



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

Simone Gama de Araújo

**Cultura de tecidos, análise fitoquímica e avaliação da atividade biológica de  
*Arachis villosulicarpa* Hoehne**

Rio de Janeiro

2011

Simone Gama de Araújo

**Cultura de tecidos, análise fitoquímica e avaliação da atividade biológica de  
*Arachis villosulicarpa* Hoehne**

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre, ao programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Elisabeth Atalla Mansur de Oliveira  
Coorientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Geórgia Pacheco Peters de Almeida

Rio de Janeiro

2011

CATALOGAÇÃO NA FONTE  
UERJ / REDESIRUS / BIBLIOTEC CTC/A

A663 Araújo, Simone Gama de.  
Cultura de tecidos, análise fitoquímica e avaliação da  
atividade biológica de *Arachis villosulicarpa* Hoenhe L. /  
Simone Gama de Araújo. – 2011.  
78 f. : il.

Orientadora: Elisabeth Atalla Mansur de Oliveira.  
Coorientadora: Geórgia Pacheco Peters de Almeida  
Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio  
de Janeiro, Instituto em Biologia Roberto Alcântara Gomes.

1. Amendoim - Teses. 2. Tecidos vegetais - Cultura e  
meios de cultura - Teses. I. Oliveira, Elisabeth Atalla Mansur  
de. II. Almeida, Geórgia Pacheco Peters de. III. Universidade  
do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto  
Alcântara Gomes. IV. Título.

CDU 633.852.52

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

---

Assinatura

---

Data

Simone Gama de Araújo

**Cultura de tecidos, análise fitoquímica e avaliação da atividade biológica de  
*Arachis villosulicarpa* Hoehne**

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

Aprovado em 28 de fevereiro de 2011.

Banca examinadora:

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Elisabeth Atalla Mansur de Oliveira (Orientadora)  
Departamento de Biologia Celular e Genética da UERJ

---

Dra. Cláudia Simões  
Departamento de Biologia Celular e Genética da UERJ

---

Prof. Dr. Gilberto Sachetto Martins  
Departamento de Genética da UFRJ

---

Prof. Dr. Marcelo Guerra Santos  
Departamento de Ciências da FFP/UERJ

Rio de Janeiro  
2011

## DEDICATÓRIA

Aos meus pais, pelo amor e pelo exemplo de fé, à minha irmã pelo carinho e pela paciência e ao meu amor, Leandro, pela dedicação e pelo companherismo.

## AGRADECIMENTOS

A Deus pela força e inspiração que sempre tive nos momentos em que precisei.

Aos meus pais, que me incentivaram e contribuíram para a realização dos meus sonhos.

A minha irmã, que muitas vezes precisou ser paciente e muitas vezes permitiu que tomasse posse do computador para a realização dos meus trabalhos.

Ao meu amor, meu anjo, meu noivo e meu companheiro, Leandro, que me apoiou tantas vezes, suportando todas as minhas crises de nervosismo e ansiedade, além de ser compreensivo durante nos momentos em que precisei abdicar de sua companhia. Espero que possamos partilhar ainda muitos sucessos juntos!

À Prof<sup>a</sup> Dra. Elisabeth Atalla Mansur de Oliveira, por ter aceitado orientar esse trabalho, pela confiança depositada, pelo conhecimento compartilhado, pela paciência dispensada e por ter me ensinado muito sobre a pesquisa científica. Foi uma satisfação trabalharmos juntas!!

À Prof<sup>a</sup> Dra. Georgia Pacheco, por todo carinho, auxílio, conselho, paciência e amizade que proporcionou o suporte necessário para a realização desse trabalho.

À Prof<sup>a</sup> Dra. Rachel Glagliardi, pelos conselhos, pela amizade e pelo grande carinho de mãe durante esses quatro anos de laboratório.

Ao professor Professor Adriano Caldeira de Araújo, do Departamento de Biofísica e Biometria do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da UERJ, por ter disponibilizado o material necessário para a realização dos testes de potencialidade genotóxica, além de sua total disposição em ajudar e auxiliar no que fosse necessário.

À Prof<sup>a</sup> Marsen Garcia Pinto Coelho, por ter disponibilizado o Laboratório de Imunologia aplicada à Bioquímica e Proteínas de Produtos Naturais (LIA-BPPN) para realização da análise fitoquímica por HPTLC que foi fundamental na realização deste trabalho.

À doutotanda do LIA-BPPN, Daniele Corrêa Fernandes, por ter sido extremamente receptiva, solícita e atenciosa. Obrigada pelas sugestões que engrandeceram significativamente meu trabalho, além de toda a ajuda que você,

humildemente, sempre me proporcionou. Não tenho palavras para agradecer tamanha satisfação em termos trabalhado juntas.

À Claudinha e à Tati, que me ajudaram muito com as suas sugestões para a realização deste trabalho.

A minha querida amiga Renatinha pela ajuda incondicional, pelos conselhos nos momentos sérios e pelas risadas nos momentos de alegria. Seu sorriso contagiante e sua calma nos momentos mais difíceis me ajudaram muito a solucionar todos os problemas que apareciam.

Ao doutorando Thigago Saide, pelo carinho, amizade, pelo incentivo e pelos ensinamentos sobre a cultura de tecidos que me ajudaram muito nesta caminhada.

Aos meus maravilhosos amigos e companheiros Bia e Leo, por todos os momentos de diversão (que foram muitos e com muita diversão). Bia, obrigada pela ajuda, pela paciência e pela sua maravilhosa companhia nos momentos de zoação. Leo, apesar do pouco tempo, já te considero um grande amigo, muito obrigada por me dar conselhos e por me fazer sorrir nos momentos mais tensos.

Ao meu querido Gabriel, por estar sempre disposto me ajudar, por ter partilhado comigo novos conhecimentos e pelos bons momentos de convivência. Sem o seu apoio não teria sido possível obter grande parte dos resultados aqui apresentados!

A minha amiguinha de metrô, Marcela, que tantas vezes me fez companhia e ouviu os meus lamentos durante as nossas longas e calorosas viagens de retorno ao lar. Quanto sufoco já passamos juntas, hein!

E a todos os meus colegas de trabalho que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

Procure ser um homem de valor, em vez de ser um homem de sucesso.

*Albert Einstein*

## RESUMO

ARAÚJO, Simone Gama de. **Cultura de tecidos, análise fitoquímica e avaliação da atividade biológica de *Arachis villosulicarpa* Hoehne**. 2011. 78 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2011.

O amendoim cultivado (*Arachis hypogaea*) possui várias substâncias com capacidade antioxidante que apresentam efeitos benéficos para a saúde humana. Entretanto, a produção dessas substâncias ainda não foi observada em outras espécies do gênero. O objetivo deste trabalho foi o estabelecimento de sistemas de cultura *in vitro* para *Arachis villosulicarpa*, visando o desenvolvimento de alternativas para a produção de metabólitos especiais. Segmentos nodais, internodais e foliares foram excisados de plantas *in vitro* e inoculados em meio MS suplementado com BAP, ANA, PIC ou 2,4-D. Os explantes apresentaram respostas distintas de acordo com o regulador de crescimento utilizado. Na presença de PIC, foi observada a formação de calos friáveis levemente oxidados em todos os explantes. Por outro lado, quando cultivados na presença de BAP ou 2,4-D, os explantes apresentaram a formação de calos compactos, com formação de brotos em diferentes taxas. Na presença de ANA, segmentos nodais e internodais não apresentaram resposta, enquanto que segmentos foliares apresentaram a formação de raízes adventícias em todas as concentrações testadas. Neste trabalho foi realizada uma avaliação comparativa da produção de metabólitos especiais e da atividade biológica em extratos de calos oriundos de folíolos inoculados em BAP 8,8 ~~em plantas~~ <sup>in vitro</sup> plantas *ex vitro*. Nas análises por meio do HPTLC e do HPLC foi possível demonstrar a diferença na produção de algumas substâncias e indicar a presença de flavonóides e polifenóis nos materiais analisados. Além disso, a partir das atividades biológicas foi possível identificar tanto a atividade antioxidante quanto a não mutagênica dos extratos. Dessa forma, estudos visando à detecção de metabólitos especiais em *A. villosulicarpa* podem expandir o conhecimento sobre as possibilidades de utilização de espécies do gênero *Arachis*.

Palavras-chave: Cultura de tecidos. HPTLC. HPLC. Atividade antioxidante. Efeito genotóxico.

## ABSTRACT

The cultivated peanut (*Arachis hypogaea*) has several substances with antioxidant capacity that have beneficial effects for human health. However, the production of these substances hasn't been observed in other species. The aim was the establishment of *in vitro* culture systems for *Arachis villosulicarpa*, aimed at developing alternatives to produce special metabolites. Nodal, internode and leaf segments were excised from *in vitro* plants and inoculated on MS medium supplemented with BA, NAA, 2,4-D or PIC. The explants showed different responses according to the plant growth regulator used. In the presence of PIC, we observed the formation of friable callus slightly oxidized in all explants. Moreover, when cultured in the presence of 2,4-D or BA, the explants showed the compact callus, forming buds at different rates. In the presence of ANA, node and internode segments showed no response, whereas leaf segments showed the formation of adventitious roots at all concentrations tested. This work was a comparative assessment of the production of special metabolites and biological activity in extracts of callus from leaves inoculated on BAP 8.8  $\mu\text{M}$  and *in vitro* and *ex vitro* plants. In the analysis by HPTLC and HPLC was possible to demonstrate the difference in the production of certain substances and indicate the presence of flavonoids and polyphenols in the materials analyzed. Moreover, from the biological activities could be identified both antioxidant and not mutagenic activity of extracts. Thus, studies focusing on the detection of special metabolites in *A. villosulicarpa* can expand your knowledge about the possibilities of using *Arachis* species.

Keywords: Tissue culture. HPTLC. HPLC. Antioxidant activity. Genotoxic effect.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1 – Principais países produtores de amendoim na safra de 2010/2011 .....	19
Figura 1 – Morfogênese <i>in vitro</i> a partir de explantes <i>A. villosulicarpa</i> inoculados em meio MS suplementado com BAP .....	35
Figura 2 – Acúmulo de biomassa (g) de calos compactos de <i>A. villosulicarpa</i> derivados de diferentes explantes cultivados em meios suplementados com BAP, após 60 dias de cultura.....	37
Figura 3 – Calogênese a partir de explantes <i>A. villosulicarpa</i> inoculados em meio MS suplementado com PIC a 1,25 µM, após 60 dias de cultura .....	39
Figura 4 – Acúmulo de biomassa (g) de calos compactos de <i>A. villosulicarpa</i> derivados de diferentes explantes cultivados em meios suplementados com de PIC, após 60 dias de cultura.....	41
Figura 5 – Acúmulo de biomassa (g) de calos compactos de <i>A. villosulicarpa</i> derivados de diferentes explantes cultivados em meios suplementados com diferentes combinações de BAP e PIC, após 60 dias de cultura ....	44
Figura 6 – Morfogênese <i>in vitro</i> a partir de explantes de <i>A. villosulicarpa</i> inoculados em meio MS suplementado com 2,4-D .....	46
Figura 7 – Acúmulo de biomassa (g) de calos compactos de <i>A. villosulicarpa</i> derivados de diferentes explantes cultivados em meio MS suplementados 2,4D, após 60 dias de cultura.....	48
Figura 8 – Morfogênese <i>in vitro</i> a partir de explantes <i>A. villosulicarpa</i> inoculados em meio MS suplementado com ANA.....	49
Figura 9 – Análise por HPTLC dos padrões (1 mg/mL) e dos extratos (10 mg/mL) de plantas e calos de <i>A. villosulicarpa</i> revelado com NP-PEG.....	51
Figura 10 – Curva padrão de DPPH.....	55
Figura 11 – Avaliação da atividade antioxidante de extratos de <i>A. villosulicarpa</i> em diferentes concentrações.....	56
Figura 12 – Potencialidade genotóxica de <i>A. villosulicarpa</i> .....	57

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Morfogênese <i>in vitro</i> a partir de segmentos nodais, internodais e de folíolos de <i>A. villosulcarpa</i> após 30 dias de cultura em meio suplementado com BAP .....	36
Tabela 2 – Calogênese a partir de segmentos nodais, internodais e de folíolos de <i>A. villosulcarpa</i> após 30 dias de cultura em meio suplementado com PIC 40	
Tabela 3 – Calogênese <i>in vitro</i> a partir de segmentos nodais, internodais e de folíolos de <i>A. villosulcarpa</i> após 30 dias de cultura em meio suplementado com BAP combinado PIC.....	43
Tabela 4 – Morfogênese <i>in vitro</i> de <i>A. villosulcarpa</i> a partir de segmentos nodais, internodais e de folíolos após 30 dias de cultura em meio suplementado com 2,4-D .....	47
Tabela 5 – Valores de R <sub>f</sub> dos padrões e dos extratos de plantas <i>ex vitro</i> (1A a 4D), plantas <i>in vitro</i> (5A a 8B) e calos (10A a 12A) de <i>A. villosulcarpa</i> conforme as bandas obtidas por HPTLC.....	52
Tabela 6 – Áreas relativas (%) dos picos cromatográficos detectados por HPLC em extratos etanólicos de <i>A. villosulcarpa</i> .....	54

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2,4-D	Ácido 2,4 diclorofenoxiacético
AIA	Ácido indol 3-acético
ANA	Ácido $\alpha$ -naftalenoacético
ANOVA	Análise de Variância
BAP	6-benzilaminopurina
Dicamba	Ácido 3,6-dicloro-2-metoxibenzóico
DNA	Ácido Desoxirribonucleico (Deoxyribonucleic acid)
DPPH	1,1-difenil-2-picrilhidrazil
ERO	Espécie reativa de oxigênio
HPLC	High-performance liquid chromatography
HPTLC	High performance thin layer chromatography
LDL	Low-density lipoprotein
MS	Meio Murashige & Skoog
NP	Ácido difenilbóricoaminoéster
PEG	Polietileno glicol 400
PF	Peso de matéria fresca
PIC	Ácido 4-amino 3,5,6 tricloro-2-piridinacarboxílico; picloram
PPM	Partes por milhão
OS	Peso de matéria seca
RPM	Rotação por minuto
TDZ	Tiadizuron
USDA	United States Department of Agriculture
UV-C	Ultravioleta C

## SUMÁRIO

	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	15
1	<b>PRODUÇÃO AGRÍCOLA DO GÊNERO <i>ARACHIS</i></b> .....	16
2	<b>BIOTECNOLOGIA EM <i>ARACHIS</i></b> .....	20
2.1	<b>Produção de metabólitos especiais</b> .....	20
2.2	<b>Cultura de tecidos</b> .....	25
3	<b>OBJETIVOS</b> .....	28
3.1	<b>Objetivo geral</b> .....	28
3.2	<b>Objetivos específicos</b> .....	28
4	<b>METODOLOGIA</b> .....	29
4.1	<b>Material vegetal</b> .....	29
4.2	<b>Estabelecimento de culturas <i>in vitro</i></b> .....	29
4.3	<b>Elicitação das culturas</b> .....	30
4.4	<b>Preparo e análise de extratos</b> .....	30
4.4.1	<u>Cromatografia em Camada Delgada de Alta Definição (HPTLC)</u> .....	31
4.4.2	<u>Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)</u> .....	31
4.5	<b>Avaliação de atividades biológicas</b> .....	32
4.5.1	<u>Atividade antioxidante</u> .....	32
4.5.2	<u>Potencialidade genotóxica</u> .....	33
4.6	<b>Análise estatística</b> .....	33
5	<b>RESULTADOS</b> .....	34
5.1	<b>Morfogênese <i>in vitro</i></b> .....	34
5.1.1	<u>Meios suplementados com BAP</u> .....	34
5.1.2	<u>Meios suplementados com PIC</u> .....	38
5.1.3	<u>Meios suplementados com combinações de BAP e PIC</u> .....	42
5.1.4	<u>Meios suplementados com 2,4-D</u> .....	45
5.1.5	<u>Meios suplementados com ANA</u> .....	49
5.2	<b>Análise fitoquímica</b> .....	50
5.2.1	<u>Cromatografia em camada delgada de alta eficiência (HPTLC)</u> .....	50
5.2.2	<u>Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)</u> .....	53
5.3	<b>Avaliação de atividades biológicas</b> .....	55
5.3.1	<u>Atividade antioxidante</u> .....	55

5.3.2	<u>Potencialidade genotóxica</u> .....	57
6	<b>DISCUSSÃO</b> .....	58
7	<b>CONCLUSÕES</b> .....	64
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	65

## INTRODUÇÃO

Atualmente, o amendoim (*Arachis hypogaea*) ocupa a quarta posição entre as culturas de oleaginosas mais produzidas no Brasil e no mundo (JORGE, 1993; FAGUNDES, 2002; RIOS, 2010). Na década de 90, houve uma ampliação do seu consumo in natura, levando os produtores a direcionar o cultivo agrícola para a indústria confeitaria, a qual exige um produto de melhor qualidade (RIOS, 2010). Entretanto, a cultura de *A. hypogaea* é afetada por diversas doenças fúngicas da parte aérea, deste modo, verificou-se uma busca pela diminuição da contaminação do amendoim brasileiro e seus subprodutos nos últimos sete anos, devido, principalmente, à necessidade de manter a qualidade do processo de produção destes alimentos (LINDSAY, 1997; UNITED STATE FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2009). Ao contrário da espécie cultivada, as espécies silvestres do gênero apresentam uma enorme variabilidade genética e constituem uma fonte de resistência natural a fatores bióticos e abióticos, como patógenos, temperatura e estresse hídrico (GALGARO; VALLS; LOPES, 1997).

A presença de várias substâncias com capacidade antioxidante que apresentam efeitos benéficos para a saúde humana tem sido descrita em diversas pesquisas com *Arachis hypogaea* (WANG; PITTMAN, 2008). Contudo, a produção dessas substâncias ainda não foi observada em outras espécies do gênero. Diversos fatores tais como tipo do solo, umidade, intensidade e tipo de radiação luminosa, temperatura e até a poluição atmosférica, podem interferir na composição química dos vegetais. Além disso, ocorrem adaptações coevolutivas complexas, entre plantas, animais e microrganismos presentes em um ecossistema (RESSURRECCION, 2005). Essas substâncias são produzidas durante o metabolismo secundário por diferentes vias que originam produtos de baixo peso molecular, em quantidades variáveis, às vezes muito baixas.

A importância da evolução comercial dos metabólitos especiais gerou, nos últimos anos, um grande interesse em estudos relacionados à sua produção por meio de tecnologias de cultura *in vitro*. Desta forma, como quase todos os estudos sobre a produção de metabólitos especiais em sistemas *in vitro* no gênero *Arachis* já foi realizada com *A. hypogaea*, torna-se necessária a pesquisa com espécies negligenciadas como *Arachis villosulicarpa*.

## 1 PRODUÇÃO AGRÍCOLA DO GÊNERO *ARACHIS*

O gênero *Arachis* pertence à família Fabaceae possuindo atualmente 80 espécies descritas, comumente chamadas de amendoim. Sua distribuição ocorre no cerrado e em outros biomas de vegetação aberta, sendo limitada ao Norte pela Ilha de Marajó, ao Sul pelo Uruguai, a Leste pelo Nordeste brasileiro e a Oeste pelo sopé da Cordilheira dos Andes (GREGORY; KRAPOVICKAS; GREGORY, 1980). Entre as espécies conhecidas, 48 são endêmicas do Brasil, sendo o Centro-oeste considerado o sexto centro de maior diversidade do gênero.

O amendoim é originário da América do Sul, incluindo a região entre as latitudes 10° a 30° Sul, com provável centro de origem na região de Gran Chaco (Paraguai), abrangendo os vales dos rios Paraná e Paraguai. A propagação do amendoim foi iniciada pelos índios em diversas regiões da América Latina, América Central e México. No século XVIII, foi introduzido na Europa e, no século XIX, difundiu-se do Brasil para a África, e do Peru para as Filipinas, China, Japão e Índia (FAGUNDES, 2002).

O amendoim mais cultivado comercialmente (*A. hypogaea* L.) apresenta grande importância econômica mundial, principalmente na indústria alimentícia. Suas sementes contêm teores elevados de lipídios (50%) e proteínas (30%) (GODOY et al., 1999). Devido a essas características, o amendoim é utilizado para a fabricação de óleos e para amenizar a carência proteica em regiões semi-áridas. Aproximadamente oito milhões de toneladas são utilizadas como alimento humano 'in natura', como componentes de iguarias caseiras ou processadas pela indústria de confeitaria (CARLEY; FLETCHER, 1995). O amendoim pode ser consumido torrado ou em pasta, sendo também muito empregado como recheio ou componente de chocolates e bombons. No Brasil, vários produtos alimentícios têm como base o amendoim, tais como paçoca, pé-de-moleque e doces, entre outros. É também conhecido como um alimento funcional, devido a descoberta de que suas sementes são ricas em antioxidantes e outras substâncias benéficas à saúde (SCHÖPPNER; KINDL, 1984), incluindo o resveratrol (WANG; PITTMAN, 2008). O amendoim apresenta também, em proporções consideráveis, as vitaminas A, B1 e B2, além da vitamina E, encontrada em maior quantidade no óleo.

Até o início da década de 70, a cultura de amendoim destacava-se na economia brasileira, já que seu óleo ajudava a dispensar o uso da banha de porco na alimentação, sendo um dos pioneiros na melhoria da dieta alimentar (ROCHA; BARBOSA, 1990). Entretanto, a partir de 1974, houve um declínio na produção devido, principalmente, à diminuição da qualidade do produto no mercado internacional, decorrente dos consecutivos problemas de contaminação com aflatoxina(s), um grupo de micotoxinas produzidas por espécies do fungo *Aspergillus*, que causam necrose aguda, cirrose e carcinoma de fígado (LINDSAY, 1997; UNITED STATE FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2009). Assim, o preço do amendoim começou a cair, o que interferiu drasticamente na área plantada e na produção (ALMEIDA, 1996). No contexto mundial, o Brasil estava entre os sete primeiros maiores produtores de amendoim, cujo principal objetivo era a comercialização do óleo (EMBRAPA, 2001). Para o produtor, o amendoim seria mais rentável que a soja, por exigir menos investimentos em maquinaria e, além disso, com 50 hectares de área plantada já é possível obter lucro, enquanto que para plantação de soja são necessários, pelo menos, 250 hectares (RIOS, 2010). Contudo, a necessidade de maior manejo nas culturas de amendoim causou a queda na produção. Em média, são utilizadas oito aplicações de inseticida, fungicida e vários herbicidas por safra, o que torna a cultura de soja mais rentável para a comercialização de óleo (RIOS, 2010).

Com o decréscimo das exportações, o destino do amendoim no mercado nacional se modificou. A produção, anteriormente destinada à extração de óleo, ultimamente está voltada para o mercado de consumo 'in natura' (80%) e apenas 20% para extração de óleo (FREITAS; GODOY; VIEIRA, 1995; FREIRE; SANTOS; BELTRÃO, 1996; RIOS, 2010). Atualmente, o amendoim é a quarta oleaginosa mais plantada e consumida no mundo e uma importante opção agrícola para a rotação de cultura nas áreas de canaviais e na reforma de pastagens, principalmente no norte do Estado de São Paulo (JORGE, 1993; FAGUNDES, 2002; RIOS, 2010). Na safra 2010/2011, o Brasil passou a ocupar 16º lugar, com a produção de 24 mil toneladas (Quadro 1). No contexto mundial, as principais áreas plantadas situam-se na China e Índia, que são também grandes consumidores do produto na forma de óleo e alimento animal e humano. Outros países, principalmente os africanos e asiáticos, possuem grandes regiões produtoras, principalmente para a produção de óleo (UNITED STATE DEPARTMENT OF AGRICULTURE, 2010).

A cultura de *A. hypogaea* é afetada por diversas doenças fúngicas da parte aérea (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO, 2005). Ao contrário, as espécies silvestres do gênero apresentam uma enorme variabilidade genética e constituem uma fonte de resistência natural a fatores bióticos e abióticos, como patógenos, temperatura e estresse hídrico (GALGARO; VALLS; LOPES, 1997). A diversidade das espécies silvestres auxilia na construção de mapas genéticos oriundos de cruzamentos, visando à sua utilização em programas de melhoramento (STALKER, 1997). O banco de germoplasma de *Arachis* da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia contem mais de mil acessos de espécies silvestres, além de outros mil de variedades primitivas, das quais algumas foram identificadas como fontes de genes de resistência para fungos e nematódeos (LEAL-BERTIOLI et al., 2000; FÁVERO, 2004; GUIMARÃES et al., 2005).

Além de *A. hypogaea*, várias espécies do gênero *Arachis* são consideradas novas opções agrícolas, devido aos altos teores de proteína e à resistência a pragas e doenças (ANGELICI et al., 2008; FREITAS, 2004). *Arachis repens* Handro e *Arachis pintoii* Krapov. & W.C. Gregory são empregadas em paisagismo e como forrageiras. *Arachis pintoii* é especialmente adequada para área de pastejo intenso e contínuo, já que mantém uma área foliar apropriada nessas situações, sendo também usada para a contenção de processos erosivos (VALLS, 2000; PEREZ; NABINGER; MARASCHIN, 2001; VEIGA et al., 2003; SILVA, 2004). *Arachis glabrata* Benth é utilizada como substituto da alfalfa nos Estados Unidos (ANGELICI et al., 2008; FREITAS, 2004). *Arachis villosulicarpa* Hoehne e *Arachis stenosperma* Krapov. & W.C. Gregory ainda são cultivadas para a alimentação entre grupos indígenas no oeste do Mato Grosso e em Rondônia (FREITAS, 2004).

*Arachis villosulicarpa* não é conhecida no estado silvestre, sendo considerada *Arachis Pietrarellii* Krapov. & W.C. Gregory a espécie mais relacionada a ela (GALGARO et al., 1997). *Arachis villosulicarpa* é uma espécie perene, diplóide ( $2n = 20$ ), pertencente à seção *Extranervosae* e não tem nenhuma relação genética com *A. hypogaea*, talvez devido a um processo autônomo de domesticação no Brasil, onde se encontram os membros da seção *Extranervosae* com exclusividade (FREITAS, 2004). A distribuição geográfica desta espécie é, até o momento, limitada à parte centro-oeste do Mato Grosso e nas proximidades do rio Juruena no extremo leste de Rondônia. Deste modo, esta espécie pode ser considerada como uma cultura negligenciada, com grande potencial para alimentação animal e humana

devido a suas sementes apresentarem altos teores de óleo e o seu conteúdo de triptofano ser superior ao de qualquer variedade do amendoim comum (VALLS, 1996, CUSTODIO et al., 2005).

País	Safra 2010/2011 (toneladas)
China	2.184
Índia	1.585
Nigéria	200
Burma	173
Sudão	150
Senegal	87
Burkina	75
Estados Unidos	67
Vietnã	59
Argentina	52
Congo	41
Mali	40
Chade	32
Maláui	30
República Africana Central	27
<b>Brasil</b>	<b>24</b>
Indonésia	21
Benin	19
Moçambique	18
Cameron	18
Outros	114

Quadro 1 – Principais países produtores de amendoim na safra de 2010/2011  
 Fonte: Foreign Agricultural Service, Official United States Department of Agriculture (USDA) Estimates.

## 2 BIOTECNOLOGIA EM ARACHIS

### 2.1 Produção de metabólitos especiais

No passado, o amendoim era visto como um alimento prejudicial à saúde devido ao seu alto teor de gordura. No entanto, pesquisas recentes têm elevado sua popularidade, devido à identificação de diversos metabólitos especiais nas sementes e outras partes da planta, incluindo compostos fenólicos que apresentam alta capacidade antioxidante. Atualmente, o amendoim é considerado como um importante alimento funcional, com base em estudos relacionados à prevenção de doenças e à produção de substâncias bioativas (CAMARGO et al., 2007, FRANCISCO; RESURRECCIÓN, 2008, VICENTINI Et Al., 2010). As plantas produzem uma enorme variedade de moléculas, tais como compostos fenólicos, compostos nitrogenados, vitaminas, terpenos e outros metabólitos endógenos, cujos efeitos na saúde humana têm sido estudados.

Os flavonóides são metabólitos especiais da classe dos polifenóis, amplamente distribuídos em partes aéreas, como folhas e flores, mas também podem ser encontrados em sementes, como no amendoim. A combinação de polifenóis produzidos pelos vegetais fornece uma rica fonte de benefícios para a saúde, devido ao seu potencial antioxidante. Um número crescente de estudos sugere que uma elevada ingestão de flavonóides pode ser correlacionada com o decréscimo do risco de câncer (PIGNATELLI et al., 2000; KNEKT et al., 2002). Os flavonóis, flavonas e catequinas reduzem o risco da mortalidade por doença coronariana arterial em 65%, assim como o de aterosclerose causada pelo acúmulo de LDL, por meio da supressão do processo oxidativo (Yen & Hsieh, 2002; Arts & Hollman, 2005). Isoflavonas são encontradas em diversos legumes, incluindo o amendoim (FRANCISCO; RESURRECCIÓN, 2008). O amendoim apresenta 211 ppm de isoflavonas totais, estando entre a soja e o grão de bico como as espécies com maiores teores. Os flavonóis também são encontrados no amendoim, assim como em frutas, chá verde e vinho tinto (FRANCISCO; RESURRECCIÓN, 2008). As sementes de amendoim apresentam cerca de 160 ppm de flavonóis totais por

grama, o que é ligeiramente superior à manteiga de amendoim e inferior ao vinho tinto (RESURRECCIÓN et al., 2009).

Os ácidos fenólicos são derivados dos ácidos benzóico e cinâmico (NATELLA et al., 1999; LIU, 2004), os quais podem alterar as propriedades dos alimentos como cor, valor nutricional e atividade antioxidante, sendo relacionados à redução do risco de doenças cardiovasculares. Por exemplo, o ácido protocatecuico inibe a oxidação do LDL (YEN; HSIEH, 2002), enquanto que o ácido ferúlico tem efeito hipotensivo, além de apresentar potencial terapêutico na doença de Alzheimer e diminuir os níveis de glicose, colesterol total e LDL no sangue (BALASUBAHINI; RUKKUMANI; MENON, 2003; ONO; HIROHATA; YAMADA, 2005). Na classe dos ácidos fenólicos mais comuns, encontram-se os ácidos hidroxidocinâmico e hidroxibenzóico (ácido salicílico), cujas principais fontes são uva, mirtilo, morango, framboesa, amora, maçã, café e amendoim (FRANCISCO; RESURRECCIÓN, 2009; VACCARI; SOCCOL; IDE, 2009). O amendoim apresenta cerca de 40-60% mais ácido hidroxibenzóico do que framboesas e morangos, que são, respectivamente, o segundo e o quarto maiores fornecedores deste polifenol (FRANCISCO; RESURRECCIÓN, 2009). O amendoim torrado contém cerca de 300 ppm de ácido hidroxidocinâmico, enquanto que a maçã, a ameixa e o café contêm de 2 a 6 vezes mais que esta quantidade. (RESURRECCIÓN et al., 2009).

Outro grupo importante de metabólitos são os esteróis vegetais e os estanois, que funcionam bloqueando a absorção do colesterol da dieta (OHR, 2003). O  $\beta$ -sitosterol é o principal e mais abundante fitoesterol presente nas dietas ocidentais (AWAD; HARTATI; FINK, 1998; KRIS-ETHERTON et al., 2002), já tendo sido comprovada sua ação inibitória sobre o câncer de cólon, próstata e mama (VON HOLTZ; FINK C. S.; AWAD, 1998; AWAD; HARTATI; FINK, 1998; AWAD et al, 2000, 2007), além da redução de níveis de colesterol, prevenindo a aterosclerose (KRIS-ETHERTON et al., 2002; AWAD; TOCZEK; FINK, 2004). Os óleos vegetais são a principal fonte de  $\beta$ -sitosterol, principalmente óleos não refinados, que apresentam quantidades superiores aos refinados (AWAD et al., 2000). O óleo de amendoim refinado possui cerca de 33% a mais de  $\beta$ -sitosterol do que o azeite de oliva extra-virgem e 15% a menos do que óleo de soja (RESURRECCIÓN et al., 2009).

Os estilbenos são uma classe de fitoalexinas de baixo peso molecular que fazem parte do grupo dos polifenóis, sendo produzidos pelas plantas em resposta à injúria, infecção ou estresse (SOLEAS; DIAMANDIS; GOLDBERG, 1997; BOUE et

al., 2009). Entre os estilbenos, o resveratrol ocupa uma posição de destaque, sendo encontrado em 72 espécies vegetais, incluindo uva, eucalipto, amendoim e amora (SAIKO et al., 2008). O resveratrol apresenta diversas propriedades biológicas e farmacológicas na prevenção e tratamento de diversas doenças, embora seja principalmente conhecido por suas propriedades antioxidantes. Já foram relatados diversos efeitos benéficos à saúde humana, associados à redução do risco de doenças cardiovasculares (BRADAMANTE et al., 2004), câncer (BERNHAUS et al., 2009) e osteoporose (RATNA; SIMONELLI, 2002), além de atividades antiinflamatória (SUBBARAMAIAH et al., 1998), neuroprotetora (GAO; CHEN; HU, 2006) e na prevenção e alívio de algumas complicações do diabetes (ATES et al., 2007). Adicionalmente, o resveratrol tem sido utilizado na conservação de frutos durante o armazenamento (ZAICOVSKI et al., 2006).

A presença de resveratrol em *A. hypogaea* tem sido descrita nas sementes e em produtos industrializados (BALLARD et al., 2009) e, dessa forma, o amendoim é considerado uma das fontes mais importantes, depois do vinho tinto, suco de uva vermelha e chocolate escuro (SOBOLEV; COLE, 1999). Tratamentos com ultra-som ou raios ultravioleta (UV) aumentaram significativamente sua produção nas sementes, elevando-a a níveis semelhantes aos do vinho tinto (SALES; RESURRECCION, 2009). Diversas estruturas da planta já foram estudadas, com a identificação de resveratrol em hipocótilos (INGHAM, 1976), sementes (SOBOLEV et al., 1995), sementes em germinação (SOBOLEV; DEYRUP; GLOER, 2006) e raízes (CHEN; WU; CHIOU, 2002). A influência de diversos fatores bióticos e abióticos na produção de resveratrol e de outros compostos fenólicos no amendoim já foi estudada, incluindo o estágio de desenvolvimento, genótipo, injúrias mecânicas e exposição a patógenos, luz UV e ultrasom (RUDOLF; RESSURRECCION, 2005). Além disso, foi também avaliada a influência de moléculas sinalizadoras como ácido jasmônico, ácido salicílico e etileno (CHUNG et al., 2003).

A importância da evolução comercial dos metabólitos especiais gerou, nos últimos anos, um grande interesse em estudos relacionados à sua produção por meio de tecnologias de cultura *in vitro* (RAMACHANDRA RAO; RAVISHANKAR, 2000; WINK et al., 2005; MEDINA-BOLIVAR et al., 2007). Os sistemas de cultura de células vegetais representam uma fonte renovável, contínua e confiável de medicamentos e substâncias que podem ser utilizadas para fins industriais, especialmente aquelas que não podem ser produzidas por células microbianas ou

sintetizadas quimicamente (MULABAGAL; TSAY, 2004). Além disso, podem ser manipulados seletivamente para produzir ou aumentar o nível de produção de diversas classes de moléculas bioativas, por meio de diferentes elicitadores físicos, químicos ou biológicos (KU et al., 2005; MEDINA-BOLIVAR et al., 2007; WU; SHI, 2008; RUIZ-MAY; GALAZ-ÁVALOS; LOYOLA-VARGAS, 2009; ZHANG et al., 2009).

Elicitores são compostos ou tratamentos que induzem as plantas a produzirem fitoalexinas em níveis elevados ou ativam a síntese de novas moléculas (SOUZA, 2005). No ambiente *ex vitro*, as plantas encontram-se continuamente expostas à ação de fatores bióticos, como fungos, bactérias, vírus ou nematóides, além de fatores abióticos, como luz ultravioleta e metais pesados, existindo, portanto, espécies que são suscetíveis e outras que são resistentes a estes fatores (BHAGWATH & HJORTSO, 2000). Os vegetais resistentes apresentam mecanismos próprios de defesa em resposta a situações de estresse, os quais incluem a ativação de vias bioquímicas que geram uma ampla gama de metabólitos primários e especiais (OKADA et al., 2007).

Provavelmente, cada espécie vegetal produz ao menos uma classe de metabólitos quando submetida à elicitação, os quais não são observados na ausência deste estímulo ou são observados em baixa quantidade. No entanto, vários compostos de interesse bioquímico são continuamente produzidos pelos vegetais e, conseqüentemente, não são sensíveis à elicitação (DESENDER et al., 2007).

Nos últimos anos, a produção de metabólitos especiais apresentam grande valor econômico, deste modo diversos trabalhos tem sido realizados visando o isolamento e a análise da estrutura química de substâncias produzidas por diversas espécies vegetais. Uma das estratégias para aumentar a produtividade destes metabólitos especiais é o tratamento da cultura de tecidos com diferentes elicitores (VERPOORTE & MARASCHIN, 2001).

Pesquisas sobre a produção *in vitro* de substâncias de interesse econômico em amendoim vêm sendo realizadas desde a década de 80, sendo dada atenção especial aos estilbenos resveratrol e piceatanol. Em 1983, Fritzemeier et al. induziram a produção de resveratrol em calos de amendoim por meio da irradiação com UV-C, enquanto que Schöppner e Kindl (1984) isolaram a mesma substância a partir de culturas de células em suspensão. Trabalhos realizados por Ku et al. (2005) demonstraram que, após a elicitação com UV, houve um aumento significativo na produção de piceatanol em culturas de calos.

Em muitas espécies vegetais, têm sido demonstrado que a cultura de raízes transformadas pode ser um sistema alternativo e eficiente para a produção de metabólitos especiais devido à sua estabilidade genética e bioquímica, à taxa de crescimento rápido e à capacidade de sintetizar compostos naturais em níveis comparáveis às plantas cultivadas *in vivo* (GIRI; NARASU, 2000; GUILLON et al., 2006). Em um estudo realizado para avaliar a capacidade de transformação e produção de metabólitos especiais em raízes obtidas pela transformação com *Agrobacterium rhizogenes*, foi demonstrado que a inoculação das sementes de amendoim com as cepas R1000 e R1601 induziu a formação de um grande volume de raízes, com crescimento rápido e produção de quantidades significativas de resveratrol (KIM; LEE; PARK, 2008). Este sistema pode funcionar como um método confiável para a produção de metabólitos especiais e para o estudo molecular dos genes que codificam e regulam a biossíntese de enzimas importantes. Análises quantitativas realizadas em raízes transformadas de amendoim evidenciaram claramente a capacidade de produção de diferentes tipos de metabólitos, com um aumento de 60 vezes após elicitação com acetato de sódio (MEDINA-BOLIVAR et al., 2007).

A cultura de tecidos vegetais pode ser vista como um sistema sustentável, pois preserva diversos recursos oriundos de produtos naturais, como vários tipos de células especializadas e importantes na manutenção e síntese de moléculas complexas, minimizando os problemas decorrentes do extrativismo (GUERRA; NODARI, 2006; PEREIRA, 2010). De acordo com as condições de cultura, é possível desenvolver uma quantidade substancial de biomassa, possibilitando maiores níveis de produção de moléculas bioativas em comparação às plantas crescidas no campo (JEONG; PARK, 2006; GEORGIEV; PAVLOV; BLEY, 2007; SRIVASTAVA; SRIVASTAVA, 2007; MISHRA; RANJAN, 2008, CONDORI et al., 2010) Portanto, é importante estabelecer diferentes sistemas de cultura visando à avaliação das condições adequadas para a biossíntese de metabólitos especiais *in vitro*.

## 2.2 Cultura de tecidos

Diversos sistemas de regeneração *in vitro* para espécies de amendoim foram desenvolvidos com sucesso nas três últimas décadas, por meio de organogênese e embriogênese somática, principalmente utilizando sementes como fonte de explantes (MANSUR et al., 1993; PITTMAN et al., 1983 ; PITTMAN ; JOHNSON; BANKS, 1984, RANI ; REDDY, 1996; GAGLIARDI et al, 2000 ; PACHECO et al., 2007a, 2007b, 2008, 2009)

A regeneração *in vitro* de espécies silvestres de *Arachis* foi descrita a partir de diferentes tipos de explante, como sementes e tecidos diferenciados. A determinação da via morfogênica em *Arachis* parece estar mais relacionada ao tipo e à concentração do regulador de crescimento utilizado que à escolha do explante inicial, uma vez que diversos órgãos, como cotilédones, folíolos embrionários e folhas maduras são utilizados tanto em sistemas organogênicos como em sistemas embriogênicos (PACHECO et al., 2009).

As sementes são capazes de representar adequadamente a variabilidade genética e, portanto, a utilização deste material como fonte inicial de explante é uma estratégia apropriada para programas de conservação *in vitro*. Durante as últimas décadas, diversos trabalhos foram realizados nesse sentido (PITTMAN et al., 1983; PITTMAN; JOHNSON; BANKS, 1984; MANSUR et al., 1993; RANI; REDDY, 1996; MAYOR et al., 2004; PACHECO et al., 2008, 2009; REY; MROGINSKI, 2009; TIWARI; TULI, 2009). Sementes de vários acessos das seções *Extranervosae*, *Heteranthae*, *Caulorrhizae*, *Erectoides*, *Procumbentes* e *Arachis* que perderam a capacidade germinativa foram usadas com sucesso para a obtenção de plantas a partir de eixos embrionários, folíolos imaturos e cotilédones (GAGLIARDI et al., 2000; PACHECO et al., 2007a).

A resposta regenerativa dos eixos embrionários é variável entre as diferentes espécies e, até mesmo, diferentes acessos da mesma espécie, provavelmente devido a fatores genéticos ou alterações fisiológicas ocorridas durante o armazenamento de sementes. Em estudos anteriores realizados no Núcleo de Biotecnologia eixos embrionários de quase todas as espécies estudadas produziram um único ou múltiplos brotos por meio do desenvolvimento meristemático em resposta a BAP a 8,8µM, com exceção de algumas espécies das seções

*Erectoides* (*Arachis archeri* Krapov. & W.C. Gregory e *Arachis porphyrocalix* Valls & C.E. Simpson) e *Procumbentes* (*Arachis appressipila* Krapov. & W.C. Gregory), que mostraram a formação de calos friáveis na região do hipocótilo, com a produção dos embriões somáticos após dois meses de cultura (GAGLIARDI et al., 2000; PACHECO et al., 2007a, 2007b, 2008).

Folíolos imaturos de espécies silvestres de *Arachis* geralmente originam plantas por meio de organogênese indireta, com a formação do calo a partir da face abaxial ou das superfícies lesionadas. O regulador de crescimento mais utilizado para induzir a organogênese a partir desses explantes é o BAP, utilizado isoladamente ou combinado com ANA (PITTMAN et al., 1983; PITTMAN; JOHNSON; BANKS, 1984; MANSUR et al., 1993; GAGLIARDI et al., 2000; VIDOZ et al., 2006; PACHECO et al., 2007a). Em resposta à mesma concentração de BAP que induziu organogênese indireta em espécies de outras seções, explantes de *A. archeri*, *A. porphyrocalix* (Seção *Erectoides*) e *A. appressipila* (Seção *Procumbentes*) produziram calos embriogênicos friáveis. Este padrão de morfogênese foi observado também entre explantes de sementes de outras espécies da seção *Erectoides* (SELLARS; SOUTHWARD, PHILLIPS, 1990), sugerindo uma forte influência do genótipo e/ou a presença de genes conservados relacionadas com regeneração *in vitro*. Assim, a indução de embriogênese somática em resposta a BAP pode ser restrita à seção *Erectoides* e algumas espécies próximas relacionadas, como as da seção *Procumbentes* (PACHECO et al., 2007b).

A regeneração a partir de cotilédones pode ocorrer via organogênese direta ou indireta em meio suplementado com BAP isolado ou associado com baixas concentrações de auxinas (MANSUR et al., 1993; RANI; REDDY, 1996; GAGLIARDI et al., 2000; PACHECO et al., 2007a). Explantes cotiledonares e eixos embrionários de acessos da Seção *Extranervosae*, quando cultivados na presença de BAP isolado ou em combinação com ANA, apresentaram frequências de regeneração de até 100% (MANSUR et al., 1993; GAGLIARDI et al., 2000).

A utilização de explantes maduros é a opção indicada para viabilizar a multiplicação *in vitro* de espécies com problemas na produção de sementes (DUNBAR; PITTMAN, 1992). Geralmente, a regeneração a partir de folíolos maduros é induzida por ANA e BAP, utilizados isoladamente ou em combinação, sendo a regeneração obtida via organogênese indireta (BURTNIK; MROGINSKI, 1985; JOHNSON; PITTMAN, 1986; MCKENTLY; MOORE; GARDNER, 1991; DUNBAR;

PITTMAN, 1992; MANSUR et al., 1993; REY et al., 2000; PACHECO et al., 2008). O TDZ também já foi utilizado com o mesmo objetivo (AKASAKA; DAIMON; MII, 2000; MROGINSKI et al., 2004).

Explantos de folhas de plantas *in vitro* de *Arachis stenosperma* Krapov. & W.C. Gregory apresentaram rizogênese direta em resposta a diferentes concentrações de ANA, com formação de ramos posteriores das raízes adventícias (PACHECO et al., 2008). Folíolos de plantas de casa de vegetação de *Arachis pintoi* Krapov. & W.C. Gregory e *Arachis glabrata* Benth foram utilizados para estabelecer sistemas de regeneração *in vitro* via embriogênese indireta usando combinações de picloram e BAP, embora a conversão de embriões somáticos tenha apresentado baixa frequência em relação ao observado no amendoim cultivado (REY et al., 2000, REY; MROGINSKI, 2006; VIDOZ et al., 2004). Plantas *in vitro* obtidas a partir de todos os tipos de explantes podem ser usadas como matrizes para o estabelecimento de protocolos de multiplicação *in vitro* (GAGLIARDI et al., 2002a, 2002b).

A quase totalidade de estudos sobre a produção de metabólitos especiais em sistemas *in vitro* no gênero *Arachis* foi realizada com *A. hypogaea*. Neste trabalho, dois sistemas foram analisados em *A. villosulicarpa*, visando a uma avaliação inicial do potencial de plantas e calos, na busca de novas alternativas para a produção de substâncias bioativas.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Este trabalho tem como objetivo geral o estabelecimento de metodologias *in vitro* para a micropropagação e cultura de calos de *Arachis villosulicarpa* Hoehne, visando à avaliação comparativa da produção de metabólitos especiais em extratos etanólicos do material produzido *in vitro*, em comparação com plantas *ex vitro*.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Estabelecer sistemas de micropropagação e cultura de calos a partir de explantes de plantas *in vitro* de *A. villosulicarpa*;
- Elicitar extratos etanólicos de plantas *ex vitro*, *in vitro* e de culturas de calos por meio de luz UV-C.
- Analisar extratos etanólicos de plantas *ex vitro*, *in vitro* e de culturas de calos por meio de cromatografia em camada delgada de alta eficiência (HPTLC) e cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC);
- Avaliar atividades antioxidante e genotóxica de plantas *ex vitro*, *in vitro* e de culturas de calos.

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 Material vegetal

Plantas *in vitro* de *A. villosulicarpa* foram obtidas a partir de eixos embrionários e cotilédones excisados de sementes fornecidas pelo banco de sementes da EMBRAPA - Recursos Genéticos e Biotecnologia (PACHECO et al., 2008). As plantas foram mantidas a  $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , sob fotoperíodo de 16h, com intensidade luminosa média de  $46 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  fornecida por lâmpadas fluorescentes do tipo branca fria na câmara de crescimento do Núcleo de Biotecnologia Vegetal da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (NBV/UERJ).

Para a obtenção de plantas *ex vitro*, plantas *in vitro* apresentando  $12 \pm 0,5$  cm de comprimento foram transferidas para tubos de vidro (22 x 150 mm) contendo 15 mL de água e vedados com filme plástico, sendo mantidas sob as mesmas condições descritas anteriormente. O filme plástico foi gradativamente perfurado, sendo realizado 2 furos de cerca de 3 mm por dia durante uma semana, a fim de reduzir gradualmente a umidade relativa do ar. Transcorrido este período, os vidros foram destampados e as plantas foram transferidas para vasos de plástico contendo plantmax/areia (1:1) e mantidas em condição de campo.

### 4.2 Estabelecimento de culturas *in vitro*

Segmentos nodais (0,5 cm), internodais (1,0 cm) e de folíolos (0,5 cm) de *A. villosulicarpa* foram inoculados (4 explantes por frasco) em meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) contendo sacarose a 3%, solidificado com ágar a 0,7% e suplementado com diferentes concentrações de BAP (4,4; 8,8; 22, 30,8 e 44  $\mu\text{M}$ ), ANA (1,25; 2,5; 5; 10; 20 $\mu\text{M}$ ), PIC (1,25; 2,5; 5; 10; 20 $\mu\text{M}$ ) ou 2,4-D (1,25; 2,5; 5; 10; 20 $\mu\text{M}$ ), além combinações de BAP (4,4  $\mu\text{M}$ ) e PIC (0,27; 0,54; 27  $\mu\text{M}$ ). O pH dos meios foi ajustado para 5,8 antes da esterilização em autoclave (15 minutos a  $121^{\circ}\text{C}$  e 1,0 atm). As culturas foram mantidas nas condições descritas anteriormente. A

resposta das culturas foi avaliada após 30 dias e os calos obtidos foram subcultivados para a análise da produção de biomassa por meio do peso fresco e do peso seco. Para a obtenção do peso seco os calos foram mantidos em estufa a 60°C por 24h.

### 4.3 Elicitação das culturas

Culturas de calos organogênicos compactos oriundos de folíolos inoculados em BAP 8,8  $\mu$ M, plantas *in vitro* e plantas *ex vitro* de *A. villosulicarpa* foram submetidas a tratamentos com luz UV-C (CHEN; WU; CHIOU, 2002), visando à indução da produção de compostos fenólicos. As amostras foram submetidas à radiação UV-C por 20 minutos e mantidas por diferentes períodos no escuro (0, 12 e 24h) após a elicitação.

### 4.4 Preparo e análise de extratos

A extração foi realizada segundo o método descrito por Chen, Wu e Chiou (2002) sendo modificado apenas o solvente utilizado. As amostras de calos oriundos de folíolos inoculados em BAP 8,8  $\mu$ M, plantas *in vitro* e plantas *ex vitro*, com aproximadamente 30 dias de idade, foram maceradas e suspensas em etanol 80% v/v (10 mL/g de peso fresco), seguindo-se a homogeneização em alta velocidade por 2 min. O extrato foi centrifugado a 13.000 rpm durante 10 min para remover as partículas em suspensão, sendo o sobrenadante filtrado e evaporado em rotaevaporador (Evaporador Rotativo Marconi – M120). Em seguida, foram armazenados em frascos âmbar, secos em sílica gel, estocados em freezer (-20°C) e, posteriormente, ressuspensos na concentração de 10mg/mL, em acetonitrila 50% ou etanol 80%. A composição dos extratos foi analisada por meio de Cromatografia de Camada Delgada de Alta eficiência (HPTLC) e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC).

#### 4.4.1 Cromatografia em Camada Delgada de Alta Definição (HPTLC)

Os extratos de *A. villosulicarpa* ressuspensos em acetonitrila (10 mg/ml) e os padrões (1 mg/mL) de resveratrol, rutina, ácido pirogálico, quercetina e ácido clorogênico (Merck S.A., Brasil) foram aplicados em placas de cromatografia em camada delgada de alta eficiência (HPTLC) de Nano Sílica gel 60 MACHEREY-NAGEL, Alemanha (5 x 7 cm), com auxílio de amostradores, a uma distância de 1 cm da margem inferior. Foram realizadas duas aplicações no mesmo ponto para fins de determinação da concentração da amostra e a placa foi seca à temperatura ambiente. A cromatografia foi desenvolvida em cuba de vidro com tampa, à temperatura ambiente, sendo testados diferentes tipos de fase móvel: butanol/etanol/água/ácido acético (60:10:20:0,5 v/v); etanol/ácido acético/água (17:1:2 v/v); clorofórmio/acetato de etila/ácido fórmico (2,5:1:0,1 v/v); acetato de etila/diclorometano/ácido acético/água (10:2,5:2:1 v/v); diclorometano/acetato de etila (9:1 v/v) e clorofórmio/metanol e água (65:35:10 v/v). Para verificar a presença de flavonóides, ao final da corrida, a placa foi seca e revelada com o reagente NP:PEG (NP - ácido difenilbóricoaminoéster - "natural product"; PEG - polietileno glicol 400, Sigma Chemical Company, EUA.). A placa foi aquecida por 3 minutos a 105°C, imediatamente revelada com NP 0,5 g% em acetato de etila e aspergida com PEG 5 g% em diclorometano e seca a temperatura ambiente. A fluorescência foi observada em câmara de UV a 365 nm (Boitton– Pró-Análise, modelo BOIT-GAB01, Brasil). Posteriormente, todas as placas foram fotografadas (máquina fotográfica digital Sony DSC-H50, Sony, Brasil).

Esses experimentos foram realizados em colaboração com o Laboratório de Imunologia aplicada à Bioquímica e Proteínas de Produtos Naturais (LIA-BPPN) da UERJ, sob a supervisão da Prof.<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Marsen Garcia Pinto Coelho.

#### 4.4.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)

A análise por HPLC foi efetuada de acordo com o método descrito por Wang e Pittman (2008). Foi utilizado o aparelho Dionex Ultimate 3000 acoplado a uma

coluna C18 (Dionex Bonded Silica Products, 5  $\mu$ M, 4,6 x 250mm). A fase móvel consistiu de água destilada estéril (A) e acetonitrila (B). O volume para a injeção da amostra ressuspensa em acetonitrila foi de 20  $\mu$ l e os analitos foram monitorados com um detector de arranjo de diodos a 307nm. A vazão foi de 1,5 ml / min com o seguinte gradiente: B 10% por 2 min, 10-30% B por 8 min, 30% B por 1 min, seguido de lavagem da coluna B, 95% por 6 min B e 10% para 9 min antes da injeção seguinte.

## 4.5 Avaliação de atividades biológicas

### 4.5.1 Atividade antioxidante

A capacidade dos extratos de seqüestrar o radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) foi determinada utilizando o método descrito por Rufino *et al.* (2007). Para construir a curva padrão, foram preparadas soluções de DPPH em metanol, com concentrações entre 0 e 60  $\mu$ M, sendo as leituras de absorvância efetuadas em espectrofotômetro a 515 nm. Para a avaliação da atividade antioxidante, foram utilizadas diferentes concentrações de extratos (1, 5 e 10 mg/mL). As amostras (300  $\mu$ L) foram adicionadas à solução de DPPH (60  $\mu$ M), completando o volume total de 1 mL, em sala escura sob luz verde. A absorvância foi medida a 515 nm, 60 minutos após o início da reação. Os experimentos foram realizados em triplicata. A queda na leitura da densidade ótica das amostras foi correlacionada com o controle, estabelecendo-se a percentagem de captura do radical DPPH, conforme fórmula abaixo:

$$\% \text{ de redução} = \frac{(\text{Abs}_c - \text{Abs}_A) \times 100}{\text{Abs}_c}$$

Em que:

**Abs<sub>c</sub>** = absorvância do controle de DPPH (60  $\mu$ M)

**Abs<sub>A</sub>** = Absorvância da amostra com DPPH (60  $\mu$ M)

#### 4.5.2 Potencialidade genotóxica

Para avaliar a potencialidade genotóxica dos extratos, soluções contendo 50 ng de DNA plasmidial pUC9.1 foram tratadas com diferentes concentrações dos extratos vegetais (5 e 10 mg/mL). Após os tratamentos, as amostras foram submetidas a eletroforese em gel de agarose (0,8%). Nessa técnica, o possível efeito genotóxico do extrato é indicado pela alteração na posição da banda obtida (DANTAS et al., 1999, 2002; DE MATTOS et al., 2000; FERREIRA-MACHADO et al., 2004; GUEDES et al., 2006; SILVA et al., 2008).

Esses experimentos foram realizados em colaboração com o Laboratório de Rádio e Fotobiologia do Departamento de Biofísica e Biometria da UERJ, sob a supervisão do Prof. Dr. Adriano Caldeira de Araujo.

#### 4.6 **Análise estatística**

Os experimentos foram repetidos pelo menos duas vezes, utilizando-se grupos de dez amostras. A avaliação estatística dos dados experimentais foi realizada através da análise de variância (ANOVA) e do teste de comparação 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%.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Morfogênese *in vitro*

#### 5.1.1 Meios suplementados com BAP

Segmentos nodais, internodais e foliolares cultivados em meio suplementado com BAP apresentaram a formação de calos compactos, organogênicos, em resposta a todas as concentrações de BAP testadas. A maior frequência de calogênese (100%) foi observada a partir de segmentos nodais cultivados em meio suplementado com BAP a 4,4  $\mu\text{M}$  (Tabela 1).

A formação de brotos a partir dos calos obtidos dos três tipos de explantes estudados variou de acordo com a concentração de BAP utilizada. Segmentos nodais apresentaram a maior produção de brotos em resposta a BAP a 4,4  $\mu\text{M}$  (Figura 1 - A), enquanto que em segmentos internodais e foliolares, as maiores capacidades organogênicas foram observadas em meio suplementado com BAP a 4,4 ou 8,8  $\mu\text{M}$  (Tabela 1, Figura 1 - B, C, D).

A maior produção de biomassa em resposta a BAP foi observada a partir dos calos obtidos de segmentos foliolares. Além disso, não foram observadas diferenças significativas no acúmulo de biomassa desses calos entre as concentrações de BAP testadas (Figura 2). Calos originados de segmentos nodais apresentaram maior produção de biomassa em resposta a BAP a 8,8 e 44  $\mu\text{M}$ , enquanto que, em calos derivados de entrenós, a produção de biomassa foi maior em meio suplementado com BAP a 8,8 e 30,8  $\mu\text{M}$  (Figura 2).

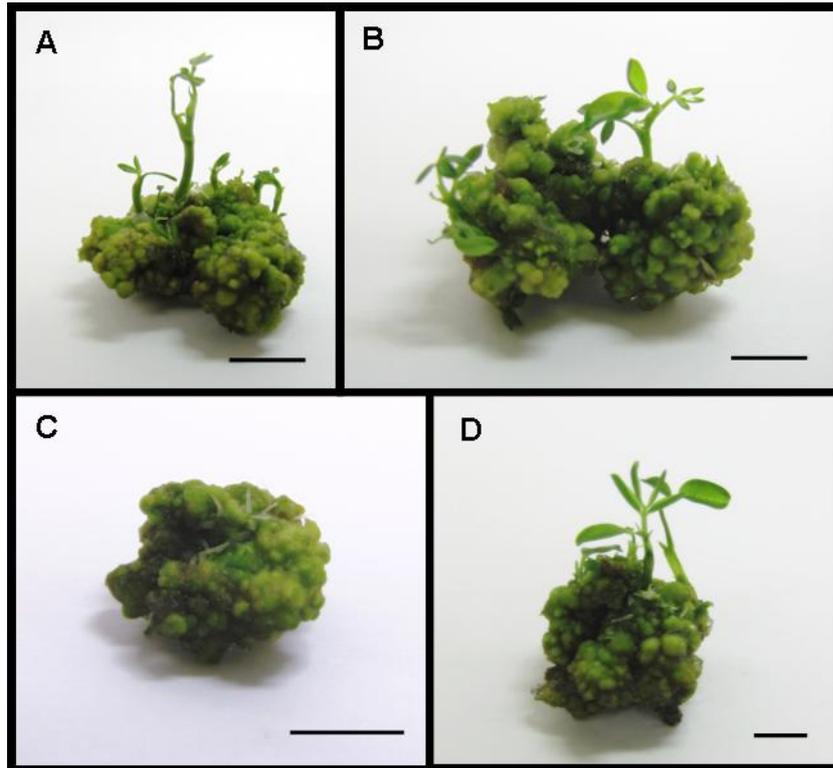


Figura 1 - Morfogênese *in vitro* a partir de explantes *A. villosulicarpa* inoculados em meio MS suplementado com BAP.

Legenda: (A) Calo obtido a partir de segmento nodal em meio MS suplementado com BAP a 4,4  $\mu\text{M}$  após 20 dias de cultura; (B) Calo obtido a partir de segmento de folíolo em meio MS suplementado com BAP a 4,4  $\mu\text{M}$ , após 20 dias de cultura; e obtidos a partir de segmentos internodais em meio suplementado com (C) BAP a 22  $\mu\text{M}$  e (D) BAP a 4,4  $\mu\text{M}$ .

Nota: Barra = 1 cm Foto: Simone Gama

Tabela 1 – Morfogênese *in vitro* a partir de segmentos nodais, internodais e de folíolos de *A. villosulicarpa* após 30 dias de cultura em meio suplementado com BAP

Explante	Concentração de BAP ( $\mu\text{M}$ )	Calogênese (%)	Brotos/explante
<b>Nó</b>	4,4	100	4,75 $\pm$ 0,8 <sup>a</sup>
	8,8	16,6	0,50 $\pm$ 0,5 <sup>b</sup>
	22	16,6	0,50 $\pm$ 0,4 <sup>b</sup>
	30,8	25	0,50 $\pm$ 0,5 <sup>b</sup>
	44	25	0,40 $\pm$ 0,4 <sup>b</sup>
<b>Entrenó</b>	4,4	90	2,55 $\pm$ 0,5 <sup>c</sup>
	8,8	80	1,60 $\pm$ 0,3 <sup>c</sup>
	22	50	0,62 $\pm$ 0,3 <sup>b</sup>
	30,8	50	0,50 $\pm$ 0,4 <sup>b</sup>
	44	50	0,60 $\pm$ 0,4 <sup>b</sup>
<b>Folíolo</b>	4,4	70	1,70 $\pm$ 0,5 <sup>c</sup>
	8,8	50	0,83 $\pm$ 0,3 <sup>b</sup>
	22	33,3	0,62 $\pm$ 0,3 <sup>b</sup>
	30,8	33,3	0,47 $\pm$ 0,4 <sup>b</sup>
	44	33,3	0,58 $\pm$ 0,3 <sup>b</sup>

Nota: Os dados representam média  $\pm$  erro padrão. A mesma na coluna significa não haver diferença significativa. Valores de  $p \leq 0,05$ , pelo teste de Tukey-Kramer

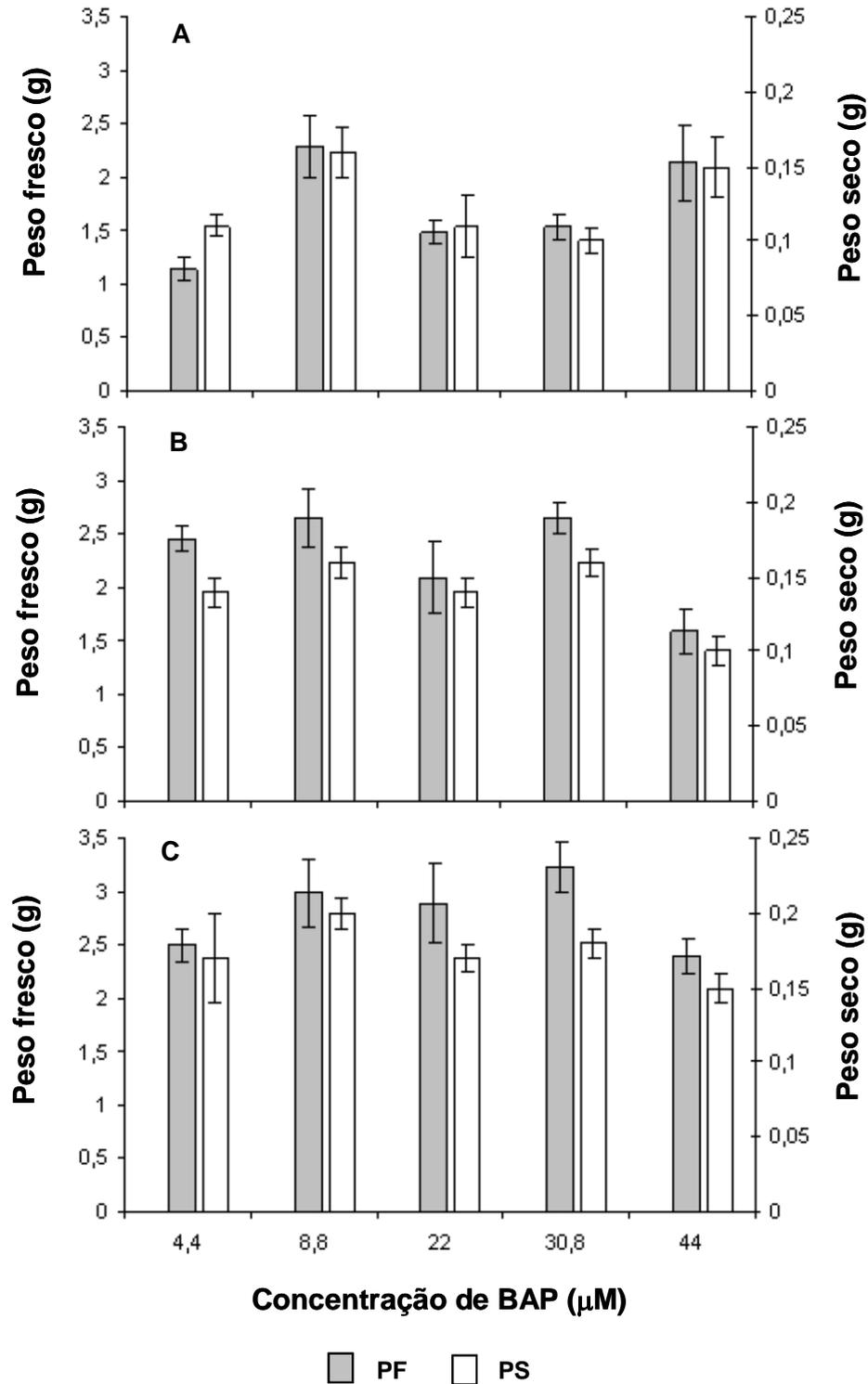


Figura 2 – Acúmulo de biomassa (g) de calos compactos de *A. villosulicarpa* derivados de diferentes explantes cultivados em meios suplementados com BAP, após 60 dias de cultura.

Legenda: (A) Segmentos nodais, (B) Entrenós e (C) Folíolos

Nota: PF = peso fresco; PS = peso seco.

### 5.1.2 Meios suplementados com PIC

As freqüências de calogênese em resposta a PIC foram relativamente baixas em todos os explantes e concentrações testados, variando entre 25 a 60 % (Tabela 2). Segmentos nodais cultivados em baixas concentrações de PIC (1,25; 2,5; 5,0  $\mu\text{M}$ ) apresentaram a formação de calos friáveis. No entanto, após 15 dias de cultura, esses calos tornaram-se oxidados e, após 60 dias de cultura, apresentaram aspecto mucilaginoso (Figura 3 - B). Os explantes inoculados em concentrações mais altas de PIC (10 e 20  $\mu\text{M}$ ) apresentaram intensa oxidação após 20 dias de cultura.

Segmentos internodais deram origem a calos friáveis, levemente oxidados, em resposta a todas as concentrações de PIC utilizadas (Figura 3 - A). Em alguns explantes, a calogênese ocorreu em apenas em uma das extremidades. Não foi observado um padrão morfogênico entre as regiões proximais e distais dos explantes.

Explantes foliolares cultivados na presença de PIC também formaram calos friáveis (Figura 3 - C), oxidados, em freqüências entre 33 e 60 % (Tabela 2). Além disso, após 60 dias de cultura, foi possível observar calos de aspecto mucilaginoso em resposta a altas concentrações de PIC (5, 10 e 20 $\mu\text{M}$ ).

O acúmulo de biomassa foi maior nos calos derivados de segmentos de folíolos quando comparados aos outros explantes testados (Figura 4), embora esses calos tenham apresentado intensa oxidação.

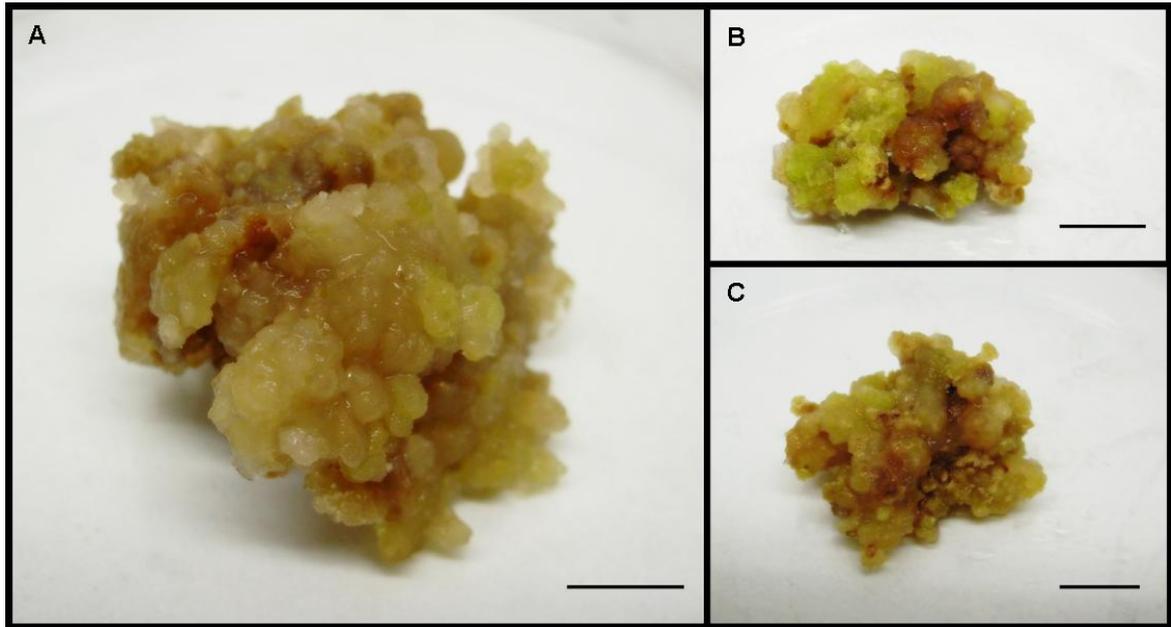


Figura 3 - Calogênese a partir de explantes *A. villosulicarpa* inoculados em meio MS suplementado com PIC a  $1,25 \mu\text{M}$ , após 60 dias de cultura.

Legenda: (A) Calo obtido a partir de segmento internodal; (B) Calo obtido a partir de segmento nodal; (C) Calo obtido a partir de segmento de folíolo.

Nota: Barra = 1 cm Foto: Simone Gama

Tabela 2 – Calogênese a partir de segmentos nodais, internodais e de folíolos de *A. villosulicarpa* após 30 dias de cultura em meio suplementado com PIC

<b>Explante</b>	<b>Concentração de PIC (<math>\mu\text{M}</math>)</b>	<b>Calogênese (%)</b>
<b>Nó</b>	1,25	60
	2,5	33
	5,0	33
	10	25
	20	25
<b>Entrenó</b>	1,25	33
	2,5	33
	5,0	25
	10	25
	20	25
<b>Folíolo</b>	1,25	60
	2,5	60
	5,0	33
	10	33
	20	33

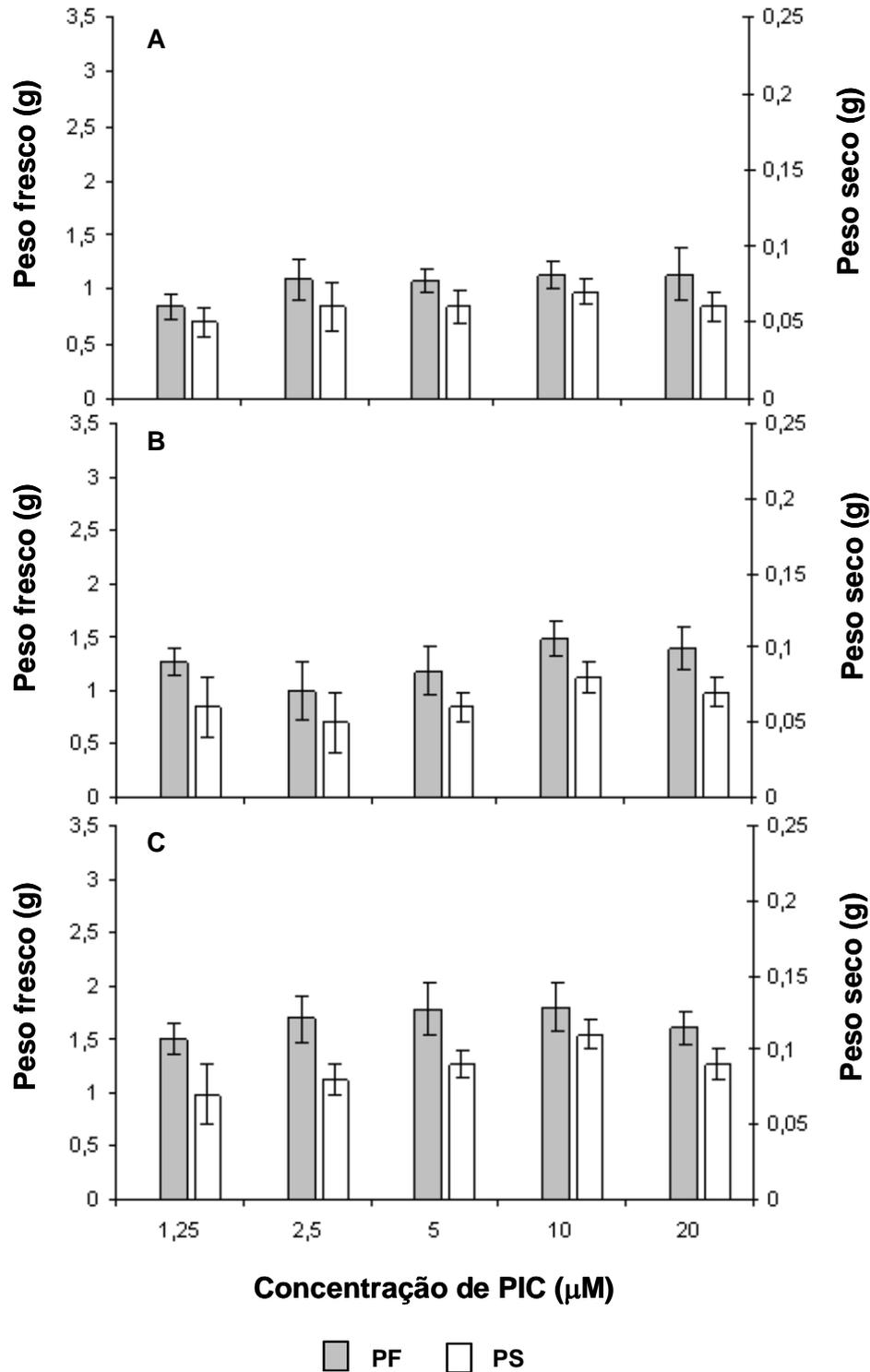


Figura 4 – Acúmulo de biomassa (g) de calos compactos de *A. villosulicarpa* derivados de diferentes explantes cultivados em meios suplementados com de PIC, após 60 dias de cultura.

Legenda: (A) Segementos nodais; (B) Entrenós e (C) Folíolos

Nota: PF = peso fresco; PS = peso seco

### 5.1.3 Meios suplementados com combinações de BAP e PIC

Explantos cultivados na presença de diferentes combinações de BAP e PIC apresentaram a formação de diferentes tipos de calos não-morfogênicos, incluindo calos friáveis, compactos ou mistos, em diferentes frequências.

Segmentos nodais deram origem a calos mistos, compactos no interior e friáveis na superfície, em resposta a BAP a 4,4 $\mu$ M combinado com PIC a 2,07 ou 4,14  $\mu$ M. Por outro lado, os mesmos explantes cultivados em combinações de BAP a 4,4  $\mu$ M e PIC a 0,41  $\mu$ M formaram calos compactos. A maior frequência de calogênese (90%) foi observada em resposta a BAP a 4,4  $\mu$ M combinado com PIC a 2,07 ou 4,14  $\mu$ M (Tabela 3).

A formação de calos a partir de entrenós ocorreu em toda a superfície dos explantes. Calos mistos foram obtidos em resposta a BAP a 4,4  $\mu$ M combinado com PIC a 0,41  $\mu$ M, enquanto que nas outras combinações testadas, foi observado o desenvolvimento de calos compactos.

Segmentos de folíolos apresentaram a formação de calos compactos em resposta às combinações de BAP a 4,4  $\mu$ M e concentrações mais baixas de PIC (0,41 e 2,07  $\mu$ M), e de calos friáveis em meio suplementado com BAP a 4,4 $\mu$ M combinado com PIC a 4,14  $\mu$ M. O acúmulo de biomassa dos calos obtidos a partir dos explantes foliolares foi maior que o observado com os demais explantes (Figura 5).

Tabela 3 – Calogênese *in vitro* a partir de segmentos nodais, internodais e de folíolos de *A. villosulicarpa* após 30 dias de cultura em meio suplementado com BAP combinado PIC

<b>Explante</b>	<b>Combinações de BAP e PIC (<math>\mu\text{M}</math>)</b>	<b>Calogênese (%)</b>
<b>Nó</b>	BAP 4,4 + PIC 0,41	75
	BAP 4,4 + PIC 2,07	90
	BAP 4,4 + PIC 4,14	90
<b>Entrenó</b>	BAP 4,4 + PIC 0,41	90
	BAP 4,4 + PIC 2,07	90
	BAP 4,4 + PIC 4,14	50
<b>Folíolo</b>	BAP 4,4 + PIC 0,41	80
	BAP 4,4 + PIC 2,07	80
	BAP 4,4 + PIC 4,14	33,3

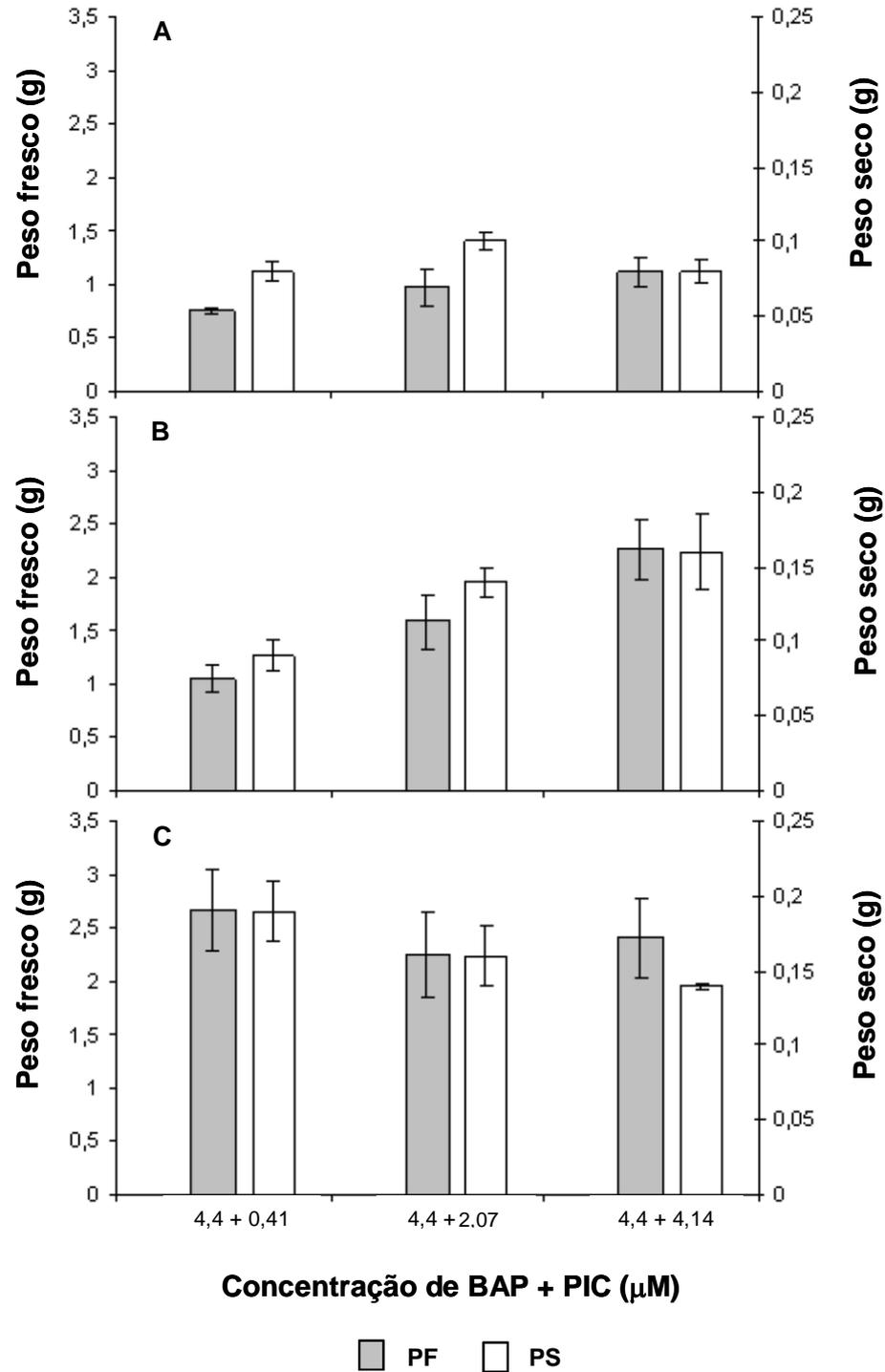


Figura 5 – Acúmulo de biomassa (g) de calos compactos de *A. villosulicarpa* derivados de diferentes explantes cultivados em meio MS suplementados diferentes combinações de BAP e PIC, após 60 dias de cultura.

Legenda: (A) Segmentos nodais; (B) Entrenós e (C) Folíolos

Nota: PF = peso fresco; PS = peso seco

#### 5.1.4 Meios suplementados com 2,4-D

A morfogênese *in vitro* a partir de segmentos nodais e internodais ocorreu apenas em resposta a 2,4-D a 5,0  $\mu\text{M}$  (Figura 6 - B, D). Foi observada a formação de calos compactos, com intensa oxidação, em frequência de 50 e 70%, respectivamente. A formação de brotos por organogênese indireta ocorreu a partir de ambos explantes ( $2,25 \pm 0,9$  e  $1,50 \pm 0,5$  brotos por explante) (Tabela 4). Além disso, foi observada a produção de raízes adventícias curtas e em número reduzido a partir dos calos derivados de segmentos internodais (Figura 6 - A).

A capacidade responsiva dos segmentos de folíolos na presença de 2,4-D mostrou-se, assim como nos demais explantes, extremamente baixa, com formação de calos organogênicos apenas em resposta a 1,25 e 2,5  $\mu\text{M}$  (Tabela 4). Entretanto, apresentou a maior frequência de calogênese (80%) e número de brotos por explante ( $4,28 \pm 0,7$ ) observados na concentração de 1,25  $\mu\text{M}$  (Tabela 4, Figura 6-C).

O maior acúmulo de biomassa dos calos obtidos em 2,4-D foi maior em explantes internodais, seguido pelos explantes foliolares (Figura 7), embora com ocorrência de oxidação.

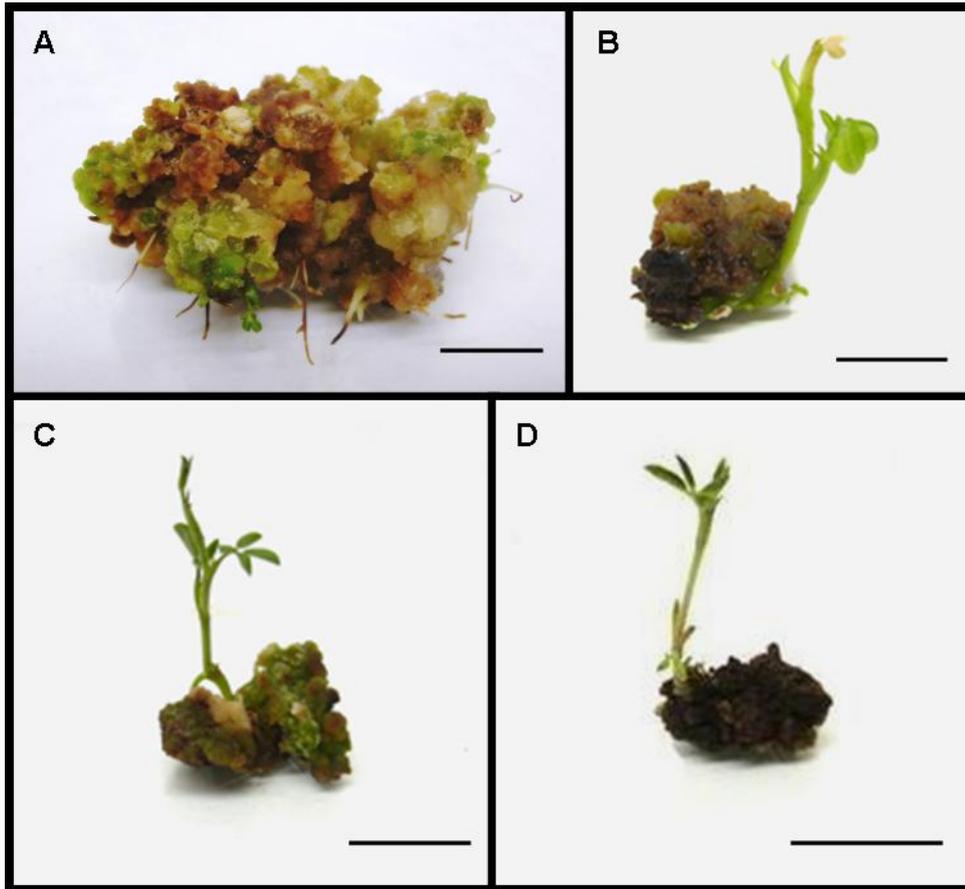


Figura 6 - Morfogênese *in vitro* a partir de explantes de *A. villosulicarpa* inoculados em meio MS suplementado com 2,4-D.

Legenda: (A) Calo obtido a partir de segmento internodal em meio suplementado com 2,4-D a  $1,25\mu\text{M}$  após 20 dias de cultura; (B) Calo organogênico obtido a partir de segmento internodal em meio suplementado com 2,4-D a  $5\mu\text{M}$ ; (C) Calo organogênico obtido a partir de folíolo em meio suplementado com 2,4-D a  $1,25\mu\text{M}$ ; (D) Calo organogênico obtido a partir de segmento nodal em meio suplementado 2,4-D a  $5\mu\text{M}$ .

Nota: Barra = 1 cm Foto: Simone Gama

Tabela 4 – Morfogênese *in vitro* de *A. villosulicarpa* a partir de segmentos nodais, internodais e de folíolos após 30 dias de cultura em meio suplementado com 2,4-D.

Explante	Combinações de BAP e PIC ( $\mu\text{M}$ )	Calogênese (%)	Brotos/explante
<b>Nó</b>	1,25	0	-
	2,5	0	-
	5,0	50	$2,25 \pm 0,9^b$
	10	0	-
	20	0	-
<b>Entrenó</b>	1,25	0	-
	2,5	0	-
	5,0	66,6	$1,50 \pm 0,5^b$
	10	0	-
	20	0	-
<b>Folíolo</b>	1,25	87,5	$4,28 \pm 0,7^a$
	2,5	20	$3,00 \pm 0,5^{ab}$
	5,0	0	-
	10	0	-
	20	0	-

Nota: Os dados representam média  $\pm$  desvio padrão. A mesma letra em cada coluna significa não haver diferença significativa, valores de  $p \leq 0,05$ , pelo teste de Tukey-Kramer.

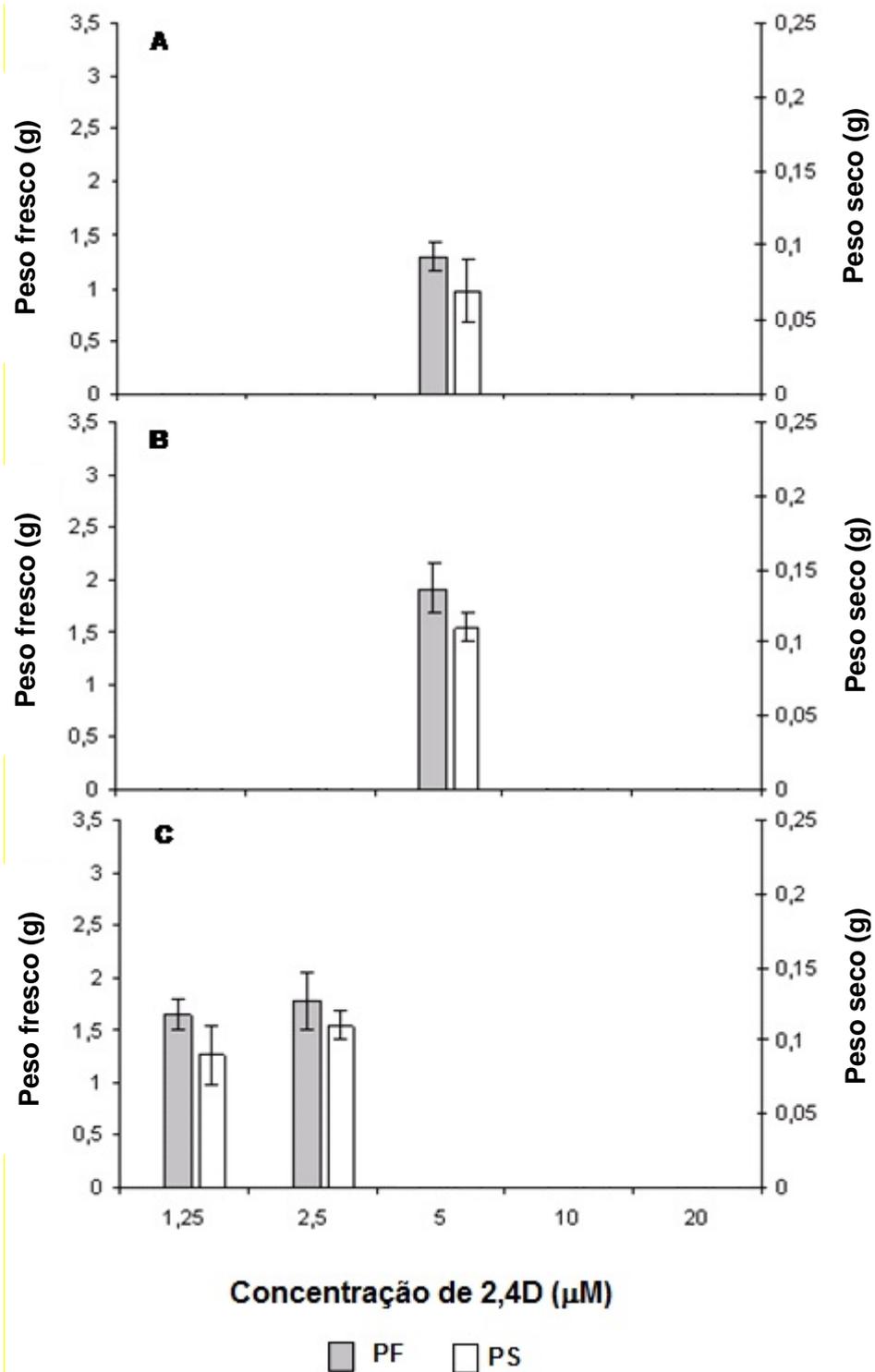


Figura 7 – Acúmulo de biomassa (g) de calos compactos de *A. villosulicarpa* derivados de diferentes explantes cultivados em meio MS suplementado com 2,4D, após 60 dias de cultura

Legenda: (A) Segementos nodais; (B) Entrenós e (C) Folíolos

Nota: PF = peso fresco; PS = peso seco

### 5.1.5 Meios suplementados com ANA

Segmentos nodais e internodais mantidos em meio suplementado com diferentes concentrações de ANA não apresentaram respostas morfogênicas. Além disso, foi observada oxidação nas extremidades dos explantes nas duas primeiras semanas de cultivo (Figura 8 - A, B).

Segmentos de folíolo apresentaram calogênese em freqüências de 70%, independente da concentração de ANA utilizada. Após 15 dias de cultura, foi observada a formação de raízes adventícias em resposta às concentrações mais altas utilizadas (5, 10 e 20  $\mu\text{M}$ ), sendo a melhor resposta obtida na concentração de 5  $\mu\text{M}$  (Figura 8 - C).

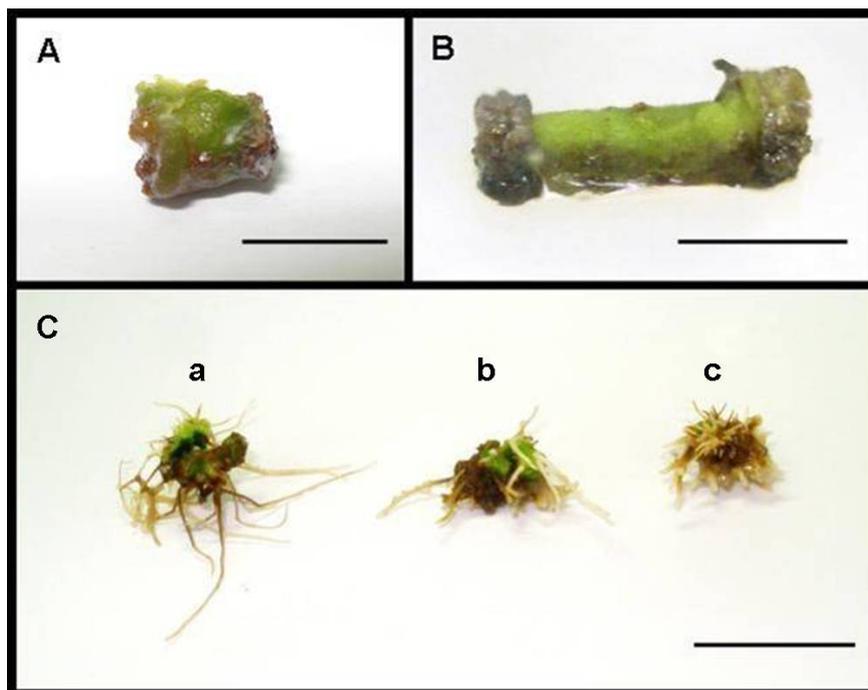


Figura 8 - Morfogênese in vitro a partir de explantes *A. villosulicarpa* inoculados em meio MS suplementado com ANA.

Legenda: (A) Segmento nodal cultivado em meio suplementado ANA a 1,25  $\mu\text{M}$  após 20 dias de cultura; (B) Segmento internodal cultivado em meio suplementado ANA a 1,25  $\mu\text{M}$ , após 20 dias de cultura; (C) Segmentos foliolares cultivados em meio suplementado com ANA a 5 (a), 10 (b) e 20 (c)  $\mu\text{M}$ .

Nota: Barra = 1 cm Foto: Simone Gama

## 5.2 Análise fitoquímica

### 5.2.1 Cromatografia em camada delgada de alta eficiência (HPTLC)

Os extratos de *A. villosulicarpa* foram analisados por HPTLC, utilizando como padrões resveratrol, rutina, ácido pirogálico, quercetina e ácido clorogênico. Os padrões apresentaram os perfis mostrados na Figura 9, quando revelados para flavonóides com NP/PEG e visualizados sob luz UV, a 365 nm. Para determinar a fase móvel mais adequada para a separação dos componentes das amostras, foram testadas diferentes combinações de solventes. A fase móvel butano/etanol/água/ácido acético (60:10:20:0,5 v/v) propiciou uma separação mais eficiente, com a formação de várias bandas fluorescentes amarelas, alaranjadas e azuis.

Na Tabela 5 estão representados os fatores de retenção ( $R_f$ ) das bandas reveladas nas placas dos extratos de plantas *ex vitro* (1A a 4D), plantas *in vitro* (5A a 8B) e calos obtidos a partir de folíolos cultivados em meio suplementado com BAP 8,8 $\mu$ M (10A a 12A).

Os extratos oriundos de partes aéreas apresentaram bandas mais fortes, o que sugere a presença de maiores concentrações dessas substâncias. Nas amostras provenientes de calo, só foi possível observar a presença de flavonóides e polifenóis naquelas que passaram pelo processo de elicitação (Figura 9). Foi possível identificar quatro bandas (1D, 3D, 4D e 5D) com  $R_f$  próximo ao da rutina tanto em plantas *in vitro* como no material *ex vitro*. Bandas com o mesmo  $R_f$  foram observadas em diferentes amostras (Tabela 5).

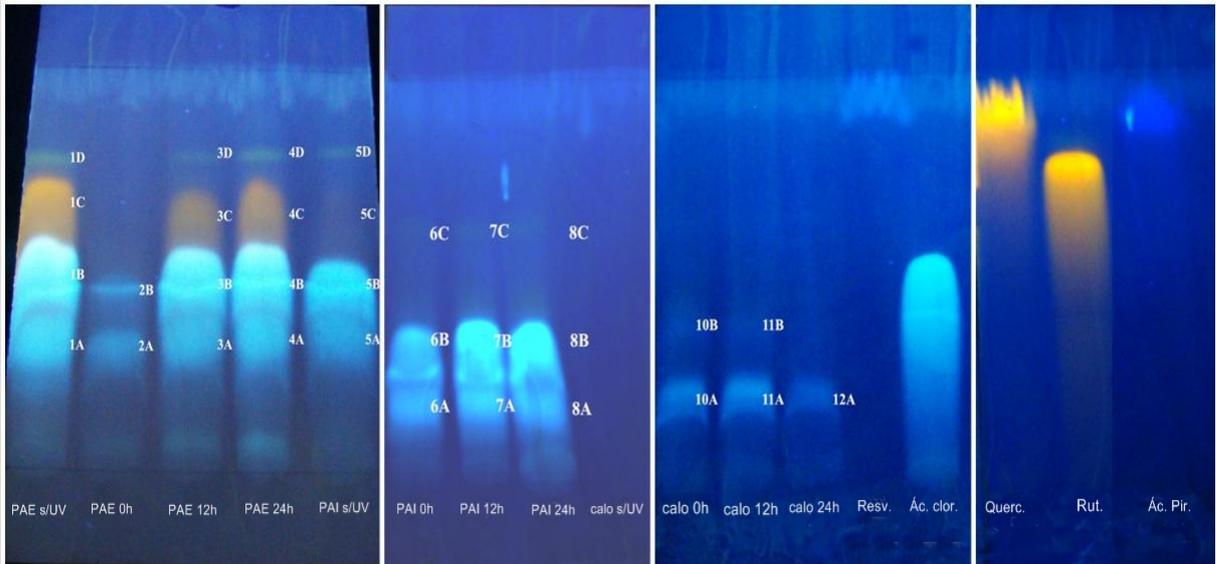


Figura 9 - Análise por HPTLC dos padrões (1 mg/mL) e dos extratos (10 mg/mL) de plantas e calos de *A. villosulicarpa* revelado com NP-PEG.

Legenda: (Resv.) Resveratrol; (Ác. Clor.) Ácido clorogênico; (Querc.) Quercetina, (Rut.) Rutina; (Ác. Pir.) Ácido pirogálico; (PAE) Plantas *ex vitro*, (PAI) Plantas *in vitro* e (Calo) calos derivados de folíolos cultivados na presença de BAP 8,8  $\mu$ M; e (s/UV) sem eliciação por UV-C.

Nota: Os extratos elicitados foram submetidos ao UV-C por 20 minutos e extraídos após 0h, 12h ou 24h no escuro. Foto: Simone Gama

Tabela 5 - Valores de Rf dos padrões e dos extratos de plantas *ex vitro* (1A a 4D), plantas *in vitro* (5A a 8B) e calos (10A a 12A) de *A. villosulicarpa* conforme as bandas obtidas por HPTLC

<b>Bandas</b>	<b>Rf</b>
Resveratrol	0,04
Ácidoclorogênico	0,50
Quercetina	0,10
Rutina	0,24
Ácido pirogálico	0,10
1 A	0,70
1 B	0,52
1 C	0,44
1 D	0,26
2 A	0,70
2 B	0,56
3 A	0,70
3 B	0,52
3 C	0,40
3 D	0,26
4 A	0,70
4 B	0,52
4 C	0,40
4 D	0,26
5 A	0,70
5 B	0,56
5 C	0,40
5 D	0,26
6 A	0,80
6 B	0,64
7 A	0,80
7 B	0,64
8 A	0,80
8 B	0,64
10 A	0,76
10 B	0,60
11 A	0,76
11 B	0,60
12 A	0,76

### 5.2.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)

A análise dos extratos de *A. villosulicarpa* por HPLC permitiu a visualização de 16 picos, que se encontram representados na tabela 6 pelas letras de A a Q, de acordo com o tempo de retenção ( $t_r$ ). Foram considerados apenas os picos com altura superior a 10 mAU.

Os picos B e C foram detectados em todos os extratos, independente da origem ou elicitação (Tabela 6). As áreas relativas do pico B em extratos de calos e plantas *in vitro* elicitados apresentaram valores superiores àqueles obtidos nos de plantas cultivadas *ex vitro*, com exceção das plantas *ex vitro* elicitadas e extraídas sem incubação no escuro (Tabela 6 - PAE 0h).

Na tabela 6 é possível observar que alguns picos foram restritos a determinadas amostras. O pico D apareceu somente nos extratos de amostras *in vitro* e o pico E foi detectado somente nas amostras de planta *ex vitro* elicitadas. Da mesma forma, o pico G foi observado apenas na amostra de calos sem elicitação, e os picos I, O e P foram detectados somente em plantas *in vitro* elicitadas, principalmente após incubação por 12h no escuro. O pico N foi registrado apenas nos extratos de plantas, sendo sua área relativa menor nos extratos de plantas *ex vitro* do que nas plantas *in vitro* sem elicitação. Os demais picos foram observados de forma esporádica, sem nenhum padrão definido.

Tabela 6 - Áreas relativas (%) dos picos cromatográficos detectados por HPLC em extratos etanólicos de *A. villosulicarpa*

Amostra	Picos cromatográficos/ t, (min)															
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	L	M	N	O	P	Q
	2,1	2,3	2,4	2,5	2,8	2,99	3,07	3,4	8,4	9,5	9,7	10,3	10,5	11,4	11,8	13,4
PAE s/UV	4,0	5,4	4,4	-	-	-	-	6,7	-	53,7	14,7	7,7	2,8	-	-	-
PAE 0h	6,3	16,3	13,9	-	-	-	-	14,6	-	-	-	-	-	-	-	-
PAE 12h	-	6,9	3,8	-	1,0	3,8	-	8,0	-	20,3	11,1	16,9	2,1	-	-	7,9
PAE 24h	1,9	5,8	4,5	-	-	0,5	0,2	4,5	-	38,8	14,0	4,5	2,5	-	-	5,3
PAI s/Uv	0,9	2,8	2,4	-	4,4	2,7	-	4,8	-	9,6	4,2	-	34,3	-	-	11,4
PAI 0h	-	9,3	3,2	2,0	1,4	4,9	-	-	-	-	-	-	33,2	-	-	8,2
PAI 12h	-	12,8	1,6	5,2	-	0,9	-	-	30,9	2,6	2,8	-	-	17,3	4,9	-
PAI 24h	-	10,6	2,4	1,1	-	1,5	-	4,1	29,1	7,6	3,2	-	-	13,5	4,5	-
Calo s/UV	-	10,0	4,8	2,3	-	2,2	66,1	9,7	-	-	-	-	-	-	-	-
Calo 0h	-	10,14	4,65	2,8	-	2,8	0,1	11,9	-	10,9	-	-	-	-	-	-
Calo 12h	-	11,8	3,85	4,3	-	5,1	-	4,3	-	-	-	-	-	-	-	-
Calo 24h	-	9,7	3,4	5,3	-	4,8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Legenda: (PAE) Extratos de plantas *ex vitro*; (PAI) plantas *in vitro*; (Calo) calos obtidos em resposta a folíolos inoculados em 8,8  $\mu$ M de BAP; e (s/UV) sem elicitação com UV-C.

Nota: Os extratos elicitados foram submetidos ao UV-C por 20 minutos e extraídos após 0h, 12h ou 24h no escuro

### 5.3 Avaliação de atividades biológicas

#### 5.3.1 Atividade antioxidante

O potencial de antioxidante dos extratos foi determinado com base na curva padrão (Figura 10), tendo sido observada uma influência significativa do período de incubação do material após a elicitação e da concentração do extrato. Dessa forma, os extratos de plantas *ex vitro* obtidos após elicitação e incubação por 24h apresentaram a maior capacidade redução do DPPH (94%) na concentração de 10 mg/ mL. Um comportamento semelhante foi observado com extratos de plantas *in vitro* e de calos, embora o material derivado de calos tenha apresentado um poder redutor mais baixo que os demais (Figura 11).

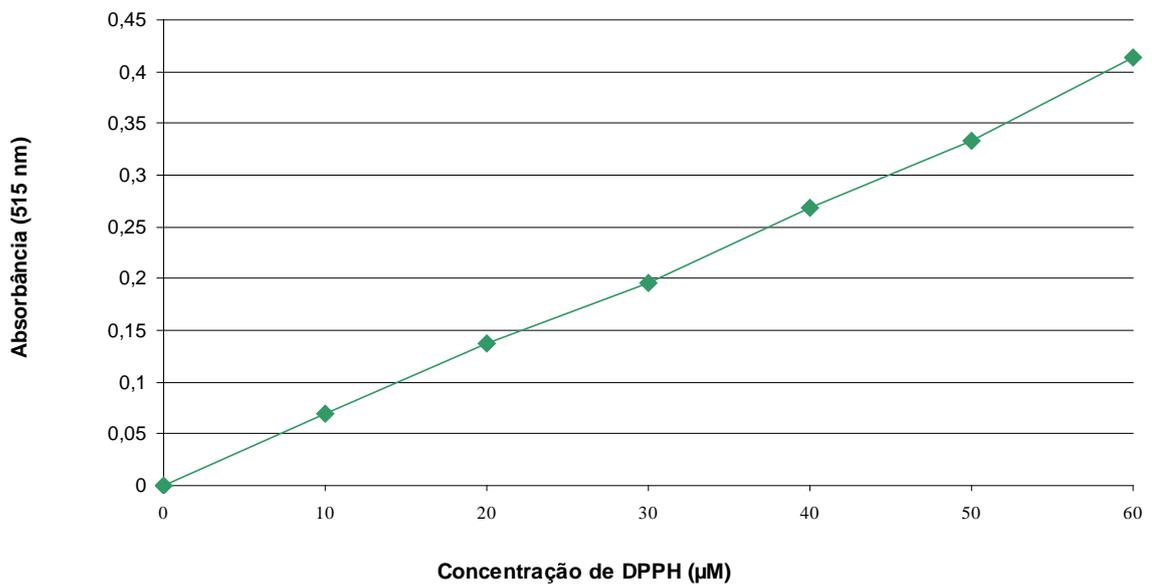


Figura 10 – Curva padrão de DPPH.

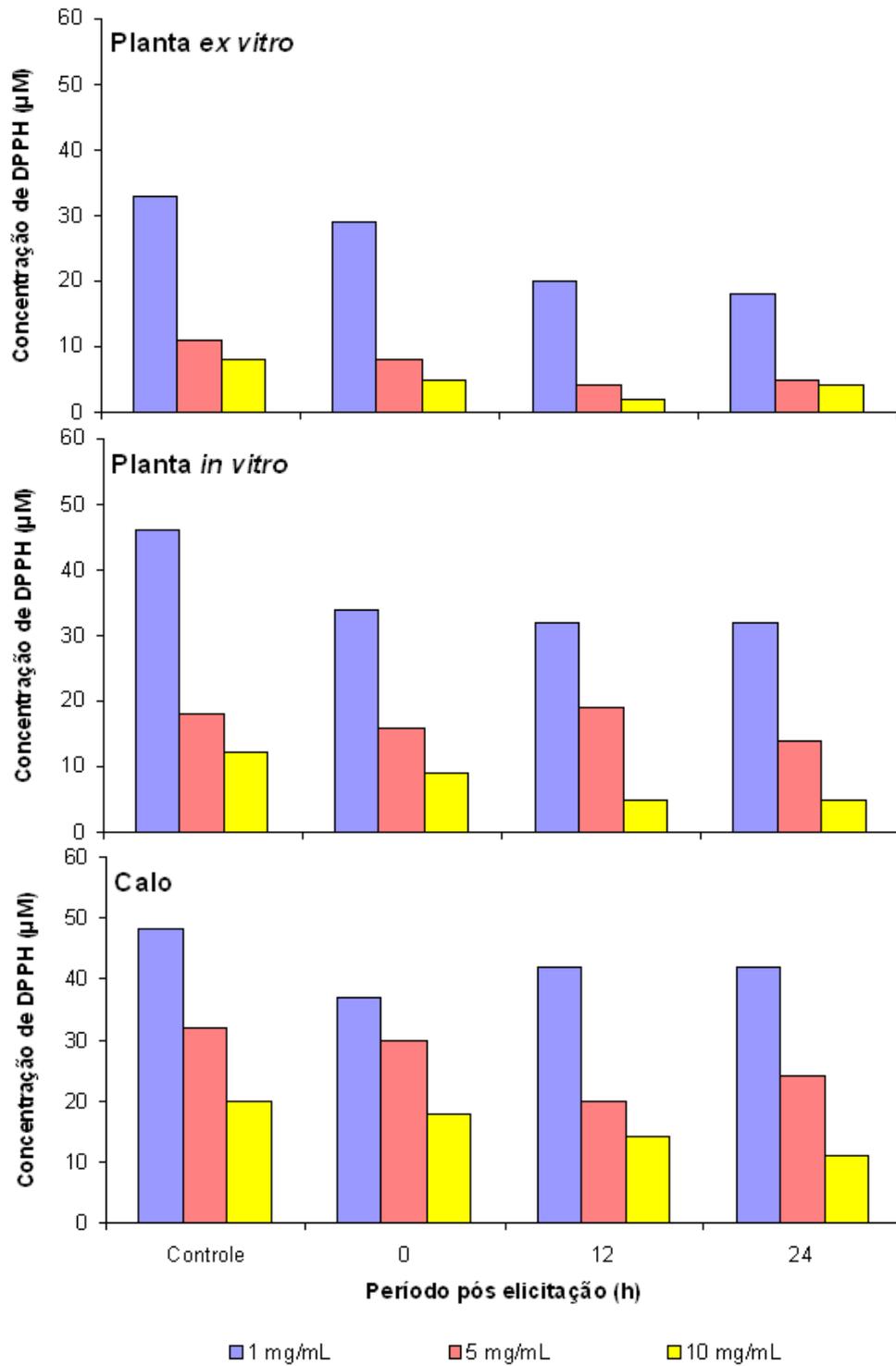


Figura 11 – Avaliação da atividade antioxidante de extratos de *A. villosulicarpa* em diferentes concentrações.

Nota: Os extratos foram obtidos de plantas *ex vitro*, plantas *in vitro* e calos, expostos a UV-C e incubados no escuro por 0, 12 e 24h após a elicitação

### 5.3.2 Potencialidade genotóxica

Os experimentos foram realizados com extratos etanólicos de plantas *ex vitro*, plantas *in vitro* e calos. Após os tratamentos com as concentrações de 5 e 10 mg/mL, a conformação do DNA plasmidial apresentou apenas o padrão de bandas característico do estado superhelicoidizado, indicando que não houve alterações em sua conformação (Figura 12).

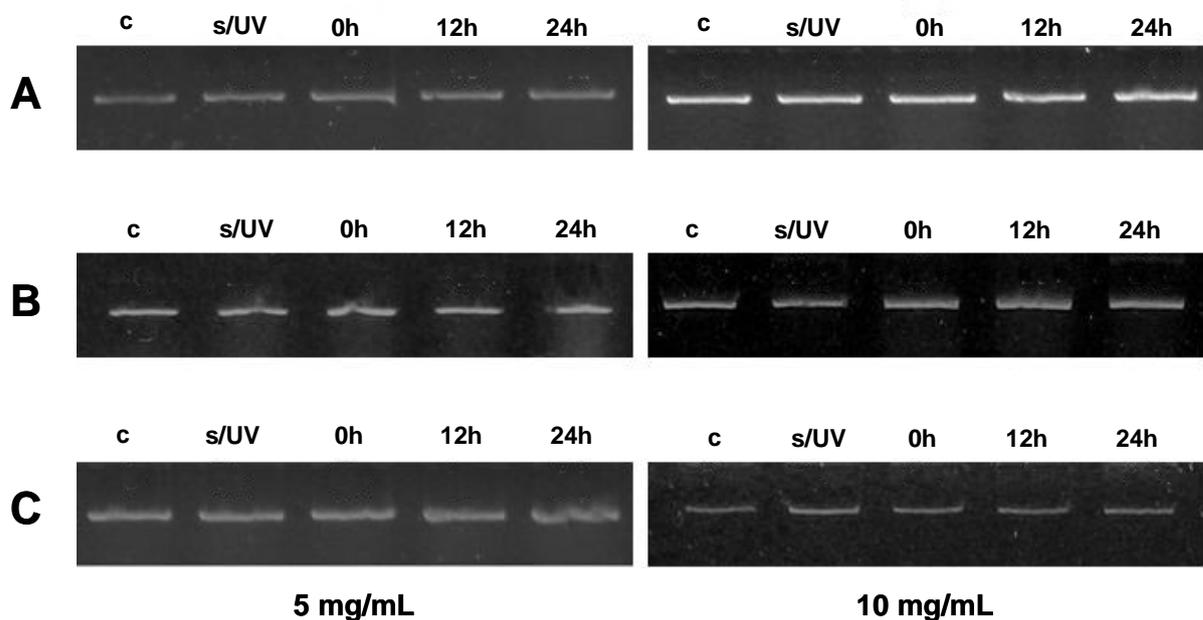


Figura 12 - Potencialidade genotóxica de *A. villosulicarpa*.

Legenda: (c) controle; (A) plantas *ex vitro*; (B) plantas *in vitro*; (C) calos; e (s/UV) sem elicitação por UV-C.

Nota: Os extratos foram obtidos a 0h, 12h e 24h após a elicitação e utilizados nas concentrações de 5mg/mL e 10mg/mL. Foto: Simone Gama

## 6 DISCUSSÃO

*Arachis villosulicarpa* Hoenhe é considerada uma cultura negligenciada, utilizada apenas entre três grupos indígenas do oeste do Mato Grosso, que além de resistência a *Cercospora arachidicola* e *Cercosporidium personatum*, apresenta um elevado teor de triptofano (SMARTT; STALKER, 1982; PITTMAN; JOHNSON; BANKS, 1984; FREITAS, 2004). Considerando o potencial dessa espécie como alimento e fonte de compostos bioativos, e levando-se em conta a escassez de estudos a seu respeito, o objetivo deste trabalho foi o estabelecimento de diferentes sistemas de cultura *in vitro*, visando à realização de estudos preliminares sobre a produção de metabólitos e a avaliação de possíveis atividades biológicas.

Nos estudos visando ao estabelecimento de culturas *in vitro*, segmentos nodais, internodais e foliolares apresentaram respostas distintas, de acordo com o regulador de crescimento utilizado. Quando cultivados na presença de BAP ou 2,4-D, os explantes apresentaram a formação de calos compactos, com desenvolvimento de até  $4,75 \pm 0,8$  brotos por explante. Em trabalhos realizados por GAGLIARDI et al. (2000, 2004) com *Arachis retusa* Krapov. & W.C. Gregory, a presença de BAP a  $8,8 \mu\text{M}$  no meio de cultura induziu multibrotação e organogênese indireta a partir de eixos embrionários. Por outro lado, *Arachis archeri* Krapov. & W.C. Gregory, *Arachis porphyrocalix* Valls & C.E. Simpson e *Arachis appressipila* Krapov. & W.C. Gregory apresentaram a formação de calos embriogênicos em resposta ao mesmo regulador de crescimento, com frequências entre 40 e 100% e a produção de até 214 embriões por explante (PACHECO et al., 2007b).

Em meios suplementados com PIC, explantes de *A. villosulicarpa* formaram calos mucilaginosos e ligeiramente oxidados. Contudo, em *A. hypogaea*, a utilização de PIC e Dicamba isolados induziu embriogênese somática repetitiva (LITTLE; MAGBANUA; PARROTT, 2000). Além disso, sistemas embriogênicos foram descritos a partir de folíolos embrionários de *Arachis pintoii* Krapov. & W.C. Gregory e *Arachis correntina* (Burkart) Krapov. & W.C. Gregory em resposta a combinações de BAP e PIC (REY; MOROGINSKI, 2006; VIDOZ et al., 2006). MANSUR et al. (1993) estabeleceram culturas de células em suspensão de *A. villosulicarpa* em meio MS líquido acrescido de PIC a  $0,82 \mu\text{M}$ , a partir de calos friáveis originados de folhas e cotilédones cultivados em meio MS suplementado com  $0,41 \mu\text{M}$  de PIC e

4,4  $\mu\text{M}$  de BAP, com o desenvolvimento de brotos que enraizaram no mesmo meio. Neste trabalho, no entanto, a utilização de combinações de BAP com PIC induziu a formação de calos friáveis, compactos ou mistos, porém sem produção de brotos ou embriões, provavelmente devido a diferenças genótípicas entre os acessos utilizados.

Na presença de ANA, segmentos nodais e internodais de *A. villosulicarpa* não apresentaram resposta morfogênica, enquanto que segmentos foliares apresentaram a formação de raízes adventícias em todas as concentrações testadas. A rizogênese direta a partir de folíolos cultivados em meio suplementado com ANA também foi observada em *Arachis stenosperma* Krapov. & W.C. Gregory (PACHECO et al., 2008).

Com base na produção de biomassa, os calos obtidos por meio da inoculação de folíolos em 8,8  $\mu\text{M}$  de BAP foram escolhidos para os estudos preliminares de fitoquímica e avaliação de atividades biológicas.

As espécies silvestres de *Arachis* são altamente promissoras como fontes de resistência a diversas pragas (LEAL-BERTIOLI et al., 2003). A resistência está relacionada, principalmente, a aleloquímicos presentes nas plantas, tais como alcalóides, flavonóides, terpenóides e esteróides (MEDEIROS, 1990). Os aleloquímicos são definidos como substâncias não nutritivas, produzidas por uma espécie, e que afetam a sobrevivência, crescimento, comportamento, fecundidade ou fertilidade de indivíduos de outra espécie (FERREIRA; AQUILA, 2000). De acordo com a natureza das substâncias envolvidas, as defesas das plantas podem ser constitutivas (independente de estresse) ou induzidas (dependente de estresse), porém os dois mecanismos são de difícil separação, principalmente porque as respostas podem ser eliciadas por fatores ambientais (FERREIRA; AQUILA, 2000).

Geralmente, a técnica de cromatografia em camada delgada é utilizada em amendoim (*Arachis hypogaea* L.) para avaliar a contaminação por aflatoxinas em grãos armazenados (COLAÇO; FERRAZ; ALBUQUERQUE, 1994; SABINO et al., 1999, PRADO; OLIVEIRA, 1999, SHUNDO; SILVA; SABINO, 2003; ROSSETO; SILVA; ARAUJO, 2005, COSTA et al., 2009). Em nosso trabalho, assim como em Medina-Bolivar et al. (2007), esta técnica foi utilizada para avaliar a presença de substâncias bioativas em extratos etanólicos de plantas *ex vitro*, plantas *in vitro* e calos de *A. villosulicarpa*, com ou sem eliciação por UV-C. Os cromatogramas obtidos por HPTLC apresentaram bandas de coloração azul, um arraste alaranjado e

uma banda amarelada, quando corados por NP:PEG. Segundo Wagner e Bladt (1995) e Santana et al. (2007), as bandas amarelas e alaranjadas indicam a presença de flavonóides, enquanto que as bandas azuis sugerem a presença de polifenóis. Foi possível identificar bandas com Rf similares entre as diferentes amostras, indicando que entre os diferentes materiais podem ser produzidas as mesmas substâncias. Da mesma forma, quatro bandas apresentaram um Rf próximo ao da rutina, não podemos afirmar que se trata da mesma substância sem estudos mais aprofundados, porque, apesar de apresentarem coloração semelhante, assim como ocorreu com ácido pirogálico e quercetina, substâncias diferentes podem apresentar valores semelhantes de Rf.

Na cromatografia líquida de alta eficiência, foi possível detectar diferentes picos nos materiais analisados. Com relação às amostras propagadas *in vitro*, houve um aumento da produção de substâncias nos picos B e N, e o aparecimento de novos picos (D, G, I, N, O, P). Estes resultados confirmam que as condições *in vitro* podem induzir ou inibir a síntese de substâncias produzidas por plantas, bem como estimular a produção de novos compostos (JEONG; PARK, 2006; GEORGIEV; PAVLOV; BLEY, 2007; SRIVASTAVA; SRIVASTAVA, 2007; MISHRA; RANJAN, 2008, CONDORI et al., 2010). Além disso, os fitorreguladores estão envolvidos em diversos processos que controlam a atividade gênica (GUERRA et al., 1999) e, portanto, a diferença na produção das substâncias pode estar diretamente relacionada à sua presença no meio de cultura. Deve-se também considerar que produção de metabólitos está associada à defesa das plantas contra diversos estresses (FERREIRA; AQUILA, 2000). A presença dos picos I, O e P, por exemplo, só foi detectada, tanto em plantas *in vitro* como em plantas *ex vitro*, após elicitación com UV.

O estresse oxidativo induzido por espécies reativas de oxigênio (ERO) desempenha um papel crítico em várias doenças degenerativas, como câncer, Alzheimer, doença de Parkinson, aterosclerose e úlceras gástricas, danificando biomoléculas, como proteínas, lipídios e DNA (BANDYOPADHYAY; DAS; BANERJEE, 1999). As células possuem um complexo sistema antioxidante para proteger as moléculas celulares contra danos induzidos por ERO, incluindo enzimas antioxidantes, como a superóxido catalase dismutase e a glutathione peroxidase (CLARKSON; THOMPSON, 2000). No entanto, esta defesa não é suficiente para impedir estresses oxidativos mais graves e, portanto, danos teciduais podem ocorrer

(WANG; ALAMURI; MAIER, 2006). Consequentemente, antioxidantes exógenos são constantemente exigidos para equilibrar as ERO (SHUKLA et al., 2009). Vários antioxidantes sintéticos, como butilhidroxianisol (BHA), butilhidroxitolueno (BHT) e terc-butilhidroquinona (TBHQ), estão disponíveis comercialmente, mas suas aplicações são restritas devido aos riscos potenciais à saúde (VALENTÃO et al., 2002). Portanto, muita atenção tem sido focalizada sobre substâncias antioxidantes naturais.

As plantas contêm uma enorme variedade de moléculas que bloqueiam o efeito danoso dos radicais livres, tais como compostos fenólicos, compostos nitrogenados, vitaminas, terpenos e outros metabólitos endógenos. Nas últimas décadas, muitas espécies têm sido amplamente estudadas para avaliação do seu potencial antioxidante, que pode gerar inúmeros benefícios para a saúde humana (CAI et al., 2004; SAMARTH et al., 2008). Os compostos fenólicos possuem fortes propriedades antioxidantes e podem exercer um efeito positivo na redução da oxidação lipídica, assim com na redução do oxigênio singlete e na quelação de metais (MOREIRA, 1999; DUARTE-ALMEIDA et al., 2006).

A análise de substâncias com atividade antioxidante no amendoim cultivado (*A. hypogaea*) tem sido relatada por vários autores (YEN;DUH, 1995; GREEN, 2004; LEE et al., 2007). Entretanto, a realização de estudos dessa natureza em outra espécie do gênero foi observada pela primeira vez neste trabalho. Uma vez que a presença de polifenóis e flavonóides foi observada em análises por HPTLC, há indícios de que estes extratos também possam apresentar um efeito redutor de radicais livres, como já extensamente comprovado (NAMIKI, 1990; YANG et al., 2001; NAGAI; YUKIMOTO, 2003).

O período de incubação do material após a elicitação, assim como a concentração utilizada, influenciaram significativamente na capacidade dos extratos de seqüestrar o radical DPPH. Dessa forma, extratos de plantas *ex vitro* reduziram a 4  $\mu\text{M}$  a concentração inicial de DPPH (60  $\mu\text{M}$ ), o que corresponde a um poder redutor de 94%. Em trabalhos realizados por Nepote, Grosso e Guzman (2002) e Yen e Duh (1995), foram obtidos percentuais de inibição em torno de 90%, portanto os resultados evidenciam que se torna cada vez mais necessário a investigação destas propriedades em outras espécies do gênero.

Produtos derivados de plantas têm sido freqüentemente usados no tratamento e prevenção de doenças (DIAS et al.,1995) e estima-se que mais de 80% da

população mundial utiliza plantas como fonte primária de agentes terapêuticos (CORDELL, 1995). Nas últimas décadas, muitos estudos têm sido dirigidos à identificação de produtos naturais com propriedades terapêuticas (HAMBURGER; HOSTETMANN, 1991; WEISBURGER et al., 1996; SILVA et al., 1997; BAE et al., 2002). Diversas substâncias da classe dos flavonóides são conhecidas por bloquear o desenvolvimento de processos mutagênicos e carcinogênicos. Sabendo-se que os flavonóides são considerados agentes antioxidantes, parece incoerente que a genotoxicidade desses compostos seja estudada. Entretanto, uma substância que desempenha atividade antioxidante em lipídeos pode não exercer a mesma atividade em outros alvos celulares como, particularmente, o DNA. Alguns flavonóides demonstraram seu poder mutagênico e genotóxico em células procarióticas e eucarióticas (SKIBOLA; SMITH, 2000). Porém, o mecanismo que descreve essa atividade é dependente da estrutura do flavonóide, de sua metabolização ou da produção de ERO (SILVA et al., 2000). Além disso, para classificar um agente como pró ou antioxidante é importante levar em consideração as condições em que o experimento é desenvolvido e as doses utilizadas, uma vez que, em baixas concentrações, um composto pode atuar como um antioxidante e, em doses elevadas, desempenhar atividade pró-oxidante, o que parece ser o caso de alguns flavonóides (HALLIWELL, 1990, SILVA et al., 1996).

O potencial genotóxico dos extratos estudados neste trabalho foi avaliado de acordo com as mudanças na conformação do plasmídeo pUC9.1. No seu estado natural, não danificado, o DNA plasmidial apresenta conformação compacta superhelicoidizada, e como tal, tem elevada mobilidade eletroforética. Após a indução de quebras em fita única, a estrutura terciária superhelicoidizada é rompida, resultando em uma conformação circular aberta e mobilidade eletroforética reduzida. O DNA plasmidial linear, formado por quebras na dupla fita, tem mobilidade intermediária (RAHMAN et al., 1992). Portanto, a análise por eletroforese em gel de agarose fornece informações a respeito dos tipos de quebra das fitas, pela separação das diferentes conformações do DNA plasmidial (YOSHINO et al., 1999; DANTAS et al., 1999; DE MATTOS et al., 2000; DANTAS et al., 2002; FERREIRA-MACHADO et al., 2004; GUEDES et al., 2006; SILVA et al., 2008). Os resultados dessa avaliação demonstraram que os extratos etanólicos de plantas *ex vitro*, *in vitro* e de calos de *A. villosulicarpa* não alteraram a integridade da conformação

superhelicoidizada do DNA plasmidial, indicando que não possuem atividade genotóxica.

O conjunto dos resultados deste trabalho permitiu o estabelecimento de diferentes sistemas *in vitro* que podem ser utilizados em análises fitoquímicas e farmacológicas de *A. villosulicarpa*. Além disso, foi possível demonstrar que a elicitação por UV-C induz a produção de diferentes substâncias e alterações na atividade antioxidante do material. Estudos adicionais visando à detecção de metabólitos especiais em *A. villosulicarpa* contribuirão para expandir o conhecimento sobre as possibilidades de utilização de espécies silvestres do gênero *Arachis*.

## 7 CONCLUSÕES

- A regeneração de plantas e a indução de calogênese foi induzida por diferentes reguladores de crescimento;
- A análise por HPTLC evidenciou diferenças na produção de flavonóides e polifenóis entre as amostras de plantas e calos;
- O período de incubação do material após a elicitação, assim como a concentração de extrato utilizada, influenciaram significativamente a capacidade antioxidante dos extratos;
- Os extratos de *A. villosulicarpa* não alteraram a integridade da conformação superhelicoidizada do DNA plasmidial, mostrando que não há indícios de genotoxicidade até a concentração de 10 mg/mL.

## REFERÊNCIAS

- AKASAKA, Y.; DAIMON, H.; MII, M. Improved plant regeneration from cultured leaf segments in peanut (*Arachis hypogaea* L.) by limited exposure to thidiazuron. *Plant Science*, [S.l.], v. 156, p. 169-175, 2000.
- ALMEIDA, F. R. F. Amendoim. *Agroanalysis*, [S.l.], n. 3, p. 26-27, 1996.
- ANGELICI, C. M. L. C. D. et al. Genetic diversity in section Rhizomatosae of the genus *Arachis* (Fabaceae) based on microsatellite markers. *Genetics and Molecular Biology*, [S.l.], v. 31, p. 79–88, 2008.
- ARTS, I. C. W.; HOLLMAN, P. C. H. Polyphenols and disease risk in epidemiological studies. *The American Journal of Clinical Nutrition*, [S.l.], v. 81(suppl), p. 317S-325S, 2005.
- ATES, O. et al. Central nervous system protection by resveratrol in streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of Clinical Neuroscience*, [S.l.], v. 14, p. 256–260, 2007.
- AWAD, A. B. et al. Peanuts as a source of beta617 sitosterol, a sterol with anticancer properties. *Nutrition and Cancer*, [S.l.], v. 36, p. 238-241, 2000.
- \_\_\_\_\_. Sitosterol activated Fas signaling in human breast cancer cells. *Phytomed*, [S.l.], v. 14, p. 747-754, 2007.
- AWAD, A. B.; HARTATI, M. S.; FINK, C. S. Phytosterol feeding induces alteration in testosterone metabolism in rat tissues. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, [S.l.], v. 9, p. 712-717, 1998.
- AWAD, A. B.; TOCZEK, J.; FINK, C. S. Phytosterols decrease prostaglandin release in cultured P388D1/MAB macrophages. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, [S.l.], v. 70, p. 511-520, 2004.
- BAE, E. A. et al. Metabolism of 20(S)- and 20(R)- ginsenoside R-g3 by human intestinal bacteria and its relation to *in vitro* biological activities. *Biological Pharmaceutical Bulletin*, [S.l.], v. 25, p. 58–63, 2002.
- BALASUBAHINI, S. M.; RUKKUMANI, R.; MENON, V. P. Protective effects of ferulic acid on hyperlipidemic diabetic rats. *Acta Diabetologica*, [S.l.], v. 40, p. 118-122, 2003.
- BALLARD, T. S. et al. Optimizing the extraction of phenolic antioxidants from peanut skins using response surface methodology. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, [S.l.], v. 57, p. 3064-3072, 2009.

- BANDYOPADHYAY, U.; DAS, D.; BANERJEE, R. K. *Reactive oxygen species: oxidative damage and pathogenesis. Current Science*, [S.l.], v. 77, p. 658-666, 1999.
- BERNHAUS, A. et al. Antitumor effects of KITC, a new resveratrol derivative, in AsPC-1 and BxPC-3 human pancreatic carcinoma cells. *Invest New Drugs*, [S.l.], v. 27, p. 393-401, 2009.
- BHAGWATH, S.G. & HJORTSO, M.A. Statistical analysis of elicitation strategies for thiarubrine A production in hairy root cultures of *Ambrosia artemisiifolia*. *Journal of Biotechnology*, v.80, p.159-167, 2000.
- BOUE, S. M. et al. Phytoalexin-enriched functional food. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, [S.l.], v. 57, p. 2614-2622, 2009.
- BRADAMANTE, S. et al. Resveratrol provides late-phase cardioprotection by means of a nitric oxide- and adenosine-mediated mechanism. *European Journal Pharmacology*, [S.l.], v. 465, no. 1-2, p. 115-123, 2004.
- BURTNIK, O. J.; MROGINSKI, L. A. Regeneracion de plantas de *Arachis pintoi* (Leguminosae) por cultivo in vitro de tejidos foliares. *Oleagineux*, [S.l.], v. 40, p. 609-611, 1985.
- CAI, Y. et al. Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life Sciences*, [S.l.], v. 74, p. 2157-2184, 2004.
- CAMARGO, A. C. et al. Capacidade antioxidante de amendoim (*Arachis hypogaea* L.) cultivar Tatu Vermelho submetido a radiações gama de 60 Co. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, 15., 2007, São Paulo. *Anais...* São Paulo: Universidade de São Paulo, 2007.
- CARLEY, D. H.; FLETCHER, S. M. An overview of world peanut markets. In: PATTEE, H. E; STALKER, H. T. *Advances in peanut research and education society. Stillwater*, [S.l.], p. 554-577, 1995.
- CHEN, R. S.; WU, P. L.; CHIOU, R. Y. Peanut roots as a source of resveratrol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, [S.l.], v. 50, p. 1665-1667, 2002.
- CHUNG, I. et al. Resveratrol accumulation and resveratrol synthase gene expression in response to abiotic stresses and hormones in peanut plants. *Plant Science*, [S.l.], v. 164, p. 103-109, 2003.
- CLARKSON, P. M.; THOMPSON, H. S. *Antioxidants: what role do they play in physical activity and health. The American Journal of Clinical Nutrition*, [S.l.], v. 72, p. 637-646, 2000.
- COLAÇO, W.; FERRAZ, U.; ALBUQUERQUE, L. R. Incidencia de aflatoxinas em amendoim e produtos derivados consumidos na cidade de Recife, no periodo de 1989 a 1991. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, [S.l.], v. 54, n. 1, p. 1-4, 1994.

- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB). *Sementes de amendoim: alguns comentários*. Brasília, 2005. 8 p. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/download/cas/especiais/semente-deamendoiminternet.pdf>>. Acesso em: 22 set. 2010.
- 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 Physiology and Biochemistry*, [S.l.], v. 48, no. 5, p. 310-318, 2010.
- CORDELL, G. A. Changing strategies in natural products chemistry. *Phytochemistry*, [S.l.], v. 40, p. 1585-1612, 1995.
- COSTA, A. K. F. et al. Fungos associados à castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa* Humb. & Bompl) e ao amendoim (*Arachis hypogaea* L.) comercializados em Fortaleza (Ceará). *Revista Ciência Agronômica*, [S.l.], v. 40, n. 3, 2009.
- CUSTÓDIO, D. P. et al. Ração: alimento animal perecível. *Revista Eletrônica Faculdade Montes Belos*, [S.l.], v.1, p. 131-147, 2005.
- DANTAS, F. J. S. et al. Genotoxic effects of stannous chloride (SnCl<sub>2</sub>) in K562 cell line. *Food and Chemical Toxicology*, [S.l.], v. 40, p. 1493-1498, 2002.
- \_\_\_\_\_. Stannous chloride mediates single strand breaks in plasmid DNA. *Toxicology Letters*, [S.l.], v. 110, p. 129-136, 1999.
- DE MATTOS, J. C. P. et al. Damage induced by stannous chloride in plasmid DNA. *Toxicology Letters*, [S.l.], v. 116, p. 159-163, 2000.
- DESENDER, S.; ANDRIVON, D.; VAL, F. Activation of defence reactions in Solanaceae: where is the specificity? *Cell Microbiology*, v. 9, p.21–30, 2007.
- DIAS, F. L. et al. Genotoxicity of the natural Cercaricides “Sucupira” oil and eremanthine in mammalian cells *in vitro* and *in vivo*. *Environmental Molecular Mutagenesis*, [S.l.], v. 26, p. 338–344, 1995.
- DUARTE-ALMEIDA, J. M. et al. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema β-caroteno/ácido linoléico e método de seqüestro de radicais DPPH. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, [S.l.], v. 26, n. 2, p. 446-452, abr./jun. 2006.
- DUNBAR, K. B.; PITTMAN, R. N. Adventitious shoot formation from mature leaf explants of *Arachis* species. *Crop Science*, [S.l.], v. 32, p. 1353–1356; 1992.
- EMBRAPA. A cultura do amendoim na agricultura familiar brasileira. *Rumos e Debates*, [S.l.], 2001.
- FAGUNDES, M. H. *Sementes de amendoim: alguns comentários*. [S.l.], 28 out. 2002. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/download/cas/especiais/semente-de-amendoim-internet.pdf>>. Acesso em: 14 nov. 2010.

- FÁVERO, A. P. *Cruzabilidade entre espécies silvestres de Arachis visando à introgressão de genes de resistência a doenças no amendoim cultivado*. 2004. 165 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.
- FERREIRA, A. G.; AQUILA, M. E. *Alelopatia: uma área emergente da ecofisiologia*. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, [S.l.], v. 12, p. 175-204, 2000.
- FERREIRA-MACHADO, S. C. et al. Genotoxic potentiality of aqueous extract prepared from *Chrysobalanus icaco* L. leaves. *Toxicology Letters*, [S.l.], v. 151, p. 481-487, 2004.
- FRANCISCO, M. L. L. D. L.; RESURRECCION, A. V. A. Functional Components in Peanuts. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, [S.l.], v. 48, p. 715-746, 2008.
- \_\_\_\_\_. Total phenolics and antioxidant capacity of heat-treated peanut skins. *Journal of Food Composition and Analysis*, [S.l.], v. 22, p. 16-24, 2009.
- FREIRE, R. M. M.; SANTOS, R. C.; BELTRÃO, N. E. M. Qualidade nutricional e industrial de algumas oleaginosas herbáceas cultivadas no Brasil. *Óleos e Grãos*, [S.l.], n. 28, p. 49-53, 1996.
- FREITAS, F. O. *Ampliação da área de ocorrência da espécie Arachis villosulicarpa Hoehne*. [S.l.]: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2004. Disponível em: <<http://www.cenargen.embrapa.br/>>. Acesso em: 16 ago. 2010.
- FREITAS, S. M.; GODOY, I. J.; VIEIRA, R. D. Aspectos comparativos da produção e comercialização de amendoim nos países do Mercosul. *Informações Econômicas*, [S.l.], v. 25, n. 1, p. 49-55, 1995.
- FRITZEMEIER, K.-H. et al. Action of ultraviolet C on stilbene formation in callus of *Arachis hypogaea*. *Planta*, [S.l.], v. 159, p. 25-29, 1983.
- GAGLIARDI, R. F. et al. Cryopreservation of cultivated and wild *Arachis* species embryonic axes using desiccation and vitrification methods. *CryoLetters*, [S.l.], v. 23, p. 61-68, 2002a.
- \_\_\_\_\_. Germplasm preservation of wild *Arachis* species through culture of shoots apices and axillary buds from *in vitro* plants. *Biologia Plantarum*, [S.l.], v. 45, p. 353-357, 2002b.
- \_\_\_\_\_. *In vitro* plant regeneration from seed explants of wild groundnut species (Genus *Arachis*, Section *Extranervosae*). *Biodiversity and Conservation*, [S.l.], v. 9, p. 943-951, 2000.
- \_\_\_\_\_. Rescue of a non-viable accession and RAPD analysis of recovered plants of *Arachis retusa*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, [S.l.], v. 39, n. 2, p. 197-199, 2004.

- GALGARO, L.; VALLS, J. F. M.; LOPES, C. R. Study of the genetic variability and similarity among and within *Arachis villosulicarpa*, *A. pietrarellii* and *A. hypogea* through isoenzyme analysis. *Genetic Resources and Crop Evolution*, [S.l.], v. 44, p. 9–15, 1997.
- GAO, Z.; CHEN, X.; HU, G. Inhibition of excitatory synaptic transmission by trans-resveratrol in rat hippocampus. *Brainresearch*, [S.l.], v. 1111, p. 41-47, 2006.
- GEORGIEV, M. I.; PAVLOV, A. I.; BLEY, T. Hairy root type plant *in vitro* systems as sources of bioactive substances. *Applied Microbiology and Biotechnology*, [S.l.], v. 74, p. 1175–1185, 2007.
- GIRI, A.; NARASU, M. J. Transgenic hairy roots: recent trends and applications. *Biotechnology Advances*, [S.l.], v. 18, p. 1-22, 2000.
- GODOY, L. J. et al. Melhoramento do Amendoim. In: BOREM, A. *Melhoramento de Espécies Cultivadas*. Viçosa, MG: Ed. UFV, 1999. p. 51-94.
- GREEN, R. J. *Antioxidant activity of peanut plant tissues*. Raleigh: North Caroline State University, 2004.
- GREGORY, W. C.; KRAPOVICKAS, A.; GREGORY, M. P. Structure, variation, evolution and classification in *Arachis*. In: SUMERFIELD, R. J.; BUNTING, A. H. (Ed.) *Advances in legume sciences*. Kew: Kew Royal Botanic Gardens, [S.l.], p. 469-481, 1980.
- GUEDES, A. P. et al. Cytotoxic and genotoxic effects induced by stannous chloride associated to nuclear medicine kits. *Nuclear Medicine and Biology*, [S.l.], v. 33, p. 915-921, 2006.
- GUERRA, M. P.; NODARI, R. O. *Apostila de Biotecnologia 1: Cultura de tecidos vegetais: Material Didático de Apoio à Disciplina de Biotecnologia*. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina. Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal, 2006. Disponível em: <<http://www.lfdgv.ufsc.br/Apostila%20Biotecnologia.pdf>>. Acesso em: 24 nov. 2010.
- GUERRA, M. P.; TORRES, A. C.; TEIXEIRA, J. B. Embriogênese somática e sementes sintéticas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Eds.). *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Brasília: Embrapa/CBAB, v.2. p.537-548, 1999.
- GUILLON, S. et al. Harnessing the potential of hairy roots: dawn of a new era. *Trends in Biotechnology*, [S.l.], v. 24, p. 403-409, 2006.
- GUIMARÃES, P. M. et al. Análise in silico da expressão gênica diferencial de *Arachis sternosperma* inoculado com *Meloidogyne arenaria*. *Boletim de Pesquisa & Desenvolvimento*, Brasília, v. 85, p. 25, 2005.

HALLIWELL, B. How to characterise a biological antioxidant. *Free Radical Research*, [S.l.], v. 9, p. 1–32, 1990.

HAMBURGER, M.; HOSTETTMANN, K. Bioactivity in plants: the link between phytochemistry and medicine. *Phytochemistry*, [S.l.], v. 30, p. 3864-3874, 1991.

INGHAM, J. L. 3,5,4-Trihydroxystilbene as a phytoalexin from ground nuts (*A. hypogaea*). *Phytochemistry*, [S.l.], v. 15, p. 1791-1793, 1976.

JEONG, G. T.; PARK, D. H. Enhanced secondary metabolite biosynthesis by elicitation in transformed plant root system: effect of abiotic elicitors. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, [S.l.], p. 436–446, 2006.

JOHNSON, B. B.; PITTMAN, R. N. Factors affecting in vitro differentiation of explants from mature leaves of *Arachis villosulicarpa* Hoehne. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, [S.l.], v. 22, p. 713–715, 1986.

JORGE, J. M. Resistência de genótipos de amendoim (*Arachis hypogaea* L.) ao ataque de *Enneothrips flavens*. 1993. 55 f. Monografia (Graduação em Agronomia) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 1993.

KIM, J. S.; LEE, S. Y.; PARK, S. U. Resveratrol production in hairy root culture of peanut, *Arachis hypogaea* L. transformed with different *Agrobacterium rhizogenes* strains. *African Journal of Biotechnology*, [S.l.], v. 7, p. 3788-3790, 2008.

KNEKT, P. et al. Flavonoid intake and risk of chronic diseases. *The American Journal of Clinical Nutrition September*, [S.l.], v. 76, no. 3, p. 560-568, 2002.

KRIS-ETHERTON, P. M. et al. Bioactive compounds in foods: Their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. *American Journal of Medicine*, [S.l.], v. 113, no. 9B, p. 71S-88S, 2002.

KU, K. et al. Production of stilbenoids from the callus of *Arachis hypogaea*: a novel source of the anticancer compound piceatannol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, [S.l.], v. 53, p. 3877-3881, 2005.

LEAL-BERTIOLI, S. C. et al. Amendoim selvagem: uma fonte de resistência a pragas. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, Brasília, n. 31, p. 116-119, 2003.

\_\_\_\_\_. *Busca de resistência ao nematóide das galhas *Meloidogyne* spp. e seqüências análogas a genes de resistência em acessos silvestres de *Arachis**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2000. 17 p. (Boletim de Pesquisa, 20).

LEE, J. H. et al. Identification of phenolic compounds and antioxidant effects from the exudates of germinating peanut (*Arachis hypogaea*). *Food Science and Biotechnology*, [S.l.], v. 16, p. 29-36, 2007.

LINDSAY, F. Chronic Sequelae of Foodborne Disease. *EID*, [S.l.], v. 3, no. 4, p. 1-12, 1997. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/ncidod/eid/vol3no4/lindsay.htm>>. Acesso em: 17 ago. 2010.

LITTLE, E. L.; MAGBANUA, Z. V.; PARROTT, W. A. A protocol for repetitive somatic embryogenesis from mature peanut epicotyls. *Plant Cell Reports*, [S.l.], v. 19, p. 351-357, 2000.

LIU, R. H. Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism and action. *Journal of Nutrition Supplement*, [S.l.], p. 3479S-3485S, 2004.

MANSUR, E. et al. *In vitro* regeneration of *Arachis villosulicarpa* Hoehne from cotyledon segments, leaves and cell suspension. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, [S.l.], v. 28, p. 1143–1146, 1993.

MAYOR, J. F. et al. Analysis of the variability in collected peanut (*Arachis hypogaea* L.) cultivars for the establishment of core collections. *Plant Genetic Resources Newsletter*, [S.l.], no. 137, p. 9-13, 2004.

MCKENTLY, A. H.; MOORE, G. A.; GARDNER, F. P. Regeneration of peanut and perennial peanut from cultivated leaf tissue. *Crop Science*, [S.l.], v. 31, p. 833–837, 1991.

MEDEIROS, A. R. M. Alelopatia. *Horti Sul*, [S.l.], v. 1, n. 3, p. 27-32, 1990.

MEDINA-BOLIVAR, F. et al. Production and secretion of resveratrol in hairy root cultures of peanut. *Phytochemistry*, [S.l.], v. 68, p. 1992-2003, 2007.

MISHRA, B. N.; RANJAN, R. Growth of hairy-root cultures in various bioreactors for the production of secondary metabolites, *Biotechnology and Applied Biochemistry*, [S.l.], v. 49, p. 1–10, 2008.

MOREIRA, A. V. B. *Avaliação da atividade antioxidante de sementes de mostarda (Brassica alba L.)*. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Departamento de Nutrição, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1999.

MROGINSKI, E. et al. Thidiazuron promotes *in vitro* plant regeneration of *Arachis correntina* (*Leguminosae*) via organogenesis. *Journal of Plant Growth Regulation*, [S.l.], v. 23, p. 129–134, 2004.

MULABAGAL, V.; TSAY, H. S. Plant Cell Cultures: An Alternative and Efficient Source for the Production of Biologically Important Secondary Metabolites. *International Journal of Applied Science and Engineering*, [S.l.], v. 2, no. 1, p. 29-48, 2004.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum.*, [S.l.], v. 15, p. 473-497, 1962.

NAGAI, T.; YUKIMOTO, T. Preparation and functional properties of beverages made from sea algae. *Food Chemistry*, [S.l.], v. 81, p. 327–332, 2003.

NAMIKI, M. Antioxidants/antimutagens in foods. *Critical Review in Food Science and Nutrition*, [S.l.], v. 29, p. 273-291, 1990.

NATELLA, F. et al. Benzoic and cinnamic acid derivatives as antioxidants: structure–activity relation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, [S.l.], v. 47, no. 4, p. 1453–1459, 1999.

NEPOTE, V.; GROSSO, N. R.; GUZMAN, C. A. Extraction of antioxidant components from peanut skins. *Grasas y Aceites*, [S.l.], v. 53, n. 4, p. 391-395, 2002.

OHR, L. M. Fats for healthy living. *Food Technology*, [S.l.], v. 57, no. 7, p. 91-96, 2003.

OKADA, A., SHIMIZU, T., OKADA, K., KUZUYAMA, T., KOGA, J., SHIBUYA, N., NOJIRI, H. AND YAMANE, H. Elicitor induced activation of the methylerythritol phosphate pathway toward phytoalexins biosynthesis in rice. *Plant Molecular Biology*, v. 65, p.177–187, 2007.

ONO, K.; HIROHATA, M.; YAMADA, M. Ferulic acid destabilizes preformed b-amyloidi fibrils *in vitro*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, [S.l.], v. 336, p. 444-449, 2005.

PACHECO, G. et al. *In vitro* regeneration and conservation of wild species of *Arachis*. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, [S.l.], v. 82, p. 311–315, 2007a.

\_\_\_\_\_. Micropropagation and *in vitro* conservation of wild *Arachis* species. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, [S.l.], v. 99, p. 239-249, 2009.

\_\_\_\_\_. Plant regeneration in *Arachis stenosperma* Krapov. and W.C. Gregory from roots and calluses derived from leaflets of *in vitro* plants. *In vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, [S.l.], v. 44, p. 14–17, 2008.

\_\_\_\_\_. The role of BAP in somatic embryogenesis induction from seed explants of *Arachis* species from Section *Erectoides* and *Procumbentes*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, [S.l.], v. 88, n. 2, p. 121-126, 2007b.

PEREIRA, A. M. S. *Cultura De Tecidos de Plantas Mediciniais*. São Paulo: UNAERP. Unidade de Biotecnologia Vegetal, 2010. Disponível em: <<http://www.ufmt.br/etnoplan/artigos/Culturadetecidosdeplantasmediciniais.pdf>>. Acesso em: 24 nov. 2010.

PEREZ, N. B.; NABINGER, C.; MARASCHIN, G. E. Desenvolvimento, lançamento e adoção de uma cultivar de amendoim forrageiro – *Arachis pintoii*, Krapovickas & Gregory - para o sul do Brasil. In: SIMPÓSIO DE RECURSOS GENÉTICOS PARA A AMÉRICA LATINA E CARIBE, 3., 2001, Londrina. *Anais...* Londrina: Instituto Agrônômico do Paraná (IAPAR), 2001. p. 90-93.

PIGNATELLI, P. et al. The flavonoids quercetin and catechin synergistically inhibit platelet function by antagonizing the intracellular production of hydrogen peroxide. *The American Journal of Clinical Nutrition*, [S.l.], v. 72, p. 1150-1155, 2000.

PITTMAN, R. N. et al. In vitro culture of immature peanut (*Arachis spp.*) leaves: Morphogenesis and plantlet regeneration. *Peanut Science*, [S.l.], v. 10, p. 21–25, 1983.

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

PRADO, G.; OLIVEIRA, M. S. Comparação entre Elisa e cromatografia em camada delgada na quantificação de aflatoxinas em amendoim. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, [S.l.], v. 58, n. 2, p. 99-104, 1999.

RAHMAN, A. et al. Strand scission in DNA induced by dietary flavonoids: role of Cu(I) and oxygen free radicals and biological consequences of scission. *Molecular and Cellular Biochemistry*, [S.l.], v. 111, no. 1-2, p. 3–9, 1992.

RAMACHANDRA RAO, S.; RAVISHANKAR, G. A. Vanilla flavour: production by conventional and biotechnological routes. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, [S.l.], v. 80, no. 3, p. 289–304, 2000.

RANI, A. S.; REDDY, G. M. Multiple shoot regeneration from deembryonated cotyledons of cultivated and wild species of *Arachis*. *Journal of Genetics and Breeding*, [S.l.], v. 50, p. 351–355, 1996.

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

RESURRECCION, A. V. A. et al. Peanuts: Bioactive food in a shell. *Food Technology*, Chicago, v. 63, no. 12, p. 30-36, 2009.

REY, H. Y. et al. Plant regeneration in *Arachis pintoi* (Leguminosae) through leaf culture. *Plant Cell Reports*, [S.l.], v. 19, p. 856–862, 2000.

REY, H. Y.; MROGINSKI, L. A. Somatic embryogenesis and plant regeneration in diploid and triploid *Arachis pintoi*. *Biology of Plants*, [S.l.], v. 50, p. 152–155, 2006.

\_\_\_\_\_. Cryopreservation of *Arachis pintoi* (Leguminosae) seeds. *International Seed Testing Association, Seed Science and Technology*, [S.l.], v. 37, no. 1, p. 202-205, 2009.

RIOS, M. Amendoim ganha espaço na rotação com a cana. *Jornal Cana*, Adamantina, SP, p. 63, 2010. Disponível em: <<http://www.jornalcana.com.br/pdf/201/%5Cproducao.pdf>>. Acesso em: 16 out. 2010.

ROCHA, M. B.; BARBOSA, M. Z. Aspectos econômicos da cultura de amendoim. *Agricultura em São Paulo*, [S.I.], v. 37, n. 2, p. 101-166, 1990.

ROSSETTO, C. A. V.; SILVA, O. F.; ARAUJO, A. E. S. Influência da calagem, da época de colheita e da secagem na incidência de fungos e aflatoxinas em grãos de amendoim armazenados. *Ciência Rural*, [S.I.], v. 35, n. 2, p. 309-315, 2005.

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

RUFINO, M. S. M. et al. *Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre ABTS*. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2007. (Comunicado Técnico, 128).

RUIZ-MAY, E.; GALAZ-ÁVALOS, R. M.; LOYOLA-VARGAS, V. M. Differential Secretion and Accumulation of Terpene Indole Alkaloids in Hairy Roots of *Catharanthus roseus* Treated with Methyl Jasmonate. *Molecular Biotechnology*, [S.I.], v. 41, no. 3, p. 278-285, 2009.

SABINO, M. et al. A survey of the occurrence of aflatoxins in groundnuts (peanuts) and groundnut products in São Paulo State/Brazil in 1994. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, [S.I.], v. 58, no. 1, p. 53-7, 1999.

SAIKO, P. et al. Resveratrol and its analogs: Defense against cancer, coronary disease and neurodegenerative maladies or just a fad? *Mutation Research Review*, [S.I.], v. 658, p. 68-94, 2008.

SALES, J. M.; RESURRECCION, A. V. A. Maximising resveratrol and piceid content in UV and ultrasound-treated peanuts. *Food Chemistry*, [S.I.], v. 117, p. 674-680, 2009.

SAMARTH, R. M. et al. Evaluation of antioxidant and radicalscavenging activities of certain radioprotective plant extracts. *Food Chemistry*, [S.I.], v.106, p. 868-873, 2008.

SANTANA, I. G. et al. Determinação do perfil cromatográfico de extratos secos vegetais. *Revista Eletrônica de Farmácia*, [S.I.], v. 4, n. 2, p. 54-57, 2007.

SCHÖPPNER, A.; KINDL, H. Purification and properties of a stilbene synthase from induced cell suspension cultures of peanut. *The Journal of Biological Chemistry*, [S.I.], v. 259, p. 6806-6811, 1984.

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

SHUKLA, S. et al. Antioxidant activity and total phenolic content of ethanolic extract of *Caesalpinia bonducella* seeds. *Food and Chemical Toxicology*, [S.I.], v. 47, p. 1848-185, 2009.

SHUNDO, L.; SILVA, R. A; SABINO, M. Ocorrência de aflatoxinas em amendoim e produtos de amendoim comercializados na região de Marília-SP, Brasil no período de 1999-2001. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, [S.l.], v. 62, n. 3, p. 177-181, 2003.

SILVA, C. R. et al. Assessment of antimutagenic and genotoxic potential of senna (*Cassia angustifolia* Vahl.) aqueous extract using *in vitro* assays. *Toxicology in vitro*, [S.l.], v. 22, p. 212-218, 2008.

SILVA, I. Duarte et al. Chemical features of flavonols affecting their genotoxicity. Potential implications in their use as therapeutical agents. *Chemico-Biological interactions*, [S.l.], v. 124, p. 29-51, 2000.

\_\_\_\_\_. Involvement of rat cytochrome1 A1 in the biotransformation of kaempferol to quercetin: relevance to the genotoxicity of kaempferol. *Mutagenesis*, [S.l.], v. 12, p. 383-390, 1997.

\_\_\_\_\_. Mechanisms of myricetin mutagenicity in V79 cells: Involvement of radicalar species. *Teratogenesis, Carcinogenesis and Mutagenesis*, [S.l.], v. 16, p. 253-268, 1996.

SILVA, M. P. Amendoim forrageiro - *Arachis pintoi*. *Fauna e Flora do Cerrado*, Campo Grande, nov. 2004. Disponível em: <<http://www.cnpqc.embrapa.br/~rodiney/series/arachis/arachis.htm>>. Acesso em: 28 jan. 2010.

SKIBOLA, C. F.; SMITH, M. T. Potential health impacts of excessive flavonoid intake. *Free Radical Biology and Medicine*, [S.l.], v. 29, no. 3-4, p. 375-383, 2000.

SMARTT, J.; STALKER, H. T. Speciation and cytogenetics of *Arachis*. In: PATTEE, H. E.; YOUNG, C. T. (Ed.). *Peanut Science and Technology*. [S.l.: s.n.], 1982. Cap 2, p. 21-49.

SOBOLEV, V. S. et al. Isolation, Purification, and Liquid Chromatographic Determination of Stilbene Phytoalexins in Peanuts. *Journal of AOAC International*, [S.l.], v. 78, p. 1177-1182, 1995.

SOBOLEV, V. S.; DEYRUP, S. T.; GLOER, J. B. New peanut (*Arachis hypogaea*) phytoalexin with prenylated benzenoid and but-2-enolide moieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, [S.l.], v. 54, p. 2111-2115, 2006.

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

SOLEAS, G. J.; DIAMANDIS, E. P.; GOLDBERG, D. M. Resveratrol, a molecule whose time has come? and gone?. *Clinical Biochemistry*, [S.l.], v. 30, no. 2, p. 91-113, 1997.

- SOUZA, W. R. Estudo do efeito elicitor do ácido salicílico e do polissacarídeo extraído de sementes de paineira (*Chorisia speciosa*) em cultura de células de amora-preta (*Rubus fruticosus*). 2005, 97 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas- Fármacos e Medicamentos). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2005.
- SRIVASTAVA, S.; SRIVASTAVA, A. K. Hairy root culture for mass-production of high-value secondary metabolites. *Critical Reviews in Biotechnology*, [S.l.], v. 27, p. 29-43, 2007.
- STALKER, H. T. Peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Field Crops Research*, [S.l.], v. 53, p. 205-217, 1997.
- SUBBARAMAIAH, K. et al. Resveratrol inhibits cyclooxygenase-2 transcription and activity in phorbol ester-treated human mammary epithelial cells. *The Journal of Biological Chemistry*, [S.l.], v. 273, p. 21875-21882, 1998.
- TIWARI, S.; TULI, R. Multiple shoot regeneration in seed-derived immature leaflet explants of peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Scientia Horticulturae*, [S.l.], v. 121, no. 2, p. 223-227, 2009.
- UNITED STATE FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. *Aflatoxins: Bad Bug Book*. [S.l.], 2009. Disponível em: <<http://www.cfsan.fda.gov/~mow/chap41.html>>. Acesso em: 8 jun. 2010.
- UNITED STATE DEPARTMENT OF AGRICULTURE. *Agricultural Research Service*. [S.l.], 2010. Disponível em: <<http://www.ars.usda.gov/nutrientdata>>. Acesso em: 21 ago. 2010.
- VACCARI, N. F. S.; SOCCOL, M. C. H.; IDE, G. M. Compostos fenólicos em vinhos e seus efeitos antioxidantes na prevenção de doenças. *Revista de Ciências Agroveterinárias*, [S.l.], v. 8, n. 1, p. 71-83, 2009.
- VALENTÃO, P. et al. Antioxidative properties of cardoon (*Cynara cardunculus* L.) infusion against superoxide radical, hydroxyl radical and hypochlorous acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, [S.l.], v. 50, p. 4989-4993, 2002.
- VALLS, J. F. M. Diversidade genética no gênero *Arachis* e a origem do amendoim. In: ENCONTRO SOBRE TEMAS DE GENÉTICA E MELHORAMENTO, 17., 2000, Piracicaba. *Anais...* Piracicaba: [s.n.], 2000. p. 19-33. Disponível em: <<http://www.genetica.esalq.usp.br/pub/seminar/JFMValls-201002-.Resumo.pdf>>. Acesso em: 14 nov. 2009.
- \_\_\_\_\_. O gênero *Arachis* L. (Leguminosae): importante fonte de proteínas na pré-história sul-americana? In: REUNIÃO DA SOCIEDADE DE ARQUEOLOGIA BRASILEIRA, 8., 1996. *Anais...* [S.l.: s.n.], 1996.
- VEIGA, R. F. A. et al. Wild *Arachis* for ornamental use. *Revista Brasileira Horticultura Ornamental*, [S.l.], v. 9, p. 7-15, 2003.

VERPOORTE, R.; MARASCHIN, M. Engenharia do metabolismo de plantas medicinais. In: Yunes R. A., Calixto J.B. (org.) Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna. Chapecó, Brasil: Argos, p.381-432, 2001.

VICENTINI, M. S. et al. Quantificação de compostos bioativos e atividade antioxidante da película residual de amendoim (*Arachis hypogaea L.*). In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO AGROPECUÁRIA CIÊNCIA E TECNOLOGIA AGROINDUSTRIAL, 18., 2010, Piracicaba, SP. *Anais...* São Paulo: USP, 2010. p. 1862.

VIDOZ, M. L. et al. *In vitro* plant regeneration of *Arachis correntina* (Leguminosae) through somatic embryogenesis and organogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, [S.I.], v. 86, p. 111–115, 2006.

\_\_\_\_\_. Somatic embryogenesis and plant regeneration through leaf culture in *Arachis glabrata* (Leguminosae). *Acta Physiologiae Plantarum*, [S.I.], v. 26, p. 59–66, 2004.

VON HOLTZ, R. L.; FINK C. S.; AWAD, A. B. -sitosterol activates the sphingomyelin cycle and induces apoptosis in LNCaP human prostate cancer cells. *Nutrition and Cancer*, [S.I.], v. 32, p. 8-12, 1998.

WAGNER, H.; BLADT, S. *Plant Drug Analysis, A Thin-Layer Chromatography Atlas*. 2nd. ed. Berlin: Springer, 1995.

WANG, G.; ALAMURI, P.; MAIER, R. J. The diverse antioxidant systems of *Helicobacter pylori*. *Molecular Microbiology*, [S.I.], v. 61, p. 847-860, 2006.

WANG, M. L.; PITTMAN, R. N. Resveratrol content in seeds of peanut germplasm quantified by HPLC. *Plant Genetic Resources: Characterization and Utilization*, [S.I.], v. 7, no. 1, p. 80–83, 2008.

WEISBURGER, J. H. et al. Tea Polyphenols as Inhibitors of Mutagenicity of Major Classes of Carcinogens. *Mutation Research*, [S.I.], v. 371, p. 57-63, 1996.

WINK, M. et al. Sustainable bioproduction of phytochemicals by plant *in vitro* cultures: anticancer agents. *Plant Genetic Resources: Characterization and Utilization*, [S.I.], v. 3, p. 90-100, 2005.

WU, Y.; SHI, M. Ultrahigh diterpenoid tanshinone production through repeated osmotic stress and elicitor stimulation in fed-batch culture of *Salvia miltiorrhiza* hairy roots. *Applied Microbiology and Biotechnology*, [S.I.], v. 78, p. 441–448, 2008.

YANG, C. S. et al. Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. *Annual Review of Nutrition*, [S.I.], v. 21, p. 381-406, 2001.

YEN, C. G.; DUH, P. D. Antioxidant activity of methanolic extracts of peanut hulls from various cultivars. *Journal of American Oil Chemists' Society*, [S.I.], v. 72, p. 1065-1067, 1995.

YEN, G. C.; HSIEH, C. L. Inhibitory effects of Du-zhong (*Eucommia ulmoides* Oliv.) against lowdensity lipoprotein oxidative modification. *Food Chemistry*, [S.l.], v. 77, p. 449-456, 2002.

YOSHINO, M. et al. Prooxidant Activity of Flavonoids: Copper-Dependent Strand Breaks and the Formation of 8-Hydroxy-2'-Deoxyguanosine in DNA. *Molecular Genetics and Metabolism*, [S.l.], v. 68, p. 468-472, 1999.

ZAICOVSKI, C. B. et al. Resveratrol na qualidade pós-colheita de morangos "camarosa". *Revista Brasileira de Agrociência*, [S.l.], v. 12, no. 4, p. 443-446, 2006.

ZHANG, H. C. et al. Enhanced flavonoid production in hairy root cultures of *Glycyrrhiza uralensis* Fisch by combining the over-expression of chalcone isomerase gene with the elicitation treatment. *Plant Cell Reports*, [S.l.], v. 28, p. 1205–1213, 2009.