrassom e metais pesados. Os eliciadores biológicos podem ser substâncias de origem biológica, como metil jasmonato, ácido salicílico e quitosana, ou até alguns tipos de seres vivos, como fungos (BAENAS et al., 2014; RAMIREZ-ESTRADA et al., 2016). Em *Arachis hypogaea*, na maioria dos trabalhos envolvendo mecanismos de eliciação foi utilizada a radiação ultravioleta em diferentes materiais vegetais, com aumento da produção de *trans*-resveratrol e outros metabólitos (CHUNG et al., 2003; KU et al., 2005; RUDOLF; RESURRECCION, 2005; POTREBKO; RESURRECCION, 2009; SALES; RESURRECCION, 2009).

Quadro 3 – Quantidade de *trans*-resveratrol em amendoim (*Arachis hypogaea*) e derivados (continua).

Referência	Variedade do amendoim	Material vegetal	<i>trans</i> -Resveratrol (µg/g peso fresco)
SOBOLEV; COLE, 1999	Produto industrializado	Amendoim assado, manteiga de amendoim e amendoim frito	0,018-0,080; 0,148-0,504 e 1,179-7,092
IBERN-GO'MEZ et al., 2000	Produto industrializado	Manteiga de amendoim	0,265-0,671 e 0,534-0,753
SANDERS et al., 2000	Spanish	Semente	0,023-1,792
CHEN et al., 2002	Spanish	Raiz	0,554-0,905
LIU et al., 2003	Spanish	Raiz	0,074-0,114
OGAKI; SAGAWA, 2003	Cultivar japonesa	Semente	0,089-0,147
YOSHIHIRO; IWAO, 2003	Produto industrializado	Amendoim assado e amendoim frito	0,033-0,085 e 0,038-0,072
NEPOTE et al., 2004	Florunner	Tegumento	9,07
LEE et al., 2004	Virginia	Semente	0,10-0,25
LEE et al., 2004	Produto industrializado	Manteiga de amendoim	0,270-0,700
TOKUSOGLU et al., 2005	Seis cultivares	Semente	0,03-1,92
KUO-HIS et al., 2005	TNS9	Cotilédone, raiz e broto	32,5; 12,1 e 19,9
KUO-HIS et al., 2005	TN 11	Cotilédone, raiz e broto	47,1; 18,6 e 25,7
KUO-HIS et al., 2005	TN 14	Cotilédone, raiz e broto	12,0; 7,9 e 11,74
SOBOLEV et al., 2006b	Runner	Cotilédone seco, cotilédone embebido e raiz embebida	<0,01-0,02; 0,02-0,17 e <0,01-0,06
SOBOLEV et al., 2006b	Valencia	Cotilédone seco, cotilédone embebido e raiz embebida	<0,01; 0,03 e <0,01
CHUKWUMAH et al., 2007	Runner	Semente	2,390-7,840

Quadro 3 – Quantidade de *trans*-resveratrol em amendoim (*Arachis hypogaea*) e derivados (conclusão).

Referência	Variedade do amendoim	Material vegetal	<i>trans</i> -Resveratrol (µg/g peso fresco)
FRANCISCO; RESURRECCION, 2009	Runner, Virginia e Spanish	Tegumento	4,30; 3,66 e 15,04
ZORZETE et al., 2011	Runner IAC 886	Vagem em formação	0,8
ZORZETE et al., 2011	Runner IAC 886 e Caiapó	Folhas	14,70-90,50 e 9,40-34,40
CHUKWUMAH et al., 2012	Runner e Valencia	Semente com tegumento	0,11 e 0,08
KIM et al., 2013	Phan Gia Than	Raiz, pecíolo e folha	270,54; 83,02 e 5,59

Fonte: adaptado de Hasan et al., (2013).

No presente trabalho inicialmente foram realizadas análises qualitativas para a identificação do resveratrol em amostras de parte aérea (de materiais obtidos *in vivo*, *in vitro* e eliciados), raiz, tegumento e semente de materiais obtidos *in vivo*, além de calos friáveis de cinco cultivares de *A. hypogaea*. Posteriormente, foram realizadas análises para quantificação das amostras que apresentaram teores significativos de *trans*-resveratrol, utilizando Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

A CLAE é uma das técnicas mais utilizadas para a separação de componentes de extratos de plantas, tanto na pesquisa como na indústria farmacêutica (NAG et al., 2015). Nesta técnica, as substâncias da amostra a serem separadas são distribuídas entre uma fase estacionária e uma fase móvel, sendo os principais componentes do equipamento: a bomba, que movimenta a fase móvel e a amostra através da coluna; uma coluna, que contém a fase estacionária, geralmente formada por partículas de sílica, porosas e esféricas, e um detector que mostra os tempos de retenção das moléculas. O tempo de retenção, que é o calculado desde a injeção de uma amostra até a sua detecção na saída do sistema, varia de acordo com as interações da própria amostra com as fases estacionária e móvel. Os detectores utilizados podem ser de UV-vis ou luz fluorescente, entre outros. Embora

seja um processo dispendioso, também costuma ser altamente eficiente (MALVIYA et al., 2010). Quando uma nova metodologia de quantificação é empregada, é necessária a validação de um método analítico que permita assegurar resultados mais eficientes (RIBANI et al., 2007). Embora a literatura registre algumas metodologias para a quantificação do *trans*-resveratrol em *A. hypogaea* por CLAE (Quadro 5), apenas Hetta e colaboradores (2014) realizaram a validação do método analítico adotado.

Quadro 4 – Cultura de tecidos e produção de estilbenos em *A. hypogaea*.

Referência	Sistema	Metabólitos especiais
PARK et al., 2003	Diferentes tecidos da plântula	Resveratrol
KU et al., 2005	Cultura de calos	Piceatanol e resveratrol
CHANG et al., 2006	Plântulas <i>in vitro</i>	Resveratrol, araquidin-1, araquidin-3 e isopentadienilresveratrol
SOBOLEV et al., 2006	Planta nos primeiros estágios de crescimento	Estilbenos e ácidos fenólicos
MEDINA-BOLIVAR et al., 2007	Cultura de raízes	Resveratrol
KIM et al., 2008	Cultura de raízes	Resveratrol
ABBOTT et al., 2010	Cultura de raízes	Araquidin-1, araquidin-3 e resveratrol
CONDORI et al., 2010	Cultura de raízes	Araquidin-1, araquidin-3 e resveratrol
YANG et al., 2010	Cultura de calos	Resveratrol
LIU et al., 2012	Cultura de raízes	Resveratrol
YANG et al., 2015	Cultura de raízes	Resveratrol, piceatanol, arachidin-1 e arachidin-3
HALDER; JHA, 2016	Cultura de raízes	Resveratrol

Quadro 5 – Metodologias já descritas para a quantificação de *trans-resveratrol* em *A. hypogaea* por CLAE (continua).

<b>Matriz</b>	<b>Detector</b>	<b>Fase móvel</b>	<b>Coluna</b>	<b>Referência</b>
Semente	UV-vis	Gradiente (água:acetoneitrila)	C-18 (150 mm x 4,5 mm)	SANDERS et al., 2000
Raiz	UV-vis	Gradiente (água:metanol)	C-18 (250 mm x 4,0 mm)	CHEN et al., 2002
Diferentes tecidos da plântula	Fluorescente	Gradiente (água:acetoneitrila)	C-18 (250 mm x 4,0 mm)	PARK et al., 2003
Raiz	UV-vis	Gradiente (água:metanol)	C-18 (250 mm x 4,0 mm)	LIU et al., 2003
Semente	UV-vis	Gradiente (água:acetoneitrila)	C-18 (250 mm x 4,0 mm)	OGAKI; SAGAWA, 2003
Semente	UV-vis	Gradiente (água:acetoneitrila)	C-18 (250 mm x 4,6 mm)	LEE et al., 2004
Cultura de calos	UV-vis e fluorescente	Gradiente (água:acetoneitrila)	C-18 (250 mm x 4,6 mm)	KU et al., 2005
Semente	Foto-diodos	Gradiente (água:acetoneitrila)	C-18 (250 mm x 4,6 mm)	TOKUSOGLU et al., 2005
Cotilédone, raiz e broto	UV-vis	Gradiente (água:metanol)	C-18 (250 mm x 4,0 mm)	KUO-HIS et al., 2005
Plântulas <i>in vitro</i>	UV-vis	Gradiente (água:metanol)	C-18 (250 mm x 4,0 mm)	CHANG et al., 2006
Plântulas <i>in vitro</i>	Foto-diodos	Gradiente (água:metanol:ácido metanoico em água)	C-18 (50 mm x 4,6 mm)	SOBOLEV et al., 2006
Cotilédone seco, cotilédone embebido e raiz embebida	Foto-diodos	Gradiente (hexano:propanol:água:ácido acético)	C-18 (150 mm x 4,6 mm)	SOBOLEV et al., 2006b
Semente	UV-vis	Gradiente (acetoneitrila:ácido acético glacial)	C-18 (250 mm x 4,6 mm)	CHUKWUMAH et al., 2007
Cultura de raízes	UV-vis	Gradiente (acetato de amônio:solvente orgânico)	C-18 (250 mm x 4,0 mm)	KIM et al., 2008
Raiz	UV	Gradiente (ácido acético em acetoneitrila:ácido acético)	C-18 (150 mm x 4,6 mm)	LEE et al., 2008
Tegumento	UV-vis	Gradiente (acetato de amônio:solvente orgânico)	C-18 (250 mm x 4,0 mm)	FRANCISCO; RESURRECCION, 2009
Cultura de raízes	Fluorescente	Gradiente (água:acetoneitrila)	C-18 (250 mm x 4,6 mm)	CONDORI et al., 2010
Cultura de raízes	UV-vis	Gradiente (ácido fórmico:acetoneitrila)	C-18 (250 mm x 4,6 mm)	ABBOTT et al., 2010
Cultura de calos	Fluorescente	Gradiente (ácido fórmico:acetoneitrila)	C-18 (250 mm x 4,6 mm)	YANG et al., 2010
Folha e vagem em formação	UV-vis	Gradiente (água:metanol)	C-18 (250 mm x 4,6 mm)	ZORZETE et al., 2011
Cultura de raízes	Fluorescente	Gradiente (água:acetoneitrila)	C-18 (250 mm x 4,6 mm)	LIU et al., 2012
Semente com tegumento	Foto-diodos	Gradiente (ácido fórmico:acetoneitrila)	C-18 (250 mm x 4,6 mm)	CHUKWUMAH et al., 2012



Quadro 5 – Metodologias já descritas para a quantificação de *trans-resveratrol* em *A. hypogaea* por CLAE (conclusão).

Raiz	UV	Gradiente (metanol:tampão acetato)	C-18 (150 mm x 4,6 mm)	KIM et al., 2013
Broto	UV	Gradiente (metanol:água:ácido acético)	C-18 (250 mm x 4,6 mm)	XIONG et al., 2014
Casca	UV-vis	Isocrática (água:acetonitrila)	C-18 (250 mm x 4,6 mm)	HETTA et al., 2014
Cultura de raízes	UV	Gradiente (ácido fórmico em água:metanol)	C-18 (250 mm x 4,6 mm)	YANG et al., 2015
Cultura de raízes	UV	Gradiente (metanol:água:ácido acético)	C-18 (250 mm x 4,6 mm)	HALDER; JHA, 2016

Neste trabalho, o método analítico utilizado para a quantificação do *trans-resveratrol* em *A. hypogaea* foi desenvolvido e validado. Os teores do metabólito em diferentes materiais vegetais obtidos *in vivo* e *in vitro* de cinco cultivares brasileiras foi investigado, juntamente com o efeito da eliciação por ultravioleta.

## 6.2 Objetivos

### 6.2.1 Objetivo geral

Realizar a análise fitoquímica de materiais *in vivo* e *in vitro* oriundos de *Arachis hypogaea*, tendo como molécula alvo o *trans*-resveratrol, com a determinação dos perfis qualitativo e quantitativo das amostras por CLAE.

### 6.2.2 Objetivos específicos

- Determinar o perfil qualitativo das amostras, através da detecção de estilbenos;
- Validar a quantificação de *trans*-resveratrol nas amostras;
- Quantificar o *trans*-resveratrol nas amostras;
- Avaliar a influência da eliciação por UV nas amostras de partes aéreas.

## 6.3 Material e métodos

### 6.3.1 Material vegetal

Foram utilizados materiais excisados de plantas obtidas em condições naturais (partes aéreas, raízes, tegumentos e sementes) e produzidos *in vitro* (partes aéreas, raízes e calos) de cinco cultivares de *Arachis hypogaea*. Plantas *in vitro* foram obtidas a partir de eixos embrionários íntegros excisados de sementes e mantidas a  $25\pm 2^\circ\text{C}$ , sob fotoperíodo de 16 h, com intensidade luminosa média de  $63 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , fornecida por lâmpadas fluorescentes do tipo branca fria.

Os calos foram obtidos 30 dias após a inoculação de explantes foliares de plantas *in vitro* das cvs. IAC 886 e BR-1 em meio MS, suplementado com picloram a  $1,25 \mu\text{M}$  e incubação a  $25\pm 2^\circ\text{C}$  sob luz fluorescente ou associação de LED azul e vermelho. Estas foram as melhores condições obtidas no cap. I.

As sementes com o tegumento foram fornecidas pelo Dr. Ignácio José de Godoy, pesquisador do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC). As partes aéreas e as raízes foram obtidas após 30 dias de cultivo das sementes em Plantmax<sup>®</sup> HA. Os materiais a serem extraídos foram armazenados na ausência de luz, em baixa umidade e mantidos a  $4^\circ\text{C}$  até sua utilização.

### 6.3.2 Eliciação

Plantas desenvolvidas em condições naturais da cv. IAC Tatu ST foram expostas a uma dose de  $1,30 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  proveniente de lâmpada UV (115 volts, 6 hz/s, 20 AMPS), por 20 min. Em seguida, foram incubadas a  $25\pm 2^\circ\text{C}$ , no escuro, por diferentes períodos. O preparo de extratos das partes aéreas foi realizado 0, 2, 4 e 6 h após a irradiação.

### 6.3.3 Preparo de extratos, partições e frações

Os extratos, partições e frações foram preparados conforme descrito no item 4.3.2.

### 6.3.4 Determinação do perfil qualitativo das amostras

As amostras foram analisadas por CLAE-DAD-UV para determinação do perfil em cromatógrafo Shimadzu®, equipado com controlador SCL – 10A VP, degaseificador DGU – 14A, bomba binária LC – 10AD VP, forno CTO – 10 AS VP, sistema de detecção por DAD SPD – M10A VP e injetor automático SIL10-AF. Os cromatogramas foram processados pelo programa Shimadzu Class VP, versão 6.1.

Todas as amostras foram dissolvidas em metanol grau HPLC (Tedia®, Brasil) a uma concentração final de 10 mg/mL, e filtradas em filtro Milipore 0,45 µm. O volume injetado para todas as amostras foi de 20 µL. As análises foram feitas em coluna C18 Thermo Scientific™ (250 mm x 4.6 mm I.D. x 5 µm), com fluxo de 1,0 mL/min, temperatura do forno a 50°C, com leitura nos comprimentos de onda 254 nm, 275 nm, 304 nm e 340 nm. A fase móvel foi composta de água ultrapura (MiliQ) acidificada com ácido acético glacial (pH = 3,0) (A)/ acetonitrila grau espectroscópico (Tedia®, Brasil) (B), e a eluição foi feita em modo gradiente: inicial = 95% (A)/ 5% (B), então em 80 min 5% (A)/ 95% (B) e mais 10 min para estabilizar a coluna na fase móvel inicial (tempo total de análise de 90 min). Solução padrão de *trans*-resveratrol a 1 mg/mL em metanol grau espectroscópico (Tedia®, Brasil) foi preparada e analisada nas mesmas condições da amostra. A detecção de *trans*-resveratrol nas amostras foi feita por leitura no comprimento de onda de maior absorção dessa substância (304 nm). Os valores percentuais de área foram obtidos pela integração dos sinais, com auxílio do programa Class-VP (Shimadzu®). O percentual relativo de cada substância identificada está relacionado ao somatório de área de todos os sinais do cromatograma, em um dado comprimento de onda, que representa 100%. O valor de uma área representa o percentual relativo da referida

substância. Foram usados dois comprimentos de onda para avaliação dos cromatogramas, 254 nm e 304 nm.

#### 6.3.5 Determinação do perfil quantitativo das amostras

A quantificação foi realizada em cromatógrafo em fase líquida de alta eficiência (CLAE) Nexera XR (Shimadzu®), equipado com controlador CBM20A, desgaseificador DGU20A, bomba binária LC20AD, forno CTO20A, injetor automático SILA20A, sistema de detecção por DAD-UV-VIS SPDM20A. A área do sinal foi integrada automaticamente pelo programa Shimadzu® LabSolutions.

Os melhores parâmetros analíticos para a dosagem do *trans*-resveratrol foram alcançados com coluna analítica C-18 Supelco Ascentis® Phenyl (250 mm x 4.6 mm i.d. x 5 µm). A fase móvel foi composta por água ultrapura (MiliQ) acidificada com ácido acético glacial (pH 3,0) (A), acetonitrila grau espectroscópico (Tedia®, Brasil) (B) e metanol grau espectroscópico (Tedia®, Brasil) (C), em sistema gradiente: inicial 90% de A, 2% de B e 8% de C; 0 a 3 min 80% de A, 12% de B e 8% de C; 3 a 9 min 5% de A, 95% de B e 0% de C; 9 a 11 min 90% de A, 2% de B e 8% de C. As análises foram feitas em coluna C18 Thermo Scientific™ (250 mm x 4.6 mm I.D. x 5 µm) e o volume de injeção foi de 20 µL e o fluxo foi de 1 mL/ min. O monitoramento foi feito em 304 nm. Este método de quantificação do *trans*-resveratrol é inédito, e foi validado pelo Dr. Davyson de Lima Moreira, no Laboratório de Toxicologia Ambiental do Departamento de Ciências Biológicas da Escola Nacional de Saúde Pública (DCB/ENSP) da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz).

#### 6.3.6 Análise estatística

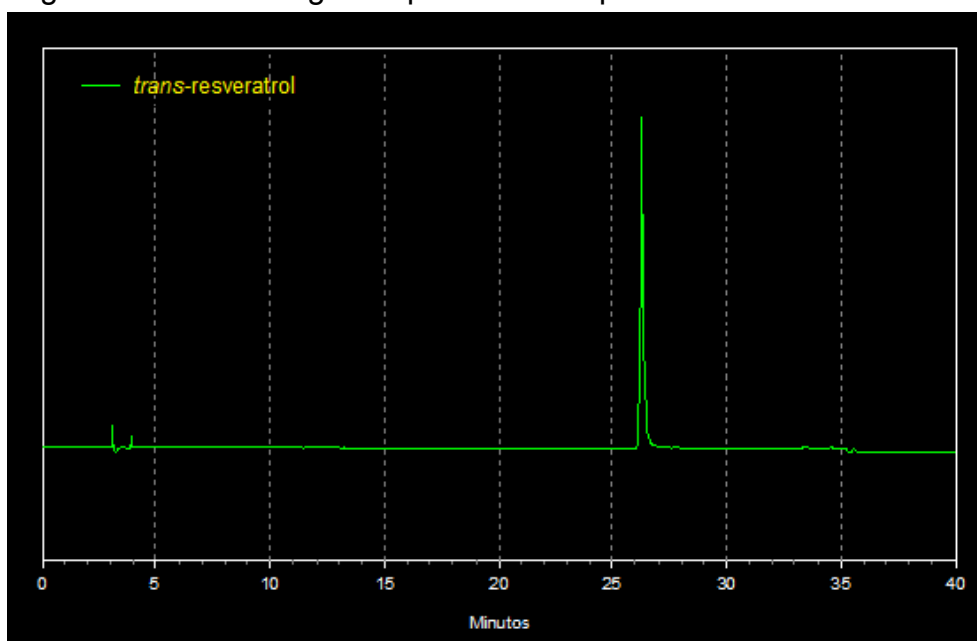
A análise dos dados foi realizada através da análise de variância (ANOVA) e do teste de comparação de Tukey, com o auxílio do programa Graphpad Prism 5®. Foram considerados significativos os valores de  $p \leq 0,05$ , tendo sido adotado o intervalo de confiança de 95%.

## 6.4 Resultados

### 6.4.1 Determinação do perfil qualitativo das amostras

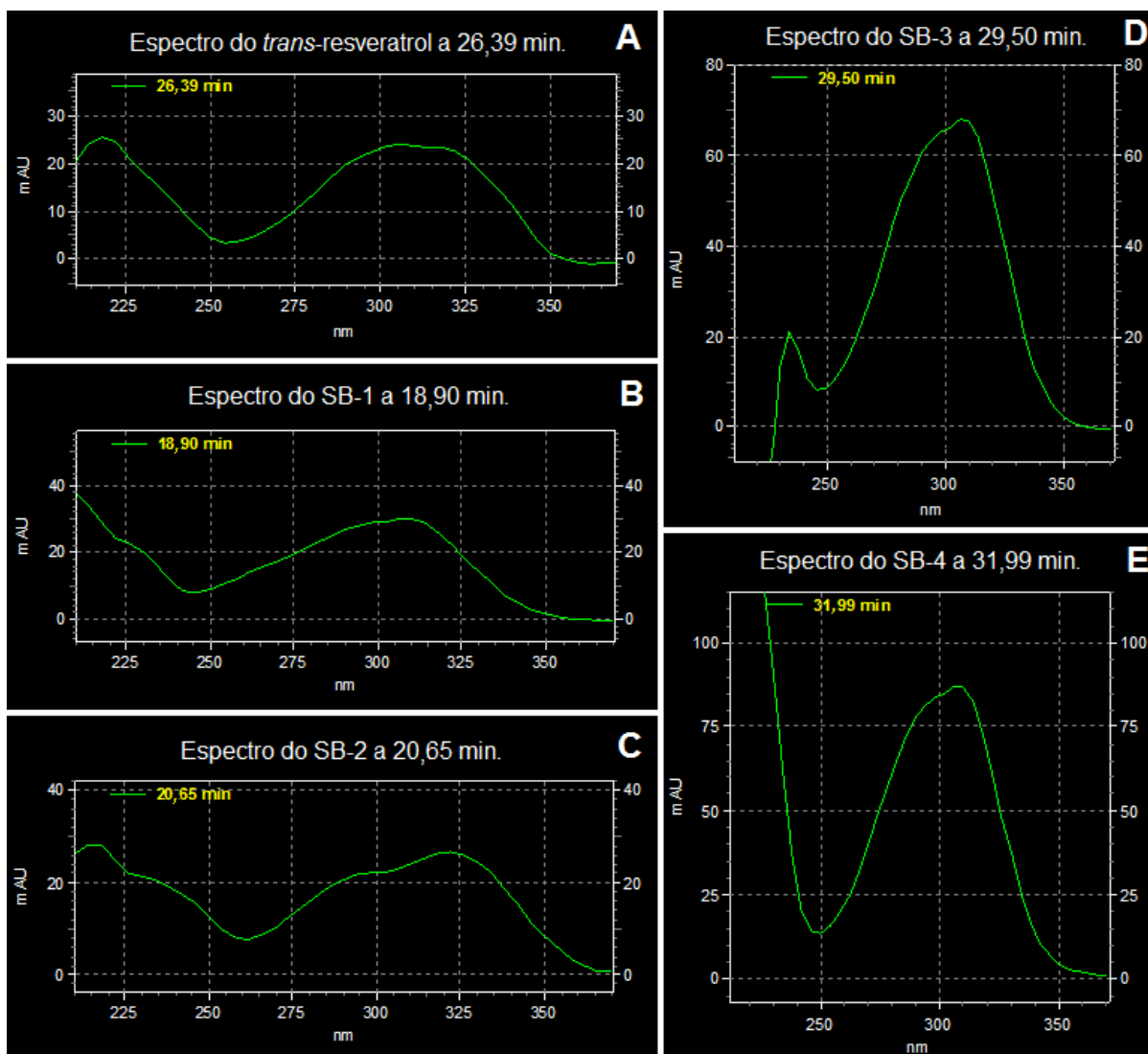
Inicialmente foi realizada a análise qualitativa de *trans*-resveratrol nas amostras, cujo tempo de retenção foi registrado em torno de 26 min, por comparação com o padrão comercial da substância (Figura 28). Considerando todos os materiais analisados, outras quatro substâncias foram registradas no cromatograma das amostras, apresentando espectro de absorção no UV compatível com estrutura de estilbenos, a saber: SB-1 ( $T_R = 18$  min), SB-2 ( $T_R = 20$  min), SB-3 ( $T_R = 29$  min) e SB-4 ( $T_R = 32$  min) (Figura 29).

Figura 28 – Cromatograma por CLAE do padrão de *trans*-resveratrol.



Nota: As análises foram realizadas em coluna C18 Thermo Scientific™ (250 mm x 4.6 mm I.D. x 5  $\mu$ m) e o volume de injeção foi de 20  $\mu$ L e o fluxo foi de 1 mL/min. O monitoramento foi feito em 304 nm. Solução padrão de *trans*-resveratrol a 1 mg/mL em metanol grau espectroscópico (Tedia®, Brasil).

Figura 29 – Espectro de absorção de luz UV (200–400 nm) do *trans*-resveratrol e de outros estilbenos.



Legenda: (A) *trans*-resveratrol; (B) SB-1; (C) SB-2; (D) SB-3; e (E) SB-4.

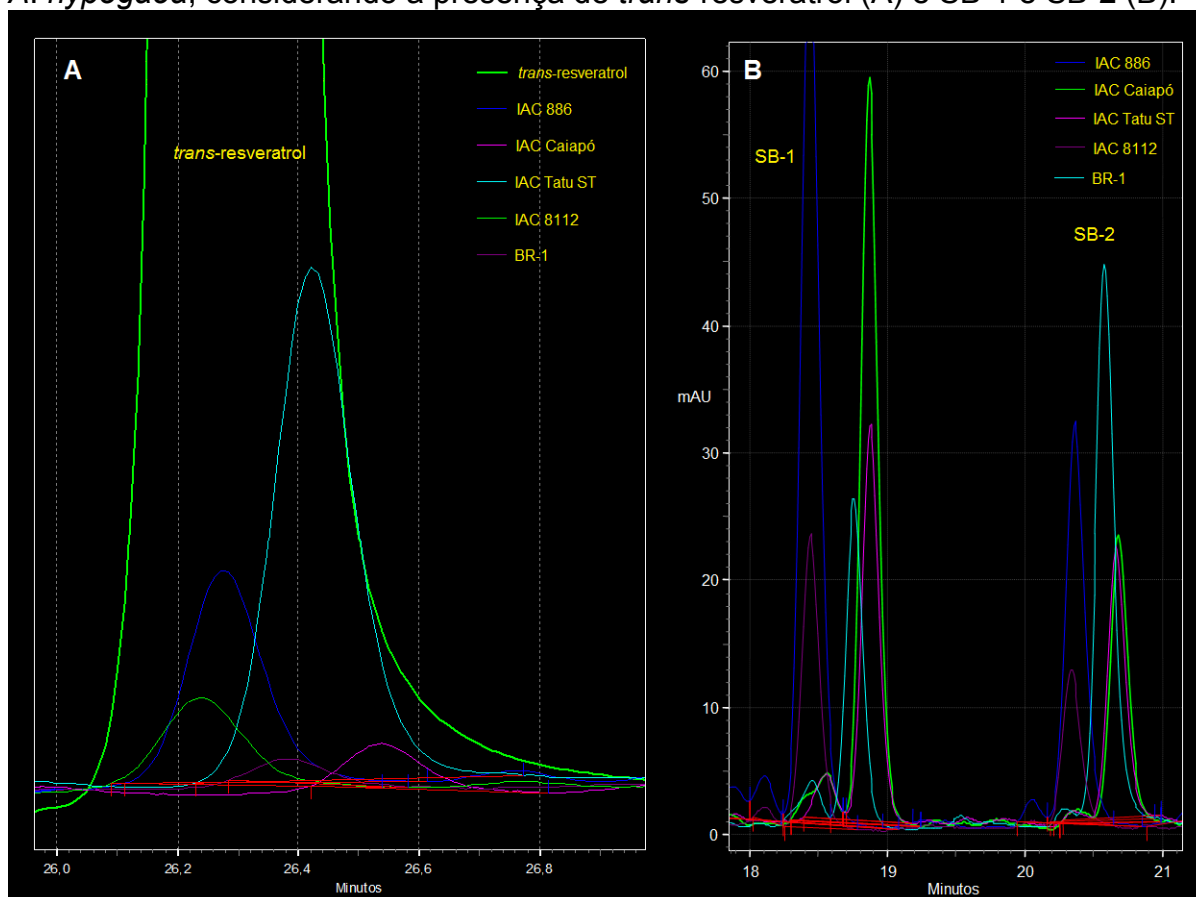
Nota: As análises foram realizadas em coluna C18 Thermo Scientific™ (250 mm x 4.6 mm I.D. x 5 µm) e o volume de injeção foi de 20 µL e o fluxo foi de 1 mL/min. O monitoramento foi feito em 304 nm. Solução padrão de *trans*-resveratrol a 1 mg/mL em metanol grau espectroscópico (Tedia®, Brasil).

#### 6.4.1.1 Avaliação dos extratos de materiais obtidos em condições naturais

O extrato de partes aéreas da cv. Tatu ST apresentou o maior teor percentual relativo de *trans*-resveratrol, seguido pelos das cvs. IAC 886 e IAC 8112. As cvs. IAC Caiapó e BR-1 mostraram teores muito baixos (Figura 30A). Considerando os outros estilbenos identificados, as maiores proporções de SB-1 foram encontradas

nas cvs. IAC 886 e IAC Caiapó, enquanto as cvs. BR-1 e IAC 886 apresentaram as maiores quantidades de SB-2 (Figura 30B).

Figura 30 – Perfil cromatográfico dos extratos de parte aérea de cinco cultivares de *A. hypogaea*, considerando a presença de *trans*-resveratrol (A) e SB-1 e SB-2 (B).

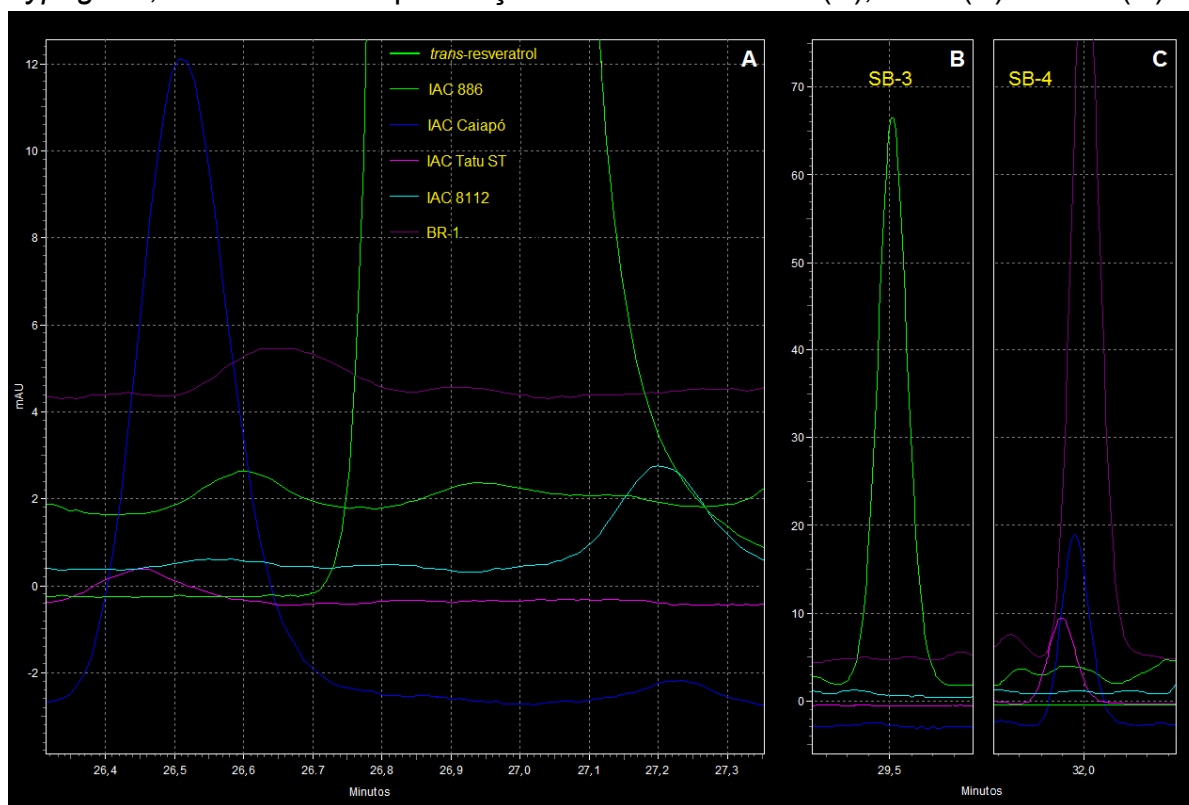


Nota: As análises foram realizadas em coluna C18 Thermo Scientific™ (250 mm x 4.6 mm I.D. x 5 µm) e o volume de injeção foi de 20 µL e o fluxo foi de 1 mL/min. O monitoramento foi feito em 304 nm. Solução padrão de *trans*-resveratrol a 1 mg/mL em metanol grau espectroscópico (Tedia®, Brasil).

Em relação a raízes, o extrato da cv. IAC Caiapó foi o único que apresentou um teor percentual relativo considerável de *trans*-resveratrol. Apenas traços da substância foram encontrados nas demais amostras (Figura 31A). Por outro lado, nos extratos das cvs. IAC 886 e BR-1 foram encontradas quantidades significativas de SB-3 e SB-4, respectivamente (Figuras 31B e 31C).



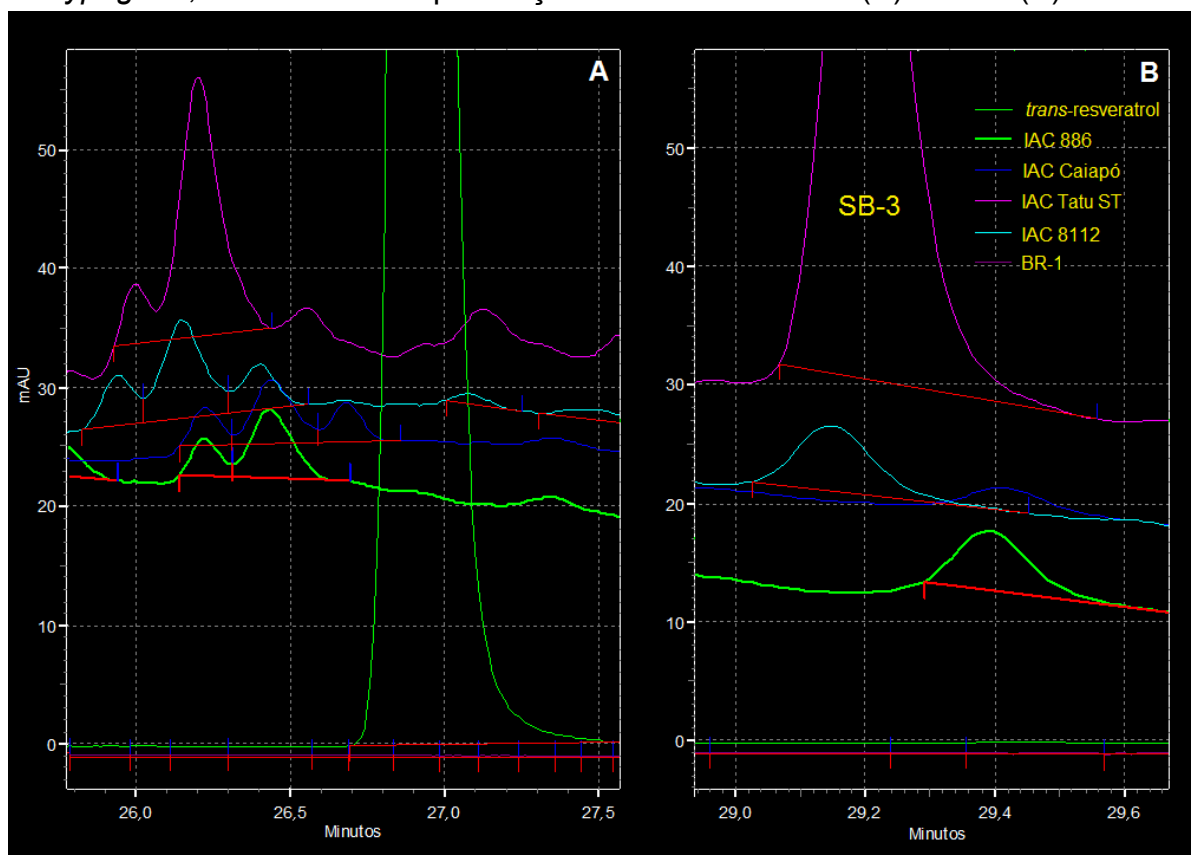
Figura 31 – Perfil cromatográfico dos extratos de raiz de cinco cultivares de *A. hypogaea*, considerando a presença de *trans*-resveratrol (A), SB-3 (B) e SB-4 (C).



Nota: As análises foram realizadas em coluna C18 Thermo Scientific™ (250 mm x 4.6 mm I.D. x 5 µm) e o volume de injeção foi de 20 µL e o fluxo foi de 1 mL/min. O monitoramento foi feito em 304 nm. Solução padrão de *trans*-resveratrol a 1 mg/mL em metanol grau espectroscópico (Tedia®, Brasil).

Na análise dos extratos de tegumento, o *trans*-resveratrol e o SB-3 foram detectados em todas as amostras, com exceção da cv. BR-1. Os maiores teores relativos de ambas as substâncias foram encontrados na cv. IAC Tatu ST (Figura 32).

Figura 32 – Perfil cromatográfico dos extratos de tegumento de cinco cultivares de *A. hypogaea*, considerando a presença de *trans*-resveratrol (A) e SB-3 (B).

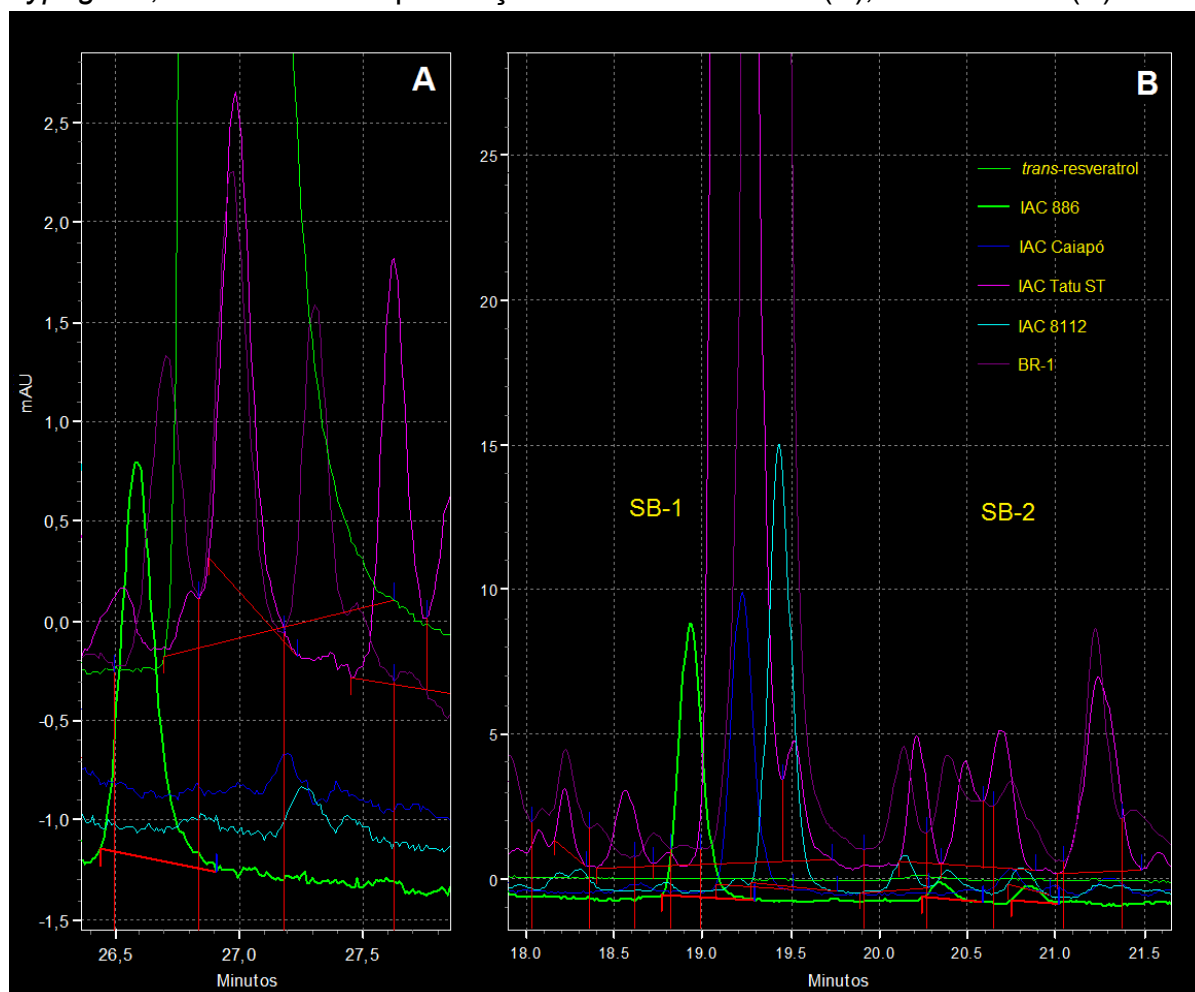


Nota: As análises foram realizadas em coluna C18 Thermo Scientific™ (250 mm x 4.6 mm I.D. x 5 µm) e o volume de injeção foi de 20 µL e o fluxo foi de 1 mL/min. O monitoramento foi feito em 304 nm. Solução padrão de *trans*-resveratrol a 1 mg/mL em metanol grau espectroscópico (Tedia®, Brasil).

Nos extratos de sementes analisados, o *trans*-resveratrol foi identificado somente nas cvs. IAC 886, IAC Tatu ST e BR-1. Ao contrário, o SB-1 e o SB-2 foram encontrados em todas as amostras, sendo as maiores concentrações de SB-1 detectadas nas cvs. IAC Tatu ST e BR-1 (Figura 33).

Em síntese, as maiores proporções de SB-3 foram detectadas em extratos de raízes da cv. IAC 886 e de tegumento da cv. IAC Tatu ST, enquanto que os maiores teores de SB-4 foram observados em extratos de raízes da cv. BR-1. De uma maneira geral, as raízes e as partes aéreas foram os materiais nos quais foram identificados os maiores teores de *trans*-resveratrol, assim como de SB-1 e SB-2. Com base nesses dados, a parte aérea da cv. IAC Tatu ST foi o material escolhido para avaliar o efeito elicitação.

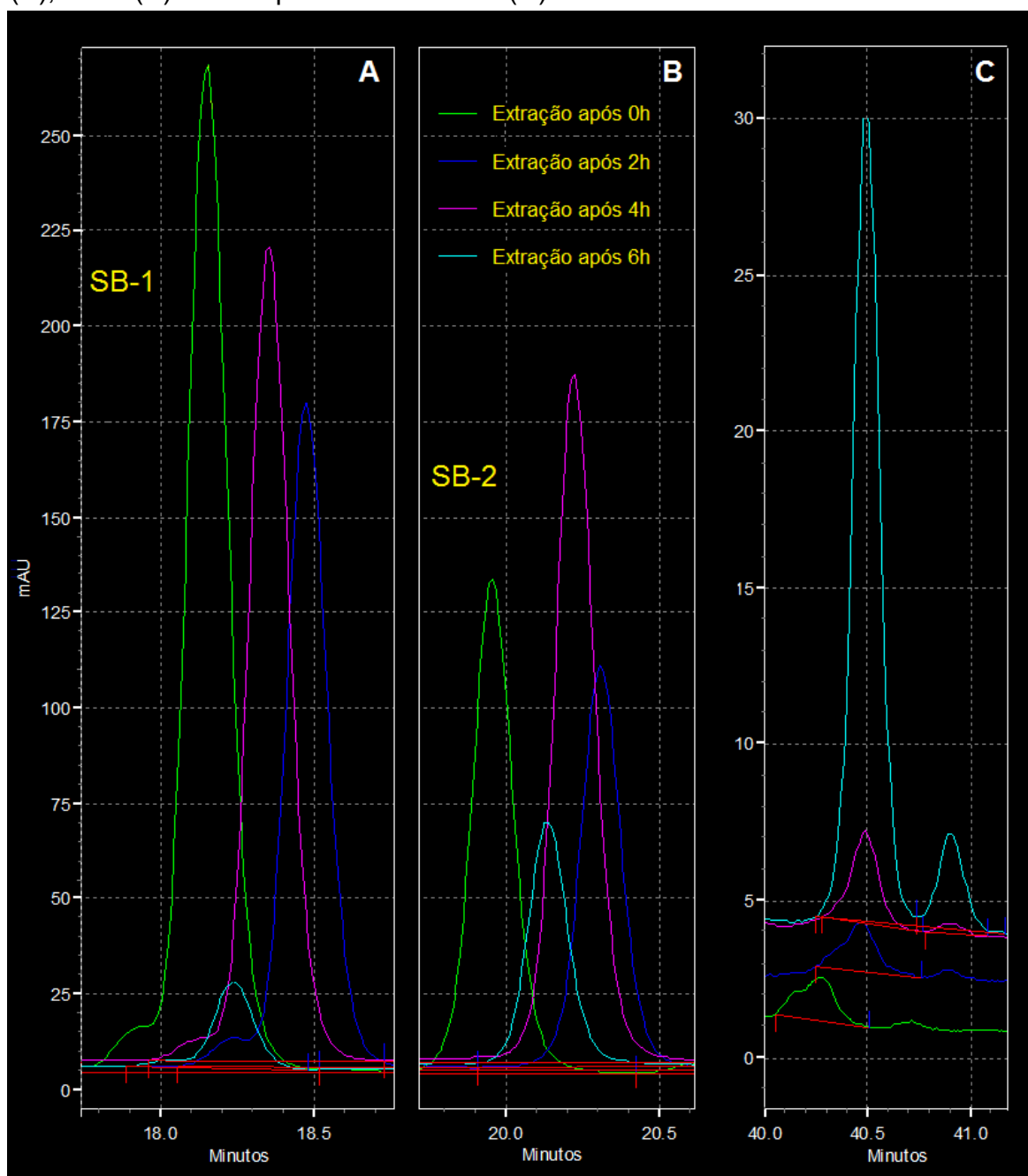
Figura 33 – Perfil cromatográfico dos extratos de semente de cinco cultivares de *A. hypogaea*, considerando a presença de *trans*-resveratrol (A), SB-1 e SB-2 (B).



Nota: As análises foram realizadas em coluna C18 Thermo Scientific™ (250 mm x 4.6 mm I.D. x 5 µm) e o volume de injeção foi de 20 µL e o fluxo foi de 1 mL/min. O monitoramento foi feito em 304 nm. Solução padrão de *trans*-resveratrol a 1 mg/mL em metanol grau espectroscópico (Tedia®, Brasil).

Embora apenas traços de *trans*-resveratrol tenham sido detectados nas amostras de partes aéreas da cv. IAC Tatu ST eliciadas com luz ultravioleta, foi verificado um aumento significativo da concentração de SB-1 e SB-2 nessas amostras. Além disso, quando a extração foi realizada 6 horas após a eliciação, houve um aumento significativo na produção de uma substância não observada nas análises anteriores, provavelmente também um estilbeno (Figura 34).

Figura 34 – Perfil cromatográfico dos extratos de partes aéreas da cv. IAC Tatu ST de *A. hypogaea* após eliciação em luz UV, considerando a presença de SB-1 (A), SB-2 (B) e outro possível estilbeno (C).

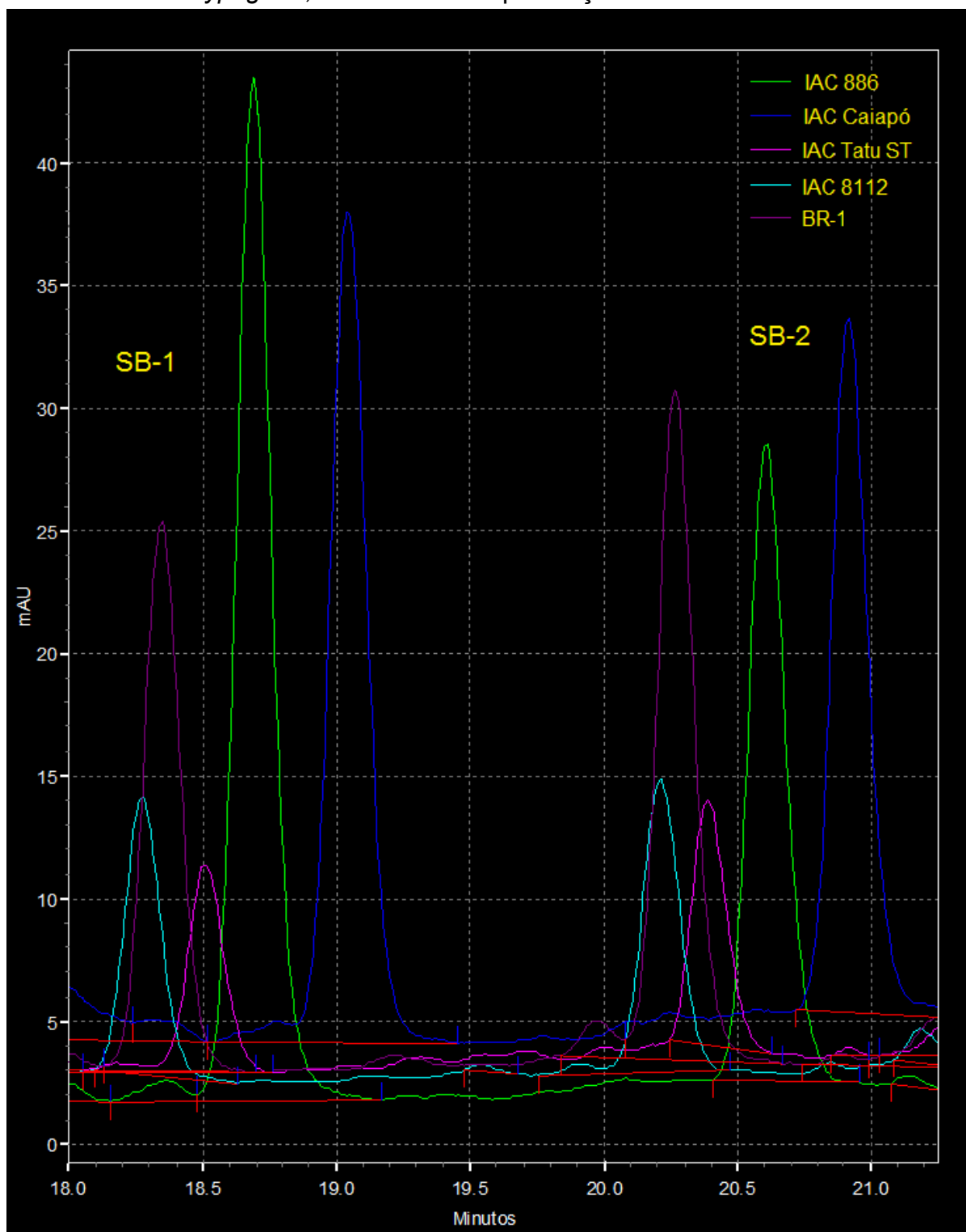


Nota: As análises foram realizadas em coluna C18 Thermo Scientific™ (250 mm x 4.6 mm I.D. x 5  $\mu$ m) e o volume de injeção foi de 20  $\mu$ L e o fluxo foi de 1 mL/min. O monitoramento foi feito em 304 nm. Solução padrão de *trans*-resveratrol a 1 mg/mL em metanol grau espectroscópico (Tedia®, Brasil).

#### 6.4.1.2 Avaliação dos extratos de materiais produzidos *in vitro*

Os extratos de partes aéreas de plantas *in vitro* das cvs. IAC 886, IAC Caiapó e BR-1 apresentaram maiores proporções de SB-1 e SB-2, quando comparados com os das outras cultivares (Figura 35). É importante ressaltar que as cvs. IAC Caiapó e BR-1 produziram mais SB-2 *in vitro* do que *in vivo*.

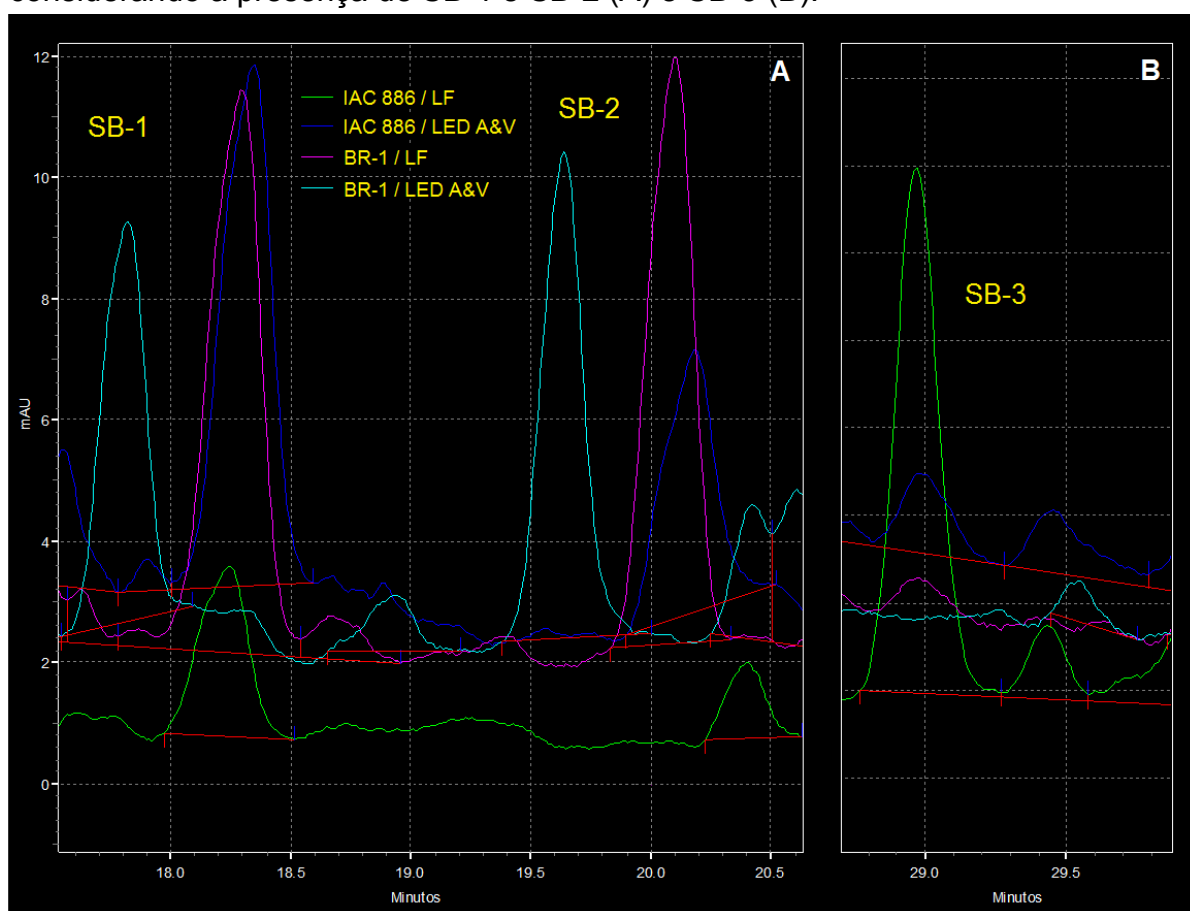
Figura 35 – Perfil cromatográfico dos extratos de partes aéreas *in vitro* de cinco cultivares de *A. hypogaea*, considerando a presença de SB-1 e SB-2.



Nota: As análises foram realizadas em coluna C18 Thermo Scientific™ (250 mm x 4.6 mm I.D. x 5 µm) e o volume de injeção foi de 20 µL e o fluxo foi de 1 mL/min. O monitoramento foi feito em 304 nm. Solução padrão de *trans*-resveratrol a 1 mg/mL em metanol grau espectroscópico (Tedia®, Brasil).

Embora o resveratrol não tenha sido encontrado nas amostras, calos das cvs. BR-1 e IAC 886 mantidos sob associação de LEDs azul e vermelho mostraram os estilbenos SB-1 e SB-2 (Figura 36A). Quando obtidos sob luz fluorescente, calos da cv. IAC 886 também apresentaram o estilbeno SB-3 (Figura 36B).

Figura 36 – Perfil cromatográfico dos extratos de calos das cvs. IAC 886 e BR-1 de *A. hypogaea* oriundos de segmentos foliares em meio suplementado com picloram 1,25  $\mu\text{M}$ , a 25°C, sob luz fluorescente ou associação de LED azul e vermelho, considerando a presença de SB-1 e SB-2 (A) e SB-3 (B).



Nota: As análises foram realizadas em coluna C18 Thermo Scientific™ (250 mm x 4.6 mm I.D. x 5  $\mu\text{m}$ ) e o volume de injeção foi de 20  $\mu\text{L}$  e o fluxo foi de 1 mL/min. O monitoramento foi feito em 304 nm. Solução padrão de *trans*-resveratrol a 1 mg/mL em metanol grau espectroscópico (Tedia®, Brasil).

#### 6.4.2 Determinação do teor de *trans*-resveratrol nas amostras

O cromatograma do padrão *trans*-resveratrol (1 µg/mL) nas melhores condições de análise é mostrado na Figura 37. O resultado da quantificação de *trans*-resveratrol nas amostras de material obtido em condições naturais é mostrado na Tabela 15.

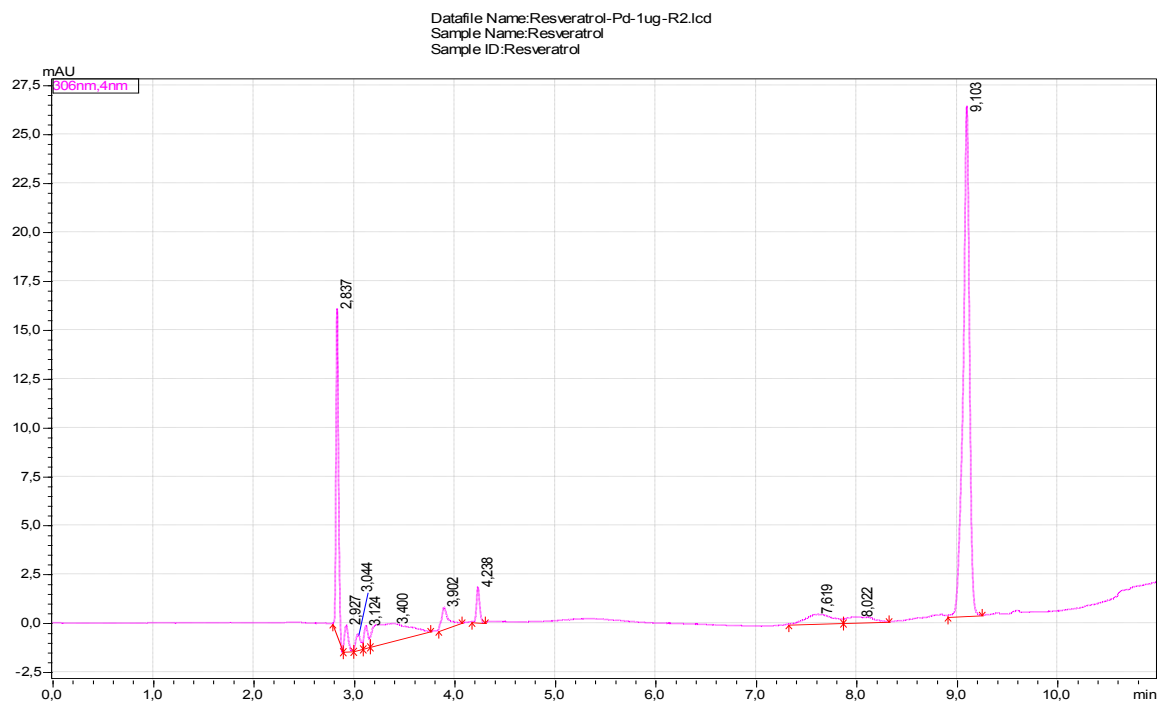
Ao menos uma amostra de cada tipo de material apresentou quantidades significativas de *trans*-resveratrol, sendo o maior teor ( $94,55 \pm 2,56$  µg/g de peso fresco) registrado no extrato de tegumento da cultivar BR-1. Por outro lado, apenas uma amostra de raiz (IAC Caiapó) e uma de semente (BR-1) apresentaram traços da substância.

A eliciação realizada com a parte aérea da cultivar IAC Tatu ST promoveu um aumento significativo do teor de *trans*-resveratrol nas amostras (de não detectado no controle para  $32,18 \pm 0,49$  µg/g de peso fresco).

Uma das partições (diclorometânica) e uma das frações (diclorometano: acetona (1:1)) apresentaram maiores teores de *trans*-resveratrol do que a amostra a partir da qual elas foram obtidas (sementes da cultivar BR-1) (Tabela 17), demonstrando que os procedimentos de partição líquido-líquido e fracionamento permitiram a concentração de *trans*-resveratrol.



Figura 37 – Cromatograma do padrão *trans*-resveratrol (1 µg/mL,  $T_R = 9,1$  min) nas melhores condições de análise.



Nota: As análises foram realizadas em coluna C18 Thermo Scientific™ (250 mm x 4.6 mm I.D. x 5 µm) e o volume de injeção foi de 20 µL e o fluxo foi de 1 mL/min. O monitoramento foi feito em 304 nm. Solução padrão de *trans*-resveratrol a 1 mg/mL em metanol grau espectroscópico (Tedia®, Brasil).

Tabela 17 – Concentração de *trans-resveratrol* nas amostras de material *in vivo* das cinco cultivares de *Arachis hypogaea*.

Extratos brutos	Concentração de <i>trans-resveratrol</i> ( $\mu\text{g/g}$ de peso fresco)				
	IAC 886	IAC Caiapó	IAC Tatu ST	IAC 8112	BR-1
Parte aérea	nd	tr	37,05 $\pm$ 0,16 <sup>b</sup>	13,38 $\pm$ 0,20 <sup>d</sup>	nd
Raiz	nd	tr	nd	nd	nd
Tegumento	tr	nd	20,33 $\pm$ 0,55 <sup>c</sup>	nd	94,55 $\pm$ 2,56 <sup>a</sup>
Semente	nd	nd	nd	nd	tr
Partições de extrato de semente com tegumento					
Hexânica	-	-	-	-	nd
Diclorometânica	-	-	-	-	0,92 $\pm$ 0,01 <sup>g</sup>
Em acetato de etila	-	-	-	-	nd
Butanólica	-	-	-	-	nd
Resíduo aquoso	-	-	-	-	nd
Frações da partição diclorometânica					
Hexano:	-	-	-	-	nd
Diclorometano (1:1)	-	-	-	-	nd
Diclorometano:	-	-	-	-	2,33 $\pm$ 0,03 <sup>f</sup>
Acetona (1:1)	-	-	-	-	nd
Diclorometano:	-	-	-	-	nd
Acetona (1:4)	-	-	-	-	nd
Diclorometano:	-	-	-	-	nd
Metanol (1:1)	-	-	-	-	nd
Metanol	-	-	-	-	nd
Eliciações da parte aérea					
Extração após 0h	-	-	nd	-	-
Extração após 2h	-	-	nd	-	-
Extração após 4h	-	-	7,85 $\pm$ 0,15 <sup>e</sup>	-	-
Extração após 6h	-	-	32,18 $\pm$ 0,49 <sup>b</sup>	-	-

Legenda: (-) Não avaliado; (nd) Não detectado; (tr) Traço - sinal no limite de identificação.

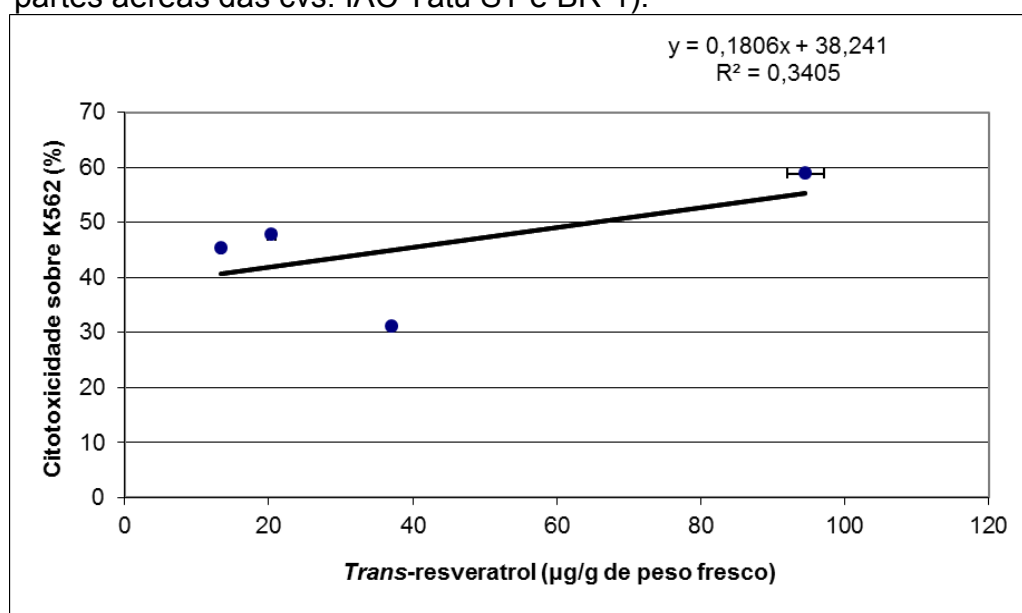
Nota: Os dados representam média  $\pm$  desvio padrão. Letras iguais indicam não haver diferença estatisticamente significativa entre os dados de uma mesma coluna, de acordo com o teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

Quando se relacionam os dados obtidos com as análises por CLAE com a atividade antitumoral apresentada anteriormente, observa-se que, nos extratos de raízes *in vivo*, diferentes cultivares apresentaram percentuais de atividade antitumoral similares, embora as substâncias majoritárias encontradas tenham sido diferentes. Enquanto na cv. IAC 886 foi detectado majoritariamente o SB-3, na cv. IAC Tatu ST o SB-4 foi detectado em maior quantidade.

Em relação aos extratos etanólicos de tegumento, o teor de *trans*-resveratrol, correlaciona-se positivamente com a toxicidade sobre células tumorais. Apesar disso, boa parte dos extratos de tegumento apresentou percentuais similares de atividade antitumoral, sendo importante ressaltar que todos possuíam *trans*-resveratrol e o estilbeno codificado como SB-3.

Foi constatada uma correlação positiva entre a concentração de *trans*-resveratrol e a atividade redutora mitocondrial dos extratos etanólicos brutos nos quais o metabólito foi quantificado. Ou seja, embora a correlação não tenha sido tão elevada ( $R^2 = 0,3405$ ), pode-se verificar que, quanto maior a concentração de *trans*-resveratrol, maior foi a atividade antitumoral dos extratos de parte aérea e tegumento *in vivo* (Figura 38).

Figura 38 – Correlação linear entre a atividade redutora mitocondrial (ARM) e a concentração de *trans*-resveratrol nas amostras de extratos etanólicos brutos (tegumentos das cvs. IAC Tatu ST e IAC 8112 e partes aéreas das cvs. IAC Tatu ST e BR-1).



Nota: Os dados representam média  $\pm$  desvio padrão.

## 6.5 Discussão

Neste trabalho, a quantificação do *trans*-resveratrol foi precedida por uma análise qualitativa, com o intuito de verificar em quais tipos de amostra seria detectado. Esse tipo de análise é frequentemente utilizado em trabalhos de fitoquímica que utilizam CLAE (HALDER; JHA, 2016), CG-EM (SANDERS et al., 2000), TLC ou RMN (HETTA, 2014), permitindo que as amostras que não apresentam o constituinte de interesse sejam descartadas, assim evitando quantificações desnecessárias.

Nas análises dos extratos brutos realizadas, foram encontrados teores significativos de *trans*-resveratrol em amostras de partes aéreas e tegumentos, materiais geralmente menos investigados do que sementes e raízes. O teor encontrado na cultivar IAC Tatu ST está dentro da faixa encontrada por Zorzete e colaboradores (2011) (14-90 µg/g peso fresco) e quase treze vezes maior do que o descrito em folhas por Kim e colaboradores (2013).

Partes aéreas da cv. IAC Tatu ST foram eliciadas com luz ultravioleta. Embora a maioria dos trabalhos de eliciação em *A. hypogaea* tenha sido realizada com sementes (RUDOLF; RESURRECCION, 2005; POTREBKO; RESURRECCION, 2009; SALES; RESURRECCION, 2009), a eliciação de plantas completas foi realizada por Chung e colaboradores (2003). Contudo, utilizando uma dose de UV similar, esses autores observaram um teor máximo de *trans*-resveratrol cerca de doze vezes menor que o encontrado no presente trabalho.

A eliciação também aumentou a produção dos estilbenos SB-1 e SB-2 e induziu a produção de mais um estilbeno nos extratos de partes aéreas preparados seis horas após a irradiação. De forma similar, o *trans*-resveratrol e o piceatanol também foram produzidos em calos oriundos de pecíolos de *A. hypogaea* somente após eliciação por UV (Ku et al., 2005).

O tegumento do amendoim, embora consumido na alimentação, só foi analisado do ponto de vista fitoquímico por Nepote e colaboradores (2004) e Francisco e Resurreccion (2009). No presente trabalho foram detectados  $20,33 \pm 0,55$  e  $94,55 \pm 2,56$  µg de *trans*-resveratrol por grama de tegumento das cultivares IAC Tatu ST e BR-1, respectivamente, o que corresponde a até 25 vezes os valores encontrados por esses autores. Esse fato pode ser explicado tanto pela utilização de

diferentes cultivares e condições de cultivo, como pelas diferenças nos métodos de extração e quantificação.

A ausência ou os baixos teores de *trans*-resveratrol encontrados em amostras de raiz e semente estão de acordo com a literatura, já que diversos autores detectaram quantidades inferiores a 1 µg por grama de peso fresco nesses materiais (SANDERS et al., 2000; CHEN et al., 2002; LIU et al., 2003; OGAKI; SAGAWA, 2003; LEE et al., 2004; TOKUSOGLU et al., 2005; SOBOLEV et al., 2006b; CHUKWUMAH et al., 2012).

A análise de partições e frações em extratos de amendoim é bastante rara na literatura. No presente trabalho, extratos brutos de sementes da cv. BR-1, assim como a suas partições em diclorometano e diclorometano:acetona (1:1) registraram teores de  $0,92 \pm 0,01$  e  $2,33 \pm 0,03$  µg de *trans*-resveratrol por grama de peso fresco, respectivamente. O aumento da concentração do metabólito conforme o fracionamento do material é uma indicação do sucesso do processo de purificação do extrato bruto. Alguns estilbenos como SB-1 e SB-2 somente foram detectados ou tiveram a sua concentração (estimada em percentual de área) consideravelmente aumentada após a eliciação.

Na comparação entre a atividade antitumoral e o teor de *trans*-resveratrol, embora se tenha percebido uma relação direta entre ambas, essa relação não ficou muito clara, devido ao baixo valor de  $R^2$ . Ainda assim, observa-se uma tendência de correlação positiva. Essa relação não muito evidente pode ser explicada pela influência de outros metabólitos na atividade antitumoral, inclusive os outros estilbenos, não quantificados no presente trabalho. Um fato similar foi observado por Djeridane e colaboradores (2006), ao analisar a interação entre compostos fenólicos totais e a atividade antioxidante de algumas espécies argelinas de plantas medicinais.

Em síntese, embora o *trans*-resveratrol não tenha sido detectado em todas as amostras, em muitas delas o teor encontrado foi maior do que o descrito na literatura. O extrato de tegumento da cv. BR-1, que foi o que mais produziu o metabólito, apresentou um teor de *trans*-resveratrol 50% maior que o de calos friáveis eliciados de uvas (*Vitis vinifera*) (KESKİN; KUNTER, 2008). Além do *trans*-resveratrol, os outros estilbenos encontrados neste trabalho, aqui chamados de SB-1, SB-2 e SB-3, também podem ser alvos de estudos mais aprofundados com o intuito de verificar suas propriedades químicas e biológicas.

## 6.6 Conclusões

- A validação permitiu uma máxima eficiência do processo de quantificação do *trans-resveratrol* nas amostras;
- Os extratos de partes aéreas *in vivo* e tegumentos foram os que mostraram as maiores concentrações de estilbenos, incluindo o *trans-resveratrol*;
- A eliciação de partes aéreas com ultravioleta promoveu aumento significativo da concentração de alguns estilbenos nos extratos eliciados.

## CONCLUSÕES FINAIS

- A frequência de calogênese foi maior em explantes e segmentos foliares cultivados em meio MS suplementado com PIC 1,25  $\mu\text{M}$ , a  $25\pm 2^\circ\text{C}$  e sob luz fluorescente ou associação de LEDs azul e vermelho;
- Os extratos de semente da cv. BR-1 foram os que apresentaram a maior atividade alelopática sobre o crescimento de plântulas de *Lactuca sativa*;
- A partição diclorometânica do extrato etanólico de semente com tegumento da cv. BR-1 apresentou atividade alelopática sobre o crescimento de duas espécies de plantas daninhas (*Commelina benghalensis* e *Ipomoea nil*);
- As maiores inibições de crescimento das células tumorais foram mostradas por extratos etanólicos de tegumento, extratos de raízes *in vitro*, pela partição diclorometânica do extrato de semente com tegumento da cv. BR-1 e pela fração diclorometano:acetona (1:1);
- Os maiores teores de *trans*-resveratrol foram encontrados em extratos etanólicos e tegumento da cv. BR-1 e em partes aéreas eliciadas e não eliciadas da cv. IAC Tatu ST.

## PERSPECTIVAS

- Quantificar metabólitos especiais, principalmente estilbenos (SB-1, SB-2, SB-3 e SB-4), em diferentes materiais *in vivo* e *in vitro* das cinco cultivares;
- Subfracionar as frações de partições de extratos de semente visando à obtenção de substâncias de interesse fitoquímico;
- Avaliar outras atividades biológicas, tais como a antioxidante e a antibacteriana dos materiais obtidos *in vivo* e *in vitro* das cinco cultivares;
- Eliciar por injúria mecânica, ultrassom e metil jasmonato os materiais vegetais obtidos.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBOTT, J.A.; MEDINA-BOLIVAR, F.; MARTIN, E.M.; ENGELBERTH, A.S.; VILLAGARCIA, H.; CLAUSEN, E.C.; CARRIER, D.J. Purification of resveratrol, arachidin-1, and arachidin-3 from hairy root cultures of peanut (*Arachis hypogaea*) and determination of their antioxidant activity and cytotoxicity. *Biotechnology Progress*, v.26, p.1344-1351, 2010.

ABDIN, M.Z.; ISRAR, R.U.; REHMAN, S.K.; JAIN, S.K. Artemisinin a novel antimalarial drug: biochemical and molecular approaches for enhanced production. *Planta Medica*, v.69, p.289-299, 2003.

ABICAB. *Cultivo de amendoim*. [S.l.: s.n.], 2012. 1 p. Disponível em: <<http://www.abicab.org.br/cultivo-de-amendoim/>>. Acesso em: 24 mar. 2015.

ABDULMALIK, M.M.; USMAN, I.S.; OLAREWAJU, J.D.; ABA, D.A. Effect of naphthalene acetic acid (NAA) on *in vitro* rooting of regenerated microshoots of groundnut (*Arachis hypogaea* L.). *Bayero Journal of Pure and Applied Sciences*, v.5, n.2, p.128-131, 2012.

ADEGAS, F.S.; VOLL, E.; PRETE, C.E.C. Embebição e germinação de sementes de picão preto (*Bidens pilosa*). *Planta Daninha*, v.21, n.1, p.21-25, 2003.

AGOSTINHO, F.H.; GRAVENA, R.; ALVES, P.L.C.A.; SALGADO, T.P.; MATTOS, E.D. The effect of cultivar on critical periods of weed control in peanuts. *Peanut Science*, v.33, n.1, p.29-35, 2006.

AGRIANUAL. São Paulo: Instituto FNP, 2012. 482 p.

AINA, O.; QUESENBERRY, K.; GALLO, M. Thidiazuron-induced tissue culture regeneration from quartered-seed explants of *Arachis paraguariensis*. *Crop Science*, v.52, n.3, p.1076-1083, 2012.

AINA, O.; QUESENBERRY, K.; GALLO, M. *In vitro* induction of tetraploids in *Arachis paraguariensis*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v.111, n.2, p.231-238, 2012.

AKASAKA, Y.; DAIMON, H.; MII, M. Improved plant regeneration from cultured leaf segments in peanut (*Arachis hypogaea* L.) by limited exposure to thidiazuron. *Plant Science*, v.56, p.169-175, 2000.

ALMEIDA, A.R.P. A defesa das plantas. *Ciências Hoje*, v.11, n.62, p.38-45, 1990.

ALMEIDA, F.S. Influência da cobertura morta na biologia do solo. *A Granja*, v.4, n.451, p.52-67, 1985.

ALMEIDA, M.R.; LEAL, I.; RUELA, H.S.; JUSTO, M.G.; MARTINS, T.M.; COELHO, M.; KUSTER, R.M.; SABINO, K. Anti-tumor potential and acute toxicity of *Jacaranda puberula* Cham. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.26, n.5, p.881-892, 2013.

ARAÚJO, S.G. *Cultura de tecidos, análise fitoquímica e avaliação do potencial anti-oxidante de Arachis villosularca Hoehne*. 2011. 85 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) – Departamento de Biologia Vegetal, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, 2011.

ARORA, M.K.; STRANGE, R.N. Phytoalexin accumulation in groundnuts in response to wounding. *Plant Science*, v.78, p.157-163, 1991.

ASLANI, E.; NAGHSH, N.; RANJBAR, M. Cytotoxic effects of hydro-alcoholic extracts of cress (*Lepidium sativum*) – made from different stages of the plant - on k562 Leukemia cell line. *Hormozgan Medical Journal*, v.18, n.5, 2014.

ATREYA, C.D.; PAPA RAO, J.; SUBRAHMANYAM, N.C. *In vitro* regeneration of peanut (*Arachis hypogaea* L.) plantlets from embryo axes and cotyledon segments. *Plant Science Letters*, v.34, p.379-383, 1984.

AWAD, A.; CHAN, K.; DOWNIE, A.; FINK, C. Peanuts as a source of beta-sitosterol, a sterol with anticancer properties. *Nutrition and Cancer*, v.36, p.238-241, 2000.

BAENAS, N.; GARCIA-VIGUEIRA, C.; MORENO, D.A. Elicitation: A tool for enriching the bioactive composition of foods. *Molecules*, v.19, p.13541-13563, 2014.

BAJAJ, Y.P.S.; LABANA, K.S.; DHANJU, M.S. Induction of pollen-embryos and pollen-callus in anther cultures of *Arachis hypogaea* e *Arachis glabrata*. *Proplasma*, v.103, p.397-399, 1980.

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

BAKER, C.M.; WETZSTEIN, H.Y. Leaflet development, induction time, and medium influence somatic embryogenesis in peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Plant Cell Reports*, v.17, p.925-929, 1998.

BAKER, C.M.; WETZSTEIN, H.Y. Repetitive somatic embryogenesis in peanut cotyledon cultures by continual exposure to 2,4D. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, v.40, p.249-254, 1995.

BALLESTER, A.; VIEITEZ, A.; VIEITEZ, E. Allelopathic potential of *Erica vegans*, *Calluna vulgaris*, and *Daboecia cantabrica*. *Journal of Chemical Ecology*, v.8, n.5, p.851-857, 1982.

BANERJEE, P. Somatic embryogenesis and plantlet regeneration in three high yielding varieties of *Arachis hypogaea* L. *Indian Journal of Plant Sciences*, v.2, n.2, p.28-34, 2013.

BANERJEE, P.; MAITY, S.; MAITI, S.S.; BANERJEE, N. Influence of genotype on *in vitro* multiplication potential of *Arachis hypogaea* L. *Acta Botanica Croatica*, v.66, n.1, p.15-23, 2007.

BARATELLI, T.G. *Estudo das propriedades alelopáticas vegetais: investigação de substâncias aleloquímicas em Terminalia catappa L.(Combretaceae)*. 2006. 185 f. Dissertação (Mestrado em Química de Produtos Naturais) – Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, 2006.

BARATELLI, T.G.; GOMES, A.; WESSJOHANN, L.; KUSTER, R.; SIMAS, N. Phytochemical and allelopathic studies of *Terminalia catappa* L. (Combretaceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, n.41, p.119-125, 2012.

BATHIA, C.R.; MURTHY, G.S.S.; MATHEWS, V.H. Regeneration of plants from “de-embryonated” peanut cotyledon cultures without nutrients and agar. *Journal of Plant Breeding*, v.94, p.149-155, 1985.

BAVARESCO, L.; PEZZUTTO, S.; GATTI, S.; MATTIVI, F. Role of the variety and some environmental factors on grape stilbenes. *Vitis*, v.46, n.2, p.57-61, 2007.

BELAYACHI, L.; ACEVES-LUQUERO, C.; MERGHOU, N.; BAKRI, Y.; DE MATTOS, S.F.; AMZAZI, S.; VILLALONGA, P. *Retama monosperma* n-hexane extract induces cell cycle arrest and extrinsic pathway-dependent apoptosis in Jurkat cells. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, v.14, n.38, p.213-224, 2014.

BERA, S.K.; BHATT, K.M. Genotypic comparison for androgenic callogenesis and organogenesis among cultivated, wild and interspecific hybrid of groundnut. *The Indian Journal of Genetics and Plant Breeding*, v.68, n.3, p.261-264, 2008.

BERA, S.K.; SINGH, A.L.; GEDIA, M.V. Influence of growth regulators on callus induction and plant regeneration in *Arachis prostrata* (L.). *Legume Research*, v.37, n.3, p.281-286, 2014.

BORGES, W.L. *Análise da variabilidade genética e avaliação da fixação biológica de nitrogênio entre acessos de amendoim (Arachis hypogaea L.)*. 2006. 48 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2006.

BRAM, E.E.; STARK, M.; RAZ, S.; ASSARAF, Y.G. Chemotherapeutic drug-induced ABCG2 promoter demethylation as a novel mechanism of acquired multidrug resistance. *Neoplasia*, v.11, p.1359-1370. 2009.

BRANDÃO, H.H.; DAVID, J.P.; COUTO, R.D.; NASCIMENTO, J.A.P.; DAVID, J.M. Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas. *Química Nova*, v.33, n.6, p.1359-1369, 2010.

BRAR, G.S.; COHEN, B.A.; VICK, C.L.; JOHNSON, G.W. Recovery of transgenic peanut (*Arachis hypogaea* L.) plants from elite cultivars utilizing ACCELL technology. *Plant Journal*, v.5, p.745-753, 1994.

BRITO, A.; BARBOSA, R.M.; MORI, B. Desafio do enfermeiro frente às causas de mortes em adultos jovens na cidade de Manaus: 2008/2012. *Boletim Informativo Unimotrisaúde em Sociogerontologia*, n.2, v.6, p.3-17, 2015.

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

BUDIARTO, K. Spectral quality affects morphogenesis on anthurium plantlet during *in vitro* culture. *Agrivita*, n.32, p.234-240, 2010.

BULA, R.J.; MORROW, R.C.; TIBBITTS, T.W.; BARTA, D.J.; INGNATIUS, R.W.; MARTIN, T.S. Lightemitting diodes as a radiation source for plants. *HortScience*, v.26, p.203-205, 1991.

BURNS, S.P.; GALLO, M.; TILLMAN, B.L. Expansion of a direct shoot organogenesis system in peanut (*Arachis hypogaea* L.) to include US cultivars. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, v.48, n.1, p. 58-66, 2012.

BURTNIK, O.J.; MROGINSKI, L.A. Regeneration of *Arachis pinto* (Leguminosae) plants through the *in vitro* culture of leaf tissue. *Oleagineux*, v.40, n.12, p.609-611, 1985.

CAI, J.-P.; WU, Y.-J.; LI, C.; FENG, M.-Y.; SHI, Q.-T.; LI, R.; WANG, Z.-Y.; GENG, J.-S. *Panax ginseng* polysaccharide suppresses metastasis via modulating twist expression in gastric cancer. *International Journal of Biological Macromolecules*, v.57, p.22-25, 2013.

CASIMIRO, G.S. *Determinação de atividade antioxidante, compostos fenólicos totais e teor de resveratrol em cinco cultivares brasileiras de Arachis hypogaea L. com a utilização de duas metodologias extrativas*. 2013. 101 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) – Departamento de Biologia Vegetal, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, 2013.

CASTRO, J.P.; FURTADO, C.M.; CARVALHO, J.M.F.C.; SUASSUNA, T.M.F. Indução do superbrotaamento *in vitro* de eixos embrionários de *Arachis hypogaea* L. *Revista de Biologia e Farmácia*, v.8, n.1, p. 99-103, 2012.

CARRÍN, M.E.; CARELLI, A.A. Peanut oil: Compositional data. *European Journal of Lipid Science and Technology*, v.112, p.697-707, 2010.

CHANG, J.-C.; LAI, Y.-H.; DJOKO, B.; WU, P.-L.; LIU, C.-D.; LIU, Y.-W.; CHIOU, R. Y.-Y. J. Biosynthesis Enhancement and Antioxidant and Anti-inflammatory Activities of Peanut (*Arachis hypogaea* L.) Arachidin-1, Arachidin-3, and Isopentadienylresveratrol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.54, p.10281-10287, 2006.

CHATTERJEE, M.; DAS, S.; JANARTHAN, M.; RAMACHANDRAN, K.; CHATTERJEE, M. Role of 5-lipoxygenase in resveratrol mediated suppression of 7,12-dimethylbenz(α)anthracene-induced mammary carcinogenesis in rats. *European Journal of Pharmacology*, v.668, n.1, p. 99-106, 2011.

CHEN, R.-S.; WU, P.-L.; CHIOU, R. Peanut roots as a source of resveratrol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.50, p.1665-1667, 2002.

CHEN, W.Q.; JOHNSON, B.; SHERWOOD, J.L. A two-step process for the regeneration of *Arachis* spp. by shoot tip culture of greenhouse-grown plants. *Peanut Science*, v.17, n.1, p.25-27, 1990.

CHENG, M.; HIS, D.; PHILLIPS, G. *In vitro* regeneration of Valencia-type peanut (*Arachis hypogaea* L.) from cultured petiolules, epicotyl sections and other seedling explants. *Peanut Science*, v.19, n.2, p.82-87, 1992.

CHENGALRAYAN, K.; HAZRA, S.; GALLO-MEAGHER, M. Histological analysis of somatic embryogenesis and organogenesis induced from mature zygotic embryo-derived leaflets of peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Plant Science*, v.161, p.415-421, 2001.

CHENGALRAYAN, K.; MHASKE, B.; HAZRA, S. High-frequency conversion of abnormal peanut somatic embryos. *Plant Cell Reports*, v.16, p.783-786, 1997.

CHENGALRAYAN, K.; SATHAYE, S.; HAZRA, S. Somatic embryogenesis from the mature embryo-derived leaflets of peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Plant Cell Reports*, v.13, p.578-581, 1994.

CHENGALRAYAN, K.; VANDANA, B.; MHASKE, B.; HAZRA, S. *In vitro* regulation of morphogenesis in peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Plant Science*, v.110, p.259-268, 1995.

CHIAPUSIO, G.; SÁNCHEZ, A.M.; REIGOSA, M. J.; GONZÁLEZ, L. E.; PELLISIER, F. Do germination indices adequately reflect allelochemical effects on the germination process? *Journal of Chemical Ecology*, v.23, n.11, p.2445-2453, 1997.

CHOU, C.H. Roles of allelopathy in plant biodiversity and sustainable agriculture. *Critical Reviews in Plant Science*, v.18, n.5, p.609-636, 1999.

CHUKWUMAH, Y.C.; WALKER, L.T.; VERGHESE, M.; BOKANGA, M.; OGUTU, S.; ALPHONSE, K. Comparison of extraction methods for the quantification of selected phytochemicals in peanuts (*Arachis hypogaea*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.55, p.285-290, 2007.

CHUKWUMAH, Y.; WALKER, L.; VOGLER, B.; VERGHESE, M. Profiling of bioactive compounds in cultivars of Runner and Valencia peanut market-types using liquid chromatography/APCI mass spectrometry. *Food Chemistry*, n.132, p.525-531, 2012.

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

CIDADE, D.; GARCIA, R.; DUARTE, A.; SACHETTO-MARTINS, G.; MANSUR, E. *In vitro* morphogenesis of Brazilian sugarcane varieties. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.41, n.3, p.385-391, 2006.

COFFELT, T.A. *Peanut. In Oil Crops of the World: their breeding and utilization*. New York : McGraw-Hill, 1989.

CONDORI, J.; SIVAKUMAR, G.; HUBSTENBERGER, J.; DOLAN, M.C.; SOBOLEV, V.S.; MEDINA-BOLIVAR, F. Induced biosynthesis of resveratrol and the prenylated stilbenoids arachidin-1 and arachidin-3 in hairy root cultures of peanut: Effects of culture medium and growth stage. *Plant Physiology and Biochemistry*, v.48, n.5, p.310-318, 2010.

CUCCO, M.; JAUME, A. Protocol for regeneration *in vitro* of *Arachis hypogaea* L. *Electronic Journal of Biotechnology*, v.3, n.2, 1-7, 2000.

CUNHA, A.; RANAL, M.; OLIVEIRA, J.; UMEDA, P.; FERRANTE, A. Potencial alelopático do amendoim forrageiro na germinação de picão-preto e corda-de-viola. *Revista da Faculdade de Engenharia e Ciências Agrárias do UNIPAM*, v.1, p.15-25, 2010.

DAIMON, H.; MII, M. Multiple shoot formation and plantlet regeneration from cotyledonary node in peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Japanese Journal of Breeding*, v.41, n.3, p.461-466, 1991.

DAVID, J.M.P.; DAVID, J.P.; SANTOS, V.L.C.S.; SANTOS, M. de L. E S.; MOTA, M.D. Resveratrol: ações e benefícios à saúde humana. *Diálogos & Ciência – Revista da Rede de Ensino FTC*, v.5, n.10, 2007.

DE ARVELO, E.; DA SILVA, C.; FRAILE-VARGAS, G.; TRIANA-ALONSO, F.J. Citotoxicidad *in vitro* de extractos laticiferos de *Calotropis procera* (Aiton) W.T. Aiton y *Pedilanthus tithymaloides* (L.) Poit. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, v.12, n.5, p.476-492, 2013.

DIAS, T.C.S.; ALVES, P.L.C.A.; PAVANI, M.C.M.D.; NEPOMUCENO, M. Efeito do espaçamento entre fileiras de amendoim rasteiro na interferência de plantas daninhas na cultura. *Planta Daninha*, v.27, n.2, p.221-228, 2009.

DJERIDANE, A.; YOUSFI, M.; NADJEMI, B.; BOUTASSOUNA, D.; STOCKER, P.; VIDAL, N. Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chemistry*, v.97, p.654-660, 2006.

DORNER, J.W.; COLE, R. J.; SANDERS, T.H.; BLANKENSHIP, P.D. Interrelationship of kernel water activity, soil temperature, maturity, and phytoalexin production in preharvest aflatoxin contamination of drought-stressed peanuts. *Mycopathologia*, v.105, p.117-128, 1989.

DRUILLE, M.; CABELLO, M.N.; GARCÍA PARISI, P.A.; GOLLUSCIO, R.A.; OMACINI, M. Glyphosate vulnerability explains changes in root-symbionts propagules viability in pampean grasslands. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, n.202, p.48-55, 2015.

DUDAREVA, N.; PICHERSKY, E. Biochemical and molecular genetic aspects of floral scent. *Plant Physiology*, v.122, p.627-633, 2000.

- DUNBAR, K.B.; PITTMAN, R.N. Adventitious shoot formation from mature leaf explants of *Arachis species*. *Plant Physiology and Biochemistry*, v.32, n.6, p.1353-1356, 1992.
- DURHAM, R.E.; PARROT, W.A. Repetitive somatic embryogenesis from peanut cultures in liquid medium. *Plant Cell Reports*, v.11, p.122-125, 1992.
- EAPEN, S.; GEORGE, L. Plant regeneration from leaf discs of peanut and pigeonpea: influence of benzyladenine, indolacetic acid and indolacetic acid-amino acid conjugates. *Biologia Plantarum*, v.35, n.3, p.223-227, 1993.
- EAPEN, S.; GEORGE, L.; RAO, P.S. Plant regeneration through somatic embryogenesis in peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Biologia Plantarum*, v.35, p.499-504. 1993b.
- EINHELLIG, F.A.; LEATHER, G.R. Potentials for exploiting allelopathy to enhance crop production. *Journal of Chemical Ecology*, v.14, n.10, p.1829-1844, 1988.
- EL-WAHAB, A.; GHAREEB, D.; SARHAN, E.; ABU-SERIE, M.; EL DEMELLAWY, M. *In vitro* biological assessment of *Berberis vulgaris* and its active constituent, berberine: antioxidants, anti-acetylcholinesterase, anti-diabetic and anticancer effects. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, v.13, p.218-229, 2013.
- FAGUNDES, M.H. *Sementes de amendoim: alguns comentários*. [S.l.: s.n.], 2002. 11 p. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/download/cas/especiais/semente-de-amendoim-internet.pdf>>. Acesso em: 8 abr. 2011.
- FAN, P.; HOSTETTMANN, K.; LOU, H. Allelochemicals of the invasive neophyte *Polygonum cuspidatum* Sieb. & Zucc. (Polygonaceae). *Chemoecology*, n.20, p.223-227, 2010.
- FEI, H.; CHUIHUA, K. Allelopathic potentials of *Arachis hypogaea* on crops. *Journal of South China Agricultural University*, v.23, n.1, p.9-12, 2002.
- FENG, Q.; STALKER, H.T.; PATEE, H.E. Plant recovery of selfs and interspecific hybrids of *Arachis* by *in vitro* culture of peg tips. *Crop Science*, v.36, n.6, p.1660-1666, 1996.
- FERREIRA, A.G.; ÁQUILA, M.E.A. Alelopatia: uma área emergente da ecofisiologia. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, v.12, p.175-204, 2000.
- FLORES, H.; MEDINA-BOLÍVAR, F. Root culture and plant natural products: "unearthing" the hidden half of plant metabolism. *Plant Tissue Culture and Biotechnology*, v.1, n.2, p.59-75, 1995.
- FONTANA, M.L.; MROGINSKI, L.A.; REY, H.Y. Organogenesis and plant regeneration of *Arachis villosa* Benth. (Leguminosae) through leaf culture. *Biocell*, v.33, n.3, p.179-186, 2009.

FRANCISCO, M.L.D.L.; RESURRECCION, A.V. Functional components in peanuts. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v.48, n.8, p.715-746, 2008.

FRANCISCO, M.L.D.L.; RESURRECCION, A.V.A. Development of a reversed-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) procedure for the simultaneous determination of phenolic compounds in peanut skin extracts. *Food Chemistry*, n.117, p.356-363, 2009.

FREITAS, F.O. *Ampliação da área de ocorrência da espécie Arachis villosulicarpa Hoehne*. Brasília: Embrapa, 2004. 6 p. Relatório técnico.

FRIEDMAN, J. Allelopathy, autotoxicity, and germination. In: KIGEL, J.; GALILI, G. *Seed development and germination*. New York: Marcel Dekker, 1995. p.629-644.

FUKUHARA, K.; KUBO, I. Isolation of steroidal glycoalkaloids from *Solanum incanum* by two countercurrent chromatographic methods. *Phytochemistry*, v.30, n.2, p.685-687, 1991.

FURTADO, C.M.; CARVALHO, J.M.F.C.; SILVA, H.; CASTRO, J.P.; SANTOS, T.S.; SANTOS, J.W. Indução do superbrotamento de amendoim (*Arachis hypogaea*) cv. BR-1 através do cultivo "in vitro". *Revista Brasileira de Oleaginosas e Fibrosas*, v.7, n.2, p.23-26, 2003.

FURTADO, C.M.; CARVALHO, J.M.F.C.; CASTRO, J.P.; SILVA, H. Comparação da frequência de regeneração *in vitro* do amendoim (*Arachis hypogaea*), utilizando diferentes citocininas. *Revista de Biologia e Ciências da Terra*, v.7, n.1, p.51-58, 2007.

GAGLIANO, N.; ALDINI, G.; COLOMBO, G.; ROSSI, R.; COLOMBO, R.; GIOIA, M.; MILZANI, A.; DALLE-DONNE, I. The potential of resveratrol against human gliomas. *Anti-Cancer Drugs*, v.21, p.140-150, 2010.

GAGLIARDI, R.; PACHECO, G.; COCULILO, S.P.; VALLS, J.F.M.; MANSUR, E. *In vitro* plant regeneration from seed explants of wild groundnut species (genus *Arachis*, section *Extranervosae*). *Biodiversity and Conservation*, v.9, p.943-951, 2000.

GAGLIARDI, R.; PACHECO, G.; VALLS, J.F.M.; MANSUR, E. Germplasm preservation of wild *Arachis* species through culture of shoot apices and axillary buds from *in vitro* plants. *Biologia Plantarum*, v.45, n.3, p.353-357, 2002.

GAGLIARDI, R.; PACHECO, G.; VALLS, J.F.M.; MANSUR, E. Cryopreservation of the cultivated and wild *Arachis* species using vitrification and dessication methods. *Cryo-Letters*, v.23, p.61-68, 2002b.

GAGLIARDI, R.; PACHECO, G.; VIEIRA, M.L.C; VALLS, J.G.M.; MANSUR, E. Cryopreservation of *Arachis* species by vitrification of *in vitro*-grown shoot apices and analysis of genetic stability of recovered plants through RAPD. *Cryo-Letters*, v.24, p.103-110, 2003.



GAGLIARDI, R.; PACHECO, G.; OLIVEIRA, C.A.; CARNEIRO, L.A.; VALLS, J.F.M.; VIEIRA, M.L.; MANSUR, E. Rescue of a non-viable accession and RAPD analysis of recovered plants of *Arachis retusa*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.39, n.2, p.197-199, 2004.

GAGLIARDI, R.; HANAI, L.R.; PACHECO, G.; OLIVEIRA, C.A.; CARNEIRO, L.; VALLS, J.F.; MANSUR, E.; VIEIRA, M.L.C. Assessment of genetic stability among *in vitro* plants of *Arachis retusa* Krapov. & C. Gregory & Valls using RAPD and AFLP markers for germplasm preservation. *Journal of Integrative Plant Biology*, v.49, p.307-312, 2007.

GALFI, P.; JAKUS, J.; MALMAR, T.; NEOGRADY, S.; CASORDAS, A. Divergent effects of resveratrol, a poly phenolic phytoestrogen, on free radical levels and type of cell death induced by the histone deacetylase inhibitors butyrate and trichostatin. *Journal of Steroid Biochemistry*, v.94, p.39-47, 2005.

GARCÍA, A.A.; CARRIL, E. Metabolismo secundario de plantas. *Reduca (Biologia)*, v.2, n.3, p.119-145, 2009.

GAO, X.K.; LIU, G.J.; LI, H.F. Study on allelopathic effects of *Arachis hypogaea* extracts on cucumber seeds. *Northern Horticulture*, v.9, p.16-18, 2013.

GARCIA, L.C. *Cultura de tecidos e análise fitoquímica de Arachis repens HANDRO*. 2012. 73 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes; Universidade do Estado do Rio de Janeiro; Rio de Janeiro; 2012.

GARCIA-SALAS, M.; MORALES-SOTO, A.; SEGURA-CARRETERO, A.; FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, A. Phenolic-compound-extraction systems for fruit and vegetable samples. *Molecules*, v.15, p.8813-8826, 2010.

GATTI, A.B.; PEREZ, S.C.; LIMA, M.I. Atividade alelopática de extratos aquosos de *Aristolochia esmeralda* O. Kuntze na germinação e no crescimento de *Lactuca sativa* L. e *Raphanus sativus* L. *Acta Botânica Brasílica*, v.18, n.3, p.459-472, 2004.

GAYDOU, E.M.; BIANCHINI, J.P.; RATOVOHERY, J.V. Triterpene alcohols, methylsterols, sterols, and fatty acids in five Malagasy legume seed oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.31, p.833-836, 1983.

GEETHA, K.; RAMARAO, N.; KIRAN, R.S.; SRILATHA, K.; MAMATHA, P.; RAO, V.U. An overview on *Arachis hypogaea* plant. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, v.4, n.12, p.4508-4518, 2013.

GENG, L.; NIU, L.; SHU, C.; SONG, F.; HUANG, D.; ZHANG, J. High-efficiency regeneration of peanut (*Arachis hypogaea* L.) plants from leaf discs. *African Journal of Biotechnology*, v.10, n.59, p.12680-12682, 2011.

GEORGE, E.F.; HALL, M.H.; DE KLERK, G.J. *Plant Propagation by Tissue Culture*. 3 ed. Berlin: Springer, 2008. v.1, 501p.

GEORGIEV, K.; ZHELEV, I.; GEORGIEVA, S. Total phenolic compounds and tannins content of bancha green tea (*Camellia sinensis*) depending on extraction conditions. *Scripta Scientifica Pharmaceutica*, v.1, p. 48-51, 2014.

GERHARDT, D.; HORN, A.P.; GAELZER, M.M.; FROZZA, R.L.; DELGADO-CAÑEDO, A.; PELEGRINI, A.L.; HENRIQUES, A.T.; LENZ, G.; SALBEGO, C. Boldine: a potential new antiproliferative drug against glioma cell lines. *Investigational New Drugs*, v.27, n.6, p.517-525, 2009.

GILL, R.; SAXENA, P.K., Direct somatic embryogenesis and direct somatic embryogenesis and regeneration of plants from seedling explants of peanut (*Arachis hypogaea*) - promotive role of thidiazuron. *Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne de Botanique*, v.70, n.6, p.1186-1192, 1992.

GILL, R.; OZIAS-AKINS, P. Thidiazuron-induced highly morphogenic callus and high frequency regeneration of fertile peanut (*Arachis hypogaea* L.) plants. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, v.35, n.6, p.445-450, 1999.

GODOY, I.J.; MORAES, S.A.; MORAES, A.R.A.; KASAI, F.S.; MARTINS, A.L.M.; PEREIRA, J.C.V.N.A. Potencial produtivo de linhagens de amendoim do grupo ereto precoce com e sem controle de doenças foliares. *Bragantia*, v.60, n.2, p.101-110, 2001.

GODOY, I.J.; MORAES, S.A.; TURATTI, J.M.; PEREIRA, J.C.V.N.A.; MARTINS, A.L.M.; PAULO, E.M. IAC. *Caiapó*: novo cultivar de amendoim. Campinas: Instituto Agrônomo de Campinas, 1996. 6p. Fôlder.

GODOY, I.J.; MORAES, S.A.; ZANOTTO, M.D.; SANTOS, R.C. Melhoria do amendoim. In: BÓREM, A. (Ed.). *Melhoramento de Espécies Cultivadas*. Visçosa, MG: UFV, 1989. p.51-93.

GOINS, G.D.; YORIO, N.C.; SANWO, M.M.; BROWN, C.S. Photomorphogenesis, photosynthesis, and seed yield of wheat plants grown under light emitting diodes (LEDs) with or without supplemental blue lighting. *Journal of Experimental Botany*, n.48, p.1407-1413, 1997.

GRISI, P.; GUALTIERI, S.; RANAL, M.; SANTANA, D. Phytotoxic activity of crude aqueous extracts and fractions of young leaves of *Sapindus saponaria* L. (Sapindaceae), *Acta Botanica Brasílica*, v.27, n.1, p.62-70, 2013.

GROSSO, N.R.; NEPOTE, V.; GUZMAN, C.A. Chemical composition of some wild peanut species (*Arachis* L.) seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.48, p.806-809, 2000.

GUPTA, A.; SINGHAL, G.S. Effect of sodium and calcium chlorides, abscisic acid and proline on callus cultures of *Arachis hypogaea* L. *Biologia Plantarum*, v.38, n.4, p.525-529, 1996.

GUPTA, S.D.; JATOTHU, B. Fundamentals and applications of light-emitting diodes (LEDs) in *in vitro* plant growth and morphogenesis. *Plant Biotechnology Reports*, v.7, p.211-220, 2013.

HABIBA, S.U.; SHIMASAKI, K.; AHASAN, M.; ALAM, M. Effect of 6-Benzylaminopurine (BA) and Hyaluronic Acid (HA) under White Light Emitting Diode (LED) on Organogenesis in Protocorm-Like Bodies (PLBs) of *Dendrobium kingianum*. *American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences*, v.14, n.7, p.605-609, 2014.

HALDER, M.; JHA, S. Enhanced *trans*-resveratrol production in genetically transformed root cultures of peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, n.124, p.555-572, 2016.

HARBORNE, J.B.; MABRY, T.J.; MABRY, H. (Ed.). *The Flavonoids*. London, Chapman & Hall, 1975.

HASAN, M.M.; CHA, M.; BAJPAI, V.K.; BAEK, K.H. Production of a major stilbene phytoalexin, resveratrol in peanut (*Arachis hypogaea*) and peanut products: a mini review. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, n.12, p.209-221, 2013.

HAZRA, S.; SATHAYE, S.S.; MASCARENHAS, A.F. Direct somatic embryogenesis in peanut (*Arachis hypogaea*). *Nature Biotechnology*, v.7, p.949-951, 1989.

HE, H.; BIN, J. Adventitious shoot induction and plant regeneration from the epicotyl of *Arachis hypogaea*. *Journal of South China Agricultural University*, v.24, n.3, p.46-49, 2003.

HE, Y-J.; LI, W.L.; LUI, B.H.; DONG, H.; MOU, Z.R.; WU, Y-Z. Identification of differential proteins in colorectal cancer cells treated with caffeic acid phenethyl ester. *World Journal of Gastroenterology*, v.20, n.33, p.11840-11849, 2014.

HERSELMAN, L. Genetic variation among Southern African cultivated peanut (*Arachis hypogaea* L.) genotypes as revealed by AFLP analysis. *Euphytica*, v.133, p.319-327, 2003.

HETTA, M.H.; ALY, H.F.; ALI, N.W. Estimation of resveratrol content in peanut pericarp and its relation to the *in vitro* inhibitory activity on carbohydrate metabolizing enzymes. *Pharmazie*, v.69, p.92-95, 2014.

HILLIS, W.E.; HART, J.H.; YAZAKI, Y. Polyphenols of *Eucalyptus sideroxylon*. *Phytochemistry*, v.13, n.8, p.1591-1959, 1974.

HLINKOVA, H. Influence of chemomutagenes on dedifferentiation and organogenesis of peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Plant Physiology*, v.12, p.77-82, 2001.

HOENECKE, M.E.; BULA, R.J.; TIBBITTS, T.W. Importance of blue photon levels for lettuce seedlings grown under red-light emitting. *HortScience*, v.27, p.427-430, 1992.

HOFMAN, C.L. *The Native Population of Pre-columbian Saba. Part One. Pottery Styles and their Interpretations*. 1993. 156 f. Tese (Doutorado em Arqueologia) – Faculdade de Arqueologia; Universidade de Leiden; Holanda; 1993.

HUANG, C.-P.; AU, L.-C.; CHIOU, R.; CHUNG, P.-C.; CHEN, S.Y.; TANG, W.C.; CHANG, C.-L.; FANG, W.-H.; LIN, S.-B. Arachidin-1, a peanut stilbenoid, induces programmed cell death in human leukemia HL-60 cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.58, p.12123-12129, 2010.

HUBER, P.C.; MARUIAMA, C.H.; ALMEIDA, W.P. P-glycoprotein and multidrug resistance: structure-activity relationships of modulators. *Química Nova*, v.33, p.2148-2154, 2010.

HUGHES, K.W. *In vitro* ecology: exogenous factors affecting growth and morphogenesis in plant culture systems. *Environmental and Experimental Botany*, v.21, n.3, p.281-288, 1981.

IAS. International Allelopathy Society Constitution. *First World Congress on Allelopathy. A Science for the Future*. 1996.

IBERN-GO'MEZ, M.; ROIG-PE'REZ, S.; LAMUELA-RAVENTO'S, R.M. DE LA TORRE-BORONAT, M.C. Resveratrol and piceid levels in natural and blended peanut butters. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, n.48, p.6352-6354, 2000.

ILAHY, I.; SAMI, R.; JABEEN, M. Plantlet regeneration from mature embryos of peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Pakistan Journal of Botany*, v.27, n.2, p.405-409, 1995.

ILAHY, I.; AMEEN, S. Studies on *in vitro* culture of *Arachis hypogaea* hypocotyl explants. *Pakistan Journal of Botany*, v.18, n.1, p.21-27, 1986.

INCA (Instituto Nacional do Câncer). *O que é o câncer*. [S.l.: s.n.], 2016. Disponível em: <[http://www1.inca.gov.br/conteudo\\_view.asp?id=322](http://www1.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=322)>. Acesso em: 13 jan. 2016.

INDERJIT; DAKSHINI, K.M.M; 1995. On laboratory bioassays in Allelopathy. *The Botanical Review*, v.61, n.1, p.28-44, 1995.

INGHAM, J.L. 3,4',5-Trihydroxystilbene as a phytoalexin from groundnut (*Arachis hypogaea*). *Phytochemistry*, v.15, p.1791-1793, 1976.

IQBAL, M.; NAZIR, F.; IQBAL, J.; TEHRIM, S.; ZAFAR, Y. *In vitro* micropropagation of peanut (*Arachis hypogaea*) through direct somatic embryogenesis and callus culture. *International Journal of Agriculture and Biology*, v.13, n.5, p.811-814, 2011.

JAMIER, V.; MARUT, W.; VALENTE, S.; CHÉREAU, C.; CHOUZENOUX, S.; NICCO, C.; LEMARÉCHAL, H.; WEILL, B.; KIRSCH, G.; JACOB, C.; BATTEUX, F. Chalcone-Coumarin derivatives as potential anti-cancer drugs: an *in vitro* and *in vivo* investigation. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, v.14, p.1-12, 2014.

JAO, R.C.; FANG, W. EFFECTS OF frequency and duty ratio on the growth of potato plantlets *in vitro* using light emitting diodes. *HortScience*, n.39, p.375-379, 2004.

JHA, S.D.; SANYAL, B.; GHOSH, T.; JHA, B. Improved taxol yield in cell suspension culture of *Taxus wallichiana* (Himalayan yew). *Planta Medical*, v.64, p.270-272, 1998.

JOHNSON, B.B.; PITTMAN, R.N. Factors affecting *in vitro* differentiation of explants from mature leaves of *Arachis villosulcarpa* Hoehne. *In Vitro Cellular and Developmental Biology*, v.22, n.12, p.713-715, 1986.

JOSHI, M.V.; SAHASRABUDHE, N.A.; HAZRA, S. Responses of peanut somatic embryos to thidiazuron. *Biologia Plantarum*, v.46, n.2, p.187-192, 2003.

JOSHI, M.V.; SUJATHA, K.; HAZRA, S. Effect of TDZ and 2, 4-D on peanut somatic embryogenesis and *in vitro* bud development. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, v.94, p.85-90, 2008.

JUNAID, A.; NASIM, S.A.; MUJIB, A.; SHARMA, M.P. Screening of vincristine yield in *ex vitro* and *in vitro* somatic embryos derived plantlets of *Catharanthus roseus* L. (G.) Don. *Scientia Horticulturae*, v.119, p.325-329, 2009.

KANYAND, M.; DESSAI, A.P.; PRAKASH, C.S. Thidiazuron promotes high frequency regeneration of peanut (*Arachis hypogaea*) plants *in vitro*. *Plant Cell Reports*, v.14, p.1-5, 1994.

KANYAND, M.; PRAKASH, C.S. Evaluation of peanut genotypes for *in vitro* plant regeneration using thidiazuron. *Journal of Biotechnology*, v.130, p.202-207, 2007.

KARUPPUSAMY, S. A review on trends in production of secondary metabolites from higher plants by *in vitro* tissue, organ and cell cultures. *Journal of Medicinal Plants Research*, v.3, n.13, p.1222-1239, 2009.

KERBAUY, G.B. Clonagem de plantas *in vitro*. *Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento*, v.1, n.1, p.30-33, 1997.

KERRIDGE, P.C.; HARDY, B. Biology and agronomy of forage *Arachis*. Cali: CIAT, 1994.

KESKİN, N.; KUNTER, B. Production of *trans*-resveratrol in 'Cabernet Sauvignon' (*Vitis vinifera* L.) callus culture in response to ultraviolet-C irradiation. *Vitis*, v.47, n.4, p.193-196, 2008.

KHAN, N.; MUKHTAR, H. Modulation of signaling pathways in prostate cancer by green tea polyphenols. *Biochemical Pharmacology*, v.85, n.5, p.115-126, 2013.

KHAN, R.; KHAN, I.A. Varietal response of Chickpea (*Cicer arietinum* L.) towards the allelopathy of different weeds. *Sains Malaysiana*, v.44, n.1, p.25-30, 2015.

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. *African Journal of Biotechnology*, n.7, p.3785-3787, 2008.

KIM, S.J.; HAHN, E.J.; HEO, J.W.; K.Y. PAEK. Effects of LEDs on net photosynthetic rate, growth and leaf stomata of chrysanthemum plantlets *in vitro*. *Scientia Horticulturae*, v.101, p.143-151, 2004.

KIM, T.; THI, N.; VAN, P.; DIEM, P.; THUY, D.; THAT, Q.; PHI, P. Phytochemical constituents and determination of resveratrol from the roots of *Arachis hypogaea* L. *American Journal of Plant Sciences*, v.4, p.2351-2358, 2013.

KING, R.E.; KENT, K.D.; BOMSER, J.A. Resveratrol reduces oxidation and proliferation of human retinal pigment epithelial cells via extracellular signal-regulated kinase inhibition. *Chemico-Biological Interactions*, v.151, p.143-149, 2005.

KISSMANN, K.G.; GROTH, D. *Plantas infestantes e nocivas*. São Paulo: Basf, 1999. 2 ed. 256p.

KNUDSEN, J.T.; TOLLSTEN, L. Trends in floral scent chemistry in pollination syndromes: floral scent composition in moth-pollinated taxa. *Botanical Journal of the Linnean Society*, v.113, p.263-284, 1993.

KOŇARIKOVÁ, K.; JEŽOVIČOVÁ, M.; KERESTEŠ, J.; GBELCOVÁ, H.; ĎURAČKOVÁ, Z.; ŽITŇANOVÁ, I. Anticancer effect of black tea extract in human cancer cell lines. *SpringerPlus*, v.4, p.127-132, 2015.

KORDE, V.; DHAS, S.; GURAVE, S. Hairy root culture: a promising approach in biotransformation. *Asian Journal of Plant Science and Research*, v.6, n.4, p.6-11, 2016.

KRAPOVICKAS, A. The origin, variability, and spread of the groundnut (*Arachis hypogaea*) in the domestication and exploitation of plants and animals. P.J. Ucko and J.W. Dumbleby. *Aldine*, p.427-441, 1969.

KRAPOVICKAS, A.; GREGORY, W.C. Taxonomia del género *Arachis* (Leguminosae). *Bonplandia*, v. 8, p.1-186, 1994.

KRAPOVICKAS, A.; SIMPSON, C.E.; VALLS, J.F. *Arachis villosulicarpa* (Leguminosae), un proceso de domesticación aislado. In: CONGRESO ARGENTINO DE GENÉTICA, 16, 1985, Rosário. Anais...[S.l.:s.n.], 1985.

KU, K.L.; CHANG, P.S.; CHENG, Y.C.; LIEN, C.Y. Production of stilbenoids from the callus of *Arachis hypogaea*: a novel source of the anticancer compound piceatannol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.53, p.3877-3881, 2005.

KUBO, M.; KIMURA, Y.; SHIN, H.; HANEDA, T.; TANI, T., NAMBA, K. Studies on the antifungal substance of crude drug: (II) on the roots of *Polygonum cuspidatum* (Poligonaceae). *Shoyakugaku Zasshe*, v.35, n.1, p.58-61, 1981.

KUMAR, K.C.S.; MÜLLER, K. Lichen metabolites. 2. Antiproliferative and cytotoxic activity of gyrophoric, usnic, and diffractaic acid on human keratinocyte growth. *Journal of Natural Products*, v.62, p.821-823, 1999.

KUNTZ, S.; KUNZ, C.; RUDLOFF, S.; Inhibition of pancreatic cancer cell migration by plasma anthocyanins isolated from healthy volunteers receiving an anthocyanin-rich berry juice. *European Journal of Nutrition*, v.4, n.5, p.1-12, 2015.

KUO-HIS, W.; YU-HSUAN, L.; JU-CHUN, C.; TIN-FU, K. SHYI-LIANG, S.; CHIOU, R.Y.Y. Germination of peanut kernels to enhance resveratrol biosynthesis and prepare sprouts as a functional vegetable. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, n.53, p.242-246, 2005.

LADHARI, A.; OMEZZINE, F.; DELLAGRECA, M.; ZARRELLI, A.; ZUPPOLINI, S.; HAOUALA, R. Phytotoxic activity of *Cleome arabica* L. and its principal discovered active compounds. *South African Journal of Botany*, n.88, p.341-351, 2013.

LAGE, H. An overview of cancer multidrug resistance: A still unsolved problem. *Cellular and Molecular Life Science*, v.65, p.3145-3167, 2008.

LANGCAKE, P.; CORNFORD, C. A.; PRYCE, R. J. Identification of pterostilbene as a phytoalexin of *Vitis vinifera* leaves. *Phytochemistry*, v.18, n.6, p.1025-1028, 1979.

LAXMI, G.V.; GIRI, C. Plant regeneration via organogenesis from shoot base-derived callus of *Arachis stenosperma* e *Arachis villosa*. *Current Science*, v.85, n.11, p.1624-1629, 2003.

LAXMI, G.V.; GIRI, C. Rapid *in vitro* multiplication and establishment of five wild species (India). *Journal of Genetics and Breeding*, v.57, n.3, p.213-218, 2003b.

LASZCZYK, M.N. Pentacyclitriterpenes of the lupane, oleanane and ursane group as tools in cancer therapy. *Planta Medica*, n.75, p.1549-1560, 2009.

LEE, S.S.; LEE, S.M.; KIM, M.; CHUN, J.; CHEONG, Y.K.; LEE, J. Analysis of *trans*-resveratrol in peanuts and peanut butters consumed in Korea. *Food Research International*, n.37, p.247-251, 2004.

LEE, J.H.; BAEK, I.-Y.; HA, T.J.; CHOUNG, M.-G.; KO, J.-M.; OH, S.-K.; KIM, H.-T.; RYU, H.W.; PARK, K.Y.; PARK, K.H. Identification and characterization of phytochemicals from peanut (*Arachis hypogaea* L.) pods. *Food Science and Biotechnology*, v.17, p.475-482, 2008.

LI, Q.; LI, W.; HUI, L.-P.; ZHAO, C.-Y.; HE, L.; KOIKE, K. 13,28-Epoxy triterpenoid saponins from *Ardisia japonicas* electively inhibit proliferation of liver cancer cells without affecting normal liver cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v.22, n.19, p.6120-6125, 2012.

LI, Z.; JARRET, R.; PITTMAN, R.N.; DEMSKI, J.W. Shoot organogenesis from cultured seed explants of peanut (*Arachis hypogaea* L.) using thidiazuron. *In Vitro Cellular Developmental Biology Plant*, v.30, n.4, p.187-191, 1994.

- LI, Z.; JARRET, R.; PITTMAN, R. N.; DUNBAR, K.B.; DEMSKI, J.W. Efficient plant regeneration from protoplasts of *Arachis paraguariensis* Chod. et Hassl. using a nurse culture method. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, v.34, p.83-90, 1993.
- LIAN, M.L.; MURTHY, H.N.; PAEK, K.Y. Effects of light emitting diodes (LED) on the *in vitro* induction and growth of bulblets of *Lilium oriental* hybrid 'Pesaro'. *Scientia Horticulturae*, n.94, p.365-370, 2002.
- LIN, J-K.; LIANG, Y-C.; LIN-SHIAU, S-Y. Cancer chemoprevention by tea polyphenols through mitotic signal transduction blockade. *Biochemical Pharmacology*, v.8, p.911-915, 1999.
- LIU, C.D.; WEN, Y.Y.; CHIOU, J.M.; WANG, K.H.; CHIOU, R.Y.Y. Comparative characterization of peanuts grown by aquatic floating cultivation and field cultivation for seed and resveratrol production. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, n.51, p.1582–1585, 2003.
- LIU, J.; REN, Y.; YUAN, U.; SHUANG, S.; YUSHAN, L. Induction and *in vitro* culture of hairy roots in Peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, n.6, p.125-135, 2012.
- LIU, J.; WANG, G.; WANG, G. Chemical constituents in aerial parts of *Arachis hypogaea* (III). *Chinese Traditional Patent Medicine*, v.31, p.1902-1903, 2009.
- LITTLE, E.L.; MAGBANUA, Z.V.; PARROTT, W.A. A protocol for repetitive somatic embryogenesis from mature peanut epicotyls. *Plant Cell Reports*, v.19, p.351-357, 2000.
- LIVINGSTONE, D.M.; BIRCH, R.G. Plant regeneration and microprojectile-mediated gene transfer in embryonic leaflets of peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Australian Journal of Plant Physiology*, v.22, n.4, p.585-591, 1995.
- LOPES, R.M.; AGOSTINI, T.S.; GIMENES, M.A.; SILVEIRA, D. Chemical composition and biological activities of *Arachis* species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.59, p.4321-4330, 2011.
- LORENZI, H. *Manual de identificação e de controle de plantas daninhas: plantio direto e convencional*. 5 ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2000. 339p.
- LOU, H.X.; YUAN, H.Q.; YAMAZAKI, Y.; SASAKI, T.; OKA, S.C. Alkaloids and flavonoids from peanut skins. *Planta Medica*, v.67, p.345-349, 2001.
- LOURENZANI, W. L.; LOURENZANI, A.E.B.S. Potencialidades do agronegócio brasileiro de amendoim. In: *CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ECONOMIA E SOCIOLOGIA RURAL*, 2006, Fortaleza, CE. Anais... [S.l.:s.n.], 2006.
- LOWCOCK, E.C.; COTTERCHIO, M.; BOUCHER, B.A. Consumption of flaxseed, a rich source of lignans, is associated with reduced breast cancer risk. *Cancer Causes & Control*, v.4, p.813-816, 2013.



MAHUGO, C.; SOSA, Z.; TORRES, M.E.; SANTANA, J.J. Methodologies for the extraction of phenolic compounds from environmental samples: new approaches. *Molecules*, v.14, p.298-320, 2009.

MAINA, S.M. Evaluation of regeneration response in tissue culture of selected groundnut (*Arachis hypogaea* L.) varieties adapted to Eastern and southern Africa. *African Journal of Biotechnology*, v.12, n.13, p.237-242, 2011.

MAINA, S.M.; EMONGOR, Q.; SHARMA, K.K.; GICHUKI, S.T.; GATHAARA, M.; VILLIERS, S.M. Surface sterilant effect on the regeneration efficiency from cotyledon explants of groundnut (*Arachis hypogaea* L.) varieties adapted to eastern and Southern Africa. *African Journal of Biotechnology*, v.9, n.20, p.2866-2871, 2010.

MACÍAS, F.A. Allelopathy, a natural strategy for weed control. *Communications and Applications in Biology and Science*, v.69, n.3, 2004.

MACIEL, M.A.; PINTO, A.C.; VEIGA, J.R. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. *Química Nova*, v.25, p.429-438, 2002.

MAHAN, L.K.; ESCOTT-STUMP, S. *Krause - Alimentação, nutrição e dietoterapia*. 12 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010. 1358p.

MALVIYA, R.; BANSAL, V.; PAL, O.P.; SHARMA, P.K. High performance liquid chromatography: a short review. *Journal of Global Pharma Technology*, v.2, n.5, p.22-26, 2010.

MANSUR, E.; LACORTE, C.; RABELLO, A.; CORDEIRO, A. *In vitro* regeneration of *Arachis villosulicarpa* Hoehne from cotyledon segments, leaves and cell suspension. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.28, n.10, p.1143-1146, 1993.

MATAND, K.; WU, N.; WU, H.; TUCKER, E.; LOVE, K. More improved peanut (*Arachis hypogaea* L.) protocol for direct shoot organogenesis in mature dry-cotyledonary and root tissues. *Journal of Biotech Research*, n.5, p.24-34, 2013.

MCKENTLY, A.H. Direct somatic embryogenesis from axes of mature peanut embryos. *In Vitro Cellular Developmental Biology*, v.27, p.197-200, 1991.

MCKENTLY, A.H. Effect of genotype on somatic embryogenesis from axes of mature peanut embryos. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v.42, n.3, p.251-254, 1995.

MCKENTLY, A.H. *In vitro* plant regeneration of peanut from seed explants. *Crop Science*, v.30, n.1, p.192-196, 1990.

MCKENTLY, A.H. Regeneration of peanut and perennial peanut from cultured leaf tissue. *Crop Science*, v.31, n.3, p.833-837, 1991b.

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

MERKLE S.A.; MONTELLO, P.M.; XIA, X.; UPCHURCH, B.L.; SMITH, D.R. Light quality treatments enhance somatic seedling production in three southern pine species. *Tree Physiology*, n.26, p.187-194, 2005.

MHASKE, V.B.; CHENGALRAYAN, K.; HAZRA, S. Influence of osmotica and abscisic acid on triglyceride accumulation in peanut somatic embryos. *Plant Cell Reports*, v.17, n.742-746, 1998.

MIRANDA, C.; VIEIRA, A.; CADISCH, G. Determinação da fixação biológica de nitrogênio no amendoim forrageiro (*Arachis* spp.) por intermédio da abundância natural de N<sup>15</sup>. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.32, n.6, p.1859-1865, 2003.

MIZUTANI, J. Selected allelochemicals. *Critical Reviews in Plant Sciences*, v.18, n.5, p.653-671, 1999.

MOLL, F. Die chemische natur des "erdnusalkaloid" arachin. *Planta Medica*, v.9, p.213-215, 1961.

MONTELES, F.; MELO, T.A.; LIMA FILHO, F. SOUSA, R.; SILVA, M.; SERRA, I. Efeito alelopático dos extratos aquosos de amendoim forrageiro (*Arachis pinto*) e da erva-de-touro (*Tridax procumbens*) sobre a germinação de sementes de tomate (*Solanum lycopersicum*) e pimentão (*Capsicum annum*). *Cadernos de Agroecologia*, v.6, p.1-5, 2011.

MORRIS, J.B.; DUNN, S.; PITTMAN, R.N. Plant recovery from embryonic axes of deteriorated peanut seed for germplasm renewal. *Peanut Science*, v.22, n.1, p.66-70, 1995.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, v.65, p.55-63, 1983.

MOSS, J.P.; RAO, V.R. The peanut: reproductive development to plant maturity. In: H. E. Pattee and H. T. Stalker (Ed.). *Advances in peanut science American Peanut Research Educational Society*. Texas: American Peanut Research Educational Society, 1995. p.1-13.

MROGINSKI, E.; REY, H.Y.; GONZALEZ, A.M.; MROGINSKI, L.A. Thidiazuron promotes *in vitro* plant regeneration of *Arachis correntina* (Leguminosae) via Organogenesis. *Journal of Plant Growth Regulation*, v.23, p.129-134, 2004.

MROGINSKI, L.A.; FERNANDEZ, A. *In vitro* culture of anthers from species of *Arachis* (Leguminosae). *Oleagineux*, v.35, p.243-248, 1979.

MROGINSKI, L.A.; FERNANDEZ, A. Production of plantlets by anther culture *in vitro* of wild species of *Arachis* (Leguminosae). *Oleagineux*, v.35, n.2, p.89-92, 1980.

MROGINSKI, L.A.; KARTHA, K.K.; SHYLUK, J.P. Regeneration of peanut (*Arachis hypogaea* L.) plantlets by *in vitro* culture of immature leaves. *Canadian Journal of Botany*, p.828-830, 1981.

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

MURCH, S.J.; VICTOR, J.M.R.; KRISHNARAJ, S. The role of proline in thidiazuron-induced somatic embryogenesis of peanut. *In Vitro Cellular and Developmental-Plant*, v.35, n.1, p.102-105, 1999.

MURPHY, S. Field testing for pollen allelopathy: a review. *Journal of Chemical Ecology*, v.26, n.9, p.2155-2172, 2000.

MURTHY, B.N.S.; MURCH, S.J.; SAXENA, P.K. Thidiazuron-induced somatic embryogenesis in intact seedlings of peanut (*Arachis hypogaea*): endogenous growth regulator levels and significance of cotyledons. *Physiologia Plantarum*, v.94, n.2, p.268-276, 1995.

NAG, M.; MUKHERJEE, P.M.; CHANDA, J.; BISWAS, R.; HARWANSH, R.K.; ALDHABI, N.A.; DURAI PANDIYAN. Plant developed analytical profile of *Stereospermum suaveolens* in Indian traditional knowledge. *Indian Journal of Traditional Knowledge*, v.14, n.4, p.590-594, 2015.

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

NARASIMHULU, S.B.; REDDY, G.M. Plantlet regeneration from different callus of *Arachis hypogaea* L. *Plant Science Letters*, v.31, p.157-163, 1983.

NASCIMENTO, F.; GÓIS, D.; ALMEIDA, D.; NASCIMENTO, A.; ALMEIDA, T.; GUEDES, V. A importância do acompanhamento nutricional no tratamento e na prevenção do câncer. *Ciências Biológicas e de Saúde Unit*, v.2, n.3, p.11-24, 2015.

NASIM, S.A.; ASLAM, J.; KAPOOR, R.; KHAN, S.A. Secondary metabolites production through biotechnological intervention: a review. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, v.22, n.3, p.147-161, 2010.

NAZIR, F.; HASSAN, M.; AKRAM, Z.; JAVED, M.; ALI, S.; ALI, G.; ZAFAR, Y. *In vitro* regeneration of Pakistani peanut (*Arachis hypogaea* L.) varieties using de-embryonated cotyledonary explants. *African Journal of Biotechnology*, v.10, n.43, p.8599-8604, 2011.

NEPOMUCENO, M.P.; ALVES, P.L.C.A.; DIAS, T.C.S.; CARDOZO, N.P.; PAVANI, M.C.M.D. Efeito da época de semeadura nas relações de interferência entre uma comunidade infestante e a cultura do amendoim. *Planta Daninha*, v.25, n.3, p.481-488, 2007.

NEPOTE, V.; GROSSO, N.R.; GUZMAN, C.A. Radical scavenging activity of extracts of Argentine peanut skins (*Arachis hypogaea*) in relation to its *trans*-resveratrol content. *The Journal of the Argentine Chemical Society*, v.92, n.4/6, p.41-49, 2004.

NHUT, D.T.; HONG, L.T.A.; WATANABE, H.; GOI, M.; TANAKA, M. Growth of banana plantlets cultured *in vitro* under red and blue lightemitting diode (LED) irradiation source. *Acta Horticulturae*, n.575, p.7-23, 2000.

NHUT, D.T.; HUUY, N.P.; TAI, N.T.; NAM, N.B.; LUAN, V.Q.; HIEN, V.T.; TUNG, H.T.; VINH, B.T.; LUAN, T.C. Light-emitting diodes and their potential in callus growth, plantlet development and saponin accumulation during somatic embryogenesis of *Panax vietnamensis* Ha et Grushv. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, n.29, v.2, p.299-308. 2015.

NOGUSHI, H.; TANAKA, Y. Allelopathic potential of *Citrus junos* fruit waste from food processing industry. *Bioresource Technology*, n.94, p.211-214, 2004.

NOOR, M.; SALAM, U.; KHAM, M. Allelopathic effects of *Prosopis juliflora* Swartz. *Journal of Arid Environments*, n.94, p.83-90, 1995.

NWOKOLO, E. Peanut (*Arachis hypogaea* L.). In Food and Feed from Legumes and Oilseeds. *Chapman and Hall*, 1996.

OGAKI, Y.; SAGAWA, I. *Trans-resveratrol* content in seeds and seed coats of Japanese peanut cultivars and that in peanut products. *Journal of the Japanese Society for Food Science and Technology*, v.50, n.12, p.570–573, 2003.

OKAMOTO, K.; YANAGI, T.; KONDO, S. Growth and morphogenesis of lettuce seedlings raised under different combinations of red and blue light. *Acta Horticulturae*, v.432, p.149-157, 1997.

OLIVEIRA, S. *Estudo alelopático de espécies do gênero Solanum do Distrito Federal*. 2009. 163 f. Tese (Doutorado em Ecologia e Recursos Naturais) – Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, 2009.

OLIVEIRA S.; CAMPOS, M. Allelopathy of *Solanum palicacanthum* leaves on germination and seedling growth of *Sesamum indicum*. *Allelopathy Journal*, v.18, n.2, p.331-338, 2006.

OLIVEIRA, S.C.; FERREIRA, A.G.; BORGHETTI, F. Efeito alelopático de folhas de *Solanum lycocarpum* A. St.-Hil (Solanaceae) na germinação e crescimento de *Sesamum indicum* L. (Pedaliaceae) sob diferentes temperaturas. *Acta Botânica Brasileira*, v.18, n.3, p.401-406, 2004.

OTHMAN, M.R.; LEONG, S.T.; BAKAR, B.; AWANG, K.; ANNUAR, M.S.M. Allelopathic potentials of *Cuscuta campestris* Yuncker extracts on germination and growth of radish (*Raphanus sativus* L.) and lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Journal of Agricultural Science*, v.4, n.9, p.57-63, 2012.

OZIAS-AKINS, P.; ANDERSON, W.; HOLBROOK, C. Somatic embryogenesis in *Arachis hypogaea* L.: genotype comparison. *Plant Science*, v.83, p.103-111, 1992.

OZIAS-AKINS, P.; GILL, R. Progress in the development of tissue culture and transformation methods applicable to the production of transgenic peanut. *Peanut Science*, n.28, p.123–131, 1999.

O'LEARY, K.; PASCUAL-TEREASA, S.; NEEDS, P.; BAO, Y-P.; O'BRIEN, N.; WILLIAMSON, G. Effect of flavonoids and Vitamin E on cyclooxygenase-2 (COX-2) transcription. *Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, v.551, n.2, p.245-254, 2004.

OZUDOGRU, E.A.; OZDEN-TOKATLI, Y.; AKCIN, A. Effect of silver nitrate on multiple shoot formation of Virginia-type peanut through shoot tip culture. *In Vitro Cellular Developmental Biology-Plant*, v.41, p.151-156, 2005.

OZUDOGRU, E.A.; OZDEN-TOKATLI, Y., AKCIN, A. Effect of silver nitrate on organogenesis of peanut (*Arachis hypogaea* L.). *In Vitro Cellular Developmental Biology-Animal*, v.40, p.46-51, 2004.

PACHECO, G.; GAGLIARDI, R.F.; COGLIATTI, M.B.; MANHÃES, H.; CARNEIRO, L.A.; VALLS, J.F.M.; MANSUR, E. Influence of substrates and *in vitro* preconditioning treatments on *ex vitro* acclimatization of *Arachis retusa*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.41, p.165-169, 2006.

PACHECO, G.; GAGLIARDI, R.F.; CARNEIRO, L.A.; CALLADO, S.A.; VALLS, J.F.M.; MANSUR, E. The role of BAP in somatic embryogenesis induction from seed explants of *Arachis species* from Sections Erectoides and Procumbentes. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, v.88, p.121-126, 2007.

PACHECO, G.; GAGLIARDI, R.F.; CARNEIRO, L.A.; VALLS, J.F.M.; MANSUR, E. *In vitro* regeneration and conservation of wild species of *Arachis*. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, v.82, n.2, p.311-315, 2007b.

PACHECO, G.; GAGLIARDI, R.F.; CARNEIRO, L.A.; VALLS, J.F.M.; MANSUR, E. Plant regeneration in *Arachis stenosperma* Krapov. and W. C. Gregory from roots and calluses derived from leaflets of *in vitro* plants. *In Vitro Cellular Developmental Biology-Plant*, v.44, p.14-17, 2008.

PACHECO, G.P.; CARDOSO, S.R.S.; GAGLIARDI, R.; VALLS, J.F.M.; FERREIRA, P.C.G.; CARDOSO, M.A.; MANSUR, E. Genetic and epigenetic analyses of *in vitro*-grown plants of *Arachis villosulicarpa* Hoehne (Leguminosae) obtained from seed explants through different regeneration pathways. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*, v.83, p.15-20, 2008b.

PAPANDREOU, I.; VERRAS, M.; MCNEIL, B.; KOONG, A.C.; DENKO, N.C. Plant stilbenes induce endoplasmic reticulum stress and their anti-cancer activity can be enhanced by inhibitors of autophagy. *Experimental Cell Research*, v.1, p.147-153, 2015.

PARK, M.-R.; BAEK, S.-H.; KIM, Y.-D.; YOO, N.-H.; JIN, I.-D.; RHA, E.-S.; KIM, J.-K.; CHOI, K.-G.; YUN, S.J. Content of Resveratrol in Tissues of Peanut Plant. *Bulletin of the Agricultural College*, v.34, p.55-61, 2003.

PASSOS, R.; CARO, M.S.B.; MARSCHIN, M. A saúde vem embalada em garrafas de vinho. *Ciência Hoje*, v.29, n.173, p.88-89, 2001.

PENDSE, R.; RAO, A.V.; VENKATARAMAN, K. 5,7-Dihydroxychromone from *Arachis hypogaea* shells 1. *Phytochemistry*, v.12, p.2033-2034, 1973.

PESTANA, M.C.; LACORTE, C.; FREITAS, V.G.; OLIVEIRA, D.E., MANSUR, E. *In vitro* regeneration of peanut (*Arachis hypogaea* L.) through organogenesis: effect of culture temperature and silver nitrate. *In Vitro Cellular Developmental Biology*, v.35, p.214-216, 1999.

PHILLIPS, K.M.; RUGGIO, D.M.; ASHRAF-KHORASSANI, M. Phytosterol composition of nuts and seeds commonly consumed in the United States. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.53, p.9436-9445, 2005.

PHITOTHERB. Fotografia de Amendoim – *Arachis hypogaea*. [S.l.: s.n., 2007]. 1 foto. Disponível em: <<http://www.phitoherb.com/article.asp?id=240>>. Acesso em: 8 de abril de 2011.

PINTO, M.C.; GARCÍA-BARRADO, J.A.; MACÍAS, P. Resveratrol is a Potent Inhibitor of the Dioxygenase Activity of Lipoxygenase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.47, p.4842-4846, 1999.

PIRES, N.M.; OLIVEIRA, R.V. Alelopatia. In: OLIVEIRA, R.S.; CONSTANTIN, J. *Plantas daninhas e seu manejo*. Guaíba: Agropecuária, 2001. p.99-108.

PITTMAN, R.N.; BANKS, D.J.; KIRBY, J.S.; MITCHELL, E.D.; RICHARDSON, P.E. *In vitro* culture of immature peanut (*Arachis* spp.) leaves: morphogenesis and plantlet regeneration. *Peanut Science*, v.10, p.21-25, 1983.

PITTMAN, R.N.; JOHNSON, B.B.; BANKS, D.J. *In vitro* differentiation of a wild peanut, *Arachis villosulicarpa*. *Peanut Science*, v.11, p.24-27, 1984.

PONSAMUEL, J.; HUHMANN, D.V., CASSIDY, B.G., POST-BEITTENMILLER, D. *In vitro* regeneration via callogenesis and brassin-induced shoot conversion of dormant buds from plumular explants of peanut (*Arachis hypogaea* L. cv 'Okrun'). *Plant Cell Reports*, v.17, p.373-378, 1998.

POTREBKO, I.; RESURRECCION, A.V.A. Effect of ultraviolet doses in combined ultraviolet-ultrasound treatments on *trans*-resveratrol and *trans*-piceid contents in sliced peanut kernels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.57, p.7750-7756, 2009.

POUDEL, P.R.; KATAOKO, I.; MOCHIOKA, R. Effect of red- and blue-light-emitting diode on growth and morphogenesis of grapes. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, n.92, p.147-153, 2008.

PRADO, E.A.; SECCHI, A.N.; MROGINSKI, L.A. Conservación de la capacidad caulogénica de callos de *Arachis major* (Leguminosae) durante prolongados subcultivos. *Turrialba*, v.38, n.3, p.249-254, 1988.

RADHAKRISHNAN, T.; MURTHY, T.G.K.; DESAI, S.; BANDYOPADHYAY, A. Meristem culture of interspecific hybrids of groundnut. *Biologia Plantarum*, v.42, n.2, p.309-312, 1999.

RADHAKRISHNAN, T.; MURTHY, T.G.K.; CHANDRAN, K.; BANDYOPADHYAY, A. Micropropagation in peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Biologia Plantarum*, v.43, n.3, p.447-450, 2000.

RAMIREZ-ESTRADA, K.; VIDAL-LIMON, H.; HIDALGO, D.; MOYANO, E.; GOLENIOSWIKI, M.; CUSIDÓ, R.M.; PALAZON, J. Elicitation, an effective strategy for the biotechnological production of bioactive high-added value compounds in plant cell factories. *Molecules*, v.21, n.2, p.182-189, 2016.

RANI, A.S.; REDDY, G.M. Multiple shoot regeneration from de-embryonated cotyledons of cultivated and wild species of *Arachis*. *Journal of Genetics and Breeding*, v.50, n.4, p.351-355, 1996.

RANI, A.S.; REDDY, G.M. Regeneration of plantlets from leaf explant of groundnut, *Arachis hypogaea* L. *National Academy Science Letters*, v.22, n.9, p.149-151, 1999.

RANI, A.S.; REDDY, G.M.; PRAKASH, P.; PADMAJA, G. Changes in protein profiles associated with somatic embryogenesis in peanut. *Biologia Plantarum*, v.49, n.3, p.347-354, 2005.

RANI, A.S.; VENKATESWARLU, P.; PADMAJA, G.; BABURAO, N. Changes in protein composition and proteinphosphorylation during somatic embryogenesis and plant regeneration in peanut (*Arachis hypogaea* L.). *African Journal of Biotechnology*, v.8, n.15, p.3472-3478, 2009.

RANSING, S.K.; PATIL, V.A.; SURYAVANSHI, G.B. Allelopathic effect of different crop seeds on germination of pearl millet. *Annals of Plant Physiology*, v.4, n.2, p.240-242, 1990.

RATNA, W.N.; SIMONELLI J.A. The action of dietary phytochemicals quercetin, catechin, resveratrol and naringenin on estrogen-mediated gene expression. *Life Sciences*, v.70, p.1577-1589, 2002.

REN, Y.; LI, L.; CUI, X.; SHI, Y.M.; WANG, H.; LI, S.L.; YUAN, M. Study on shoot induction from leaflets of different peanut cultivars (*Arachis hypogaea* L.). *Shandong Agricultural Sciences*, n.13, p.113-121, 2012.

RENA-AGUILA, S.; TAN, M.A.; VILLAFLORES, O.B. The anti-angiogenic and antibacterial effect of *Tinomisium philippinense* Miers. (Menispermaceae) leaf extract. *Journal of Coastal Life Medicine*, v.4, n.1, p.61-68, 2016.

REY, H.Y.; SCOCCHI, A.M.; GONZALEZ, A.M.; MROGINSKI, L.A. Plant regeneration in *Arachis pintoii* (Leguminosae) through leaf culture. *Plant Cell Reports*, v.19, p.856-862, 2000.

REY, H.Y.; MROGINSKI, L.A. Regeneration of plants from apical meristem tips and nodal segments of *Arachis pintoii*. *Peanut Science*, v.30, n.2, p.75-79, 2003.

REY, H.Y.; MROGINSKI, L.A. Somatic embryogenesis and plant regeneration in diploid and triploid *Arachis pintoii*. *Biologia Plantarum*, v.50, n.1, p.152-155, 2006.

REZENDE, C.P.; PINTO, J.C.; EVANGELISTA, A.R.; SANTOS, I.P.A. Alelopatia e suas interações na formação e manejo de pastagens. *Boletim Agropecuário*, n.54, p.1-55, 2003.

RIBANI, M.; COLLINS, C.H.; BOTTOLI, C.B.G. Validation of chromatographic methods: Evaluation of detection and quantification limits in the determination of impurities in omeprazole. *Journal of Chromatography A*, v.1156, p.201-205, 2007.

RICE, E.L. *Allelopathy*. 2 ed. New york: Springer, 1984. 422p.

RIOS, M. Amendoim ganha espaço na rotação com a cana. *Jornal Cana*, Adamantina, 2010, p. 63. Disponível em:<<http://www.jornalcana.com.br/pdf/2011/5c/producao.pdf>>. Acesso em: 8 de abril de 2011.

RIVAS, M.A.; CARNEVALE, R.P.; PROIETTI, C.J.; ROSEMBLIT, C.; BEGUELIN, W.; SALATINO, M.; CHARREAU, E.H.; FRAHM, I.; SAPIA, S.; BROUCKAERT, P.; ELIZALDE, P.V.; SCHILLACI, R. TNF alpha acting on TNFR1 promotes breast cancer growth via p42/P44 MAPK, JNK, Akt and NF-kappa B-dependent pathways. *Experimental Cell Research*, v.314, n.3, p.509-529, 2008.

ROBINSON, P.; SRIVARDHINI, S.; SASIKUMAR, G. Somatic embryogenesis and plant regeneration from cotyledon tissue of *Arachis hypogaea* L. *Research in Plant Biology*, v.1, n.3, p.21-27, 2011.

ROLFS, C.H.; FRITZEMEIER, K.H.; KINDL, H. Cultured cells of *Arachis hypogaea* susceptible to induction of stilbene synthase (resveratrol-forming). *Plant Cell Reports*, v.1, p.83-85, 1981.

ROLFS, C.H.; SCHÖN, H.; STEFFENS, M.; KINDL, H. Cell-suspension culture of *Arachis hypogaea* L.: model system of specific enzyme induction in secondary metabolism. *Planta*, v.172, n.2, p.238-244, 1987.

RONNEKLEIV-KELLY, S.M.; NUKAYA, M.; DÍAZ-DÍAZ, C.J.; MEGNA, B.W.; CARNEY, P.R.; GEIGER, P.G.; KENNEDY, G.D. Aryl hydrocarbon receptor-dependent apoptotic cell death induced by the flavonoid chrysin in human colorectal cancer cells. *Cancer letters*, v.370, n.1, p.91-99, 2016.

ROY, J.; BANERJEE, N. Induction of callus and plant regeneration from shoot-tip explants of *Dendrobium fimbriatum* Lindl. Var. *oculatum* Hk. F. *Scientia Horticulturae*, n.97, p.333-340, 2003.

RUDOLF, J.R.; RESURRECCION, V.A.; Elicitation of resveratrol in peanut kernels by application of abiotic stresses. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.53, p.10186-10192, 2005.



RUSSO, S.L.; VARNELL, R.J. *In vitro* responses of peanut tips to 2,4D and Kinetin. *Crop Science*, v.37, p.34-36, 1978.

SALES, J.M.; RESURRECCION, A.V.A. Maximising resveratrol and piceid contents in UV and ultrasound treated peanuts. *Food Chemistry*, v.117, 674-680, 2009.

SANDERS, T.H.; MCMICHAEL, R.W.; HENDRIX, K.W. Occurrence of resveratrol in edible peanuts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.48, n.4, 1243-1246, 2000.

SANTOS, R.C.; MOREIRA, J.A.; VALLE, L.V.; FREIRE, R.M.; ALMEIDA, R.P.; ARAÚJO, J.M.; SILVA, L.C. *Amendoim BR-1*: informações para seu cultivo. [S.l.: s.n.], 2009. 2 p. Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/25513/1/FolderAmendoimBR1-4ed.pdf>>. Acesso em: 22 abr. 2015.

SANTOS, W.; FULY, P. Association analysis among odor, exudate and social isolation in patients with neoplastic wounds. *Journal of Nursing UFPE on line*, v.9, n.4, p.7497-7500, 2015.

SARAIVA, T.S. Investigação de efeitos alelopáticos de espécies do gênero *Arachis*. 2010. 53 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, São Paulo, SP, 2010.

SASTRI, D.C.; NALINI, M.S.; MOSS, J.P. Tissue culture and prospects for improvement of *Arachis hypogaea* and other oil seed crops. *Tissue Culture of Economically Important Plants*, v.31, p.42-57, 1981.

SAUTTER, C.K.; DENARDIN, S.; ALVES, A.O.; MALLMANN, C. A.; PENNA, N.G.; HECKTHEUER, L.H. Determinação de Resveratrol em sucos de uva no Brasil. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.25, n.3, p.437-442, 2005.

SAXENA, P.K.; MALIK, K.A.; GILL, R. Induction by thidiazuron of somatic embryogenesis in intact seedlings of peanut. *Planta*, v.87, n.3, p.421-424, 1992.

SEITZ, M.H.; STALKER, H.T.; GREEN, C.C. Genetic variation for regenerative response in immature leaflet cultures of the cultivated peanut, *Arachis hypogaea*. *Plant Breeding*, v.98, n.2, p.104-110 1987.

SELLARS, R.M.; SOUTHWARD, G.M.; PHILLIPS, G.C. Adventitious somatic embryogenesis from cultured immature zygotic embryos of peanut and soybean. *Crop Science*, v.30, n.2, p.408-414, 1990.

SHAN, L.; TANG, G.; XU, P.; LIU, Z.; BI, Y. High efficiency *in vitro* plant regeneration from epicotyls explants of Chinese peanut cultivars. *In Vitro Cellular Developmental Biology-Plant*, v.45, p.525-531, 2009.

SHIN, K.S.; MURTHY, H.N.; HEO, J.W.; HAHN, E.J.; PAEK, K.Y. The effect of light quality on the growth and development of *in vitro* cultured *Doritaenopsis* plants. *Acta Physiologiae Plantarum*, v.30, n.3, p.339-343, 2008.

SHUKLA, S.; MEHTA, A. Anticancer potential of medicinal plants and their phytochemicals: a review. *Brazilian Journal of Botany*, v.38, n.2, p.199-210, 2015.

SILVA, S. *Flores do alimento*. São Paulo: Empresa das Artes, 1997.

SILVA, F.A.M. *Seleção de microrganismos com potencial de produção de compostos alelopáticos para o controle de plantas daninhas*. 2004. 137 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, SP, 2004.

SINGH, S.; HAZRA, S. Somatic embryogenesis from the axillary meristems of peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Plant Biotechnology Reports*, v.3, p.333-340, 2009.

SMITH, B.; PAWLAK, J.; MURRAY, D. VERHALEN, L.; GREEN, J. Interference from established stands of silverleaf nightshade (*Solanum elaeagnifolium*) on cotton (*Gossypium hirsutum*) Lint Yield. *Weed Science*, n.38, p.129-133, 1990.

SOBOLEV, V.S.; COLE, R.J. *Trans-resveratrol* content in commercial peanuts and peanut products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, n.47, p.1435-1439, 1999.

SOBOLEV, V.S.; HORN, B.W.; POTTER, T.L.; DEYRUP, S.T.; GLOER, J.B. Production of stilbenoids and phenolic acids by the peanut plant at early stages of growth. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.54, p.3505-3511, 2006.

SOBOLEV, V.S.; POTTER, T.L.; HORN, B.W. Prenylated stilbenes from peanut root mucilage. *Phytochemical Analysis*, n.17, p.312-322, 2006b.

SOBOLEV, V.S.; GUO, B.Z.Z.; HOLBROOK, C.C.; LYNCH, R.E. Interrelationship of phytoalexin production and disease resistance in selected peanut genotypes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.55, p.2195-2200, 2007.

SOBOLEV, V.S.; NEFF, S.A.; GLOER, J.B. New stilbenoids from peanut (*Arachis hypogaea*) seeds challenged by an *Aspergillus caelatus* strain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.57, p.62-68, 2009.

SOBOLEV, V.S.; KHAN, S.; TABANCA, N.; WEDGE, D.E.; MANLY, S.P.; CUTLER, S.J.; COY, M.R.; BECNEL, J.J.; NEFF, S.A.; GLOER, J.B. Biological activity of peanut (*Arachis hypogaea*) phytoalexins and selected natural and synthetic stilbenoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.59, n.5, p.1673-1682, 2011.

SORAHAN, T. Multiple myeloma and glyphosate use: A re-analysis of US Agricultural Health Study (AHS) Data. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, v.12, n.2, p.1548-1559, 2015.

SPINDOLA, K.; SIMAS, N.K.; SANTOS, C.; SILVA, A.; ROMÃO, W.; VANINI, G.; SILVA, S.; BORGES, G.; SOUZA, F.; KUSTER, R. *Dendranthema grandiflorum*, a hybrid ornamental plant, is a source of larvicidal compounds against *Aedes aegypti* larvae. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, v.3, p.67-71, 2016.

SREELATHA, S.; JEYACHIRTA, A.; PADMA, P.R. Antiproliferation and induction of apoptosis by *Moringa oleifera* extract on human cancer cells. *Food and Chemical Toxicology*, n.49, p.1270-1275, 2011.

SRINIVASAN, T.; KUMAR, K.; KIRTI, P. Establishment of efficient and rapid regeneration system for some diploid wild species of *Arachis*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, v.101, p.303-309, 2010.

STALKER, H.T.; SIMPSON, C.E. Genetic resources in *Arachis*. In H. E. Pattee and H. T. Stalker (Ed.), *Advances in Peanut Science: American Peanut Research and Education*. Texas: American Peanut Research and Education, 1995. p.14-53.

STERVBO, U.; VANG, O.; BONNESEN, C. A review of the content of the putative chemopreventive phytoalexin resveratrol in red wine. *Food Chemistry*, v.101, p.449-457, 2007.

STEWART, J.R.; CHRISTMAN, K.L.; O'BRIAN, C.A. Effects of resveratrol on the autophosphorylation of phorbol ester-responsive protein kinases: Inhibition of protein kinase D but not protein kinase C isozyme autophosphorylation. *Biochemical Pharmacology*, v.60, n.9, p.1355-1359, 2000.

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

SUBBARAMAIAH, K.; CHUNG, W.J.; MICHALUART, P.; TELANG, N.; TANABE, T.; INOUE, H.; JANG, M.; PEZZUTO, J. M.; DANNENBERG, A.J. Resveratrol inhibits cyclooxygenase-2 transcription and activity in phorbol ester-treated human mammary epithelial cells. *Journal of Biological Chemistry*, v.273, n.34, p.21875-21882, 1998.

TAGHVAEEFARD, N.; SADEGHI, H. Allelopathic effect of *Pistacia khinjuk* leaf extracts on *Chenopodium album*, *Physalis alkekengi* and *Amaranthus retroflexus*. *Agricultural Advances*, v.3, n.2, p.33-37, 2014.

TEFERA, T. Allelopathic effects of *Parthenium hysterophorus* extracts on seed germination and seedling growth of *Eragrostis tef*. *Journal of Agronomy and Crop Science*, v.188, n.5, p.306-310, 2002.

TIWARI, S.; TULI, R. Factors promoting efficient *in vitro* regeneration from de-embryonated cotyledon explants of *Arachis hypogaea* L. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, v.92, p.15-24, 2008.

TIWARI, S.; TULI, R. Multiple shoot regeneration in seed-derived immature leaflet explants of peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Scientia Horticulturae*, v.121, p.223-227, 2009.

TOKUSOGLU, L.Z.; MUSTAFA, K.U.N.; FADIM, Y. 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). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, n.53, p.5003-5009, 2005.

TORRES, A.C.; FERREIRA, A.T.; SÁ, F.G.; BUSO, J.A.; CALDAS, L.S.; NASCIMENTO, A.S.; BRÍGIDO, M.M.; ROMANO, E. *Glossário de biotecnologia vegetal*. Brasília, DF: Embrapa, 2000.

TOUIHRI, I.; KALLECH-ZIRI, O.; BOULILA, A.; FATNASSI, S.; MARRAKCHI, N.; LUIS, J.; HANCHI, B. *Ecballium elaterium* (L.) A. Rich. seed oil: Chemical composition and antiproliferative effect on human colonic adenocarcinoma and fibrosarcoma cancer cell lines. *Arabian Journal of Chemistry*, v.13, p. 234-242, 2015.

TSANUO, K.; HASSANALI, A.; HOOPER, A.; KHAN, Z.; KABERIA, F.; PICKETT, J. Isoflavonones from the allelopathic aqueous root exudate of *Desmodium uncinatum*. *Phytochemistry*, n.64, p.265-273, 2003.

VALLS, J.F.M. Diversidade genética no gênero *Arachis* e a origem do amendoim. In: Temas de genética e melhoramento, 17, 2000. *Anais...* Piracicaba, SP: EMBRAPA, 2000.

VALLS, J.F.M.; SIMPSON, C.E. New species of *Arachis* L. (Leguminosae) from Brazil, Paraguay and Bolivia. *Bonplandia*, n.14, p.35-64, 2005.

VASANTH, K.; PRABHA, A.L.; MUTHASAMY, A. JAYABALAM, N. Multiple shoot induction and plant regeneration of groundnuts (*Arachis hypogaea* L.). *Plant Cell Biotechnology Molecular Biology*, v. 5, p.89-94, 2004.

VEIGA, R.F.A.; CORSO, G.M.; CURI, P.R. Aspectos da organografia e anatomia foliar do amendoim: genótipos so-53 e so-909. *Bragantia*, v.53, n.1, p.1-17, 1994.

VENKATACHALAM P.; GEETHA, N.; ABHA, K.; SHAILA, M.S.; SITA, G.L. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation and regeneration of transgenic plants from cotyledon explants of groundnut via somatic embryogenesis. *Current Science*, n.78, p.1130-1136, 2000.

VENKATACHALAM, P.; GEETHA, N.; JAYABALAN, N. Induction of somatic embryos and plantlet development in cell suspension cultures of *Arachis hypogaea* L. *Breeding Science*, v.48, n.3, p.231-236, 1998.

VENKATACHALAM, P.; GEETHA, N.; KHANDELWAL, A.; SHAILA, M.S.; SITA, G.L. Induction of direct somatic embryogenesis and plant regeneration from mature cotyledon explants of *Arachis hypogaea* L. *Current Science*, v.77, n.2, p.269-273, 1999.

VENKATACHALAM, P.; GEETHA, N.; RAO, K.S.; JAYABALAN, N. Rapid and high-frequency *in vitro* plant regeneration from leaflet and petiole explants of groundnut (*Arachis hypogaea* L.). *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v.80, n.3, p.193-203, 1999b.

VENKATACHALAM, P.; KISHOR, P.B.K.; JAYABALAN, N. High frequency somatic embryogenesis and efficient plant regeneration from hypocotyl explants of groundnut (*Arachis hypogaea* L.). *Current Science*, v.72, n.4, p.271-275, 1997.

VENKATACHALAM, P.; JAYABALAN, N. Effect of auxins and cytokinins on efficient plant regeneration and multiple-shoot formation from cotyledons and cotyledonary-node explants of groundnut (*Arachis hypogaea* L.) by *in vitro* culture technology. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v.67, n.3, p.237-247, 1997.

VENKATACHALAM, P.; JAYABALAN, N. Efficient callus induction and plant regeneration via somatic embryogenesis from immature leaf-derived protoplasts of groundnut (*Arachis hypogaea* L.). *Israel Journal of Plant Sciences*, v.44, n.4, p.387-396, 1996.

VENKATACHALAM, P.; JAYABALAN, N. Selection and regeneration of groundnut plants resistant to the pathotoxic culture filtrate of *Cercosporium personatum* through tissue culture technology. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v.61, p.351-364, 1996b.

VICTOR, J.M.R.; MURCH, S.J.; KRISHNARAJ, S.; SAXENA, P.K. Somatic embryogenesis and organogenesis in peanut: The role of thidiazuron and N6-benzylaminopurine in the induction of plant morphogenesis. *Plant Growth Regulation*, v.28, p.9-15, 1999.

VICTOR, J.M.R.; MURTHY, B.N.S.; MURCH, S.J.; KRISHNARAJ, S.; SAXENA, P.K. Role of endogenous purine metabolism in thidiazuron-induced somatic embryogenesis of peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Plant Growth Regulation*, v.28, p.41-47, 1999b.

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

VIDOZ, M.L.; REY, H.Y.; GONZALEZ, A.M.; MROGINSKI L.A. Somatic embryogenesis and plant regeneration through leaf culture in *Arachis glabrata* (Leguminosae). *Acta Physiologiae Plantarum*, v.26, n.1, p.59-66, 2004.

VIEGAS, C.; BOLZANI, V.S.; BARREIRO, E.J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. *Química Nova*, v.29, p.326-337, 2006.

VILES, A.; REESE, R. Allelopathic potential of *Echinaceae angustifolia* D.C. *Environmental and Experimental Botany*, v.36, n.1, p.39-43, 1996.

WALLER, G.R. Introduction. In: MACIAS, F.A.; GALINDO, J.C.G.; MOLINÍLLO, J.M.G.; CUTLER, H.G. *Recent advances in allelopathy*. Cadiz: Universidad de Cádiz, 1999. v.1, p.125-138.

WANG, M.L.; CHEN, C.Y.; DAVIS, J.; GUO, B.; STALKER, H.T.; PITTMAN, R.N. Assessment of oil content and fatty acid composition variability in different peanut subspecies and botanical varieties. *Plant Gene Research*, v.8, p.71-73, 2010.

WANG, S.; PENCHALA, S.; PRABHU, S.; WANG, J.; HUANG, Y. Molecular basis of traditional Chinese medicine in cancer chemoprevention. *Current Drug Discovery Technologies*, v.7, p.67-75, 2010b.

WEI, R.; HE, Y.Q.; PENG, D.; WANG, S.Y.; ZHU, Y.B. Effect of different plant hormones combinations on the peanut embryo *in vitro* culture and plant regeneration. *Heilongjiang Agricultural Sciences*, n.34, p.1123-1134, 2012.

WESTON, L.A. Utilization of allelopathy for weed management in agroecosystems. *Agronomy Journal*, v.88, n.6, p.860-866, 1996.

WILLCOX, M.C.; REED, S.M.; BURNS, J.A.; WYNNE, J.C. Effect of microspore stage and media on anther culture of peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Plant Cell Tissue Organ Culture*, v.24, n.1, p.25-28, 1991.

WONG, Y.H.; TAN, W.Y.; TAN, C.P.; LONG, K.; NYAM, K.L. Cytotoxic activity of kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.) seed extract and oil against human cancer cell lines. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, v.4, n.1, p.510-515, 2014.

WRIGHT, L.E.; FRYE, J.B.; LUKEFAHR, A.L.; TIMMERMANN, B.N.; MOHAMMAD, K.S.; GUISE, T.A.; FUNK, J.L. Curcuminoids block TGF- $\beta$  signaling in human breast cancer cells and limit osteolysis in a murine model of breast cancer bone metastasis. *Journal of Natural Products*, v.76, n.3, p.316-321, 2013.

WU, H.C.; LIN, C.C. Red light-emitting diode light irradiation improves root and leaf formation in difficult-to-propagate *Protea cynaroides* L. plantlets *in vitro*. *HortScience*, v.47, n.10, p.1490-1494, 2012.

WU, C.F.; KARIOTI, A.; ROHR, D.; BILIA, A. R.; EFFERTH, T. Production of rosmarinic acid and salvianolic acid B from callus culture of *Salvia miltiorrhiza* with cytotoxicity towards acute lymphoblastic leukemia cells. *Food Chemistry*, v.201, p.292-297, 2016.

XIONG, Q.; ZHANG, Q.; ZHANG, D.; SHI, Y.; JIANG, C.; SHI, X. Preliminary separation and purification of resveratrol from extract of peanut (*Arachis hypogaea*) sprouts by macroporous adsorption resins. *Food Chemistry*, v.145, p.1-7, 2014.

YADAV, N.; PINGOLIA, P.; YADAV, A.; VAISHNAV, N.; MEHTA, J. Effect of Phyto regulators on *in vitro* micropropagation of *Arachis hypogaea* (L.). *International Journal of Recent Biotechnology*, v.1, n.1, p.32-38, 2013.

YANG, M.-H.; KUO, C.-H.; HSIEH, W.-C.; KU, K.-L. Investigation of microbial elicitation of *trans*-resveratrol and *trans*-piceatannol in peanut callus led to the application of chitin as a potential elicitor. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.58, n.17, p.9537-9541, 2010.

YANG, T.; FANG, L.; NOPO-OLAZABAL, C.; CONDORI, J.; NOPO-OLAZABAL, L.; BALMACEDA, C.; MEDINA-BOLIVAR, F. Enhanced production of resveratrol, piceatannol, arachidin-1, and arachidin-3 in hairy root cultures of peanut co-treated with methyl jasmonate and cyclodextrin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.63, p.3942-3950, 2015.

ZAPPONI, A.L.B.; MELO, E.C.P. Distribuição da mortalidade por câncer de mama e de colo de útero segundo regiões Brasileiras. *Revista Enfermagem UERJ*, n.18, p.628-631, 2010.

ZORZETE, P.; REIS, T.A.; FELICIO, J.D.; BAQUIAO, A.C.; MAKIMOTO, P.; CORREA, B. Fungi, mycotoxins and phytoalexin in peanut varieties, during plant growth in the field. *Food Chemistry*, n.129, p.957-964, 2011.

ZWICKENPFLUG, W.; MEGER, M.; RICHTER, E. Occurrence of the tobacco alkaloid myosmine in nuts and nut products of *Arachis hypogaea* and *Corylus avellana*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.46, p.2703-2706, 1998.

APÊNDICE A – Artigo publicado no periódico *International Journal of Green and Herbal Chemistry*

E-ISSN: 2278-3229

IJGHC, June 2016 – August 2016; Sec. A; Vol.5, No.3, 283-292.

# International Journal of Green and Herbal Chemistry

An International Peer Review E-3 Journal of Sciences

Available online at [www.ijghc.com](http://www.ijghc.com)

Section A: Green Chemistry



Research Article  
(USA): IJGHAY

CODEN

## Allelopathic Activity of Callus Extracts from Different Brazilian Peanut (*Arachis Hypogaea* L.) Cultivars on Lettuce (*Lactuca Sativa*): Effect of Light Quality and Temperature during Callogenesis

Gabriel Casimiro<sup>1\*</sup>, Renata Garcia<sup>1</sup>, Georgia Pacheco<sup>1</sup>, Ivana Leal<sup>2</sup>, Elisabeth Mansur<sup>1</sup> and Naomi Simas<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Micropropagação e Transformação de Plantas, Departamento de Biologia Celular, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil.

<sup>2</sup> Laboratório de Produtos Naturais e Ensaio Biológicos, Departamento de Produtos Naturais e Alimentos, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, CEP 21941-902, Rio de Janeiro, Brasil.

Received: 08 July 2016; Revised: 19 July 2016; Accepted: 21 July 2016

**Abstract:** Peanut (*Arachis hypogaea* L.) is an herbaceous Brazilian plant with high contents of lipids, proteins, vitamins and carbohydrates. Although many biological activities have already been evaluated in extracts from different parts of *A. hypogaea* plants, the allelopathic effect of *in vitro* materials is less investigated. In this work, the allelopathic activity of callus extracts from different Brazilian peanut cultivars on lettuce (*Lactuca sativa*) was evaluated. Calluses were induced from different explants (cotyledons, embryonic axes, embryonic leaflets, and leaf segments) of five peanut cultivars (IAC 886, IAC Caiapó, IAC Tatu ST, IAC 8112 e BR-1) in response to different concentrations of picloram under fluorescent lamps, or white, blue, red or combination of blue and red light-emitting diodes (LEDs), at 25±2°C or 30±2°C. Calluses derived from leaf segments cultivated at 25±2°C on MS medium supplemented with 1.25µM picloram were selected for the evaluation of allelopathic activity. The highest activity was observed in extracts from calluses



induced under fluorescent lamps or combination of blue and red LEDs (up to 66.89% inhibition of radicle growth in relation to the control). These results may open new possibilities for the use of *in vitro* materials in the control of the rate of plant growth.

**Keywords:** Allelopathy, callogenesis, groundnut, light-emitting diode, picloram.

---

## INTRODUCTION

Peanut or groundnut (*Arachis hypogaea* L., Leguminosae) is an important legume crop cultivated in tropical, subtropical and warm regions around the world. In addition to flavor, peanut seeds have high amounts of lipids, proteins, vitamins, mineral salts, and carbohydrates. They also are highly energetic, producing around 600 calories per 100 grams<sup>1,2</sup>.

Allelopathy is the inhibition of neighboring plants by the release of chemicals that can affect other species<sup>3</sup>. It is an important tool for weed control, once natural plant products can overcome the need of pollutant and synthetic herbicides<sup>4</sup>. Although many different biological activities have already been identified in genus *Arachis*, the allelopathic potential is comparatively less investigated. The inhibitory activity of seeds of *A. hypogaea* against pearl millet was ever reported<sup>5</sup>, while a stimulating effect of root exudates on seedling growth of rice, maize, radish and rye grass was also described<sup>6</sup>.

*In vitro* culture can be an efficient alternative on the search for methods to optimize the production of special metabolites with biological activity. The advantages of using tissue culture for this purpose include: i) possibility of eliminating the influence of environmental factors that affect the production of secondary metabolites; ii) selection of genotypes with higher yields, and iii) possibility of using elicitors agents. Metabolites production has already been analyzed in different *in vitro* systems, such as tissue, organ and cell cultures<sup>7</sup>. In some cases, friable calluses are able to produce a higher number of metabolites, and in increased concentrations as compared to field-grown plants<sup>8</sup>.

Many factors can affect *in vitro* morphogenesis, including temperature and light. Temperature may influence cell growth, organ development and enzyme activity, also affecting morphogenetic pathways, both *in vivo* and *in vitro*. Light photoperiod, intensity and wavelength are other important factors, since they directly modulate several metabolic pathways in plants<sup>9</sup>.

Fluorescent lamps are classically adopted in growth-chambers. However, since the late twentieth century, significant improvements in growth and *in vitro* morphogenesis of several plant species have been achieved in response to light-emitting diodes (LEDs) of different colors<sup>10</sup>. Invented in the 1960s, LEDs are single type solid-state semiconductors that emit light when an electric current is applied across the device. The advantages of using LEDs include low energy consumption, wavelength specificity, color variability, low heat energy production, and long life<sup>11-13</sup>.

This paper reports callus formation from seed and *in vitro* explants of five Brazilian peanut (*Arachis hypogaea* L.) cultivars cultured under fluorescent lamp or white, blue, red or association of blue and red LEDs, at two different temperatures. The allelopathic activity of extracts from the distinct callus types against lettuce (*Lactuca sativa*) was evaluated.

## MATERIALS AND METHODS

**Plant material:** Five Brazilian peanut cultivars, namely IAC 886 (Virginia Runner), IAC Caiapó (Virginia Runner), IAC Tatu ST (Valencia), IAC 8112 (Spanish) and BR-1 (Valência), were used in this study. Plants were grown from seeds in a greenhouse of the Rio de Janeiro State University, Brazil, in pots containing Plantmax<sup>®</sup>. Light intensity in a clear day during the growing period was as high as 1600  $\mu\text{E}/(\text{m}^2/\text{s})$ .

For *in vitro* germination, seeds were washed three times with distilled water and detergent, rinsed with 70% ethanol, and immersed in 2.0% sodium hypochlorite (NaClO) for 30 minutes, under stirring. Thereafter, three washes with distilled water were carried out in a laminar flow hood. For the establishment of *in vitro* cultures, embryo axes were excised and inoculated into 250 mL vials sealed with lids made of polypropylene, and containing 25 mL of semi-solid MS medium<sup>14</sup> supplemented with 3% sucrose and solidified with 7.5% agar. The pH was adjusted to 5.8 before sterilization by autoclaving (15 minutes at 121°C and 1.0 atm). Cultures were maintained at 25±2° under 16h photoperiod, and irradiance of 63 μM.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>, provided by cool white fluorescent lamps.

**Callus induction:** Cotyledons, embryonic leaflets and embryonic axes were excised from seeds. Leaf segments were excised from 30-day old *in vitro* seedlings. Explants were inoculated into flasks containing 25 mL of MS medium supplemented with different concentrations of picloram (1.25, 2.5 or 5 μM). Five explants were horizontally inoculated on each glass flask of 250 mL with a polypropylene cover containing 25 mL of medium. Cultures were maintained at 25±2°C or 30±2°C, under cool white fluorescent lamps or LEDs of colors: white, blue (λ = 450nm), red (λ = 660nm) or a combination of blue and red. Irradiance of all light sources was in a range of 60-70 μM.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>. Ten explants were used per treatment, and the experiments were performed three times in triplicate.

The frequency of callus formation and biomass accumulation were measured after 60 days of culture. Dry weights were determined after drying the materials at 45°C for 48 hours.

**Extract preparation:** *In vivo* and *in vitro* plant materials and calluses were dried in an oven at 50°C until constant weight, then crushed and weighed. Maceration in 100% ethanol was performed in the dark at room temperature (five stages during ten days). After filtration on filter paper, and concentration in a vacuum rotary evaporator at 45°C, extracts were weighed and stored at 4°C until used.

**Evaluation of allelopathic activity:** Initially, the IC<sub>50</sub> (concentration of the extract required to inhibit 50% of *Lactuca sativa* growth) of extracts from aerial parts of *in vivo* and *in vitro* plants of cultivar BR-1 on the growth of hypocotyls and rootlets of *L. sativa* was determined. The comparison among extracts of calluses of the different cultivars was performed using the lowest value of IC<sub>50</sub> obtained for BR-1.

Test samples were dissolved in ethanol, and the volume was adjusted to the desired concentrations (96.68, 100, 200, 500 and 1000 ppm). Each petri dish (d=6 cm, h=1 cm) containing filter paper discs Whatman<sup>®</sup> No.1 (d=5.7 cm) received 0.5 mL of the test solution. After solvent evaporation at room temperature (24 hours), 10 seeds of *L. sativa* and 2.5 mL of distilled water with DMSO 0.1% were added to the system. All assays were conducted in triplicate, with three replications. Paper discs containing menadione at 200 ppm served as positive controls, while discs containing 2.5 mL of distilled water or 2.5 mL of distilled water with DMSO 0.1% were used as negative controls. Seedling growth was measured five days after the introduction of seeds. The percentages of inhibition were calculated by comparison with the untreated control, using the following formula: % Inhibition = (C-X) / C x 100, where C = average size of hypocotyl / rootlet in control and X = average length of the hypocotyl / rootlet in the test sample<sup>15,16</sup>.

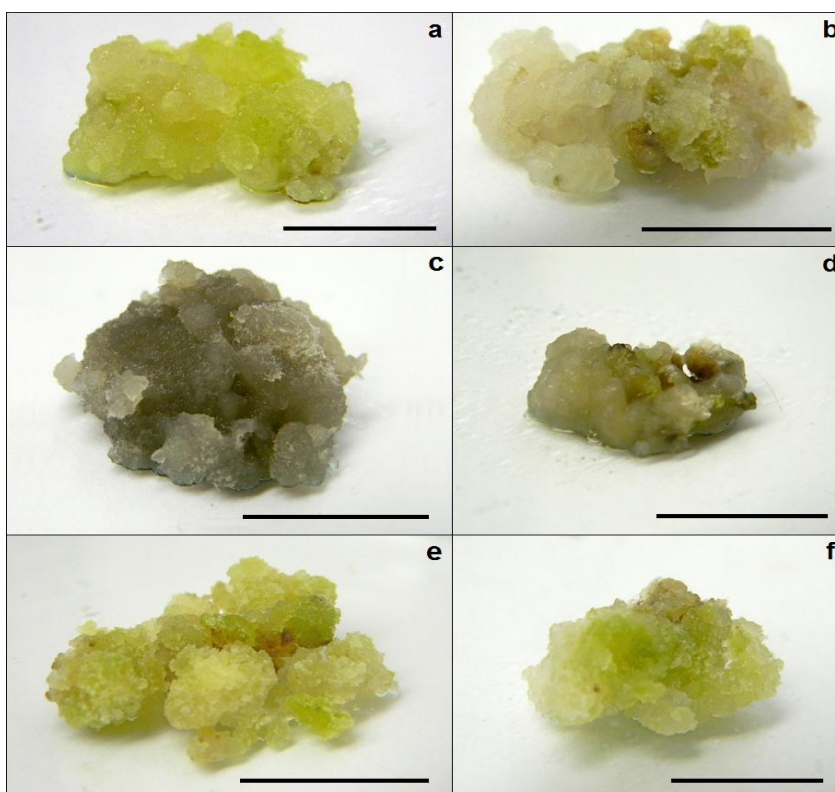
**Statistical analysis:** Statistical evaluation of experimental data was performed by analysis of variance (ANOVA) and Tukey's comparison test, using the software Graphpad Prism 5<sup>®</sup>. The value of p≤0.05 was considered significant, and a confidence interval of 95% was adopted.

## RESULTS

**Callus induction:** Seed explants cultured on media supplemented with picloram resulted in low percentages of friable callus formation (data not shown). On the other hand, leaf segments displayed callogenesis with frequencies up to 90%. In general, the highest percentages of callus formation from leaf explants were obtained from the cultivars IAC 886 (up to 87.8%) and BR-1 (up to 90.0%). In addition, the production of friable calluses was more efficient in response to the lowest concentration of picloram tested (1.25 $\mu$ M) (up to 90.0%), which induced higher percentages of callus formation in all cultivars (Table 1), irrespective of temperature or light quality.

Callogenesis was more efficient at 25°C, with frequencies up to 90.0% in explants cultured under fluorescent lamps or the association of blue and red LEDs. Under white LED, these rates were up to 85.6% at 25°C. On the other hand, the influence of temperature on callus formation was not significant under blue or red LEDs (Table 1).

Calluses induced under fluorescent lamps, white LED or association of blue and red LEDs were friable and displayed a bright light green color. On the other hand, calluses formed under red LED were less friable and showed colors ranging from yellow to green, while a dark grey color was displayed by calluses produced under blue LED (Table 1 and Figure 1).



**Fig. 1:** Friable calluses derived from leaf segments of five Brazilian cultivars of *A. hypogaea* cultured for 60 days on MS medium supplemented with 1.25 $\mu$ M picloram at 25 $\pm$ 2°C and different light qualities. (a) callus of the cultivar BR-1 cultured under fluorescent lamp; (b) callus of the cultivar IAC 886 cultured under white LED; (c) callus of the cultivar IAC Caiapó cultured under blue LED; (d) callus of the cultivar IAC 886 cultured under red LED; (e) callus of the cultivar BR-1 cultured under blue-red LED; (f) callus of the cultivar Tatu ST cultured under the association of blue and red LEDs. Bar = 1cm.

**Table 1.** Frequency of callus induction from leaf segments of *in vitro* plants from five cultivars of *A. hypogaea* cultured on MS medium supplemented with different concentrations of picloram, after 60 days of culture under different light qualities, at 25±2°C or 30±2°C.

Concentration of picloram (µM)	Type of light	IAC 886		IAC Caiapó		IAC Tatu ST		IAC 8112		BR-1	
		25±2°C	30±2°C	25±2°C	30±2°C	25±2°C	30±2°C	25±2°C	30±2°C	25±2°C	30±2°C
1.25 2.5 5	Fluorescent Lamp	87.8 ± 4.3 *	87.8 ± 4.3 *	85.6 ± 8.6 *	80.0 ± 4.9 *	87.8 ± 4.3 *	77.8 ± 4.3	85.6 ± 8.6 *	87.8 ± 4.3 *	90.0 ± 4.9 *	82.2 ± 6.5 *
		86.7 ± 4.9 *	82.3 ± 6.5 *	80.0 ± 4.9 *	80.0 ± 6.9 *	82.2 ± 6.5 *	75.6 ± 5.1	80.0 ± 6.9 *	85.6 ± 7.1 *	87.8 ± 4.3 *	77.8 ± 8.1
		80.0 ± 6.9 *	76.7 ± 4.9	80.0 ± 4.9 *	77.8 ± 8.1 *	82.2 ± 4.3 *	75.6 ± 5.1	82.2 ± 6.5 *	82.2 ± 4.3 *	77.8 ± 4.3	75.6 ± 7.1
1.25 2.5 5	White LED	85.6 ± 8.6 *	70.0 ± 4.9	83.3 ± 4.9 *	60.0 ± 6.9	82.2 ± 4.3 *	57.8 ± 8.0	80.0 ± 4.9 *	66.7 ± 4.9	85.6 ± 7.0 *	73.3 ± 6.9
		82.2 ± 6.5 *	70.0 ± 6.9	80.0 ± 6.9 *	52.2 ± 4.3	82.2 ± 6.5 *	57.8 ± 6.5	75.6 ± 5.1 *	64.4 ± 11.0	82.2 ± 6.5 *	70.0 ± 4.9
		82.3 ± 4.3 *	66.7 ± 4.9	80.0 ± 4.9 *	50.0 ± 6.9	80.0 ± 6.9 *	52.2 ± 4.3	72.2 ± 8.1	66.7 ± 8.4	80.0 ± 6.9 *	70.0 ± 6.9
1.25 2.5 5	Blue LED	52.2 ± 4.3	66.7 ± 4.9	66.7 ± 4.9	82.2 ± 6.5 *	55.6 ± 7.1	66.7 ± 4.9	64.4 ± 11.0	80.0 ± 4.9 *	57.8 ± 8.1	66.7 ± 4.9
		52.2 ± 6.5	62.2 ± 6.5	60.0 ± 6.9	76.7 ± 4.9	52.2 ± 6.5	64.4 ± 11.0	66.7 ± 4.9	77.8 ± 4.3	55.6 ± 7.1	62.2 ± 6.5
		50.0 ± 6.9	57.8 ± 6.5	52.2 ± 4.3	77.8 ± 8.1	52.2 ± 4.3	57.8 ± 8.1	55.6 ± 7.1	75.6 ± 5.1	55.6 ± 5.1	50.0 ± 4.9
1.25 2.5 5	Red LED	66.7 ± 4.9	70.0 ± 6.9	75.6 ± 5.1	70.0 ± 6.9	66.7 ± 4.9	77.8 ± 4.3	77.8 ± 8.1	66.7 ± 4.9	70.0 ± 6.9	70.0 ± 4.9
		62.2 ± 6.5	73.3 ± 4.9	66.7 ± 4.9	66.7 ± 4.9	66.7 ± 8.4	66.7 ± 4.9	72.2 ± 8.1	64.4 ± 5.1	70.0 ± 6.9	62.2 ± 6.5
		66.7 ± 4.9	70.0 ± 6.9	62.2 ± 6.5	60.0 ± 6.9	62.2 ± 6.5	60.0 ± 6.9	70.0 ± 4.9	55.6 ± 5.1	66.7 ± 4.9	60.0 ± 6.9
1.25 2.5 5	Blue-Red LED	87.8 ± 4.3 *	77.8 ± 4.3	82.2 ± 4.3 *	77.8 ± 4.3	85.6 ± 8.6 *	80.0 ± 4.9 *	85.6 ± 8.6 *	75.6 ± 5.1	90.0 ± 4.9 *	80.0 ± 4.9 *
		77.8 ± 4.3	75.6 ± 7.1	82.2 ± 6.5 *	75.6 ± 5.1	77.8 ± 8.1	77.8 ± 8.0	82.2 ± 6.5 *	70.0 ± 4.9	76.7 ± 4.9 *	75.6 ± 5.1
		75.6 ± 5.1	70.0 ± 6.9	77.8 ± 8.1	64.4 ± 11.0	75.6 ± 5.1	66.7 ± 8.4	80.0 ± 6.9 *	66.7 ± 8.4	66.7 ± 4.9	76.7 ± 4.9

Data correspond to mean ± standard deviation. The highest values are indicated by the presence of the asterisk, according to Tukey test.

**Table 2:** Fresh and dry weights (g) of calluses derived from leaf segments of five Brazilian cultivars of *A. hypogaea* cultured on MS medium supplemented with different concentrations of picloram after 60 days of culture at 25±2°C under fluorescent lamps or association of blue and red LEDs.

Cultivar	Concentration of picloram (µM)	Fluorescent lamp		Blue-red LED	
		Fresh weight (g)	Dry weight (g)	Fresh weight (g)	Dry weight(g)
IAC 886	1.25	1.289±0.125 <sup>ab</sup>	0.119±0.009 <sup>ab</sup>	1.115±0.093 <sup>b</sup>	0.088±0.018 <sup>bc</sup>
	2.5	0.986±0.145 <sup>cd</sup>	0.117±0.014 <sup>ab</sup>	1.423±0.098 <sup>a</sup>	0.135±0.021 <sup>ab</sup>
	5	0.982±0.091 <sup>cd</sup>	0.056±0.016 <sup>c</sup>	1.114±0.045 <sup>bc</sup>	0.081±0.012 <sup>bc</sup>
IAC Caiapó	1.25	0.781±0.112 <sup>de</sup>	0.056±0.011 <sup>c</sup>	0.652±0.108 <sup>e</sup>	0.067±0.010 <sup>c</sup>
	2.5	0.812±0.098 <sup>d</sup>	0.054±0.009 <sup>c</sup>	0.539±0.097 <sup>e</sup>	0.069±0.004 <sup>c</sup>
	5	0.649±0.039 <sup>e</sup>	0.039±0.009 <sup>d</sup>	0.612±0.119 <sup>e</sup>	0.072±0.004 <sup>c</sup>
IAC Tatu ST	1.25	0.894±0.152 <sup>cd</sup>	0.111±0.013 <sup>ab</sup>	0.998±0.160 <sup>cd</sup>	0.114±0.013 <sup>b</sup>
	2.5	0.824±0.182 <sup>cd</sup>	0.109±0.003 <sup>b</sup>	0.854±0.154 <sup>cde</sup>	0.121±0.011 <sup>b</sup>
	5	0.723±0.045 <sup>de</sup>	0.082±0.014 <sup>bc</sup>	0.635±0.098 <sup>e</sup>	0.099±0.005 <sup>b</sup>
IAC 8112	1.25	0.915±0.093 <sup>cd</sup>	0.050±0.020 <sup>cd</sup>	1.012±0.105 <sup>c</sup>	0.078±0.025 <sup>bc</sup>
	2.5	0.871±0.087 <sup>d</sup>	0.051±0.019 <sup>cd</sup>	0.924±0.098 <sup>cd</sup>	0.069±0.021 <sup>bc</sup>
	5	0.911±0.196 <sup>cd</sup>	0.046±0.017 <sup>cd</sup>	0.789±0.088 <sup>de</sup>	0.058±0.009 <sup>bc</sup>
BR-1	1.25	1.356±0.117 <sup>ab</sup>	0.133±0.009 <sup>a</sup>	1.295±0.165 <sup>ab</sup>	0.129±0.012 <sup>ab</sup>
	2.5	1.141±0.132 <sup>bc</sup>	0.082±0.010 <sup>bc</sup>	1.476±0.113 <sup>a</sup>	0.154±0.019 <sup>a</sup>
	5	1.025±0.054 <sup>c</sup>	0.064±0.018 <sup>c</sup>	1.186±0.089 <sup>b</sup>	0.099±0.013 <sup>b</sup>

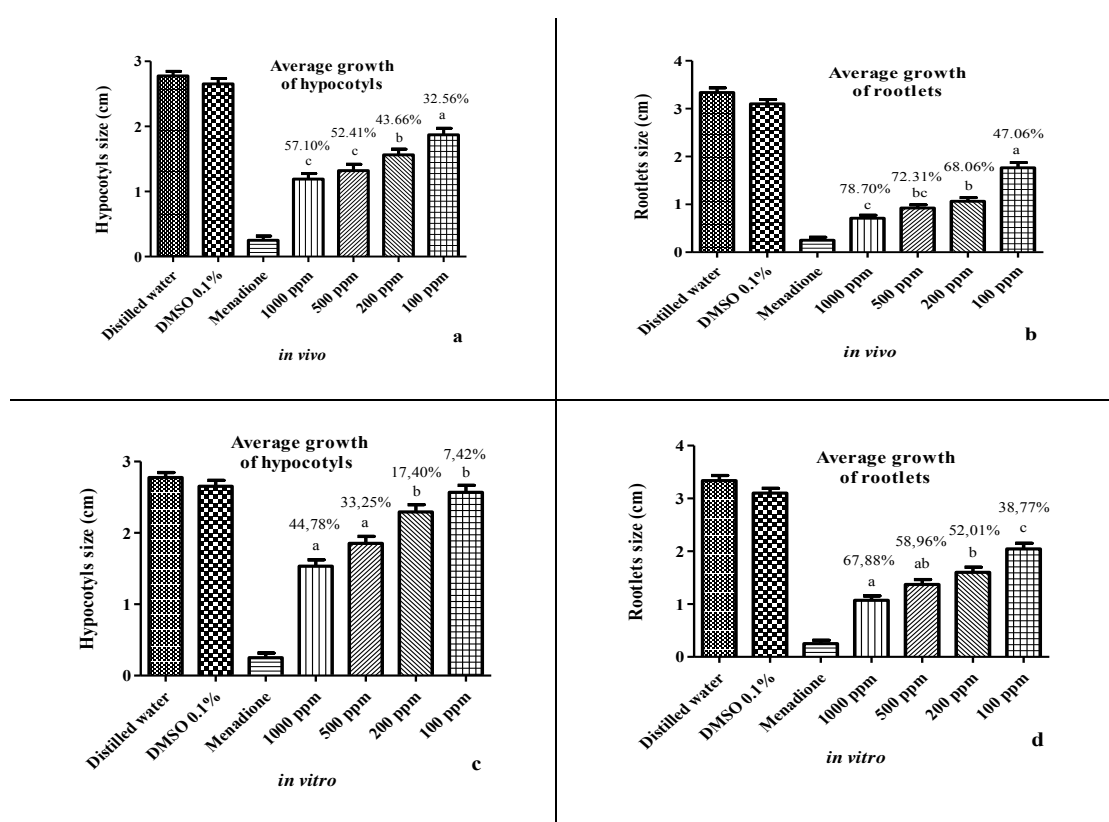
Mean ± SD; means within each column followed by the same letter are not significantly different, according to the Tukey test.

Biomass accumulation was determined only for the calluses derived from leaf segments cultured under fluorescent lamps or association of blue and red LEDs, considering that these treatments

resulted in the highest frequencies of callogenesis. The highest biomass accumulation was observed in calluses from cultivars IAC 886 and BR-1 (Table 2).

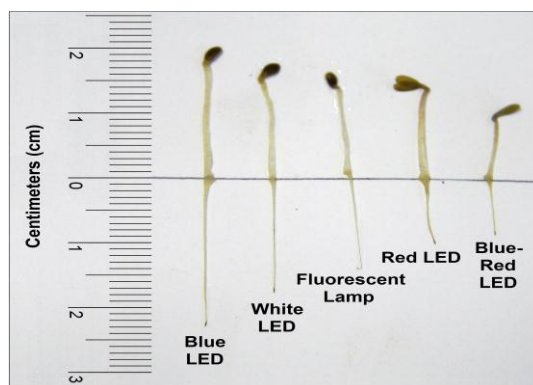
Since calluses induced on MS medium supplemented with 1.25  $\mu$ M or 2.5  $\mu$ M picloram, at 25°C, showed the highest biomass accumulation (up to  $0.154 \pm 0.019$  g of dry weight), they were used for further experiments aiming at a comparative study of the allelopathic potential of *in vitro* materials from the five selected cultivars.

**Allelopathic activity:** Extracts of both *in vivo* and *in vitro* aerial parts of *A. hypogaea* (cv. BR-1) caused higher growth inhibition of rootlets when compared to hypocotyls (Figure 2). The lowest value of IC<sub>50</sub> (96.68 ppm) determined for rootlets (Figure 2b) was chosen for the comparison of the allelopathic activity of calluses from the different cultivars.



**Fig. 2:** Evaluation of allelopathic activity of ethanolic extracts from aerial parts of *in vivo* ('a' and 'b') and *in vitro* ('c' and 'd') plants of *Arachis hypogaea* (cultivar BR-1) on the growth of hypocotyls and rootlets of *L. sativa* based on the average lengths of each organ and the inhibition percentages relative to distilled water control. The same letter means no statistically significant difference between the samples in each graphic.

Extracts from calluses of cultivars IAC 886, IAC Caiapó and BR-1 cultured under fluorescent lamp, red LED and association of blue and red LEDs caused higher percentages of inhibition than the ones observed with extracts from aerial parts of *in vivo* plants (above 50%). Callus extracts of cultivar BR-1 (Figure 3) inhibited growth of both hypocotyls and rootlets, in the range of 57 to 67% (Table 3).



**Fig. 3:** Seedlings of *L. sativa* grown in the presence of extracts of callus derived from leaf segments of *A. hypogaea* (cv. BR-1) cultured on MS medium supplemented with 1.25 $\mu$ M picloram for 60 days at 25°C and under different light qualities.

**Table 3:** Growth inhibition of *L. sativa* by extracts of calluses (96.68 ppm) derived from leaf segments of five Brazilian cultivars of *A. hypogaea* cultured on MS medium supplemented with 1.25 $\mu$ M picloram for 60 days at 25°C, under different light qualities.

Cultivar	Inhibition in relation to control (%)									
	Fluorescent lamp		White LED		Blue LED		Red LED		Blue-red LED	
	H	R	H	R	H	R	H	R	H	R
IAC 886	55.66 <sup>b</sup>	53.09 <sup>bc</sup>	48.71 <sup>cd</sup>	54.28 <sup>b</sup>	35.21 <sup>ef</sup>	30.28 <sup>f</sup>	50.89 <sup>c</sup>	53.82 <sup>bc</sup>	58.77 <sup>ab</sup>	55.10 <sup>b</sup>
IAC Caiapó	57.51 <sup>b</sup>	52.14 <sup>bc</sup>	49.63 <sup>c</sup>	50.19 <sup>c</sup>	29.14 <sup>f</sup>	31.70 <sup>f</sup>	55.39 <sup>b</sup>	59.14 <sup>ab</sup>	54.89 <sup>b</sup>	58.13 <sup>ab</sup>
IAC Tatu ST	48.97 <sup>cd</sup>	52.61 <sup>bc</sup>	39.23 <sup>e</sup>	41.78 <sup>de</sup>	30.52 <sup>f</sup>	33.29 <sup>f</sup>	36.29 <sup>e</sup>	31.97 <sup>f</sup>	45.95 <sup>d</sup>	48.72 <sup>cd</sup>
IAC 8112	48.18 <sup>cd</sup>	41.07 <sup>de</sup>	42.17 <sup>d</sup>	43.28 <sup>d</sup>	19.72 <sup>g</sup>	22.81 <sup>fg</sup>	40.91 <sup>d</sup>	35.75 <sup>ef</sup>	38.62 <sup>e</sup>	34.28 <sup>ef</sup>
BR-1	58.74 <sup>ab</sup>	57.33 <sup>b</sup>	56.98 <sup>b</sup>	47.20 <sup>cd</sup>	30.81 <sup>f</sup>	27.15 <sup>f</sup>	59.28 <sup>ab</sup>	59.30 <sup>ab</sup>	63.21 <sup>a</sup>	66.89 <sup>a</sup>

H = Hypocotyl; R = rootlets

## DISCUSSION

In this work, we measured the callogenic potential of explants from five Brazilian peanut cultivars, in order to investigate the allelopathic activity of *in vitro* materials. In general, explants from cultivars BR-1 and IAC 886 showed higher rates of callus formation. Differences between calluses, shoots and roots from different varieties, species and hybrids of peanut have already been reported<sup>17</sup>. Other authors also observed variations in the percentage of regeneration among peanut cultivars<sup>18-23</sup>. These different responses can be explained by the genomic constitutions and levels of endogenous growth regulators<sup>24</sup>.

We also found that leaf segments showed higher percentages of callogenesis in response to picloram, when compared to seed explants. The use of explants from *in vitro* plants has several advantages, as they do not require disinfection and are physiologically uniform<sup>25</sup>. Although seed explants can be more readily sterilized due to the fact that they are more protected against external agents, a single seed is capable of generating multiple leaf explants, increasing the availability of uniform materials for experimentation<sup>26,27</sup>.

Picloram is often used for callus induction in *Arachis* species, either alone or in combination with other plant growth regulators. Among five auxins used, picloram (12.4. to 124.4  $\mu$ M) was the one that

induced the fastest response from explants of *A. hypogaea*<sup>28</sup>, at a percentage equivalent to the ones found in the present work (up to 82%). Considering another specie of the genus, the best efficiency of embryogenic callus induction was from shoot tips of *A. pintoii* in response to picloram (41.7  $\mu\text{M}$ ) combined with 6-benzylaminopurine<sup>29</sup>. However, the concentrations of picloram used for *A. hypogaea* and *A. pintoii* were much higher than the ones tested here. More recently, leaf explants of *A. prostrata* were studied, and also displayed higher frequencies of callus induction in response to picloram, when compared to other auxins<sup>30</sup>. In the present work, the formation of friable calluses in response to picloram was higher at 25°C when compared to 30°C. The influence of temperature is variable according to the species. For example, shoots of *Rauwolfia serpentine*, an Indian medicinal plant, were established at the lowest temperature tested (15°C), reaching 100% survival rates during the first nine months<sup>31</sup>. On the contrary, both direct organogenesis from cotyledons and development of organogenic calluses from leaves in response to BAP showed better rates at 35°C, when compared to 25°C<sup>32</sup>.

Light quality also plays an important role in *in vitro* systems. Our study was the first to measure the influence of light quality on callogenesis from explants of *A. hypogaea*. The highest rates of callus induction were observed under fluorescent lamps or association of blue and red LEDs, similarly to the results reported for several other species. These conditions were the most effective for plant regeneration from bulblets of a *Lilium* hybrid<sup>33</sup>. Two years later, reported that fluorescent light and association of blue and red LEDs induced better results than blue, red or white LEDs for shoot growth from shoot tips of chrysanthemum (*Dendranthema grandiflorum*)<sup>34</sup>. More recently, the best plant formation rates of *Panax vietnamensis* occurred when embryogenic calli were cultured under the association of 40% blue LED and 60% red LED<sup>35</sup>. These results can be due to the increase of active metabolites synthesis caused by the influence of red LED on photosynthesis and starch accumulation in plant leaves<sup>36</sup>, as well as the stimulation of opening stomata, the formation of chlorophyll, and the development of chloroplasts promoted by the blue wavelength<sup>37</sup>. Another important aspect measured in this work was the allelopathic activity of ethanolic extracts from calluses derived from leaf explants cultured in the presence of picloram at 25°C and under different light qualities, in comparison to extracts from aerial parts of *in vivo* and *in vitro* plants of *A. hypogaea*. While we found an  $\text{IC}_{50}$  of less than 100 ppm for extracts of aerial parts of *in vivo* plants, no less than  $59,3 \times 10^5$  ppm in aqueous extracts from five wild species (*Cakile maritime*, *Centaurea glomerata*, *Juncus bufonius*, *Lactuca serriola*, and *Reichardia tingitana*) on the inhibition of growth of *Biden spillosa*<sup>38</sup>.

In our work, extracts from aerial parts of *in vivo* plants showed an  $\text{IC}_{50}$  value for inhibiting growth of hypocotyls (99.91 ppm) and rootlets (96.68 ppm) that was very similar to those reported by other authors for resveratrol ( $\text{IC}_{50} = 90$  ppm, for both hypocotyls and rootlets) on *Polygonum cuspidatum*<sup>39</sup>. In addition to this, extracts of calluses from leaf segments of cultivar BR-1 cultured under association of blue and red LEDs caused a higher inhibition when compared to extracts of *in vivo* and *in vitro* aerial part. These results endorse the importance of the investigation of biological activities of *in vitro* materials, which can show different potentials when compared to *in vivo* plants<sup>40</sup>. Moreover, the production of *in vitro* materials, such as calluses, allows the selection of cell lines that can produce more secondary metabolites, faster and free from the influence of environmental factors<sup>7</sup>.

## CONCLUSION

In conclusion, we measured picloram-induced callogenesis from leaf segment of five Brazilian cultivars of *A. hypogaea* as influenced by different wavelengths incubation temperatures. We also investigated the allelopathic effect of ethanolic extracts from these materials on the growth of *Lactuca sativa*. The highest percentages of inhibition (up to 66.89%) were found with extracts of calluses from

the cultivars IAC 886 and BR-1 cultured under fluorescent lamps or association of blue and red LEDs. Although further studies are needed in order to identify the inhibiting allelochemical in the extracts, our data suggest that callus extracts from *A. hypogaea* can be considered an important tool for the development of natural herbicides.

## ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank CAPES, CNPq and FAPERJ, for the financial support and IAC, for the peanut samples used in the present study.

## REFERENCES

1. R. Jaime-Garcia and P. J. Cotty, *Soil Biology & Biochemistry*, 2010, 42, 1842-1847.
2. S. A. Jakkeral, H. L. Nadaf and M. V. C. Gowda, *Journal of Agricultural of Sciences*, 2015, 27(1), 71-73.
3. C. D. Fabbro and D. Prati, *Basic and Applied Ecology*, 2015, 16: 28-35.
4. K. Arora, D. R. Batish, H. P. Singh and R. K. Kohli, *Journal of Environmental and Agricultural Sciences*, 2015, 3, 56-60.
5. S. K. Ransing, V. A. Patil and G. B. Suryavanshi, *Annals of Plant Physiology*, 1990, 4(2), 240-242.
6. H. Fei and K. Chuihua, *Journal of South China Agricultural University*, 2002, 23(1), 9-12.
7. S. Karuppusamy, *Journal of Medicinal Plants Research*, 2009, 3(13), 1222-1239.
8. H. Flores and F. Medina-Bolívar, *Plant Tissue Culture Biotechnology*, 1995, 1, 59-74.
9. K. W. Hughes, *Environmental and Experimental Botany*, 1981, 21(3), 281-288.
10. H. C. Wu and C.C. Lin, *Hort. Science*, 2012, 47(10), 1490-1494.
11. R. J. Bula, R. C. Morrow, T. W. Tibbitts, D. J. Barta, R. W. Ingnatius and T. S. Martin, *Hort. Science*, 1991, 26, 203-205.
12. M. E. Hoenecke, R. J. Bula and T. W. Tibbitts, *Hort. Science*, 1992, 27, 427-430.
13. K. Okamoto, T. Yanagi and S. Kondo, *Acta Horticulturae*, 1997, 432, 149-157.
14. T. Murashige and F. Skoog, *Plant Physiology*, 1962, 15(3), 473-497.
15. K. Fukuhara and I. Kubo, *Phytochemistry*, 1991, 30(2), 685-687.
16. G. Chiapusio, A. M. Sánchez, M. J. Reigosa, L. E. González and F. Pellisier, *Journal of Chemical Ecology*, 1997, 23(11), 2445-2453.
17. R. N. Pittman, D. J. Banks, J. S. Kirby, E. D. Mitchell and P. E. Richardson, *Peanut Science*, 1983, 10, 21-25.
18. P. Ozias-Akins, W. Anderson and C. Holbrook, *Plant Science*, 1992, 83, 103-111.
19. A. H. McKently, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1995, 42(3), 251-254.
20. P. Banerjee, S. Maity, S. S. Maiti and N. Banerjee, *Acta Botanica Croatica*, 2007, 66(1), 15-23.
21. M. Kanyand and C. S. Prakash, *Journal of Biotechnology*, 2007, 130, 202-207.
22. L. Shan, G. Tang, P. Xu, Z. Liu and Y. Bi, *In Vitro Cellular Developmental Biology-Plant*, 2009, 45, 525-531.
23. F. Nazir, M. Hassan, Z. Akram, M. Javed, S. Ali, G. Ali and Y. Zafar, *African Journal of Biotechnology*, 2011, 10(43), 8599-8604.



24. J. Roy and N. Banerjee, *Scientia Horticulturae*, 2003, 97, 333-340.
25. D. Cidade, R. Garcia, A. Duarte, G. Sachetto-Martins and E. Mansur, *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 2006, 41(3), 385-391.
26. P. Venkatachalam, N. Geetha, K. Abha, M. S. Shaila and G. L. Sita, *Current Science*, 2000, 78, 1130-1136.
27. B. B. Misra, and S. Dey, *AoB Plants*, 2013, 5, 57-66.
28. E. L. Little, Z. V. Magbanua and W. A. Parrott, *Plant Cell Reports*, 2000, 19, 351-357.
29. H. Y. Rey and L. A. Mroginski, *Biologia Plantarum*, 2006, 50(1), 152-155.
30. S. K. Bera, A. L. Singh and M. V. Gedia, *Legume Research*, 2014, 37(3), 281-286.
31. N. Sharma and K. P. S. Chandel, *Plant Cell Reports*, 1992, 11(4), 200-203.
32. M. C. Pestana, C. Lacorte, V. G. De Freitas, D. E. De Oliveira and E. Mansur, *In Vitro Cellular Developmental Biology-Plant*, 1999, 35, 214-221.
33. M. L. Lian, H. N. Murthy and K. Y. Paek, *Scientia Horticulturae*, 2002, 94, 365-370.
34. S. J. Kim, E. J. Hahn, J. W. Heo and K. Y. Paek, *Scientia Horticulturae*, 2004, 101, 143-151.
35. D. T. Nhut, N. P. Huy, N. T. Tai, N. B. Nam, V. Q. Luan, V. T. Hien, H. T. Tung, B. T. Vinh and T. C. Luan, *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 2015, 29(2), 299-308.
36. A. Saebo, T. Krekling and M. Appelgren, *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 1995, 41, 177-185.
37. M. C. Wu, C. Y. Hou, C. M. Jiang, Y. T. Wang, C. Y. Wang, H. H. Chen and H. M. Chang, *Food Chemistry*, 2007, 101, 1753-1758.
38. A. M. A. El-Gawad, I. A. Mashaly and R. I. Al-Nafie, *International Journal of Current Research*, 2015, 7(10), 21019-21024.
39. P. Fan, K. Hostettmann and H. Lou, *Chemoecology*, 2010, 20, 223-227.
40. I. Grzegorzcyk, A. Matkowski and H. Wysokinska, *Food Chemistry*, 2007, 104, 536-541.

**\*Corresponding Author: Gabriel Casimiro;**

Laboratório de Micropropagação e Transformação de Plantas, Departamento de Biologia Celular, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil.

**APÊNDICE B** - Artigo publicado no periódico *The Scientific World Journal***Allelopathic activity of extracts from different Brazilian peanut (*Arachis hypogaea* L.) cultivars on lettuce (*Lactuca sativa*) and weed plants**

Casimiro, G.S.\*<sup>1</sup>; Mansur, E.<sup>1</sup>; Pacheco, G.<sup>1</sup>; Garcia, R.<sup>1</sup>;  
Leal, I.C.R.<sup>2</sup> and Simas, N.K.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Laboratory of Micropropagation and Plant Transformation, Cellular Biology Department, State University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil.

<sup>2</sup> Laboratory of Natural Products and Biological Assays, Department of Natural Products and Food, School of Pharmacy, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil.

\* Correspondence should be addressed to Gabriel Casimiro: gclss@globocom

---

**ABSTRACT**

Peanut (*Arachis hypogaea* L.) is the fourth most consumed oleaginous in the world, producing seeds with high contents of lipids, proteins, vitamins and carbohydrates. Biological activities of different extracts of this specie have already been evaluated by many researchers, including antioxidant, antitumoral and antibacterial. In this work, the allelopathic activity of extracts from different Brazilian peanut cultivars against lettuce (*Lactuca sativa*) and two weed plants (*Commelina benghalensis* and *Ipomoea nil*) was studied. Aerial parts, roots, seeds and seed coats were used for the preparation of crude extracts. Seed extract partitioning was performed with *n*-hexane, dichloromethane, ethyl acetate, *n*-butanol and aqueous residue. Germination and growth of hypocotyls and rootlets were evaluated after one and five days of incubation with plant extracts, respectively. Crude seed extract and its dichloromethanic partition displayed highest allelopathic activity. These results contribute for the study of new potential natural herbicides.

**KEYWORDS**

Peanut; seeds; allelopathy.

---

**1. Introduction**

Peanut (*Arachis hypogaea* L., Leguminosae) is the fourth most planted and consumed oilseed worldwide, and also a good option for crop rotation. In addition to its flavour, peanut seeds have a high content of lipids (about 50%), proteins (22% to 30%), mineral salts, vitamins and carbohydrates, being highly energetic, with an average of 585 calories per 100 grams of the grain [1].

The evaluation of different biological activities within the genus *Arachis* led to the recognition of antioxidant, antibacterial, antitumoral and anti-inflammatory potentials, among others. However, allelopathic activity is comparatively less investigated. Allelopathy is any positive or negative effect of one plant on another through the production of chemicals that are released into the environment [2]. A great importance of plants with allelopathic activity is to fight against weed plants, which are defined as plants that grow where they are not desired,

along with agricultural crops, interfering in their development and reducing productivity [3]. Although routinely weed plants are combated with herbicides, their indiscriminate use leads to the development of resistant plants. In addition, the impact of herbicides on human health is also another debatable fact. In this context, the search for natural products instead of synthetic herbicides for weed plant management is highly recommended [4, 5].

To our knowledge, the allelopathic potential as already been studied only in two species of genus *Arachis*. The inhibitory activity of seed extracts in the germination of millet and the effect of root and leaf extracts of *A. hypogaea* on rice, maize, radish and rye grass, besides a positive stimulus of aqueous extracts of *A. pintoii* on the germination of tomato seeds (*Solanum lycopersicum*) and pepper (*Capsicum annum*), have been studied yet [6, 7, 8].

In view of this fact, this paper evaluates the allelopathic activity of extracts from different organs of five Brazilian peanut (*Arachis hypogaea* L.) cultivars against lettuce (*Lactuca sativa*) and weed plants (*Commelina benghalensis* and *Ipomoea nil*).

## 2. Material and methods

### 2.1. Plant material

Aerial parts, roots, seeds and seed coats of five Brazilian peanut cultivars, named IAC 886 (Virginia Runner), IAC Caiapó (Virginia Runner), IAC Tatu ST (Valencia), IAC 8112 (Spanish) and IAC BR-1 (Valencia), were used in this study. Plants were grown from seeds in the greenhouse of Rio de Janeiro State University, Brazil, in pots containing Plantmax<sup>®</sup>. Light intensity in a clear day during the growing period was as high as 1600  $\mu\text{E}/(\text{m}^2/\text{s})$ . Aerial parts and roots were taken for extraction 30 days after planting.

### 2.2 Preparation of extracts

#### 2.2.1. Crude extracts

Plant materials were dried in an oven at 50°C, crushed and weighed. Soaking in ethanol 100% was preceded by a degreasing step with *n*-hexane (five stages during ten days). Maceration in ethanol was performed in the dark at room temperature (five stages during ten days). After filtration on filter paper and concentration in a vacuum rotary evaporator at 45°C, extracts were weighed and stored at 4°C until used.

#### 2.2.2. Partitioned extracts

The extract of cultivar BR-1 seeds was resuspended in methanol:distilled water (9:1), and subjected to successive liquid-liquid partitioning using organic solvents of increasing polarity, namely *n*-hexane, dichloromethane, ethyl acetate and *n*-butanol, followed by concentration in a vacuum rotary evaporator at 45°C.

### 2.3. Evaluation of allelopathic activity

#### 2.3.1. Germination of seeds

Samples of the extracts were dissolved in chloroform and the volume adjusted to the desired concentrations (1000, 500, 200 and 100 ppm). Each petri dish (d=6 cm, h=1 cm) containing filter paper discs Whatman<sup>®</sup> No.1 (d=5.7 cm) received 0.5 ml of the extract. After

solvent evaporation at room temperature (24 hours), ten seeds (*L. sativa*, *C. benghalensis* or *I. nil*) and 2.5 mL of distilled water with DMSO 0.1% were added to the petri dish. All assays were conducted in triplicate, with three replications. Menadione in the concentration of 200 ppm served as positive control, while distilled water with DMSO 0.1% were used as negative control. Experiments were conducted in a growth chamber in the dark, at 25±2°C. The evaluation of germination was performed 24h after the introduction of seeds. The criterion for germination reading was the rootlet protrusion. The percentages of germination inhibition were calculated by comparison with the untreated control, using the following calculation: % Inhibition = (C-X) / C x 100, where C = No. of seeds germinated in control and X = No. of seeds germinated in the test sample.

### 2.3.2. Hypocotyls and rootlets growth

Seedling growth was evaluated five days after the introduction of the seeds with opening of plates. The percentages of inhibition were calculated by comparison with the untreated control, using the following formula: % Inhibition = (C-X) / C x 100, where C = average size of hypocotyl / rootlet in control and X = average size of the hypocotyl / rootlet in the test sample [9, 10].

### 2.4. Statistical analysis

Statistical evaluation of experimental data was performed by analysis of variance (ANOVA) and Tukey's comparison test, with the aid of the Graphpad Prism 5<sup>®</sup>. The value of p≤0.05 was considered significant, and a confidence interval of 95% was adopted.

## 3. Results

### 3.1. Evaluation of crude ethanolic extracts

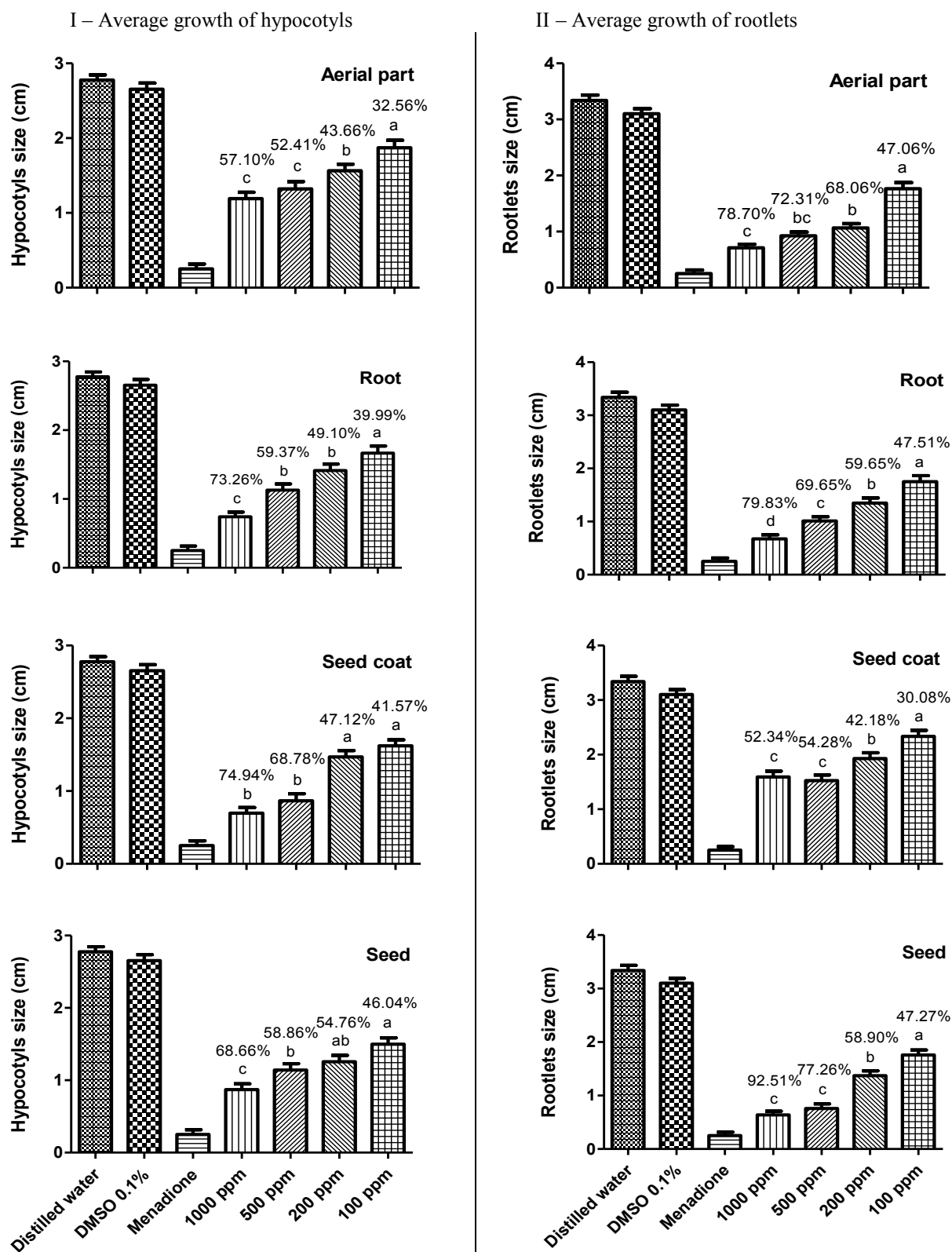
The effect of crude extracts from cultivar BR-1 (aerial part, root, seed and seed coat) was evaluated on the germination and growth of hypocotyls and rootlets of *L. sativa*. Seed and seed coat extracts showed highest percentages of inhibition of germination (47.78%), when compared to root (35.46%) and aerial part extracts (24.44%) (Table 1).

**Table 1.** Inhibition of *L. sativa* seeds germination by crude ethanolic extracts of aerial part, root, seed coat and seed of BR-1 cultivar from *Arachis hypogaea*.

Crude extract (BR-1 - 1000 ppm)	Inhibition of germination (%)
Aerial part	24.44 <sup>c</sup>
Root	35.46 <sup>b</sup>
Seed coat	47.78 <sup>a</sup>
Seed	47.78 <sup>a</sup>

The same letter means no statistically significant difference between the samples, according to Tukey's test.

On the other side, aerial part extract caused the highest percentages of growth inhibition in rootlets, when compared with hypocotyls. Similarly, root and seed extracts reached the higher percentage of inhibition on rootlets growth. Nevertheless, the percentage of inhibition induced by root extracts on the hypocotyls was higher when compared with the inhibition showed by extracts of aerial parts. Unlike these materials, seed coat extracts promoted greater inhibition on hypocotyls, when compared with rootlets, while the inhibition on rootlets was similar to those of the other extracts tested (Fig. 1).



**Figure 1.** Evaluation of allelopathic activity of ethanolic extracts of *Arachis hypogaea* (cultivar BR-1) on the growth of hypocotyls and rootlets of *L. sativa* based on the average lengths of each organ and the inhibition percentages relative to distilled water control. The same letter means no statistically significant difference between the samples in each graphic, according to Tukey's test.

The IC<sub>50</sub> (concentration of extract required to inhibit 50% of *Lactuca sativa* growth) was used for comparison of the activity of the different extracts from cultivar BR-1. Seed extracts showed the lowest IC<sub>50</sub> values (72.98 ppm for hypocotyl and 77.43 ppm for rootlet development), while the root extract showed the highest values (367.5 ppm for hypocotyl and 472.5 for rootlet). The aerial part and seed coat extracts displayed similar values (91.46 ppm to 106.1 ppm) (Table 2).

**Table 2.** IC<sub>50</sub> of crude ethanolic extracts of cultivar BR-1 of *A. hypogaea* on the inhibition of *L. sativa* growth of hypocotyls and rootlets.

Crude ethanolic extract	IC <sub>50</sub> (ppm)	
	Hypocotyl	Rootlet
Aerial part	99.91	96.68
Root	367.5	472.5
Seed coat	106.1	91.46
Seed	72.98	77.43

The concentration corresponding to the lower IC<sub>50</sub> values, obtained with cultivar BR-1 in order to inhibit the development of hypocotyls or rootlets, was used for the comparative analysis of extracts from other cultivars. The highest inhibition percentages (52.87% for hypocotyl and 58.25% for rootlet) were obtained with extracts from the aerial part of cultivar IAC 886 (Table 3).

**Table 3.** Inhibition of *L. sativa* growth of hypocotyls and rootlets by crude ethanolic extracts of aerial part, root, seed coat and seed of IAC 886, IAC Caiapó, IAC Tatu ST, IAC 8112 and BR-1 cultivars from *Arachis hypogaea*.

Cultivar	Inhibition in relation to control (%)							
	Crude extracts							
	Aerial part (96.68 ppm)		Root (367.5 ppm)		Seed coat (91.46 ppm)		Seed (72.98 ppm)	
Hypoc.	Root.	Hypoc.	Root.	Hypoc.	Root.	Hypoc.	Root.	
IAC 886	52.87 <sup>a</sup>	58.25 <sup>a</sup>	36.14 <sup>bc</sup>	29.07 <sup>b</sup>	29.75 <sup>b</sup>	38.52 <sup>bc</sup>	41.28 <sup>b</sup>	40.15 <sup>ab</sup>
IAC Caiapó	32.18 <sup>c</sup>	35.27 <sup>d</sup>	43.65 <sup>ab</sup>	33.89 <sup>ab</sup>	27.52 <sup>b</sup>	32.97 <sup>c</sup>	27.98 <sup>c</sup>	26.78 <sup>c</sup>
IAC Tatu ST	40.19 <sup>b</sup>	38.59 <sup>cd</sup>	32.13 <sup>c</sup>	29.81 <sup>b</sup>	30.18 <sup>b</sup>	40.10 <sup>b</sup>	39.58 <sup>b</sup>	33.98 <sup>bc</sup>
IAC 8112	42.03 <sup>b</sup>	43.87 <sup>bc</sup>	35.62 <sup>c</sup>	28.32 <sup>b</sup>	41.78 <sup>a</sup>	45.21 <sup>ab</sup>	35.52 <sup>bc</sup>	36.27 <sup>b</sup>
BR-1	46.81 <sup>ab</sup>	50.00 <sup>ab</sup>	50.00 <sup>a</sup>	37.24 <sup>a</sup>	44.09 <sup>a</sup>	50.00 <sup>a</sup>	50.00 <sup>a</sup>	48.51 <sup>a</sup>

The same letter means no statistically significant difference between the samples in each column, according to Tukey's test.

Hypoc. = Hypocotyl / Root. = Rootlet.

### 3.2. Evaluation of partitioned extracts

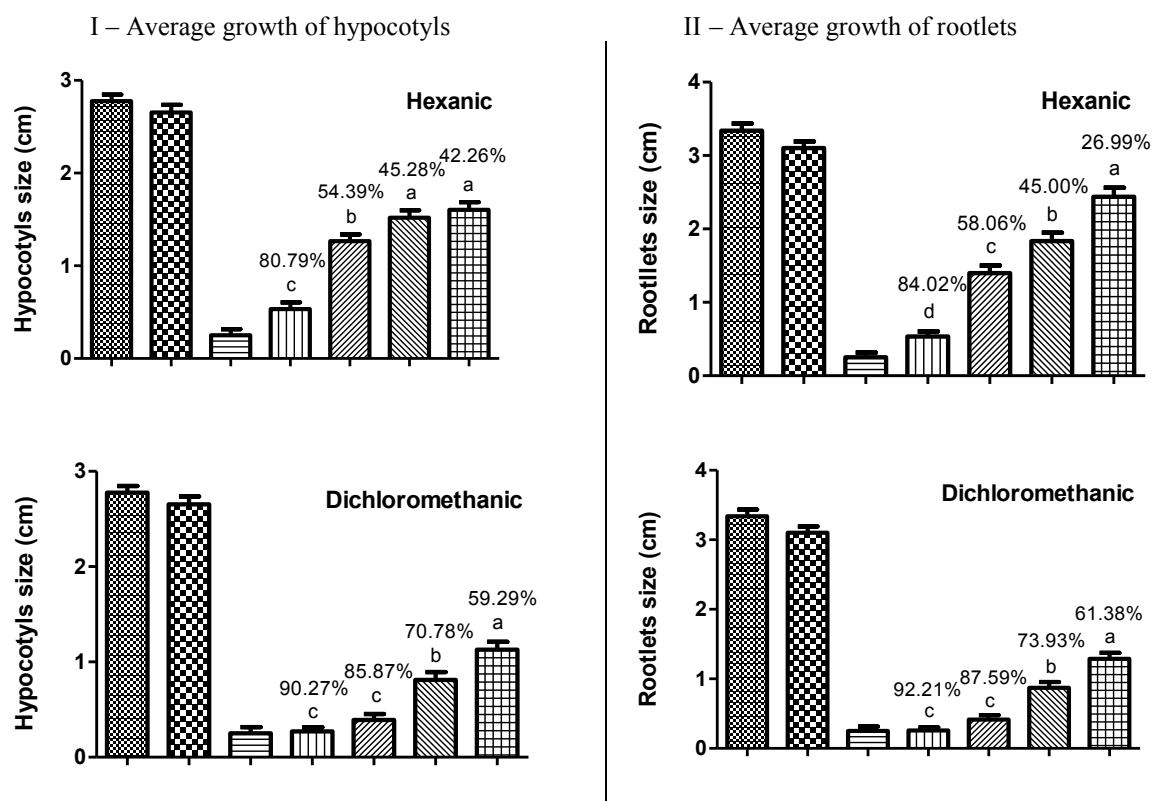
The allelopathic activity of liquid-liquid partitions of the ethanolic extract of seeds of BR-1 (*n*-hexane, dichloromethane, ethyl acetate, *n*-butanol, aqueous residue) was also evaluated. The inhibition caused by the nonpolar partitions, dichloromethanic (68.89%) and hexanic (57.78%) were much higher than that attained with the other partitions tested (13.33 to 16.67%) (Table 4).

**Table 4.** Inhibition of *L. sativa* seeds germination by partitions of seed extracts of BR-1 cultivar from *A. hypogaea*, at 1000 ppm.

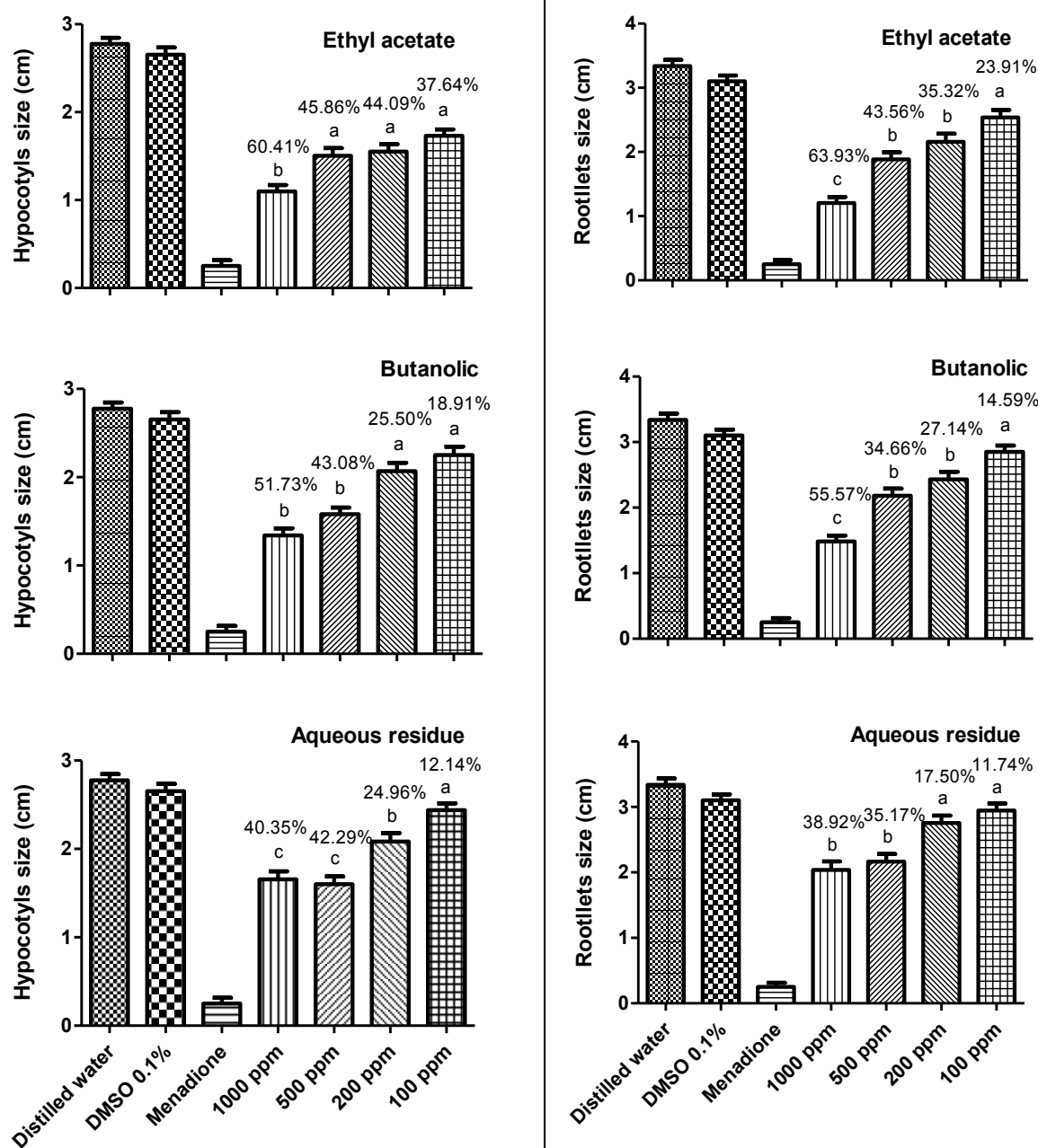
Partitions (1000 ppm)	Inhibition of germination (%)
Hexanic	57.78 <sup>a</sup>
Dichloromethanic	68.89 <sup>a</sup>
Ethyl acetate	16.67 <sup>b</sup>
Butanolic	16.67 <sup>b</sup>
Aqueous residue	13.33 <sup>b</sup>

The same letter means no statistically significant difference between the samples, according to Tukey's test.

The inhibition percentages of growth of rootlets and hypocotyls varied according to the partition. The values obtained with the hexanic partition (80.79% for hypocotyl and 84.02% for rootlets at 1000 ppm) were higher than those achieved with the crude extract, which showed an inhibition of 68.66% on the growth of hypocotyls. Percentages found for rootlets were lower than those showed by the crude extract (until 92.51% at 1000 ppm). The dichloromethanic partition also caused the highest percentages of inhibition of growth of hypocotyls and rootlets (90.27 and 92.21, respectively, at 1000 ppm). Growth inhibition rates of ethyl acetate partition reached similar percentages when compared to crude extract. Butanolic partition and aqueous residue had the lowest percentages of inhibition, both in relation to other partitions and as compared to crude extracts (Fig. 2).







**Figure 2.** Evaluation of allelopathic activity of partitions of seed extracts of *Arachis hypogaea* (cultivar BR-1) on the growth of hypocotyls and rootlets of *L. sativa* based on the average lengths of each partition and the inhibition percentages are relative to distilled water control. The same letter means no statistically significant difference between the samples in each graphic, according to Tukey's test.

As expected, the lowest value for  $IC_{50}$  was found with dichloromethanic partition on rootlets (19.70 ppm), while the highest value was found for aqueous residue (1360.0 ppm). All partitions evaluated, except dichloromethanic, showed lower  $IC_{50}$  values for hypocotyls as compared to rootlets growth (Table 5).

**Table 5.** IC<sub>50</sub> of partitions of seed ethanolic extract of cultivar BR-1 of *A. hypogaea* on the inhibition of *L. sativa* growth of hypocotyls and rootlets.

Seed extract partitions of cultivar BR-1 ( <i>Arachis hypogaea</i> )	IC <sub>50</sub> (ppm)	
	Hypocotyls	Rootlets
Hexanic	93.93	216.8
Dichloromethanic	23.88	19.70
Ethyl acetate	42.95	447.6
Butanolic	361.6	976.6
Aqueous residue	310.7	1360.0

The dichloromethanic partition at IC<sub>50</sub> (19.70 ppm) was evaluated for allelopathic activity on two weed species that affect *Arachis hypogaea* crops, *Commelina benghalensis* and *Ipomoea nil*. Although the inhibition of seed growth on *I. nil* was greater than on *C. benghalensis*, the inhibition of both species was lower than the observed in *L. sativa* (Table 6).

**Table 6.** Inhibition of weed plants (*Commelina benghalensis* and *Ipomoea nil*) growth of hypocotyls and rootlets by dichloromethanic partition of seed extract of cultivar BR-1 of *Arachis hypogaea*.

Weed specie	Inhibition of seed germination of weed plants by dichloromethanic partition (IC <sub>50</sub> = 19.70 ppm) (%)	
	Hypocotyl	Rootlet
<i>Commelina benghalensis</i>	14.29 <sup>b</sup>	23.56 <sup>b</sup>
<i>Ipomoea nil</i>	33.78 <sup>a</sup>	38.11 <sup>a</sup>

The same letter means no statistically significant difference between the samples, according to Tukey's test.

#### 4. Discussion

In the present study, evaluations of allelopathic activity were made with ethanolic extracts of different materials as well as with liquid-liquid partitions of seed extracts from five cultivars of *A. hypogaea*. The allelopathic activity of peanut extracts has also been previously studied by other workers. Similar results to those obtained here were reported when the activity of aqueous extracts of different organs (root, stem, leaf and flower) on the inhibition of germination of cucumber seeds were analyzed [11]. However, while these authors found highest allelopathic activity in root extracts, we attained best effects with ethanolic seed extracts. This difference shows that allelopathic activity of different organs of the same plant can vary according to the method used and the target specie.

Inhibition of germination is one of the most parameters used to evaluate allelopathic activity. In this work, crude ethanol extracts of seeds and seed coats caused almost 50% of inhibition of germination of *L. sativa* seeds. In contrast, extracts of aerial parts of *Equisetum giganteum* and *Nephrolepis exaltata* had no effect on *L. sativa* seeds [12]. Nonpolar partitions (*n*-hexanic and dichloromethanic) of seed extract of *A. hypogaea* showed the highest

capacities of inhibition of germination of *L. sativa*. The same values were found for equivalent partitions of aqueous leaf extract of *Sapindus saponaria*, which could also inhibit the germination of *L. sativa* [13].

In addition to seed germination of *L. sativa*, extracts were evaluated in relation to their effect on seedling growth. Among the organs evaluated, seed extracts showed the lowest IC<sub>50</sub> for inhibiting both hypocotyls (72.98 ppm) and rootlets (77.43 ppm) growth. These values were even lower than those reported by other authors for resveratrol (IC<sub>50</sub> = 90 ppm), a constitutive compound of *Arachis* species, also in relation to inhibition of *L. sativa*'s growth [14].

The concentrations used to determine the plant growth inhibitory activity usually vary in a wide range of high values. Certainly, they are unreasonable when thinking in farming use in the field, considering the possibility of environmental damages and disadvantaging the desired ecological balance. For example, rootlets of *L. sativa* showed an average length of 5.78 cm when treated with *Cuscuta campestris* extracts at a concentration of 100 ppm. This value was almost three times higher than that observed with extracts of *A. hypogaea* seeds for the same specie and at the a similar concentration (less than 2.00 cm) [15]. In the evaluation of coffee fruit extracts (*Coffea arabica*), the concentration required for the growth inhibition of hypocotyls and rootlets of *L. sativa* to be numerically similar to that found in our work was ten-fold higher (1000 ppm) [16]. In a study of allelopathic activity of *Terminalia cattapa* fruit extracts biomonitoring by *L. sativa*, it was demonstrated that the IC<sub>50</sub> of the dichloromethanic partition was 4.5 times reduced as compared to crude ethanol extracts [17]. In a paper with subfractions of *Cleome arabica*, a concentration of 3.000 ppm was necessary to inhibit 50% of *L. sativa* growth [18]. This concentration was much higher than that used for inhibiting 50% of the same specie with the dichloromethanic partition (19.70 ppm) in the present study. Thus, the IC<sub>50</sub> values found for *A. hypogaea* (77.43 ppm and 19.70 ppm for the crude extract and the dichloromethanic partition, respectively) for inhibiting growth of rootlets provide indications of the quality of the material studied to obtain substances with potential herbicide activity.

The allelopathic activity of certain species is very important to diminish the spread of weeds on crops. Thus, some plant extracts can act as natural herbicides, bringing many benefits to crops. Evaluation of the dichloromethanic partition of ethanolic extract of *A. hypogaea* performed in the present study showed inhibition of growth of weed, similarly to the results reported with extracts of *Terminalia catappa* fruits [17].

## 5. Conclusions

In conclusion, the results showed that aerial part, root, seed and seed coat extracts of *A. hypogaea* could inhibit the germination of seeds and the growth of hypocotyls and rootlets of *L. sativa*. The partitions of ethanolic seed extract in *n*-hexane, dichloromethane, ethyl acetate, butanol and aqueous residue can also have a positive allelopathic activity. Dichloromethanic partition of ethanolic seed extract showed to be an environmentally sustainable alternative herbicide for weed management in other large-scale crops.

## Acknowledgements

The authors thank FAPERJ (no. E-26/110.125/2013) and CNPq (no. 305265/2014-8) for the financial support and Agronomic Institute of Campinas for the providing of seeds.

## The Conflict of Interest Section

The authors declare no conflict of interest.

## References

- [1] Jaime-Garcia, R., Cotty, P.J., 2010. Crop rotation and soil temperature influence the community structure of *Aspergillus flavus* in soil. *Soil Biology & Biochemistry*. 42, 1842-1847.
- [2] Thi, H.L., Hyuk, P., Ji, P.Y., Jae, W.O., Jae-Bok, H., Um, P.S., Woong, P.K., 2016. Allelopathy in *Sorghum bicolor* (L.) Moench: A review on environmentally friendly solution for weed control. *Research on Crops*. 16(4), 657-662.
- [3] Asaduzzaman, M., Luckett, D.J., Cowley, R.B., An, M., Pratley, J.E., Lemerle, D., 2014. Canola cultivar performance in weed-infested field plots confirms allelopathy ranking from *in vitro* testing. *Biocontrol Science and Technology*. 24(12), 1394-1411.
- [4] Cantrell, C.L., Dayan, F.E., Duke, S.O., 2012. Natural products as sources for new pesticides. *Journal of Natural Products*. 75, 1231-1242.
- [5] Khang, D.T., Anh, L.H., Ha, P., Tuyen, P., Quan, N., Minh, L., Quan, N., Minh, T., Xuan, T., Khanh, T., Trung, K. Allelopathic activity of dehulled rice and its allelochemicals on weed germination. *International Letters of Natural Sciences*. 58, 1-10.
- [6] Ransing, S.K., Patil, V.A., Suryavanshi, G.B., 1990. Allelopathic effect of different crop seeds on germination of pearl millet. *Annals of Plant Physiology*. 4(2), 240-242.
- [7] Fei, H., Chuihua, K., 2002. Allelopathic potentials of *Arachis hypogaea* on crops. *Journal of South China Agricultural University*. 23(1), 9-12.
- [8] Monteles, F., Melo, T.A., Lima Filho, F., Sousa, R., Silva, M., Serra, I., 2011. 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*). *Cadernos de Agroecologia*. 6, 1-5.
- [9] Chiapusio, G., Sánchez, A.M., Reigosa, M.J., González, L.E., Pellisier, F., 1997. Do germination indices adequately reflect allelochemical effects on the germination process? *Journal of Chemical Ecology*. 23(11), 2445-2453.
- [10] Fukuhara, K., Kubo, I., 1991. Isolation of steroidal glycoalkaloids from *Solanum incanum* by two countercurrent chromatographic methods. *Phytochemistry*. 30(2), 685-687.
- [11] Gao, X.K., Liu, G.J., Li, H.F., 2013. Study on allelopathic effects of *Arachis hypogaea* extracts on cucumber seeds. *Northern Horticulturae*. 9, 16-18.
- [12] Franco, D.M., Almeida, L.F., Poletto, R., 2014. Allelopathic potential of *Equisetum giganteum* L. and *Nephrolepis exaltata* L. on germination and growth of cucumber and lettuce. *Journal of Plant Sciences*. 2(5), 237-241.

- [13] Grisi, P., Gualtieri, S., Ranal, M.; Santana, D., 2013. Phytotoxic activity of crude aqueous extracts and fractions of young leaves of *Sapindus saponaria* L. (Sapindaceae). *Acta Botanica Brasilica*. 27(1), 62-70.
- [14] Fan, P., Hostettmann, K., Lou, H., 2010. Allelochemicals of the invasive neophyte *Polygonum cuspidatum* Sieb. & Zucc. (Polygonaceae). *Chemoecology*. 20, 223-227.
- [15] Othman, M.R., Leong, S.T., Bakar, B., Awang, K., Annuar, M.S.M., 2012. Allelopathic potentials of *Cuscuta campestris* Yuncker extracts on germination and growth of radish (*Raphanus sativus* L.) and lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Journal of Agricultural Science*. 4(9), 57-63.
- [16] Silva, R.M.G., Brigatti, J.G.F., Santos, V.H.M., Mecina, G.F., Silva, L.P., 2013. Allelopathic effect of the peel of coffee fruit. *Scientia Horticulturae*. 158, 39-44.
- [17] Baratelli, T.G., Gomes, A., Wessjohann, L., Kuster, R., Simas, N., 2012. Phytochemical and allelopathic studies of *Terminalia catappa* L. (Combretaceae). *Biochemical Systematics and Ecology*. 41, 119-125.
- [18] Ladhari, A., Omezzine, F., Dellagrecia, M., Zarrelli, A., Zuppolini, S., Haouala, R., 2013. Phytotoxic activity of *Cleome arabica* L. and its principal discovered active compounds. *South African Journal of Botany*. 88, 341-351.