



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

Isabela Brandão de Sousa

**Cultura de tecidos, análise fitoquímica e determinação da  
atividade antioxidante de extratos de sementes, plantas *in vivo*  
e materiais obtidos *in vitro* de *Arachis pintoi* Krapov. & W.C.  
Greg.**

Rio de Janeiro

2015

Isabela Brandão de Sousa

**Cultura de tecidos, análise fitoquímica e determinação da atividade antioxidante de extratos de sementes, plantas *in vivo* e materiais obtidos *in vitro* de *Arachis pintoi* Krapov. & W.C. Greg.**



Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: conservação e utilização da biodiversidade.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Elisabeth Atalla Mansur de Oliveira  
Co-orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Georgia Pacheco Peters de Almeida

Rio de Janeiro

2015

CATALOGAÇÃO NA FONTE

UERJ / REDE SIRIUS / BIBLIOTECA CTC-A

S725 Sousa, Isabela Brandão de.  
Cultura de tecidos, análise fitoquímica e determinação da atividade antioxidante de extratos de sementes, plantas *in vivo* e materiais obtidos *in vitro* de *Arachis pinto* Krapov. & W.C. Greg / Sousa, Isabela Brandão de Sousa. - 2015.

135f.: il.

Orientadora: Elisabeth Atalla Mansur de Oliveira.

Coorientadora: Georgia Pacheco Peters de Almeida

Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) – Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Inclui bibliografia.

1. Amendoim - Teses. 2. Amendoim - Propagação-in-vitro - Teses. 3. Amendoim - Morfogênese - 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 582.739

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

---

Assinatura

---

Data

Isabela Brandão de Sousa

**Cultura de tecidos, análise fitoquímica e determinação da atividade antioxidante de extratos de sementes, plantas *in vivo* e materiais obtidos *in vitro* de *Arachis pintoi* Krapov. & W.C. Greg.**

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração de conservação e utilização da biodiversidade.

Aprovada em 07 de maio de 2015.

Banca Examinadora:

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Elisabeth Atalla Mansur de Oliveira (Orientadora)  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Georgia Pacheco Peters de Almeida (Coorientadora)  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Katia Costa de Carvalho Sabino  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Nina Claudia Barboza da Silva  
Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Claudia Simões Gurgel  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Rio de Janeiro

2015

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha família, amigos e professores.

## AGRADECIMENTOS

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

À CAPES, à FAPERJ e ao CNPq pelo suporte financeiro.

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

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

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

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

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

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

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

À Eliane Rego e toda a sua equipe do INMETRO, por fornecer o equipamento para as análises por CLAE, pela gentileza e pela disponibilidade.

Aos professores Davyson Moreira e Katia Sabino pela colaboração iniciada, dando continuidade a este trabalho no projeto de doutorado, nas áreas de fitoquímica e antitumoral. Que seja uma parceria bastante frutuosa.

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

A todos os meus amigos e colegas do LABMIT que compartilharam muitos momentos bons e ruins, me apoiaram e me chamaram a atenção, sem os quais a vida no laboratório não teria graça. Em especial aos “da minha leva” Liane Peixoto, Jamine Pettinelli, Bianka Oliveira, Gabriel Casimiro, Mariana Pimenta, Nathália Miguel, Nathália Falsia, Raphaela Reis, e às minhas madrinhas de casamento Mariela Simão, Ana Pinheiro e Marcela Gomes. Obrigada por tudo!

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

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

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

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

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

Que mesmo em face do maior encanto  
Dele se encante mais meu pensamento.

*Vinícius de Moraes*

## RESUMO

SOUSA, I. B. *Cultura de tecidos e análises fitoquímica e antioxidante de extratos de sementes, plantas in vivo e materiais obtidos in vitro de Arachis pintoi Krapov. & W.C. Greg.* 2015. 135 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015.

O amendoim forrageiro (*Arachis pintoi* Krapov. & W.C. Greg) é uma espécie herbácea perene, originária do Brasil, utilizada como forragem e cobertura viva para controle de erosão e recuperação de áreas degradadas. Apesar da existência de diversos trabalhos que demonstram a presença de metabólitos de interesse em *A. hypogaea*, o amendoim utilizado para consumo humano, estudos sobre a fitoquímica e atividades biológicas ainda são escassos para as demais espécies do gênero. O objetivo deste trabalho foi estabelecer sistemas de cultura de tecidos com o uso diferentes tipos e concentrações de fitorreguladores para *A. pintoi* cv. Amarillo MG-100, realizando também análises fitoquímicas e avaliação de sua atividade antioxidante. Explantes de cotilédones, eixos e folíolos embrionários provenientes de sementes, e segmentos foliares, nodais e internodais de plantas cultivadas *in vitro* apresentaram desenvolvimento de calos mistos ou friáveis em resposta a combinações de BAP e ANA, e calos mucilaginosos em resposta a PIC. A formação de brotos foi obtida a partir de todos os explantes, exceto folíolos embrionários e de plantas *in vitro*, em resposta a 2,4-D, TDZ ou combinações de BAP e ANA. O desenvolvimento de raízes adventícias foi observado a partir de cotilédones, em resposta a AIA, AIB e combinações de BAP a 0,44  $\mu\text{M}$  e ANA em diferentes concentrações. A multiplicação de raízes foi estudada em diferentes tipos de sistemas, sendo mais eficiente em meio líquido sob agitação e suplementado com AIB, assim como em meio líquido suplementado com AIB ou ANA utilizando ponte de papel. A análise fitoquímica dos extratos das raízes induzidas em ANA a 54  $\mu\text{M}$ , AIA a 57  $\mu\text{M}$  e AIB a 14,7  $\mu\text{M}$ , além de sementes, cotilédones e órgãos de plantas cultivadas *in vivo* e *in vitro* (caules, raízes e folhas) foi realizada através de CCD e CLAE. Pela técnica de CCD, foram observadas bandas em condições específicas para saponinas e triterpenos, além de uma grande variedade de substâncias fenólicas. Na análise por CLAE, foram detectados 49 sinais, incluindo o do resveratrol, encontrado em todos os extratos. A atividade antioxidante foi determinada pelo ensaio do DPPH e revelou um grande potencial antioxidante de extratos de folhas de plantas cultivadas *in vivo*, que apresentaram  $\text{EC}_{50}$  de 0,91 mg de extrato bruto/mL, o que corresponde a 0,2 mg de equivalentes de quercetina. Os resultados mostraram que a espécie *A. pintoi* pode ser uma nova fonte de substâncias fenólicas com atividade medicinal, como o resveratrol. Através da cultura de tecidos, diferentes tipos de materiais foram produzidos e ainda precisam ser avaliados quanto à produção de substâncias fenólicas ou de outros grupos de interesse.

Palavras-chave: Amendoim forrageiro. Calogênese. Cultura de raízes. Cromatografia. Resveratrol.

## ABSTRACT

SOUSA, I. B. *Tissue culture, phytochemical analysis and determination of antioxidant activity of extracts from seeds, in vivo grown plants and in vitro materials of Arachis pintoi Krapov. & W.C. Greg.* 2015. 135f. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015.

Pinto peanut (*Arachis pintoi* Krapov. & W.C. Greg) is a herbaceous perennial species native from Brazil, used as forage and plant cover for the control of erosion and recovery of degraded areas. Although several studies with *A. hypogaea* (groundnut) have revealed the presence of metabolites of interest, studies on phytochemistry and biological activities for other species of the genus are still limited. The goal of this study was to establish tissue culture systems for *A. pintoi* cv. Amarillo MG-100, using different types and concentrations of plant growth regulators, to perform phytochemical analysis and to determine the potential antioxidant activity of different extracts. Cotyledons, embryonic axes and leaflets explants from seeds, as well as leaflets, nodal and internodal segments from *in vitro* growth plants formed mixed and friable calluses in response to combinations of BA and NAA, and mucilaginous calluses in response to PIC. Shoot formation was obtained from all explants, except embryonic and *in vitro* grown plants leaflets, in response to 2,4-D, TDZ or BA and NAA combinations. Adventitious roots development was obtained from cotyledons in response to IAA, IBA and combinations of 0.44  $\mu$ M BA with NAA. Root cultures were established in different types of systems, and multiplication was obtained in liquid medium supplemented with IBA under agitation, as well as in liquid medium supplemented with IBA or NAA, using a bead system. Phytochemical analysis of extracts from roots formed in the presence of 54  $\mu$ M NAA, 57  $\mu$ M IAA and 14.7  $\mu$ M IBA, seeds, cotyledons, and organs of *in vivo* and *in vitro* plants (stems, roots and leaves) was performed by TLC and HPLC. Different constituents were observed in specific conditions for the detection of saponins and triterpenes by TLC, in addition to a great variety of phenolic compounds. HPLC analysis revealed 49 peaks, including resveratrol, which was found in all extracts. A strong antioxidant activity was found in extracts from leaves of *in vivo* grown plants (EC<sub>50</sub> = 0.91 mg of crude extract/ml of DPPH solution), corresponding to 0.2 mg of quercetin equivalents. *In vitro* studies will be continued in order to establish other callus cultures and to optimize the adventitious root cultures. Other chromatographic methods will be utilized to define the compounds detected by TLC and HPLC.

Keywords: Pinto peanut. Callogenesis. Adventitious root cultures. Chromatography. Resveratrol.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Colar com frutos de amendoim moldados em ouro e prata, encontrado na tumba do Lorde de Sipán, um importante sacerdote da cultura Moche, que viveu no Peru, século III ... 20
- Figura 2 - Morfologia de *Arachis pintoï* ..... 24
- Figura 3 - Fórmula estrutural do beta-sitosterol ..... 36
- Figura 4 - Fórmulas estruturais dos isômeros de resveratrol ..... 37
- Figura 5 - Curva padrão de atividade antioxidante da quercetina avaliada pelo método de captura do radical DPPH ..... 51
- Figura 6 - Calogênese a partir de explantes de sementes de *Arachis pintoï* após 60 dias de cultura ..... 54
- Figura 7 - Acúmulo de biomassa de calos obtidos a partir de cotilédones de *A. pintoï* cultivados em meio MS suplementado com diferentes combinações de BAP e ANA, após 60 dias de cultura na ausência de luz ..... 58
- Figura 8 - Acúmulo de biomassa de calos obtidos a partir de eixos embrionários de *A. pintoï* inoculados em meio MS suplementado com diferentes combinações de BAP e ANA, após 60 dias de cultura na ausência de luz ..... 59
- Figura 9 - Acúmulo de biomassa de calos a partir de folíolos embrionários de *A. pintoï* inoculados em meio MS suplementado com diferentes combinações de BAP e ANA, após 60 dias de cultura na ausência de luz ..... 59

Figura 10 - Rizogênese em <i>Arachis pintoi</i> a partir de explantes de cotilédones cultivados na ausência de luz .....	64
Figura 11 - Rizogênese em <i>Arachis pintoi</i> a partir de cotilédones cultivados na ausência de luz, em meio suplementado com diferentes reguladores de crescimento .....	66
Figura 12 - Desenvolvimento de segmentos radiculares em diferentes sistemas em resposta a AIA e AIB .....	69
Figura 13 - Desenvolvimento de segmentos radiculares em diferentes sistemas em resposta a ANA isoladamente ou em combinação com BAP .....	70
Figura 14 - Calogênese a partir de explantes excisados de plantas <i>in vitro</i> de <i>A. pintoi</i> cultivados em meio MS suplementado com PIC a 4,14 $\mu$ M por 60 dias, na presença de luz .....	71
Figura 15 - Calogênese a partir de explantes de plantas <i>in vitro</i> de <i>A. pintoi</i> em resposta a 2,4-D na presença ou ausência de luz	73
Figura 16 - Calogênese a partir de explantes de plantas <i>in vitro</i> em resposta a TDZ, na presença (A, B e C) ou ausência (D, E e F) de luz .....	74
Figura 17 - Calogênese a partir de explantes de plantas <i>in vitro</i> em resposta a BAP a 2,2 $\mu$ M em combinação com ANA na presença de luz (A, B e C) ou ausência de luz (D, E e F) .....	75
Figura 18 - Desenvolvimento de plantas em meio suplementado com 2,4-D na presença de luz .....	77
Figura 19 - Cromatografia em camada delgada para detecção de triterpenos, utilizando como eluente uma mistura de acetato	

de etila, ácido acético glacial, ácido fórmico e água (50:5,5:5,5:13) e revelador anisaldeído sulfúrico, registrada em luz visível .....	80
Figura 20 - Cromatografia em camada delgada para detecção de triterpenos, utilizando como eluente uma mistura de acetato de etila, ácido acético glacial, ácido fórmico e água (50:5,5:5,5:13) e revelador anisaldeído sulfúrico, registrada em luz visível (A) e a 365 nm (B) .....	81
Figura 21 - Cromatografia em camada delgada para detecção de saponinas, utilizando como eluente clorofórmio, ácido acético glacial, metanol e água (32:16:6:4) e revelador anisaldeído sulfúrico, registrada em luz visível .....	82
Figura 22 - Cromatografia em camada delgada para detecção de saponinas, utilizando como eluente clorofórmio, ácido acético glacial, metanol e água (32:16:6:4) e revelador anisaldeído sulfúrico, registrada em luz visível (A) e a 365 nm (B) .....	83
Figura 23 - Cromatografia em camada delgada para detecção de flavonoides, utilizando como eluente acetato de etila, ácido acético glacial, ácido fórmico e água (50:5,5:5,5:13) e revelador NP/PEG, registrada a 365 nm .....	84
Figura 24 - Cromatografia em camada delgada para detecção de estilbenoides, utilizando como eluente acetato de etila, clorofórmio, metanol e água (33:15:3:0,6) e revelador NP/PEG, registrada a 365 nm .....	85
Figura 25 - Cromatografia em camada delgada para detecção de substâncias fenólicas (Condição 3), utilizando como eluente acetato de etila, ácido acético glacial e água (34:2:4) e	

revelador NP/PEG, registrada a 365 nm .....	86
Figura 26 - Cromatografia em camada delgada para detecção de substâncias fenólicas (Condição 5), utilizando como eluente acetato de etila, ácido acético glacial, ácido fórmico e água (51:6:1:7) e revelador NP/PEG, registrada a 365 nm .....	87
Figura 27 - Cromatogramas obtidos por CLAE .....	88
Figura 28 - Cromatografia em camada delgada para detecção de flavonoides, utilizando como eluente acetato de etila, ác. acético glacial, ácido fórmico e água (50:5,5:5,5:13) e revelador DPPH, registrada em luz visível .....	94
Figura 29 - Cromatografia em camada delgada para detecção de estilbenoides, utilizando como eluente acetato de etila, clorofórmio, metanol e água (33:15:3:0,6) e revelador DPPH, registrada em luz visível .....	95
Figura 30 - Cromatografia em camada delgada para detecção de substâncias fenólicas (Condição 3), utilizando como eluente acetato de etila, ácido acético glacial e água (34:2:4) e revelador DPPH, registrada em luz visível .....	96
Figura 31 - Cromatografia em camada delgada para detecção de substâncias fenólicas (Condição 5), utilizando como eluente acetato de etila, ácido acético glacial, ácido fórmico e água (51:6:1:7) e revelador DPPH, registrada em luz visível .....	97
Figura 32 - Cromatograma de extrato de cotilédone (amostra I) obtido por CLAE, contendo resveratrol (R) .....	129
Figura 33 - Cromatograma de extrato de semente com tegumento (amostra II) obtido por CLAE, contendo resveratrol (R) .....	129

Figura 34 - Cromatograma de extrato de semente sem tegumento (amostra III) obtido por CLAE, contendo resveratrol (R) .....	130
Figura 35 - Cromatograma de extrato de folhas de plantas obtidas <i>in vitro</i> (amostra IV) obtido por CLAE, contendo resveratrol (R) .....	130
Figura 36 - Cromatograma de extrato de raízes de plantas obtidas <i>in vitro</i> (amostra V) obtido por CLAE, contendo resveratrol (R) .....	131
Figura 37 - Cromatograma de extrato de caules de plantas obtidas <i>in vitro</i> (amostra VI) obtido por CLAE, contendo resveratrol (R) .....	131
Figura 38 - Cromatograma de extrato de folhas de plantas mantidas <i>in vivo</i> (amostra VII) obtido por CLAE, contendo resveratrol (R) .....	132
Figura 39 - Cromatograma de extrato de raízes de plantas mantidas <i>in vivo</i> (amostra VIII) obtido por CLAE, contendo resveratrol (R) .....	132
Figura 40 - Cromatograma de extrato de caules de plantas mantidas <i>in vivo</i> (amostra IX) obtido por CLAE, contendo resveratrol (R) .....	133
Figura 41 - Cromatograma de extrato de raízes induzidas em resposta a ANA (amostra X) obtido por CLAE, contendo resveratrol (R) .....	133
Figura 42 - Cromatograma de extrato de raízes induzidas em resposta a AIA (amostra XI) obtido por CLAE, contendo resveratrol (R) .....	134
Figura 43 - Cromatograma de extrato de raízes induzidas em resposta a AIB (amostra XII) obtido por CLAE, contendo resveratrol (R) .....	134

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Atividades biológicas já descritas no gênero <i>Arachis</i> .....	32
Quadro 2 - Condições utilizadas nas cromatografias em camada delgada .....	48
Quadro 3 - Extratos em etanol 80 % preparados a partir de diferentes materiais para a análise fitoquímica, através de CCD e CLAE, e do potencial antioxidante, pelo ensaio do DPPH ....	79

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Calogênese a partir de explantes de sementes de *Arachis pinto*i cultivados em meio MS suplementado com diferentes concentrações de PIC, 2,4-D ou TDZ por 60 dias, na presença ou ausência de luz ..... 55
- Tabela 2 - Calogênese a partir de explantes de sementes de *Arachis pinto*i cultivados em meio MS suplementado com diferentes combinações de BAP e ANA por 60 dias, na presença ou ausência de luz ..... 56
- Tabela 3 - Regeneração de plantas a partir de explantes de sementes de *A. pinto*i cultivados em meio MS suplementado com diferentes concentrações de 2,4-D e TDZ por 60 dias, na presença ou ausência de luz ..... 61
- Tabela 4 - Regeneração de plantas a partir de explantes de sementes de *A. pinto*i cultivados em meio MS suplementado com diferentes combinações de BAP e ANA por 60 dias, na presença ou ausência de luz ..... 62
- Tabela 5 - Rizogênese a partir de explantes de sementes de *A. pinto*i cultivados em meio MS suplementado com diferentes concentrações de 2,4-D por 60 dias, na presença ou ausência de luz ..... 63
- Tabela 6 - Rizogênese a partir de explantes de sementes de *A. pinto*i cultivados em meio MS suplementado com diferentes combinações de BAP e ANA por 60 dias, na presença ou ausência de luz ..... 65

Tabela 7 - Rizogênese a partir de cotilédones de <i>A. pintoï</i> cultivados em meio MS suplementado com diferentes tipos e concentrações de auxinas por 60 dias, na ausência de luz .	67
Tabela 8 - Rizogênese a partir de cotilédones de <i>A. pintoï</i> cultivados em meio MS suplementado com diferentes combinações de BAP e ANA por 60 dias, na ausência de luz .....	67
Tabela 9 - Calogênese a partir de explantes excisados de plantas <i>in vitro</i> de <i>A. pintoï</i> cultivados em meio MS suplementado com diferentes concentrações de PIC ou 2,4-D por 60 dias, na presença ou ausência de luz .....	72
Tabela 10 - Calogênese a partir de explantes excisados de plantas <i>in vitro</i> de <i>A. pintoï</i> cultivados em meio MS suplementado com diferentes combinações de BAP e ANA por 60 dias, na presença ou ausência de luz .....	76
Tabela 11 - Regeneração de plantas a partir de explantes excisados de plantas <i>in vitro</i> de <i>A. pintoï</i> cultivados em meio MS suplementado com 2,4-D ou TDZ ou combinações de BAP e ANA por 60 dias, na presença de luz .....	78
Tabela 12 - Análise fitoquímica de diferentes extratos por cromatografia líquida de alta eficiência .....	90
Tabela 13 - Potencial antioxidante de diferentes amostras de <i>A. pintoï</i> ..	93

## SUMÁRIO

	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	19
1	<b>GÊNERO <i>ARACHIS</i></b> .....	19
2	<b><i>ARACHIS PINTOI</i></b> .....	23
2.1	<b>Características e aplicações</b> .....	23
2.2	<b>Histórico e distribuição geográfica</b> .....	25
3	<b>PRODUÇÃO DE METABÓLITOS ESPECIAIS EM PLANTAS</b> ...	29
3.1	<b>Metabólitos especiais</b> .....	29
3.2	<b>Metabólitos especiais em <i>Arachis</i></b> .....	30
3.2.1	<u>Fitoesteróis em <i>Arachis</i></u> .....	34
3.2.2	<u>Substâncias fenólicas em <i>Arachis</i></u> .....	36
4	<b>PRODUÇÃO DE METABÓLITOS <i>IN VITRO</i></b> .....	38
4.1	<b>Cultura de tecidos vegetais</b> .....	38
4.2	<b>Sistemas de produção de metabólitos <i>in vitro</i></b> .....	40
4.3	<b>Sistemas de produção de metabólitos <i>in vitro</i> em <i>Arachis</i></b> ...	41
5	<b>OBJETIVOS</b> .....	43
5.1	<b>Objetivo geral</b> .....	43
5.2	<b>Objetivos específicos</b> .....	43
6	<b>METODOLOGIA</b> .....	44
6.1	<b>Material vegetal</b> .....	44
6.2	<b>Meios e condições de cultura</b> .....	44
6.3	<b>Cultura de tecidos</b> .....	45
6.3.1	<u>Indução de morfogênese a partir de explantes de sementes e de plantas <i>in vitro</i></u> .....	45
6.3.2	<u>Estabelecimento de cultura de raízes</u> .....	46
6.4	<b>Avaliação Fitoquímica</b> .....	47
6.4.1	<u>Preparo de extratos</u> .....	47
6.4.2	<u>Cromatografia em camada delgada (CCD)</u> .....	47
6.4.3	<u>Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)</u> .....	49
6.5	<b>Avaliação da atividade antioxidante</b> .....	49
6.5.1	<u>Ensaio DPPH</u> .....	49
6.5.2	<u>Ensaio CCD-DPPH</u> .....	51

6.6	<b>Análise Estatística</b> .....	51
7	<b>RESULTADOS</b> .....	52
7.1	<b>Cultura de Tecidos</b> .....	52
7.1.1	<u>Morfogênese a partir de explantes de sementes</u> .....	52
7.1.1.1	Calogênese .....	52
7.1.1.2	Formação de brotos .....	60
7.1.1.3	Cultura de raízes .....	63
7.1.2	<u>Morfogênese a partir de explantes de plantas <i>in vitro</i></u> .....	71
7.1.2.1	Calogênese .....	71
7.1.2.2	Produção de plantas .....	77
7.2	<b>Avaliação fitoquímica</b> .....	79
7.2.1	<u>Perfil fitoquímico por cromatografia em camada delgada (CCD)</u> .	79
7.2.2	<u>Perfil fitoquímico por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência</u> ....	87
7.3	<b>Avaliação da atividade antioxidante</b> .....	92
7.3.1	<u>Ensaio DPPH</u> .....	92
7.3.2	<u>CCD-DPPH</u> .....	93
8	<b>DISCUSSÃO</b> .....	98
	<b>CONCLUSÕES</b> .....	110
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	111
	<b>APÊNDICE</b> .....	129

## INTRODUÇÃO

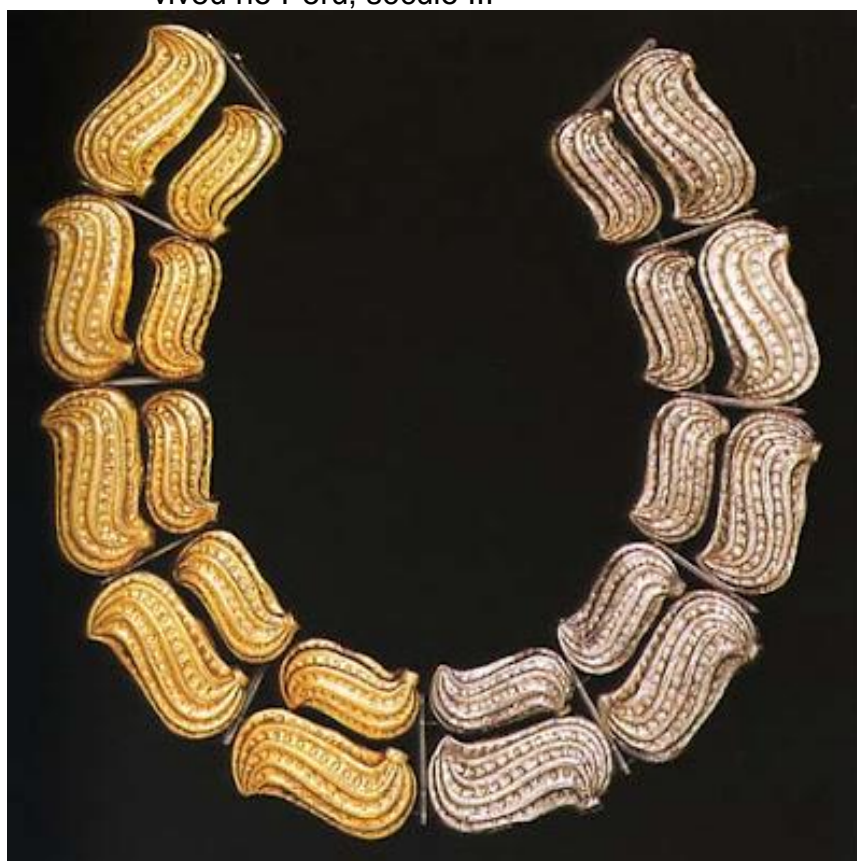
### 1. GÊNERO *ARACHIS*

O gênero *Arachis* pertence à família Fabaceae e possui, atualmente, 81 espécies descritas (KRAPOVICKAS; GREGORY, 2007; VALLS; SIMPSON, 2005; VALLS; COSTA; CUSTÓDIO, 2013). A primeira descrição taxonômica foi feita por Linnaeus (1753) para *Arachis hypogaea* L., o amendoim utilizado para consumo humano. As primeiras espécies silvestres foram descritas por Bentham (1841) e outras estão sendo incluídas até o presente (VALLS; COSTA; CUSTÓDIO, 2013). O gênero é subdividido em nove Secções: *Arachis*, *Trirectoides*, *Erectoides*, *Procumbentes*, *Rhizomatozae*, *Caulorrhizae*, *Extranervosae*, *Triseminatae* e *Heteranthae*, que agrupam as espécies segundo suas características morfológicas, filogenéticas e compatibilidade de cruzamento (APGIII, 2009; KRAPOVICKAS; GREGORY, 2007; VALLS; SIMPSON, 1994; VALLS; SIMPSON, 2005). A maioria das espécies de *Arachis* tem sua área de distribuição limitada a Argentina, Bolívia, Brasil, Paraguai e Uruguai (KRAPOVICKAS; GREGORY, 2007). Acredita-se que o gênero seja originário do Brasil, onde são encontrados representantes de todas as Secções, sendo mais da metade das espécies endêmicas (KRAPOVICKAS; GREGORY, 2007; VALLS; SILVA; MONÇATO, 2000).

*Arachis hypogaea* (Secção *Arachis*) é cultivado há milhares de anos, já tendo sido encontradas sementes em registros arqueológicos realizados no Peru, datados de 7.840 anos (DILLEHAY *et al.*, 2007). Acredita-se que sua presença seja decorrente de ação antrópica, visto que não há nenhuma evidência de ocorrência natural de espécies de *Arachis* na vertente oeste dos Andes. A importância do amendoim para os povos pré-históricos da América do Sul tornou-se evidente para os pesquisadores após os achados da cultura Moche, que viveu na costa do Peru entre os Séculos I e XVII, dentre os quais um colar com frutos de amendoim moldados em ouro e prata (Figura 1) encontrado na tumba de um importante sacerdote, que remonta do Século III (FREITAS; PEÑALOZA; VALLS, 2003).

Atualmente, a utilização de *A. hypogaea* é bastante difundida em diversos países. Por outro lado, *Arachis villosulicarpa* Hoehne, cultivada pelos índios Nambicuara na Chapada dos Percis no Mato Grosso do Sul, apesar de ser considerada uma das mais primitivas da América (KRAPOVICKAS, 2010a), permaneceu restrita a essa região. Outras espécies do gênero, como *Arachis pintoii* Krapov. & W.C. Gregory, *Arachis repens* Handro e *Arachis glabrata* Benth. passaram a ser cultivadas em um período bem mais recente, em meados do século XX, e têm sido utilizadas em diversos países, principalmente como forrageiras e ornamentais.

Figura 1 – Colar com frutos de amendoim moldados em ouro e prata, encontrado na tumba do Lorde de Sipán, um importante sacerdote da cultura Moche, que viveu no Peru, século III



Fonte: Stone-Miller, 2002.

*Arachis hypogaea* é a espécie mais conhecida entre as cultivadas. Devido ao seu uso para alimentação humana, representa a quarta oleaginosa de maior importância econômica no mundo (SILVA *et al.*, 2010), sendo cultivada em mais de 100 países (HUANG *et al.*, 2012), com uma produção anual de 41,2 milhões de toneladas (FAO, 2012). Suas sementes apresentam grande valor nutritivo, sendo constituídas por cerca de 50 % de óleo e 25 % de proteína, o que as torna um importante alimento para seres humanos e animais. O amendoim pode ser utilizado *in natura* ou em derivados, sendo importante ainda para produção de óleo, que é utilizado na culinária de diversos países.

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

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

O uso consorciado de forrageiras e gramíneas tem como objetivo antecipar e aumentar o período de utilização das pastagens (LUDWIG *et al.*, 2010), ao

mesmo tempo reduzindo o desmatamento de novas áreas para essa finalidade (CHEN *et al.*, 2003), e promovendo ainda um aumento na disponibilidade de proteína bruta na dieta animal. Através dessa técnica, alguns produtores obtiveram um aumento de 40 % no peso vivo do gado e de 20 % na produção de leite (LASCANO; ÁVILA, 1991). A consorciação tem sido principalmente estudada com o uso de *A. repens*, *A. pintoi* e *A. glabrata* (SIMPSON; VALLS; MILES, 1994; VALLS; SIMPSON, 1994) com espécies de *Brachiaria* e *Cynodon* (ARGEL; PIZARRO, 1992; BARCELLOS *et al.*, 2000; FELTRE, 2013).

*Arachis glabrata* (Secção *Rhizomatosae*) ocorre no Brasil, Argentina e Paraguai, tendo sido coletada por W. Andrew Archer e A. Gehrtem, da *United States Department of Agriculture* (USDA), em Campo Grande (Mato Grosso do Sul, Brasil) e Posadas (Misiones, Argentina) em 1936, e introduzida na Flórida, onde passou a ser cultivada como forrageira. A espécie possui duas variedades, *Glabrata* e *Hagenbeckii* e é utilizada também na cobertura de solos. Suas folhas são altamente nutritivas e apresenta persistência em longo prazo sob diversos sistemas de pastejo (MAAS; ANDERSON; QUESENBERRY, 2010). A propagação da espécie é principalmente vegetativa, com produção reduzida de sementes (WILLIAMS *et al.*, 2008).

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

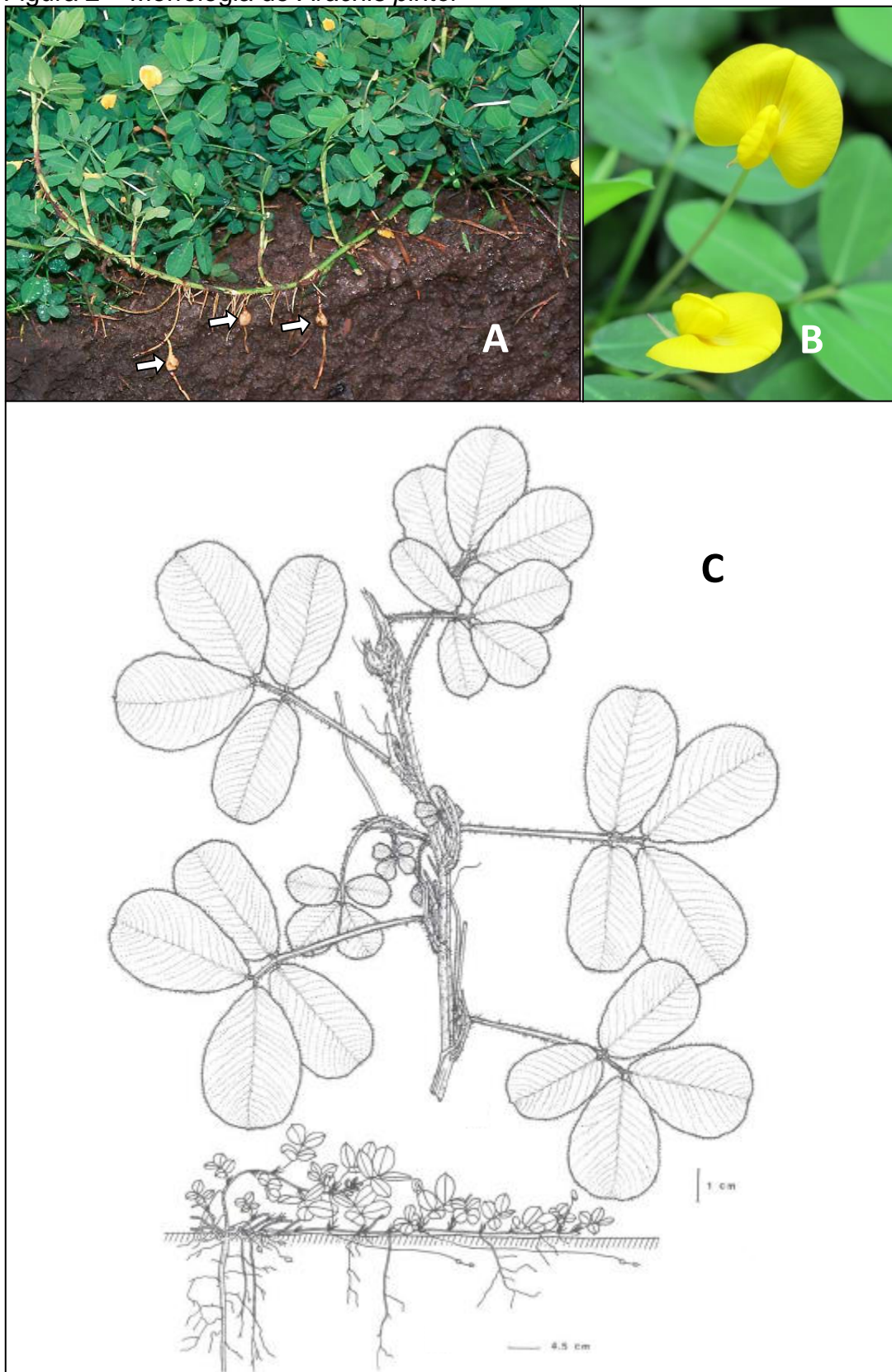
## 2. *ARACHIS PINTOI* KRAPOV. & W. C. GREG.

### 2.1. Características e aplicações

*Arachis pintoii*, conhecido como amendoim forrageiro, é uma espécie herbácea perene com hábito estolonífero (Figura 2a) e um sistema de raízes pivotantes. Suas inflorescências apresentam coloração amarelada (Figura 2b) e as folhas são tetrafoliadas (Figura 2c), formadas por folíolos com formato oboval (KRAPOVICKAS; GREGORY, 2007). Seu genoma é diploide ( $2n = 20$ ), assim como a maioria das espécies do gênero e diferentemente de *A. hypogaea* que é tetraploide ( $4n = 40$ ). Há ainda um acesso que apresenta citotipo triploide ( $3n = 30$ ) (PEÑALOZA; POZZOBON; VALLS, 1996).

Essa espécie tem assumido importância crescente na produção de forragem em áreas tropicais e subtropicais, devido à sua alta qualidade nutritiva (KHAMSEEKHIEW *et al.*, 2002; LADEIRA *et al.*, 2002), com elevados teores de proteína bruta associados a uma boa digestibilidade e excelente palatabilidade. Além disso, apresenta grande número de sementes em frutos subterrâneos (Figura 2a), com alta taxa de sobrevivência (FISHER; CRUZ, 1994; MONTENEGRO; PINZÓN, 1997) e capacidade de manter uma área foliar residual satisfatória, mesmo quando submetida a um pastejo contínuo e intenso (CARVALHO; PIRES, 2008). Possui tolerância ao sombreamento e boa adaptação a solos ácidos e de baixa fertilidade, sendo também empregado na cobertura de solos, em sistemas agroflorestais e no controle de erosão em encostas (ANDRADE; VALENTIM, 1997; PERIN; GUERRA; TEIXEIRA, 2003).

Figura 2 – Morfologia de *Arachis pintoii*



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

Fontes: [http://az.wikipedia.org/wiki/Arachis\\_pintoii](http://az.wikipedia.org/wiki/Arachis_pintoii),  
[http://www.tropicalforages.info/key/Forages/Media/Html/Arachis\\_pintoii.htm](http://www.tropicalforages.info/key/Forages/Media/Html/Arachis_pintoii.htm),  
 Krapovickas & Gregory, 2007.

A espécie é também usada na recuperação de áreas degradadas (OLIVEIRA *et al.*, 2002), como pastagens deterioradas e solos empobrecidos pela monocultura, já que seu cultivo, associado à presença de microorganismos como fungos, bactérias, actinomicetos e rizóbios (WARDLE; GILLER; BARKER, 1999), promove a aceleração das taxas de decomposição e liberação dos nutrientes da matéria orgânica e a agregação do solo, além do acúmulo de nitrogênio e fósforo orgânico nas camadas superficiais do solo (MIRANDA; SAGGIN JÚNIOR; SILVA, 2008). A cobertura do solo com *A. pintoii* em sistema de plantio direto pode reduzir os custos de produção de milho, sendo equivalente à adubação com 80 kg/ha de nitrogênio (PURCINO *et al.*, 2004). Como cobertura viva, é estimado que a utilização da espécie proporcionaria redução ou eliminação da adubação nitrogenada com fertilizantes sintéticos em culturas de fruteiras (PERIN; GUERRA; TEIXEIRA, 2003). Além disso, devido à sua boa resistência ao fogo, é utilizado também como cerca viva ao redor de culturas perenes como prevenção contra queimadas acidentais (VALENTIM; CARNEIRO; SALES, 2001).

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

## 2.2. Histórico e distribuição geográfica

A distribuição geográfica natural de *A. pintoii* compreende os estados de Goiás, Bahia e Minas Gerais, estendendo-se por toda a costa Atlântica no Brasil (CARVALHO, 2004). A primeira coleta da espécie foi realizada em 1954, pelo professor Geraldo C. Pinto, na foz do rio Jequitinhonha, na localidade de Boca do Córrego, no município de Belmonte, no Estado da Bahia, como um único acesso identificado inicialmente como GK 12787 e armazenado no banco de

germoplasma da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia como BRA-013251 (PAGANELLA; VALLS, 2002; PEREIRA; RESENDE; SANTANA, 1999). Essa coleta foi resultado de um trabalho espontâneo de alguns agrônomos brasileiros que realizaram várias expedições a diferentes regiões do Brasil a partir de 1930, com o objetivo de coletar germoplasma de espécies que apresentassem potencial forrageiro.

A partir do primeiro acesso, a espécie foi posteriormente introduzida em diversos países, onde foram desenvolvidas diferentes cultivares. Na Austrália, o acesso deu origem à cultivar Amarillo, em 1990, após sua introdução em 1987, onde adquiriu reconhecimento comercial. Em 1992, originou a cultivar Maní Forrageiro Perene (Colômbia) e, em 1994, as cultivares Pico Bonito (Honduras) e Maní Mejorador (Costa Rica). No Brasil, o grupo Sementes Matsuda, em São Paulo, desenvolveu a cultivar Amarillo MG-100, lançada em 1995, que é considerada a mais difundida no país (SILVA, 2004; NASCIMENTO, 2006).

Outras cultivares (Maní Forrageiro e Porvenir) foram desenvolvidas a partir do acesso CIAT 18744, fornecido pela Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia a partir do BRA-012122, coletado pelos pesquisadores J. Valls e W. Werneck em Minas Gerais, no Panamá e na Costa Rica, pela fazenda El Porvenir da Cooperativa Agroindustrial Coopeagre, no ano de 1981. Além disso, um clone triploide foi identificado no cultivo de Maní Forrageiro Perenne na Costa Rica, armazenado no Brasil como o acesso BRA-031895 (LAVIA *et al.*, 2011; PEÑALOZA; POZZOBON; VALLS, 1996).

Atualmente, além da cultivar Amarillo MG-100, três novas cultivares (Alqueire-1, Belmonte e BRS Mandobi) foram lançadas no Brasil e estão inscritas no Registro Nacional de Cultivares do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (RNC-MAPA). A Alqueire-1 foi desenvolvida em 1998, no município de Rio Pardo no Rio Grande do Sul, pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), a partir de diferentes acessos fornecidos pela EMBRAPA, sendo utilizada em grande escala pelos produtores do Sul do país, devido à alta tolerância ao frio (PEREZ, 2001).

A cultivar Belmonte foi desenvolvida a partir do acesso registrado na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia como BRA-0311828 e introduzida na sede da Superintendência da Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira (CEPLAC), em Ilhéus, no Estado da Bahia, em 1999. Embora tenha

baixa produção de sementes, possui grande adaptação às condições do sul da Bahia, que apresenta pluviosidade anual entre 1.200 e 1.400 mm e solos ácidos, de baixa e média fertilidade, demonstrando boa adaptação a solos de textura franca e tolerância mediana a encharcamentos, sendo altamente produtiva, com grande resistência a pragas e doenças (BARCELLOS *et al.*, 2008; PEREIRA; RESENDE; SANTANA, 1999).

A cultivar BRS Mandobi, registrada em 2008, foi desenvolvida pela EMBRAPA Acre a partir de seleção massal. Tem como características grande produção de sementes, embora apresente altas porcentagens de dormência associada ao tegumento (ASSIS, 2011), ampla faixa de adaptação, desde o nível do mar até 1.800 m de altitude e sobrevive a períodos de seca superiores a quatro meses e a geadas em regiões subtropicais (CARVALHO; QUESENBERRY; GALLO, 2010).

Algumas cultivares de *A. pinto* têm sido bastante estudadas quanto ao seu potencial agrônomo, sendo seu cultivo implementado em diferentes regiões. A cultivar Belmonte, inicialmente reconhecida como *A. repens*, foi reidentificada como *A. pinto* (PEREIRA; REZENDE; MORENO-RUIZ, 2004). Após seu lançamento, ainda permaneceu pouco difundida, sendo cultivada em cerca de 300 ha por produtores locais em Itabela, na Bahia. Somente após a divulgação da cultivar por uma reportagem sobre *Arachis* no programa de TV Globo Rural em 2003, reapresentada em 2004, produtores de vários Estados do Brasil, incluindo São Paulo, Minas Gerais e Bahia, começaram a solicitar o material para plantio (PEREIRA; REZENDE; MORENO-RUIZ, 2004).

No Acre, a introdução da cultivar Belmonte foi um recurso bem sucedido para transformar os sistemas produtores convencionais, cujas áreas sofriam pastejo intenso e empobrecimento do solo. A adoção do sistema de plantio consorciado entre *A. pinto* e diferentes gramíneas resultou no desenvolvimento de sistemas agropecuários com alta produtividade e rentabilidade, com redução da utilização de fertilizantes químicos e pesticidas caros e altamente poluentes (VALENTIM; ASSIS; SÁ, 2009). Dessa maneira, através de um programa de pesquisa e desenvolvimento da EMBRAPA Acre, que já havia introduzido com sucesso outra leguminosa forrageira, *Pueraria phaseoloides* (Roxb.) Benth., com ganhos econômicos de US\$ 33 milhões anuais aos produtores (SHELTON; FRANZEL; PETERS, 2005; VALENTIM; ANDRADE, 2005a), o amendoim

forrageiro foi recomendado como alternativa para recuperação de pastagens que sofriam a síndrome da morte do capim-marandu (*Brachiaria brizantha* (Hochst.) Stapf. cv. Marandu).

Em 2004, mais de 1.000 pequenos, médios e grandes produtores possuíam pastagens consorciadas de diferentes espécies de gramíneas com amendoim forrageiro com renda anual de US\$ 4 milhões (ANDRADE; VALENTIM, 2007; SHELTON; FRANZEL; PETERS, 2005; VALENTIM; ANDRADE, 2005b). Em 2012, 137.000 ha estavam sendo cultivados, com benefícios a milhares de produtores e um impacto econômico anual de US\$ 46 milhões (EMBRAPA, 2008). Devido à sua alta capacidade de persistência, pastagens de diferentes gramíneas em consórcio com *A. pintoi* vêm sendo mantidas por muitos anos no Estado, sem perda da produtividade (PEREIRA, 2002; VALENTIM; ASSIS; SÁ, 2009).

Atualmente, a EMBRAPA Acre vem explorando o potencial forrageiro da cultivar BRS Mandobi, desenvolvida na região e adaptada às condições locais de pluviosidade e altitude. Embora seu uso seja recente, resultados positivos vem sendo observados, incluindo alto vigor, bom estabelecimento, boa tolerância a terrenos alagados, grande produção de matéria seca e sementes, que são vendidas a preços baixos no mercado (ASSIS; SILVA; AZEVEDO, 2013). O cultivo em consórcio da cultivar BRS Mandobi com capim-marandu (*B. brizantha* (Hochst.) Stapf. cv. Marandu) e *Pueraria phaseoloides* (Roxb.) Benth. tem sido realizado com sucesso, atingindo uma taxa de pastoreio de 2,5 animais por hectare, sem irrigação ou adubação nitrogenada. Além disso, apresenta boa persistência em sistemas de consórcio com *Cynodon nlemfuensis* Vanderyst, *Brachiaria brizantha* (Hochst.) Stapf. e *B. humidicola* (Rendle.) Schweickhardt. com intenso pastoreio (ASSIS; SILVA; AZEVEDO, 2013).

### 3. PRODUÇÃO DE METABÓLITOS ESPECIAIS EM PLANTAS

#### 3.1. Metabólitos especiais

A evolução das plantas está associada ao surgimento das vias bioquímicas dos metabólitos especiais, que contribuíram com o aumento na capacidade de sobrevivência e adaptação ao ambiente. Os metabólitos especiais são as substâncias produzidas pelo metabolismo secundário das plantas em resposta a diversos estímulos, atuando na proteção contra patógenos e estresses oxidativos, inibição da herbivoria, atividade alelopática, escassez de nutrientes, entre outros (FUMAGALI *et al.*, 2008). Estas substâncias são tão importantes para os vegetais que, frequentemente, a energia gasta para sua produção é maior que a investida no metabolismo primário, presente em todos os seres vivos (GERSHENZON, 1994; KENNEDY; WIGHTMAN, 2011). Uma grande diversidade destas substâncias é produzida pelas plantas, muitas delas podem ser exclusivas de uma espécie ou gênero (KENNEDY; WIGHTMAN, 2011). Algumas classes de substâncias, como terpenoides e flavonoides são amplamente encontrados nas diferentes espécies de vegetais, enquanto outros como os alcaloides e os glicosídeos cianogênicos são restritos a determinados táxons.

A síntese dos metabólitos especiais, conhecidos também como produtos naturais ou metabólitos secundários, tem como base algumas poucas vias biossintéticas e moléculas-chave do metabolismo primário, sendo a grande diversidade de moléculas observadas gerada por mecanismos em nível molecular e enzimático (TISSIER; ZIEGLER; VOGT, 2014). Dessa forma, a combinação entre diferentes mecanismos produz, em uma mesma planta, em diferentes órgãos ou tecidos, substâncias específicas para adaptação a cada tipo de estímulo. Atualmente, são conhecidas cerca de 200.000 substâncias oriundas do metabolismo secundário das plantas (TISSIER; ZIEGLER; VOGT, 2014). Muitas delas são importantes para a diferenciação taxonômica dos grupos vegetais.

Os produtos naturais recebem este nome devido à sua origem, diferenciando-os dos produtos sintéticos, e também às suas diferentes utilidades para uso humano, podendo constituir aromatizantes, corantes e aditivos

alimentares, pigmentos, pesticidas e medicamentos (HUSSAIN *et al.*, 2012). Por exemplo, ervas e temperos são ricos em metabólitos especiais, que estão incluídos na dieta humana. Estas substâncias podem ser divididos em três grandes grupos, os alcaloides, os terpenoides e os compostos fenólicos (HUSSAIN *et al.*, 2012). Neste último, destacam-se os flavonoides e ácidos fenólicos, que são considerados os grupos mais importantes de metabólitos secundários e substâncias bioativas em plantas (KIM; JEOND; LEE, 2003), por apresentarem diversas atividades biológicas no organismo humano e animal, podendo ser utilizados no combate a doenças.

### 3.2. Metabólitos especiais em *Arachis*

Com o crescimento e as novas descobertas da pesquisa sobre produtos naturais, muitas espécies vegetais têm ganhado destaque como potenciais produtoras de substâncias bioativas. Outras espécies, já utilizadas na medicina popular em diferentes países e culturas, têm sido também estudadas para identificação das substâncias responsáveis pelas suas atividades medicinais. O estudo das diversas atividades biológicas associadas a substâncias produzidas por plantas, incluindo a ampliação do conhecimento sobre sua via de produção e os estímulos que podem aumentá-la, assim como as vias pelas quais ocorrem os efeitos biológicos no organismo humano, tem sido fundamental para o desenvolvimento de novos fármacos.

O gênero *Arachis* também vem sendo estudado com esse enfoque, já tendo sido encontradas substâncias de diferentes grupos, incluindo ácidos fenólicos, fitoesteróis, triterpenos, flavonoides, estilbenos, alcaloides, ácidos graxos (LOPES *et al.*, 2011) e policosanóis (CHERIF *et al.*, 2010). Diferentes atividades biológicas já foram observadas em extratos de espécies de *Arachis*, incluindo atividades antioxidante, antiinflamatória, antitumoral, antifúngica, antibacteriana, amebicida, anti-helmíntica, hipoglicêmica e hipolipidêmica, antiplaquetária e inibição enzimática em infecção pelo vírus HIV, além de efeito sedativo e hipnótico (Quadro 1). No caso de *A. pintoii*, já foram observados o efeito alelopático de extratos foliares contra a germinação de sementes de

tomate, pimentão (MONTELES *et al.*, 2011), picão-preto (*Bidens pilosa* L.) e corda-de-viola (*Ipomoea triloba* L.) (CUNHA *et al.*, 2010), além de atividade anti-helmíntica contra *Haemonchus contortus* (FERNEX *et al.*, 2012).

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

<b>Espécie</b>	<b>Atividade</b>	<b>Material vegetal</b>	<b>Referência</b>
<i>A. hypogaea</i>	Amebicida contra <i>Acanthamoeba</i>	Extrato de cascas de vagens	El-Sayed <i>et al.</i> , 2000
	Antibacteriana	Extrato de folhas	Parekh; Chanda, 2008
	Antibacteriana e antifúngica	Proteína hipogina isolada de sementes	Wang <i>et al.</i> , 2007
	Antifúngica	Proteína hipogina isolada de sementes	Abdou, 1996
		Proteínas de raízes	Devi <i>et al.</i> , 2005
		Flavonoide isolado de cascas de vagens	Vaughn, 1995
	Anti-hipertensiva	Proteína araquina isolada de sementes	Jimsheena; Gowda, 2011
	Anti-inflamatória	Proantocianidinas isoladas do tegumento de sementes	Tatsuno <i>et al.</i> , 2012
		Estilbenoides isolados de sementes	Chang <i>et al.</i> , 2006; Djoko <i>et al.</i> , 2007
	Antioxidante	Extrato metanólico de brotos	Hsu <i>et al.</i> , 2002
		Compostos fenólicos isolados do exsudato de amendoins germinados	Lee <i>et al.</i> , 2007
		Fração solúvel em água de extrato de tegumentos	Monagas <i>et al.</i> , 2009
		Fração solúvel em água de extrato de sementes	Duncan <i>et al.</i> , 2006
		Compostos fenólicos extraídos de tegumentos	Sales; Resurreccion, 2010
		Proantocianidinas da fração solúvel em água de extrato de tegumentos	Lou <i>et al.</i> , 2004
		Estilbenoides de sementes	Chang <i>et al.</i> , 2006
		Extrato metanólico de cascas de vagens	Yen; Duh, 1995
		Diferentes extratos de plantas e sementes	Green, 2004
		Fração volátil de extrato de amendoim paquistanês	Abbasi <i>et al.</i> , 2009
		Sementes <i>in natura</i>	Emekli-Alturfan <i>et al.</i> , 2008; Nouran <i>et al.</i> , 2010
Antiplaquetária		Flavonoides isolados de cascas de vagens	Tsai <i>et al.</i> , 2003

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

<i>A. hypogaea</i>	Antitumoral contra cânceres de cólon, próstata e mama	Fitoesteróis de sementes	Awad <i>et al.</i> , 2000a; 2000b
	Antitumoral contra leucemia	Estilbenoides isolados de extrato metanólico de amendoins germinados	Huang <i>et al.</i> , 2010
	Hipocolesterolêmica	Sementes <i>in natura</i>	Lokko <i>et al.</i> , 2007; Emekli-Alturfan <i>et al.</i> , 2008; Sales <i>et al.</i> , 2008; Nouran <i>et al.</i> , 2010
		Sementes, óleo e farinha de amendoim livre de gordura	Stephens <i>et al.</i> , 2010
	Hipoglicêmica e hipolipidêmica	Extrato aquoso de sementes	Bilbis <i>et al.</i> , 2002
	Hipoglicêmica	Sementes <i>in natura</i>	Emekli-Alturfan <i>et al.</i> , 2008; Jenkins <i>et al.</i> , 2008
	Hipolipidêmica	Extrato etanólico de cascas de vagens	Moreno <i>et al.</i> , 2006
		Sementes <i>in natura</i>	Sales <i>et al.</i> , 2008
	Imunomodulatória	Estilbenoides de sementes	Djoko <i>et al.</i> , 2007
		Fitoesteróis de sementes	Bouic, 2001
	Inibição enzimática de proteases	Proteínas isoladas de sementes	Norioka <i>et al.</i> , 1982; Norioka; Ikenata, 1983a; 1983b
	Inibição enzimática em infecção pelo vírus HIV	Proteína hipogina isolada de sementes	Ye; Ng, 2001
	Sedativa e hipnótica	Extrato aquoso de folhas	Zu <i>et al.</i> , 2010
	Inibição da fertilidade de pulgão preto ( <i>Aphis craccivora</i> )	Tanino condensado procianidina isolado de extratos de pecíolos	Grayer <i>et al.</i> , 1992
	Inseticida contra <i>Callosobruchus</i>	Saponinas isoladas de extratos de sementes	Applebaum <i>et al.</i> , 1969; Boughdad <i>et al.</i> , 1987
<i>A. paraguariensis</i>	Inibição do desenvolvimento de larvas de <i>Spodoptera litura</i>	Derivados do ácido caféico e flavonoides isolados de extrato metanólico de folhas	Stevenson <i>et al.</i> , 1993
<i>A. pintoi</i>	Efeito alelopático	Extrato aquoso de folhas	Cunha <i>et al.</i> , 2010; Monteles <i>et al.</i> , 2011
	Anti-helmíntica contra <i>Haemonchus contortus</i>	Extrato de folhas	Fernex <i>et al.</i> , 2012

### 3.2.1. Fitoesteróis em *Arachis*

Uma grande diversidade de efeitos biológicos observados em extratos de *Arachis* podem ser atribuídos à presença de esteroides. Estas substâncias pertencem à classe dos terpenoides e também estão associadas ao metabolismo primário dos vegetais, estando presentes em todas as plantas e atuando na estabilidade da membrana fosfolipídica, como substâncias homólogas ao colesterol em animais (MOREAU; WHITAKER; HICKS, 2002). Os fitoesteróis também podem atuar como hormônios ou precursores hormonais em plantas (MATHUR, 2012). A biossíntese, a composição e a concentração dos diferentes tipos de fitoesteróis é regulada pelos níveis de hormônios vegetais e pelas condições ambientais (MATHUR, 2012; MOREAU; WHITAKER; HICKS, 2002; PAVLIK *et al.*, 2010). Este grupo de substâncias é encontrado em altas concentrações em sementes oleaginosas, grãos, legumes e óleos vegetais (ALISSA; FERNS, 2012), sendo os mais abundantes o sitosterol, o campesterol e o estigmasterol (MOREAU; WHITAKER; HICKS, 2002).

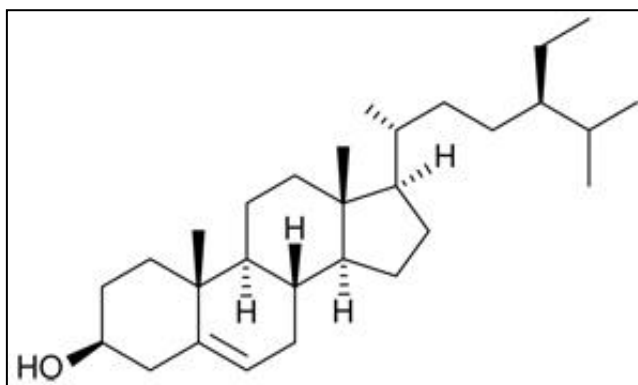
Estudos com alimentos nutracêuticos demonstraram que a ingestão de sitosterol inibe a absorção intestinal de colesterol (HICKS; MOREAU, 2001), previne doenças cardiovasculares (GENSER *et al.*, 2012) e reduz o risco de cânceres de pulmão (MENDILAHARSU *et al.*, 1998), mama (RONCO *et al.*, 1999), estômago (STEFANI *et al.*, 2000a), esôfago (STEFANI *et al.*, 2000b), próstata (WILT *et al.*, 2000), cólon e reto (NORMÉN *et al.*, 2001), endometrial (MCCANN *et al.*, 2000) e ovariano (MCCANN *et al.*, 2003). Muitos estudos com fitoesteróis também têm demonstrado sua atuação biológica como antiaterosclerose (BERGER; JONES; ABUMWEIS, 2004), angiogênicos em casos de danos isquêmicos cerebrais (CHOI *et al.*, 2002), antioxidantes (YOSHIDA; NIKI, 2003), antifúngicos (SMANIA *et al.*, 2003), antiulcerogênicos (BERGER; JONES; ABUMWEIS, 2004), antitumorais contra cânceres de cólon, próstata e mama (AWAD *et al.*, 2000b, 2007; BASKAR *et al.*, 2010), quimiopreventivos (IMANAKA *et al.*, 2008), imunomodulatórios (BOUIC, 2001) e anti-inflamatórios (BACKHOUSE *et al.*, 2008). Além disso, alguns fitoesteróis podem atuar no tratamento e na prevenção de diferentes doenças, como respostas proliferativas de linfócitos, tuberculose pulmonar, vírus de imunodeficiência felina e HIV,

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

O óleo obtido de sementes de diferentes espécies de *Arachis* contem cerca de 0,5 % dessas substâncias (FORMO *et al.*, 1979). A avaliação da composição de sementes de quatro variedades de *A. hypogaea* mostrou que o teor de fitoesteróis varia de acordo com o genótipo, com teores entre 63,3 e 126,9 mg/100g de sementes secas (AWAD *et al.*, 2000a), sendo mais abundante o  $\beta$ -sitosterol (Figura 3).

Grosso *et al.* (1997) avaliaram a presença de fitoesteróis em sementes de diferentes acessos de *A. correntina* (Burkart) Krapov. & W.C. Greg. (sin. *A. villosa* Benth.), *A. durannensis* Krapov. & W.C. Greg. (sin. *A. argentinensis* Speg., *A. spegazzinii* M. Greg. & W.C. Greg.), *A. monticola* Krapov. & Rigoni, *A. batizocoi* Krapov. & W.C. Greg. e *A. cardenasii* Krapov. & W.C. Greg. coletados na Argentina e na Bolívia, utilizando como solvente éter de petróleo e extração em Soxhlet, tendo sido detectados campesterol, estigmasterol,  $\Delta^5$ -avenasterol,  $\Delta^7$ -avenasterol,  $\Delta^7$ -estigmasterol e o mais predominante,  $\beta$ -sitosterol, que correspondeu a 55,7 a 58,7 % do conteúdo total de fitoesteróis. Posteriormente, Grosso, Nepote e Guzmán (2000) também estudaram a composição de fitoesteróis em sementes de espécies de diferentes Seções, incluindo *A. sylvestris* (A. Chev.) A. Chev. (*Heterantae*), *A. chiquitana* Krapov. & W. C. Greg., *A. appressipila* Krapov. & W. C. Greg., *A. kretschmeri* Krapov. & W. C. Greg. e *A. matiensis* Krapov. & W. C. Greg. (*Procumbentes*), *A. trinitensis* Krapov. & W. C. Greg., *A. kempff-mercadoi* Krapov., W. C. Gregory & C.E. Simpson, *A. diogoi* Hoehne, *A. benensis* Krapov. & W. C. Greg., *A. valida* Krapov. & W. C. Greg., *A. helodes* Mart. ex Krapov. & Rigoni, *A. kuhlmannii* Krapov. & W. C. Greg., *A. williamsii* Krapov. & W. C. Greg., *A. hoehnei* Krapov. & W. C. Greg., *A. villosa* e *A. stenosperma* Krapov. & W. C. Greg. (*Arachis*) e *A. pintoii* (*Caulorrhizae*), utilizando a mesma metodologia para preparo dos extratos. Nesse trabalho, foi observada uma variação entre 55,7 e 60,2 % no conteúdo de  $\beta$ -sitosterol em relação aos fitoesteróis totais, semelhante ao que foi encontrado nas espécies estudadas anteriormente.

Figura 3 – Fórmula estrutural do beta-sitosterol



### 3.2.2. Substâncias fenólicas em *Arachis*

Os compostos fenólicos são substâncias essenciais para o crescimento e a reprodução das plantas, sendo produzidos em resposta a fatores ambientais, como luminosidade, temperatura e poluição, ou injúrias, como ataque de patógenos e herbivoria (GHASEMZADEH; GHASEMZADEH, 2011). O grupo possui substâncias com estrutura molecular bastante diversa, sendo caracterizado pela presença de anéis aromáticos hidroxilados (MANDAL *et al.*, 2010).

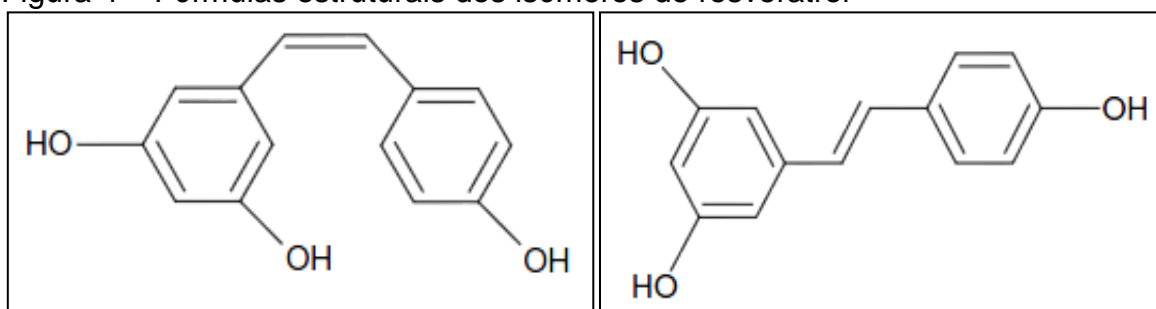
Em espécies do gênero, os compostos fenólicos vêm sendo bastante estudados, especialmente as classes dos estilbenoides e flavonoides, que são os mais encontrados (LOPES *et al.*, 2011) e apresentam uma vasta gama de atividades biológicas, como atividade antioxidante. Estilbenoides e flavonoides são metabólitos de via biossintética mista, cujo precursor direto é o *p*-cumaroil-CoA e um intermediário da síntese de lipídios, malonil-CoA. A estrutura básica destas moléculas é formada por dois anéis aromáticos ligados por uma ponte de dois carbonos, no grupo dos estilbenoides, ou de três carbonos, no grupo dos flavonoides. A atividade antioxidante dos compostos fenólicos está associada à presença de grupamentos hidroxila, capazes de neutralizar as espécies reativas de oxigênio (CHANG *et al.*, 2010).

Estilbenoides, como o resveratrol e o piceatanol, têm sido amplamente estudados por sua atividade na prevenção e tratamento de doenças

cardiovasculares, cânceres, processos inflamatórios e doenças relacionadas à idade (KING; BOMSER; MIN, 2006). O resveratrol apresenta as formas *cis* e *trans* (Figura 4), sendo a segunda a mais encontrada e com maior atividade biológica (KING; BOMSER; MIN, 2006). Foi inicialmente encontrado em uvas, mas é também produzido por diversos grupos de plantas em resposta a estresses bióticos e abióticos, como ataque de fungos e patógenos, injúrias mecânicas e radiação UV, entre outros (TOKUSOGLU; ÜNAL; YEMIS, 2005). Uma das fontes mais ricas de resveratrol é a erva *Polygonum cuspidatum* Siebold & Zucc., utilizada na medicina tradicional na China e no Japão (KING; BOMSER; MIN, 2006).

A principal fonte de resveratrol na alimentação humana são uvas, amendoins e seus derivados (CASSIDY; HANLEY; RAVENTOS, 2000). Em *A. hypogaea*, foi encontrado em raízes (MEDINA-BOLIVAR *et al.*, 2007), folhas, sementes, vagens (PARK *et al.*, 2003) e em sistemas de cultura de tecidos e células *in vitro* (KU *et al.*, 2005). Lopes *et al.* (2013) também detectaram resveratrol em folhas de plantas cultivadas em casa de vegetação das espécies *A. batizocoi*, *A. cardenasii*, *A. cruziana* Krapov., W. C. Greg. & C. E. Simpson, *A. duranensis*, *A. gregoryi* C. E. Simpson, Krapov. & Valls, *A. ipaënsis* Krapov. & W. C. Greg., *A. kempff-mercadoi*, *A. kuhlmannii*, *A. magna* Krapov., W. C. Greg. & C.E. Simpson e *A. simpsonii* Krapov. & W. C. Greg.

Figura 4 – Fórmulas estruturais dos isômeros de resveratrol



Legenda: forma *cis* (esquerda) e *trans* (direita).

Flavonoides também foram encontrados em espécies de *Arachis*, incluindo *A. pintoii*. Diversas isoflavonas (biochanina A, daidzina, daidzeina, genistina e genisteína e um flavonol, a quercetina), que atuam como sinalizadoras no processo de fixação do nitrogênio e podem atuar como fitoalexinas na proteção

contra estresses, foram detectadas em sementes e plântulas de diferentes genótipos de *A. hypogaea* (CHUKWUMAH *et al.*, 2007; KIRAKOSYAN *et al.*, 2007; SALES; RESURRECCION, 2010). Proantocianidinas, oligômeros de flavonoides conhecidos como taninos condensados, e monômeros, incluindo catequina, epicatequina, epigallocatequina, catequina galato e epigallocatequina galato, foram encontradas em extratos do tegumento das sementes (OLDONI *et al.*, 2016; YU *et al.*, 2006), enquanto que a presença de flavonas foi descrita em extratos de cascas da vagem (QIU *et al.*, 2012). Marka *et al.* (2013) e Kim *et al.* (2013) detectaram flavonoides em raízes e Sobolev, Sy e Gloer (2008) encontraram flavonois conjugados derivados de quercetina, isorramnetina e espermidina em flores de plantas de *A. hypogaea* cultivadas em casa de vegetação. Utilizando elicitores bióticos, Subba Rao, Wadia e Strange (1996) obtiveram daidzeina, isoflavanona, formononetina e medicarpina em folhas de *A. hypogaea* em casa de vegetação. Lage (2009) detectou, além de taninos e outros ácidos fenólicos, os flavonoides vanilina e quercetina em partes aéreas de *A. pinto* cv. Belmonte e cv. Amarillo não adubadas.

Os estudos já realizados sobre produção de metabólitos em *Arachis* ainda focalizam majoritariamente *A. hypogaea*. A maior parte dos trabalhos é relacionada ao estudo fitoquímico de plantas de campo, sementes e alguns sistemas *in vitro*, havendo relativamente poucos estudos com esse objetivo nas demais espécies do gênero.

#### **4. PRODUÇÃO DE METABÓLITOS *IN VITRO***

##### **4.1. Cultura de tecidos vegetais**

A cultura de tecidos tem sido utilizada como ferramenta para diversas finalidades no campo da biotecnologia, incluindo a produção massal de mudas através de propagação vegetativa, produção de sementes sintéticas e transformação genética. Sistemas *in vitro* são também utilizados para a produção de metabólitos e como um método auxiliar na conservação de espécies

ameaçadas (CARVALHO; QUESENBERRY; GALLO, 2010; CARVALHO; VIDAL, 2003; GÓMEZ-AGUIRRE *et al.*, 2012; MULABAGAL; TSAY, 2004).

As técnicas da cultura de tecidos baseiam-se na totipotência celular e na capacidade de desdiferenciação e rediferenciação dos tecidos vegetais por diferentes vias, em resposta a estímulos químicos ou físicos. Dessa forma, pequenos segmentos vegetais, chamados de explantes, incluindo meristemas, folhas, raízes e segmentos caulinares, podem desenvolver estruturas organizadas, como brotos (organogênese), raízes (rizogênese), embriões (embriogênese somática), ou a formação de massas desorganizadas de células, denominadas calos (calogênese) (LANDA *et al.*, 2000). A obtenção de plantas ocorre por organogênese e embriogênese somática, de forma direta ou através da formação de calos. Portanto, fragmentos de tecidos cultivados *in vitro* em condições controladas, podem dar origem a diferentes sistemas de cultura (ANDRADE, 2002; GEORGE; HALL; KLERK, 2008).

A modulação da morfogênese, assim como da calogênese, em explantes vegetais pode ser realizada através da variação nos parâmetros das culturas, que são mantidas em condições controladas (ANDRADE, 2002), sob fotoperíodo e temperatura específicos e em meio asséptico. O balanço de fitorreguladores adicionados ao meio de cultura pode ser empregado para tal, regulando a diferenciação e a multiplicação das células e induzindo determinadas vias de regeneração (NETO *et al.*, 2004). Da mesma maneira, a composição do meio de cultura pode variar, sendo adotados diferentes tipos e concentrações de sais, carboidrato utilizado como fonte de carbono e energia para a planta e de vitaminas. O meio pode também ser solidificado ou líquido, mantido em condição estática ou sob agitação.

Além disso, a seleção dos explantes é um fator crucial, pois os estados fisiológicos, bioquímicos e de desenvolvimento de suas células irão influenciar a resposta morfogênica, sendo determinantes o tipo de explante e o genótipo da planta doadora (ANDRADE, 2002). Essas condições são, em geral, padronizadas e então adaptadas a cada espécie segundo suas necessidades particulares. Entretanto, para isto, são necessários estudos em cada espécie ou genótipo de interesse, até a obtenção de um protocolo adequado para o estabelecimento dos sistemas de cultura de tecidos.

#### 4.2. Sistemas de produção de metabólitos *in vitro*

Os metabólitos especiais são sintetizados pelas plantas em pequenas quantidades, podendo sua produção ser estimulada por fatores como condições de estresse. As diferentes abordagens de cultura de tecidos oferecem condições favoráveis para produção *in vitro* de substâncias bioativas, sendo, portanto, soluções viáveis para a produção dessas moléculas, especialmente as de difícil síntese química.

Culturas de células, iniciadas a partir de calos e cultivadas em meios sólidos ou líquidos, estáticos ou sob agitação, constituem uma importante via, amplamente utilizada, para produção de metabólitos de interesse (CHARLET *et al.*, 2000). Diversas espécies medicinais têm sido utilizadas para obtenção de metabólitos de uso terapêutico através de sistemas de culturas de células, com um aumento considerável na produção em relação ao obtido *in vivo* (TRIPATHI; TRIPATHI, 2003; WILSON; ROBERTS, 2012).

Da mesma maneira, culturas de órgãos, especialmente de raízes, vêm sendo exploradas para a produção de substâncias bioativas (GÓMEZ-AGUIRRE *et al.*, 2012; SAIMAN *et al.*, 2012; ZHANG *et al.*, 2012). Culturas de raízes adventícias são geralmente empregadas para a produção de substâncias produzidas por este órgão em condições naturais, contudo podem apresentar também a produção de novos tipos de moléculas por influência das condições de cultura, sendo geralmente induzidas em resposta a auxinas. O emprego dessas metodologias não somente torna-se importante para o suprimento da necessidade de produtos terapêuticos, mas também constitui uma alternativa para evitar a superexploração de espécies e a degradação de ecossistemas.

Um importante exemplo de utilização industrial da cultura de tecidos é a produção de paclitaxel, um diterpeno complexo. O paclitaxel foi obtido inicialmente por Wani *et al.* (1971) a partir de cascas do caule de *Taxus brevifolia* Nutt. e é atualmente comercializado com o nome de Taxol<sup>®</sup>, como um importante recurso para o tratamento de diversos tipos de câncer. Entretanto, a produção *in vivo* ocorre em baixas concentrações, correspondendo cerca de 0,01 % de massa seca de cascas das árvores. Além disso, as espécies do gênero *Taxus* são árvores raras e de crescimento lento (TABATA, 2004), sendo estimado que, para

o tratamento de cada paciente, quatro árvores de mais de 100 anos deveriam ser cortadas para extração de 2 g do fármaco (RUAN, 2003). A exploração da espécie para extração do paclitaxel e dos seus precursores causou danos graves a várias populações nativas na China e na Índia e a síntese química também é um procedimento complexo e de custo elevado. Por outro lado, o paclitaxel é obtido em larga escala a partir de culturas de células (FETT-NETO; ZHANG; DICOSMO, 1994) e raízes (FURMANOWA; SYKLOWSKA-BARANEK, 2000), especialmente em resposta à elicitación com metil-jasmonato e ácido jasmônico (ZHONG, 2002), sendo comercializado exclusivamente pela Bristol-Myers Squibb, nos Estados Unidos.

#### 4.3. Sistemas de produção de metabólitos *in vitro* em *Arachis*

Diversos sistemas de cultura de tecidos já foram desenvolvidos para o gênero *Arachis* e alguns já vêm sendo explorados com o objetivo da produção de metabólitos especiais (KU *et al.*, 2005). Para *A. hypogaea*, já foram estabelecidas culturas de calos (GUPTA; SINGHAL, 1996; KU *et al.*, 2005; VENKATACHALAM; PILLAI; JAYABALAN, 1996), células em suspensão (SEAL *et al.*, 2001) e raízes induzidas por *Agrobacterium rhizogenes* (CONDORI *et al.*, 2010; MEDINA-BOLIVAR *et al.*, 2007). Algumas abordagens têm sido adotadas para otimização desses sistemas, como o uso de biorreatores com co-cultivo de raízes de *A. hypogaea* com *Artemisia annua* L. (SIVAKUMAR *et al.*, 2010) e a elicitación.

O uso de elicitores bióticos e abióticos em diferentes tecidos de *A. hypogaea* cultivados *in vitro* tem demonstrado ser um método eficiente para a otimização da biossíntese de fitoalexinas, como o resveratrol e o piceatanol. A elicitación abiótica inclui o uso de agentes químicos, como ácido jasmônico e derivados, ácido salicílico, peróxido de hidrogênio, paraquat, etefon e sacarose (CHUNG *et al.*, 2003; SUBBA RAO; WADIA; STRANGE, 1996; YANG *et al.*, 2010a), e agentes físicos, como radiação UV-C (CHUNG *et al.*, 2003; KU *et al.*, 2005; POTREBKO; RESURRECCION, 2009; SUBBA RAO; WADIA; STRANGE, 1996) e ultrassom (RUDOLF; RESURRECCION, 2005; POTREBKO; RESURRECCION, 2009).

Como elicitores bióticos, são utilizados patógenos naturais da espécie, como os fungos do gênero *Aspergillus* (SOBOLEV, 2013), causadores da contaminação de sementes com aflatoxinas. Embora os mecanismos de ação do patógeno não sejam totalmente claros, o fungo causa um aumento na síntese de fitoalexinas, corroborando a hipótese de que esses compostos atuam na defesa da planta (SUBBA RAO; STRANGE, 1995). Além de *Aspergillus*, Sobolev (2013) também avaliou a elicitação de sementes utilizando leveduras (*Saccharomyces cerevisiae* Meyen ex E.C. Hansen e *Candida lipolytica* (Harrison) Diddens & Lodder) e bactérias (*Bacillus subtilis* (COHN, 1872) e *Rhizobium leguminosarum* (FRANK, 1889). Em culturas de calos, o uso de agentes bióticos, como *Botryodiplodia theobromae* (Patouillard) Griffon & Maublanc e *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst., tem demonstrado maior eficiência para aumentar a produção de resveratrol e piceatanol que agentes químicos (YANG *et al.*, 2010a). Paralelamente, a quitina, substância isolada da parede celular de fungos, tem sido empregada com sucesso na produção de fitoalexinas em calos obtidos de sementes de *A. hypogaea* (YANG *et al.*, 2010b).

Ao contrário do que ocorre com *A. hypogaea*, a produção de metabólitos especiais em sistemas *in vitro* têm sido relativamente pouco investigada nas demais espécies do gênero. *Arachis pintoi* tem sido estudado principalmente com enfoque na conservação e produção de plantas, com estabelecimento de organogênese (REY *et al.*, 2000) e embriogênese (REY; MROGINSKI, 2006), utilizando como fonte de explantes principalmente folhas de plantas de campo, e conservação por criopreservação (REY *et al.*, 2009). Embora tenham sido detectados fitoesteróis com reconhecida atividade medicinal em sementes de espécies de *Arachis*, incluindo *A. pintoi*, existe ainda a necessidade de realização de estudos sobre a presença de outras substâncias bioativas nos diferentes materiais *in vivo* e *in vitro*.

## 5. OBJETIVOS

### 5.1. Objetivo geral

Este trabalho tem como objetivo estabelecer sistemas de cultura de calos e raízes de *A. pintoi* e realizar um estudo fitoquímico comparativo entre extratos de sementes, plantas de campo e materiais obtidos *in vitro*, seguido de análise da atividade antioxidante dos extratos.

### 5.2. Objetivos específicos

- Avaliar a morfogênese a partir de diferentes tipos de explantes em resposta a variados fitorreguladores e a presença ou ausência de luz;
- Estabelecer culturas de raízes em resposta às auxinas ácido  $\alpha$ -naftalenoacético (ANA), ácido indolacético (AIA) e ácido indolbutírico (AIB);
- Analisar o perfil fitoquímico e a possível presença de resveratrol em sementes, plantas mantidas *in vivo* e *in vitro* e raízes induzidas em resposta a diferentes auxinas;
- Analisar o potencial antioxidante dos extratos dos diferentes materiais por meio do ensaio de captura do radical DPPH.

## 6. METODOLOGIA

### 6.1. Material vegetal

Frutos de *A. pinto* (cv. Amarillo MG-100) foram adquiridos comercialmente. Para obtenção de plantas *in vivo*, sementes foram plantadas em jardineiras, com substrato Plantmax®, em casa de vegetação. Culturas de plantas *in vitro* foram estabelecidas a partir de eixos embrionários. Para isso, as sementes foram descontaminadas inicialmente por imersão em álcool a 70 % por 2 minutos e, em seguida, em solução de NaClO a 1,5 % contendo Tween 80 a 0,02 % (v/v) por 45 minutos, sob agitação. Após esse procedimento, as sementes foram lavadas três vezes com água deionizada estéril, em capela de fluxo laminar. Os eixos embrionários foram excisados das sementes e inoculados em meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) sem a adição de fitorreguladores (MS0). As plantas obtidas *in vitro* eram subcultivadas através da excisão de segmentos caulinares contendo dois nós em intervalos de 90 dias para meio MS suplementado com ANA a 2,7  $\mu\text{M}$ .

### 6.2. Meios e condições de cultura

Para o cultivo *in vitro* foi utilizado o meio MS suplementado com sacarose a 3 % e gelificado com ágar a 0,7 %. Os reguladores de crescimento foram utilizados em diferentes concentrações e o pH final foi ajustado para 5,8, antes da esterilização em autoclave (15 minutos a 121 °C e 1 atm). As culturas foram incubadas a 28 °C  $\pm$  2 °C, sendo mantidas na ausência ou presença de luz, com fotoperíodo de 16:8 horas (luz:escuro) e intensidade luminosa média de 46  $\mu\text{M m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , fornecida por lâmpadas fluorescentes do tipo branca fria.

### 6.3. Cultura de tecidos

#### 6.3.1. Indução de morfogênese a partir de explantes de sementes e de plantas *in vitro*

Para avaliação da morfogênese a partir das sementes, cotilédones, eixos e folíolos embrionários foram inoculados em meio MS suplementado com diferentes concentrações dos fitorreguladores picloram (PIC) (4,14; 12,42; 20,7; 28,98 e 41,4  $\mu\text{M}$ ); ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) (4,52; 13,56; 22,6; 31,64 e 45,2  $\mu\text{M}$ ) ou tidiazuron (TDZ) (4,54; 13,62; 22,7; 31,78 e 45,4  $\mu\text{M}$ ), além de combinações com maior concentração de 6-benzilaminopurina (BAP) (8,8; 13,2 e 17,6  $\mu\text{M}$ ) com ANA (0,54; 2,7 e 5,4  $\mu\text{M}$ ) e maiores concentrações de ANA (10,8, 16,2 e 21,6  $\mu\text{M}$ ) com BAP (0,44, 2,2 e 4,4  $\mu\text{M}$ ). As culturas foram mantidas na presença ou ausência de luz. Os experimentos foram realizados com doze explantes de cotilédones e eixos embrionários por tratamento, sendo inoculados um número de quatro explantes por frasco. Os oito folíolos embrionários de cada embrião foram inoculados em cada frasco, tendo sido utilizados dez embriões por tratamento, perfazendo um total de oitenta explantes. Os brotos obtidos foram excisados e transferidos para meio MS suplementado com ANA a 2,7  $\mu\text{M}$  para enraizamento, sendo subcultivados pela excisão de segmentos caulinares a cada 60 dias.

O potencial morfogênico de segmentos caulinares e foliares de plantas *in vitro* desenvolvidas dois meses após o subcultivo de segmentos caulinares foi também avaliado com a utilização dos meios suplementados com as diferentes concentrações de PIC, 2,4-D e TDZ, além de combinações de BAP e ANA descritas acima. Para todos os explantes foi adotado um número de doze por tratamento, sendo quatro por frasco. Foram realizadas duas repetições para todos os experimentos.

Calos friáveis obtidos a partir de cotilédones e eixos embrionários cultivados na presença de BAP a 4,4  $\mu\text{M}$  e ANA a 10,8  $\mu\text{M}$  e de folíolos embrionários cultivados em BAP a 17,6  $\mu\text{M}$  e ANA a 5,4  $\mu\text{M}$  foram transferidos para meio fresco com as mesmas concentrações de fitoreguladores. O acúmulo de biomassa de calos foi determinado pelos pesos de matéria fresca (PF) e seca

(PS), após 60 dias de cultura. A massa seca foi obtida após secagem a 50°C até peso constante.

### 6.3.2. Estabelecimento de cultura de raízes

Para a indução de raízes adventícias, cotilédones foram cultivados na presença ou ausência de luz em meio MS suplementado com AIA (11,4; 17,1; 28,5; 57 e 85,5  $\mu\text{M}$ ), AIB (9,8; 14,7; 24,5; 49; 73,5  $\mu\text{M}$ ) ou ANA (10,8; 16,2; 27; 54; 81  $\mu\text{M}$ ), utilizado isoladamente ou em combinação com BAP a 0,44  $\mu\text{M}$ . Foram utilizados dezesseis explantes por tratamento, sendo quatro por frasco.

A capacidade de multiplicação das raízes adventícias obtidas a partir de cotilédones cultivados na presença de AIA a 57  $\mu\text{M}$ , AIB 14,7  $\mu\text{M}$ , ANA 54  $\mu\text{M}$  e da combinação de BAP a 0,44  $\mu\text{M}$  e ANA a 27  $\mu\text{M}$  foi avaliada utilizando-se cinco diferentes sistemas: meio solidificado com ágar a 0,7 % (frascos de 268 mL ou placas de Petri), meio líquido em frasco de 268 mL mantido sob agitação a 110 rpm ou estático em ponte de papel filtro, ou meio dupla-fase (10 mL de meio líquido sobre 20 mL de meio solidificado), contendo as mesmas concentrações e tipos de fitorreguladores. Os segmentos radiculares (3 cm) foram excisados das extremidades das raízes produzidas pelos cotilédones e inoculados três explantes por frasco. No sistema de meio sólido em placa de Petri foram inoculados quatro explantes por placa. Foram utilizados cinco frascos por tratamento para todos os sistemas. Foram realizadas duas repetições de cada experimento.

Para determinação do acúmulo de biomassa de segmentos radiculares e raízes com 30 dias de cultura, foram determinados os pesos de matéria fresca (PF) e seca (PS). A massa seca foi obtida após secagem a 50°C até peso constante.

## 6.4. Avaliação fitoquímica

### 6.4.1. Preparo de extratos

Frutos de *A. pinto* adquiridos comercialmente foram descascados manualmente para retirada das sementes, que foram secas em estufa a 50°C por 48 horas, sendo em seguida trituradas em moinho. Para a retirada do óleo, as sementes foram submetidas à maceração dinâmica a 75 rpm com *n*-hexano (Vetec®) a 50 mL/g de material seco por 2 horas. Este material foi filtrado e reextraído por maceração com etanol (Vetec®) a 80 % (v/v) a 50 mL/g de material seco. Folhas, caules e raízes de plantas cultivadas *in vivo* e *in vitro* e raízes adventícias induzidas *in vitro* foram submetidas à mesma metodologia de extração em *n*-hexano e etanol a 80 %. Os extratos obtidos foram filtrados e concentrados sob pressão reduzida (Evaporador Rotativo Marconi – M120) a 40 °C para retirada do solvente e armazenados a – 20 °C.

### 6.4.2. Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

A técnica de CCD foi utilizada para avaliação do perfil de substâncias presentes nos diferentes extratos, ressuspensos em metanol (Vetec) a 1 mg/mL. Foram utilizadas placas de alumínio com silicagel com marcador de fluorescência a 254 nm Alugram® Xtra Sil G/UV<sub>254</sub> (Macherey-Nagel). As condições utilizadas de fase móvel, revelação e observação para detecção de diferentes grupos de substâncias estão descritos no Quadro 2. As placas cromatográficas foram fotografadas em luz visível ou fluorescência a 254 nm ou 365 nm (UVtrans, Modelo UV-15LC). A identificação de diferentes grupos de substâncias baseou-se na metodologia descrita por Wagner (1996). O fator de retenção ( $R_f$ ) foi calculado pela razão entre a distância percorrida pela substância e a distância percorrida pela fase móvel.

Quadro 2 – Condições utilizadas nas cromatografias em camada delgada

<b>Grupo de substâncias</b>	<b>Fase Móvel</b>	<b>Revelação</b>	<b>Observação</b>
Triterpenos	Acetato de etila, ácido acético glacial, ácido fórmico, água (50:5,5:5,5:13)	Anisaldeído sulfúrico e aquecimento a 100°C (6 min.)	Visível e 365 nm
Saponinas	Clorofórmio, ácido acético glacial, metanol, água (32:16:6:4)	Anisaldeído sulfúrico e aquecimento a 100°C (5-10 min.)	Visível e 365 nm
Alcaloides	Tolueno, acetato de etila, dietilamina (35:10:5)	Dragendorff	Visível
Cumarinas	Acetato de etila, ácido acético glacial, ácido fórmico, água (50:5,5:5,5:13)	Sem revelação ou NP/PEG	365 nm
Flavonoides	Acetato de etila, ácido acético glacial, ácido fórmico, água (50:5,5:5,5:13)	NP/PEG	Visível e 365 nm
Estilbenoides	Acetato de etila, clorofórmio, metanol, água (33:15:3:0,6)	NP/PEG ou Vanilina sulfúrica e aquecimento a 100°C (5-10 min.)	Visível e 365 nm
Substâncias fenólicas 1	Acetato de etila, metanol, ácido acético glacial (36:4:4)	Sem revelação ou NP/PEG	Visível e 365 nm
Substâncias fenólicas 2	Acetato de etila, metanol, ácido acético glacial (32:8:4)	Sem revelação ou NP/PEG	Visível e 365 nm
Substâncias fenólicas 3	Acetato de etila, ácido acético glacial, água (34:2:4)	Sem revelação ou NP/PEG	Visível e 365 nm
Substâncias fenólicas 4	Acetato de etila, ácido acético glacial, água (51:6:6)	Sem revelação ou NP/PEG	Visível e 365 nm
Substâncias fenólicas 5	Acetato de etila, ácido acético glacial, ácido fórmico, água (51:6:1:7)	Sem revelação ou NP/PEG	Visível e 365 nm

Para as análises por CCD, foram utilizados padrões de vitexina, isovitexina, orientina, isoorientina, rutina (flavonoides) e resveratrol (estilbenoide), adquiridos da Sigma<sup>®</sup>.

#### 6.4.3. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

As análises por CLAE foram realizadas em um cromatógrafo Dionex, modelo Ultimate 3000, com um detector de rede de diodos e coluna ACCLAIM C18 (Dionex Bonded Silica Products, 5 µm, 120 Å, com dimensão de 4,6 x 250 mm), disponibilizado pela pesquisadora Eliane C. Rego, no Laboratório de Análise Orgânica da Divisão de Metrologia Química do Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (Inmetro). O método utilizado baseou-se no descrito por Wang e Pittman (2008). O material foi ressuspenso em etanol a 80 % (v/v) (1 mg/mL) e filtrado (Nylon 0,45 µm, hidrofílico, Advantec). As amostras foram analisadas a 30 °C, com volume de injeção de 20 µL e fluxo de 1 mL/min. Foram utilizados como solventes água MiliQ (A), metanol (B) e acetonitrila (C), em um gradiente com condições iniciais 90 % de A, 8 % de B e 2 % de C; passando para 70 % de A, 8 % de B e 22 % de C, após 10 minutos; e para 5 % de A e 95 % de C em 18 minutos; finalizando em 26 minutos com 90 % de A e 10 % de C. O sinal do trans-resveratrol foi detectado a 307 nm, utilizando padrão de trans-resveratrol (Sigma<sup>®</sup>) a 1 mg/mL em etanol a 80 % (v/v).

### 6.5. **Avaliação da atividade antioxidante**

#### 6.5.1. Ensaio DPPH

A avaliação do potencial antioxidante dos extratos foi realizada utilizando-se o ensaio de DPPH (2,2-difenil-1-picril hidrazil), no qual foi

determinada a capacidade do extrato de sequestrar o radical livre DPPH (Sigma-Aldrich®, Milwaukee, Wisconsin, EUA) reduzindo-o a hidrazina, com base no método de Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995). Os extratos foram ressuspensos em metanol em diferentes concentrações (0,1 - 40 mg/mL). Amostras de 25 µL foram incubadas com 975 µL de solução metanólica do radical DPPH (0,6 mM) por 1 hora no escuro, em triplicata. Em seguida, a absorbância foi medida a 515 nm em espectrofotômetro UV-Vis BioMate 3S (Thermo Scientific). A porcentagem de captura foi determinada pela equação:

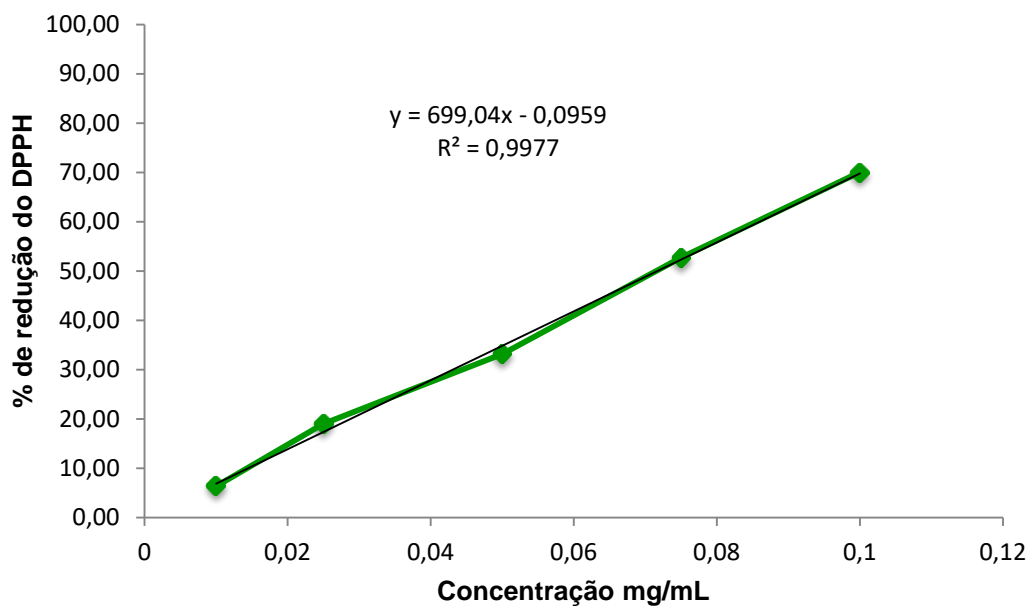
$$\% \text{ DPPH sequestrado} = \frac{(A_c - A_a)}{A_c} \times 100$$

Onde:  $A_c$  = Absorbância do controle negativo;

$A_a$  = Absorbância da amostra.

O valor de  $EC_{50}$  (concentração necessária de extrato para reduzir em 50 % a concentração inicial do DPPH (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; Berset, 1995) foi calculado a partir de curva analítica, obtida por regressão linear. Como controle positivo, foi determinada a curva padrão da quercetina e calculado o seu valor de  $EC_{50}$  (Figura 5).

Figura 5 – Curva padrão de atividade antioxidante da quercetina avaliada pelo método de captura do radical DPPH



#### 6.5.2. Ensaio CCD-DPPH

Para análise do perfil antioxidante dos extratos associado à técnica de cromatografia de camada delgada, as cromatoplacas foram borrifadas com solução de DPPH a 2 % e incubadas no escuro por 1 hora (MASOKO; ELOFF, 2007).

#### 6.6. **Análise Estatística**

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

## 7. RESULTADOS

### 7.1. Cultura de Tecidos

#### 7.1.1. Morfogênese a partir de explantes de sementes

Explantes de sementes apresentaram uma grande variedade de respostas, tendo sido obtidas calogênese, organogênese e rizogênese em função do tipo de explante, do tipo e da concentração dos reguladores de crescimento e da condição de luminosidade.

##### 7.1.1.1. Calogênese

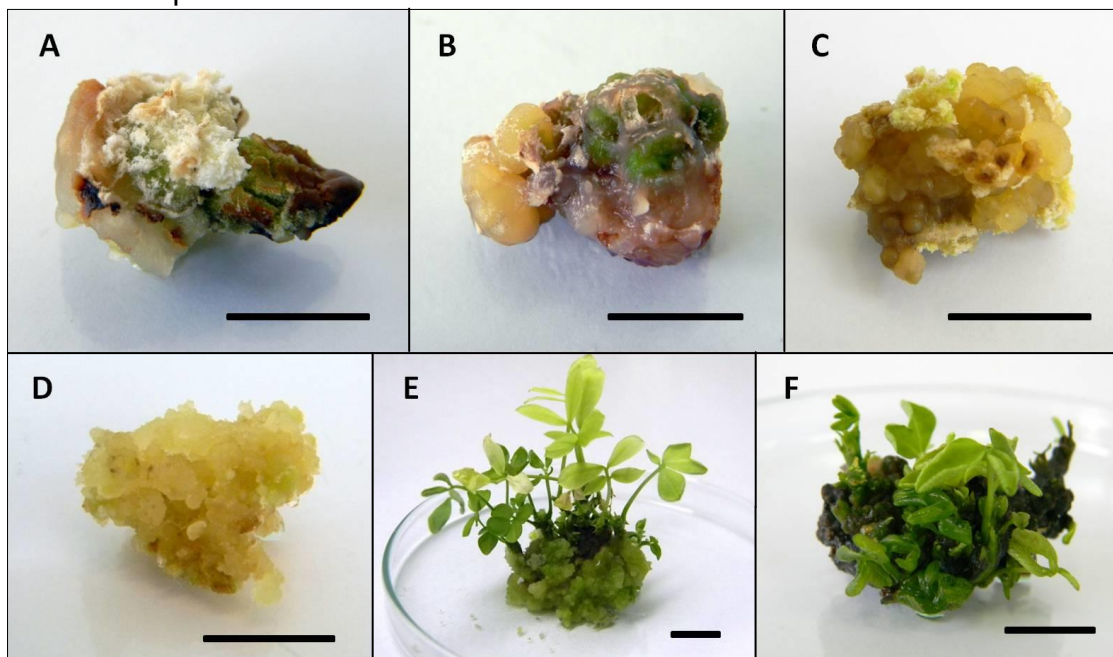
Cotilédones, eixos e folíolos embrionários produziram diferentes tipos de calos (Figura 6 – A a F). Na presença de 2,4-D, cotilédones e eixos embrionários apresentaram baixa frequência de calogênese, originando calos compactos ou mistos (Figura 6 - A), contendo uma base compacta e uma massa friável na superfície. Na presença de luz, foram observados principalmente calos compactos, enquanto que no escuro só foram obtidos calos mistos (Tabela 1).

Explantes cultivados em meio suplementado com PIC desenvolveram calos mucilaginosos (Figura 6 - B e C). A maior taxa de calogênese (90 %) foi observada em cotilédones cultivados em meio suplementado com PIC a 12,42  $\mu\text{M}$  e incubados na ausência de luz, condição na qual os calos apresentaram coloração mais clara. Concentrações mais baixas de PIC favoreceram a formação de calos em cotilédones, enquanto que eixos e folíolos embrionários apresentaram maiores taxas de calogênese (70 %) em resposta às concentrações mais altas testadas (Tabela 1).

Explantes cultivados em meios contendo TDZ desenvolveram calos mistos e compactos organogênicos (Figura 6 - F). Na presença de luz, os explantes apresentaram alta taxa de oxidação, tendo sido observadas maiores frequências de calogênese no material mantido no escuro. Eixos embrionários e cotilédones apresentaram maior frequência de calogênese (80 %) em resposta à maior concentração testada (45,4  $\mu\text{M}$ ) (Tabela 1).

Combinações de BAP e ANA promoveram o desenvolvimento de calos friáveis ou mistos nos diferentes explantes de sementes utilizados (Figura 6 - D e E, Tabela 2). Eixos embrionários desenvolveram calos mistos organogênicos em resposta a quase todas as combinações testadas, exceto em baixas concentrações de BAP, quando cultivados no escuro, onde desenvolveram calos friáveis. As frequências de calogênese variaram entre 20 % e 90 % a partir de eixos cultivados na presença de luz, e entre 42,8 % e 100 % quando as culturas eram mantidas na ausência de luz. As maiores frequências de calogênese (90 % e 100 %) foram observadas nos explantes cultivados em meios suplementados com BAP a 2,2  $\mu\text{M}$  e ANA a 21,6  $\mu\text{M}$  ou BAP a 8,8  $\mu\text{M}$  e ANA a 5,7  $\mu\text{M}$ , respectivamente.

Figura 6 – Calogênese a partir de explantes de sementes de *Arachis pinto* após 60 dias de cultura



Legenda: (A) Calo misto obtido de cotilédone cultivado em meio contendo 2,4-D a 22,6  $\mu\text{M}$ , na presença de luz; (B) Calo com aparência mucilaginosa obtido de eixo embrionário em resposta a PIC a 4,14  $\mu\text{M}$ , na presença de luz; (C) Calo mucilaginoso obtido de cotilédones em resposta a PIC a 12,42  $\mu\text{M}$ , na ausência de luz; (D) Calo friável obtido de folíolos embrionários em meios contendo BAP a 17,6  $\mu\text{M}$  e ANA a 2,7  $\mu\text{M}$ , na ausência de luz; (E) Calo misto organogênico obtido de eixo embrionário em resposta a BAP a 13,2  $\mu\text{M}$  e ANA a 2,7  $\mu\text{M}$  na presença de luz; (F) Calo compacto organogênico obtido de eixo embrionário cultivado em resposta a TDZ a 4,54  $\mu\text{M}$ , na presença de luz. Barra = 1cm.

Tabela 1 – Calogênese a partir de explantes de sementes de *Arachis pintoi* cultivados em meio MS suplementado com diferentes concentrações de PIC, 2,4-D ou TDZ por 60 dias, na presença ou ausência de luz

Fitorreguladores ( $\mu\text{M}$ )	COTILÉDONE				FOLÍOLO				EIXO				
	CLARO		ESCURO		CLARO		ESCURO		CLARO		ESCURO		
	Calos (%)	Tipo do calo	Calos (%)	Tipo do calo	Calos (%)	Tipo do calo	Calos (%)	Tipo do calo	Calos (%)	Tipo do calo	Calos (%)	Tipo do calo	
PIC	4,14	45	MUCIL.	70	MUCIL.	0	-	5	MUCIL.	35	MUCIL.	30	MUCIL.
	12,42	35	MUCIL.	90	MUCIL.	10	MUCIL.	10	MUCIL.	15	MUCIL.	20	MUCIL.
	20,7	45	MUCIL.	50	MUCIL.	0	-	20	MUCIL.	10	MUCIL.	50	MUCIL.
	28,98	50	MUCIL.	60	MUCIL.	0	-	55	MUCIL.	10	MUCIL.	70	MUCIL.
	41,4	40	MUCIL.	40	MUCIL.	0	-	70	MUCIL.	5	MUCIL.	60	MUCIL.
2,4-D	4,52	0	-	15	MISTO	0	-	0	-	0	-	0	-
	13,56	25	COMP.	40	MISTO	0	-	0	-	15	COMP.	20	MISTO
	22,6	25	COMP.	20	MISTO	0	-	0	-	10	MISTO	10	MISTO
	31,64	5	COMP.	25	MISTO	0	-	0	-	20	MISTO	10	MISTO
	45,2	0	-	10	MISTO	0	-	0	-	0	-	10	MISTO
TDZ	4,54	0	-	0	-	10	MISTO	20	MISTO	30	MISTO	10	MISTO
	13,62	0	-	0	-	0	-	0	-	10	MISTO	20	MISTO
	22,7	10	MISTO	70	MISTO	0	-	10	MISTO	50	COMP.	60	MISTO
	31,78	50	COMP.	60	MISTO	0	-	20	MISTO	70	COMP.	50	MISTO
	45,4	50	COMP.	80	MISTO	0	-	30	MISTO	40	COMP.	80	MISTO

Tabela 2 – Calogênese a partir de explantes de sementes de *Arachis pintoi* cultivados em meio MS suplementado com diferentes combinações de BAP e ANA por 60 dias, na presença ou ausência de luz

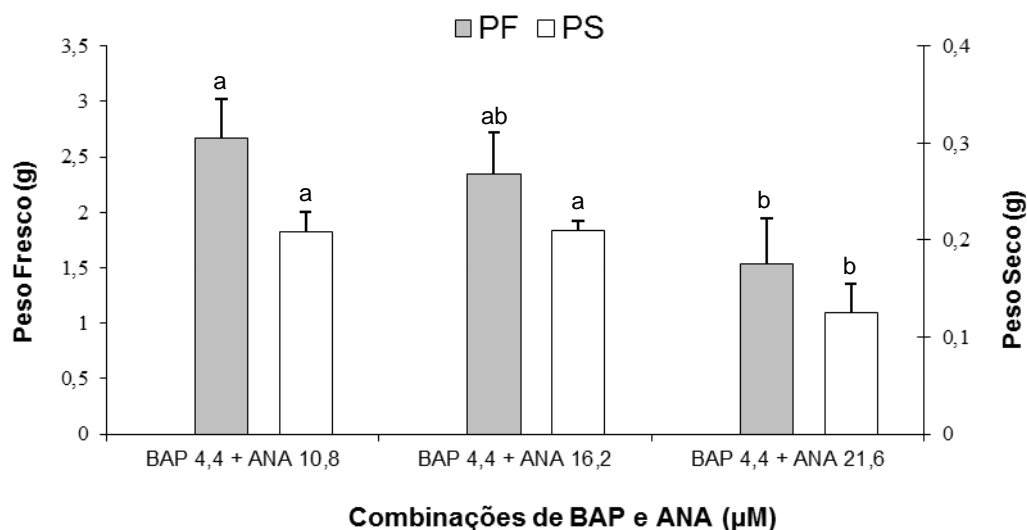
Fitorreguladores ( $\mu$ M)		COTILÉDONE				FOLÍOLO				EIXO			
		CLARO		ESCURO		CLARO		ESCURO		CLARO		ESCURO	
		Calos (%)	Tipo do calo	Calos (%)	Tipo do calo	Calos (%)	Tipo do calo	Calos (%)	Tipo do calo	Calos (%)	Tipo do calo	Calos (%)	Tipo do calo
BAP	ANA												
0,44	10,8	50	MISTO	0	-	10	MISTO	66,6	FRIÁVEL	20	MISTO	50	FRIÁVEL
0,44	16,2	50	MISTO	40	FRIÁVEL	100	MISTO	100	FRIÁVEL	60	MISTO	70	FRIÁVEL
0,44	21,6	50	MISTO	50	FRIÁVEL	100	MISTO	33,3	FRIÁVEL	50	MISTO	80	FRIÁVEL
2,2	10,8	57,14	FRIÁVEL	60	MISTO	66,6	FRIÁVEL	66,6	FRIÁVEL	50	MISTO	70	FRIÁVEL
2,2	16,2	20	MISTO	50	FRIÁVEL	33,3	MISTO	33,3	FRIÁVEL	40	MISTO	60	FRIÁVEL
2,2	21,6	40	MISTO	30	FRIÁVEL	33,3	MISTO	100	FRIÁVEL	90	MISTO	90	FRIÁVEL
4,4	10,8	30	MISTO	30	MISTO	50	FRIÁVEL	33,3	FRIÁVEL	70	MISTO	70	MISTO
4,4	16,2	50	MISTO	50	MISTO	100	FRIÁVEL	66,6	FRIÁVEL	70	MISTO	60	MISTO
4,4	21,6	50	MISTO	60	MISTO	66,6	FRIÁVEL	33,3	FRIÁVEL	50	MISTO	80	MISTO
8,8	0,54	37,5	MISTO	80	MISTO	33,3	FRIÁVEL	33,3	FRIÁVEL	80	MISTO	42,8	MISTO
13,2	0,54	50	MISTO	28,6	MISTO	33,3	FRIÁVEL	50	FRIÁVEL	71,4	MISTO	70	MISTO
17,6	0,54	62,5	MISTO	100	MISTO	33,3	FRIÁVEL	100	FRIÁVEL	42,8	MISTO	50	MISTO
8,8	2,7	50	MISTO	60	MISTO	66,6	FRIÁVEL	33,3	MISTO	71,4	MISTO	71,4	MISTO
13,2	2,7	40	MISTO	80	MISTO	100	FRIÁVEL	66,6	FRIÁVEL	70	MISTO	70	MISTO
17,6	2,7	80	MISTO	100	MISTO	66,6	FRIÁVEL	100	FRIÁVEL	50	MISTO	60	MISTO
8,8	5,4	60	FRIÁVEL	60	MISTO	66,6	FRIÁVEL	100	FRIÁVEL	33,3	MISTO	100	MISTO
13,2	5,4	60	MISTO	100	MISTO	33,3	FRIÁVEL	100	FRIÁVEL	70	MISTO	57	MISTO
17,6	5,4	80	MISTO	100	MISTO	66,6	FRIÁVEL	100	FRIÁVEL	71,4	MISTO	57	MISTO

Cotilédones apresentaram calos com maiores níveis de oxidação que os outros explantes, quando cultivados na presença de luz. Calos mistos e friáveis foram observados na superfície dos explantes ou nas extremidades dos cotilédones onde se localizavam os embriões. Combinações com concentrações mais elevadas de BAP proporcionaram maiores frequências de calogênese. Meios contendo BAP a 17,6  $\mu\text{M}$  combinado com diferentes concentrações de ANA promoveram o desenvolvimento de calos mistos com uma frequência de 100 % em explantes cultivados na ausência de luz (Tabela 2).

Folíolos embrionários desenvolveram apenas calos não morfogênicos, principalmente friáveis, mais desenvolvidos quando cultivados na ausência de luz em resposta a combinações com maior proporção de BAP em relação a ANA. A combinação de BAP a 17,6  $\mu\text{M}$  e ANA a 2,7  $\mu\text{M}$  propiciou o surgimento de calos friáveis bem desenvolvidos em 100 % dos explantes (Tabela 2). Enquanto calos produzidos a partir de folíolos embrionários apresentaram maior friabilidade em resposta às maiores concentrações de BAP testadas, os calos produzidos a partir de eixos embrionários e cotilédones tiveram maior grau de friabilidade quando cultivados em combinações com menor proporção de BAP. Nessas condições, foram observados calos mistos com grande massa friável na superfície. Essas massas friáveis serão utilizadas para estabelecimento de culturas de células em suspensão.

A determinação da biomassa dos calos friáveis ou das regiões friáveis dos calos mistos foi realizada após 60 dias de cultivo a partir da massa fresca e seca desenvolvida em meios contendo combinações de BAP e ANA, em resposta a BAP a 17,6  $\mu\text{M}$ , para explantes de folíolos embrionários, e BAP a 4,4  $\mu\text{M}$ , para explantes de eixos embrionários e cotilédones, escolhidos com base na consistência friável e na frequência de calogênese observada. A biomassa dos calos obtidos a partir de cotilédones em resposta a combinações contendo ANA a 10,8  $\mu\text{M}$  e a 16,2  $\mu\text{M}$  não diferiu estatisticamente. Entretanto, os valores encontrados foram maiores que nos calos cultivados em ANA a 21,6  $\mu\text{M}$ , indicando que as menores concentrações de ANA avaliadas favoreceram o acúmulo de biomassa (Figura 7).

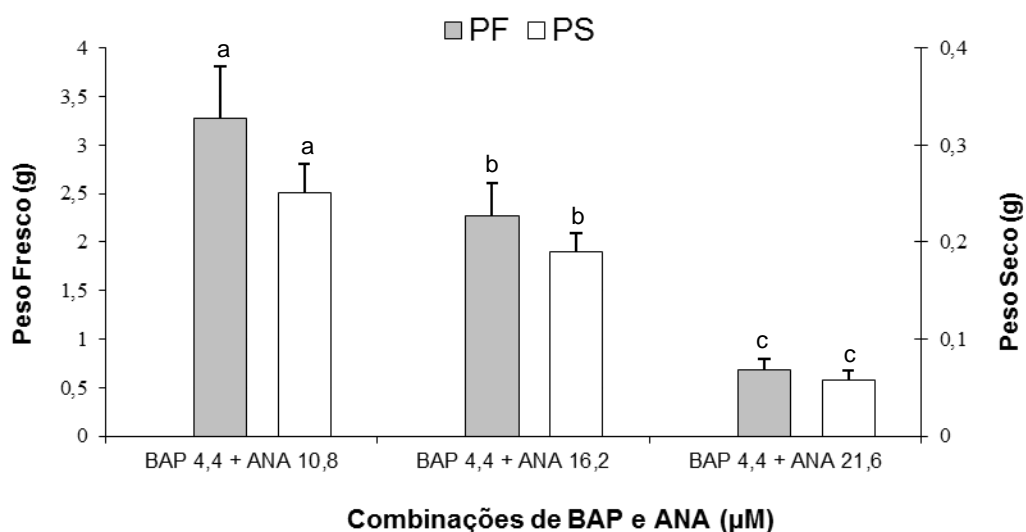
Figura 7 – Acúmulo de biomassa de calos obtidos a partir de cotilédones de *A. pintoii* cultivados em meio MS suplementado com diferentes combinações de BAP e ANA, após 60 dias de cultura na ausência de luz



Legenda: PF – peso fresco, PS – peso seco. Médias com letras iguais em colunas da mesma cor não apresentam diferença significativa a  $p \leq 0,05$ .

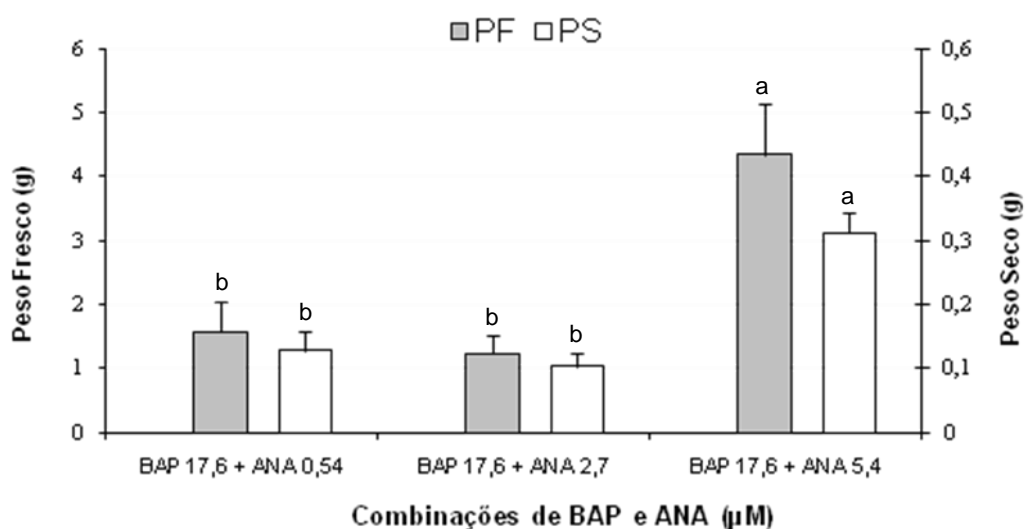
Calos derivados de eixos embrionários apresentaram valores de biomassa semelhantes aos observados naqueles obtidos a partir de cotilédones. O maior acúmulo de biomassa foi observado em calos desenvolvidos em meios contendo BAP a 4,4  $\mu\text{M}$  e ANA a 10,8  $\mu\text{M}$  (Figura 8). Calos obtidos a partir de folíolos embrionários apresentaram grande aumento na biomassa quando cultivados em meios contendo BAP a 17,6  $\mu\text{M}$  e ANA a 5,4  $\mu\text{M}$ , em comparação com as concentrações mais baixas de ANA (Figura 9).

Figura 8 – Acúmulo de biomassa de calos obtidos a partir de eixos embrionários de *A. pintoii* inoculados em meio MS suplementado com diferentes combinações de BAP e ANA, após 60 dias de cultura na ausência de luz



Legenda: PF – peso fresco, PS – peso seco. Médias com letras iguais em colunas da mesma cor não apresentam diferença significativa a  $p \leq 0,05$ .

Figura 9 – Acúmulo de biomassa de calos a partir de folíolos embrionários de *A. pintoii* inoculados em meio MS suplementado com diferentes combinações de BAP e ANA, após 60 dias de cultura na ausência de luz



Legenda: PF – peso fresco, PS – peso seco. Médias com letras iguais em colunas da mesma cor não apresentam diferença significativa a  $p \leq 0,05$ .

#### 7.1.1.2. Formação de brotos

Brotos foram produzidos a partir de calos mistos e compactos derivados de cotilédones e eixos embrionários em resposta a diferentes fitorreguladores. Em alguns casos, eixos embrionários produziram um único broto, provavelmente pelo desenvolvimento do meristema apical caulinar do embrião, como no material cultivado na presença de 2,4-D (Tabela 3). A formação de calos organogênicos em resposta a TDZ ocorreu em baixas frequências de regeneração e com altos níveis de oxidação (Tabela 3). Devido a esse fato, não foi possível realizar a análise estatística do número de brotos obtido por explante para os resultados obtidos com 2,4-D e TDZ.

As frequências de organogênese variaram entre 0 e 100 % em resposta às combinações de BAP e ANA testadas. Cotilédones mantidos no escuro apresentaram a maior frequência de regeneração (100 %) em resposta a BAP a 17,6  $\mu\text{M}$  combinado com ANA a 0,54 ou 2,7  $\mu\text{M}$  (Tabela 4). Entretanto, a ausência de luz influenciou o desenvolvimento dos brotos, que se tornaram estiolados, com o eixo alongado e poucos nós. Ao contrário, na presença de luz foram obtidos brotos saudáveis, que apresentaram desenvolvimento normal após a transferência para meio suplementado com ANA a 2,7  $\mu\text{M}$  para enraizamento. A melhor condição para produção de brotos, na presença de luz, foi a partir de eixos embrionários cultivados em meios contendo BAP a 13,2  $\mu\text{M}$  e ANA a 2,7  $\mu\text{M}$ , resultando em uma frequência de regeneração de 57,1 %, com uma média de 6 brotos por explante (Tabela 4).

Tabela 3 – Regeneração de plantas a partir de explantes de sementes de *A. pintoii* cultivados em meio MS suplementado com diferentes concentrações de 2,4-D e TDZ por 60 dias, na presença ou ausência de luz

Fitorreguladores ( $\mu\text{M}$ )	COTILÉDONE				EIXO				
	CLARO		ESCURO		CLARO		ESCURO		
	Regen. (%)	Nº de brotos/ explante	Regen. (%)	Nº de brotos/ explante	Regen. (%)	Nº de brotos/ explante	Regen. (%)	Nº de brotos/ explante	
<b>2,4-D</b>	4,52	10	1 $\pm$ 0,0	0	0	15	1 $\pm$ 0,0	20	2 $\pm$ 1,6
	13,56	0	0	20	1 $\pm$ 0,0	5	1 $\pm$ 0,0	0	0
	22,6	0	0	10	1 $\pm$ 0,0	0	0	0	0
	31,64	0	0	10	1 $\pm$ 0,0	10	2 $\pm$ 1,0	10	1 $\pm$ 0,0
	45,2	0	0	0	0	0	0	10	1 $\pm$ 0,0
	4,54	0	0	0	0	20	3 $\pm$ 1,0	10	7 $\pm$ 0,0
<b>TDZ</b>	13,62	0	0	0	0	0	0	0	0
	22,7	10	2 $\pm$ 0,0	0	0	30	3,3 $\pm$ 0,5	30	2,3 $\pm$ 1,0
	31,78	0	0	30	1,6 $\pm$ 1,0	0	0	10	4 $\pm$ 0,0
	45,4	30	2 $\pm$ 0,9	20	1 $\pm$ 0,0	10	2 $\pm$ 0,0	50	2,16 $\pm$ 1,4

Tabela 4 – Regeneração de plantas a partir de explantes de sementes de *A. pintoi* cultivados em meio MS suplementado com diferentes combinações de BAP e ANA por 60 dias, na presença ou ausência de luz

Fitorreguladores ( $\mu\text{M}$ )		COTILÉDONE				EIXO			
		CLARO		ESCURO		CLARO		ESCURO	
BAP	ANA	Reg. (%)	Nº de brotos/ explante	Reg. (%)	Nº de brotos/ explante	Reg. (%)	Nº de brotos/ explante	Reg. (%)	Nº de brotos/ explante
0,44	10,8	0	0	40	$2,75 \pm 0,3^b$	30	$1 \pm 0,0^c$	50	$2,4 \pm 0,2^c$
0,44	16,2	10	$2 \pm 0,0^c$	10	$2 \pm 0,0^b$	50	$1 \pm 0,0^c$	30	$1 \pm 0,0^c$
0,44	21,6	10	$2 \pm 0,0^c$	10	$1 \pm 0,0^b$	33,3	$1,5 \pm 0,2^c$	30	$1,33 \pm 0,2^c$
2,2	10,8	0	0	50	$1,2 \pm 0,2^b$	40	$2 \pm 0,6^b$	50	$1,6 \pm 0,4^c$
2,2	16,2	0	0	10	$1 \pm 0,0^b$	0	0	10	$1 \pm 0,0^c$
2,2	21,6	0	0	0	0	30	$1,33 \pm 0,2^c$	50	$1 \pm 0,0^c$
4,4	10,8	20	$4 \pm 0,0^{bc}$	10	$3 \pm 0,0^b$	50	$2,6 \pm 0,6^b$	0	0
4,4	16,2	10	$1 \pm 0,0^c$	20	$6,5 \pm 0,6^a$	30	$3,3 \pm 0,2^{ab}$	20	$2 \pm 0,4^c$
4,4	21,6	30	$4,3 \pm 0,2^{bc}$	10	$1 \pm 0,0^b$	10	$3 \pm 0,0^{ab}$	50	$2,4 \pm 0,5^c$
8,8	0,54	37,5	$4 \pm 0,7^{bc}$	60	$4,3 \pm 0,9^{ab}$	40	$2,75 \pm 0,7^b$	42,8	$7,6 \pm 0,2^a$
13,2	0,54	16,6	$1 \pm 0,0^c$	14,3	$4 \pm 0,0^{ab}$	28,5	$5 \pm 0,9^{ab}$	40	$4,5 \pm 1,3^c$
17,6	0,54	12,5	$7 \pm 0,0^a$	100	$3,2 \pm 1,0^{ab}$	28,5	$5,5 \pm 0,2^{ab}$	20	$4 \pm 0,0^{bc}$
8,8	2,7	20	$8,5 \pm 0,6^a$	30	$1,33 \pm 0,2^b$	28,5	$3 \pm 0,9^{ab}$	42,8	$7 \pm 2,0^{ab}$
13,2	2,7	20	$6 \pm 0,4^{ab}$	50	$4,4 \pm 1,0^{ab}$	57,1	$6 \pm 1,1^a$	30	$33,3 \pm 0,4^c$
17,6	2,7	50	$2,66 \pm 0,4^c$	100	$5,5 \pm 0,8^{ab}$	30	$2,66 \pm 0,5^b$	40	$3 \pm 0,0^c$
8,8	5,4	0	0	40	$4 \pm 1,1^{ab}$	0	0	70	$1,71 \pm 0,3^c$
13,2	5,4	30	$3,6 \pm 1,3^{bc}$	60	$1,5 \pm 0,3^b$	40	$1,75 \pm 0,5^c$	48,2	$3 \pm 0,3^c$
17,6	5,4	20	$3 \pm 0,4^c$	75	$1,66 \pm 0,2^b$	42,8	$2 \pm 0,6^b$	28,6	$1,5 \pm 0,2^c$

Legenda: Valores com letras iguais na mesma coluna não diferiram estatisticamente.

## 7.1.1.3. Cultura de raízes

**Indução**

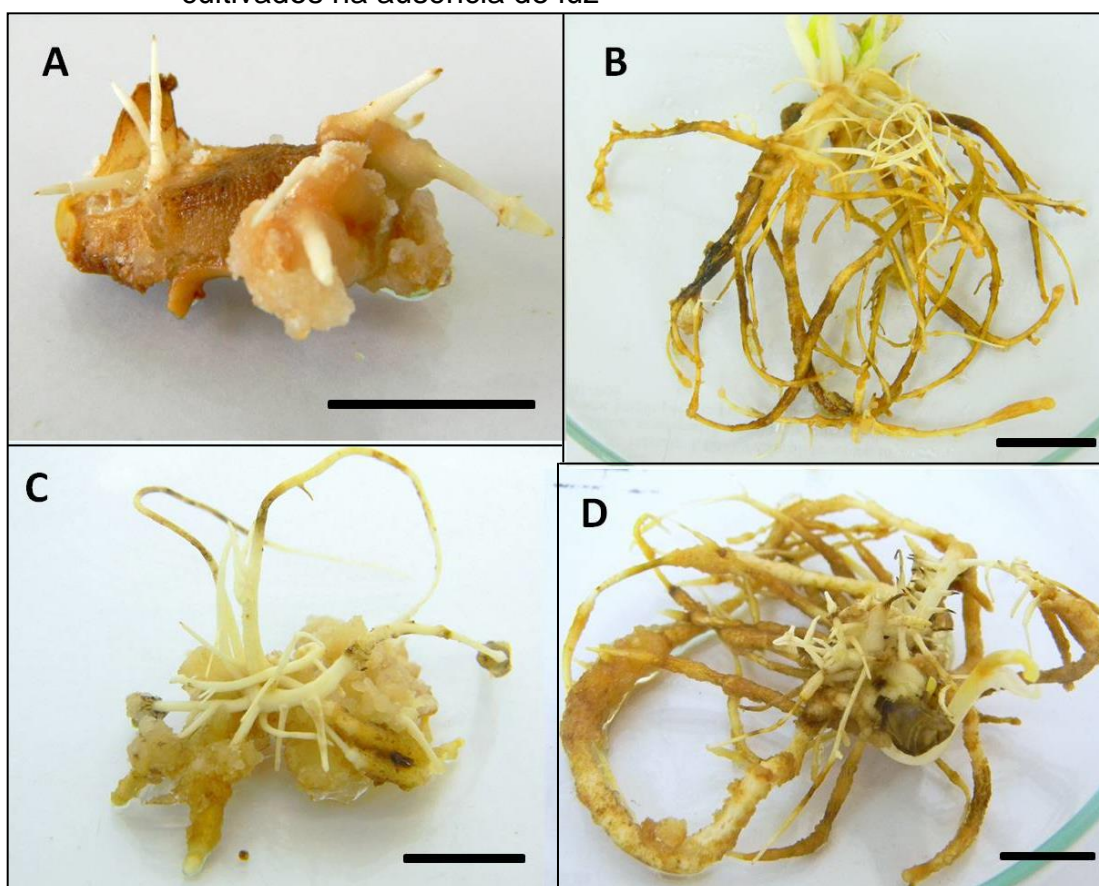
O desenvolvimento de raízes adventícias ocorreu por organogênese direta a partir de cotilédones, eixos e folíolos embrionários, dependendo do regulador de crescimento utilizado e das condições de cultura. Em resposta a 2,4-D, cotilédones e eixos embrionários desenvolveram raízes curtas (0,5 a 1 cm), com surgimento de calos na base (Figura 10 - A). As frequências de rizogênese variaram significativamente, com taxas entre 10 e 90 %, sendo a maior frequência observada a partir de cotilédones cultivados em meio contendo 2,4-D a 22,6  $\mu\text{M}$ , na ausência de luz (Tabela 5). Folíolos embrionários apresentaram rizogênese em resposta apenas às combinações de BAP e ANA e na ausência de luz, em geral apenas uma raiz por explante, com tamanho de aproximadamente 0,5 cm, na região de excisão dos folíolos.

Tabela 5 – Rizogênese a partir de explantes de sementes de *A. pintoii* cultivados em meio MS suplementado com diferentes concentrações de 2,4-D por 60 dias, na presença ou ausência de luz

Fitorreguladores ( $\mu\text{M}$ )	Rizogênese (%)					
	Cotilédone		Eixo		Folíolo	
	CLARO	ESCURO	CLARO	ESCURO	CLARO	ESCURO
4,52	0	0	50	10	0	0
13,56	0	50	0	10	0	0
<b>2,4-D</b> 22,6	20	90	10	10	0	0
31,64	0	10	20	0	0	0
45,2	0	0	0	0	0	0

Em resposta a combinações de BAP e ANA, cotilédones e eixos embrionários apresentaram produção de raízes longas e ramificadas (Figura 10 – B, C e D). Os explantes cultivados na presença de luz apresentaram maior oxidação e menores frequências de regeneração que os cultivados no escuro. As maiores frequências de rizogênese foram observadas a partir de cotilédones, com a formação de um grande número de raízes por explante. A melhor condição para o desenvolvimento de raízes, resultando em uma frequência de 80 %, ocorreu a partir de cotilédones mantidos em meio contendo a menor concentração de BAP testada (0,44  $\mu\text{M}$ ), em combinação com uma alta concentração de ANA (21,6  $\mu\text{M}$ ), na ausência de luz (Tabela 6).

Figura 10 – Rizogênese em *Arachis pintoi* a partir de explantes de cotilédone cultivados na ausência de luz



Legenda: meios contendo (A) 2,4-D a 22,6  $\mu\text{M}$ ; (B) BAP a 0,44  $\mu\text{M}$  e ANA a 10,8  $\mu\text{M}$ ; (C) BAP a 0,44  $\mu\text{M}$  e ANA a 16,2  $\mu\text{M}$ ; (D) BAP a 0,44  $\mu\text{M}$  e ANA a 21,6  $\mu\text{M}$ . Barra = 1 cm.

Tabela 6 – Rizogênese a partir de explantes de sementes de *A. pintoi* cultivados em meio MS suplementado com diferentes combinações de BAP e ANA por 60 dias, na presença ou ausência de luz

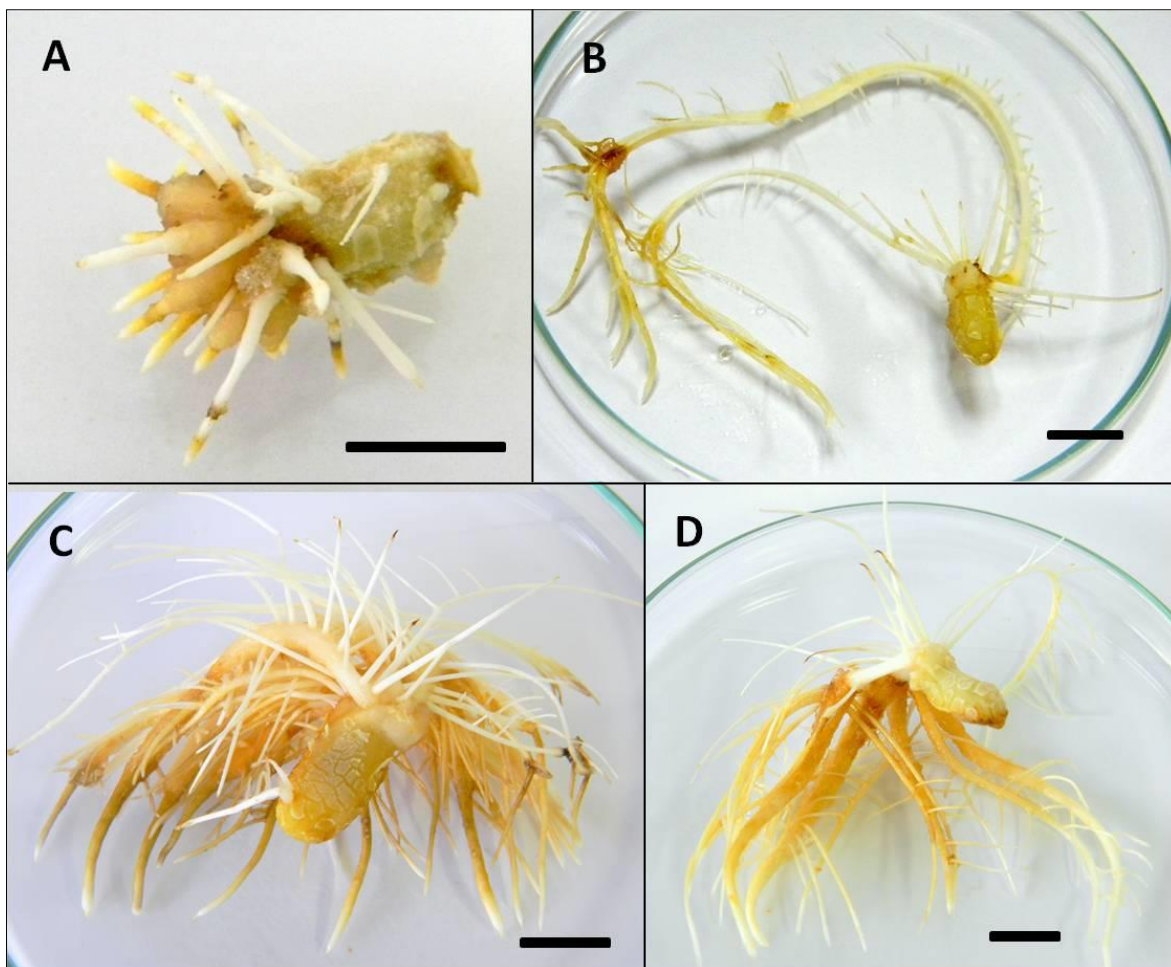
Fitorreguladores ( $\mu\text{M}$ )		Rizogênese (%)					
		Cotilédone		Folíolo		Eixo	
		CLARO	ESCURO	CLARO	ESCURO	CLARO	ESCURO
BAP	ANA						
0,44	10,8	0	50	0	0	40	40
0,44	16,2	40	60	0	0	50	60
0,44	21,6	0	80	0	25	33,3	50
2,2	10,8	0	40	0	0	40	60
2,2	16,2	0	30	0	33,3	0	20
2,2	21,6	30	70	0	100	60	70
4,4	10,8	0	10	0	0	0	0
4,4	16,2	0	10	0	0	0	0
4,4	21,6	0	10	0	0	0	40

Com base nos resultados descritos acima, a cultura de raízes foi continuada apenas com explantes de cotilédones cultivados em meios suplementados com diferentes tipos e concentrações de auxinas e incubados na ausência de luz. Em resposta a AIA, os explantes produziram raízes curtas e não ramificadas (cerca de 1 cm de comprimento), sendo a maior frequência (63,5 %) obtida em resposta à concentração de 17,1  $\mu\text{M}$ . Contudo, o maior acúmulo de biomassa, 0,092 g de peso seco, foi obtido em resposta à concentração de 57  $\mu\text{M}$ , com uma frequência de 55 % (Figura 11 - A, Tabela 7).

Explantes cultivados na presença de AIB apresentaram baixas taxas de rizogênese (10 - 30 %). Contudo, foi observado o desenvolvimento de raízes longas e bastante ramificadas, com um elevado acúmulo de biomassa, que atingiu 0,1639 g de peso seco, a uma frequência de 30 %, em resposta a meio suplementado com AIB a 14,7  $\mu\text{M}$  (Figura 11 - B, Tabela 7).

Em meios contendo ANA, isolado ou em combinação com BAP, foi observado um grande número de raízes longas e ramificadas (Figura 11 - C e D). As taxas de rizogênese variaram entre 10 e 60 %. Os maiores acúmulos de biomassa foram obtidos em resposta à combinação de ANA a 27  $\mu\text{M}$  e BAP a 0,44  $\mu\text{M}$  (0,1508 g de peso seco) e ANA a 54  $\mu\text{M}$  (0,1292 g de peso seco) (Tabelas 7 e 8).

Figura 11 – Rizogênese em *Arachis pintoi* a partir de cotilédones cultivados na ausência de luz, em meio suplementado com diferentes reguladores de crescimento



Legenda: Meios contendo (A) AIA a 57  $\mu\text{M}$ ; (B) AIB a 14,7  $\mu\text{M}$ ; (C) ANA a 16,2  $\mu\text{M}$ ; (D) BAP a 0,44  $\mu\text{M}$  e ANA a 27  $\mu\text{M}$ . Barra = 1 cm.

Tabela 7 – Rizogênese a partir de cotilédones de *A. pintoii* cultivados em meio MS suplementado com diferentes tipos e concentrações de auxinas por 60 dias, na ausência de luz

Fitorregulador (μM)		Rizogênese (%)	Peso Fresco (g)	Peso Seco (g)
	11,4	55	0,19 ± 0,1 <sup>c</sup>	0,03 ± 0,02 <sup>c</sup>
	17,1	63,5	0,4 ± 0,25 <sup>bc</sup>	0,05 ± 0,03 <sup>bc</sup>
AIA	28,5	55	0,43 ± 0,24 <sup>bc</sup>	0,05 ± 0,03 <sup>bc</sup>
	57	55	0,96 ± 0,67 <sup>abc</sup>	0,09 ± 0,06 <sup>abc</sup>
	85,5	45	0,35 ± 0,13 <sup>c</sup>	0,05 ± 0,03 <sup>bc</sup>
	9,8	25	0,84 ± 0,81 <sup>abc</sup>	0,11 ± 0,1 <sup>abc</sup>
	14,7	30	1,64 ± 1,56 <sup>a</sup>	0,16 ± 0,14 <sup>a</sup>
AIB	24,5	25	1,45 ± 0,73 <sup>ab</sup>	0,13 ± 0,07 <sup>abc</sup>
	49	30	1,61 ± 0,96 <sup>a</sup>	0,14 ± 0,08 <sup>ab</sup>
	73,5	10	0,7 ± 0,58 <sup>abc</sup>	0,07 ± 0,05 <sup>abc</sup>
	10,8	10	0,84 ± 0,37 <sup>abc</sup>	0,1 ± 0,04 <sup>abc</sup>
	16,2	13,3	0,87 ± 0,68 <sup>abc</sup>	0,1 ± 0,08 <sup>abc</sup>
ANA	27	26,7	0,84 ± 0,68 <sup>abc</sup>	0,09 ± 0,06 <sup>abc</sup>
	54	42,8	1,19 ± 0,97 <sup>abc</sup>	0,13 ± 0,11 <sup>abc</sup>
	81	33,3	0,93 ± 0,53 <sup>abc</sup>	0,09 ± 0,04 <sup>abc</sup>

Legenda: Valores com letras iguais na mesma coluna não diferiram estatisticamente.

Tabela 8 – Rizogênese a partir de cotilédones de *A. pintoii* cultivados em meio MS suplementado com diferentes combinações de BAP e ANA por 60 dias, na ausência de luz

Fitorregulador (μM)		Rizogênese (%)	Peso Fresco (g)	Peso Seco (g)
BAP	ANA			
	10,8	50	0,19 ± 0,03 <sup>b</sup>	0,03 ± 0,05 <sup>b</sup>
	16,2	60	0,17 ± 0,06 <sup>b</sup>	0,02 ± 0,09 <sup>b</sup>
0,44	27	53,3	1,43 ± 1,09 <sup>a</sup>	0,15 ± 0,10 <sup>a</sup>
	54	40,9	1,1 ± 1,06 <sup>a</sup>	0,12 ± 0,11 <sup>ab</sup>
	81	40	0,88 ± 0,72 <sup>ab</sup>	0,1 ± 0,07 <sup>ab</sup>

Legenda: Valores com letras iguais na mesma coluna não diferiram estatisticamente.

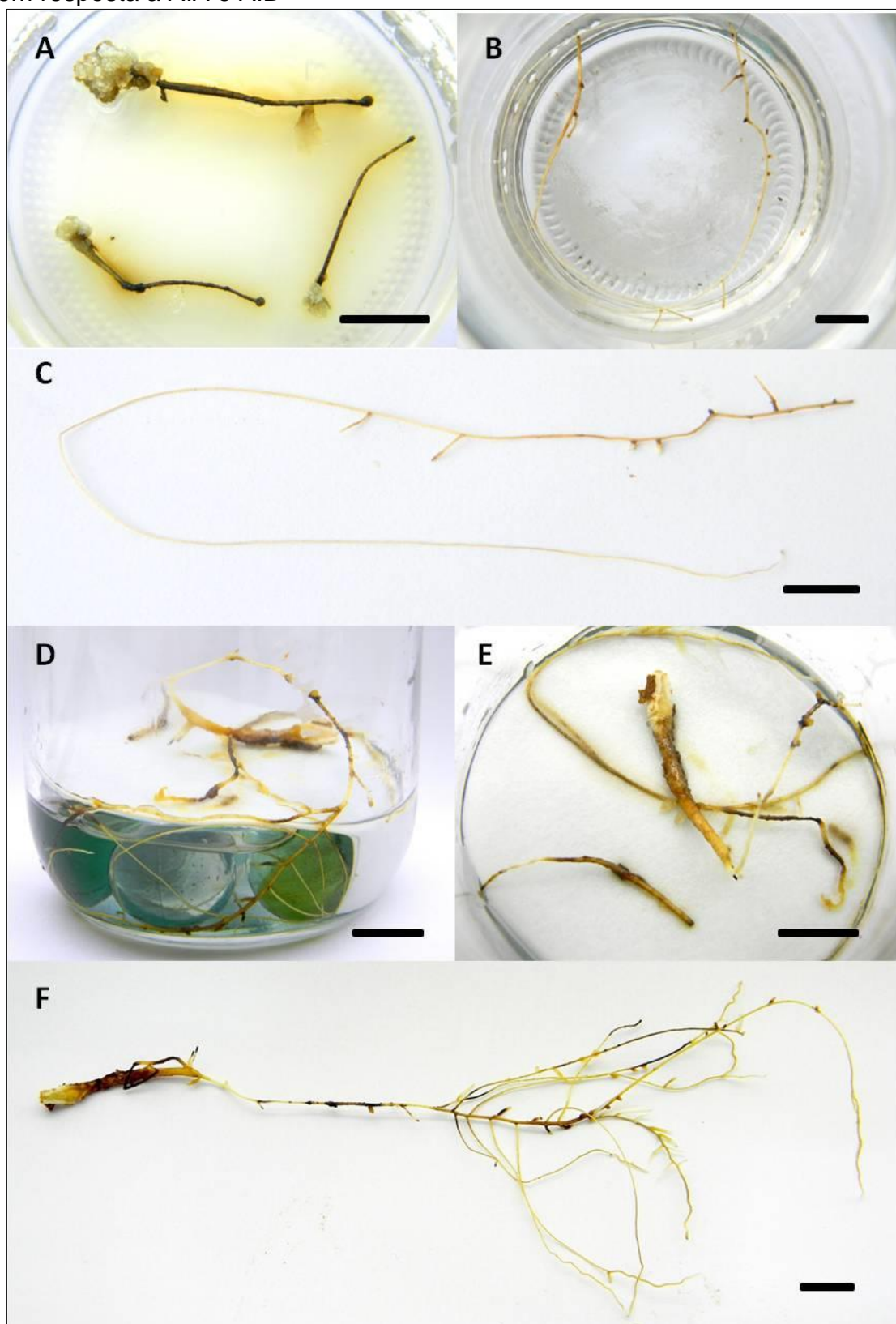
## Multiplicação

Segmentos de raízes adventícias induzidas a partir de cotilédones foram submetidos a cinco diferentes sistemas: meio solidificado com ágar a 0,7 % (frascos de 268 mL ou placas de Petri), meio líquido em frasco de 268 mL mantido sob agitação a 110 rpm ou estático em ponte de papel filtro, ou meio dupla-fase (10 mL de meio líquido sobre 20 mL de meio solidificado). O material cultivado em meios contendo AIA a 57  $\mu\text{M}$  não apresentou proliferação de raízes em nenhum dos sistemas avaliados, apresentando apenas a formação de calos com oxidação dos explantes (Figura 12 - A). Por outro lado, os segmentos cultivados em AIB a 14,7  $\mu\text{M}$  originaram raízes alongadas, sem ramificações, a uma frequência de 33 %, quando cultivados submersos em meio líquido (Figura 12 - B e C), ou com desenvolvimento de ramificações a uma frequência de 33 %, quando em ponte de papel em meio líquido (Figura 12 - D, E e F).

Os segmentos cultivados em meio suplementado com a combinação de BAP a 0,44  $\mu\text{M}$  e ANA a 27  $\mu\text{M}$  desenvolveram calos com sinais de oxidação em quase todos os sistemas avaliados, exceto em meio líquido em ponte de papel, onde foi observado o início do desenvolvimento de raízes secundárias, paralelamente ao escurecimento do meio de cultura, devido à oxidação dos explantes (Figura 13 - A).

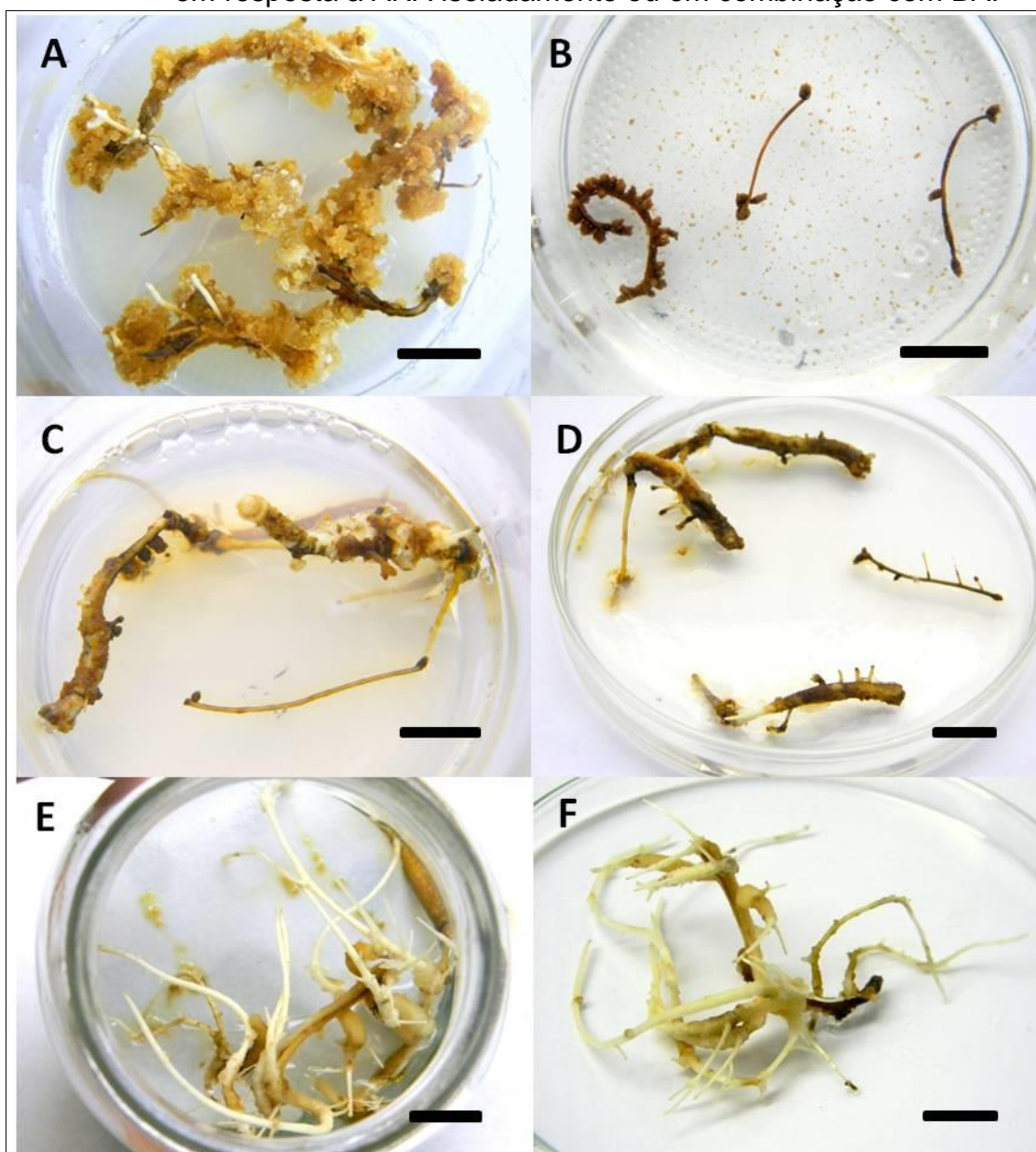
Uma intensa oxidação também foi observada em meio líquido suplementado com ANA a 54  $\mu\text{M}$  (Figura 13 - B). Com este tipo de fitoregulador, os explantes cultivados apresentaram apenas o alongamento das raízes quando cultivados em meio sólido em frascos de vidro, a uma frequência de 80 % (Figura 13 - C), ou em placas de Petri, a uma frequência de 75 % (Figura 13 - D). Por outro lado, quando inoculados em meio líquido sobre pontes de papel filtro, os mesmos explantes desenvolveram raízes grossas e ramificadas (Figura 13 - E e F), a uma frequência de 73 % (dados não mostrados).

Figura 12 – Desenvolvimento de segmentos radiculares em diferentes sistemas em resposta a AIA e AIB



Legenda: (A) Calogênese em meio MS sólido em frasco de 268 mL contendo AIA a  $57 \mu\text{M}$ ; (B) e (C) Raízes alongadas em meio MS líquido sob agitação contendo AIB a  $14,7 \mu\text{M}$ ; (D), (E) e (F) Raízes ramificadas em meio MS líquido em ponte de papel contendo AIB a  $14,7 \mu\text{M}$ . Barra = 1 cm.

Figura 13 – Desenvolvimento de segmentos radiculares em diferentes sistemas em resposta a ANA isoladamente ou em combinação com BAP



Legenda: (A) Alongamento de raízes em meio MS sólido em frasco de 268 mL contendo ANA a 54  $\mu\text{M}$ ; (B) Alongamento de raízes em meio MS sólido em placa de Petri contendo ANA a 54  $\mu\text{M}$ ; (C) e (D) Raízes ramificadas em meio MS líquido em ponte de papel contendo ANA a 54  $\mu\text{M}$ ; (E) Oxidação em meio líquido sob agitação contendo ANA a 54  $\mu\text{M}$ ; (F) Calogênese em meio MS sólido em frascos contendo BAP a 0,44  $\mu\text{M}$  e ANA a 27  $\mu\text{M}$ . Barra = 1 cm.

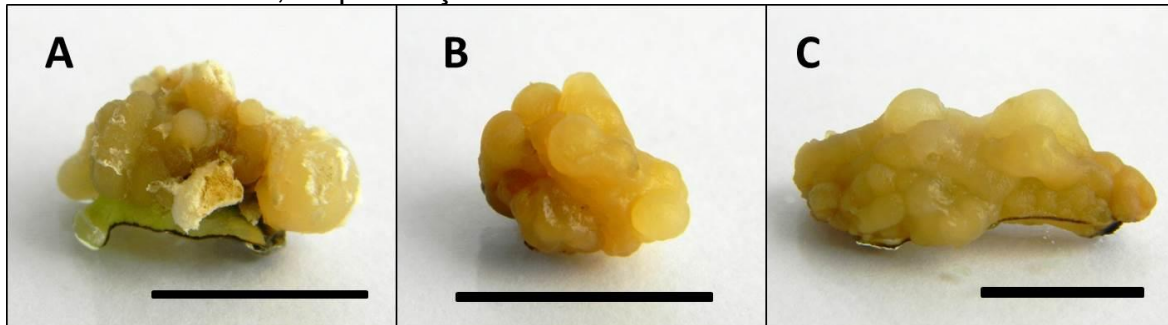
## 7.1.2. Morfogênese a partir de explantes de plantas *in vitro*

### 7.1.2.1. Calogênese

Folíolos, nós e entrenós excisados de plantas *in vitro* apresentaram desenvolvimento de diferentes tipos de calos não morfogênicos em resposta aos fitorreguladores testados.

Na presença de PIC, todos os explantes desenvolveram calos mucilaginosos (Figura 14 - A, B e C), tendo as maiores taxas de calogênese sido observadas a partir de explantes de foliares cultivados na ausência de luz (63,5 - 90,6 %), sendo a maior taxa obtida em resposta a PIC a 20,7  $\mu\text{M}$  (Tabela 9).

Figura 14 – Calogênese a partir de explantes excisados de plantas *in vitro* de *A. pintoi* cultivados em meio MS suplementado com PIC a 4,14  $\mu\text{M}$  por 60 dias, na presença de luz



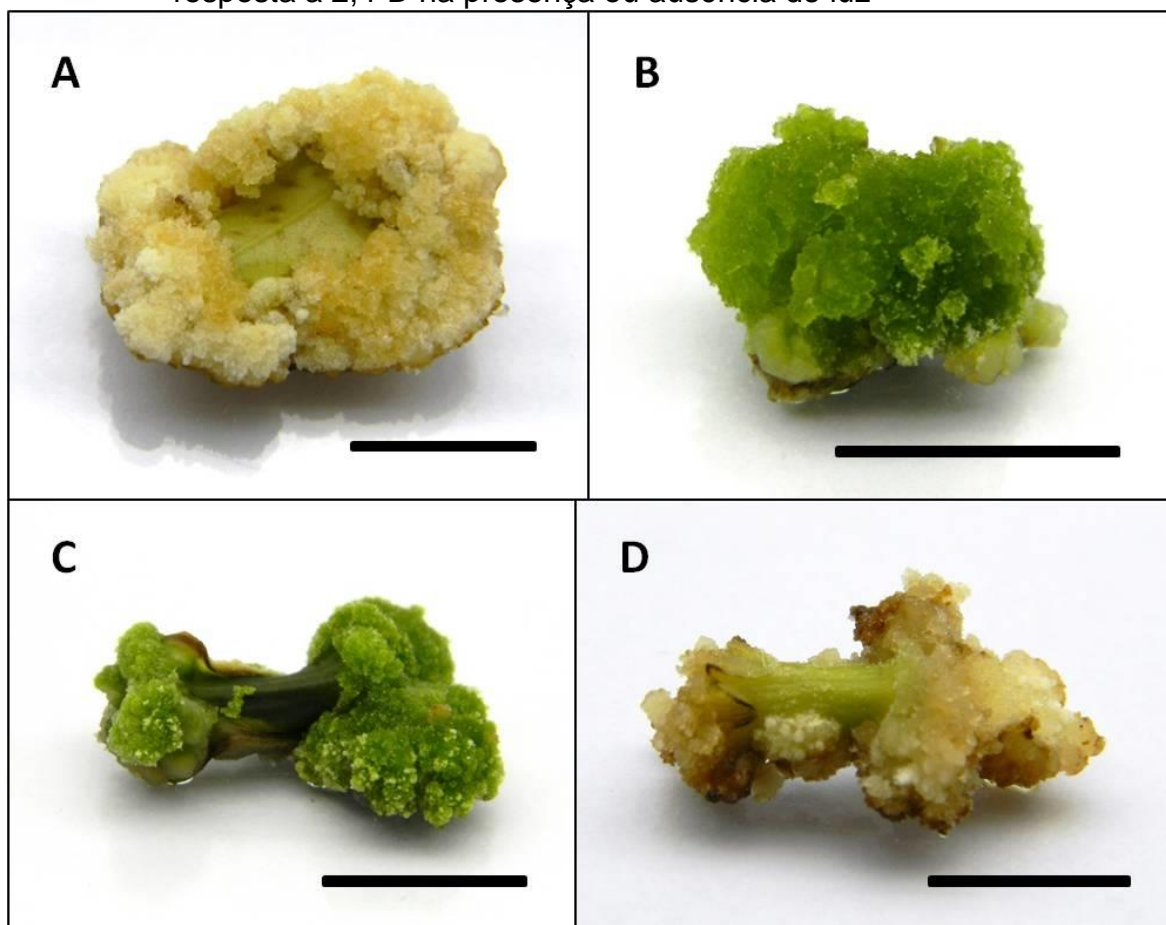
Legenda: (A) folíolo; (B) nó e (C) entrenó. Barra = 1 cm.

Tabela 9 – Calogênese a partir de explantes excisados de plantas *in vitro* de *A. pintoi* cultivados em meio MS suplementado com diferentes concentrações de PIC ou 2,4-D por 60 dias, na presença ou ausência de luz

Fitorreguladores ( $\mu$ M)	FOLÍOLO				NÓ				ENTRENÓ				
	CLARO		ESCURO		CLARO		ESCURO		CLARO		ESCURO		
	Calos (%)	Tipo do calo	Calos (%)	Tipo do calo	Calos (%)	Tipo do calo	Calos (%)	Tipo do calo	Calos (%)	Tipo do calo	Calos (%)	Tipo do calo	
PIC	4,14	40,6	MUCIL.	78	MUCIL.	58,3	MUCIL.	45,8	MUCIL.	54,1	MUCIL.	33,3	MUCIL.
	12,42	41,6	MUCIL.	87,5	MUCIL.	25	MUCIL.	29,1	MUCIL.	41,6	MUCIL.	37,5	MUCIL.
	20,7	45	MUCIL.	90,6	MUCIL.	8,3	MUCIL.	25	MUCIL.	29,1	MUCIL.	30	MUCIL.
	28,98	42,7	MUCIL.	63,5	MUCIL.	12,5	MUCIL.	20,8	MUCIL.	29,1	MUCIL.	29,1	MUCIL.
	41,4	35,4	MUCIL.	78	MUCIL.	4,1	MUCIL.	16,6	MUCIL.	8,3	MUCIL.	33,3	MUCIL.
2,4-D	4,52	0	-	0	-	29,1	MISTO	16,6	FRIÁVEL	5	COMPAC.	25	FRIÁVEL
	13,56	0	-	0	-	60	MISTO	37,5	FRIÁVEL	8	COMPAC.	50	FRIÁVEL
	22,6	0	-	6,2	FRIÁVEL	45	MISTO	37,5	FRIÁVEL	37,5	COMPAC.	66,6	FRIÁVEL
	31,64	0	-	12,5	FRIÁVEL	54,1	MISTO	54,1	FRIÁVEL	60	MISTO	70,8	FRIÁVEL
	45,2	0	-	37,5	FRIÁVEL	60	MISTO	55	FRIÁVEL	60	MISTO	75	FRIÁVEL
TDZ	4,54	62,5	MISTO	62,5	COMPAC.	90	MISTO	100	MISTO	90	MISTO	75	MISTO
	13,62	80	COMPAC.	58,3	COMPAC.	91,6	COMPAC.	100	MISTO	100	COMPAC.	90	MISTO
	22,7	80	COMPAC.	100	COMPAC.	100	COMPAC.	100	MISTO	100	COMPAC.	75	MISTO
	31,78	70	COMPAC.	93,75	COMPAC.	100	COMPAC.	100	MISTO	100	COMPAC.	100	MISTO
	45,4	70	COMPAC.	81,25	COMPAC.	87,5	COMPAC.	100	MISTO	100	COMPAC.	100	MISTO

Os calos obtidos em resposta a 2,4-D apresentaram consistência compacta, mista ou friável. Explantes foliares só apresentaram resposta quando cultivados na ausência de luz, em meios contendo altas concentrações do fitorregulador (Figura 15 - A). Segmentos nodais desenvolveram calos mistos na presença de luz e friáveis na ausência de luz (Figura 15 - B). Segmentos internodais também desenvolveram apenas calos friáveis no escuro, enquanto que, na presença de luz, calos compactos foram observados em resposta às menores concentrações e calos mistos às maiores concentrações testadas (Figura 15 - C e D). As maiores taxas de calogênese foram observadas a partir de entrenós cultivados na ausência de luz em resposta à maior concentração testada de 45,2  $\mu\text{M}$  de 2,4-D (Tabela 9).

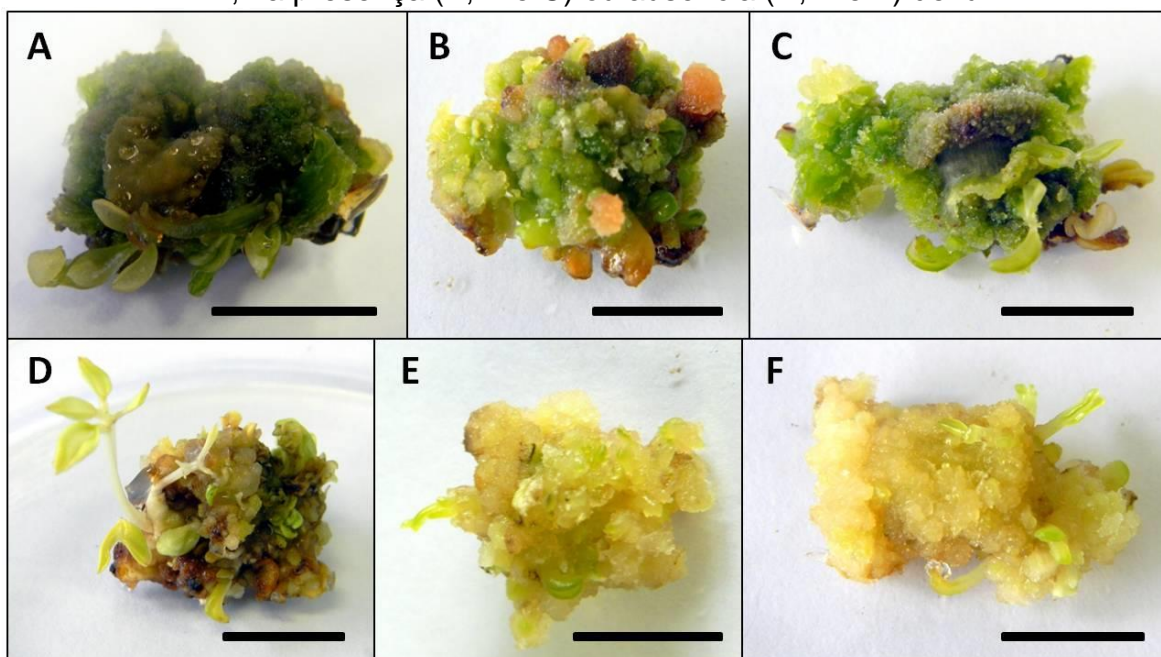
Figura 15 – Calogênese a partir de explantes de plantas *in vitro* de *A. pintoi* em resposta a 2,4-D na presença ou ausência de luz



Legenda: (A) folíolo cultivado em 2,4-D a 45,2  $\mu\text{M}$ , na ausência de luz; (B) nó cultivado em 2,4-D a 22,6  $\mu\text{M}$ , na presença de luz; (C) entrenó cultivado em 2,4-D a 13,56  $\mu\text{M}$ , na presença de luz; (D) entrenó cultivado em 2,4-D a 13,56  $\mu\text{M}$ , na ausência de luz. Barra = 1 cm.

Os calos obtidos em resposta a TDZ variaram entre compactos e mistos, sendo observadas altas taxas de calogênese, entre 62,5 e 100 % (Tabela 9). Calos compactos foram obtidos a partir de explantes caulinares cultivados na presença de luz, ou de explantes foliares mantidos em ambas as condições de luminosidade. Por outro lado, calos mistos foram observados a partir de quase todos os explantes mantidos em meio suplementado com a menor concentração de TDZ testada ( $4,54 \mu\text{M}$ ), na ausência de luz. A formação de gemas ocorreu nos três tipos de explantes avaliados, com o desenvolvimento de brotos principalmente na ausência de luz, embora estes tenham apresentado estiolamento (Figura 16 - A a F).

Figura 16 – Calogênese a partir de explantes de plantas *in vitro* em resposta a TDZ, na presença (A, B e C) ou ausência (D, E e F) de luz

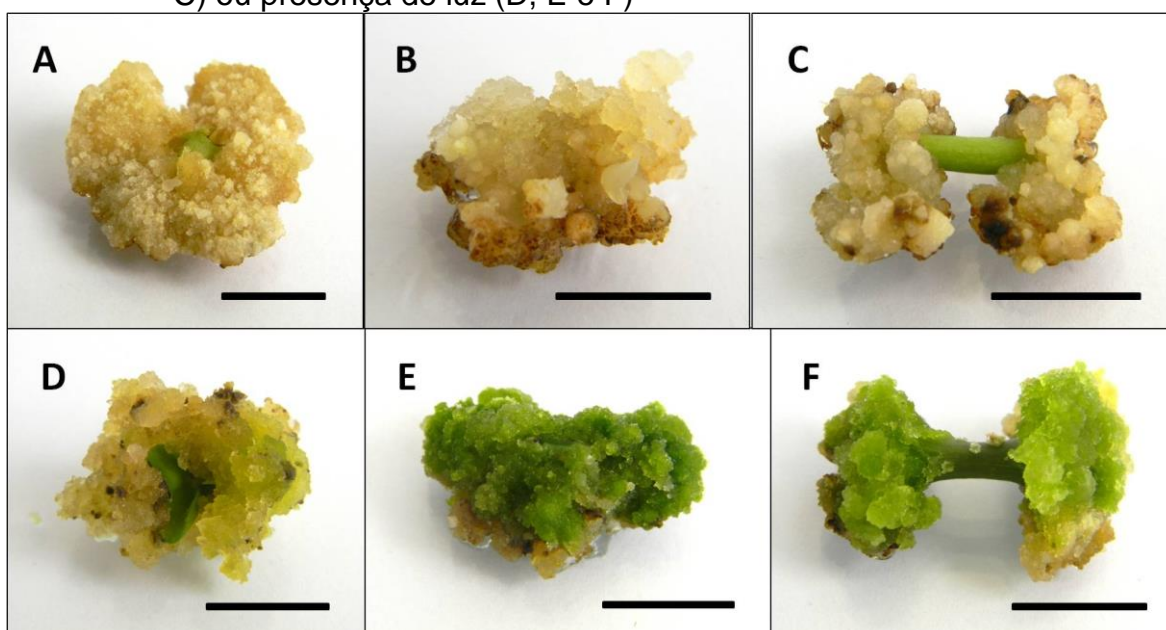


Legenda: (A) folíolo cultivado em TDZ a  $4,54 \mu\text{M}$ ; (B) nó cultivado em TDZ a  $45,4 \mu\text{M}$ ; (C) entrenó cultivado em TDZ a  $31,78 \mu\text{M}$ ; (D) folíolo cultivado em TDZ a  $45,4 \mu\text{M}$ ; (E) nó cultivado em TDZ a  $4,54 \mu\text{M}$ ; (F) entrenó cultivado em TDZ a  $4,54 \mu\text{M}$ . Barra = 1 cm.

As combinações de BAP e ANA testadas induziram a formação de calos mistos e friáveis. Em meios suplementados com BAP a  $0,44 \mu\text{M}$  e diferentes concentrações de ANA, todos os explantes produziram calos mistos, com região compacta verde e região friável mais clara, na ausência de luz (Figura 17 - A, B e

C). Na presença de luz, entretanto, foi observada a formação de calos friáveis, com frequências entre 80 e 100 % (Figura 17 - D, E e F). Em meios suplementados com BAP a 2,2 ou 4,4  $\mu\text{M}$  em combinação com ANA, os explantes também originaram predominantemente calos mistos, na presença de luz, e friáveis, na ausência de luz, com frequências entre 55 e 100 % (Figura 17 - A a F, Tabela 10).

Figura 17 – Calogênese a partir de explantes de plantas *in vitro* em resposta a BAP a 2,2  $\mu\text{M}$  em combinação com ANA na ausência de luz (A, B e C) ou presença de luz (D, E e F)



Legenda: (A) folíolo cultivado em BAP a 2,2  $\mu\text{M}$  e ANA a 21,6  $\mu\text{M}$ ; (B) nó cultivado em BAP a 2,2  $\mu\text{M}$  e ANA a 10,8  $\mu\text{M}$ ; (C) entrenó cultivado em BAP a 2,2  $\mu\text{M}$  e ANA a 10,8  $\mu\text{M}$ ; (D) folíolo cultivado em BAP a 2,2  $\mu\text{M}$  e ANA a 10,8  $\mu\text{M}$ ; (E) nó cultivado em BAP a 2,2  $\mu\text{M}$  e ANA a 16,2  $\mu\text{M}$ ; (F) entrenó cultivado em BAP a 2,2  $\mu\text{M}$  e ANA a 10,8  $\mu\text{M}$ . Barra = 1 cm.

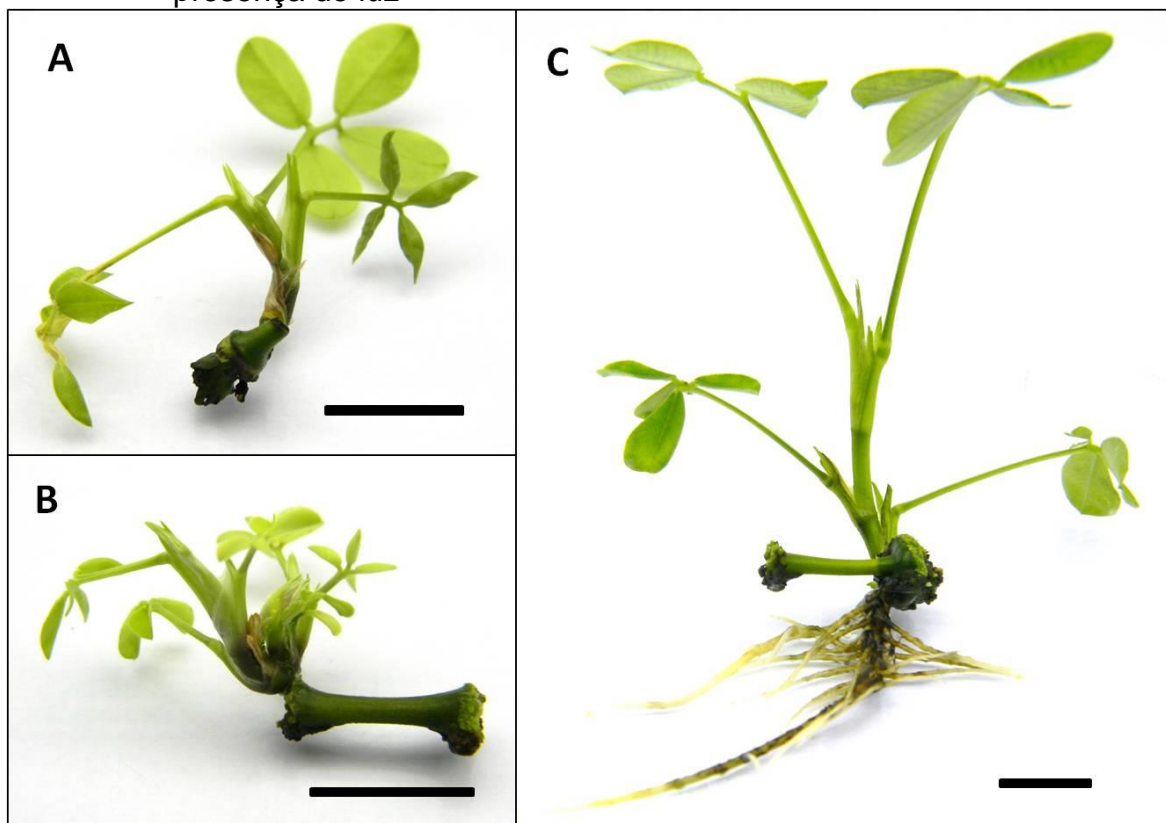
Tabela 10 – Calogênese a partir de explantes excisados de plantas *in vitro* de *A. pintoi* cultivados em meio MS suplementado com diferentes combinações de BAP e ANA por 60 dias, na presença ou ausência de luz

Fitorreguladores ( $\mu\text{M}$ )		FOLÍOLO				NÓ				ENTRENÓ			
		CLARO		ESCURO		CLARO		ESCURO		CLARO		ESCURO	
BAP	ANA	Calos (%)	Tipo do calo	Calos (%)	Tipo do calo	Calos (%)	Tipo do calo	Calos (%)	Tipo do calo	Calos (%)	Tipo do calo	Calos (%)	Tipo do calo
0,44	10,8	83,3	MISTO	81,2	FRIÁVEL	80	MISTO	83,3	FRIÁVEL	95,8	MISTO	90	FRIÁVEL
0,44	16,2	90	MISTO	90,6	FRIÁVEL	85	MISTO	85	FRIÁVEL	85	MISTO	95	FRIÁVEL
0,44	21,6	85,7	MISTO	100	FRIÁVEL	100	MISTO	83,3	FRIÁVEL	91,6	MISTO	87,5	FRIÁVEL
2,2	10,8	90	MISTO	55	MISTO	100	MISTO	100	MISTO	93,3	MISTO	100	FRIÁVEL
2,2	16,2	93,3	MISTO	100	MISTO	90	MISTO	66,6	FRIÁVEL	93,3	MISTO	100	FRIÁVEL
2,2	21,6	100	MISTO	100	FRIÁVEL	100	MISTO	100	FRIÁVEL	100	FRIÁVEL	93,3	FRIÁVEL
4,4	10,8	100	FRIÁVEL	75	FRIÁVEL	100	MISTO	100	MISTO	87,5	FRIÁVEL	100	MISTO
4,4	16,2	93,7	FRIÁVEL	100	MISTO	100	MISTO	100	FRIÁVEL	91,6	MISTO	83,3	MISTO
4,4	21,6	100	FRIÁVEL	100	MISTO	100	MISTO	83,3	FRIÁVEL	87,5	MISTO	83,3	FRIÁVEL
8,8	0,54	58,3	FRIÁVEL	65	FRIÁVEL	100	COMPAC.	100	MISTO	100	FRIÁVEL	83,3	FRIÁVEL
13,2	0,54	75	FRIÁVEL	87,5	FRIÁVEL	100	COMPAC.	100	FRIÁVEL	85	COMPAC.	90	FRIÁVEL
17,6	0,54	100	FRIÁVEL	100	FRIÁVEL	100	MISTO	90	FRIÁVEL	90	COMPAC.	90	FRIÁVEL
8,8	2,7	100	FRIÁVEL	100	FRIÁVEL	50	COMPAC.	80	COMPAC.	90	COMPAC.	90	COMPAC.
13,2	2,7	100	FRIÁVEL	100	FRIÁVEL	58,3	COMPAC.	90	COMPAC.	100	COMPAC.	90	COMPAC.
17,6	2,7	100	FRIÁVEL	100	FRIÁVEL	80	COMPAC.	80	COMPAC.	100	COMPAC.	80	COMPAC.
8,8	5,4	75	FRIÁVEL	75	FRIÁVEL	100	MISTO	100	MISTO	100	MISTO	91,6	MISTO
13,2	5,4	83,3	FRIÁVEL	87,5	FRIÁVEL	75	MISTO	100	MISTO	100	MISTO	93,7	MISTO
17,6	5,4	81,2	FRIÁVEL	100	FRIÁVEL	100	MISTO	100	FRIÁVEL	83,3	MISTO	83,3	FRIÁVEL

### 7.1.2.2. Produção de plantas

Brotos foram obtidos a partir de segmentos nodais e internodais cultivados em meios suplementados com 2,4-D a  $4,52 \mu\text{M}$  ou com combinações de BAP e ANA (1,0 broto por explante) (Figura 18 - A, B e C, Tabela 11). Os explantes cultivados em meios suplementados com combinações de BAP e ANA apresentaram as maiores frequências a partir de segmentos nodais (33,3 %) e internodais (25 %).

Figura 18 – Desenvolvimento de plantas em meio suplementado com 2,4-D na presença de luz



Legenda: (A) nó em resposta a 2,4-D a  $4,52 \mu\text{M}$  e (B) entrenó em resposta a 2,4-D a  $13,56 \mu\text{M}$ ; (C) entrenó em resposta a 2,4-D a  $4,52 \mu\text{M}$ . Barra = 1 cm.

Tabela 11 – Regeneração de plantas a partir de explantes excisados de plantas *in vitro* de *A. pintoii* cultivados em meio MS suplementado com 2,4-D ou TDZ ou combinações de BAP e ANA por 60 dias, na presença de luz

Fitorreguladores ( $\mu\text{M}$ )			NÓ				ENTRENÓ			
			CLARO		ESCURO		CLARO		ESCURO	
2,4-D	BAP	ANA	Reg. (%)	Nº de brotos/explante	Reg. (%)	Nº de brotos/explante	Reg. (%)	Nº de brotos/explante	Reg. (%)	Nº de brotos/explante
4,52	0	0	50	1	33,3	1	37,5	1	16,6	1
13,56	0	0	0	-	0	-	0	-	0	-
22,6	0	0	0	-	0	-	0	-	0	-
31,64	0	0	0	-	0	-	0	-	0	-
45,2	0	0	0	-	0	-	0	-	0	-
0	0,44	10,8	0	-	0	-	0	-	0	-
0	0,44	16,2	0	-	0	-	0	-	0	-
0	0,44	21,6	0	-	4,15	1	0	-	0	-
0	2,2	10,8	20	1	20	1	20	2	0	-
0	2,2	16,2	30	1	0	-	6	1	20	1
0	2,2	21,6	20	1	20	1	0	-	0	-
0	4,4	10,8	8,3	1	0	-	0	-	0	-
0	4,4	16,2	33,3	1	0	-	25	1	0	-
0	4,4	21,6	8,3	1	0	-	12,5	1	0	-

## 7.2. Avaliação fitoquímica

Para o estudo fitoquímico da espécie *A. pintoii*, foram preparados extratos metanólicos de sementes, plantas *in vivo* cultivadas em casa de vegetação, plantas obtidas *in vitro* e raízes adventícias formadas em resposta a diferentes auxinas (Quadro 3).

Quadro 3 – Extratos em etanol 80 % preparados a partir de diferentes materiais para a análise fitoquímica, através de CCD e CLAE, e do potencial antioxidante, pelo ensaio do DPPH

Material	Número	Material	Número
Cotilédones	I	Folhas – plantas <i>in vivo</i>	VII
Sementes com tegumento	II	Raízes – plantas <i>in vivo</i>	VIII
Sementes sem tegumento	III	Caules – plantas <i>in vivo</i>	IX
Folhas – plantas <i>in vitro</i>	IV	Raízes – ANA 54 $\mu\text{M}$	X
Raízes – plantas <i>in vitro</i>	V	Raízes – AIA 57 $\mu\text{M}$	XI
Caules – plantas <i>in vitro</i>	VI	Raízes – AIB 14,7 $\mu\text{M}$	XII

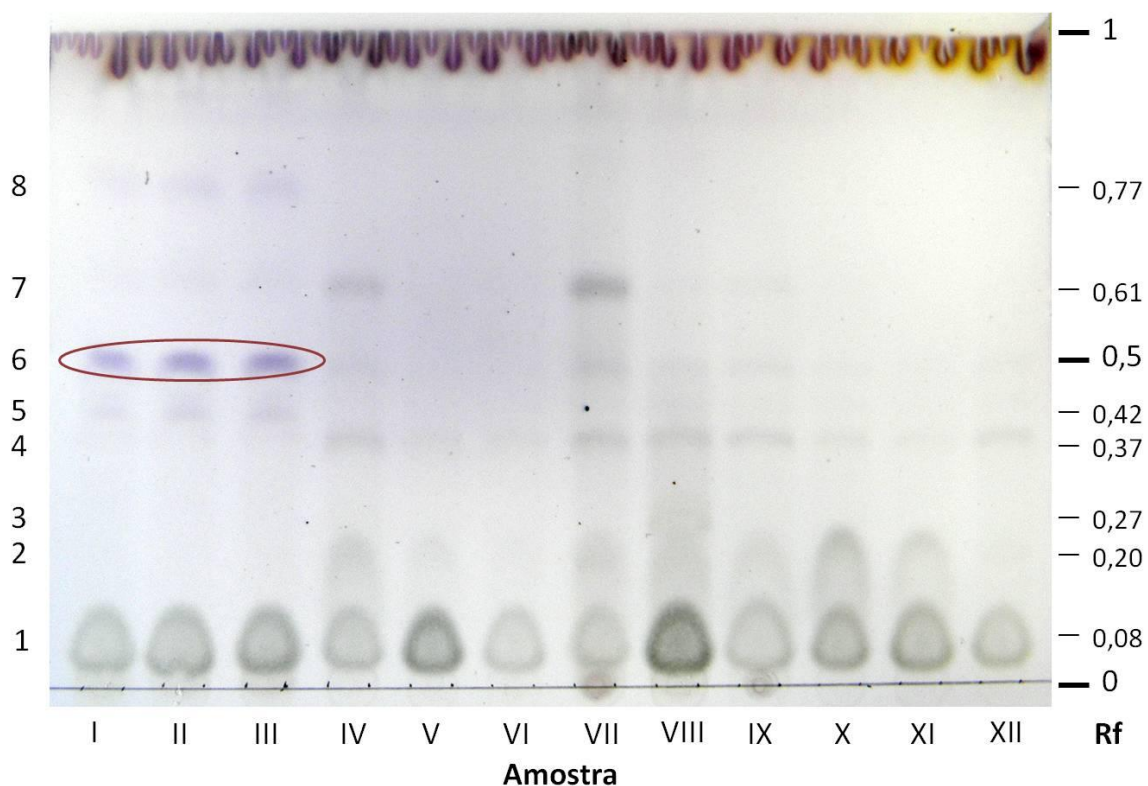
### 7.2.1. Perfil fitoquímico por cromatografia em camada delgada (CCD)

Os diferentes extratos foram avaliados quanto à presença de diferentes grupos de substâncias através da técnica de CCD, em condições específicas para a detecção de triterpenos, saponinas, alcaloides, cumarinas, flavonoides, estilbenoides e outras substâncias fenólicas, conforme descrito no Quadro 2.

Para a avaliação da presença de triterpenos e diferenciação do subgrupo das saponinas, foram utilizadas duas condições diferentes. Amostras de extratos provenientes de sementes (I, II e III) apresentaram padrão de bandas semelhante na avaliação de triterpenos, com uma banda arroxeadada intensa visualizada em luz visível, e rosa avermelhada quando observada a 365 nm (Banda 6, Figuras 19 e 20). As bandas 5 e 8, embora menos intensas, apresentaram a mesma coloração. As demais bandas apresentaram coloração acinzentada. Extratos de folhas de

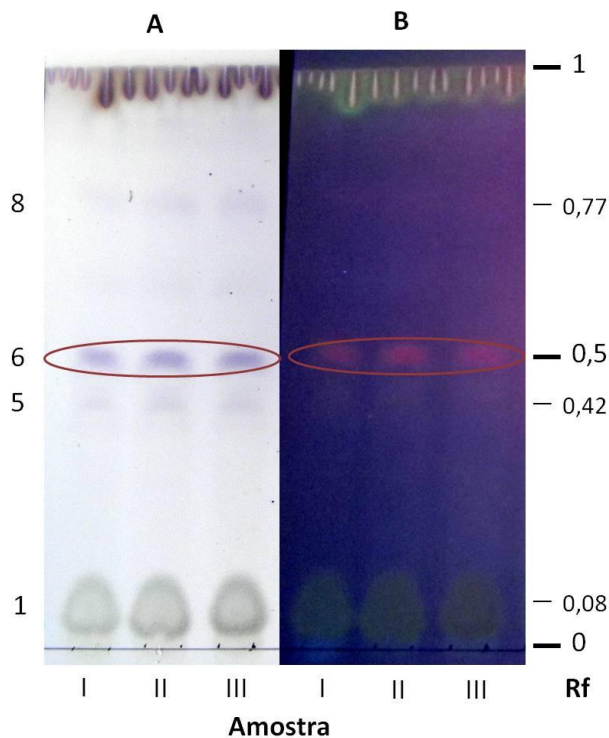
plantas mantidas *in vivo* e *in vitro* (IV e VII, respectivamente) apresentaram uma substância em comum, correspondente à banda 7. As bandas 2 e 4 foram observadas apenas em extratos de folhas, caules e raízes. A banda 1 foi detectada em todas as amostras, enquanto que a banda 3, apenas em amostra de raízes de plantas mantidas *in vivo* (VIII).

Figura 19 – Cromatografia em camada delgada para detecção de triterpenos, utilizando como eluente uma mistura de acetato de etila, ácido acético glacial, ácido fórmico e água (50:5,5:5,5:13) e revelador anisaldeído sulfúrico, registrada em luz visível



Legenda: I - cotilédones, II - sementes com tegumento, III - sementes sem tegumento, IV - folhas de plantas *in vitro*, V - raízes de plantas *in vitro*, VI - caules de plantas *in vitro*, VII - folhas de plantas *in vivo*, VIII - raízes de plantas *in vivo*, IX- caules de plantas *in vivo*, X - raízes induzidas em ANA, XI - raízes induzidas em AIA, XII - raízes induzidas em AIB.

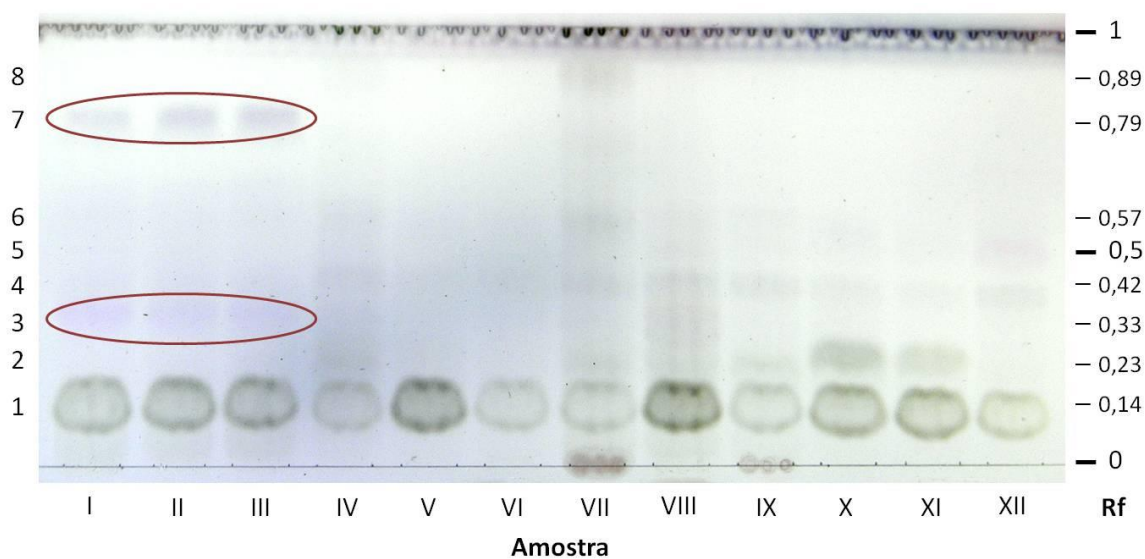
Figura 20 – Cromatografia em camada delgada para detecção de triterpenos, utilizando como eluente uma mistura de acetato de etila, ácido acético glacial, ácido fórmico e água (50:5,5:5,5:13) e revelador anisaldeído sulfúrico, registrada em luz visível (A) e a 365 nm (B)



Legenda: I - cotilédones, II - sementes com tegumento, III - sementes sem tegumento.

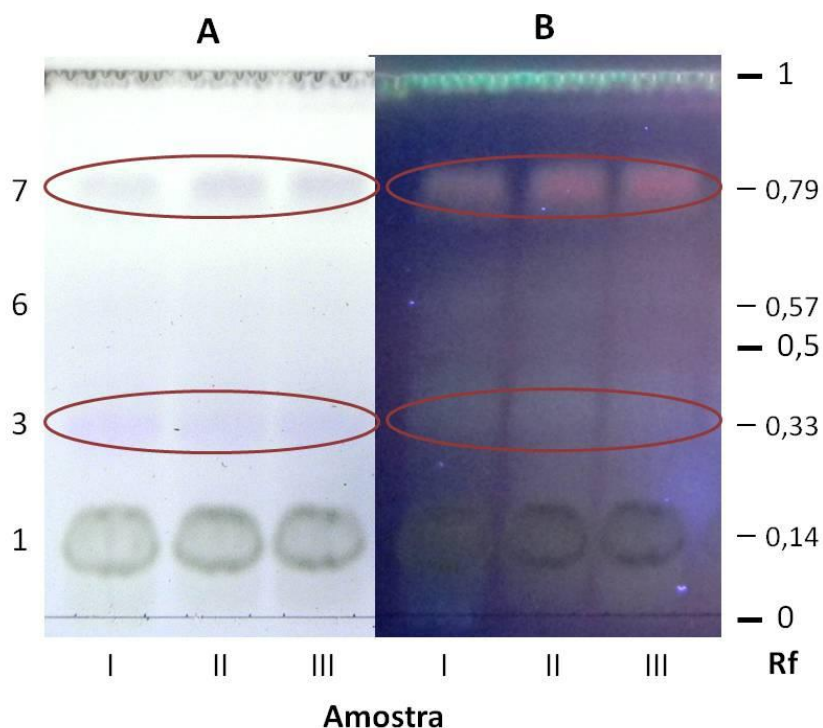
Na análise para a presença de saponinas também foi observado um total de oito bandas. Em extratos provenientes de sementes (I, II e III), foi detectada uma coloração arroxeada mais intensa na banda 7, quando observada sob luz visível, e coloração rosa avermelhada a 365 nm (Figuras 21 e 22). Esses extratos apresentaram também uma banda de coloração roxa azulada (Banda 3). Na condição para detecção de alcaloides, nenhuma banda foi observada.

Figura 21 – Cromatografia em camada delgada para detecção de saponinas, utilizando como eluente clorofórmio, ácido acético glacial, metanol e água (32:16:6:4) e revelador anisaldeído sulfúrico, registrada em luz visível



Legenda: I - cotilédones, II - sementes com tegumento, III - sementes sem tegumento, IV - folhas de plantas *in vitro*, V - raízes de plantas *in vitro*, VI - caules de plantas *in vitro*, VII - folhas de plantas *in vivo*, VIII - raízes de plantas *in vivo*, IX - caules de plantas *in vivo*, X - raízes induzidas em ANA, XI - raízes induzidas em AIA, XII - raízes induzidas em AIB.

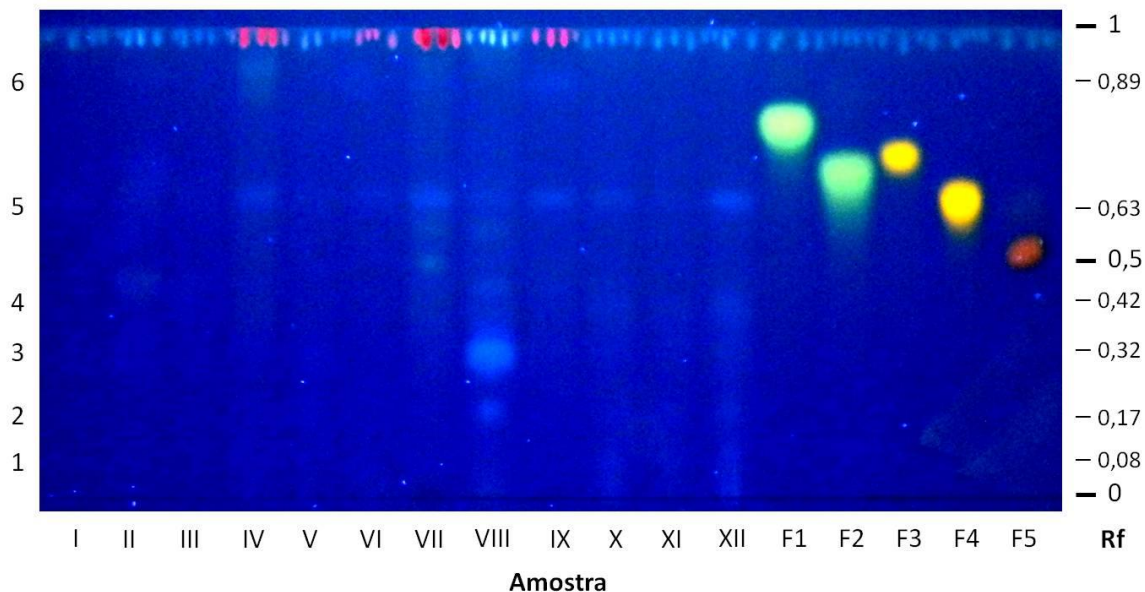
Figura 22 – Cromatografia em camada delgada para detecção de saponinas, utilizando como eluente clorofórmio, ácido acético glacial, metanol e água (32:16:6:4) e revelador anisaldeído sulfúrico, registrada em luz visível (A) e a 365 nm (B)



Legenda: I - cotilédones, II - sementes com tegumento, III - sementes sem tegumento.

Para o estudo dos flavonoides, foram utilizados padrões de vitexina ( $R_f = 0,81$ , coloração verde clara), isovitexina ( $R_f = 0,7$ , coloração verde clara), orientina ( $R_f = 0,73$ , coloração amarela), isorientina ( $R_f = 0,63$ , coloração amarela) e rutina ( $R_f = 0,52$ , coloração alaranjada). Foram detectadas seis bandas com coloração azul clara, que diferiram da coloração dos padrões de flavonoides analisados (Figura 23). Substâncias com fluorescência foram visualizadas local de aplicação das amostras. A banda 1 só foi detectada em extratos de raízes adventícias induzidas na presença de auxinas (amostras X, XI e XII), enquanto que as bandas 2 e 4 também foram observadas em extrato de raízes de plantas mantidas *in vivo* (VIII). A banda 3 foi visualizada apenas em raízes de plantas mantidas *in vivo*. Quando utilizada a condição para detecção de cumarinas, sem revelação e com visualização em 365 nm, não foram observadas bandas com fluorescência.

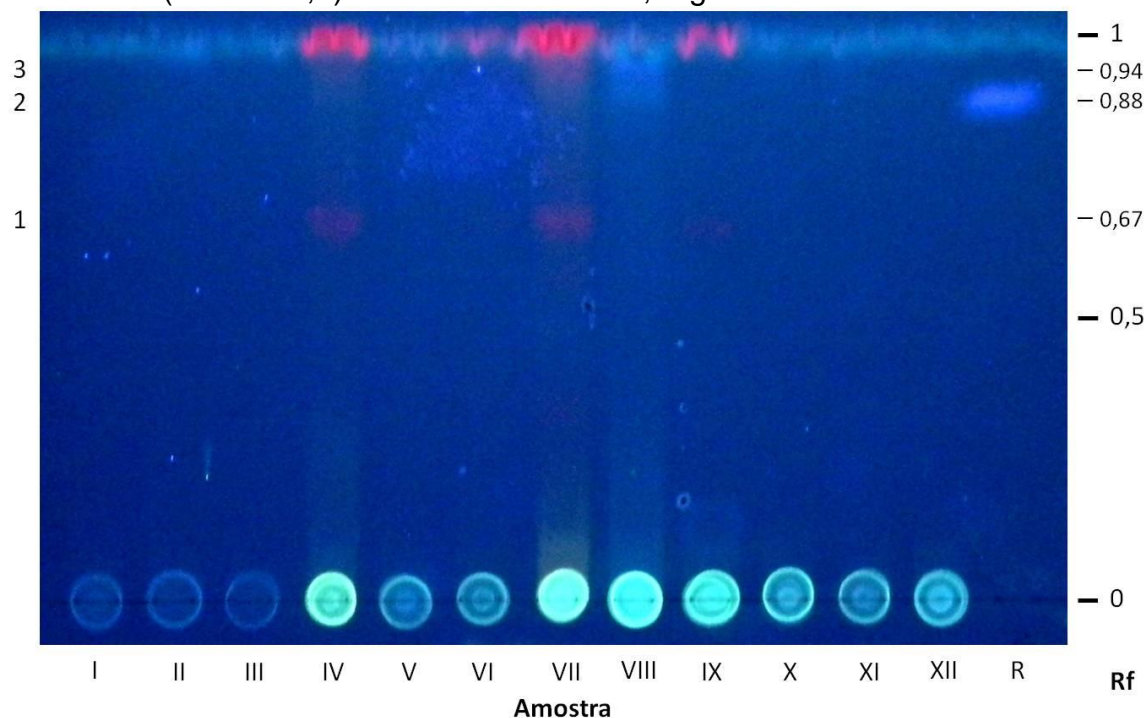
Figura 23 – Cromatografia em camada delgada para detecção de flavonoides, utilizando como eluente acetato de etila, ácido acético glacial, ácido fórmico e água (50:5,5:5,5:13) e revelador NP/PEG, registrada a 365 nm



Legenda: padrões de flavonoides – F1 = vitexina, F2 = isovitexina, F3 = orientina, F4 = isoorientina e F5 = rutina. I - cotilédones, II - sementes com tegumento, III - sementes sem tegumento, IV - folhas de plantas *in vitro*, V - raízes de plantas *in vitro*, VI - caules de plantas *in vitro*, VII - folhas de plantas *in vivo*, VIII - raízes de plantas *in vivo*, IX - caules de plantas *in vivo*, X - raízes induzidas em ANA, XI - raízes induzidas em AIA, XII - raízes induzidas em AIB.

Na condição para detecção de estilbenoides, foram apenas detectadas três bandas, tendo sido observadas substâncias com fluorescência azulada a 365 nm no local de aplicação, sem o uso de revelador, e intensa fluorescência quando reveladas com NP/PEG e visualizadas a 365 nm (Figura 24). As bandas 1 e 3 visualizadas em extratos de folhas (IV e VII), que correspondem a pigmentos de clorofila, apresentaram coloração avermelhada quando reveladas com NP/PEG e registradas a 365 nm. Nessa condição, também foram detectadas duas bandas (2 e 3) em extratos de raízes de plantas mantidas *in vivo* (VIII), com fluorescência azulada. A mesma coloração e um deslocamento relativo semelhante foi encontrada entre o padrão de resveratrol e a banda 2. Contudo, nenhuma banda pode ser observada nas amostras quando utilizado como revelador a vanilina (dados não mostrados).

Figura 24 – Cromatografia em camada delgada para detecção de estilbenoides, utilizando como eluente acetato de etila, clorofórmio, metanol e água (33:15:3:0,6) e revelador NP/PEG, registrada a 365 nm

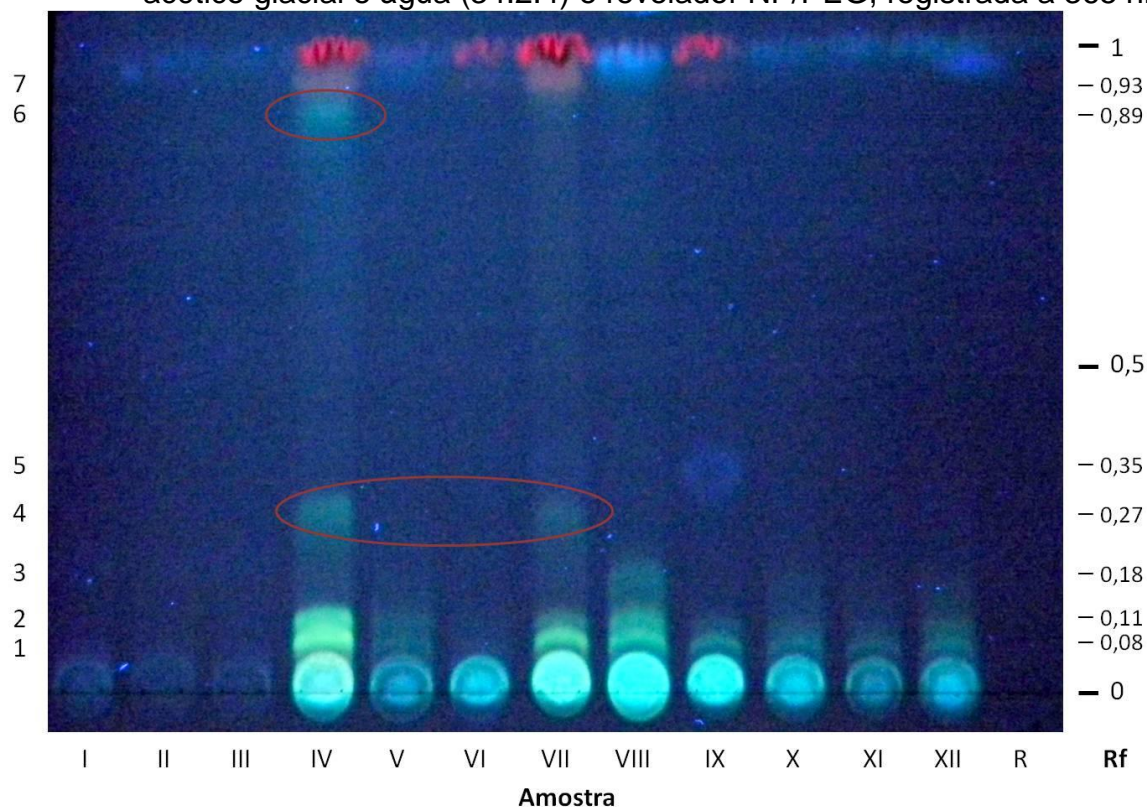


Legenda: R - padrão de resveratrol; I - cotilédones, II - sementes com tegumento, III - sementes sem tegumento, IV - folhas de plantas *in vitro*, V - raízes de plantas *in vitro*, VI - caules de plantas *in vitro*, VII - folhas de plantas *in vivo*, VIII - raízes de plantas *in vivo*, IX - caules de plantas *in vivo*, X - raízes induzidas em ANA, XI - raízes induzidas em AIA, XII - raízes induzidas em AIB.

Para a melhor separação das substâncias observadas no *spot* (ponto de aplicação) na placa de análise de estilbenos, foram utilizadas diferentes eluentes intermediários entre os adotados para estilbenos e para flavonoides, com os quais intensa fluorescência dessas substâncias foi observada no *front* de solvente. Na primeira e segunda condições testadas para detectar substâncias fenólicas, não foi possível definir as bandas. Na condição 3, na qual utilizou-se como fase móvel acetato de etila, ácido acético glacial e água (34:2:4), foram detectadas sete bandas (Figura 25). O padrão de resveratrol apresentou  $R_f = 0,96$ . As bandas 1, 2 e 3 reveladas na cromatografia para detecção de estilbenos correspondem à banda 7 e às fluorescências apresentadas no *front* nessa condição para substâncias fenólicas. As bandas 1, 2, 3, 4 e 6 apresentaram coloração esverdeada, e a banda 5, coloração azul. A banda 4 só foi verificada em extratos de folhas (IV e VII) e a banda 6 em extratos de folhas de plantas mantidas *in vitro*

(IV). A banda 3 foi constatada apenas em extratos de raízes de plantas mantidas *in vivo* (VIII). Extratos de sementes (I, II e III) não apresentaram nenhuma banda (Figura 25).

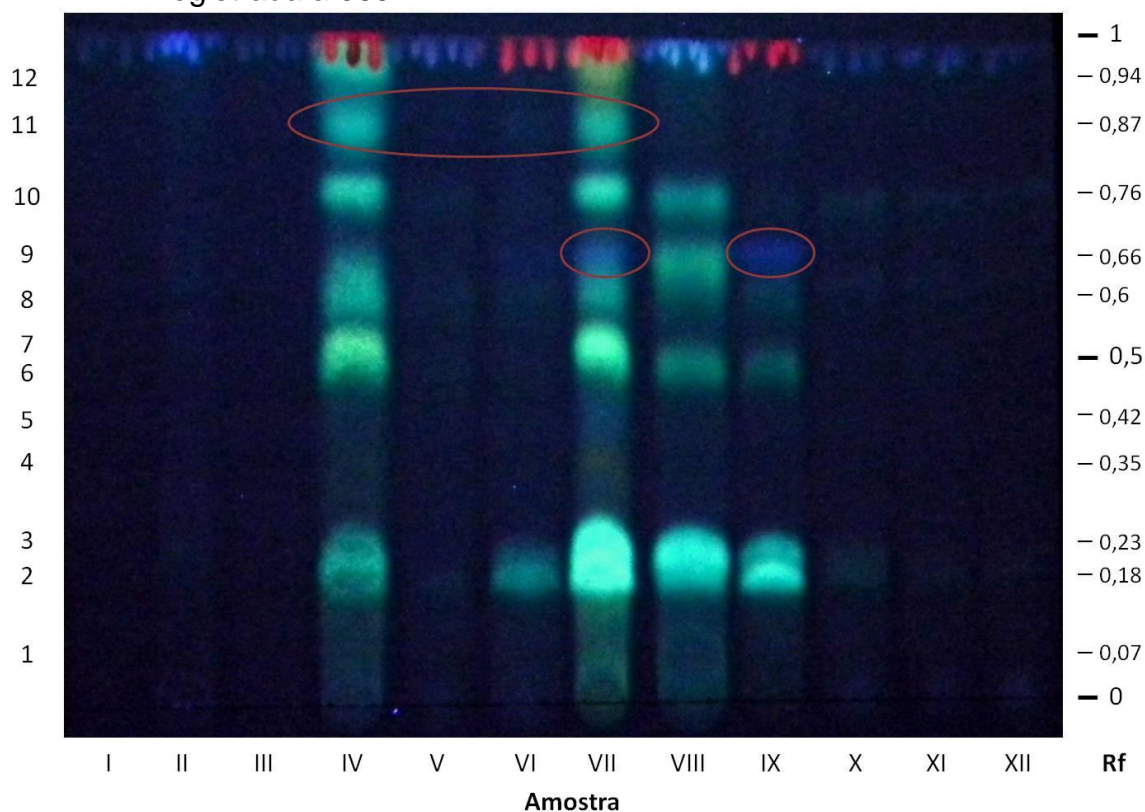
Figura 25 – Cromatografia em camada delgada para detecção de substâncias fenólicas (Condição 3), utilizando como eluente acetato de etila, ácido acético glacial e água (34:2:4) e revelador NP/PEG, registrada a 365 nm



Legenda: R - padrão de resveratrol; I - cotilédones, II - sementes com tegumento, III - sementes sem tegumento, IV - folhas de plantas *in vitro*, V - raízes de plantas *in vitro*, VI - caules de plantas *in vitro*, VII - folhas de plantas *in vivo*, VIII - raízes de plantas *in vivo*, IX - caules de plantas *in vivo*, X - raízes induzidas em ANA, XI - raízes induzidas em AIA, XII - raízes induzidas em AIB.

Na condição 5 para visualização de substâncias fenólicas, com o aumento da proporção de ácido acético e inclusão de ácido fórmico, foi possível separar as substâncias visualizadas no ponto de aplicação da placa anterior, sendo visualizadas doze bandas de coloração azul escura, azul clara, verde ou amarela. A banda 7 só foi visualizada em extratos de folhas (IV e VII). Uma banda azul escura (9) foi verificada em extratos de folhas e caules (IV, VI, VII e IX) (Figura 26).

Figura 26 – Cromatografia em camada delgada para detecção de substâncias fenólicas (Condição 5), utilizando como eluente acetato de etila, ácido acético glacial, ácido fórmico e água (51:6:1:7) e revelador NP/PEG, registrada a 365 nm



Legenda: I - cotilédones, II - sementes com tegumento, III - sementes sem tegumento, IV - folhas de plantas *in vitro*, V - raízes de plantas *in vitro*, VI - caules de plantas *in vitro*, VII - folhas de plantas *in vivo*, VIII - raízes de plantas *in vivo*, IX- caules de plantas *in vivo*, X - raízes induzidas em ANA, XI - raízes induzidas em AIA, XII - raízes induzidas em AIB.

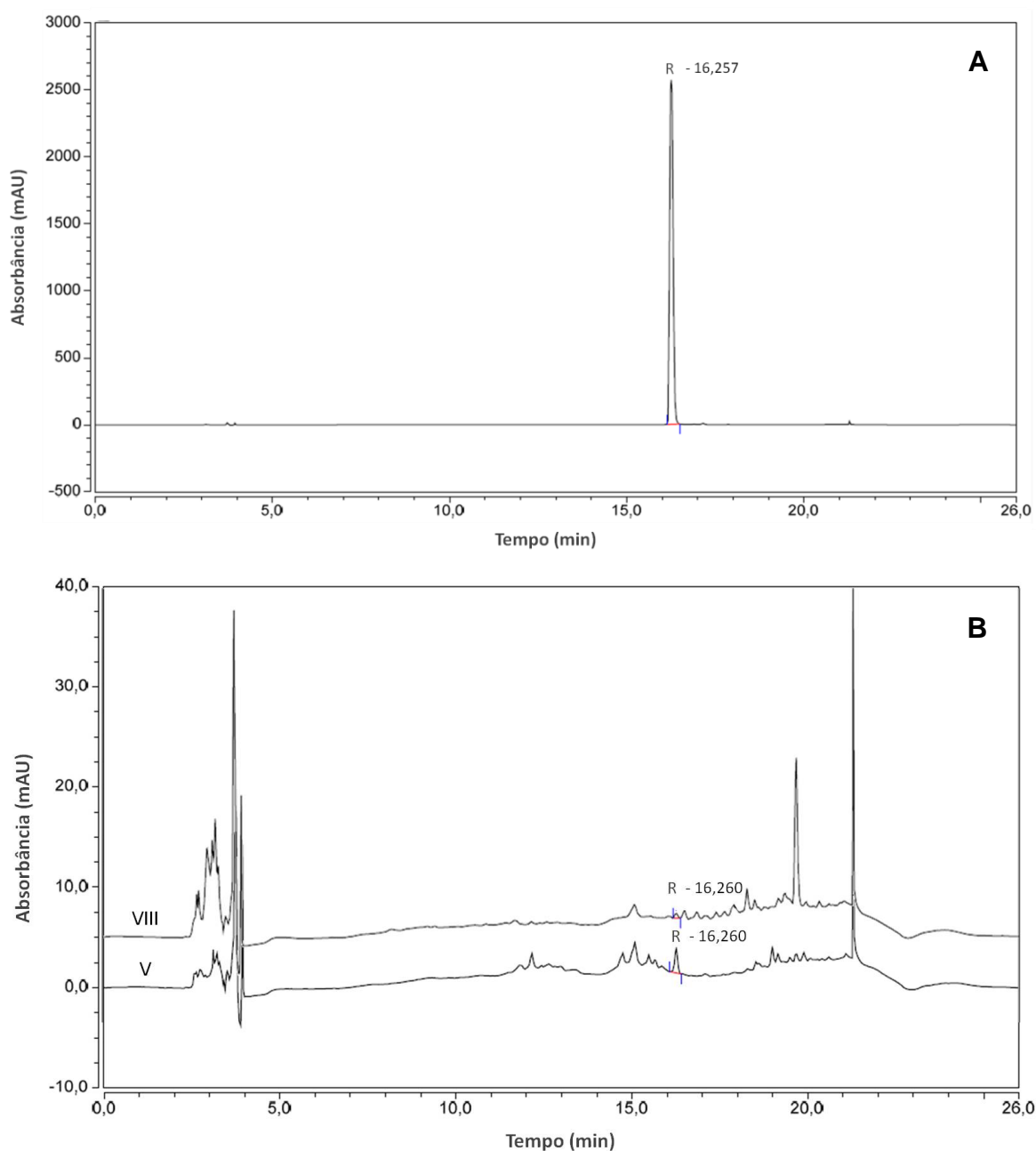
### 7.2.2. Perfil fitoquímico por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

A análise por CLAE permitiu a visualização de quarenta e nove sinais nas amostras estudadas (Tabela 12, Apêndice). Maiores números de sinais foram encontrados em extratos de raízes de plantas mantidas *in vivo* (33) e *in vitro* (24) e de sementes com tegumento (26). Os grupos de extratos derivados de sementes, plantas mantidas *in vitro*, plantas mantidas *in vivo* e raízes adventícias apresentaram um total de 28, 31, 40 e 8 sinais, respectivamente.

O padrão de resveratrol apresentou tempo de retenção (tR) de 16,26 minutos (Figura 27). Esta substância, assim como os sinais de número 20 e 46, foram detectados em todas as amostras. O extrato de raízes de plantas mantidas

*in vivo* apresentou onze sinais não detectados nos demais extratos avaliados. Os sinais de número 10 e 43 apenas foram detectados em extratos de raízes de plantas obtidas *in vitro*.

Figura 27 – Cromatogramas obtidos por CLAE



Legenda: (A) Padrão resveratrol, com  $t_R = 16,257$  min; (B) Extrato de raízes de plantas obtidas *in vitro* (V) e cultivadas *in vivo* (VIII).

Dos vinte e oito sinais encontrados em extratos provenientes de sementes, treze eram comuns aos três tipos de extratos. No caso de plantas obtidas *in vitro*, apenas três sinais em comum foram detectados nas diferentes amostras. Da mesma forma, em materiais de plantas *in vivo* só foram detectados seis sinais compartilhados entre as amostras. Contudo, ao contrapor os resultados de materiais *in vivo* com os obtidos *in vitro*, extratos de folhas, raízes e caules possuíam, respectivamente, os sinais 10, 12 e 5 em comum.

Nos extratos de raízes adventícias, seis sinais foram detectados em materiais obtidos em resposta a ANA ou AIA. Por outro lado, nas raízes formadas na presença de AIB, além desses, foram visualizados outros dois sinais (18 e 19). Ao comparar os extratos das raízes induzidas com o extrato de cotilédones foi observado que apenas o sinal 9 não estava presente no explante original. Da mesma maneira, ao comparar com extratos de raízes de plantas obtidas *in vitro*, apenas o sinal 17 não era comum entre os dois tipos de extratos. Entretanto, ao comparar as amostras de raízes induzidas às raízes de plantas *in vivo*, apenas cinco sinais em comum foram detectados entre os trinta e três encontrados nesta última. Neste contexto, pode-se destacar o sinal 8, que foi detectado em amostras de raízes induzidas a partir de cotilédones, raízes de plantas *in vitro* e explantes de sementes (Tabela 12).

Tabela 12 – Análise fitoquímica de diferentes extratos por cromatografia líquida de alta eficiência (continua)

Amostra	Sinal																										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	R	24	25	26
I	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-
II	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
III	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-
IV	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-
V	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
VI	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-
VII	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-
VIII	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	-
IX	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-
X	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-
XI	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-
XII	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-

Tabela 12 – Análise fitoquímica de diferentes extratos por cromatografia líquida de alta eficiência (conclusão)

Amostra	Sinal																				Total			
	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	Amostra	Grupo
I	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	16	
II	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	26	28
III	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	15	
IV	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	17	
V	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	24	31
VI	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	6	
VII	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	15	
VIII	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	33	40
IX	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	15	
X	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	6	
XI	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	6	8
XII	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	8	

Legenda: R - padrão de resveratrol; I - cotilédones, II - sementes com tegumento, III - sementes sem tegumento, IV - folhas de plantas *in vitro*, V - raízes de plantas *in vitro*, VI - caules de plantas *in vitro*, VII - folhas de plantas *in vivo*, VIII - raízes de plantas *in vivo*, IX- caules de plantas *in vivo*, X - raízes induzidas em ANA, XI - raízes induzidas em AIA, XII - raízes induzidas em AIB.

### 7.3. Avaliação da atividade antioxidante

#### 7.3.1. Ensaio DPPH

O potencial antioxidante das amostras estudadas foi avaliado através do ensaio de captura do radical livre estável DPPH, segundo o método descrito por Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995), e expresso através dos valores de EC<sub>50</sub> em mg/mL de extrato bruto, amostra seca e amostra fresca (Tabela 13). O controle positivo utilizado foi a quercetina, que apresentou EC<sub>50</sub> igual a 0,072 mg/mL. Extratos de cotilédones e sementes sem tegumento apresentaram um potencial antioxidante bem inferior quando comparado ao de sementes com tegumento. Extratos de sementes com tegumento apresentaram ainda um valor de EC<sub>50</sub> próximo ao observado em extratos de caules de plantas cultivadas *in vitro* e de raízes adventícias induzidas a partir de cotilédones em resposta a diferentes auxinas. Quando comparados entre si, tanto os extratos de folhas de plantas mantidas *in vivo* como das plantas obtidas *in vitro* apresentaram maior potencial antioxidante, seguido de raízes e de caules. Extratos de folhas e raízes de plantas mantidas *in vivo* apresentaram menores valores de EC<sub>50</sub> (0,91 e 0,99 mg/mL, respectivamente).

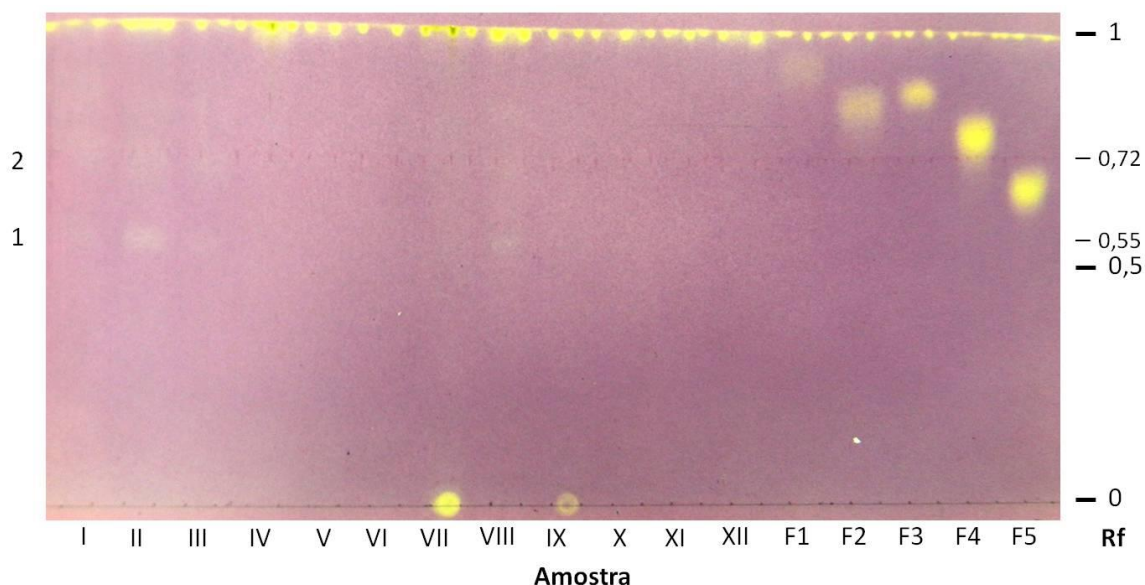
Tabela 13 – Potencial antioxidante de diferentes amostras de *A. pintoii* pelo ensaio DPPH

Amostra	EC <sub>50</sub> mg/mL		
	Extrato	Amostra fresca	Amostra seca
Cotilédones	26,43	594,50	583,52
Sementes com tegumento	10,62	277,87	271,64
Sementes sem tegumento	30,57	792,50	777,93
Folhas <i>in vitro</i>	2,48	65,86	12,58
Caules <i>in vitro</i>	10,53	384,67	63,78
Raízes <i>in vitro</i>	7,63	310,89	42,49
Folhas <i>in vivo</i>	0,91	22,69	5,52
Caules <i>in vivo</i>	7,73	251,21	55,05
Raízes <i>in vivo</i>	0,99	33,03	10,40
Raízes AIA 57 µM	11,94	538,92	48,38
Raízes AIB 14,7 µM	12,05	432,77	39,81
Raízes ANA 54 µM	13,09	803,14	59,01
Quercetina	0,072	-	-

### 7.3.2. CCD-DPPH

A análise qualitativa do potencial antioxidante dos extratos também foi realizada através do ensaio de CCD-DPPH. Na análise para flavonoides foi possível observar uma intensa atividade antioxidante nas bandas referentes aos padrões testados, além de duas bandas mais suaves. Intensa atividade antioxidante também foi observada no *front* de solvente (Figura 28).

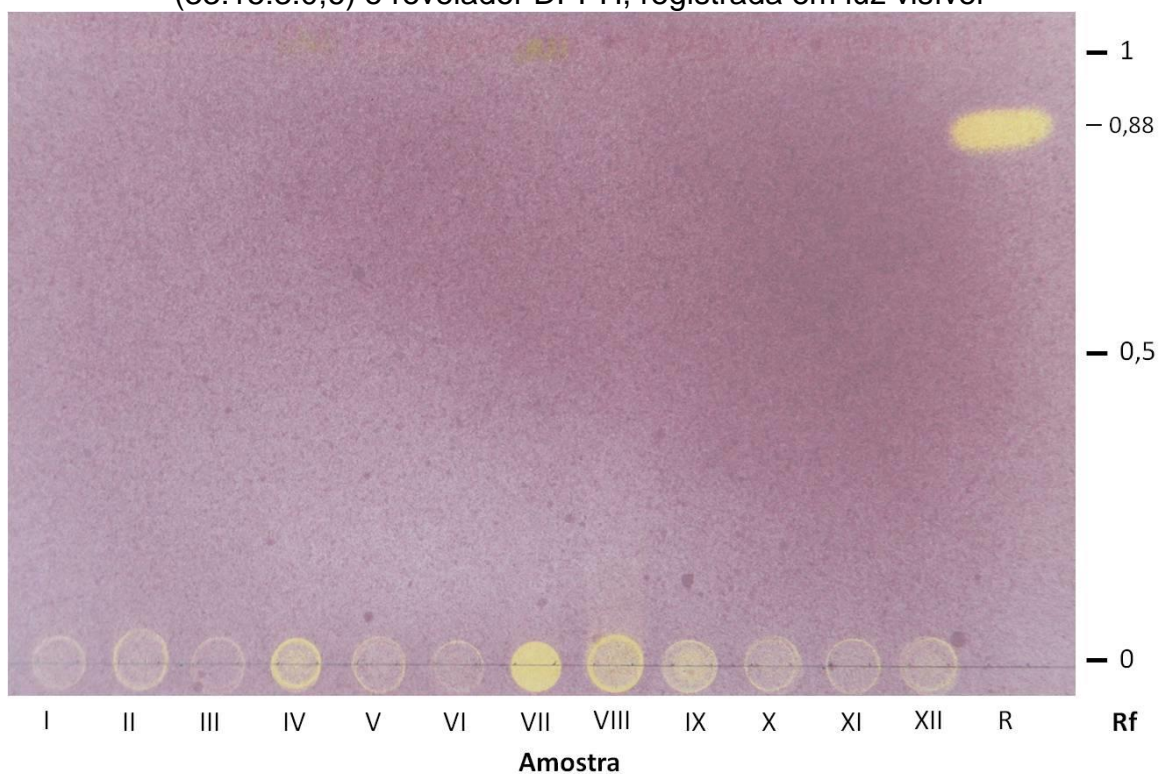
Figura 28 – Cromatografia em camada delgada para detecção de flavonoides, utilizando como eluente acetato de etila, ác. acético glacial, ácido fórmico e água (50:5,5:5,5:13) e revelador DPPH, registrada em luz visível



Legenda: padrões de flavonoides - F1 = vitexina, F2 = isovitexina, F3 = orientina, F4 = isoorientina e F5 = rutina. I - cotilédones, II - sementes com tegumento, III - sementes sem tegumento, IV - folhas de plantas *in vitro*, V - raízes de plantas *in vitro*, VI - caules de plantas *in vitro*, VII - folhas de plantas *in vivo*, VIII - raízes de plantas *in vivo*, IX - caules de plantas *in vivo*, X - raízes induzidas em ANA, XI - raízes induzidas em AIA, XII - raízes induzidas em AIB.

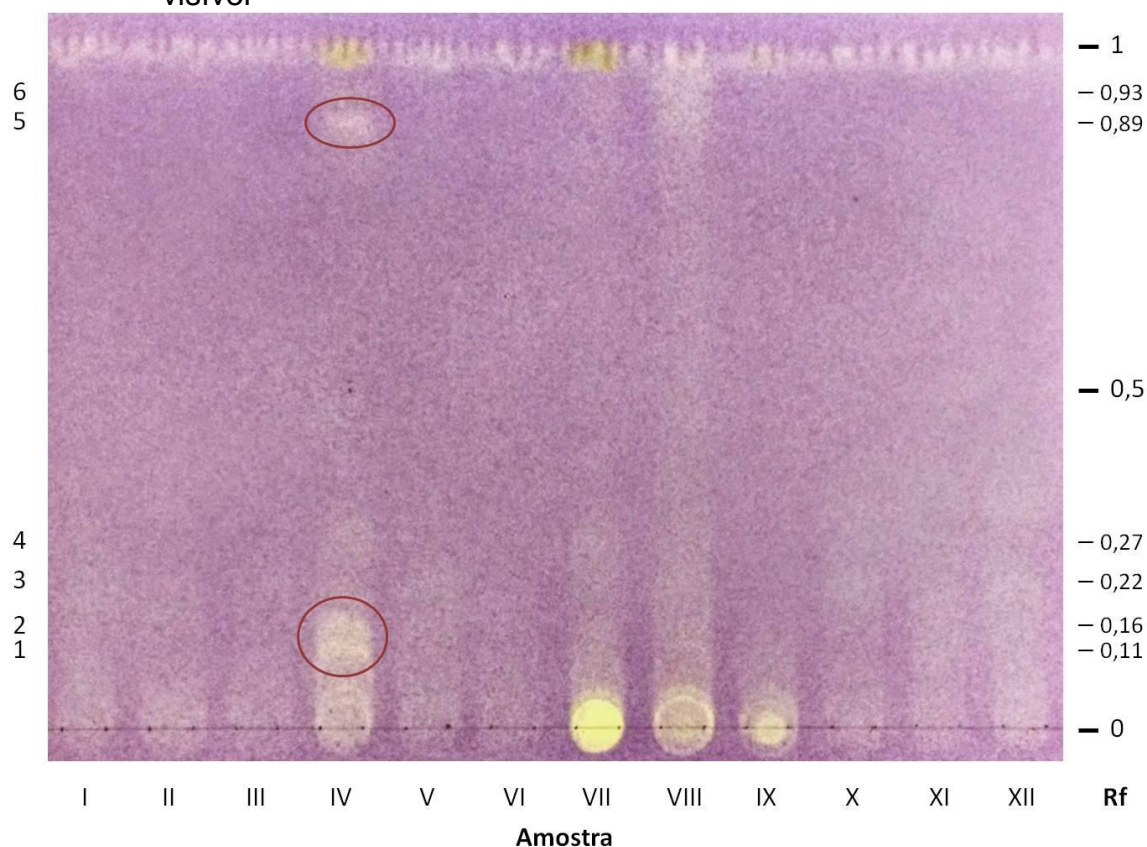
Quando utilizada a condição para detecção de estilbenoides, só foi visualizada a banda correspondente ao padrão de resveratrol ( $R_f = 0,88$ ). Entretanto, foi observada uma atividade antioxidante no *spot* (Figura 29). Na análise para substâncias fenólicas utilizando a condição 3, foram detectadas seis bandas. A banda 4 foi visualizada em extratos de folhas (IV e VII), enquanto as bandas 5 e 6 foram evidenciadas em amostras de folhas de plantas obtidas *in vitro* (IV) e raízes de plantas mantidas *in vivo* (VIII) (Figura 30).

Figura 29 – Cromatografia em camada delgada para detecção de estilbenoides, utilizando como eluente acetato de etila, clorofórmio, metanol e água (33:15:3:0,6) e revelador DPPH, registrada em luz visível



Legenda: R - padrão de resveratrol; I - cotilédones, II - sementes com tegumento, III - sementes sem tegumento, IV - folhas de plantas *in vitro*, V - raízes de plantas *in vitro*, VI - caules de plantas *in vitro*, VII - folhas de plantas *in vivo*, VIII - raízes de plantas *in vivo*, IX - caules de plantas *in vivo*, X - raízes induzidas em ANA, XI - raízes induzidas em AIA, XII - raízes induzidas em AIB.

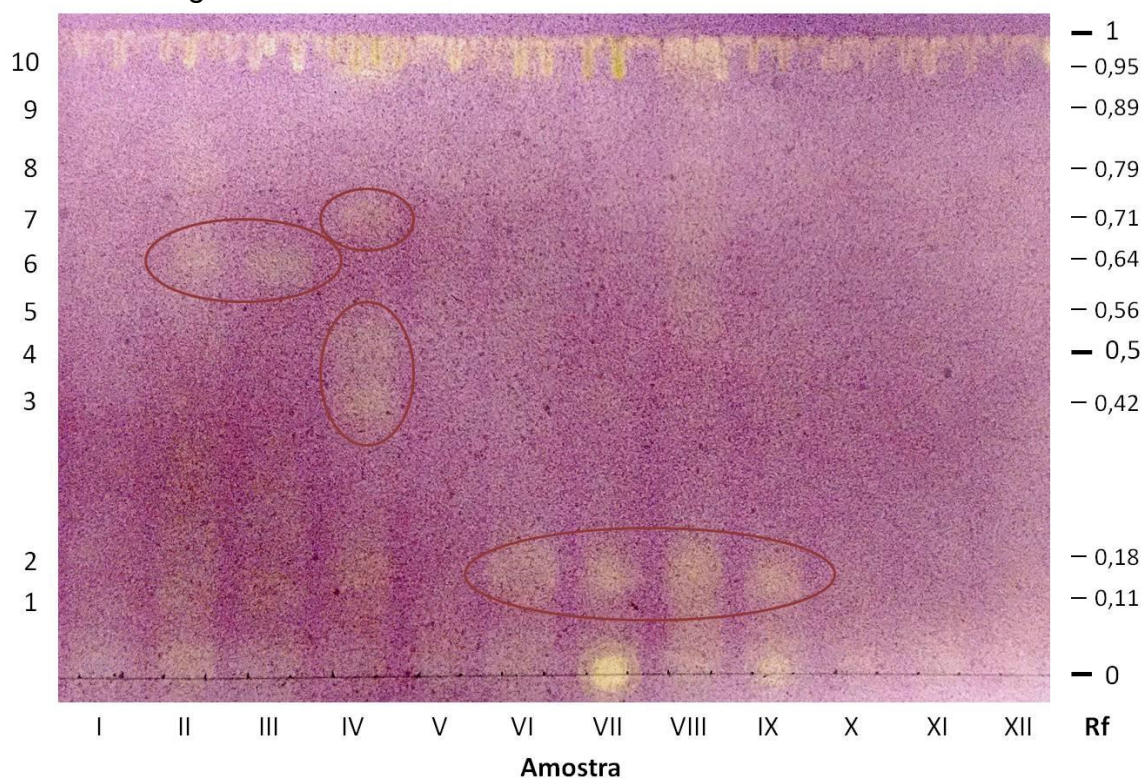
Figura 30 – Cromatografia em camada delgada para detecção de substâncias fenólicas (Condição 3), utilizando como eluente acetato de etila, ácido acético glacial e água (34:2:4) e revelador DPPH, registrada em luz visível



Legenda: I - cotilédones, II - sementes com tegumento, III - sementes sem tegumento, IV - folhas de plantas *in vitro*, V - raízes de plantas *in vitro*, VI - caules de plantas *in vitro*, VII - folhas de plantas *in vivo*, VIII - raízes de plantas *in vivo*, IX - caules de plantas *in vivo*, X - raízes induzidas em ANA, XI - raízes induzidas em AIA, XII - raízes induzidas em AIB.

Quando utilizada a condição 5 para detecção de substâncias fenólicas, na qual o eluente consistiu em acetato de etila, ácido acético glacial, ácido fórmico e água (51:6:1:7), foram visualizadas dez bandas com atividade antioxidante. A banda 6 só foi detectada em extratos de sementes com tegumento e sem tegumento (II e III), enquanto que a banda 7 foi observada em extratos de folhas (IV e VII). As bandas 3 e 4 só foram evidenciadas em extratos de folhas de plantas obtidas *in vitro* (VI), enquanto que as bandas 5 e 9 só foram verificadas em extratos de folhas de plantas mantidas *in vivo* (VII). A atividade antioxidante ainda foi detectada no *spot*, indicando a presença de outras substâncias antioxidantes nos extratos (Figura 31).

Figura 31 – Cromatografia em camada delgada para detecção de substâncias fenólicas (Condição 5), utilizando como eluente acetato de etila, ácido acético glacial, ácido fórmico e água (51:6:1:7) e revelador DPPH, registrada em luz visível



Legenda: I - cotilédones, II - sementes com tegumento, III - sementes sem tegumento, IV - folhas de plantas *in vitro*, V - raízes de plantas *in vitro*, VI - caules de plantas *in vitro*, VII - folhas de plantas *in vivo*, VIII - raízes de plantas *in vivo*, IX - caules de plantas *in vivo*, X - raízes induzidas em ANA, XI - raízes induzidas em AIA, XII - raízes induzidas em AIB.

## 8. DISCUSSÃO

A cultura de tecidos de plantas é uma metodologia que pode ser utilizada para micropropagação, conservação, transformação genética e produção de metabólitos secundários *in vitro*. A regeneração *in vitro* de *Arachis pintoi* têm sido obtida por organogênese a partir de explantes de folíolos de plântulas germinadas (PITTMAN *et al.*, 1983), folhas de plantas de campo (BURTNIK; MROGINSKI, 1985; REY *et al.*, 2000) e explantes de sementes (PACHECO *et al.*, 2007). A embriogênese somática foi observada a partir de explantes de folhas de plantas de campo (REY *et al.*, 2000), folhas e ápices caulinares de plantas cultivadas *in vitro* (REY; MROGINSKI, 2006). O desenvolvimento de meristemas pré-existentes foi alcançado com a utilização de segmentos caulinares (meristemas apical e nodal) de plantas cultivadas *in vitro* (REY; MROGINSKI, 2003) e explantes de sementes (PACHECO *et al.*, 2007). Neste trabalho, foi avaliado o efeito da luz e diferentes reguladores de crescimento sobre o potencial morfogênico de explantes de sementes (cotilédones, eixos e folíolos embrionários) e de plantas cultivadas *in vitro* (folíolos, nós e entrenós).

Em resposta a PIC, os explantes desenvolveram apenas calos mucilaginosos, podendo apresentar uma pequena região friável. Rey e Mroginski (2006) observaram o desenvolvimento de calos com formação de embriões somáticos em segmentos apicais e foliares cultivados na presença de PIC a 10 - 20 mg/L (41,4 - 82,8  $\mu\text{M}$ ) em combinação com baixas concentrações de BAP. Resultados semelhantes já foram também obtidos para *A. paraguariensis* Chodat & Hassl. (SELLARS; SOUTHWARD; PHILLIPS, 1990), *A. hypogaea* (LITTLE; MAGBANUA; PARROTT, 2000), *A. glabrata* (VIDOZ *et al.*, 2004) e *A. correntina* (VIDOZ *et al.*, 2006). Entretanto, neste trabalho não foram obtidos embriões somáticos em calos desenvolvidos em meios contendo PIC, provavelmente devido a diferenças entre a constituição bioquímica dos explantes utilizados.

A produção de plantas foi obtida neste trabalho através de organogênese ou desenvolvimento meristemático. A condição de luminosidade influenciou tanto o número de brotos por explante como a qualidade dos brotos, que se apresentaram estiolados na ausência de luz. Explantes de cotilédones, eixos embrionários, folíolos, nós e entrenós desenvolveram calos organogênicos em

resposta a TDZ ou combinações de BAP e ANA. No entanto, calos obtidos na presença de TDZ apresentaram baixa taxa de regeneração e produção de brotos, paralelamente a uma intensa oxidação dos explantes. A oxidação de explantes de *A. pintoii* cultivados *in vitro* foi também observada por Rey e Mroginski (2003), sendo prejudicial para o processo de regeneração, pois pode acarretar na morte celular.

O desenvolvimento de brotos por organogênese em resposta a diferentes combinações de BAP e ANA também foi observado em outros trabalhos com diferentes espécies de *Arachis* (BAJAJ *et al.*, 1981; CHENG; HIS; PHILLIPS, 1992; MANSUR *et al.*, 1993; MCKENTLY, 1991; VIDOZ *et al.*, 2006). Em *A. pintoii*, Burtnik e Mroginski (1985) avaliaram a organogênese em explantes de folíolos excisados de plantas de campo, utilizando combinações de BAP e ANA, tendo considerado como melhor combinação BAP a 0,44  $\mu\text{M}$  e ANA a 10,8  $\mu\text{M}$ . Rey *et al.* (2000) obtiveram também calos organogênicos a partir de explantes de folíolos de plantas de campo em resposta a diferentes combinações de auxinas e citocininas, verificando a melhor resposta na combinação de BAP a 4,4  $\mu\text{M}$  e ANA a 54  $\mu\text{M}$ , seguida da transferência dos calos para meio contendo BAP a 4,4  $\mu\text{M}$  para desenvolvimento dos brotos. Estes fatos justificam a necessidade de empregar um balanço adequado de reguladores de crescimento, que pode variar de acordo com a natureza do explante utilizado.

Segmentos nodais excisados de plantas obtidas *in vitro* desenvolveram brotos a partir do meristema pré-existente, em resposta a 2,4-D a 4,52  $\mu\text{M}$  e combinações de BAP a 2,2 ou 4,4  $\mu\text{M}$  com diferentes concentrações de ANA, principalmente na presença de luz. A regeneração de plantas a partir de segmentos nodais excisados de plantas *in vitro* derivadas de segmentos apicais do caule de plantas de campo em combinações de BAP e ANA também foi relatada por Rey e Mroginski (2003). Entretanto, estes autores obtiveram melhores resultados em resposta à combinação de BAP a 0,044  $\mu\text{M}$  com ANA a 0,054  $\mu\text{M}$ . A diferença entre as concentrações de fitorreguladores utilizada neste trabalho e aquela adotada por esses autores pode estar associada à disponibilidade de hormônios endógenos nos dois tipos de explantes utilizados, considerando que no presente trabalho foram utilizados segmentos nodais de plantas obtidas através de germinação *in vitro* do embrião zigótico.

Culturas de células ou órgãos isolados *in vitro* têm se destacado como métodos adequados para a produção de metabólitos secundários, devido à rapidez no acúmulo de biomassa e nos ciclos biossintéticos condensados, encurtando o período de cultivo no qual essas substâncias são produzidas (ZHANG *et al.*, 2012). Segundo Saiman *et al.* (2012), culturas de raízes podem ser mais favoráveis para a biossíntese de metabólitos de interesse do que culturas de partes aéreas, devido à rapidez na multiplicação e à possibilidade de cultivo em larga escala com o uso de biorreatores. Culturas de raízes vêm sendo estabelecidas para várias espécies, com o uso de diferentes sistemas, tais como em meio líquido sob agitação (SAIMAN *et al.*, 2012; SIVANANDHAN *et al.*, 2012; SUDHA; SEENI, 2001) e meio sólido em frascos (SWAIN *et al.*, 2012) ou placas de Petri (ZHANG *et al.*, 2012).

Neste trabalho, o desenvolvimento de raízes adventícias foi observado em explantes de cotilédones, em resposta a baixas concentrações de BAP em combinação com ANA. Devido à importante ação das auxinas no desenvolvimento de raízes, muitos estudos avaliam a influência de auxinas como ANA, AIA ou AIB, isoladamente ou em combinação com baixas concentrações de citocininas, na diferenciação radicular em diferentes explantes mantidos *in vitro* (ZHANG *et al.*, 2012). Os explantes avaliados neste trabalho desenvolveram raízes de aspectos variados em resposta a cada fitorregulador, com diferentes frequências.

Segmentos das raízes obtidas em ANA a 54  $\mu\text{M}$ , AIA a 57  $\mu\text{M}$  e AIB a 14,7  $\mu\text{M}$  foram utilizados para o estabelecimento de culturas de raízes em cinco diferentes sistemas: meio sólido em frasco ou placa de Petri, meio líquido em frasco sob agitação, em pontes de papel de filtro e meio em dupla-fase. A oxidação dos explantes ocorreu principalmente em meios contendo AIA e combinações de BAP e ANA. Nesta última condição, também foram observados calos não morfogênicos que além de não serem capazes de produzir novas raízes, apresentavam intensa oxidação. Zhang *et al.* (2012) também observaram a formação de calos em explantes de raízes de *Periploca sepium* Bunge cultivadas em meio sólido em placas de Petri contendo meio suplementado com combinações das auxinas ANA e AIA com as citocininas BAP e cinetina.

O desenvolvimento de raízes com potencial para o estabelecimento de culturas foi alcançado somente em resposta a AIB, nos dois sistemas de meio

líquido, e em resposta a ANA, em meio líquido sobre pontes de papel de filtro. Em meio contendo AIB sob agitação ocorreu apenas o alongamento dos segmentos radiculares, sem desenvolvimento de raízes secundárias, fator importante para a multiplicação, visto que são utilizados como explantes os segmentos apicais. No sistema de pontes de papel de filtro sobre meio líquido, entretanto, foram obtidas raízes bastante ramificadas em resposta aos dois fitorreguladores, que podem ser utilizadas para o estabelecimento de novas culturas.

A multiplicação é uma etapa importante para o estabelecimento de culturas de raízes, que podem ser fontes para a produção de metabólitos de interesse. Para isso, é fundamental determinar as melhores condições para a ocorrência do processo. Dessa forma, o trabalho será continuado com a determinação da influência do tamanho do segmento radicular e sua origem (segmento apical, mediano ou proximal), do período e do número de subculturas, assim como da composição de sais e da fonte de carbono do meio de cultura, visando ao estabelecimento de culturas produtoras de substâncias bioativas.

A composição fitoquímica de raízes adventícias obtidas na presença de cada fitorregulador, assim como de raízes, caules e folhas excisados de plantas mantidas *in vivo* e obtidas *in vitro*, e de sementes com tegumento, sem tegumento e de cotilédones foi avaliada através de métodos cromatográficos. A análise por CCD foi utilizada para o estudo da presença de diferentes grupos de substâncias, incluindo triterpenos, saponinas, alcaloides, cumarinas, flavonoides, estilbenoides e outras substâncias fenólicas.

Triterpenos são moléculas de 30 carbonos derivadas do esqualeno, assim como os alcaloides esteroidais, os heterosídeos cardiotônicos e os fitoesteróis, como o  $\beta$ -sitosterol. Triterpenos podem apresentar várias atividades biológicas, como antitumoral, antiviral, antimicrobiana, hepatoprotetora, gastroprotetora e anti-inflamatória (MARTELANC; VOVK; SIMONOVSKA, 2009; SHIMIZU *et al.*, 1986; TOMMASI; SHIMONE; PIZZA, 1992), podendo ser produzidas em culturas *in vitro*. Nove tipos de triterpenos com atividade medicinal foram detectados, em grandes quantidades, em culturas de calos e células de *Eriobotrya japonica* Lindl. (TANIGUCHI *et al.*, 2002). Utilizando a técnica de CCD, com fase móvel e revelador específicos para a detecção de triterpenos, foram observadas oito diferentes bandas nos extratos de *A. pintoii* com coloração cinza ou arroxeadada, na luz visível. Algumas bandas arroxeadadas presentes em extratos provenientes de

sementes, apresentaram coloração rosa avermelhada quando visualizadas em 365 nm. Martelanc, Vovk e Simonovska (2009), estudando triterpenos e fitoesteróis em extratos vegetais de diferentes espécies, também observaram bandas com coloração acinzentada e bandas que apresentavam coloração arroxeada sob luz visível, e avermelhada brilhante em 366 nm. Em extratos de raízes de *A. hypogaea* foram detectados dois triterpenos, conhecidos como soforadiol e soiasapogenol B (LEE *et al.*, 2009).

As saponinas são um grupo de triterpenos ou esteroides caracterizado por apresentar em sua estrutura química uma região glicona (ligação com açúcar) e por serem afrógenos (produzirem espuma na presença de água). Saponinas com atividades biológicas são encontradas, por exemplo, em raízes, tubérculos e cascas do caule de diferentes espécies de vegetais, como o ginseng (*Panax spp*), sendo também obtidas em culturas de raízes (CHOI *et al.*, 2000; YU *et al.*, 2002) e de células *in vitro* (WU; LINDONG; CHAU, 2001) dessa espécie. Nas cromatografias realizadas neste estudo com extratos de *A. pintoii*, utilizando condições determinadas para detecção de saponinas, foram detectadas oito bandas, com padrão de coloração semelhante ao observado na cromatografia de triterpenos. É possível que haja bandas em comum entre as duas análises devido à semelhança estrutural entre os dois grupos, o que justificaria também a semelhança na coloração e intensidade de bandas observadas nas cromatografias para detecção de triterpenos e de saponinas em extratos provenientes de sementes.

Alcaloides constituem um grupo de substâncias nitrogenadas bastante diverso estrutural e funcionalmente, apresentando importantes atividades farmacológicas. Contudo, nas condições estudadas, não foram detectados alcaloides por CCD nos extratos de *A. pintoii* analisados. As cumarinas são substâncias produzidas por plantas a partir do ácido *o*-cumárico que também apresentam uma gama bastante ampla de atividades medicinais. Em CCD, quando visualizadas a 365 nm, mesmo sem revelador, apresentam fluorescência. Utilizando uma fase móvel adequada para a detecção de cumarinas, não foram observadas bandas fluorescentes a 365 nm sem revelação. Contudo, nestas condições, o *front* da cromatografia apresentou fluorescência azulada, indicando a presença de outras substâncias fenólicas nos extratos estudados.

A mesma fase móvel utilizada para a detecção de cumarinas foi aplicada para a detecção de flavonoides, com o uso do revelador NP/PEG. Esta classe de substâncias é constituída por vários tipos de moléculas fenólicas de baixo peso molecular, amplamente distribuídas em espécies vegetais e com atividades farmacológicas bastante diversificadas. Esse grupo se destaca por seu grande potencial antioxidante, sendo produzido em plantas por diversos fins, incluindo a proteção contra o estresse oxidativo (HEIM; TAGLIAFERRO; BOBILYA, 2002). Em CCD, apresentam principalmente coloração verde, amarela, alaranjada ou marrom, sob luz visível ou em 365 nm (WAGNER, 1996). Neste estudo, foram utilizados como padrões a vitexina e a isovitexina, que apresentam coloração verde clara, a orientina e a isoorientina, com coloração amarela, e a rutina, com coloração alaranjada. Nos extratos dos diferentes materiais de *A. pintoii*, foram observadas seis bandas de coloração azulada quando visualizadas a 365 nm, correspondendo possivelmente a outros tipos de substâncias fenólicas. De acordo com Wagner (1996), ácidos fenólicos carboxílicos, como os ácidos caféico, clorogênico e ferúlico, podem ser visualizados em CCD nas mesmas condições, com coloração intensa azul ou esverdeada.

Na condição utilizada para detecção de estilbenoides, uma intensa fluorescência foi observada no local de aplicação da placa cromatográfica, com coloração azulada, sem o uso de revelador, e azul ou esverdeada, após revelação com NP/PEG. Nesta condição, só foi possível observar três bandas. A primeira, de coloração avermelhada a 365 nm, corresponde ao pigmento de clorofila, que também pode ser observado como bandas esverdeadas quando vistas sob luz visível, sem o uso de revelador. Duas bandas foram detectadas em extrato de raízes de plantas *in vivo*, com coloração azulada e Rfs próximos ao do padrão de resveratrol. Entretanto, bandas correspondentes não foram observadas ao utilizar como revelador vanilina sulfúrica, o que pode indicar que são substâncias diferentes.

Com o intuito de separar as substâncias que apresentaram fluorescência, observadas no *front* de cromatografias para detecção de flavonoides e no *spot* de cromatografias para detecção de estilbenoides, cinco condições intermediárias de fase móvel foram testadas, variando a concentração de ácido (ácido acético glacial e ácido fórmico), água e dos demais solventes orgânicos (acetato de etila, clorofórmio e metanol). Nas condições de cromatografia denominadas de 1 e 2,

utilizando fases móveis constituídas por combinações de acetato de etila, metanol e ácido acético glacial, nas proporções 36:4:4 e 32:8:4, respectivamente, foram detectadas substâncias com fluorescência, utilizando como revelador NP/PEG e observando a 365 nm, contudo não foi possível distinguir as bandas. As melhores condições para separação das substâncias foram com a utilização dos mesmos solventes para detecção de flavonoides, com redução da concentração dos ácidos, associada à redução do volume de água.

Com o uso de fase móvel constituída por acetato de etila, ácido acético glacial e água (34:2:4) (Condição 3), foi verificado o início da separação dos constituintes, sendo visualizado um total de sete bandas, o padrão de resveratrol próximo ao *front* da cromatografia, assim como uma banda de coloração esverdeada e outra de coloração azulada, quando observadas a 365 nm. Na quinta condição testada, utilizando como eluente acetato de etila, ácido acético glacial, ácido fórmico e água (51:6:1:7), foi verificado um total de doze bandas, assim como a separação das substâncias anteriormente visualizadas na base da cromatografia. Nesta condição, já foi detectada fluorescência no *front* quando observada a 365 nm, devido às substâncias com  $R_f$  próximo a 1 observadas na condição anterior. As bandas apresentaram coloração azul-clara, azul-escura, verde e amarelada.

Resumidamente, substâncias de diferentes grupos puderam ser visualizadas nas cromatografias em camada fina, com base nas condições de detecção determinadas por Wagner (1996). Outras substâncias só puderam ser separadas no campo cromatográfico pela variação nas condições de ácidos intermediárias entre as condições determinadas para flavonoides e estilbenoides. Estes resultados indicam a presença de várias substâncias fenólicas nos extratos analisados.

Neste trabalho, foram detectadas quarenta e nove sinais que podem ser de substâncias diferentes através da técnica de CLAE, incluindo o resveratrol, que não havia sido visualizado nas análises por CCD, provavelmente devido à quantidade insuficiente para detecção. Da mesma forma, outros componentes que ocorram em menores quantidades nas amostras analisadas podem também não ter sido visualizados por esta metodologia.

Os extratos produzidos a partir de materiais de plantas mantidas *in vivo* foram os que apresentaram maior número total de sinais, seguido de plantas *in*

*vitro*. Nas amostras de raízes de plantas *in vivo* e *in vitro*, assim como de sementes com tegumento, foram detectados os maiores números de sinais. Onze sinais foram encontrados exclusivamente no extrato de raízes de plantas *in vivo*. Paralelamente, outros dois sinais, 10 e 43, foram observados apenas na amostra de raízes de plantas *in vitro*. Estes, assim como o sinal de número 12, ocorreram apenas em amostras de plantas *in vitro*. Desta forma, é importante ressaltar que, embora as plantas mantidas *in vivo* produzam uma grande variedade de substâncias, as plantas obtidas *in vitro* podem apresentar um potencial para produzir também diversas substâncias, incluindo algumas não encontradas em condições naturais, como pode ser verificado pela presença de 3 sinais não observados nas amostras de plantas cultivadas *in vivo*.

Ao comparar os resultados observados entre os materiais avaliados, observa-se que, dentre as amostras de sementes, que apresentaram em comum 13 sinais, as sementes com tegumento possuíam cerca de 10 sinais a mais que os outros dois materiais. Muitos estudos fitoquímicos com sementes têm demonstrado que uma grande quantidade de substâncias pode ser encontrada no tegumento, que exerce um papel importante no sistema de defesa (TROSZYŃSKA; CISKA, 2002).

Outros dois grupos de materiais, produzidos a partir de plantas *in vivo* e *in vitro*, apresentaram pouca semelhança ao se comparar as amostras de cada grupo separadamente. No entanto, ao correlacionar os materiais equivalentes dos dois grupos, folhas, raízes e caules, observou-se uma proporção bem maior de correspondência. Isto mostra que, embora a origem e as condições de cultivo das plantas seja bastante diferente, a composição química específica em cada órgão ainda apresenta semelhanças.

As raízes adventícias, por sua vez, apresentaram total equivalência entre os sinais detectados, com exceção da amostra obtida em resposta a AIB, que continha dois sinais, 18 e 19, não encontrados nas duas outras amostras. Extratos de raízes adventícias obtidas de cotilédones e de raízes de plantas obtidas *in vitro* originaram oito sinais, dentre os quais apenas os de número 9 e 17 não foram visualizados em extratos dos explantes originais. Isto mostra que, além da semelhança com um material equivalente, estes materiais também mantêm uma composição semelhante à existente antes da indução.

A análise por CLAE é importante para determinar o perfil de cada amostra e poder comparar a presença ou ausência de diferentes constituintes nos materiais estudados. Contudo, ainda é necessária a identificação das substâncias, para que se possa avaliar adequadamente o potencial destes materiais para a produção de substâncias bioativas.

Os compostos fenólicos, como os flavonoides e os estilbenoides, são substâncias aromáticas que apresentam pelo menos uma hidroxila ligada diretamente ao anel aromático, a qual pode ainda apresentar seu hidrogênio substituído. Substâncias fenólicas são divididas em diferentes grupos, por serem bem diversas, e muitos de seus representantes apresentam atividades biológicas, como a atividade antioxidante. A capacidade antioxidante dessas substâncias está relacionada, principalmente, às propriedades redox dos grupamentos hidroxila, capazes de neutralizar espécies reativas de oxigênio (EROs). Além disso, a posição estrutural das hidroxilas é capaz de garantir estabilidade à molécula. Segundo Benavente-García *et al.* (2000), a capacidade antioxidante de uma substância fenólica é influenciada por uma combinação entre esses fatores, que estão também relacionados à presença ou ausência de estruturas glicosídicas e sítio de glicosilação, ao número e posição dos radicais livres e esterificados e à estrutura fenólica, entre outros.

A atividade antioxidante pode ser estimada por diversas metodologias que vêm sendo desenvolvidas para a análise de produtos naturais. Estes métodos incluem os ensaios de redução do íon férrico (*ferric reducing antioxidant power* - FRAP), redução do íon cúprico (*cupric reducing antioxidant capacity* - CUPRAC), redução do íon cérico (*ceric ion reducing antioxidant capacity* - CeRAC), radical ABTS<sup>•+</sup> (2,2'-azinobis(3-etilbenzenotiazolina-6-sulfonato)), conhecido como atividade antioxidante equivalente ao Trolox (*Trolox equivalent antioxidant capacity* - TEAC), absorvância do radical oxigênio (*oxygen radical absorbance capacity* - ORAC) e a captura do radical DPPH, além de técnicas eletroquímicas como a voltametria cíclica e de pulso diferencial, a coulometria e técnicas acopladas (BORGES *et al.*, 2011; CHEN; BERTIN; FROLDI, 2013; KILINC, 2009).

No gênero *Arachis*, a determinação do potencial antioxidante de extratos foi testada por diferentes metodologias, incluindo o ensaio de redução do íon de ferro (CHANG *et al.*, 2006; WANG *et al.*, 2007), o método ORAC (CONSTANZA *et al.*, 2012; CRAFT *et al.*, 2010; HOLLAND *et al.*, 2011; SALES; RESURRECCION,

2010), o método TEAC (CRAFT *et al.*, 2010; DUNCAN *et al.*, 2006; SALES; RESURRECCION, 2010; YU; AHMEDNA; GOKTEPE, 2005), a determinação do potencial antioxidante pelo sistema de ferro/ascorbato com ácido linoléico (*antioxidative potency* – AOP) (SHEM-TOV *et al.*, 2012; WANG *et al.*, 2005), o método do ácido tiobarbitúrico (TBA) (WIN *et al.*, 2011), a fotoquimioluminescência (*Photochemiluminescence* – PCL) (CRAFT *et al.*, 2010), o método de peroxidação do ácido linoléico (HUSSAIN *et al.*, 2012), os ensaios de captura dos radicais hidroxil, ânion superóxido e peróxido de hidrogênio (WANG *et al.*, 2007), o sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico (HUSSAIN *et al.*, 2012) e o ensaio de captura do radical DPPH (ABBASI *et al.*, 2009; CHANG *et al.*, 2006; HUSSAIN *et al.*, 2012; LOPES *et al.*, 2013; QIU *et al.*, 2012; WANG *et al.*, 2005; WANG *et al.*, 2007; WIN *et al.*, 2011).

O potencial antioxidante dos diferentes materiais estudados neste trabalho foi determinado pelo método de captura do radical DPPH, por ser uma técnica amplamente utilizada para avaliação de extratos de plantas, alimentos e substâncias puras, devido à sua estabilidade, rapidez, facilidade e sensibilidade (CHEN; BERTIN; FROLDI, 2013). A capacidade antioxidante dos extratos foi expressa em EC<sub>50</sub>, correspondente à concentração de material necessária para reduzir 50 % do DPPH inicial da reação, expressa em mg de extrato, de material fresco ou de material seco de cada amostra estudada.

Dentre as amostras derivadas de sementes, aquelas com tegumento apresentaram um potencial antioxidante bem maior que sementes sem tegumento e cotilédones, com um EC<sub>50</sub> equivalente a quase um terço do valor encontrado nas outras amostras. Este resultado é uma evidência de maior concentração de substâncias antioxidantes, fato também observado em sementes de *A. hypogaea*, cujo tegumento provou ser uma importante fonte de polifenóis com grande potencial antioxidante, comparável ao de sementes e cascas (epicarpo) de uvas (YU; AHMEDNA; GOKTEPE, 2005) e maior que o de substâncias utilizadas como controle positivo, trolox e vitamina C (YU *et al.*, 2006). Win *et al.* (2011), ao comparar extratos de sementes com e sem tegumento desta espécie, detectou uma quantidade de fenóis totais superior ao dobro em extratos de sementes com tegumento, além de uma atividade antioxidante significativamente maior. Como o tegumento é a camada protetora da semente (DAVIS *et al.*, 2010), representando uma barreira física e química contra o ataque de patógenos, uma grande

diversidade de fitoalexinas, substâncias fenólicas produzidas em resposta a estresses para proteção da planta, podem ser encontradas nesse tecido.

As amostras analisadas apresentaram uma faixa de  $EC_{50}$  entre 0,91 e 30,57 mg de extrato/mL de solução de DPPH, equivalente a 1,4 a 0,2 mg de quercetina por 100 mg de amostra seca. O valor de  $EC_{50}$  obtido para extratos de sementes com tegumento foi próximo ao de caules de plantas *in vitro* (10,53 mg de extrato bruto/mL) e de raízes adventícias induzidas em resposta a AIA a 57  $\mu$ M (11,94 mg de extrato bruto/mL), AIB a 14,7  $\mu$ M (12,05 mg de extrato bruto/mL) e ANA a 54  $\mu$ M (13,09 mg de extrato bruto/mL). Contudo, os extratos de diferentes órgãos (folha, caule e raiz) de plantas mantidas *in vivo* em casa de vegetação e de plantas obtidas *in vitro* pela germinação do embrião zigótico foram os que apresentaram os maiores potenciais antioxidantes pelo ensaio do DPPH. Em ambas, extratos de folhas apresentaram maior atividade, seguidos por extratos de raízes e caules. Os extratos de folhas e raízes de plantas *in vivo* apresentaram menor  $EC_{50}$  (0,91 e 0,99 mg de extrato bruto/mL, respectivamente). A atividade antioxidante destas amostras pode estar relacionada à presença de substâncias fenólicas, que foram observadas em maior número nos extratos de folhas de plantas cultivadas *in vitro* e *in vivo*, assim como de raízes de plantas cultivadas *in vivo*. Muitas destas bandas apresentaram também ação antioxidante através do ensaio de CCD-DPPH.

Extratos de raízes de quatro diferentes cultivares de *A. hypogaea* foram avaliadas por Holland *et al.* (2011), determinando o potencial antioxidante pelo método ORAC, expresso em equivalência de Trolox, dos extratos brutos e das frações obtidas por CLAE. Estes autores obtiveram grande variação nos resultados, mostrando que o potencial antioxidante depende não somente da cultivar, mas das condições onde os diferentes genótipos foram cultivados. Da mesma maneira, as condições de cultura e os fitorreguladores utilizados podem ser responsáveis pelo aumento ou redução da produção de diversas substâncias *in vitro*.

Embora as raízes adventícias induzidas em resposta a auxinas tenham apresentado um potencial antioxidante intermediário entre as amostras testadas, é importante ressaltar que sistemas de cultura de tecidos com alta produção de biomassa, como culturas de calos e raízes, são investimentos interessantes, pois podem ser submetidos a processos de elicitação física, química ou biológica, de

forma a modular a produção de substâncias de interesse (BAQUE *et al.*, 2012; KIM *et al.*, 2004). Utilizando o ensaio do DPPH, extratos de folhas de onze espécies silvestres e de *A. hypogaea* foram avaliados quanto à sua capacidade antioxidante (LOPES *et al.*, 2013). Dentre os extratos de folhas controle, sem tratamento, *A. simpsonii* apresentou maior potencial antioxidante, seguido de *A. hypogaea*. Com a elicitação por radiação UV, cinco espécies apresentaram um aumento estatisticamente significativo na sua porcentagem de atividade, dentre as quais *A. hypogaea* demonstrou maior atividade antioxidante, com um aumento de 44,63 para 60,69% de atividade. A elicitação de diferentes materiais pode ser um recurso importante para o aumento da produção de substâncias antioxidantes.

Dentre as substâncias responsáveis pela atividade antioxidante no gênero *Arachis*, o resveratrol tem se destacado. Chang *et al.* (2006) avaliaram a atividade antioxidante de quatro substâncias isoladas de extratos de sementes de *A. hypogaea*, resveratrol, araquidina-1, araquidina-3 e *trans*-isopentadienilresveratrol (IPD), com hidroxitolueno butilado (*butylated hydroxytoluene* - BHT), utilizado como padrão devido ao seu alto potencial antioxidante. Pelo método de FRAP, resveratrol e araquidina-1 apresentaram maior atividade antioxidante que o padrão BHT, enquanto que pelo método do DPPH, resveratrol apresentou atividade semelhante ao BHT, seguido de araquidina-1. A atividade antioxidante observada neste trabalho pode também estar associada à presença de resveratrol, detectado em todas as amostras estudadas, além de outras substâncias fenólicas.

Em resumo, neste trabalho foram estabelecidos diferentes sistemas de cultura de calos, brotos e raízes adventícias a partir de explantes de sementes e de plantas cultivadas *in vitro* de *A. pintoii*. Dentre eles, foram selecionadas culturas de raízes adventícias em resposta a três diferentes auxinas, além de amostras de plantas *in vivo* e *in vitro* e de sementes, para avaliação fitoquímica da espécie. A avaliação por CCD evidenciou a presença de triterpenos e saponinas, além de substâncias fenólicas com intensa atividade antioxidante. Através da análise por CLAE, foram detectadas 49 substâncias, incluindo o resveratrol, que não havia sido observado por CCD. Três substâncias encontradas estavam presentes exclusivamente nas amostras de plantas *in vitro*, não sendo observadas em condições naturais. Os dados obtidos das cromatografias serão utilizados para

estabelecer os parâmetros das próximas análises, com o objetivo de identificar as substâncias detectadas neste trabalho.

## CONCLUSÕES

- Explantes de sementes (cotilédones, eixos e folíolos embrionários), nós, entrenós e folíolos de plantas mantidas *in vitro* foram explantes adequados para a indução de calogênese em meios suplementados com PIC, 2,4-D, TDZ e combinações de BAP e ANA, tendo sua resposta modulada pela concentração e tipo de reguladores de crescimento, assim como pela condição de luminosidade.
- O desenvolvimento de plantas foi obtido a partir de quase todos os explantes, exceto folíolos embrionários e folíolos de plantas cultivadas *in vitro*, por organogênese direta ou indireta.
- Meios contendo diferentes concentrações das auxinas ANA, AIA e AIB induziram a formação de raízes adventícias, principalmente a partir de cotilédones cultivados em meio líquido.
- Entre os sistemas de cultura líquida testados, a maior eficiência de indução de raízes foi obtida como o uso de AIB, sob agitação, e meio suplementado com AIB ou ANA em sistema de ponte de papel filtro.
- O perfil fitoquímico determinado por CCD evidenciou a presença de triterpenos e saponinas nos extratos analisados, além de substâncias fenólicas, que também apresentaram atividade antioxidante, quando analisadas por CCD-DPPH.
- As condições estabelecidas para análise por CLAE permitiram a detecção de 49 sinais, incluindo o resveratrol, presente em todos os extratos.
- Os extratos produzidos serão ainda utilizados para identificação das substâncias antioxidantes através de outros métodos analíticos e também submetidos a outros ensaios para a identificação de possíveis atividades biológicas.
- As culturas estabelecidas serão submetidas a metodologias de elicitação visando à modulação da produção de substâncias de interesse.

## REFERÊNCIAS

- ABBASI, M. A. *et al.* Chemical composition of volatile fraction of Pakistani peanut and its antiradical activities. *J Chem Soc Pakistan.*, v. 31, p. 955–959, 2009.
- ABDOU, Y. A. M. *The sources and nature of resistance in Arachis L. species to Mycosphaerella arachidicola Jenk. and Mycosphaerella berkeleyii Jenk., and factors influencing sporulation of these fungi.* 1996. Tese (PhD) - North Carolina State University, Raleigh, NC, 1966.
- ALISSA, E. M.; FERNS, G. A. Functional foods and nutraceuticals in the primary prevention of cardiovascular diseases. *J Nutr Metab.*, v. 2012, 16 p., 2012.
- ANDRADE, S. R. M. *Princípios da cultura de tecidos vegetais.* Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, Documentos, 58, 2002. 16 p.
- ANDRADE, C. M. S.; VALENTIM, J. F. Adaptação, produtividade e persistência de *Arachis pintoi* submetido a diferentes níveis de sombreamento, no Acre. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 1997. *Anais...* Juiz de Fora: SBZ, v.34, 1997. p. 341-343.
- ANDRADE, C. M. S.; VALENTIM, J. F. *Síndrome da morte do capim-brizantão no Acre: características, causas e soluções tecnológicas.* Rio Branco, AC: Embrapa Acre, Documentos, 105, 2007. 41 p.
- APG III. An update of the angiosperm phylogeny group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Botanical Journal of the Linnean Society* v. 161, p. 105-121, 2009.
- APPLEBAUM, S. W.; MARCO, S.; BIRK, Y. Saponins as possible factors of resistance of legume seeds to the attack of insects. *J Agric Food Chem.*, v. 17, p. 618–622, 1969.
- ARGEL, P. J.; PIZARRO, E. A. Germplasm case study: *Arachis pintoi*. In: CIAT – Centro Internacional de Agricultura Tropical. *Pastures for tropical lowlands: CIAT's contribution.* CIAT publication 211, 1992. p. 57-76.
- ASSIS, G. M. L. Principais características de *Arachis pintoi* cv. BRS Mandobi. In: *Produção de sementes de Arachis pintoi cv. BRS Mandobi no Acre.* Rio Branco, AC: Embrapa Acre, 2011. (Sistemas de produção, 4). Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Amendoim/ProducaSementeArachisAcre/index.htm>>. Acesso em: 12 dez. 2013.
- ASSIS, G. M. L.; SILVA, R. A.; AZEVEDO, H. N. Período para condução do teste de germinação em sementes de amendoim forrageiro (*Arachis pintoi*). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE SEMENTES, 18., 2013, Florianópolis. *A semente na produtividade agrícola e na conservação de recursos genéticos: resumos.* Informativo Abrates, v. 23, n. 2, 2013.CD-ROM.

- AWAD, A. B. *et al.* Peanuts as a source of  $\beta$ -sitosterol, a sterol with anticancer properties. *Nutr Cancer*, v. 36, p. 238–241, 2000a.
- AWAD, A. B.; DOWNIE, A. C.; FINK, C. S. Inhibition of growth and stimulation of apoptosis by  $\beta$ -sitosterol treatment of MDA-MB-231 human breast cancer cells in culture. *Int J Mol Med.*, v. 5, p. 541-545, 2000b.
- AWAD, A. B. *et al.* Beta-Sitosterol activates Fas signaling in human breast cancer cells. *Phytomedicine*, v. 14, p. 747–754, 2007.
- BACKHOUSE, N. *et al.* Analgesic, anti-inflammatory and antioxidant properties of *Buddleja globosa*, Buddlejaceae. *J Ethnopharmacol.*, v. 116, p. 263–269, 2008.
- BAJAJ, Y. P. S. *et al.* Regeneration of genetically variable plants from the anther-derived callus of *Arachis hypogaea* and *Arachis villosa*. *Plant Sci Lett.*, v. 23, n. 1, p. 35–39, 1981.
- BALZON, T. A. *et al.* Efeito do material propagativo e de métodos de plantio na produção de biomassa e de sementes do *Arachis pintoi* AP 65. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 42., 2005, Goiânia. *Anais...* Goiânia: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 2005. 1 CD ROM.
- BAQUE, A. *et al.* Production of biomass and useful compounds from adventitious roots of high-value added medicinal plants using bioreactor. *Biotech Advances*, v. 30, n. 6, p. 1255-1267, 2012.
- BARCELLOS, A. O. *et al.* Potencial e uso de leguminosas forrageiras dos gêneros *Stylosanthes*, *Arachis* e *Leucaena*. In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO DA PASTAGEM, 17., 2000, Piracicaba. A planta forrageira no sistema de produção. *Anais...* Piracicaba: FEALQ, 2000. p. 297-357.
- BARCELLOS, A. O. *et al.* Sustentabilidade da produção animal baseada em pastagens consorciadas e no emprego de leguminosas exclusivas, na forma de banco de proteína, nos trópicos brasileiros. *R Bras Zootec.*, v. 37, p. 51-67, 2008.
- BASKAR, A. A. *et al.* Chemopreventive potential of  $\beta$ -Sitosterol in experimental colon cancer model - an *in vitro* and *in vivo* study. *BMC Complement Altern Med.*, v. 10, n. 24, 2010.
- BENAVENTE-GARCÍA, O. *et al.* Antioxidant activity of phenolics extracted from *Olea europaea* L. leaves. *Food Chem*, v. 68, p. 457-462, 2000.
- BENTHAM, G. On the structure and affinities of *Arachis* and *Voandezia*. *Trans Linn Soc London*, v. 18, n. 2, p. 155-162, 1841.
- BERGER, A.; JONES, P. J. H; ABUMWEIS, S. S. Plant sterols: factors affecting their efficacy and safety as functional food ingredients. *Lipids in Health and Disease*, v. 3, n. 5, 2004.
- BERTIOLI, D. J. *et al.* A large scale analysis of resistance gene homologues in *Arachis*. *Mol Genet Genomics*, v. 270, p. 34–45, 2003.

- BILBIS, L. S.; SHEHU, R. A.; ABUBAKAR, A. G. Hypoglycemic and hypolipidemic effects of aqueous extract of *Arachis hypogaea* in normal and alloxan-induced diabetic rats. *Phytomedicine*, v. 9, p. 553–555, 2002.
- BORGES, L. L. *et al.* Uma abordagem sobre métodos analíticos para determinação da atividade antioxidante em produtos naturais. *Enciclopédia Biosfera*, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v. 7, n. 12, 20 p., 2011.
- BOUGHDAD, A.; GILLON, Y.; GAGNEPAIN, C. Effect of *Arachis hypogaea* seed fats on the larval development of *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera: Bruchidae). *J Stored Prod Res.*, v. 23, p. 99–103, 1987.
- BOUIC, P. J. The role of phytosterols and phytosterolins in immune modulation: a review of the past 10 years. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, v. 4, p. 471–475, 2001.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Sci Technol.*, v. 28, n. 1, p. 25–30, 1995.
- BURTNIK O. J.; MROGINSKI L. A. Regeneration of *Arachis pintoii* (Leguminosae) plants through the *in vitro* culture of leaf tissue. *Oléagineux*, v. 40, n. 12, p. 609–612, 1985.
- CARVALHO, G. G. P.; PIRES, A. J. V. Leguminosas tropicais herbáceas em associação com pastagens. *Arch Zootec.*, v. 57 (R), p. 103-113, 2008.
- CARVALHO, J. M. F. C.; VIDAL, M. S. *Crioconservação no melhoramento vegetal*. Campina Grande, PB: Embrapa Algodão, Documentos, 115, 2003. 22 p.
- CARVALHO, M. A. *Germplasm characterization of Arachis pintoii Krap. e Greg. (Leguminosae)*. 2004. 140 f. Tese (Doutorado) – University of Florida, 2004.
- CARVALHO, M. A.; QUESENBERRY, K. H.; GALLO, M. Comparative assessment of variation in the USA *Arachis pintoii* (Krap. and Greg.) germplasm collection using RAPD profiling and tissue culture regeneration ability. *Plant Syst Evol.*, v. 288, p. 245–251, 2010.
- CASSIDY, A.; HANLEY, B.; RAVENTOS, R. M. L. Isoflavones, lignans and stilbenes origins, metabolism and potential importance to human health. *J Sci Food Agric.*, v. 80, p. 1044–1062, 2000.
- CHANG, J. C. *et al.* Biosynthesis enhancement and antioxidant and anti-inflammatory activities of peanut (*Arachis hypogaea* L.) arachidin-1, arachidin-3, and isopentadienylresveratrol. *J Agric Food Chem.*, v. 54, p. 10281–10287, 2006.
- CHANG, S. C.; HSU, B. Y.; CHEN, B. H. Structural characterization of polysaccharides from *Zizyphus jujuba* and evaluation of antioxidant activity. *Int J Biol Macromol.*, v. 47, n. 4, p. 445-453, 2010.
- CHARLET, S. *et al.* Immobilisation of *Solanum chrysotrichum* plant cells within Ca-alginate gel beads to produce an antimycotic spirostanol saponin. *Plant Physiol Biochem.*, v. 38, p. 875-870, 2000.

- CHENG, M.; HIS, D. C. H.; PHILLIPS, G. C. *In vitro* regeneration of valencia-type peanut (*Arachis hypogaea* L.) from cultured petiolules, epicotyl sections and other seedling explants. *Peanut Sci.*, v. 19, p. 82–87, 1992.
- CHEN, W. M. *et al.* Nodulation of *Mimosa spp.* by the  $\beta$ -Proteobacterium *Ralstonia taiwanensis*. *Mol Plant Microbe Interact.*, v. 16, p. 1051-1061, 2003.
- CHEN, Z.; BERTIN, R.; FROLDI, G. EC50 estimation of antioxidant activity in DPPH<sup>•</sup> radical assay using several statistical programs. *Food Chem.*, v. 138, n. 1, p. 414–420, 2013.
- CHERIF, A. O. *et al.* Comparison of the concentrations of long-chain alcohols (policosanols) in three Tunisian peanut varieties (*Arachis hypogaea* L.). *J Agric Food Chem.*, v. 58, p. 12143–12148, 2010.
- CHOI, S. M. *et al.* Pilot-scale culture of adventitious roots of ginseng in a bioreactor system. *Plant Cell Tiss Organ Cult.*, v. 62: p. 187–193, 2000.
- CHOI, S. *et al.* Angiogenic activity of beta-sitosterol in the ischaemia/reperfusion-damaged brain of *Mongolian gerbil*. *Planta Med.*, v. 68, p. 330–335, 2002.
- CHUKWUMAH, Y. C. *et al.* Comparison of extraction methods for the quantification of selected phytochemicals in peanuts (*Arachis hypogaea*). *J Agric Food Chem.*, v. 55, p. 285-290, 2007.
- CHUNG; I. M. *et al.* Resveratrol accumulation and resveratrol synthase gene expression in response to abiotic stresses and hormones in peanut plants. *Plant Sci.*, v. 164, p. 103-109, 2003.
- CONDORI, J. *et al.* Induced biosynthesis of resveratrol and the prenylated stilbenoids arachidin-1 and arachidin-3 in hairy root cultures of peanut: Effects of culture medium and growth stage. *Plant Physiol Biochem.*, v. 48, n. 5, p. 310-318, 2010.
- CONSTANZA, K. E. *et al.* Value-added processing of peanut skins: antioxidant capacity, total phenolics, and procyanidin content of spray-dried extracts. *J Agric Food Chem.*, v. 60, p. 10776–10783, 2012.
- CRAFT, B. D. *et al.* Antioxidant properties of extracts obtained from raw, dry-roasted, and oil-roasted US peanuts of commercial importance. *Plant Foods Hum Nutr.*, v. 65, p. 311–318, 2010.
- CUNHA, A. J. *et al.* Allelopathy effect of *Arachis pintoi* in the *Bidens pilosa* germination and *Ipomoea triloba*. *Cerrado Agrobiociências*, n. 1, p. 15-25, 2010.
- DAVIS, J. P. *et al.* Roast effects on the hydrophilic and lipophilic antioxidant capacities of peanut flours, blanched peanut seed and peanut skins. *Food Chem.*, v. 119, n. 2, p. 539-547, 2010.
- DEVI, S. I.; VASHISTA, P.; SHARMA, C. B. Purification to homogeneity and characterization of two antifungal proteins from the roots of *Arachis hypogaea* L. *Natl Acad Sci Lett India*, v. 28, p. 21–28, 2005.

- DILLEHAY, T. D. *et al.* Pre-ceramic adoption of peanut, squash, and cotton in Northern Peru. *Science*, v. 316, p. 1890, 2007.
- DJOKO, B. *et al.* Characterization of immunological activities of peanut stilbenoids, arachidin-1, piceatannol, and resveratrol on lipopolysaccharide-induced inflammation of RAW 264.7 macrophages. *J Agric Food Chem.*, v. 55, p. 2376–2383, 2007.
- DUNCAN, C. E.; GORBET, D. W.; TALCOTT, S. T. Phytochemical content and antioxidant capacity of water-soluble isolates from peanuts (*Arachis hypogaea* L.). *Food Res Int.*, v. 39, p. 898–904, 2006.
- EL-SAYED, N. M. *et al.* *In vitro* amoebicidal activity of ethanol extracts of *Arachis hypogaea* L., *Curcuma longa* L. and *Pancreaticum maritimum* L. on *Acanthamoeba castellanii* cysts. *Parasitol Res.*, v. 110, p. 1985–1992, 2012.
- EMBRAPA. *Balanço social: pesquisa agropecuária*. Brasília, DF, 2008. 19 p.
- EMEKLİ-ALTURFAN, E.; KASIKCI, E.; YARAT, A. Peanut (*Arachis hypogaea*) consumption improves glutathione and HDL-cholesterol levels in experimental diabetes. *Phytother Res.*, v. 22, p. 180–184, 2008.
- FAO. Food and Agricultural Organization of the United Nation, FAO Statistical Database. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/567/default.aspx#ancor>>. Acesso em: 18 jan. 2014.
- FELTRE, K. *Introdução de coastcross em área com amendoim forrageiro com doses de fósforo e densidade de mudas*. 2013. 75 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – UFLA, Lavras, 2013.
- FERGUSON, J. E. Seed biology and seed systems for *Arachis pintoi*. In: KERRIDGE, P.C.; HARDY, B. (Eds.). *Biology and Agronomy of forage Arachis*. Cali: CIAT, 1994. cap. 11, p. 122-133.
- FERNEX, E. S. *et al.* *In vitro* anthelmintic activity of five tropical legumes on the exsheathment and motility of *Haemonchus contortus* infective larvae. *Exp Parasitol.*, v. 131, p. 413–418, 2012.
- FETT-NETO, A. G.; ZHANG, W. Y.; DICOSMO, F. Kinetics of taxol production, growth and nutrient uptake in cell suspensions of *Taxus cuspidata*. *Biotech Bioeng.*, v. 44, p. 205-210, 1994.
- FISHER, M. J.; CRUZ, P. Some ecophysiological aspects of *Arachis pintoi*. In: KERRIDGE, P.C.; HARDY, B. (Eds.) *Biology and agronomy of forage Arachis*. Cali: CIAT, 1994. p. 53-70.
- FORMO, M. W. *et al.* *Bailey's Industrial oil and fat products*. 4th ed. D. Swern (Ed.). John Wiley & Sons, New York, 1979. p. 59-63.
- FREITAS, F. O.; PEÑALOZA, A. P. S.; VALLS, J. F. M. *O amendoim contador de história*. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Documentos, 107, 2003. 12 p.

FUMAGALI, E. *et al.* Produção de metabólitos secundários em cultura de células e tecidos de plantas: O exemplo dos gêneros *Tabernaemontana* e *Aspidosperma*. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 18 (4): 627-641, 2008.

FURMANOWA, M.; SYKŁOWSKA-BARANEK, K. Hairy root cultures of *Taxus media* var. *Hickssi* Rehd. as a new source of paclitaxel and 10-deacetylbaccatin III. *Biotechnol Lett.*, v. 22, p. 683–686, 2000.

GALGARO, L.; VALLS, J. F. M.; LOPES, C. R. Study of genetic variability and similarity among and within *Arachis villosulicarpa*, *A. pietrarellii* and *A. hypogaea* through isoenzyme analysis. *Genet Resour Crop Evol.*, v. 44, p. 9-15, 1997.

GENSER, B. *et al.* Plant sterols and cardiovascular disease: a systematic review and meta-analysis. *Eur Heart J.*, v. 33, p. 444–451, 2012.

GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; KLERK, G. J. *Plant Propagation by Tissue Culture*. 3. Ed. Basingstoke, UK: Exegetics, 2008. 2 v. V. 1: The background.

GERSHENZON, J. The cost of plant chemical defense against herbivory: a biochemical perspective. In: Bernays EA, editor. *Insect-plant interactions*. Boca Raton (FL): CRC Press; 1994. p. 105–73.

GHASEMZADEH, A.; GHASEMZADEH, N. Flavonoids and phenolic acids: Role and biochemical activity in plants and human. *J Med Plants Res.*, v. 5, n. 31, p. 6697-6703, 2011.

GLIESSMAN, S. R. *Agroecology: ecological processes in sustainable agriculture*. Boca Raton: Lewis Publishers, 2000. 357 p.

GÓMEZ-AGUIRRE, Y. A. *et al.* Adventitious root cultures of *Castilleja tenuiflora* Benth. as a source of phenylethanoid glycosides. *Ind Crops Prod.*, v. 36, p. 188–195, 2012.

GREEN, R. J. *Antioxidant activity of peanut plant tissues*. 2004. Tese (Doutorado) – North Carolina State University, Raleigh, NC, 2004.

GRAYER, R. J. *et al.* Condensed tannin levels and resistance of groundnuts (*Arachis hypogaea*) against *Aphis craccivora*. *Phytochemistry*, v. 31, p. 3795–3800, 1992.

GROSSO, N. R.; NEPOTE, V.; GUZMÁN, C. A. Chemical composition of some wild peanut species (*Arachis* L.) seeds. *J Agric Food Chem.*, v. 48, p. 806-809, 2000.

GROSSO, N. R. *et al.* Fatty acid, sterol and proximate compositions of peanut species (*Arachis* L.) seeds from Bolivia and Argentina. *Grasas y Aceites*, v. 48. n. 4, p. 219-225, 1997.

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

- HALWARD, T. M. *et al.* Genetic variation detectable with molecular markers among unadapted germ-plasm resources of cultivated peanut and related wild species. *Genome*, v. 34, p. 1013-1020, 1991.
- HEIM, K. E.; TAGLIAFERRO, A. R.; BOBILYA, D. J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J Nutr Biochem.*, v. 13, n. 10, p. 572-584, 2002.
- HOLLAND, K. W. *et al.* ORAChromatography and total phenolics content of peanut root extracts. *J Food Sci.*, v. 76, n. 3, p. 380-384, 2011.
- JIMSHEENA, V. K.; GOWDA, L. R. Angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides derived from arachin by simulated gastric digestion. *Food Chem.*, v. 125, n. 2, p. 561–569, 2011.
- KHAMSEEKHEW, B. *et al.* Fibre degradability of oil palm frond pellet, supplemented with *Arachis pintoi* in cattle. *Songkla J Sci Technol.*, v. 24, n. 2, p. 209-216, 2002.
- HICKS, K. B.; MOREAU, R. A. Phytosterols and phytostanols: functional food cholesterol busters. *Food Technol.*, v. 55, p. 63–67, 2001.
- HSU, W. C. *et al.* A rapid and small-scale method for estimating antioxidative potency of peanut sprouts. *J Food Sci.*, v. 67, p. 2604–2608, 2002.
- HUANG, C. P. *et al.* Arachidin-1, a peanut stilbenoid, induces programmed cell death in human leukemia HL-60 cells. *J Agric Food Chem.*, v. 58, p. 12123–12129, 2010.
- HUANG, H. *et al.* Abundant microsatellite diversity and oil content in wild *Arachis* species. *Plos One.*, v. 7, n. 11, 2012.
- HUSSAIN, M. S. *et al.* Current approaches toward production of secondary plant metabolites. *J Pharm Bioallied Sci.*, v. 4, n. 1, p. 10–20, 2012.
- IMANAKA, H. *et al.* Chemoprevention of tumor metastasis by liposomal beta-sitosterol intake. *Biol Pharm Bull.*, v. 31, p. 400–404, 2008.
- JENKINS, D. J. A. *et al.* Possible benefit of nuts in type 2 diabetes. *J Nutr.*, v. 138, p. 1752S, 2008.
- KENNEDY, D. O.; WIGHTMAN, E. L. Herbal extracts and phytochemicals: plant secondary metabolites and the enhancement of human brain function. *Adv Nutr.*, v. 2, p. 32–50, 2011.
- KILINC, E. Significance of chromatographic and voltammetric data for the classification of green teas in Türkiye: A principle component analysis approach. *J Liq Chrom Rel Technol.*, v. 32, n. 2, p. 221-241, 2009.
- KIM, D.; JEOND, S.; LEE, C. Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars of plums. *Food Chem.*, v. 81, p. 321-326, 2003.

- KIM, T. P. N. *et al.* Phytochemical constituents and determination of resveratrol from the roots of *Arachis hypogaea* L. *Am J Plant Sci.*, v. 4, n. 12, p. 2351-2358, 2013.
- KIM, Y. S. *et al.* Adventitious root growth and ginsenoside accumulation in *Panax ginseng* cultures as affected by methyl jasmonate. *Biotech Letters*, v. 26, n. 21, p. 1619-1622, 2004.
- KING, R. E.; BOMSER, J. A.; MIN, D. B. Bioactivity of resveratrol. *Compr Rev Food Sci Food Saf.*, v. 5, p. 65-70, 2006.
- KIRAKOSYAN, A. *et al.* Production of isoflavones in seeds and seedlings of different peanut genotypes. *Crop Sci*, v. 47, p. 717-721, 2007.
- KOCHERT, G. *et al.* RFLP variability in peanut (*Arachis hypogaea*) cultivars and wild species. *Theor Appl Genet.*, v. 81, p. 565-570, 1991.
- KRAPOVICKAS, A.; GREGORY, W. C. Taxonomy of the genus *Arachis* (Leguminosae). *Bonplandia*, v. 16, suplemento, p. 1-205, 2007.
- KRAPOVICKAS, A. Archeological peanuts from Argentina. *Bonplandia*, v. 19, n. 2, p. 183-192, 2010a.
- KRAPOVICKAS A. The domestication and origin of agriculture. *Bonplandia*, v. 19, n. 2, p. 193-199, 2010b.
- KU, K. L. *et al.* Production of stilbenoids from the callus of *Arachis hypogaea*: a novel source of the anticancer compound piceatannol. *J Agric Food Chem.*, v. 53, p. 3877–3881, 2005.
- LADEIRA, M. M. *et al.* Avaliação do feno de *Arachis pintoi* utilizando o ensaio de digestibilidade *in vivo*. *R Bras Zootec.*, v. 31, n. 6, p. 2350-2356, 2002.
- LAGE, F. F. *Caracterização química e quantificação de compostos fenólicos em forrageiras*. 2009. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, 2009.
- LANDA, F. S. L. *et al.* *In vitro* callus induction of *Caryocar brasiliense* Camb. leaf explants. *Ciênc Agrotec.*, Lavras, v. 24, edição especial, p. 56-63, 2000.
- LASCANO, C. E.; ÁVILA, P. Long-term producción de leche em pasturas solas y asociadas con leguminosas adaptadas a suelos ácidos. *Pasturas Tropicales*, Cali, v. 13, n. 1, p. 10-20, 1991.
- LAVIA, G. I. *et al.* Origin of triploid *Arachis pintoi* (Leguminosae) by autopolyploidy evidenced by FISH and meiotic behavior. *Annals of Botany*, v. 108, p. 103–111, 2011.
- LAXMI, G. V.; GIRI, C. C. Rapid *in vitro* multiplication and establishment of five *Arachis* wild species. *J Genet Breed.*, v. 57, p. 213-218, 2003.
- LEE, J. H. *et al.* Identification of phenolic compounds and antioxidant effects from the exudate of germinating peanut (*Arachis hypogaea*). *Food Sci Biotechnol.*, v. 16, p. 29–36, 2007.

- LEE, Y. Y. *et al.* Isolation of oleanane triterpenes and trans-resveratrol from the root of peanut (*Arachis hypogaea*). *J Korean Soc Appl Biol Chem.*, v. 52, n. 1, p. 40-44, 2009.
- LINNAEUS, C. *Species plantarum*. 1. ed. Estocolmo: Laurentius Salvius, 1753. 2 v.
- LITTLE, E. L.; MAGBANUA, Z. V.; PARROTT, W. A. A protocol for repetitive somatic embryogenesis from mature peanut epicotyls. *Plant Cell Rep.*, v. 19, p. 351–357, 2000.
- LOKKO, P. *et al.* Regular peanut consumption improves plasma lipid levels in healthy Ghanaians. *Int J Food Sci Nutr.*, v. 58, p. 190–200, 2007.
- LOPES, R.M. *et al.* Chemical composition and biological activities of *Arachis* species. *J Agric Food Chem.*, v. 59, p. 4321–4330, 2011.
- LOPES, R. M. *et al.* Characterization of resveratrol content in ten wild species of section *Arachis*, genus *Arachis*. *Genet Resour Crop Evol.*, v. 60, p. 2219–2226, 2013.
- LOU, H. *et al.* Polyphenols from peanut skins and their free radical-scavenging effects. *Phytochemistry*, v. 65, p. 2391–2399, 2004.
- LUDWIG, R. L. *et al.* Produção e qualidade do *Arachis pinto*. *Enciclopédia Biosfera*, v. 6, n.11, p.2, 2010.
- MAAS, A. L.; ANDERSON, W. F.; QUESENBERRY, K. H. Genetic variability of cultivated rhizoma peanut. *Crop Sci.*, v. 50, p. 1908-1914, 2010.
- MANDAL, S. M.; CHAKRABORTY, D.; DEY, S. Phenolic acids act as signaling molecules in plant-microbe symbioses. *Plant Signal Behav.*, v. 5, n. 4, p. 359-368, 2010.
- MANSUR, E. A. *et al.* Regulation of transformation efficiency of peanut (*Arachis hypogaea* L.) explants by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Sci.*, v. 89, p. 93-99, 1993.
- MARKA, R. *et al.* Preliminary phytochemical analysis of leaf, stem, root and seed extracts of *Arachis hypogaea* L. *Int J Pharm Sci Rev Res.*, v. 20, n. 22, p. 134-139, 2013.
- MARTELANC, M.; VOVK, I.; SIMONOVSKA, B. Separation and identification of some common isomeric plant triterpenoids by thin-layer chromatography and high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr.*, v. 1216, p. 6662–6670, 2009.
- MASOKO, P.; ELOFF, J. N. Screening of twenty-four south african combretum and six terminalia species (Combretaceae) for antioxidant activities. *Afr J Tradit Complem.*, v. 4, p. 231–239, 2007.
- MATHUR, M. Variations in phytosterol composition in *Corchorus depressus* and their relation with bottom-up, top-down and plant metabolites. *J Nat Prod.*, v. 5, p. 179-187, 2012.

- MCCANN, S. E. *et al.* Diet in the epidemiology of endometrial cancer in western New York (United States). *Cancer Causes Control*, v. 11, p. 965-974, 2000.
- MCCANN, S. E. *et al.* Risk of human ovarian cancer is related to dietary intake of selected nutrients, phytochemicals and food groups. *J Nutr.*, v. 133, p. 1937-1942, 2003.
- MCKENTLY, A. H. Direct somatic embryogenesis from axes of mature peanut embryos. *In vitro Cell Dev Biol Plant.*, v. 27, p. 197-200, 1991.
- MEDINA-BOLIVAR, F. *et al.* Production and secretion of resveratrol in hairy root cultures of peanut. *Phytochemistry*, v. 68, p. 1992-2003, 2007.
- MENDILAHARSU, M. *et al.* Phytosterols and risk of lung cancer: a case-control study in Uruguay. *Lung Cancer*, v. 21, p. 37-45, 1998.
- MIRANDA, E. M.; SAGGIN JÚNIOR, O. J.; SILVA, E. M. R. *Amendoim forrageiro: importância, usos e manejo*. Seropédica: EMBRAPA Agrobiologia, Documentos, 259, 2008.
- MONAGAS, M. *et al.* Comparative flavan-3-ol profile and antioxidant capacity of roasted peanut, hazelnut, and almond skins. *J Agric Food Chem.*, v. 57, p. 10590-10599, 2009.
- MONTELES, F. H. R. *et al.* Allelopathic effect of Bull-herb (*Arachis pinto*) and peanut forage (*Tridax procubens*) aqueous extracts on the germination of tomato (*Solanum lycopersicum*) and bell pepper (*Capsicum annum*) seeds. In: VII CONGRESSO BRASILEIRO DE AGROECOLOGIA, 7., 2011, Fortaleza, CE. *Cadernos de Agroecologia*, v. 6, n. 2, Resumo 11889, Fortaleza, CE: ABA-Agroecologia, 2011.
- MONTENEGRO, R.; PINZÓN, B. *Maní forrajero (Arachis pinto Krapovickas e Gregory): Una alternativa para el sostenimiento de la ganadería en Panamá*. Panamá: IDIAP, 1997. 20p.
- MOREAU, R.; WHITAKER, B.; HICKS, K. Phytosterols, phytosteranols, and their conjugates in foods: structural diversity, quantitative analysis, and health-promoting uses. *Prog Lipid Res.*, v. 41, p. 457, 2002.
- MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. *Microbiologia e Bioquímica do Solo*. 2. ed. atual. e ampl. Lavras: Ufla, 2006. 729p.
- MORENO, D. A. *et al.* Effects of *Arachis hypogaea* nutshell extract on lipid metabolic enzymes and obesity parameters. *Life Sci.*, v. 78, p. 2797-2803, 2006.
- MULABAGAL, V.; TSAY, H. S. Plant Cell Cultures - An Alternative and Efficient Source for the Production of Biologically Important Secondary Metabolites. *Int J Appl Sci Eng.*, v. 2, n. 1, p. 29-48, 2004.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant.*, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.
- NASCIMENTO, I. S. O cultivo do amendoim forrageiro. *Revista Brasileira Agrociência*, Pelotas, v. 12, n. 4, p. 387-393, 2006.

NETO, D. D. *et al.* Application and influence of crop regulator in the growth of maize plants. *Revista da FZVA, Uruguiana*, v.11, n.1, p. 1-9, 2004.

NORIOKA, S.; IKENAKA, T. Amino acid sequence of a trypsin chymotrypsin inhibitor, B-III, of peanut (*Arachis hypogaea*). *J Biochem.*, v. 93, p. 479–485, 1983a.

NORIOKA, S.; IKENAKA, T. Amino acid sequences of trypsinchymotrypsin inhibitors (A-I, A-II, B-I, and B-II) from peanut (*Arachis hypogaea*): a discussion on the molecular evolution of legume Bowman Birk type inhibitors. *J Biochem.*, v. 94, p. 589–599, 1983b.

NORIOKA, S.; OMICHI, K.; IKENAKA, T. Purification and characterization of protease inhibitors from peanuts (*Arachis hypogaea*). *J Biochem.*, v. 91, p. 1427–1434, 1982.

NORMÉN, A. L. *et al.* Plant sterol intakes and colorectal cancer risk in the Netherlands cohort study on diet and cancer. *Am J Clin Nutr.*, v. 74, p. 141-148, 2001.

NOURAN, M. G. *et al.* Peanut consumption and cardiovascular risk. *Public Health Nutr.*, v. 13, p. 1581–1586, 2010.

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

OLIVEIRA, C. A. *et al.* Decomposition of *Arachis pinto* litter intercropped with forage grass in “Cerrado” soil in the dry and wet seasons. *Biol Fertil Soils*, v. 36, p. 405–410, 2002.

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

PAGANELLA, M. B.; VALLS, J. F. M. Caracterização morfológica de cultivares e acessos selecionados de *Arachis pinto* Krapov. & Gregory. *Pasturas Trop.*, Cali, v. 24, n. 2, p. 23-30, 2002.

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

PARK, M. R. *et al.* Content of resveratrol in tissues of peanut plant. *Bulletin of the Agricultural College, Chonbuk National University*, v. 34, p. 55-61, 2003.

PAVLIK, M. *et al.* The contents of amino acid and sterol in maize plant growing under different nitrogen conditions. *Plant Soil Environ.*, v. 56, n. 3, p. 125-132, 2010.

PEÑALOZA, A. P. S.; POZZOBON, M. T.; VALLS, J. F. M. Cytogenetic findings in wild species of *Arachis* (Leguminosae). *Revista Brasileira de Genética*, v. 19, suplemento, p. 129, 1996.

- PEREIRA, J. M. Leguminosas forrageiras em sistemas de produção de ruminantes: onde estamos? para onde vamos? In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO ESTRATÉGICO DE PASTAGENS, 1., 2002, Viçosa, MG. *Anais...* Viçosa, MG: DZO UFV, 2002. p.109-147.
- PEREIRA, J. M.; REZENDE, C. P.; MORENO-RUIZ, M. A. Desenvolvimento e adoção do amendoim forrageiro (*Arachis pintoi* Krapov & Gregory) cultivar Belmonte. In: IV Encontro Latino Americano de Especialistas em *Arachis*, 2004, Brasília, DF. *Anais...* Brasília, DF: 2004.
- PEREIRA, J. M.; RESENDE, C. P.; SANTANA, J. R. *Amendoim forrageiro cv. Belmonte* (*Arachis pintoi* Krapov & Gregory): uma nova opção de leguminosa forrageira. CEPLAC, 1999. Disponível em: <<http://www.cepec.gov.br/amendoim.htm>>. Acesso em: 01 out. 2003.
- PEREZ, N. B. *Maní forrajero en Río Grande del Sur- Brasil*. 2001. Disponível em: <<http://www.pasturasdeamerica.com.relatos/brasil.asp>>. Acesso em: 19 set. 2003.
- PERIN, A.; GUERRA, J. G. M.; TEIXEIRA, M. G. Cobertura do solo e acumulação de nutrientes pelo amendoim forrageiro. *Pesquisa Agropecuária Bras.*, v. 38, p. 791-796, 2003.
- PITTMAN, R. N. *et al.* *In vitro* culture of immature peanut (*Arachis spp.*) leaves: morphogenesis and plantlet regeneration. *Peanut Sci.*, v. 10, p. 21–25, 1983.
- 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. *J Agric Food Chem.*, v. 57, p. 7750–7756, 2009.
- PURCINO, H. M. A. *et al.* Avaliação da cobertura do solo com *Arachis pintoi* como fonte de nitrogênio para produção de milho. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, v. 41, Campo Grande, MS. *Anais...* Campo Grande, SBZ, 2004b. CD-ROM.
- QIU, J. *et al.* Screening natural antioxidants in peanut shell using DPPH–HPLC–DAD–TOF/MS methods. *Food Chem.*, v. 135, p. 2366–2371, 2012.
- REY, H. Y. *et al.* Cryopreservation of *in vitro* grown shoot tips and apical meristems of the forage legume *Arachis pintoi*. *CryoLetters*, v. 30, n. 5, p. 347-358, 2009.
- REY, H. Y.; MROGINSKI, L. A. regeneration of plants from apical meristem tips and nodal segments of *Arachis pintoi*. *Peanut Sci.*, v. 30, n. 2, p. 75-79, 2003.
- REY, H. Y.; MROGINSKI, L. A. Somatic embryogenesis and plant regeneration in diploid and triploid *Arachis pintoi*. *Biol Plantarum*, v. 50, n. 1, p. 152-155, 2006.
- REY, H. Y. *et al.* Plant regeneration in *Arachis pintoi* (Leguminosae) through leaf culture. *Plant Cell Rep.*, v. 19, p. 856–862, 2000.
- RONCO, A. *et al.* Vegetables, fruits, and related nutrients and risk of breast cancer: a case-control study in Uruguay. *Nutr Cancer*, v. 35, p. 111-119, 1999.

RUAN, G.; FENG, S. S. Preparation and characterization of poly(lactic acid)-poly(ethylene glycol)-poly(lactic acid) (PLA-PEG-PLA) microspheres for controlled release of paclitaxel. *Biomaterials*, v. 24, p. 5037–44, 2003.

RUDOLF, J. L.; RESURRECCION, A. V. A. Elicitation of resveratrol in peanut kernels by application of abiotic stresses. *J Agric Food Chem.*, v. 53, p. 10186–10192, 2005.

SAIMAN, M. Z. *et al.* Induction, characterization, and NMR-based metabolic profiling of adventitious root cultures from leaf explants of *Gynura procumbens*. *Plant Cell Tiss Organ Cult.*, v. 109, p. 465–475, 2012.

SALES, J. M.; RESURRECCION, A. V. A. Phenolic profile, antioxidants, and sensory acceptance of bioactive-enhanced peanuts using ultrasound and UV. *Food Chem.*, v. 122, p. 795–803, 2010.

SALES, R. L. *et al.* The effects of peanut oil on lipid profile of normolipidemic adults: a three-country collaborative study. *J Appl Res.*, v. 8, p. 216–225, 2008.

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

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

SHELTON, H. M.; FRANZEL, S.; PETERS, M. Adoption of tropical legume technology around the world: analysis of success. In: MCGILLOWAY, D.A. (Ed.). *Grassland: a global resource*. Wageningen: Wageningen Academic Publishers, 2005. p. 149-166.

SHEM-TOV, Y. *et al.* Determination of total polyphenol, flavonoid and anthocyanin contents and antioxidant capacities of skins from peanut (*Arachis hypogaea*) lines with different skin colors. *J Food Biochem.*, v. 36, p. 301–308, 2012.

SHIMIZU, M. *et al.* Anti-inflammatory constituents of topically applied crude drugs I: constituents and anti-inflammatory effect of *Eriobotrya japonica* Lindl. *Chem Pharm Bull.*, v. 34, p. 2614–2617, 1986.

SILVA, M. P. *Amendoim forrageiro - Arachis pintoi*. Fauna e Flora do Cerrado. Campo Grande: Nov. 2004. Disponível em: <<http://www.cnpqg.embrapa.br/~rodiney/series/Arachis/Arachis.htm>>. Acesso em: 12 dez. 2013.

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

SIMPSON, C. E.; VALLS, J. F. M.; MILES, J. W. Reproductive biology and potential for genetic recombination in *Arachis*. In: KERRIDGE, P.C.; HARDY, B. (Eds.) *Biology and agronomy of forage Arachis*. Cali: CIAT, 1994. p.43-52.

SIVAKUMAR, G. *et al.* Biomass production of hairy roots of *Artemisia annua* and *Arachis hypogaea* in a scaled-up mist bioreactor. *Biotechnol Bioeng.*, v. 107, n. 5, p. 802-13, 2010.

SIVANANDHAN, G. *et al.* Chitosan enhances withanolides production in adventitious root cultures of *Withania somnifera* (L.) Dunal. *Ind Crop Prod.*, v. 37, p. 124– 129, 2012.

SMANIA, E. F. *et al.* Antifungal activity of sterols and triterpenes isolated from *Ganoderma annulare*. *Fitoterapia*, v. 74, p. 375-377, 2003.

SOBOLEV, V. S.; SY, A. A.; GLOER, J. B. Spermidine and flavonoid conjugates from peanut (*Arachis hypogaea*) flowers. *J Agric Food Chem.*, v. 56, n. 9, p. 2960-2969, 2008.

SOBOLEV, V. S. Production of phytoalexins in peanut (*Arachis hypogaea*) seed elicited by selected microorganisms. *J Agric Food Chem.*, v. 61, p. 1850–1858, 2013.

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

STEFANI, E. *et al.* Plant sterols and risk of stomach cancer: a case-control study in Uruguay. *Nutr Cancer*, v. 37, p. 140-144, 2000a.

STEFANI, E. *et al.* Vegetables, fruits, related dietary antioxidants, and risk of squamous cell carcinoma of the esophagus: a case-control study in Uruguay. *Nutr Cancer*, v. 38, p. 23-29, 2000b.

STEPHENS, A. M. *et al.* Peanuts, peanut oil, and fat free peanut flour reduced cardiovascular disease risk factors and the development of atherosclerosis in Syrian Golden hamsters. *J Food Sci.*, v. 75, p. 116–122, 2010.

STEVENSON, P. C. *et al.* Developmental inhibition of *Spodoptera litura* (Fab.) larvae by a novel caffeoylquinic acid from the wild groundnut, *Arachis paraguariensis* (Chod et Hassl.). *J Chem Ecol.*, v. 19, p. 2917–2933, 1993.

STONE-MILLER, R. *Art of the Andes*. 2nd. Ed. New York: Thames and Hudson, 2002. 224 p.

SUBBA RAO, P. V.; STRANGE, R. N. Chemistry, biology, and role of groundnut phytoalexins in resistance to fungal attack. In: DANIEL, M., PURKAYASTHA, R.P. (Eds.) *Handbook of Phytoalexin Metabolism and Action*. New York: Marcel Dekker, 1995. p. 199–227.

SUBBA RAO, P. V.; WADIA, K. D. R.; STRANGE, R. N. Biotic and abiotic elicitation of phytoalexins in leaves of groundnut (*Arachis hypogaea* L.). *Physiol Mol Plant Pathol.*, v. 49, p. 343-357, 1996.

SUDHA, C. G.; SEENI, S. Establishment and analysis of fast growing normal root culture of *Decalepis arayalpathra*, a rare endemic medicinal plant. *Curr Sci.*, v. 81, p. 371–374, 2001.

- SWAIN, S. S.; ROUT, K. K.; CHAND, P. K. Production of triterpenoid anti-cancer compound taraxerol in agrobacterium-transformed root cultures of butterfly pea (*Clitoria ternatea* L.). *Appl Biochem Biotechnol.*, v. 168, n. 3, p. 487-450, 2012.
- TABATA, H. Paclitaxel production by plant-cell-culture technology. *Adv Biochem Eng Biotechnol.*, v. 87, p. 1-23, 2004.
- TANIGUCHI, S. *et al.* Production of bioactive triterpenes by *Eriobotrya japonica* calli. *Phytochemistry*, v. 59, p. 315–323, 2002.
- TATSUNO, T. *et al.* Anti-inflammatory and anti-melanogenic proanthocyanidin oligomers from peanut skin. *Biol Pharm Bull.*, v. 35, n. 6, p. 909–916, 2012.
- TISSIER, A.; ZIEGLER, J.; VOGT, T. Specialized Plant Metabolites: Diversity and Biosynthesis. In: *Ecological Biochemistry: Environmental and Interspecies Interactions*. Eds. KRAUSS, G. J.; NIES, D. H., Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany, 2014.
- TOKUSOGLU, O.; ÜNAL, M. K.; YEMIS, F. Determination of the phytoalexin resveratrol (3,5,4'-Trihydroxystilbene) in peanuts and pistachios by high-performance liquid chromatographic diode array (HPLC-DAD) and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). *J Agric Food Chem.*, v. 53, p. 5003-5009, 2005.
- TOMMASI, N. D.; SHIMONE, F. D.; PIZZA, C. Constituents of *Eriobotrya japonica*: a study of their antiviral properties. *J Nat Prod.*, v. 55, p. 1067–1073, 1992.
- TRIPATHI, L.; TRIPATHI, J. N. Role of biotechnology in medicinal plants. *Trop J Pharm Res.*, v. 2, n. 2, p. 243-253, 2003.
- TROSZYŃSKA, A.; CISKA, E. Phenolic compounds of seed coats of white and coloured varieties of pea (*Pisum sativum* L.) and their total antioxidant activity. *Czech J Food Sci.*, v. 20, p. 15–22, 2002.
- TSAI, W. J. *et al.* Inhibition of cyclic AMP phosphodiesterase and blockage of arachidonate metabolism by antiplatelet principles from the seed hulls of *Arachis hypogaea* L. *Zhonghua Yaoxue Zazhi*, v. 55, p. 335–345, 2003.
- VALENTIM, J. F.; ANDRADE, C. M. S. Tropical kudzu (*Pueraria phaseoloides*): successful adoption in sustainable cattle production systems in the Western Brazilian Amazon. In: INTERNATIONAL GRASSLAND CONGRESS, 20., 2005, Dublin. *Proceedings...* The Netherlands: Wageningen Academic Publishers, 2005a. p. 328.
- VALENTIM, J. F.; ANDRADE, C. M. S. Forage peanut (*Arachis pintoi*): a high yielding and high quality tropical legume for sustainable cattle production systems in the Western Brazilian Amazon. In: INTERNATIONAL GRASSLAND CONGRESS, 20., 2005, Dublin. *Proceedings...* The Netherlands: Wageningen Academic Publishers, 2005b. p. 329.
- VALENTIM, J. F.; ASSIS, G. M. L.; SÁ, C. P. *Produção de sementes de amendoim forrageiro (Arachis pintoi) no Acre. Ci & Desenv.*, Belém, v. 4, n. 8, jan./jun. 2009.

- VALENTIM, J. F.; CARNEIRO, J. C.; SALES, M. F. L. *Amendoim forrageiro cv. Belmonte*: leguminosa para diversificação das pastagens e conservação do solo no Acre. Rio Branco: EMBRAPA Acre, Circular Técnica, 43, 2001. 18 p.
- VALLS, J. F. M.; SILVA, G. P.; MONÇATO, L. Diversidade genética no gênero *Arachis* e a origem do amendoim. In: ENCONTRO SOBRE TEMAS DE GENÉTICA E MELHORAMENTO, 17., 2000, Piracicaba. *Anais...* Piracicaba: ESALQ/Depto. De Genética, 2000. p. 19-33.
- VALLS, J. F. M.; COSTA, L. C.; CUSTÓDIO, A. R. A novel trifoliolate species of *Arachis* (Fabaceae) and further comments on the taxonomic section *Trierectoides*. *Bonplandia*, v. 22, n. 1, p. 91-97, 2013.
- VALLS, J. F. M.; SIMPSON, C. E. New species of *Arachis* L. (Leguminosae) from Brazil, Paraguay and Bolivia. *Bonplandia*, v. 14, p. 35-64, 2005.
- VALLS, J. F. M.; SIMPSON, C. E. Taxonomy, natural distribution, and attributes of *Arachis*. In: KERRIDGE, P.C. & HARDY, B. (eds.). *Biology and Agronomy of Forage Arachis*. Cali: CIAT, 1994. v. 1, p. 1-18.
- VAUGHN, S. F. Phytotoxic and antimicrobial activity of 5,7-dihydroxychromone from peanut shells. *J Chem Ecol.*, v. 21, p. 107–115, 1995.
- VEIGA, R. F. A. *et al.* Amendoins silvestres para uso ornamental. *Rev Bras Hortic Ornam.*, v. 9, p. 7-15, 2003.
- VENKATACHALAM, P.; PILLAI, A. S.; JAYABALAN, N. Callus culture and plant regeneration from different explants of groundnut (*Arachis hypogaea* L.). *Breed Sci.*, v. 46, p. 315-320, 1996.
- VIDOZ, M. L. *et al.* Somatic embryogenesis and plant regeneration through leaf culture in *Arachis glabrata* (Leguminosae). *Acta Physiol Plant.*, v. 26, n. 1, p. 59-66, 2004.
- VIDOZ, M. L. *et al.* *In vitro* plant regeneration of *Arachis correntina* (Leguminosae) through somatic embryogenesis and organogenesis. *Plant Cell Tiss Organ Cult.*, v. 86, p. 111-115, 2006.
- WAGNER, H. *Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas*. Springer Science & Business Media, 1996.
- WANG, K.-H. *et al.* Germination of peanut kernels to enhance resveratrol biosynthesis and prepare sprouts as a functional vegetable. *J Agric Food Chem.*, v. 53, p. 242-246, 2005.
- WANG, S. Y. *et al.* Hypotin, a novel antipathogenic and antiproliferative protein from peanuts with a sequence similar to those of chitinase precursors. *J Agric Food Chem.* v. 55, p. 9792–9799, 2007.
- WANG, M. L.; PITTMAN, R. N. Resveratrol content in seeds of peanut germplasm quantified by HPLC. *Plant Genet Res.*, v. 7, n. 1, p. 80–83, 2008.

- WANI, M. C. *et al.* Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *J Am Chem Soc.*, v. 93, p. 2325–2327, 1971.
- WARDLE, D. A.; GILLER, K. E.; BARKER, G. M. The regulation and functional significance of soil biodiversity in agroecosystems. In: WOOD, D.; LENNÉ, J. M. (Ed.). *Agrobiodiversity: characterization, utilization, and management*. Wallingford: CAB International, 1999. p. 87-121.
- WILLIAMS, M. J. *et al.* Photoperiod sensitivity of rhizoma peanut germplasm. *Agron J.*, v. 100, n. 5, p. 1366–1370, 2008.
- WILSON, S. A.; ROBERTS, S. C. Recent advances towards development and commercialization of plant cell culture processes for the synthesis of biomolecules. *Plant Biotech J.*, v. 10, p. 249–268, 2012.
- WILT, T. *et al.* Beta-sitosterols for benign prostatic hyperplasia. *Cochrane Database Syst. 2: Rev.*, 2000.
- WIN, M. M. *et al.* Effects of roasting on phenolics composition and antioxidant activity of peanut (*Arachis hypogaea* L.) kernel flour. *Eur Food Res Technol.*, v. 233, p. 599–608, 2011.
- WU, J.; LINDONG, L.; CHAU, F. Ultrasound-assisted extraction of ginseng saponins from ginseng roots and cultured ginseng cells. *Ultrason Sonochem.*, v. 8, p. 347-352, 2001.
- YANG, M. H. *et al.* Medicinal mushroom *Ganoderma lucidum* as a potent elicitor in production of *t*-resveratrol and *t*-piceatannol in peanut calluses. *J Agric Food Chem.*, v. 58, p. 9518–9522, 2010a.
- YANG, M. H. *et al.* Investigation of microbial elicitation of *trans*-resveratrol and *trans*-piceatannol in peanut callus led to the application of chitin as a potential elicitor. *J Agric Food Chem.*, v. 58, p. 9537–9541, 2010b.
- YEN, G. C.; DUH, P. D. Antioxidant activity of methanolic extracts of peanut hulls from various cultivars. *J Am Oil Chem Soc.*, v. 72, p. 1065–1067, 1995.
- YE, X.; NG, T. B. Hypogin, a novel antifungal peptide from peanuts with sequence similarity to peanut allergen. *J Pept Res.*, v. 57, p. 330–336, 2001.
- YOSHIDA, Y.; NIKI, E. Antioxidant effects of phytosterol and its components. *J Nutr Sci Vitaminol. (Tokyo)*, v. 49, p. 277–280, 2003.
- YU, J.; AHMEDNA, M.; GOKTEPE, I. Effects of processing methods and extraction solvents on concentration and antioxidant activity of peanut skin phenolics. *Food Chem.*, v. 90, p. 199–206, 2005.
- YU, J. *et al.* Peanut skin procyanidins: Composition and antioxidant activities as affected by processing. *J Food Comp Anal.*, v. 19, n. 4, p. 364-371, 2006.

YU, K. W. *et al.* Jasmonic acid improves ginsenoside accumulation in adventitious root culture of *Panax ginseng* C.A. Meyer, *Biochem Eng J.*, v. 11, n. 2–3, p. 211-215, 2002.

ZHANG, J. *et al.* Effects of sucrose concentration and exogenous hormones on growth and periplocin accumulation in adventitious roots of *Periploca sepium* Bunge. *Acta Physiol Plant.*, v. 34, p. 1345–1351, 2012.

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

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

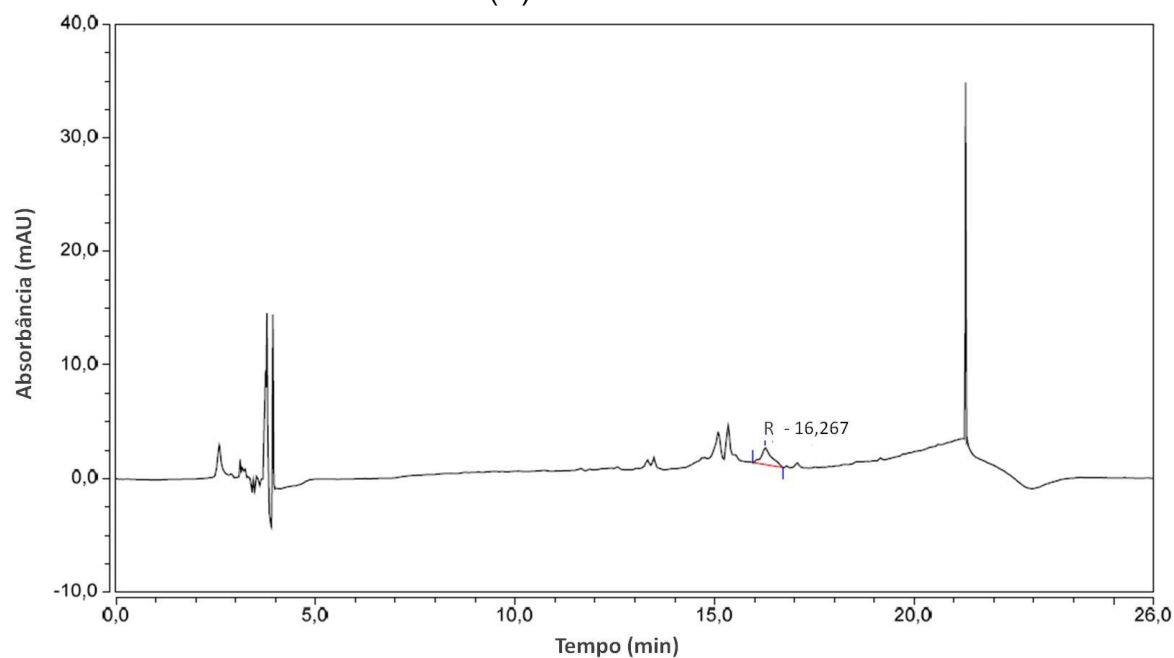
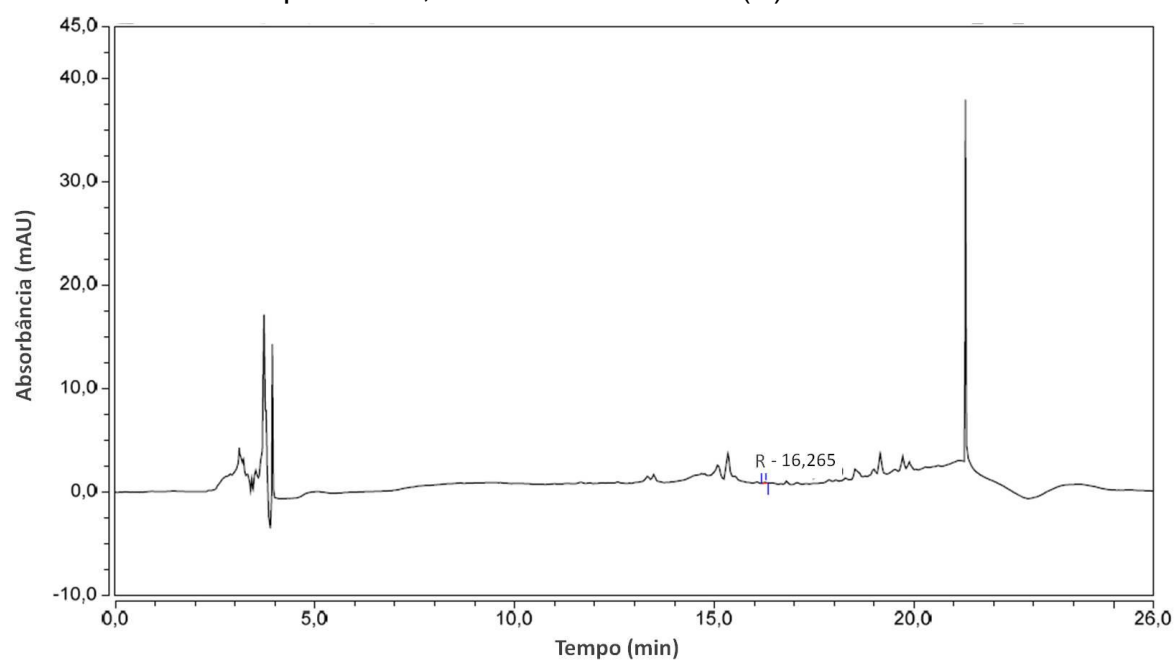
**APÊNDICE – Cromatogramas obtidos por CLAE****Figura 32 – Cromatograma de extrato de cotilédone (amostra I) obtido por CLAE, contendo resveratrol (R)****Figura 33 – Cromatograma de extrato de semente com tegumento (amostra II) obtido por CLAE, contendo resveratrol (R)**

Figura 34 – Cromatograma de extrato de semente sem tegumento (amostra III) obtido por CLAE, contendo resveratrol (R)

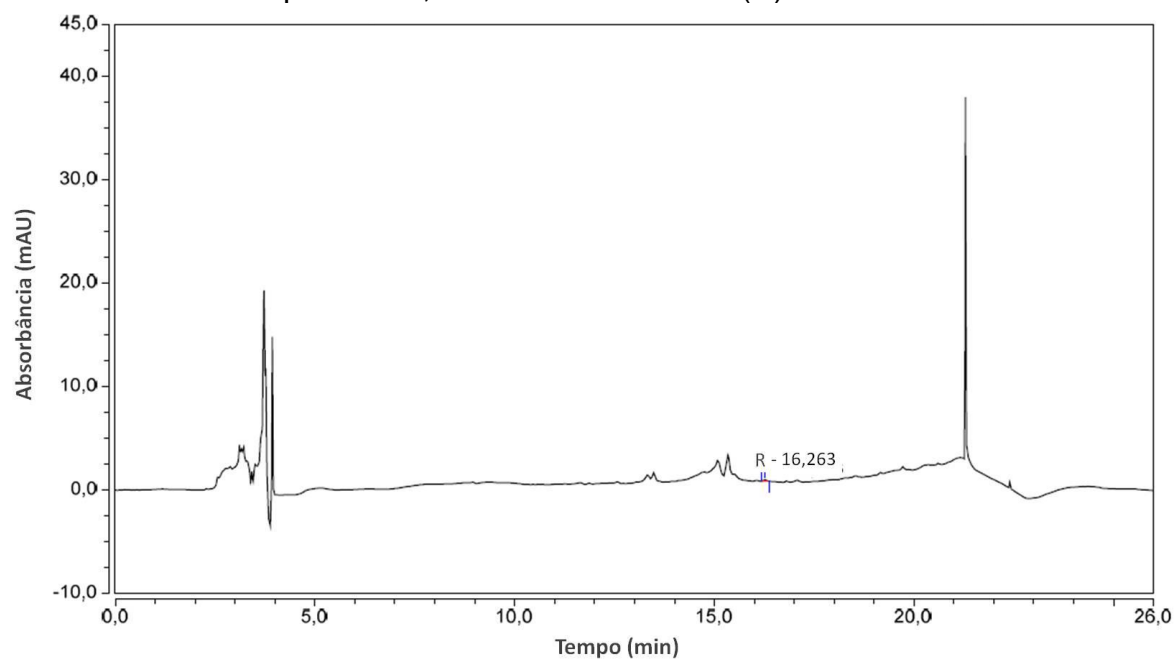


Figura 35 – Cromatograma de extrato de folhas de plantas obtidas *in vitro* (amostra IV) obtido por CLAE, contendo resveratrol (R)

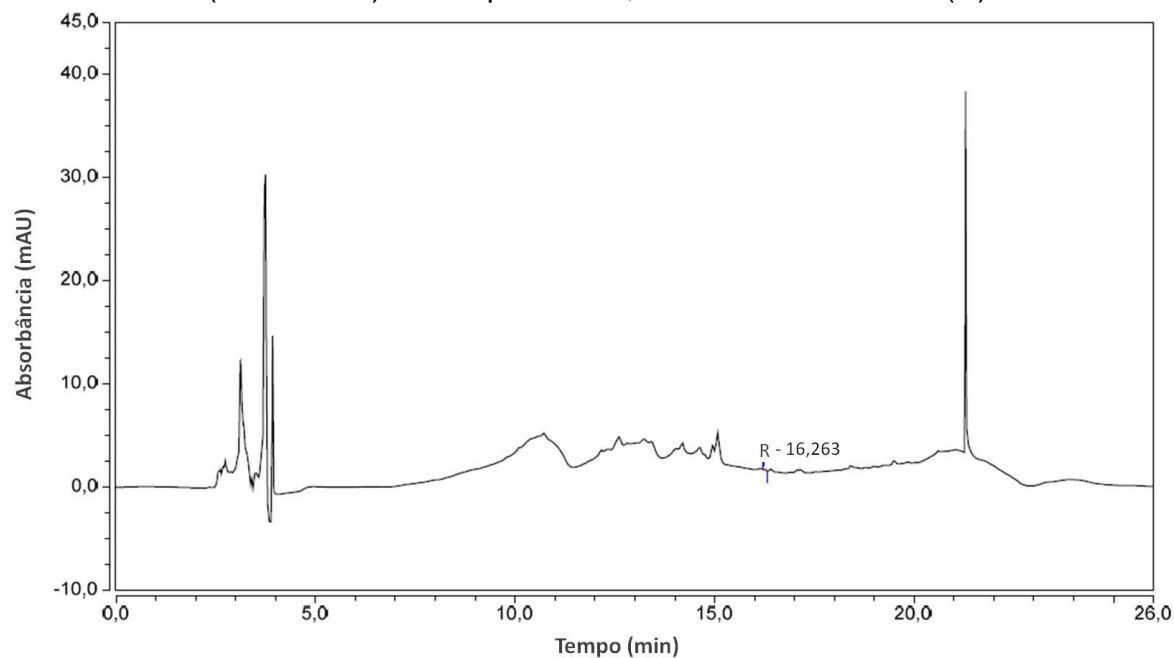


Figura 36 – Cromatograma de extrato de raízes de plantas obtidas *in vitro* (amostra V) obtido por CLAE, contendo resveratrol (R)

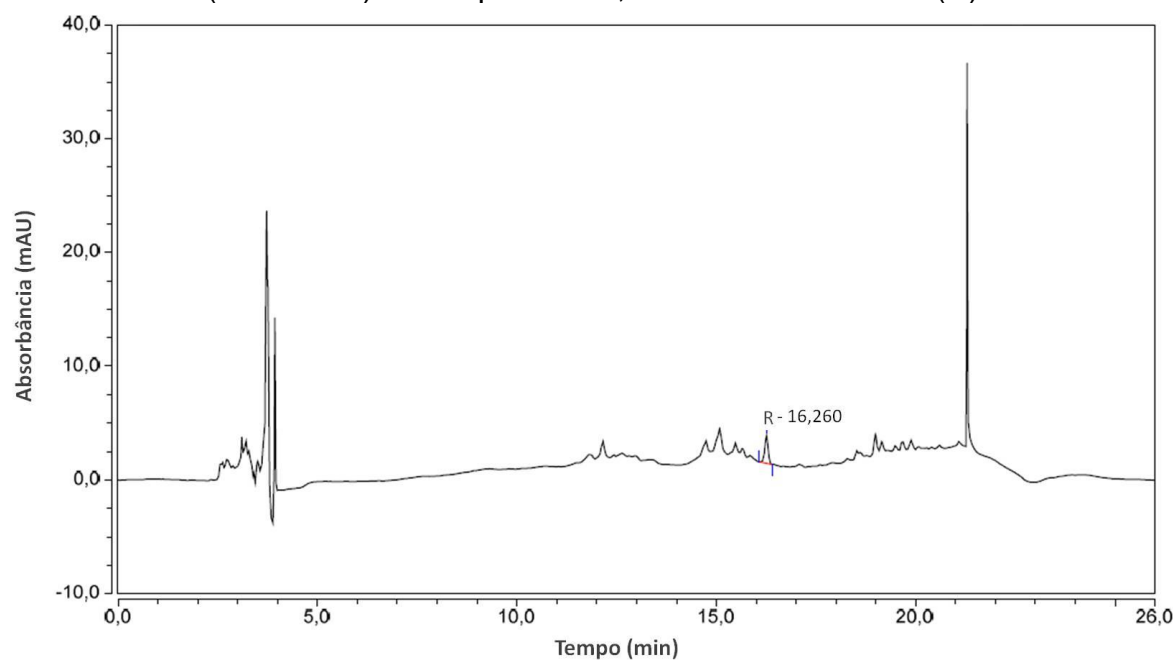


Figura 37 – Cromatograma de extrato de caules de plantas obtidas *in vitro* (amostra VI) obtido por CLAE, contendo resveratrol (R)

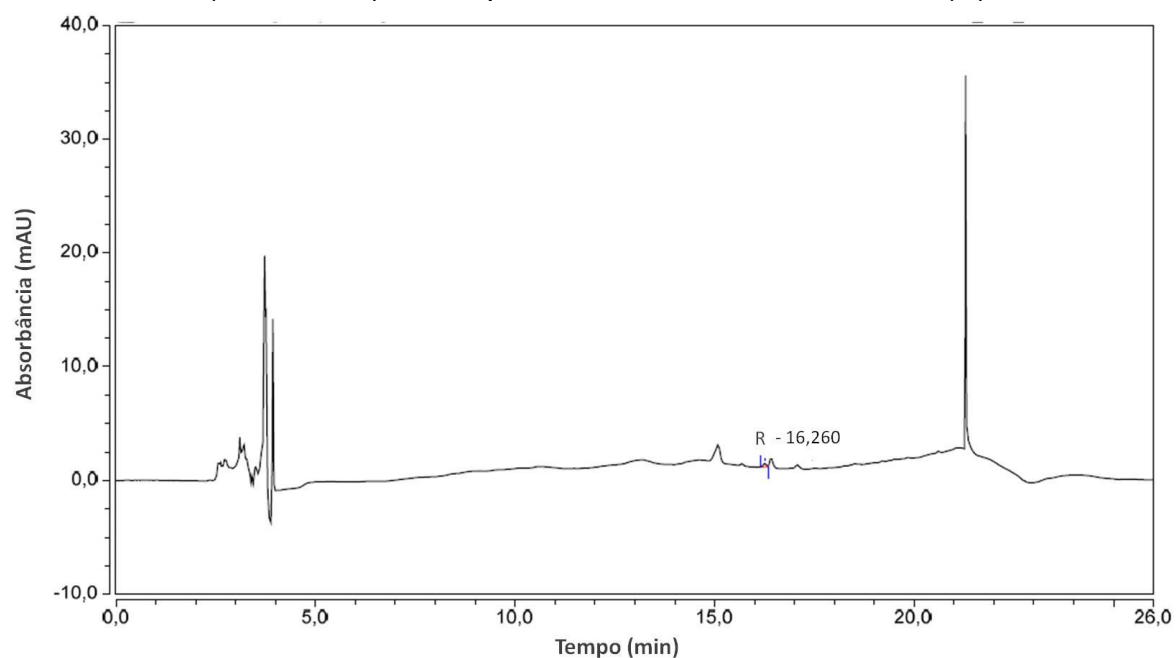


Figura 38 – Cromatograma de extrato de folhas de plantas mantidas *in vivo* (amostra VII) obtido por CLAE, contendo resveratrol (R)

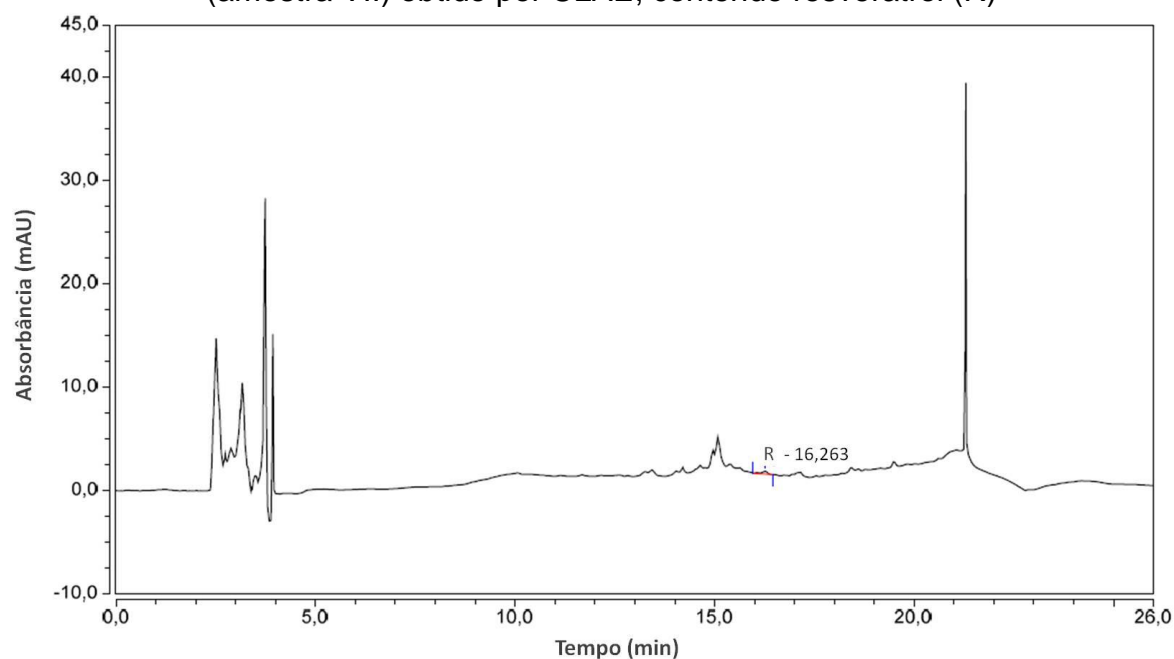


Figura 39 – Cromatograma de extrato de raízes de plantas mantidas *in vivo* (amostra VIII) obtido por CLAE, contendo resveratrol (R)

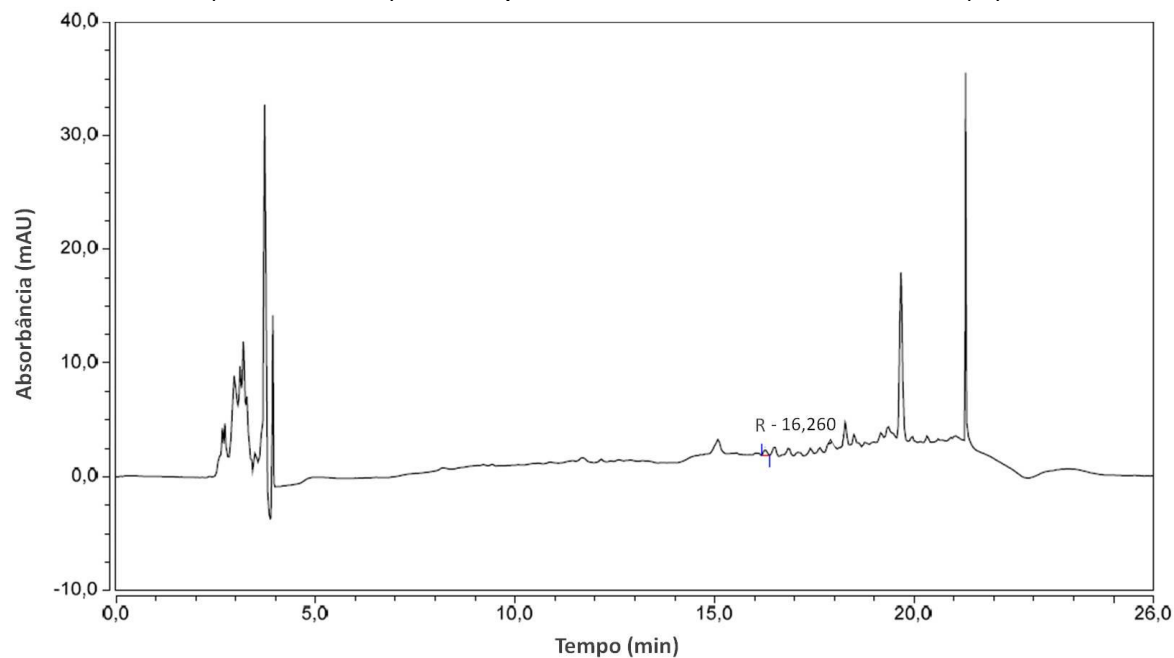


Figura 40 – Cromatograma de extrato de caules de plantas mantidas *in vivo* (amostra IX) obtido por CLAE, contendo resveratrol (R)

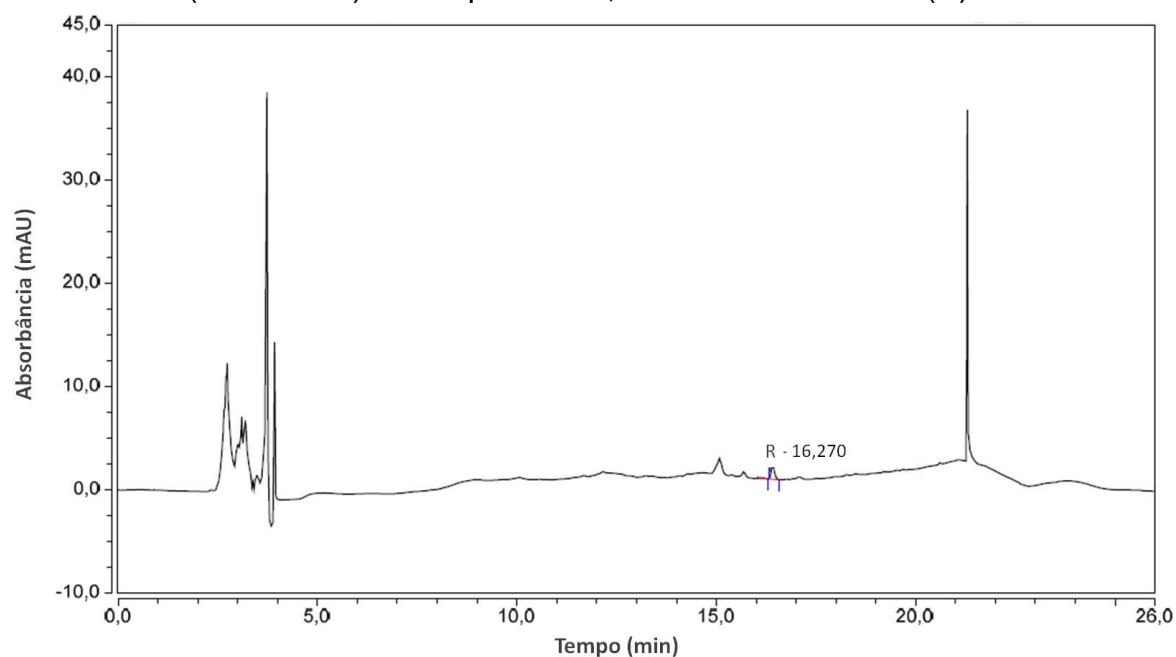


Figura 41 – Cromatograma de extrato de raízes induzidas em resposta a ANA (amostra X) obtido por CLAE, contendo resveratrol (R)

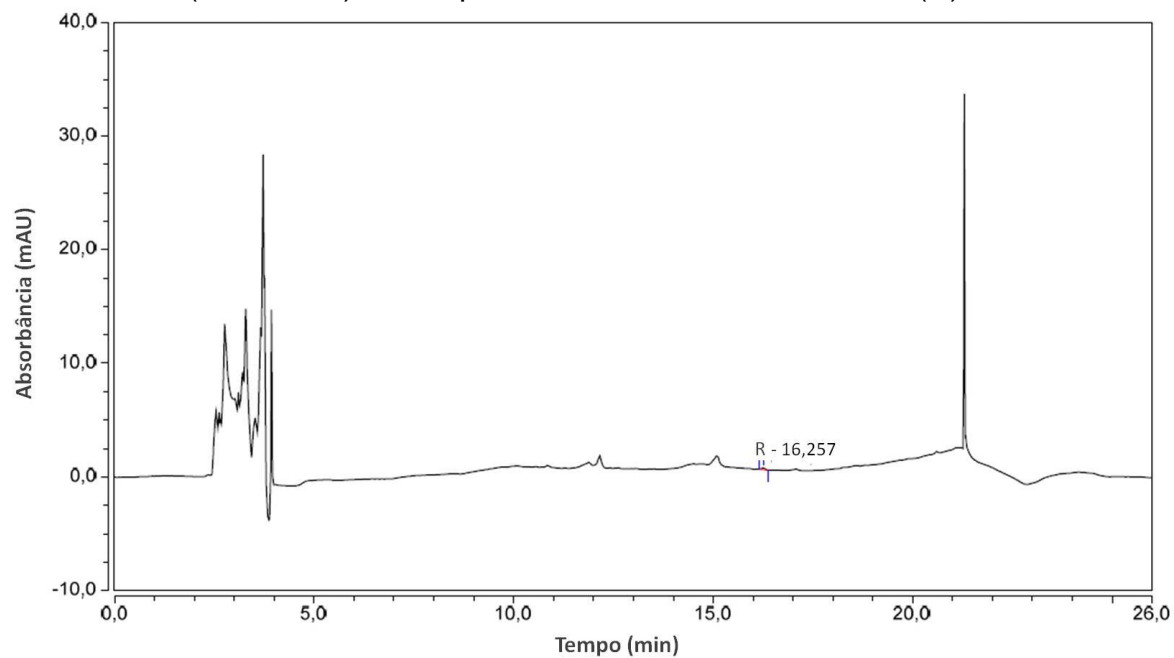


Figura 42 – Cromatograma de extrato de raízes induzidas em resposta a AIA (amostra XI) obtido por CLAE, contendo resveratrol (R)

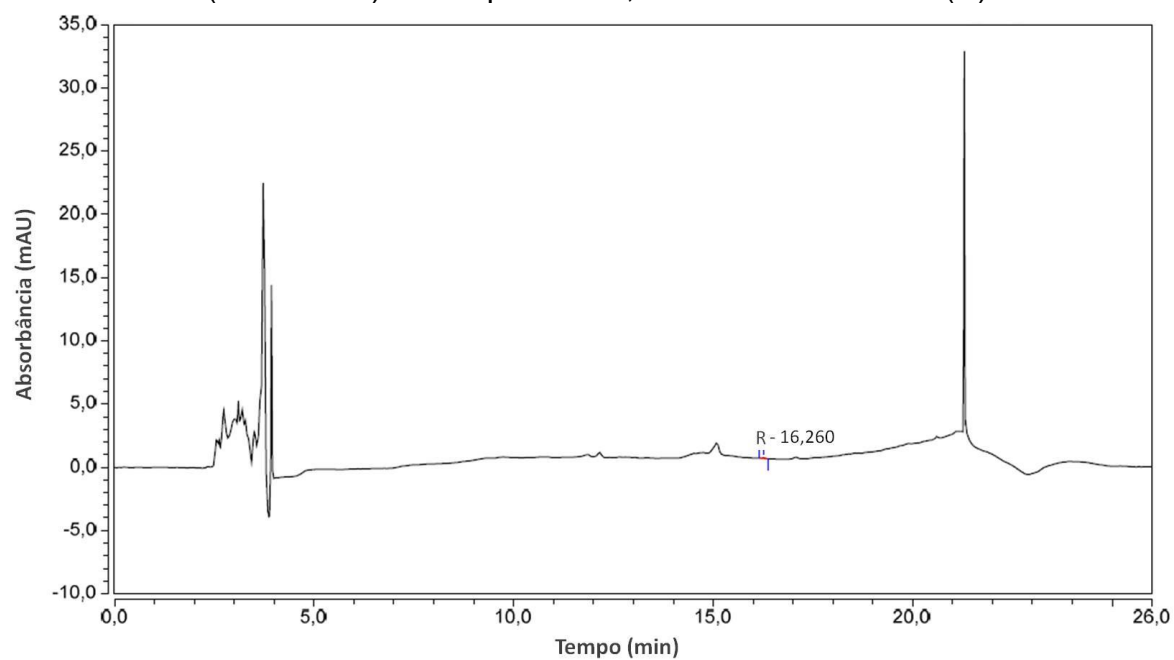


Figura 43 – Cromatograma de extrato de raízes induzidas em resposta a AIB (amostra XII) obtido por CLAE, contendo resveratrol (R)

