



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Leonardo de Carvalho Garcia

Cultura de tecidos e análise fitoquímica de *Arachis repens* HANDRO

Rio de Janeiro

2012

Leonardo de Carvalho Garcia

Cultura de tecidos e análise fitoquímica de *Arachis repens* HANDRO.

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.

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

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

Rio de Janeiro

2012

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

G2016 Garcia, Leonardo de Carvalho.
Cultura de tecidos e análise fitoquímica de *Arachis repens* HANDRO
/ Leonardo de Carvalho Garcia. – 2012.
74f.: il.

Orientadora: Elisabeth Atalla Mansur de Oliveira.
Coorientadora: Georgia Pacheco Peters de Almeida
Dissertação (Mestrado) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro.
Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes.
Inclui bibliografia.

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

CDU 633.852.52

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

Assinatura

Data

Leonardo de Carvalho Garcia

Cultura de tecidos e análise fitoquímica de *Arachis repens* HANDRO.

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 08 de fevereiro de 2012.

Banca Examinadora:

Prof^ª. Dra. Elisabeth Atalla Mansur de Oliveira (Orientadora)
Departamento de Biologia Vegetal - IBRAG/UERJ

Prof^ª. Dra. Georgia Pacheco Peters de Almeida (Coorientadora)
Departamento de Biologia Vegetal - IBRAG/UERJ

Prof. Dr. Celso Luiz Salgueiro Lage
Instituto Nacional da Propriedade Industrial – INPI

Prof^ª. Dra. Maite Vaslin de Freitas Silva
Departamento de Virologia - UFRJ

Prof. Dr. Marcelo Manzi
Departamento de Biologia Vegetal - IBRAG/UERJ

Rio de Janeiro

2012

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Nilson e Sonia, pelo exemplo de honestidade, dedicação, amor e fé.

Ao meu filho Artur, pelo amor e pelo companheirismo.

AGRADECIMENTOS

À Deus pela força em todos os momentos da minha vida.

Aos meus pais, Nilson † e Sonia †, que sempre me incentivaram a estudar e auxiliaram nas conquistas dos meus sonhos. Com certeza esses dois continuam olhando por mim e me auxiliando sempre que solicito seus conselhos.

Ao meu filho Artur M. R. Garcia, que inúmeras vezes precisou ser compreensivo por não poder ofertar a atenção desejada e pelo companheirismo nos momentos de lazer.

À Prof^a Dr^a Elisabeth Atalla Mansur de Oliveira, por ter aceitado orientar este trabalho, pela confiança, dedicação, paciência e por ter me ensinado muito sobre o que é ser um mestrando.

À Prof^a Dr^a Georgia Pacheco, pela co-orientação, pelo carinho, auxílio, dedicação, sugestões, conselhos e principalmente pela amizade.

À Prof^a Dr^a Rachel Gagliardi, pela amizade, carinho e pelos inúmeros conselhos durante a realização deste trabalho.

A todos os professores da Pós-Graduação que auxiliaram na construção do meu conhecimento durante a realização do curso.

À Engenheira Química Emely, pela realização dos cromatogramas e pelas orientações e conselhos.

Ao Programa de Pós-graduação em Biologia Vegetal (PPGBV) da UERJ pela possibilidade de realização deste trabalho e evolução do meu conhecimento acadêmico.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de mestrado.

À Dr^a Renata Garcia, acima de tudo amiga e companheira nas horas difíceis, pela dedicação, orientação e acima de tudo pelos momentos de descontração nas horas vagas do laboratório.

Ao doutorando Thiago Saide, pelos ensinamentos e incentivos ofertados.

À minha amiga Simone Araújo, pelas horas de “lazer” tanto no laboratório quanto no “Planalto do Chopp” (“Loreninha” para os mais íntimos), sempre proporcionando momentos de felicidades.

À minha amiga Bianka Soares (com KKKKKK, muitos K’s para que ninguém confunda, ela odeia que escrevam o nome dela errado), pelas conversas e conselhos, além dos momentos de descontração durante os dias de trabalho, pelas idas e vindas ao “Planalto do Chopp” (“Loreninha”).

Ao amigo e companheiro de mestrado Gabriel Casimiro (leke, “Pet”, garoto, juvenil, liso, etc), pelos momentos de muito estudo e também de diversão, afinal ninguém é de ferro, apesar de ser “juvenil” é um bom “garoto”, por partilhar novos conhecimentos e no auxílio do desenvolvimento das técnicas realizadas durante o decorrer do trabalho dentro e fora do laboratório.

Aos amigos e companheiros Paulo Araújo (Crioulo) e Raphael Carpes (Bob), pelas várias horas de muitos estudos realizados no CASAF, pelas contribuições para o desenvolvimento deste trabalho, sempre que necessário eles estavam prontos para ajudar.

A todos os funcionários, mestrandos e IC’s do Núcleo de Biotecnologia Vegetal, pelos momentos de convivência harmônica, pelas alegrias partilhadas e principalmente ao auxílio no desenvolvimento do trabalho, afinal sem os funcionários e os IC’s não existiriam os laboratórios.

Em especial vou agradecer a dois IC’s que contribuíram inigualavelmente para o desenvolvimento do meu trabalho, que foram os alunos Joerg Factorine e a aluna Raphaela Reis, sempre prontos a realizarem as tarefas designadas e as cumprindo com muita destreza e dedicação. Obrigado!

As pessoas podem tirar tudo de você. Mas os seus estudos elas nunca conseguirão arrancar.
Estudar nunca é demais, não ocupa espaço e sempre vale a pena.

Sonia de Carvalho Garcia

RESUMO

GARCIA, Leonardo de Carvalho. **Cultura de tecidos e análise fitoquímica de *Arachis repens* HANDRO**. 2012. 74f. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

Os representantes do gênero *Arachis* são conhecidos como amendoim, e suas sementes possuem grande quantidade de óleos e proteínas, podendo ser consumidas cruas. A espécie mais cultivada do gênero é *Arachis hypogaea*, que possui grande importância comercial. Outras espécies são também utilizadas para controle das ervas daninhas e cobertura do solo, assim como ornamentais e na alimentação. *Arachis repens*, popularmente conhecida como grama amendoim, é utilizada como planta ornamental, na formação de pastagens, como forragem e para cobertura do solo em substituição a várias espécies comuns de grama. Diversas substâncias bioativas têm sido identificadas em *A. hypogaea*. Contudo, estas substâncias ainda não foram descritas em outras espécies do gênero. O objetivo deste trabalho foi o estabelecimento de sistemas de cultivo *in vitro* para *Arachis repens*, visando à micropropagação e à análise comparativa da produção de resveratrol em extratos alcoólicos dos materiais produzidos *in vitro*, em comparação com as plantas *in vivo*. Segmentos nodais, internodais e foliares foram excisados de plantas *in vitro* e inoculados em meio MS suplementado com diferentes concentrações de BAP, TDZ, AIA e KIN, utilizados isoladamente ou em combinação. Os explantes apresentaram respostas distintas de acordo com o regulador de crescimento utilizado. Na presença de BAP foi observada a formação de calos compactos, com formação de brotos em diferentes taxas. Na presença de TDZ, segmentos nodais e internodais formaram calos compactos em todas as concentrações. Segmentos nodais cultivados na presença de diferentes concentrações de AIA em combinação com KIN apresentaram a formação de calogênese. Foi também realizada uma avaliação da atividade antioxidante e a presença de fenóis totais em extratos de diferentes materiais *in vivo* e produzidos *in vitro*. Nas análises por meio de CLAE, foi possível detectar a presença de resveratrol tanto nos materiais *in vivo*, quanto os produzidos *in vitro*. Dessa forma, o trabalho forneceu resultados preliminares sobre as possibilidades de utilização de *A. repens* para a produção de metabólitos especiais.

Palavras-chave: *Arachis repens*. Atividade antioxidante. Fenóis totais. Resveratrol.

ABSTRACT

Arachis species are known as groundnut and their seeds display high oil and protein contents, being consumed *in natura*. The most common commercially cultivated species of the genus is *Arachis hypogaea*. Other *Arachis* species can also be used as food, ornamental, ground cover and provide weed control. *Arachis repens*, commonly known as *grama amendoim*, is used as an ornamental, forage legume and ground cover in substitution of common grass species. Different bioactive substances have been identified in *A. hypogaea*. However, these substances have not been described in other species of the genus. The goal of this work was the establishment of *in vitro* culture for *Arachis repens*, aiming at the micropropagation and the comparative analysis of the resveratrol production in ethanolic extracts of the *in vitro* produced material, in comparison to *in vivo* plants. Nodal, internodal and leaf segments were excised from *in vitro* plants and inoculated on MS medium supplemented with different concentrations of BAP, TDZ, IAA and KIN, used alone or in combination. Explants showed distinct responses in according to the growth regulator used. In the presence of BAP, compact calluses were formed, with the production of shoots in different frequencies. In the presence of TDZ, nodal and internodal segments formed compact calluses in response to all concentrations. Nodal segments cultivated in the presence of different IAA concentrations in combination with KIN showed callogenesis. The evaluation of antioxidant activity and the presence of total phenolics in extracts of different *in vivo* and *in vitro* materials was also evaluated. The HPLC analysis detected the presence of resveratrol in the materials produced *in vivo* and *in vitro*. Therefore, this work provided preliminary results about the possible use of *A. repens* for the production of special metabolites.

Keywords : *Arachis repens*. Antioxidant activity. Total phenolics. Resveratrol.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Área de ocorrência natural das espécies do gênero <i>Arachis</i>	17
Figura 2 -	<i>Arachis repens</i>	18
Figura 3 -	Etapas da cultura de tecidos.....	23
Figura 4 -	Curva padrão de resveratrol.....	31
Figura 5 -	Curva padrão de DPPH.....	33
Figura 6 -	Curva padrão do ácido gálico.....	34
Figura 7 -	Morfogênese <i>in vitro</i> a partir de explantes de <i>A. repens</i> inoculados em meio MS suplementados com BAP.....	38
Figura 8 -	Calogênese a partir de explantes de <i>A. repens</i> inoculados em meio MS suplementado com PIC combinado com BAP.....	41
Figura 9 -	Morfogênese <i>in vitro</i> a partir de explantes <i>A. repens</i> inoculados em meio MS suplementado com TDZ.....	43
Figura 10 -	Acúmulo de biomassa (g) de calos compactos de <i>A. repens</i> provenientes de segmentos internodais.....	45
Figura 11 -	Acúmulo de biomassa (g) de calos compactos de <i>A. repens</i> provenientes de segmentos nodais.....	46
Figura 12 -	Morfogênese <i>in vitro</i> a partir de explantes de <i>A. repens</i> inoculados em meio MS suplementado com diferentes concentrações de AIA em combinação com KIN.....	48
Figura 13 -	Avaliação da atividade antioxidante de <i>A. repens</i>	50
Figura 14 -	Avaliação da atividade antioxidante de extratos de segmentos nodais de <i>A. repens</i>	51
Figura 15 -	Avaliação da atividade antioxidante de extratos de segmentos nodais de <i>A. repens</i> em inoculados em diferentes concentrações de TDZ a temperatura.....	51
Figura 16 -	Avaliação da atividade antioxidante de extratos calos provenientes de explantes internodais de <i>A. repens</i>	51
Figura 17 -	Avaliação da atividade antioxidante de extratos calos provenientes de explantes internodais de <i>A. repens</i>	52

Figura 18 -	Curva de dose-resposta relativa ao decréscimo da porcentagem remanescente de DPPH.....	53
Figura 19 -	Cromatograma de CLAE de <i>A. repens</i>	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Regeneração a partir de segmentos caulinares de <i>A. repens</i> após diferentes tratamentos de descontaminação.....	36
Tabela 2 -	Morfogênese <i>in vitro</i> a partir de segmentos nodais e internodais em meio MS suplementado com diferentes concentrações de BAP.....	39
Tabela 3 -	Morfogênese <i>in vitro</i> a partir de segmentos nodais, internodais e de folíolos de <i>A. repens</i> em meio MS suplementado com diferentes concentrações de PIC combinadas com BAP a 4,4µM.....	42
Tabela 4 -	Morfogênese <i>in vitro</i> a partir de segmentos nodais e internodais de <i>A. repens</i> em meio suplementado com diferentes concentrações de TDZ.....	44
Tabela 5 -	Morfogênese <i>in vitro</i> a partir de segmentos nodais e internodais de <i>A. repens</i> cultivados em meio suplementado com KIN a 2,3 µM em associação com diferentes concentrações de AIA.....	49
Tabela 6 -	Conteúdo de fenóis totais em extratos metanólicos de calos de <i>A. repens</i> provenientes de segmentos nodais e internodais cultivados em resposta a diferentes concentrações de TDZ, em duas diferentes temperaturas.....	54
Tabela 7 -	Conteúdo de fenóis totais em extratos metanólicos de <i>A. repens</i> provenientes de segmentos nodais e internodais cultivados <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	55
Tabela 8 -	Concentração de resveratrol em extratos metanólicos de calos de <i>A. repens</i> , provenientes de segmentos nodais e internodais cultivados em diferentes concentrações de TDZ, incubados em duas diferentes temperaturas.....	56
Tabela 9 -	Concentração de resveratrol obtida em extratos de folíolos, raízes e de segmentos caulinares de plantas mantidas <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	57

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	Atividade antioxidante
Abs	Absorvância
ACN	acetonitrila
AIA	ácido indolacético
ANA	ácido 1-naftaleno acetic
ANOVA	análise de variância
Å	angstrom
BAP	6-benzilaminopurina
BHA	butilhidroxianisol
BHT	butilhidroxitolueno
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DNA	ácido Desoxirribonucleico (<i>Deoxyribonucleic acid</i>)
DPPH	1,1-difenil-2-picrilhidrazil
EAG	Equivalência do Ácido Gálico
G	Gravidade
HgCl ₂	cloreto de mercúrio
HRJ	Herbário do Rio de Janeiro
KIN	cinetina (6-furfurilaminopurina)
LDL	Low-density lipoprotein
MS	meio de cultura Murashige & Skoog
NaOCl	hipoclorito de sódio
PF	peso de matéria fresca
PIC	ácido 4-amino-3,5,6-tricloropicolínico; picloram

PS	peso de matéria seca
rpm	rotação por minuto
TDZ	tidiazuron
TBHQ	terc-butilhidroxiquinona
UV	ultravioleta

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	15
1	O GÊNERO <i>ARACHIS</i>	16
1.1	Produção de substâncias bioativas em <i>Arachis</i>	18
1.2	Cultura de tecidos de vegetais	22
1.3	Cultura de tecidos de espécies do gênero <i>Arachis</i>	24
2	OBJETIVOS	27
2.1	Objetivo geral	27
2.2	Objetivos específicos	27
3	METODOLOGIA	28
3.1	Material vegetal e condições de cultura	28
3.2	Descontaminação	28
3.3	Morfogênese <i>in vitro</i>	29
3.4	Preparo e análise de extratos	29
3.4.1	<u>Análise dos extratos por CLAE</u>	30
3.5	Avaliação de atividades biológicas	32
3.5.1	<u>Capacidade de captura do radical DPPH</u>	32
3.5.2	<u>Determinação de fenóis totais</u>	33
3.6	Análise estatística	34
4	RESULTADOS	35
4.1	Estabelecimento de culturas <i>in vitro</i>	35
4.1.1	<u>Descontaminação</u>	35
4.2	Morfogênese <i>in vitro</i>	37
4.2.1	<u>Morfogênese <i>in vitro</i> em resposta a BAP</u>	37
4.2.2	<u>Morfogênese <i>in vitro</i> em resposta a combinações de PIC com BAP</u>	40
4.2.3	<u>Morfogênese <i>in vitro</i> em resposta a TDZ</u>	43
4.2.4	<u>Morfogênese <i>in vitro</i> em resposta a combinações de KIN e AIA</u>	47
4.3	Avaliação de atividades biológicas	50
4.3.1	<u>Atividade antioxidante</u>	50
4.3.2	<u>Determinação de fenóis totais</u>	53
4.4	Análise fitoquímica	55
4.4.1	<u>Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)</u>	55

5	DISCUSSÃO	58
6	CONCLUSÕES	63
	REFERÊNCIAS	65
	ANEXO - Tabela de composição do meio MS.....	74

INTRODUÇÃO

O gênero *Arachis* pertence à família Fabaceae, sendo composto por 81 espécies distribuídas em nove seções taxonômicas (*Arachis*, *Caulorrhizae*, *Erectoides*, *Extranervosae*, *Heteranthae*, *Procumbentes*, *Rhizomatosae*, *Trirectoides* e *Triseminatae*). As espécies silvestres do gênero são restritas à América do Sul, sendo encontradas na Argentina, Brasil, Bolívia, Paraguai e Uruguai (KRAPOVICKAS & GREGORY, 1994). O Brasil abriga a possível área de origem do gênero, na região localizada entre o sudoeste do estado do Mato Grosso do Sul e o Sul de Goiás (VALLS, 2000) (Figura 1). Além disso, as seções *Caulorrhizae*, *Triseminatae*, *Heteranthae* e *Extranervosae* ocorrem somente no país, que possui 64 das 81 espécies do gênero, sendo 47 endêmicas.

1 O GÊNERO *ARACHIS*

Os representantes do gênero são conhecidos como amendoim, e suas sementes possuem grande quantidade de óleos e proteínas, podendo ser consumidas cruas. Estas características fizeram do amendoim uma das espécies mais utilizadas pelo homem pré-histórico, que não dominava as técnicas do fogo necessárias para o cozimento do alimento (KRAPOVICKAS & GREGORY, 1994; VALLS & SIMPSON, 2005). Representantes do gênero foram encontrados em achados arqueológicos com mais de 3.700 anos, indicando que faziam parte da dieta pré-colombiana (HAMMONS, 1994). Os primeiros a cultivarem o amendoim foram os membros da tribo indígena Arawak, que viviam no norte da América do Sul, na época da chegada de Cristóvão Colombo, em 1492 (HOFMAN, 1993).

A espécie mais cultivada do gênero é *A. hypogaea*, que possui grande importância comercial (VALLS & SIMPSON, 2005). Outras espécies são também utilizadas para controle das ervas daninhas e cobertura do solo, assim como ornamentais e na alimentação (STALKER & SIMPSON, 1995; KERRIDGE & HARDY, 1994; VALLS, 2000). Por exemplo, *Arachis villosulicarpa* Hoehne e *A. stenosperma* Krapov. & W.C. Greg., são utilizadas historicamente como alimento por tribos indígenas brasileiras (KRAPOVICKAS *et al.*, 1985; FREITAS, 2004). *Arachis glabrata* Benth. e *Arachis pintoii* Krapov & W.C. Greg. possuem grande valor como plantas forrageiras e para a cobertura de pomares, paisagismo e controle da erosão do solo (VALLS, 2000).

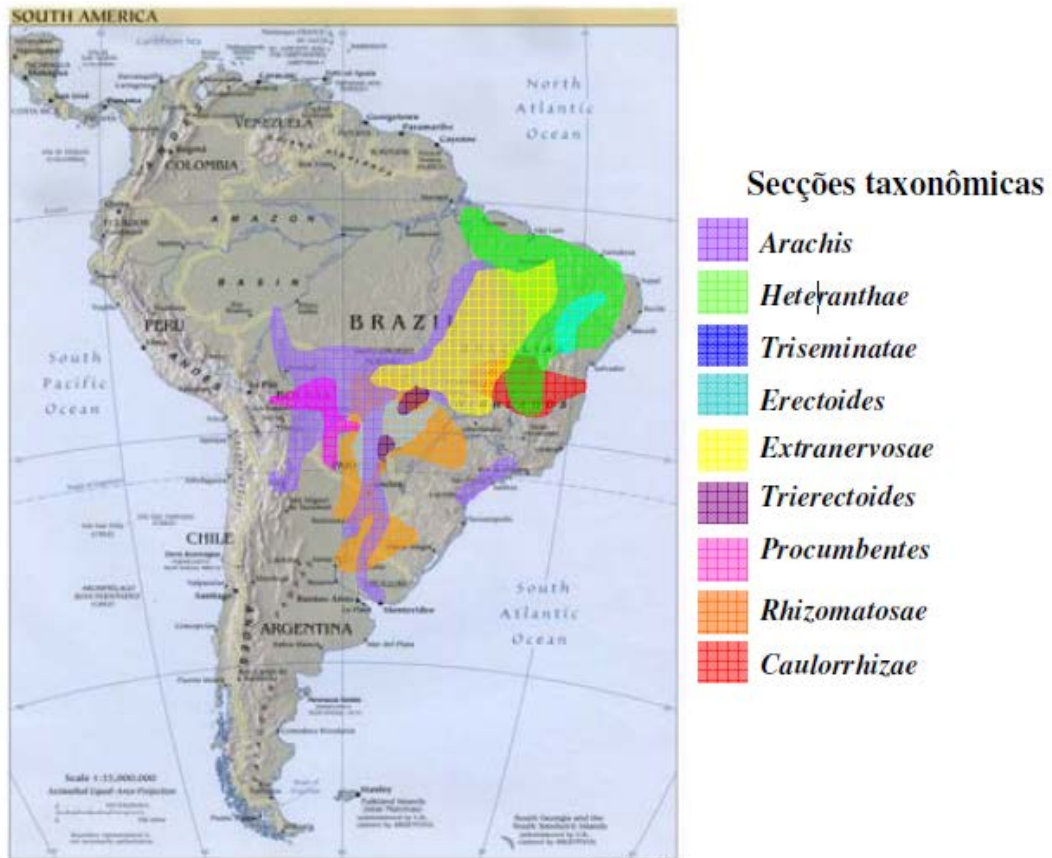


Figura 1 - Área de ocorrência natural das espécies do gênero *Arachis* na América do Sul, com destaque para as seções taxonômicas. Fonte: Adaptado de Krapovickas & Gregory, 1994.

Arachis repens Handro, popularmente conhecida como grama amendoim, é utilizada como planta ornamental, na formação de pastagens, como forragem e para cobertura do solo em substituição a várias espécies comuns de grama. Tem notável efeito decorativo devido à sua coloração verde-escura e formato das folhas, além das suas flores amarelas que surgem no verão. Pode também ser utilizada para revestir taludes íngremes, atuando no controle da erosão do solo, e sua poda é totalmente dispensável (STALKER & SIMPSON, 1995; VALLS, 1996). (Figura 2).



Figura 2- *Arachis repens*.

Foto: Disponível em: < <http://www.flickr.com/photos/mercadanteweb/page25/>>

Acesso em: 07 Out. 2011.

1.1 Produção de substâncias bioativas em *Arachis*

Diversas substâncias bioativas têm sido identificadas em espécies de *Arachis*, como os ácidos fenólicos, derivados dos ácidos cinâmicos e benzóicos. Os ácidos fenólicos estão associados a diferentes processos fisiológicos, como dormência, em atividades enzimáticas e na síntese de proteínas. Além disso, devido ao seu potencial antioxidante, estão relacionados à redução de doenças cardiovasculares (KIM *et al.*, 2006). Os ácidos vanílico (ácido 4-hidroxi-3-metoxibenzóico), ferúlico (ácido 4-hidroxi-3-metoxicinâmico) e 4-hidroxicinâmico isolados a partir dos exsudatos originados da germinação de sementes de *A. hypogaea* possuem efeito hipotensivo, contribuem para a redução dos níveis de glicose, colesterol total e LDL no sangue, além de apresentarem potencial terapêutico na doença de Alzheimer (BALASUBAHINI *et al.*, 2003; ONO *et al.*, 2005; LEE *et al.*, 2007). Além disso, explantes de raízes inoculadas com *Mycorrhizal* e *Rhizobium* em *Arachis hypogaea* apresentaram, além dos ácidos vanílico, protocatecuico, ferúlico e p-cumárico, os ácidos 4-hidroxibenzóico, caféico e os cis-isômeros para ácido ferúlico, p-cumárico, caféico e clorogênico (CHARITHA & REDDY, 2002). No amendoim torrado, os ácidos ferúlico e p-cumárico foram os compostos encontrados em maior abundância. Stevenson *et al.* (1993) descreveram a presença dos ácidos clorogênico, neoclorogênico e 1-cafeoil-4-deoxiquinínico em folhas da espécie silvestre *A. paraguariensis*.

Além dos ácidos fenólicos, diferentes fitoesteróis, incluindo β -sitosterol, campesterol, estigmasterol, α -espinasterol, $\Delta 5$ -avenasterol, $\Delta 7$ -avenasterol, sitostanol e campestanol, já foram isolados de sementes moídas, assim como da manteiga e do óleo de amendoim (PHILLIPS *et al.*, 2005; SHIN *et al.*, 2010). Segundo Ohr (2003) os fitoesteróis funcionam bloqueando a absorção do colesterol ingerido na dieta, prevenindo a aterosclerose. O β -sitosterol possui ação comprovada sobre o câncer de cólon, mama e próstata (AWAD *et al.*, 2007). Composições similares de esteróides foram encontradas em outras espécies de *Arachis* como *A. sylvestris*, *A. pintoii*, *A. chinquitana*, *A. appresipila*, *A. kretschmeri*, *A. matiensis*, *A. trinitensis*, *A. kempff-mercadoi*, *A. diodoi*, *A. benensis*, *A. valida*, *A. helodes*, *A. kuhlmannii*, *A. williamsii*, *A. hoehnei*, *A. villosa*, *A. stenosperma* e *A. fastigiata* (GROSSO *et al.*, 1997; 2000). Nas partes aéreas de *A. hypogaea* foram encontrados β -sitosterol e daucosterol (LIU *et al.*, 2009). Outros fitoesteróis como lofenol, 24-etilofenol, obtusifoliol, 31-norcicloartenol, cicloleucalenol, gramisterol e citrostadienol também foram encontrados em espécie do gênero (GAYDOU *et al.*, 1983).

O amendoim também é rico em terpenos, como cicloartanol, cicloartenol, ciclobranol, 24-etileno-cicloartenol, β -amirina e lupeol (GAYDOU *et al.*, 1983; BANSAL *et al.*, 1993). De um modo geral, os triterpenóides possuem ampla aplicação na medicina, apresentando atividades bactericida, fungicida, antiviral, analgésica, proteção cardiovascular e antitumoral (PATOCKA, 2003). Essas moléculas são sintetizadas pela mesma via metabólica dos esteróides.

Entre as moléculas bioativas já descritas nas espécies de *Arachis*, algumas possuem comprovada ação antioxidante, incluindo os flavonóides e os estilbenos, protegendo os constituintes celulares contra danos oxidativos. O oxigênio molecular e seus derivados possuem grande importância na bioquímica dos radicais livres nas células aeróbicas. As “espécies reativas de oxigênio” (EROs) incluem os radicais livres contendo oxigênio, como o ânion superóxido (O_2^-), o radical hidroxila ($HO\cdot$), o radical peroxila ($ROO\cdot$) e espécies não radicalares, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o oxigênio singleto (1O_2), que são frequentemente gerados como subprodutos de reações biológicas ou por fatores exógenos (ANDRADE *et al.*, 2007). O desequilíbrio entre a formação e a neutralização desses pró-oxidantes leva ao estresse oxidativo, considerado uma das principais causas de doenças, uma vez que os radicais livres buscam a estabilidade através do emparelhamento de elétrons com as macromoléculas biológicas, como proteínas, lipídios e DNA, causando danos ao DNA, juntamente com peroxidação lipídica. Essas injúrias contribuem para inúmeras complicações biológicas, incluindo o desenvolvimento de carcinogêneses, mutagêneses, ateroscleroses,

inflamações crônicas, doenças neurodegenerativas, auto-imunes das glândulas endócrinas e envelhecimento precoce (MAXWELL, 1995; BRACA *et al.*, 2002; ANDRADE *et al.*, 2007).

Algumas substâncias, denominadas antioxidantes, são capazes de retardar ou prevenir significativamente a oxidação de lipídeos ou outras moléculas ao inibirem a iniciação ou a propagação da reação de oxigênio em cadeia (AL-MAMARY *et al.*, 2002; MOREIRA *et al.*, 2002; CHANWITHEESUK *et al.*, 2005; WU *et al.*, 2005; LIMA *et al.*, 2006; ANDRADE *et al.*, 2007), além de prevenirem ou repararem danos ocasionados às células pelas EROs (CHANWITHEESUK *et al.*, 2005). As células humanas possuem um complexo sistema antioxidante contra os danos causados pelos radicais livres, incluindo enzimas e compostos antioxidantes, como o ácido ascórbico e o tocoferol (NIKI *et al.*, 1995; CLARKSON & THOMPSON, 2000). No entanto, quando a produção de radicais livres excede a capacidade de proteção desses sistemas antioxidantes, as defesas celulares tornam-se insuficientes para impedir os estresses oxidativos mais graves e, portanto, podem ocorrer danos teciduais (WANG, 2008).

Atualmente, diversos antioxidantes sintéticos encontram-se disponíveis comercialmente, como butilhidroxianisol (BHA), butilhidroxitolueno (BHT) e terc-butilhidroxiquinona (TBHQ). Contudo, sua utilização é controlada devido aos riscos potenciais à saúde ocasionados por estas substâncias não estarem totalmente elucidados (VALENTÃO *et al.*, 2002).

Uma enorme variedade de moléculas que bloqueiam os efeitos dos radicais livres já foram descritas em plantas, principalmente compostos fenólicos, nitrogenados, vitaminas, terpenos e outros metabólitos endógenos. Assim, diversas espécies vegetais têm sido estudadas com o propósito de avaliar o seu potencial antioxidante, em busca de benefícios para a saúde humana (CAI *et al.*, 2004; SAMARTH *et al.*, 2008). Os compostos fenólicos de plantas estão distribuídos em várias categorias, como fenóis simples, ácidos fenólicos (derivados dos ácidos benzóico e cinâmico), cumarinas, flavonóides, estilbenos, taninos condensados e hidrolisáveis, ligninas e lignanas (NACZK *et al.*, 2004).

Diversas substâncias bioativas com propriedade antioxidante têm sido descritas no gênero *Arachis*, principalmente em *A. hypogaea*. Estudos epidemiológicos sugerem que o consumo frequente de amendoim pode reduzir o risco de doença cardíaca coronariana (FRASER *et al.*, 1992) e certos tipos de câncer (AWAD *et al.*, 2000). Os efeitos benéficos à saúde podem ser atribuídos principalmente aos flavonóides e ao resveratrol (PENNINGTON, 2002). Entretanto, a realização de estudos dessa natureza com outras espécies do gênero ainda é muito restrita.

Os fenilpropanóides e seus derivados, principalmente os estilbenos e flavonóides, são a classe de compostos mais presentes no gênero *Arachis*. As fitoalexinas são substâncias químicas produzidas como uma forma de defesa do vegetal em resposta aos estresses bióticos ou abióticos. A produção de fitoalexinas é induzida por ferimentos, contaminação por fungos, insetos e outros tipos de injúrias. No entanto, os estilbenos são uma classe de fitoalexinas e podem ser encontrados em plantas não infectadas e não lesadas, apesar de, nesses casos, estarem presentes em menores quantidades. Esta classe de substâncias têm sido encontrada em diversas variedades de *A. hypogaea*, estando presente em diferentes órgãos da planta, como folhas, raízes e sementes (SOBOLEV *et al.*, 2007; KIM *et al.*, 2008).

O resveratrol é o representante mais conhecido dos estilbenóides e já foi encontrado em mais de 72 espécies vegetais, incluindo eucalipto, uvas (*Vitis vinifera* e *Vitis labruscae*), pinho escocês (*Pinus sylvestris*), duas espécies de lírio (*Veratrum grandiflorum* e *Veratrum formosanum*), amendoim (*Arachis hypogaea*), amora (*Morus sp*), framboesa (*Rubus idaeus*), *Polygonum multiflorum*, *Polygonum cuspidatum*, pinheiros e na pele dos frutos do tomateiro (HILLIS *et al.*, 1974; INGHAM, 1976; LANGCAKE *et al.*, 1979; KUBO *et al.*, 1981; SOLEAS *et al.*, 1997; PASSOS *et al.*, 2001; CHEN *et al.*, 2002; SAUTTER *et al.*, 2005; RAGAB *et al.*, 2006; SAIKO *et al.*, 2008).

Desde que o resveratrol foi relacionado a benefícios à saúde associados com o consumo moderado de vinho tinto, plantas que possuem estilbenos, entre as quais o amendoim, tornaram-se objeto de grande interesse (STERVBO *et al.*, 2007). O resveratrol possui vários efeitos benéficos à saúde humana, como prevenção de doenças cardiovasculares, alívio de algumas complicações na diabetes, atividade antitumoral, prevenção da osteoporose e atividade antiinflamatória, entre outros (JANG *et al.*, 1997). Algumas dessas propriedades são atribuídas à sua ação antioxidante, como consequência da inibição da atividade da enzima lipoxigenase (PINTO *et al.*, 1999; SOUZA *et al.*, 2006).

Além dos estilbenos e flavonóides, já foram encontrados em espécies do gênero *Arachis*, glicosídeos como a medicapina, dimetilmedicapina e isomedicapina (LIU *et al.*, 2009), e as isoflavonas biocanina A, daidzeína, genisteína e formonnetina (EDWARDS & STRANGE, 1991; EDWARDS *et al.*, 1995).

Pterocarpanos como o aracarpeno-1 e aracarpeno-2 também já foram identificados em folhas de *A. hypogaea* infectadas com fungos. No grupo dos flavonóides, dentro da classe das fitoalexinas, o pterocarpano é considerado o composto com maior atividade antifúngica. Além disso, já foi descrita a presença de catequina e epi-catequina em extratos aquosos de tegumentos de sementes dessa espécie (JIMÉNEZ-GONZÁLEZ *et al.*, 2008).

A quase totalidade dos estudos citados acima foram realizados com o amendoim cultivado comestível (*A. hypogaea*), existindo poucas informações sobre a produção de metabólitos especiais e atividades biológicas em outras espécies do gênero. No entanto, os dados obtidos permitem supor que outras espécies de *Arachis*, em especial aquelas que possuem altos graus de resistência a pragas e doenças, possuam também níveis elevados de metabólitos especiais. Portanto, avaliações fitoquímicas e farmacológicas de outras espécies são extremamente importantes na busca de novas fontes de substâncias bioativas. No caso das espécies que constituem estas novas opções, como *A. repens*, estes estudos justificam-se tanto pela necessidade de ampliar o conhecimento desse aspecto do gênero, como pela possibilidade de agregação de valor a essas culturas.

Além das aplicações na produção de plantas e na conservação de germoplasma, o uso de técnicas de cultura de tecidos vegetais pode resultar na criação de sistemas sustentáveis para a produção de metabólitos especiais. Tendo em vista que as condições de cultura podem ser manipuladas no sentido de possibilitar maiores níveis de produção em comparação a plantas crescidas no campo, é importante estabelecer diferentes sistemas de cultura, visando à avaliação das condições adequadas para a biossíntese de metabólitos especiais *in vitro*.

1.2 Cultura de tecidos vegetais

As técnicas de cultura de tecidos vegetais permitem o cultivo *in vitro* de células, tecidos e órgãos vegetais, em meio sólido ou líquido, em ambiente asséptico e espaço reduzido. Assim, devido à totipotência das células vegetais, qualquer propágulo vegetal pode ser utilizado para a produção de plantas *in vitro*, levando-se em consideração o nível de diferenciação celular e a finalidade da propagação (GEORGE, 2008).

A micropropagação é a aplicação mais utilizada da cultura de tecidos vegetais. Nesta técnica, pequenos fragmentos de tecidos vegetais, incluindo segmentos nodais e/ou internodais, raízes, folhas, pecíolos, embriões, ápices caulinares, meristemas apicais ou radiculares, denominados explantes, são isolados da planta matriz e cultivados assepticamente em meio de cultura (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998; GEORGE, 2008). A obtenção

de plantas idênticas é o principal objetivo da micropropagação, com a formação de novos indivíduos geneticamente uniformes (TORRES *et al.*, 2000).

Segundo Murashige & Skoog (1962), a micropropagação pode ser dividida em três estágios, dependendo das particularidades de cada espécie e de cada modelo experimental. O primeiro estágio inclui a seleção dos explantes, a desinfestação e a inoculação em meio de cultura; o segundo estágio está relacionado à morfogênese, a multiplicação dos propágulos e as subculturas, para a obtenção de plantas completas; o terceiro estágio inclui o enraizamento, o transplântio e aclimatização das plantas obtidas a condições *ex vitro* (Figura 3).

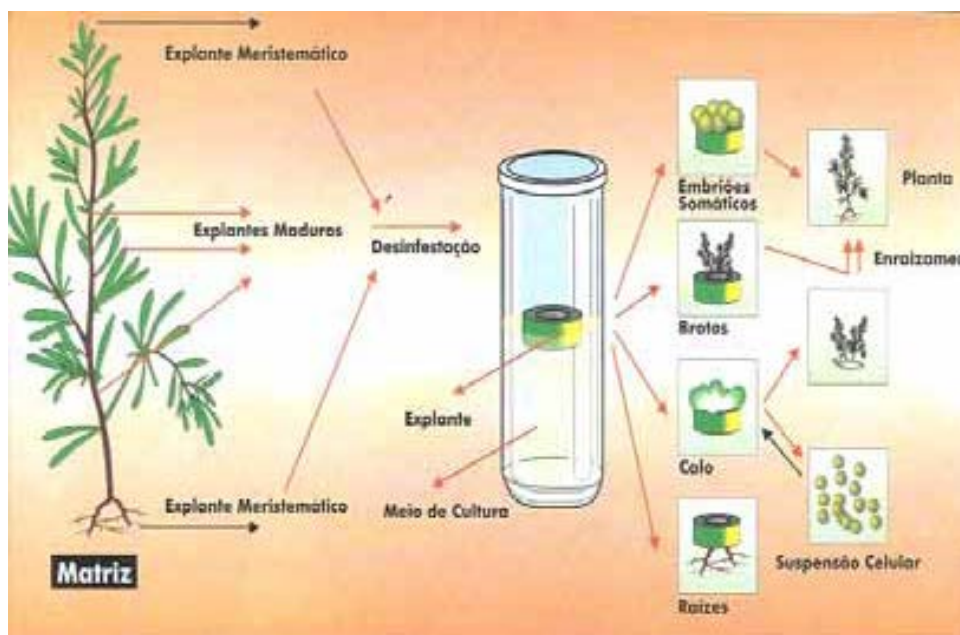


Figura 3- Etapas da cultura de tecidos. Fonte: KERBAUY, 1997.

A desinfestação do material vegetal pode ser realizada utilizando-se diferentes substâncias, como hipoclorito de sódio, hipoclorito de cálcio, álcool, Benlate®, Agrimicina®, cloreto de mercúrio, entre outras, utilizadas isoladamente ou em combinação, variando-se o tempo e a concentração. Finalizando o estágio inicial, os explantes são inoculados em meio nutritivo, sendo o mais conhecido o meio MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) (Anexo I).

Na fase de multiplicação, o material vegetal é incubado sob condições controladas de umidade e temperatura. Para que haja um desenvolvimento contínuo do material micropropagado, é imprescindível a renovação do meio de cultura, sendo necessária a realização de subculturas ou repiques (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998; SOUZA, 2006).

Após o cultivo com o balanço adequado dos reguladores de crescimento para multiplicação *in vitro*, as plântulas produzidas podem ser transferidas para condições *ex vitro*, produzindo um material propagativo de qualidade superior por serem livres de patógenos e geneticamente uniformes (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998).

A formação de plantas *in vitro* pode ocorrer por: i) proliferação a partir de meristemas pré-existentes; ii) indução de gemas adventícias por organogênese e iii) indução de embriogênese somática (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998). A organogênese e a embriogênese somática podem ocorrer diretamente a partir das células dos explantes ou indiretamente, quando há formação de uma massa desorganizada de células, denominada calo, a partir do qual se formam as gemas adventícias e os embriões somáticos.

As culturas de calos e de células em suspensão são técnicas muito utilizadas para a produção de compostos bioativos. As culturas em suspensão podem ser obtidas através do cultivo de células individuais ou em grupos, dispersas em meio líquido, sob agitação e aeração. Estes sistemas possibilitam o cultivo de células relativamente uniformes, ausentes da interferência de microorganismos e com um ciclo vegetativo reduzido (CROTEAU *et al.*, 2000). As culturas de células podem sintetizar grandes quantidades de metabólitos especiais em intervalos curtos de tempo, as taxas de biossíntese podem ser aumentadas, facilitando os estudos *in vitro* (CROTEAU *et al.*, 2000; SANTOS *et al.*, 2007).

As culturas de raízes são também amplamente empregadas para a produção de metabólitos secundários, uma vez que são os sítios naturais de produção e acúmulo de várias substâncias vegetais derivadas do metabolismo primário e secundário (VERPOORTE & MEMELINK, 2002).

1.3 Cultura de tecidos de espécies do gênero *Arachis*

O desenvolvimento de sistemas de cultura de tecidos para espécies do gênero *Arachis* teve início no final da década de 70, com o estabelecimento de protocolo para micropropagação de *Arachis hypogaea* (RUSSO & VARNELL 1978). Desde então, inúmeros sistemas de regeneração *in vitro* foram estabelecidos para as diversas espécies de amendoim, principalmente *A. hypogaea*, utilizando diferentes tipos de explantes, como ápices caulinares,

anteras, nós, entrenós, cotilédones, eixos embrionários, folíolos maduros e embrionários, estames, pecíolos, epicótilos e hipocótilos (MROGINSKI & FERNANDEZ, 1979; MROGINSKI *et al.*, 1981; SASTRI *et al.*, 1981; ILAHI & AMEEN, 1986; STILL *et al.*, 1987; DAIMON & MII, 1991; KANYAND *et al.*, 1994; GUPTA & SINGHAL, 1996; VENKATACHALAM & JAYABALAN, 1996; CUCCO E JAUME, 2000; NAZIR *et al.*, 2011). Além disso, foram também avaliados diferentes reguladores de crescimento, incluindo ABA, AIA, ANA, BAP, Centrofenoxina, Dicamba, GA3, KIN, PIC, TDZ e 2,4D, utilizados isoladamente ou em combinação (RUSSO & VARNELL, 1978; BAJAJ *et al.*, 1981; ROLFS *et al.*, 1981; SELLARS *et al.*, 1990; SAXENA *et al.*, 1992; GUPTA & SINGHAL, 1996; FENG *et al.*, 1996; VENKATACHALAM & JAYABALAN, 1997; LITTLE *et al.* 2000; SHAN *et al.*, 2009).

De um modo geral, a resposta morfogênica em *Arachis*, que pode ocorrer tanto por organogênese como por embriogênese somática, e está mais relacionada à concentração e ao tipo de regulador de crescimento utilizado que à escolha do explante inicial (PACHECO *et al.*, 2009).

A regeneração por organogênese ocorreu em espécies da seção *Extranervosae*, quando os cotilédones foram cultivados em meio contendo BAP e BAP com ANA (MANSUR *et al.*, 1993; GAGLIARDI *et al.*, 2000 e 2002). Nas espécies da seção *Arachis*, por outro lado, a indução da organogênese ocorreu em resposta a BAP ou ANA, em combinação com TDZ (McKENTLY *et al.*, 1990; GENG *et al.*, 2011). A produção de brotos também ocorreu a partir de eixos embrionários cultivados em meio contendo BAP (GAGLIARDI *et al.*, 2000) e em segmentos nodais cultivados em meio contendo ANA (GAGLIARDI *et al.*, 2002). Em explantes foliares, a indução de brotos ocorreu em meio suplementado com ANA e BAP, utilizados isoladamente ou em combinação ou em meio contendo TDZ (McKENTLY *et al.*, 1991; MANSUR *et al.*, 1993; REY *et al.*, 2000; MROGINSKI *et al.*, 2004).

Os primeiros estudos com as espécies da seção *Caulorrhizae* começaram em 1985, quando explantes foliares de *A. pintoï* foram cultivadas em meio suplementado com BAP + ANA, houve a regeneração por organogênese indireta (BURTNIK & MROGINSKY, 1985). Após este estudo inicial, as culturas com as espécies da seção *Caulorrhizae* só foram retomadas no ano 2000, com o cultivo de explantes foliolares, de *A. pintoï*, em meios com PIC + BAP, foi observada a indução de embriogênese somática (REY *et al.*, 2000). Em 2006, folíolos da mesma espécie cultivados sob as mesmas condições, obtiveram uma resposta similar, novamente com a indução da embriogênese somática (REY & MROGINSKI, 2006).

A indução de embriogênese somática nas espécies silvestres de *Arachis* já foi descrita para as espécies *A. Archeri* e *A. porphyrocalix* (*Erectoides*) e *A. appressipila* (*Procumbentes*), em resposta a BAP (PACHECO *et al.*, 2007). Por outro lado, essa mesma via morfogênica foi induzida a partir de folhas de *A. pintoii* (*Caulorrhizae*), *A. glabrata* (*Rhizomatosae*) e de gema apical e folíolo de *A. Correntina* (*Rhizomatosae*), em meios suplementados com PIC (REY *et al.*, 2000; VIDOZ *et al.*, 2004, 2006).

Alguns dos sistemas de regeneração descritos acima foram ainda utilizados como base para o desenvolvimento de metodologias de conservação *in vitro*, com o objetivo de preservar e aumentar a disponibilidade de germoplasma, que pode ser utilizado em programas de melhoramento genético das espécies cultivadas. Além disso, a produção de moléculas bioativas também vem sendo avaliada em diferentes sistemas *in vitro*, principalmente em *A. hypogaea*.

Tendo em vista que a produção *in vitro* de metabólitos especiais ainda é muito pouco explorada em outras espécies do gênero *Arachis*, neste trabalho foi avaliado o teor de resveratrol em plantas de *A. repens* em sistemas de cultivo *in vivo*, *in vitro* e em calos produzidos com a adição diferentes concentrações de TDZ ao meio. Esta espécie demonstrou ter potencial para ser utilizada como uma nova alternativa para a produção de resveratrol.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Este trabalho tem como objetivo geral o estabelecimento de sistemas de cultivo *in vitro* para *Arachis repens*, visando à micropropagação e à análise comparativa da produção de resveratrol em extratos alcoólicos dos materiais produzidos *in vitro*, em comparação com as plantas *in vivo*.

2.2 Objetivos específicos

- Estabelecer sistemas de micropropagação e indução de calogênese a partir de segmentos nodais, internodais e foliolares;
- Avaliar a produção de resveratrol em extratos alcoólicos de materiais produzidos *in vitro* e plantas *in vivo* de *A. repens*;
- Avaliar a atividade antioxidante e o conteúdo de fenóis totais em extratos provenientes de diferentes materiais.

3 METODOLOGIA

3.1 Material vegetal e condições de cultura

Mudas de *A. repens* foram adquiridas comercialmente, depositadas no Herbário da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (HRJ 11.767) e mantidas em telado, em vasos contendo substrato Plantmax®. Para os experimentos *in vitro*, foi utilizado o meio basal MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962), contendo sacarose a 3% e solidificado com ágar a 0,7%. O pH dos meios foi ajustado para 5,8 e os reguladores de crescimento foram acrescentados, em diferentes concentrações, antes da esterilização em autoclave (15 min a 121°C e 1,0 atm).

As culturas foram mantidas em câmara de crescimento a 25°C ± 2°C ou 30°C ± 2°C, sob fotoperíodo de 16h, com intensidade luminosa média de 46 µmol.m⁻².s⁻¹ fornecida por lâmpadas fluorescentes do tipo luz do dia (branca fria).

3.2 Descontaminação

Para o estabelecimento *in vitro*, segmentos caulinares foram testados em diferentes tamanhos (3 a 8 cm) contendo três nós e foram excisados das plantas mantidas em casa de vegetação e lavados três vezes com detergente e água corrente. Em seguida, os explantes foram submetidos a diferentes protocolos de descontaminação, utilizando-se álcool 70%, seguido de NaOCl, Benlate®, Agrimicina® (1% / 5, 10 ou 15 min) ou HgCl₂ (0,1 ou 0,2% / 5, 6 ou 7 min) em diferentes concentrações e períodos de tratamento. Os agentes descontaminantes foram utilizados isoladamente ou em combinação.

Após a descontaminação, os explantes foram lavados três vezes com água destilada estéril em câmara de fluxo laminar e inoculados em meio MS sem a adição de reguladores de crescimento (MS0), suplementado com Benlate® a 0,04 g/L e Agrimicina® a 600 mg/L. Foram utilizados 40 explantes por tratamento.

3.3 Morfogênese *in vitro*

Segmentos nodais e internodais com 0,5cm e foliolares com 1cm foram excisados de plantas *in vitro* com 30 dias de idade e inoculados em meio MS, mantidos em duas temperaturas (25 e $30^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$) e suplementado com diferentes concentrações de BAP (2,2; 4,4; 8,8; 22 e 44 μM), TDZ (13,6; 18,1; 22,7; 27,2; 31,8 μM), AIA (2,8; 5,7; 11,4; 17,1 e 22,8 μM), ANA (2,69; 5,37; 10,74; 26,85 e 53,71 μM) e PIC (2,07; 6,21; 10,35; 14,50 e 20,7 μM). Além disso, foram também avaliadas combinações de PIC (0,41; 2,07 e 4,14 μM) com BAP a 4,4 μM , AIA (2,8; 5,7; 11,4; 17,1; 22,8 μM) com KIN a 2,3 μM e BAP (2,2; 4,4; 8,8; 22 e 44 μM) com ANA a 2,69 μM .

Os brotos obtidos nesses experimentos foram isolados e transferidos para meio MS sem adição de reguladores de crescimento para indução de raízes. Os calos provenientes dos experimentos com meio MS suplementado com diferentes concentrações de TDZ, após 30 dias de cultura, foram avaliados o acúmulo da biomassa por meio da aferição do peso de matéria fresca e seca, sendo o peso seco aferido após secagem em estufa a 45°C , por 24h. Após a secagem do material foi realizado à extração com metanol 80% e armazenados (-20°C) para serem posteriormente analisados. As subculturas foram realizadas a cada 30 dias.

3.4 Preparo e análise de extratos

Para a preparação dos extratos, foram utilizados caules, folhas e raízes de plantas *in vitro* e *in vivo*, além de amostras de calos oriundos de segmentos nodais e internodais inoculados em meio suplementado com TDZ (13,6; 18,1; 22,7; 27,2; 31,8 μM), mantidos em diferentes temperaturas ($25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e $30 \pm 2^{\circ}\text{C}$) com aproximadamente 30 dias de cultura. Os extratos foram preparados com base no método descrito por Chen *et al.* (2002). As amostras foram maceradas e suspensas em metanol 80% v/v (0,1 g de peso seco / 4 mL de solvente), seguindo-se a homogeneização (100 rpm) por 24h, este procedimento foi repetido por três vezes com cada material vegetal. Os extratos foram filtrados em papel filtro e colocados em

frascos âmbar, para posterior evaporação em rota evaporador (Evaporator Rotativo Marconi – M120). Os extratos foram armazenados em freezer (-20°C) e posteriormente, para as análises em CLAE, foram ressuspensos em metanol, na concentração de 10 mg/mL.

3.4.1. Análise dos extratos por CLAE

Inicialmente, os extratos foram analisados com o uso de diferentes fases móveis, para determinação do método mais adequado para a individualização do pico correspondente ao resveratrol, utilizando um cromatógrafo Dionex, modelo Ultimate 3000, com um detector Diode Array e coluna ACCLAIM, C18 (Dionex Bonded Silica Products, 5 µm, 120 Å, com a dimensão de 4,6 x 250 mm). As fases móveis variaram nas seguintes proporções: água (5% a 90%), Acetonitrila (10% a 90%) e Metanol (0% a 8%). Além disso, foram testados diferentes temperaturas (20°C a 30°C) e tempos (18 min a 45 min).

Com base nos resultados obtidos, as amostras foram analisadas utilizando-se a temperatura de 30°C, com um gradiente iniciado com água 90%, 8% de metanol e 2% de acetonitrila por 2min. Após 10min, a relação passa para 70% de água, 8% de metanol e 22% de acetonitrila, finalizando em 18 min. com 5% de água e 95% de acetonitrila.

A concentração de resveratrol foi determinada com base na curva padrão construída com o mesmo método (Figura 4).

O volume injetado para todas as amostras preparadas foi de 20 µl e o comprimento de onda utilizado na região do ultravioleta (UV) foi de 307 nm. O pico do componente principal dos extratos encontrados nos cromatogramas foram comparados com a curva padrão de resveratrol (Sigma, Lot# 038K5202).

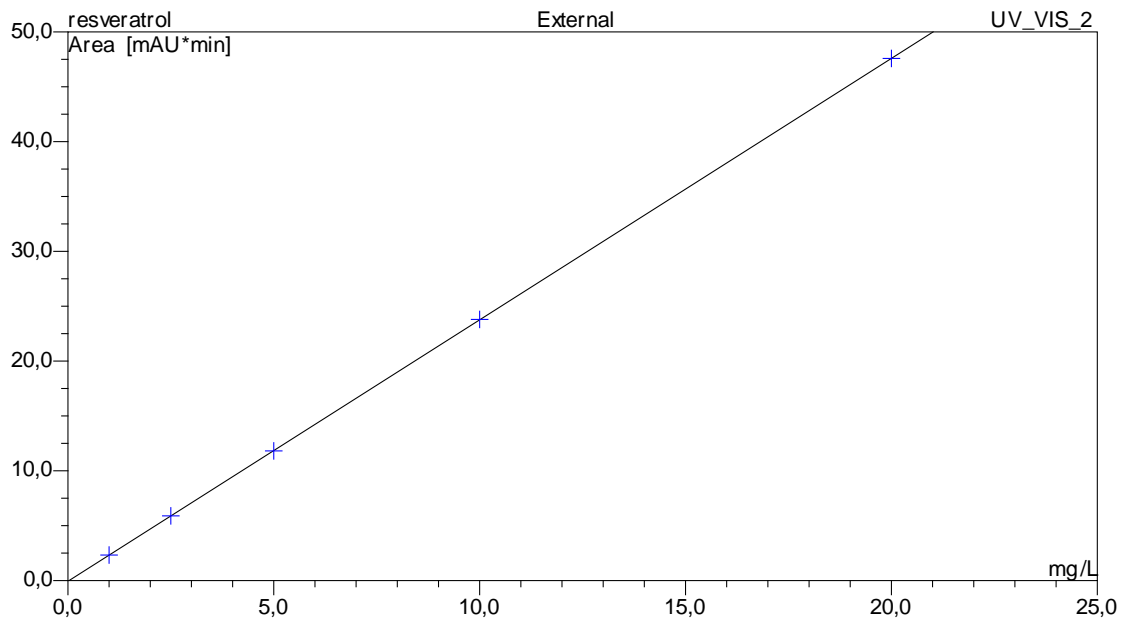


Figura 4 – Curva padrão de resveratrol.

3.5 Avaliação de atividades biológicas

3.5.1 Capacidade de captura do radical DPPH

A capacidade dos extratos de sequestrar o radical DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil – SIGMA - ALDRICH®) foi determinada utilizando a metodologia descrita por Rufino *et al.* (2007). Para construir a curva padrão, foram preparadas diferentes concentrações de solução metanólica do radical DPPH, variando de 0 a 60 µM, sendo as leituras de absorvância efetuadas a 515 nm em espectrofotômetro (SHIMADZU, UV-VISIBLE RECORDING SPECTROPHOTOMETER, UV- 160 A). Para a avaliação da atividade antioxidante, foram utilizadas diferentes concentrações de extratos de plantas *in vivo*, *in vitro* e de calos provenientes de meio suplementado com diferentes concentrações de TDZ (1, 5, 10 e 20 mg/mL). As amostras (25 µL) foram adicionadas à solução de DPPH (60 µM) (975 µL), completando um volume de 1 mL, em ambiente iluminado com luz vermelha. A absorvância foi medida a 515 nm, 60 min após o início da reação. Os experimentos foram realizados em triplicata. A densidade ótica das leituras das amostras foi correlacionada com as leituras do controle, estabelecendo-se a percentagem de radical DPPH remanescente, conforme a fórmula abaixo:

$$\%DPPH_{REM} = [DPPH]_{T=t} / [DPPH]_T \times 100,$$

Onde $[DPPH]_{REM}$ corresponde à concentração de DPPH no meio, após a reação com o extrato e $[DPPH]_T$ é a concentração inicial de DPPH.

Os valores de absorvância em todas as concentrações testadas também foram convertidos em percentagem de atividade antioxidante (%AA), determinada pela equação:

$$\%AA = \{ [Abs_{controle} - (Abs_{amostra}) / Abs_{controle}] \times 100 \},$$

Onde $Abs_{controle}$ é a absorvância inicial da solução metanólica de DPPH (60 µM) e $Abs_{amostra}$ é a absorvância da mistura reacional (DPPH+amostra) (Souza, et al 2007).

A atividade antioxidante dos extratos foi determinada com base na curva padrão de DPPH (Figura 5).

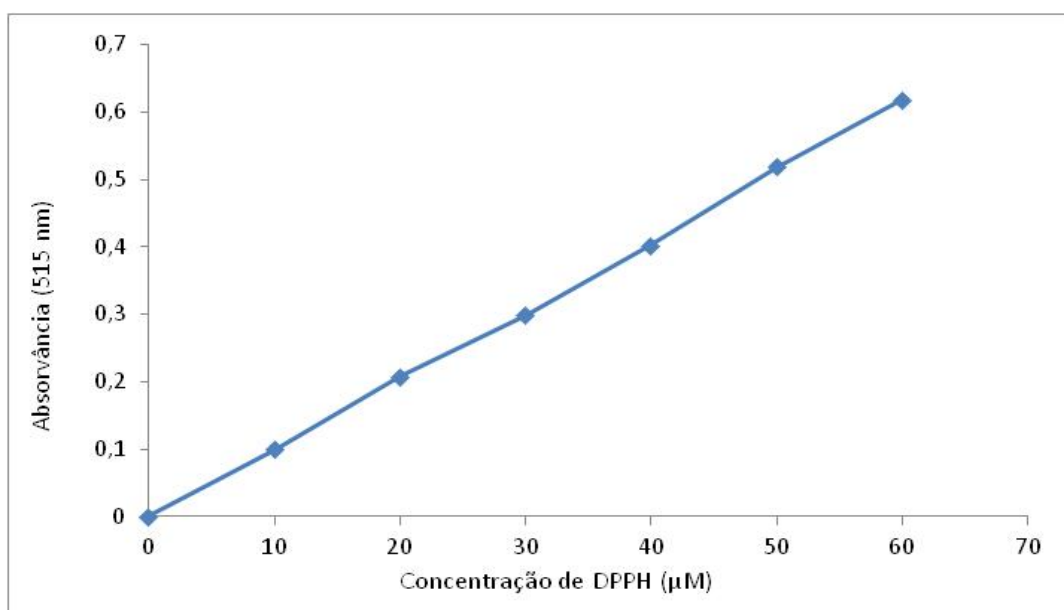


Figura 5 – Curva padrão de DPPH.

3.5.2 Determinação de fenóis totais

A determinação do teor de fenóis totais presentes nos extratos metanólicos, foi realizada por quantificação espectrométrica utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu com modificações (BONOLI *et al*, 2004). Para construir a curva padrão, foram preparadas diferentes concentrações de solução metanólica de ácido gálico, variando de 10 a 500 mg/mL, sendo as leituras de absorvância realizadas a 765 nm em espectrofotômetro (SHIMADZU, UV-VISIBLE RECORDING SPECTROPHOTOMETER, UV- 160 A). Para a avaliação do conteúdo de fenóis totais, foi utilizada a concentração de 2mg de extrato por mL. As amostras (25 μL) foram adicionadas a 25 μL do reagente de Folin-Ciocalteu. Após 5 min, foi adicionado 1 mL de Na_2CO_3 e as amostras incubadas por 1 h. A absorvância das amostras foi medida utilizando cubetas de vidro (200 μL). Os experimentos foram realizados em triplicata e mantidos sob ausência de luz antes das leituras. O teor de fenóis totais foi determinado pela interpolação da absorvância das amostras contra uma curva de calibração construída com o padrão de ácido gálico (10 a 500 mg/mL) e expressos em mg de EAG (Equivalência do Ácido Gálico) por g de extrato.

O teor de fenóis totais dos extratos foi determinado com base na curva padrão de ácido gálico (Figura 6).

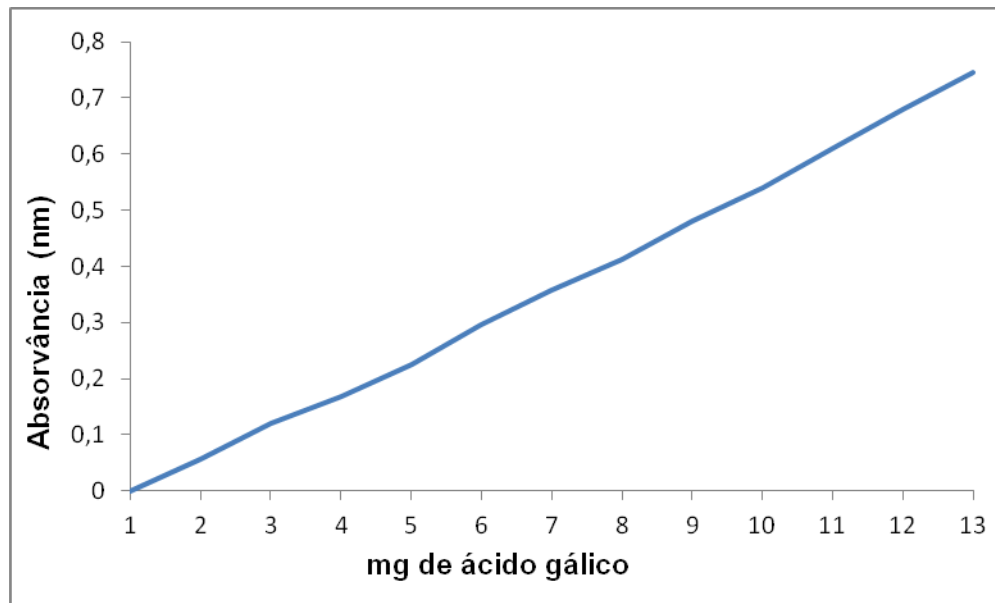


Figura 6- Curva padrão do ácido gálico.

3.6. Análise estatística

Os experimentos foram repetidos pelo menos duas vezes, utilizando-se grupos de dez explantes. 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%.

4 RESULTADOS

4.1 Estabelecimento de culturas *in vitro*

4.1.1 Descontaminação

Embora os tratamentos realizados com NaOCl, Benlate® e Agrimicina® utilizados isoladamente ou em combinação não tenham proporcionado uma descontaminação eficiente do material vegetal, o tratamento com HgCl₂ a 0,1% por 5 minutos resultou em um percentual de 70% de descontaminação (Tabela 1). Períodos mais longos de exposição resultaram em altas taxas de oxidação e períodos mais curtos, em baixas taxas de descontaminação.

O tamanho dos segmentos caulinares utilizados foi relevante para a definição do protocolo de descontaminação. Segmentos caulinares com tamanho médio de $5 \pm 0,5$ cm e contendo três segmentos nodais mostraram-se os mais adequados, apresentando menor taxa de oxidação e maior taxa de regeneração. O enraizamento dos brotos formados ocorreu em frequências entre 90 e 100%, após 40 dias de cultura.

Tabela 1 – Percentual de regeneração e oxidação a partir de segmentos caulinares de *A. repens* após diferentes tratamentos de descontaminação.

Agente antimicrobiano	Tempo (minutos)	Regeneração / descontaminação (%)	Oxidação (%)
	5	13	50
NaOCl (1%)	10	0	100
	15	0	100
	5	0	-
Benlate(1%)	10	13	50
	15	0	100
	5	0	-
Agrimicina(1%)	10	13	50
	15	0	-
	5	70	10
HgCl₂ (0,1%)	6	50	30
	7	0	100

4.2 Morfogênese *in vitro*

Segmentos nodais, internodais e foliares excisados de plantas *in vitro* e inoculados em meio MS suplementado com diferentes concentrações de AIA, ANA e PIC, utilizados isoladamente, ou combinações de BAP com ANA a 2,69 μM , não apresentaram respostas morfogênicas significativas.

4.2.1 Morfogênese *in vitro* em resposta aos tratamentos com BAP

Segmentos nodais cultivados em meio suplementado com BAP nas temperaturas de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ou de $30 \pm 2^\circ\text{C}$ apresentaram a formação de calos compactos em resposta a todas as concentrações testadas, sendo as maiores frequências de calogênese (75 e 100 %) obtidas em resposta a 22 μM e a 2,2 μM , respectivamente, após 30 dias de cultura (Tabela 2). No entanto, as maiores taxas de regeneração de brotos por organogênese indireta, foram observadas em resposta a 8,8 μM a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ (6 brotos/explante) e na concentração de 2,2 μM a $30 \pm 2^\circ\text{C}$ (1,71 brotos/explante) (Tabela 2) (Figura 7).

Segmentos internodais também apresentaram a formação de calos compactos, com posterior formação de brotos, após 30 dias de cultura, sendo a maior percentagem de explantes responsivos (30%) obtida em resposta a 4,4 μM a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e para a formação de brotos em resposta a 8,8 μM ($1,0 \pm 0,3$ broto/explante) e 100% de formação de calos, obtida em resposta 2,2 μM a $30 \pm 2^\circ\text{C}$ e formação de brotos em resposta a 4,4 μM ($3,0 \pm 0$ brotos/explante) (Tabela 2; Figura 7 - A). Entretanto, a produção de brotos nas culturas a partir de segmentos internodais foi menor do que nas culturas a partir de segmentos nodais, em ambas as temperaturas (Tabela 2). Não foram obtidas respostas morfogênicas a partir de explantes de folíolos cultivados na presença de BAP.

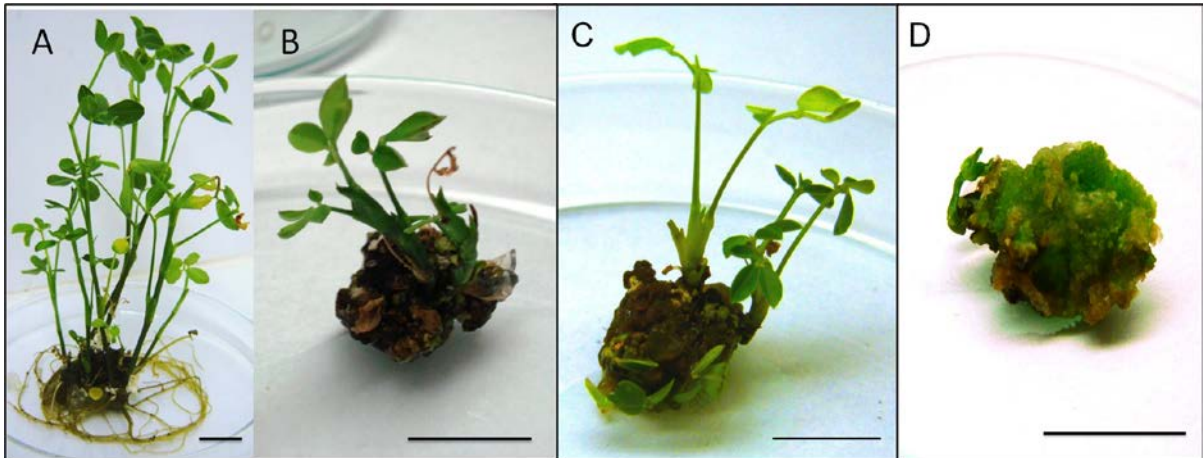


Figura 7 – Morfogênese *in vitro* a partir de explantes de *A. repens* inoculados em meio MS suplementados com BAP.

Legenda: (A) Calo organogênico obtido a partir de segmento nodal em meio MS suplementado com BAP 8,8 μM após 60 dias de cultura (25°C), (B) Calo organogênico obtido a partir de segmentos internodais em meio MS suplementado com BAP 8,8 μM após 60 dias de cultura (25°C), (C) Calo organogênico obtido a partir de segmento nodal em meio MS suplementado com BAP 2,2 μM após 60 dias de cultura (30°C), (D) Calo obtido a partir de segmentos internodais em meio MS suplementado com BAP 2,2 μM após 60 dias de cultura (30°C). Barra = 1cm.

Foto: Leonardo de Carvalho Garcia, 2011.

Tabela 2 – Morfogênese *in vitro* a partir de segmentos nodais e internodais de *A. repens* em meio MS suplementado com diferentes concentrações de BAP, após 30 dias de cultura.

Explante	Concentração de BAP (μM)	Calos (%)		Número de brotos / explante	
		25 \pm 2°C	30 \pm 2°C	25 \pm 2°C	28 \pm 2°C
Nodal	2,2	58	100	1,5 \pm 0,5 ^{bc}	1,71 \pm 0,75 ^b
	4,4	33	70	1,0 \pm 0,5 ^{bc}	1,6 \pm 0,54 ^b
	8,8	60	10	6,0 \pm 0,4 ^a	0
	22	75	40	2,0 \pm 0,5 ^b	1,0 \pm 0 ^{bc}
	44	41	30	1,0 \pm 0,5 ^{bc}	1,0 \pm 0 ^{bc}
Internodal	2,2	20	100	0,5 \pm 0,5 ^d	2,0 \pm 0 ^b
	4,4	30	70	0	3,0 \pm 0 ^a
	8,8	20	30	1,0 \pm 0,3 ^c	0
	22	0	70	0	0
	44	0	20	0	0

Notas: 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; Os dados foram analisados de acordo com a temperatura.

4.2.2 Morfogênese *in vitro* em resposta a combinações de PIC com BAP

Explantos nodais, internodais e de folíolos apresentaram a formação de calos compactos morfogênicos, friáveis ou mistos não morfogênicos. Segmentos nodais apresentaram baixa frequência de calogênese em todas as concentrações testadas, variando entre 16 a 50% nas culturas incubadas a $25 \pm 2^\circ\text{C}$. A frequência de calogênese a partir dos mesmos explantes foi significativamente maior, entre 60 a 100%, quando o material foi mantido à temperatura de $30 \pm 2^\circ\text{C}$ (Tabela 3).

Segmentos internodais cultivados a $25 \pm 2^\circ\text{C}$, apresentaram calogênese apenas em resposta à combinação de BAP a $4,4 \mu\text{M}$ com PIC a $2,07 \mu\text{M}$. Explantes cultivados a $30 \pm 2^\circ\text{C}$ apresentaram formação de calos compactos em frequências entre 30 e 80% (Tabela 3) (Figura 8).

Segmentos de folíolos cultivados a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ apresentaram a formação de calos friáveis com frequência entre 55 a 100%, em meio suplementado com diferentes concentrações de PIC. Os mesmos explantes cultivados a $30 \pm 2^\circ\text{C}$ apresentaram taxas entre 50 a 100%, em todas as combinações testadas (Tabela 3) (Figura 8).

Após 60 dias de cultura, os três explantes testados apresentaram intensa taxa de oxidação e necrose.

Segmentos nodais, internodais e folíolos cultivados em meios suplementados somente com PIC (2,07; 6,21; 10,35; 14,50 e $20,7 \mu\text{M}$) nas temperaturas de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e $30 \pm 2^\circ\text{C}$, apresentaram altas taxas de oxidação e necrose (100%), após 10 dias de cultura, sem resposta morfogênica.

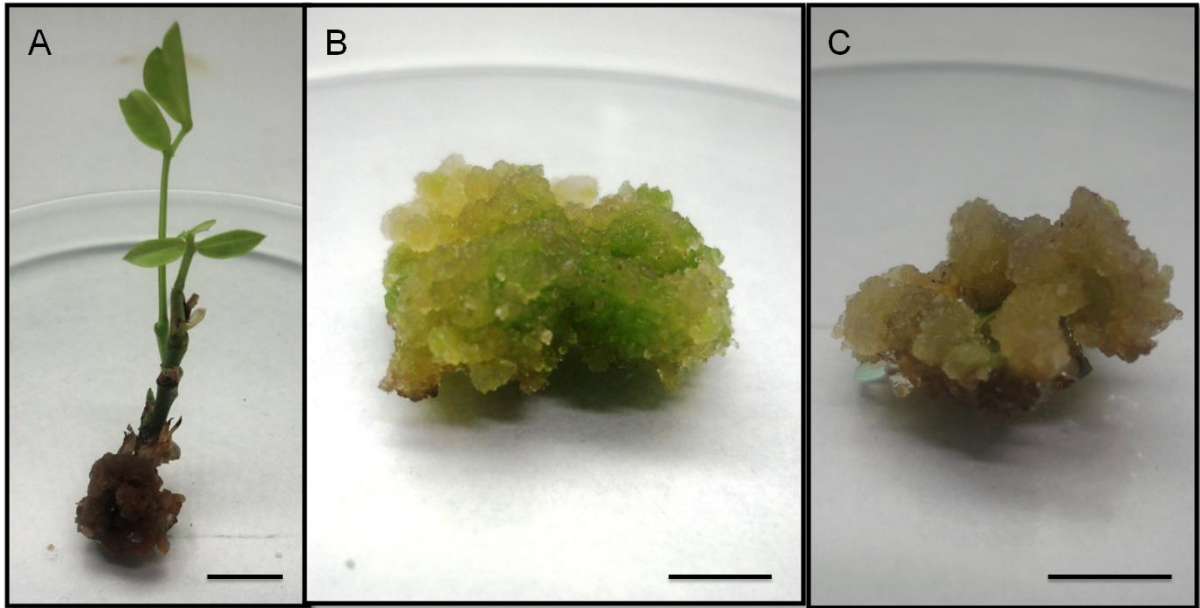


Figura 8 – Calogênese a partir de explantes de *A. repens* inoculados em meio MS suplementado com PIC combinado com BAP a $4,4 \mu\text{M}$, após 30 dias de cultura.

Legenda: (A) Calo compacto obtido a partir de segmento nodal cultivado na presença de $4,14 \mu\text{M}$ de PIC (25°C), (B) Calo friável obtido a partir de folíolo cultivado na presença de $2,07 \mu\text{M}$ de PIC (25°C), (C) Calo misto obtido a partir de segmento internodal cultivado na presença de $0,41 \mu\text{M}$ de PIC (25°). Barra = 1 cm.

Foto: Leonardo de Carvalho Garcia, 2011.

Tabela 3 - Morfogênese *in vitro* a partir de segmentos nodais, internodais e de folíolos de *A. repens* em meio MS suplementado com diferentes concentrações de PIC combinadas com BAP a 4,4 μ M, após 30 dias de cultura.

Explante	Concentração de PIC (μ M)	Calogênese (%)	
		25 \pm 2°C	30 \pm 2°C
Nó	0,41	41	100
	2,07	16	60
	4,14	50	60
Entrenó	0,41	0	80
	2,07	12	60
	4,14	0	30
Folíolos	0,41	100	100
	2,07	55	60
	4,14	63	50

4.2.3 Morfogênese *in vitro* em resposta a TDZ

Segmentos nodais e internodais cultivados em meio suplementado com TDZ apresentaram a formação de calos compactos e desenvolvimento de gemas adventícias em todas as concentrações testadas (90 - 100%) (Figura 9), quando cultivados a $25 \pm 2^\circ\text{C}$. Culturas mantidas a $30 \pm 2^\circ\text{C}$ apresentaram frequências de calogênese entre 40 e 100% (Tabela 4). Após 30 dias de cultura, foi observada a formação de brotos (10%) em resposta à menor concentração de TDZ ($13,6 \mu\text{M}$), somente a $25 \pm 2^\circ\text{C}$.

Segmentos de folíolos apresentaram início de calogênese (20%) quando mantidos a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ em resposta à maior concentração testada ($31,8 \mu\text{M}$) e de calogênese (60%) a temperatura de $30 \pm 2^\circ\text{C}$ na concentração de $22,7 \mu\text{M}$. Nas demais concentrações não foram obtidas respostas morfogênicas (Tabela 4) (Figura 9).

A maior produção de massa calogênica foi obtida em resposta a TDZ a $27,2 \mu\text{M}$ a partir de segmentos nodais cultivados a $30 \pm 2^\circ\text{C}$ (Figura 10). Em calos originados de segmentos internodais, o maior acúmulo de biomassa foi observado em meio suplementado com TDZ a $22,7 \mu\text{M}$ nos materiais incubados em ambas as temperaturas testadas. (Figura 11)

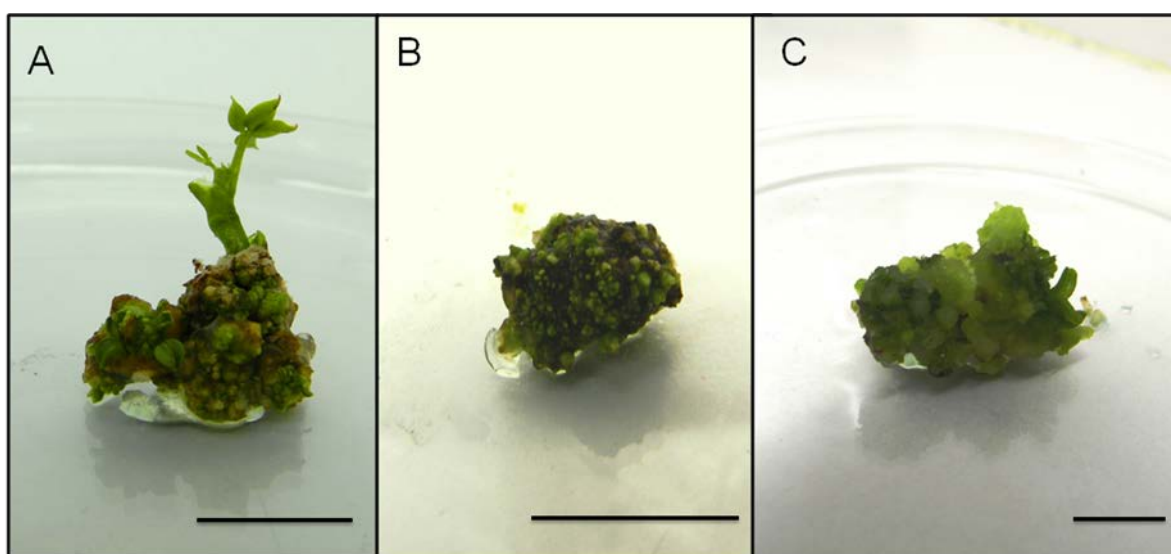


Figura 9 – Morfogênese *in vitro* a partir de explantes *A. repens* inoculados em meio MS suplementado com TDZ.

Legenda: (A) Calo organogênico obtido a partir de segmento nodal ($4,5 \mu\text{M}$ 30°C), (B) calo compacto obtido em segmentos nodais ($18,1 \mu\text{M}$; 30°C), (C) Calo misto obtido a partir de segmento internodal ($13,6 \mu\text{M}$; 30°C). Barra = 1 cm. Foto: Leonardo de Carvalho Garcia, 2011.

Tabela 4 - Calogênese *in vitro* a partir de segmentos nodais e internodais de *A. repens* em meio suplementado com diferentes concentrações de TDZ, após 30 dias de cultura.

Explante	Concentração de TDZ (μM)	Calogênese (%)	
		$25 \pm 2^\circ\text{C}$	$30 \pm 2^\circ\text{C}$
Nodal	13,6	100	60
	18,1	90	100
	22,7	100	40
	27,2	100	50
	31,8	100	60
Internodal	13,6	100	100
	18,1	90	40
	22,7	100	90
	27,2	100	100
	31,8	100	60

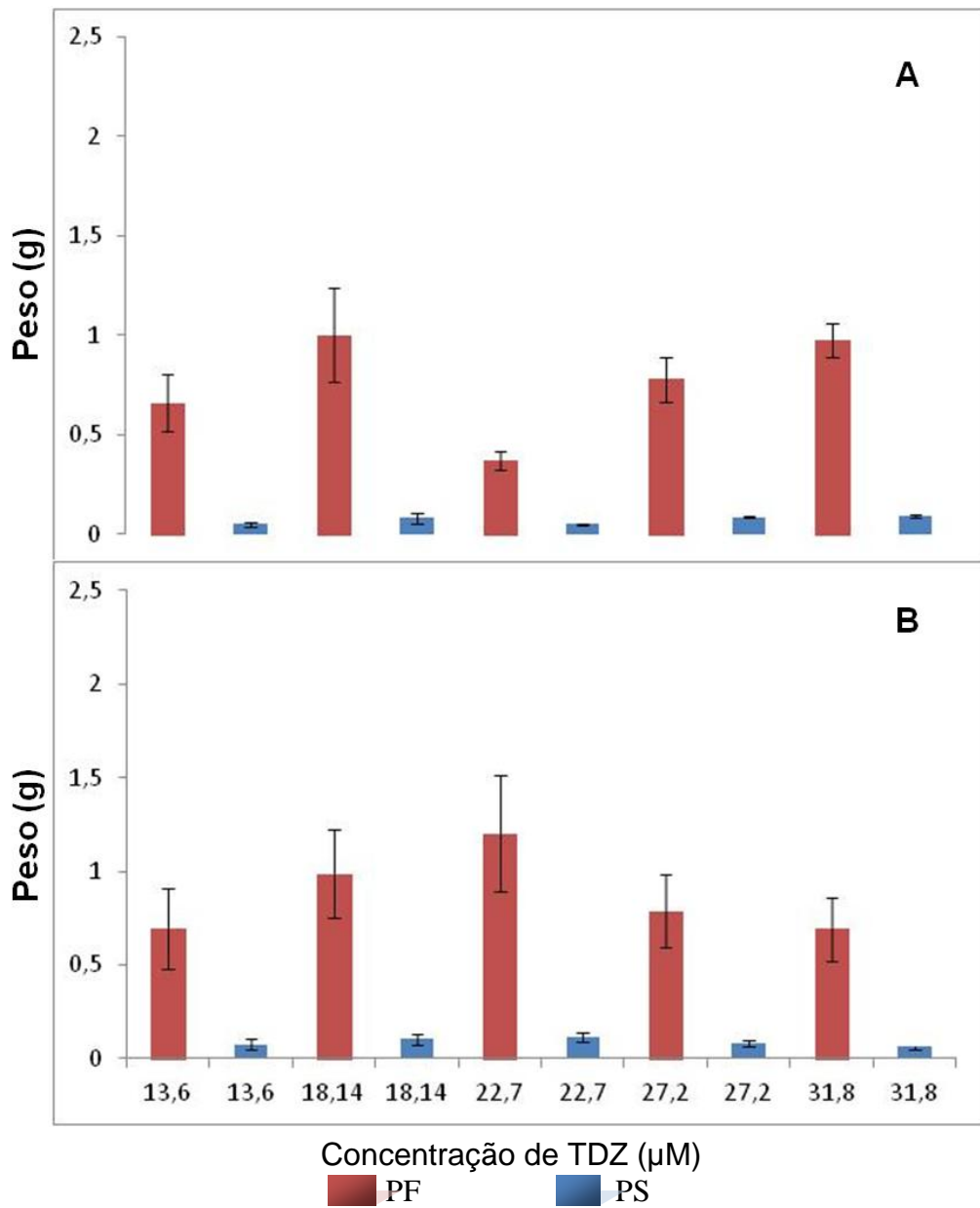


Figura 10 – Acúmulo de biomassa (g) de calos compactos de *A. repens* provenientes de segmentos internodais, cultivados em meio suplementado com diferentes concentrações de TDZ, após 30 dias de cultura, a temperatura de $30 \pm 2^\circ\text{C}$ (A) e $25 \pm 2^\circ\text{C}$ (B). PF = peso fresco; PS = peso seco.

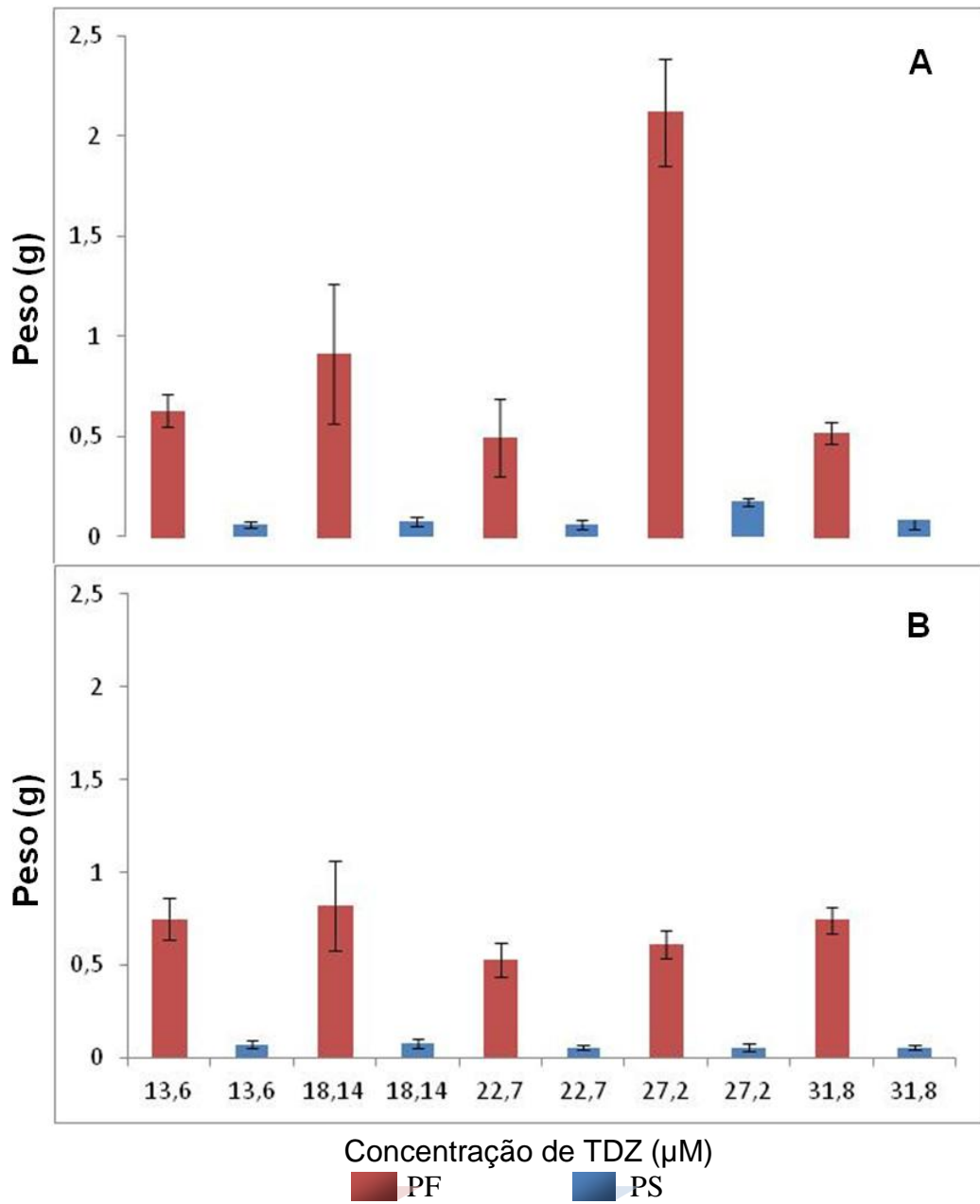


Figura 11 – Acúmulo de biomassa (g) de calos compactos de *A. repens* provenientes de segmentos nodais, cultivados em meio suplementado com diferentes concentrações de TDZ, após 30 dias de cultura, a temperatura de $30 \pm 2^\circ\text{C}$ (A) e $25 \pm 2^\circ\text{C}$ (B).
 Legenda: PF = peso fresco; PS = peso seco.

4.2.4 Morfogênese *in vitro* em resposta a combinações de AIA com Kin a 2,3 μM

Segmentos nodais cultivados na presença de diferentes concentrações de AIA em combinação com KIN a 2,3 μM apresentaram desenvolvimento de brotos em resposta a todas as combinações testadas. Foi também obtida calogênese, na frequência de 80%, em resposta a AIA a 11,4 μM em associação a KIN a 2,3 μM , na temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$. Na temperatura mais elevada ($30 \pm 2^\circ\text{C}$), o desenvolvimento de brotos ocorreu somente em três combinações (AIA a 2,8; 5,7 e 11,4 μM), sendo à maior percentagem de calogênese (30%) observada em resposta a AIA a 11,4 μM (Tabela 5) (Figura 12).

Segmentos internodais apresentaram formação de calos a partir das extremidades dos explantes, sendo a maior frequência (100%) observada em meio suplementado com AIA a 2,8 μM . A formação de brotos por organogênese direta (20%) foi observada nas culturas mantidas em meios suplementados com AIA a 2,8; 11,4 e 22,8 μM , mantidas a $25 \pm 2^\circ\text{C}$. Os explantes mantidos a $30 \pm 2^\circ\text{C}$ desenvolveram calogênese em frequências de 60 e 20%, em meios suplementados com AIA a 2,8 e 5,7 μM , respectivamente. A formação de brotos por organogênese direta a temperatura de $30 \pm 2^\circ\text{C}$, ocorreu somente em meio suplementado com AIA 2,8 μM , com uma frequência de 60% (Figura 12).

Segmentos de folíolos não apresentaram resposta morfogênica nas combinações testadas, em ambas as temperaturas.

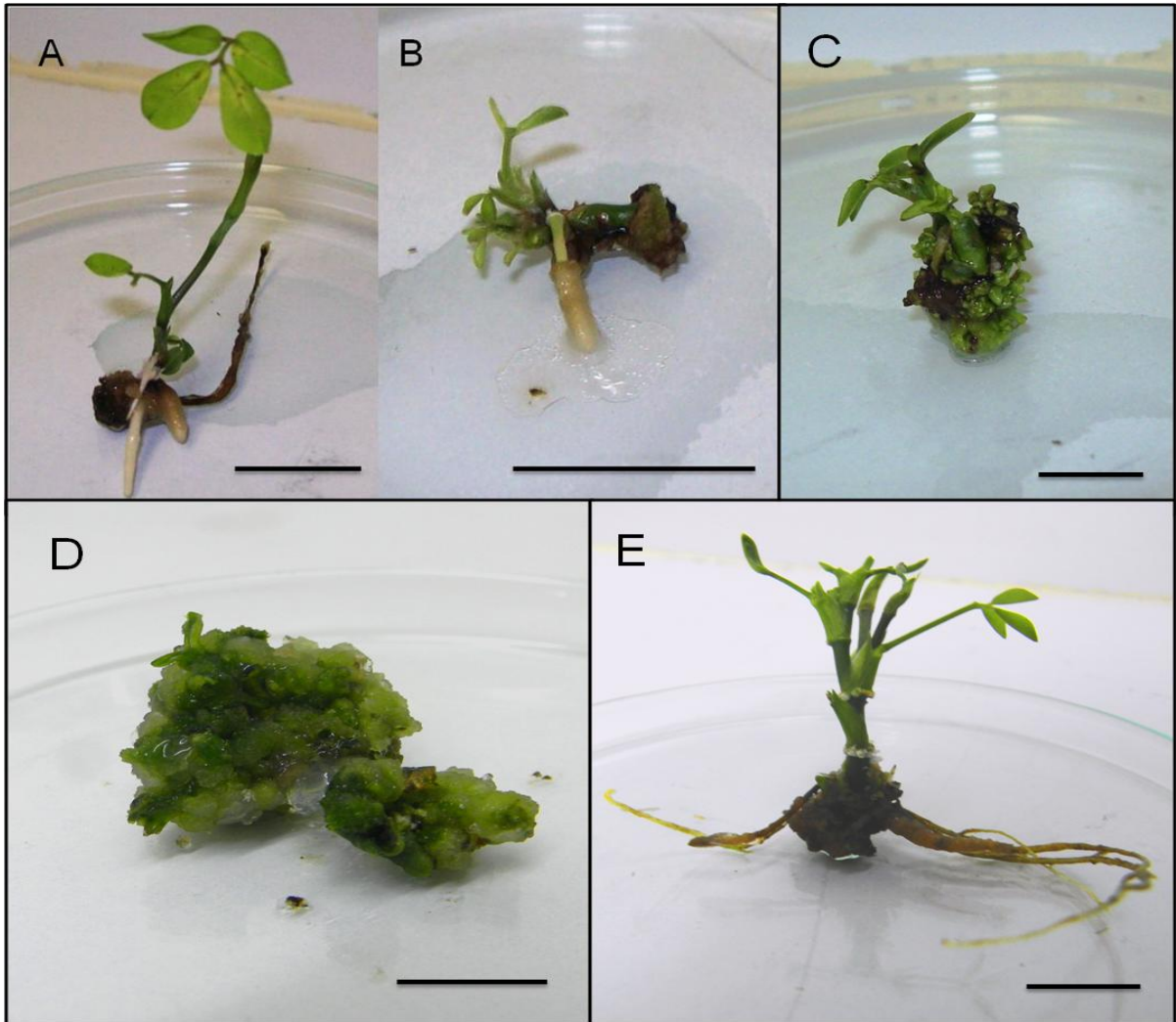


Figura 12 – Morfogênese *in vitro* a partir de explantes de *A. repens* inoculados em meio MS suplementado com diferentes concentrações de AIA em combinação com KIN a 2,3 μ M.

Legenda: (A) Segmento nodal (2,8 μ M; 25°C), (B) organogênese indireta de explante internodal, (C) calogênese obtida em resposta a 11,4 μ M (30°C), (D) Calogênese obtida na concentração de 5,7 μ M (30°C), (E) Organogênese obtida em meio suplementado com 2,8 μ M (30°C). Barra = 1 cm.

Foto: Leonardo de Carvalho Garcia, 2011.

Tabela 5 – Calogênese *in vitro* a partir de segmentos nodais e internodais de *A. repens* cultivados em meio suplementado com KIN a 2,3 μM em associação com diferentes concentrações de AIA, após 30 dias de cultura.

Explante	Concentração de AIA (μM)	Calogênese (%)	
		25 \pm 2°C	30 \pm 2°C
Nodal	2,8	0	0
	5,7	70	10
	11,4	80	30
	17,1	0	0
	22,8	0	0
Internodal	2,8	100	60
	5,7	90	20
	11,4	20	0
	17,1	10	0
	22,8	20	0

4.3 Avaliação de atividades biológicas

4.3.1 Atividade antioxidante

A avaliação quantitativa da atividade antioxidante (%AA) dos extratos metanólicos de *A. repens* in vivo e dos materiais obtidos in vitro, nas concentrações de 1, 5, 10 e 20 mg/mL, está representada nas figuras de 13 a 17. Extratos de folha in vivo apresentaram a maior capacidade de sequestro do radical DPPH (90,68%).

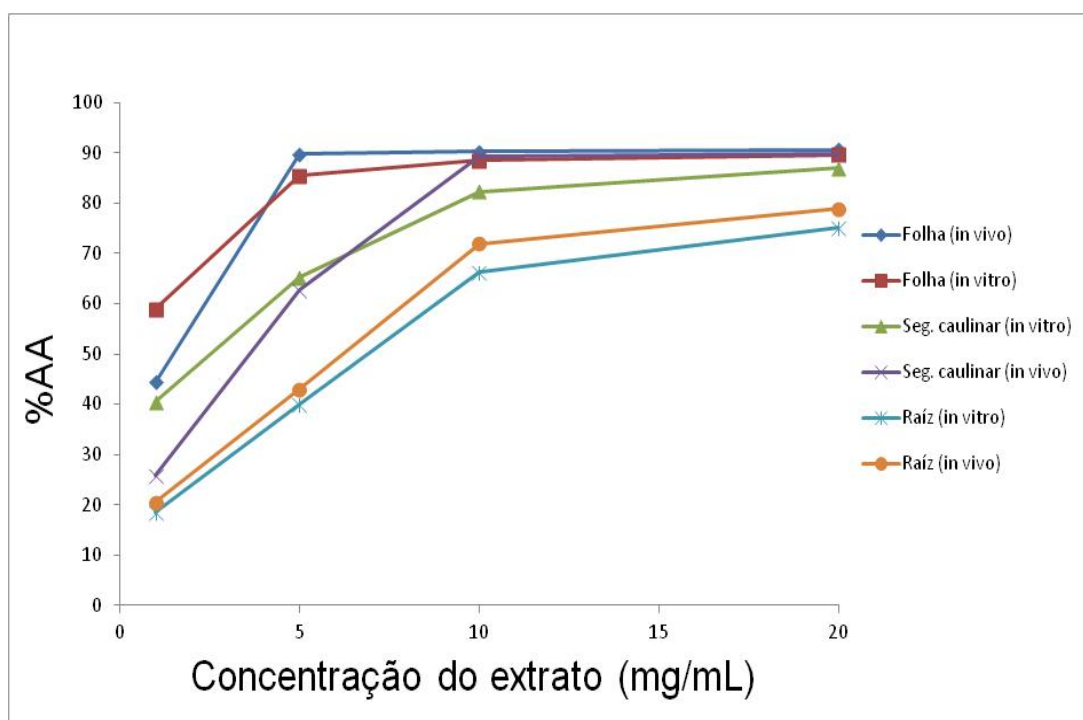


Figura 13 – Avaliação da atividade antioxidante de extratos metanólicos de *A. repens* provenientes de explantes foliares, caulinares e radiculares *in vivo* e *in vitro*.

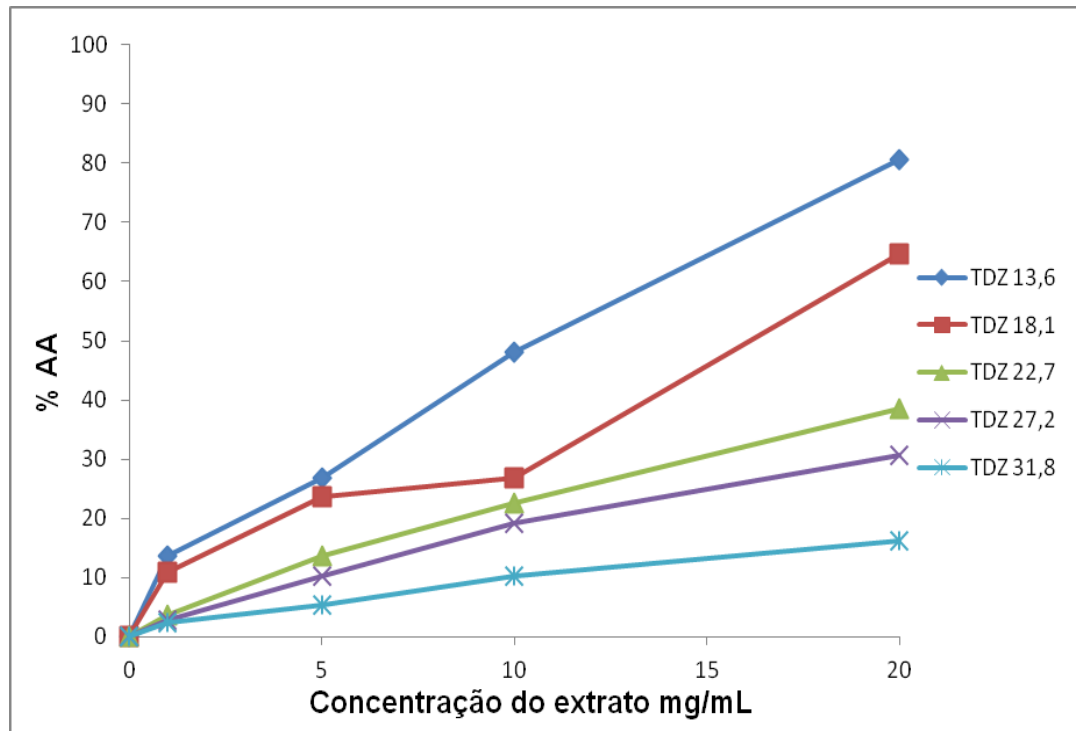


Figura 14 - Avaliação da atividade antioxidante de extratos de calos obtidos a partir de explantes de segmentos nodais inoculados em meio MS suplementado com diferentes concentrações de TDZ (μM) a temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$.

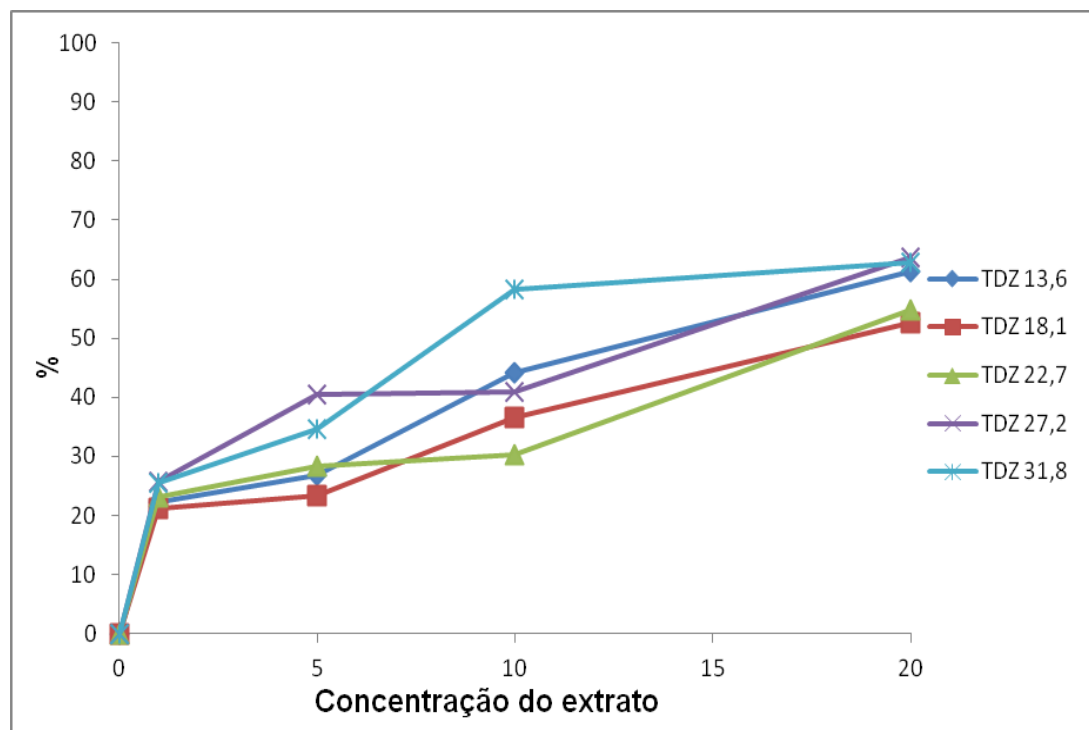


Figura 15 - Avaliação da atividade antioxidante de extratos de calos obtidos a partir de explantes de segmentos internodais inoculados em meio MS suplementado com diferentes concentrações de TDZ (μM) a temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$.

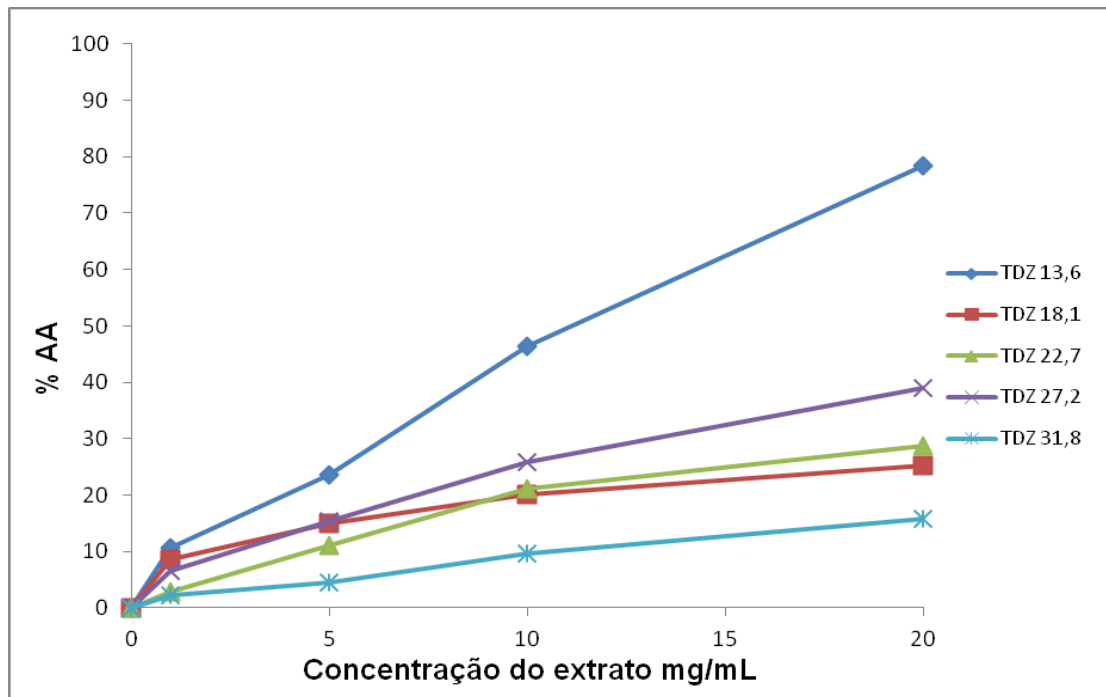


Figura 16 - Avaliação da atividade antioxidante de extratos de calos obtidos a partir de explantes de segmentos nodais inoculados em meio MS suplementado com diferentes concentrações de TDZ (μM) a temperatura de $30 \pm 2^\circ\text{C}$.

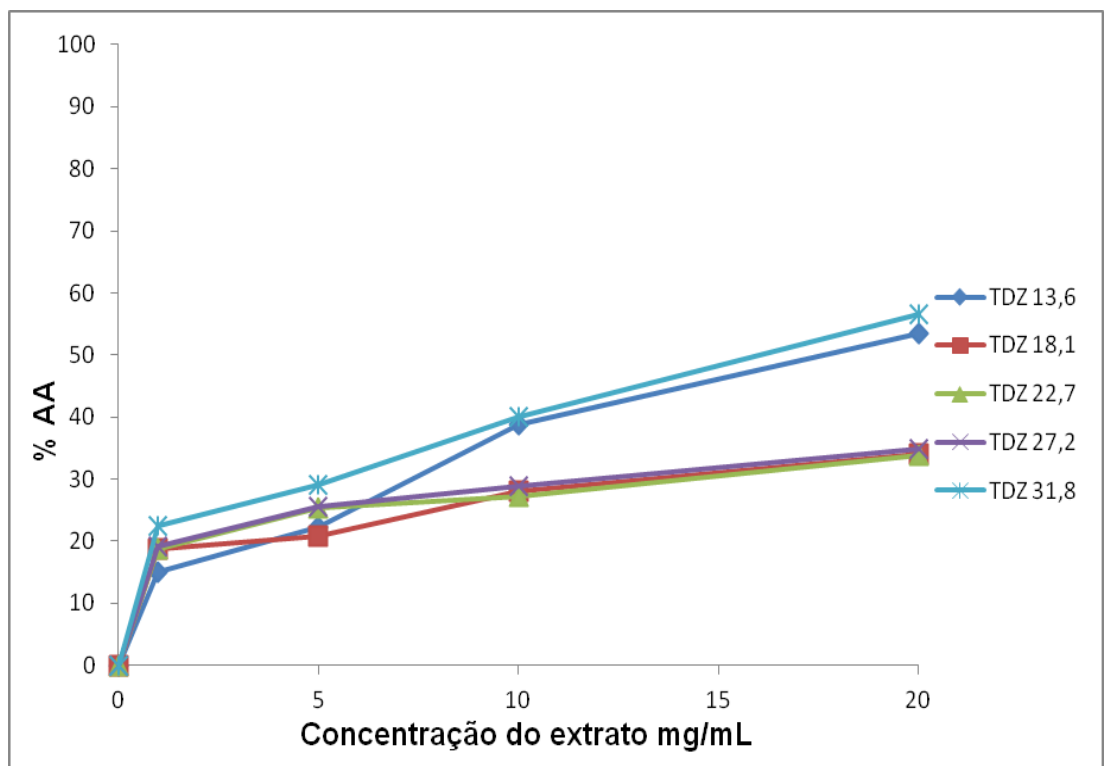


Figura 17 - Avaliação da atividade antioxidante de extratos de calos obtidos a partir de explantes de segmentos internodais inoculados em meio MS suplementado com diferentes concentrações de TDZ (μM) a temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$.

Através da curva de dose-resposta relativa ao decréscimo da porcentagem remanescente de DPPH (% DPPHREM) (figura 18), observa-se que todas as amostras, com exceção do extrato de raiz *in vitro*, atingiram praticamente o máximo de consumo do DPPH após 1h do início da reação. O extrato de folhas *in vivo*, mesmo em baixas concentrações, obteve uma taxa de % DPPHREM = 9,32%.

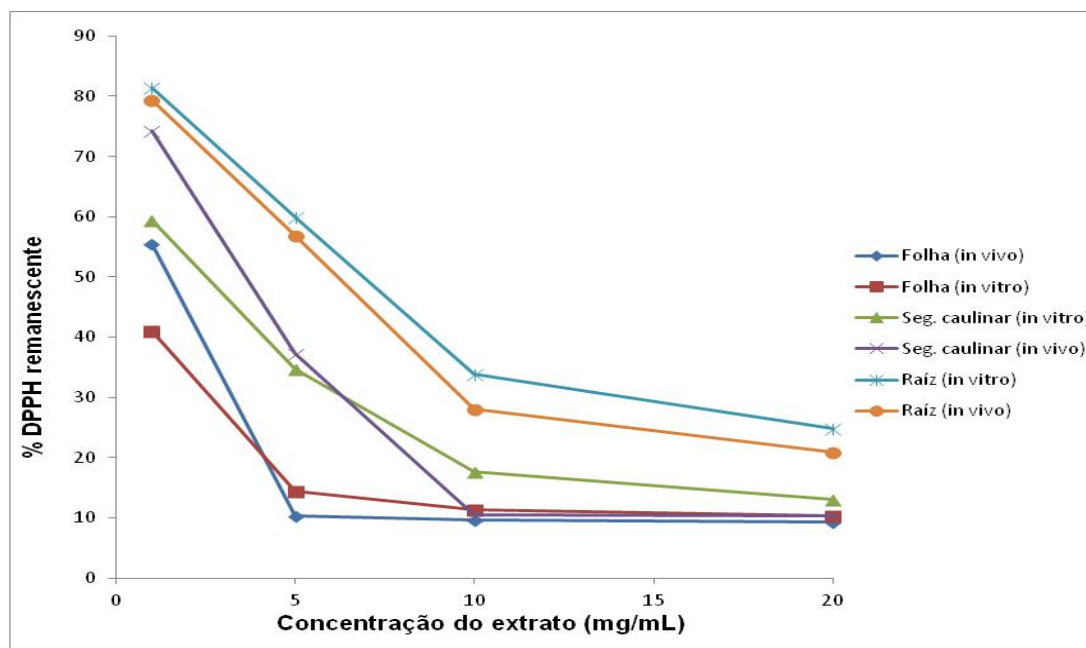


Figura 18 - Curva de dose-resposta relativa ao decréscimo da porcentagem remanescente de DPPH.

4.3.2 Determinação de fenóis totais

Os resultados obtidos na determinação dos fenóis totais pelo método Folin-Ciocalteu, expressos como EAG por g de extrato bruto e por g de material vegetal seco, são apresentados nas tabelas 6 e 7. A análise do conteúdo de fenóis totais revelou que o extrato preparado a partir de folhas de plantas *in vivo* e *in vitro* apresentaram as maiores concentrações dessas substâncias, com equivalência de 144,45 e 141,07 μg de ácido gálico/mg de extrato, respectivamente. A análise das amostras de extratos de calos obtidos na presença de TDZ (13,6; 18,1; 22,7; 27,2; 31,8 μM), em diferentes temperaturas (25 ou $30 \pm 2^\circ\text{C}$), revelou que o extrato preparado a partir de calos derivados de segmentos internodais cultivados em meio suplementado com TDZ a 13,6 μM , na temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, apresentou a maior concentração de fenóis totais ($75,32 \pm 6,97 \mu\text{g}$ de ácido gálico/mg extrato) (Tabela 6 e 7).

Tabela 6 - Conteúdo de fenóis totais em extratos metanólicos de calos de *A. repens* provenientes de segmentos nodais e internodais cultivados em resposta a diferentes concentrações de TDZ, em duas diferentes temperaturas.

Material vegetal (2000 mg/L)	Concentração de TDZ (μM)	EAG (500mg/L)	
		$25 \pm 2^\circ\text{C}$	$30 \pm 2^\circ\text{C}$
Calo nodal	13,6	$49,09 \pm 2,99^c$	$49,60 \pm 7,08^a$
	18,1	$52,29 \pm 1,56^c$	$15,08 \pm 1,61^c$
	22,7	$52,38 \pm 5,10^c$	$10,50 \pm 0,61^{de}$
	27,2	$52,72 \pm 1,82^c$	$2,59 \pm 0,83^g$
	31,8	$30,38 \pm 2,80^d$	$5,76 \pm 0,44^f$
Calo internodal	13,6	$75,32 \pm 6,97^a$	$2,99 \pm 0,97^g$
	18,1	$42,25 \pm 10,42^c$	$9,55 \pm 3,02^d$
	22,7	$27,18 \pm 0,65^d$	$21,35 \pm 1,32^b$
	27,2	$49,69 \pm 6,74^c$	$11,75 \pm 1,27^d$
	31,8	$67,09 \pm 7,46^{ab}$	$9,83 \pm 0,29^e$

Notas: 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; Os dados foram analisados de acordo com a temperatura.

Tabela 7 - Conteúdo de fenóis totais em extratos metanólicos de *A. repens* provenientes de segmentos nodais e internodais cultivados *in vitro* e *in vivo*.

Material vegetal	EAG (500mg/L)	
	<i>In vitro</i>	<i>In vivo</i>
Folha	141,07	144,45
Caule	7,79	107,35
Raiz	19,44	28,82

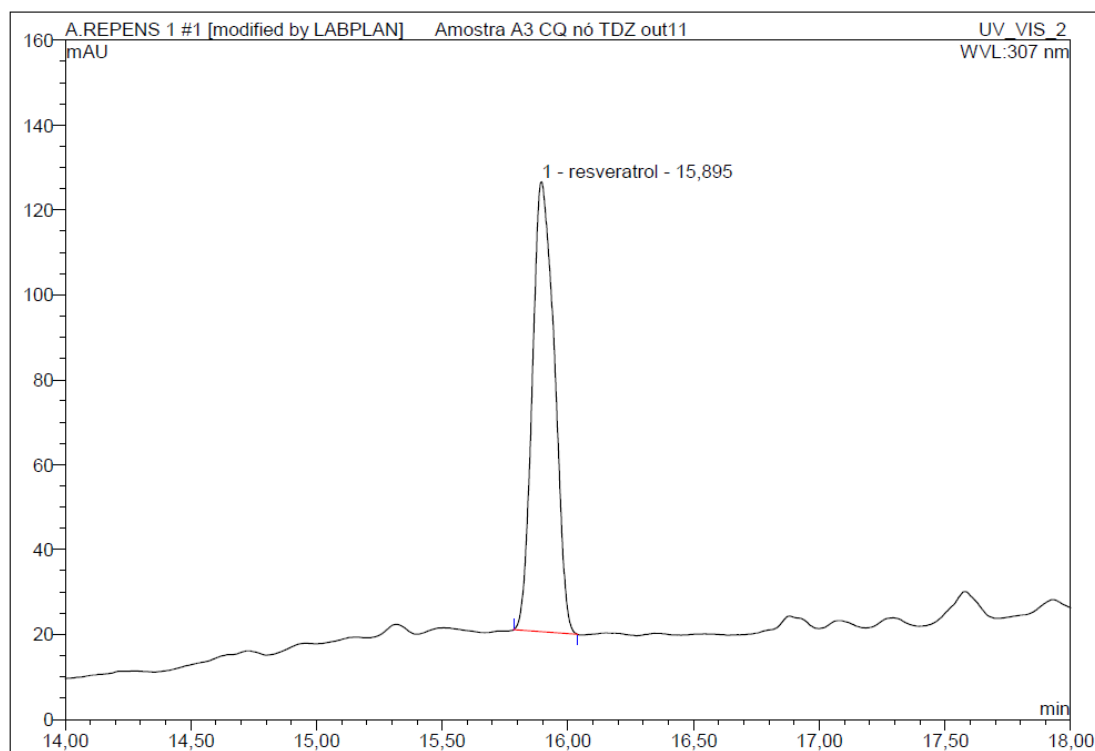
4.4 Análise fitoquímica

4.4.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Foram inicialmente testados diferentes métodos de análise das amostras, variando-se as proporções dos solventes da fase móvel e a temperatura, com o objetivo de determinar o método mais adequado para a separação do pico correspondente ao resveratrol nos materiais a serem estudados.

O teor encontrado variou entre os extratos de calos provenientes de segmentos nodais e internodais obtidos em diferentes concentrações de TDZ, sendo os maiores valores obtidos em resposta à menor concentração de TDZ (13,6 μM) testada (Figura 19) (Tabela 8). Em concentrações mais elevadas, houve uma redução do teor de resveratrol (Tabela 8), associada ao surgimento de novos picos nos cromatogramas (dados não apresentados).

O teor de resveratrol obtido nos calos provenientes dos meios suplementados com diferentes concentrações de TDZ foi mais elevado, cerca de 10x, em relação aos materiais *in vitro* e *in vivo*. Além disso, o teor de resveratrol nos extratos de plantas *in vitro* foi mais elevado em comparação com as plantas *in vivo* (Tabela 9).



No.	Ret.Time min	Peak Name	Height mAU	Area mAU*min	Rel.Area %	Amount mg/L	Type
1	15,90	resveratrol	106,001	10,762	100,00	4,544	BMB*
Total:			106,001	10,762	100,00	4,544	

Figura 19 - Cromatograma de CLAE de extrato metanólico de calos de *A. repens* obtido em resposta a TDZ (13,6 μ M; 28°C).

Tabela 8 - Concentração de resveratrol em extratos metanólicos de calos de *A. repens*, provenientes de segmentos nodais e internodais cultivados em diferentes concentrações de TDZ, incubados em duas diferentes temperaturas.

Material vegetal	Concentração de TDZ (μ M)	Concentração de resveratrol μ g/mg	
		25°C	30°C
Calo nodal	13,6	1,70	4,54
	18,1	3,82	3,86
	22,7	2,61	1,83
	27,2	2,62	2,80
	31,8	1,62	1,94
Calo internodal	13,6	5,07	2,47
	18,1	2,44	0,52
	22,7	1,02	0,50
	27,2	0,76	0,96
	31,8	0,31	1,42

Tabela 9 - Concentração de resveratrol obtida em extratos de folíolos, raízes e de segmentos caulinares de plantas mantidas *in vivo* e *in vitro*.

Material vegetal	Resveratrol $\mu\text{g}/\text{mg}$	
	<i>In vivo</i>	<i>In vitro</i>
Seg. foliolares	0,16	0,16
Seg. caulinares	0,18	2,77
Seg. radiculares	0,53	1,88

5 DISCUSSÃO

Diversas substâncias bioativas já foram identificadas entre as espécies do gênero *Arachis*, sendo sua produção associada a diferentes processos fisiológicos. O amendoim comestível é a espécie mais estudada do gênero, com diferentes compostos descritos e associados a efeitos benéficos à saúde humana (BALASUBAHINI *et al.*, 2003; ONO *et al.*, 2005; LEE *et al.*, 2007). Considerando o potencial para a produção de substâncias bioativas, e levando-se em conta a escassez de estudos envolvendo outras espécies do gênero, o objetivo deste trabalho foi o estabelecimento de diferentes metodologias de cultura *in vitro* para a *A. repens*, visando à identificação de moléculas bioativas em extratos dos materiais produzidos *in vitro* e obtidos *in vivo*.

O sucesso da cultura de tecidos vegetais depende, em parte, de medidas de controle e prevenção da contaminação microbiana (SILVA *et al.*, 2009) para proporcionar um ambiente asséptico (DANTAS *et al.*, 2002). A contaminação do meio de cultura leva a uma competição por nutrientes entre explantes e microorganismos. Além disso, os microorganismos eliminam metabólitos tóxicos no meio de cultura e podem ocasionar a morte do explante (PEREIRA *et al.*, 2003).

Diversas pesquisas já foram realizadas para prevenir ou eliminar a contaminação no cultivo *in vitro*, que vão desde medidas assépticas e tratamentos das plantas matrizes até a utilização de produtos antimicrobianos adicionados ao meio de cultura (ERIG & SCHUCH, 2003; SILVA *et al.*, 2003; PEREIRA & FORTES, 2003; HANDA *et al.*, 2005). Diferentes protocolos de descontaminação são adotados por diversos autores, incluindo o uso de substâncias como HgCl₂ e a adição de antibióticos ao meio de cultura (GARCIA & RAFAEL, 1990; LEIFERT *et al.*, 1991; BUCKLEY *et al.*, 1995; TAMPRASERT & REED, 1998; REED *et al.*, 1998).

Neste trabalho, para o estabelecimento de culturas *in vitro*, foi utilizado um tratamento com HgCl₂ a 0,1% por 5 min, que resultou em um percentual de 70% de descontaminação. Os períodos de exposição e o tamanho dos segmentos caulinares utilizados para a descontaminação foram fatores determinantes na eficiência do tratamento. Períodos mais curtos não proporcionaram descontaminação e períodos mais longos resultaram em altas taxas de oxidação do material vegetal. Segmentos caulinares com tamanho médio de 3,0 cm apresentaram altas taxas de oxidação, enquanto que segmentos com aproximadamente 5,0 cm apresentaram as menores taxas de oxidação e as maiores taxas de descontaminação. A adição

de Agrimicina® ao meio de cultura foi necessária, contribuindo para uma melhor taxa de descontaminação do material vegetal, confirmando o trabalho anterior realizado por Soares (2010).

O enraizamento dos brotos *in vitro* ocorreu espontaneamente após 40 dias, sem a necessidade da adição de reguladores de crescimento ao meio de cultura. As plantas de *A. repens* produzidas *in vitro* foram então utilizadas como fontes de explantes para a micropropagação e a indução de calogênese. Segmentos nodais, internodais e foliares apresentaram respostas morfogênicas distintas, de acordo com a temperatura e os reguladores de crescimento utilizados. A produção de brotos foi observada em resposta a BAP, TDZ e combinações de KIN e AIA. Em trabalhos realizados por Gagliardi *et al.* (2000, 2004) com *Arachis retusa* Krapov. & W.C. Gregory, a adição da citocinina BAP a 8,8 μM ao meio de cultura resultou em organogênese direta e indireta a partir de explantes de eixos embrionários. Em trabalhos realizados por Pacheco *et al.* (2007) em explantes de *Arachis archeri* Krapov. & W.C. Gregory, *Arachis porphyrocalix* Valls & C.E. Simpson e *Arachis appressipila* Krapov. & W.C. Gregory, houve a formação de calos embriogênicos em resposta ao mesmo regulador de crescimento, em frequências entre 17 e 100% e a produção de até 158 embriões por explantes. Por outro lado, estudos realizados com *Arachis hypogaea* por Furtado *et al.* (2007) com a comparação de BAP, TDZ e KIN, o melhor resultado para multibrotação foi obtido em resposta a TDZ a 22,7 μM .

A indução de calogênese ocorreu em resposta a quase todos os reguladores de crescimento testados, com a formação de calos compactos, friáveis ou mistos, morfogênicos ou não morfogênicos. Porém, os calos derivados da cultura de segmentos nodais e internodais em meio suplementado com TDZ nas diversas concentrações testadas apresentaram a maior produção de biomassa em relação aos outros reguladores de crescimento. A resposta ao TDZ varia de acordo com a espécie. Em *Cajanus cajan*, menores concentrações de TDZ induziram a formação de brotos e em concentrações mais elevadas houve uma mudança na via de regeneração, levando à formação de embriões somáticos (Singh *et al.*, 2003). Por outro lado, em *Echinacea purpurea*, a mesma concentração de TDZ induziu dois tipos de respostas, embriogênese somática e organogênese (Jones *et al.*, 2007).

A maioria dos trabalhos realizados com espécies do gênero *Arachis* tem relatado a ocorrência de organogênese a partir de explantes cultivados em meios suplementados com auxinas e/ou citocininas (BAJAJ *et al.*, 1981; BURTNIK & MROGINSKI, 1985; MCKENTLY *et al.*, 1991; CHENG *et al.*, 1992; CHENGALRAYAN *et al.*, 2001).

A suplementação do meio de cultura com citocininas isoladas ou em combinação com auxinas é frequentemente empregada para a indução de organogênese em espécies do gênero *Arachis* (BAJAJ *et al.*, 1981; BURTNIK & MROGINSKI, 1985; MCKENTLY *et al.*, 1991; CHENG *et al.*, 1992; CHENGALRAYAN *et al.*, 2001). Além disso, os principais tipos de explantes utilizados são sementes, eixos embrionários, cotilédones ou hipocótilos. Outros estudos obtiveram a regeneração de plantas em algumas espécies de *Arachis* e em outras leguminosas usando apenas citocininas (GILL & OZIAS-AKINS, 1999; RADHAKRISHNAN *et al.*, 2000; SINGH *et al.*, 2003).

Além das condições de cultura e do tipo de explante, o genótipo desempenha um importante papel na indução da resposta morfogênica ao regulador de crescimento (MROGINSKI *et al.*, 1981; MCKENTLY *et al.*, 1991.) e pode explicar a diferença de respostas obtidas em várias espécies (BANERJEE *et al.*, 2007).

Com o objetivo de avaliar o material vegetal produzido *in vitro*, os calos de *A. repens* originados a partir do meio suplementado com TDZ foram utilizados para os estudos fitoquímicos realizados neste trabalho.

A presença de polifenóis foi observada pelo método de Folin-Ciocalteu, que mostrou uma redução dos radicais livres pelos extratos dos materiais produzidos *in vitro* e obtidos *in vivo*. Os extratos obtidos a partir de folhas de plantas *in vivo* apresentaram a maior concentração de fenóis totais e a maior capacidade de redução do radical DPPH, em relação aos extratos dos outros materiais *in vivo* e *in vitro*. A análise da produção de substâncias com potencial antioxidante em *A. repens* foi realizada pela primeira vez neste trabalho.

Durante a última década, os polifenóis passaram a ser considerados antioxidantes potenciais para a proteção de constituintes celulares contra danos oxidativos, por atuarem na captura das EROs, permitindo a neutralização ou o sequestro dos radicais livres, reduzindo e quelando íons férricos que catalisam a peroxidação lipídica, agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo (HASLAM, 1996; AL-MAMARY *et al.*, 2002; NAHAR & SARKER, 2005; CHUN *et al.*, 2005; DELAZAR *et al.*, 2006). Portanto, os polifenóis estão relacionados à redução do risco de várias doenças degenerativas associadas ao estresse oxidativo (SCALBERT *et al.*, 2005). Dessa forma, as substâncias antioxidantes de ocorrência natural vêm ganhando destaque, sobretudo por inibirem a peroxidação lipídica e a lipoxigenase *in vitro* (HASLAM, 1996).

O conteúdo de fenóis totais encontrado em *A. repens* (equivalência de 144,45 µg de ácido gálico/mg de extrato) pode ser considerado alto quando comparado com teores relatados em trabalhos com outros gêneros. Sarkar *et al.* (2009) observaram valores de EAG em torno

de 91,47 μg de ácido gálico/mg de extrato de *Spondias pinnata*. Além disso, Sousa *et al.* (2007) encontraram valores de 45,82; 66,14; 38,70 e 11,55 mg de EAG/g de material vegetal em espécies dos gêneros *Terminalia*, *Cenostigmata*, *Qualea* e *Copernia*, respectivamente. Já em trabalhos realizados por Camargo *et al.* (2008) com duas cultivares de *Arachis hypogaea* (IAC-Tatu ST e IAC-Runner 886), foram determinados teores de compostos fenólicos totais de $33,27 \pm 0,3$ e $51,59 \pm 7,1$ mg.g⁻¹ de extrato respectivamente.

Além da avaliação de produção de polifenóis em extratos de *A. repens*, a capacidade de redução do radical DPPH também foi avaliada neste trabalho. Os extratos preparados a partir de folhas de plantas *in vivo* apresentaram poder redutor de 90,68%, corroborando resultados descritos para *Arachis hypogaea* (YEN & DUH, 1995; NEPOTE *et al.*, 2002), onde foram obtidos valores de inibição do radical DPPH em torno de 90%. Nos trabalhos realizados por Camargo *et al.* (2008) com as cultivares IAC-Tatu ST e IAC-Runner 886 de *Arachis hypogaea*, o poder redutor do DPPH foi de $51,90 \pm 15,2$ e $39,76 \pm 13,7\%$ respectivamente.

De acordo com esses resultados, podemos sugerir que o extrato bruto de folhas de plantas de *A. repens* mantidas *in vivo* apresenta um teor de fenóis totais relativamente alto, o que pode estar associado à atividade antioxidante, devido às propriedades redutoras e estrutura química dessas substâncias. Uma das moléculas bioativas já descritas em amendoim é o resveratrol, substância associada à redução do risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares e câncer. Neste trabalho, a determinação da presença de resveratrol em *A. repens* foi realizada por CLAE, em materiais obtidos *in vivo* e *in vitro*. Os teores mais significativos foram observados em calos derivados de segmentos nodais e intermodais em resposta a TDZ a 13,6 μM . De uma maneira geral, valores mais significativos de resveratrol foram observados em extratos derivados de calos em meio suplementado com as menores concentrações de TDZ testadas.

O teor de resveratrol encontrado em *A. repens* neste trabalho é equivalente ao relatado na literatura para o gênero *Arachis*. Coodsey *et al.* (1988), Ku *et al.* (2005) e Yang *et al.* (2010), observaram teores de 4,3; 3,93 e 2,13 $\mu\text{g/g}$ de resveratrol, respectivamente, em culturas de calos de *Arachis hypogaea* elicitadas por microorganismos ou UV-C. Estes mesmos autores não detectaram resveratrol em culturas não elicitadas. Levando-se em consideração que as culturas de calos de *A. repens* não sofreram nenhum tipo de elicitação, os teores de resveratrol encontrados neste trabalho são cerca de 1,5x maiores que os encontrados na literatura.

Os resultados alcançados neste trabalho demonstram que os sistemas de cultura de tecidos podem ser utilizados para a modulação da produção *in vitro* de substâncias bioativas em *A. repens*, contribuindo para expandir o conhecimento e uma maior utilização da espécie.

6 CONCLUSÕES

- O protocolo de descontaminação mais eficiente foi obtido com HgCl_2 a 0,1% por 5 minutos. Segmentos caulinares menores que 5cm apresentaram altas taxas de oxidação;
- Meios suplementados com BAP 8,8 μM (25°C) induziram maior proliferação de brotos a partir de segmentos nodais;
- A maior produção de biomassa de calos obtidos a partir de segmentos nodais cultivados a 30°C foi observada em meios suplementados com TDZ a 27,2 μM ;
- Extratos metanólicos de folhas *in vivo* apresentaram a maior capacidade de sequestro do radical DPPH (90,68%);
- A maior concentração de fenóis totais (144,45 μg em EAG) foi obtida em extratos de folhas *in vivo*;
- A maior concentração de resveratrol (5,07 $\mu\text{g}/\text{mg}$) foi observada em extratos metanólicos de calos provenientes de explantes internodais, obtidos em resposta a TDZ 13,6 μM cultivados a temperatura de 25°C com a concentração de.

Perspectivas

- Otimizar os sistemas de cultura *in vitro*, com a análise de outros reguladores de crescimento;
- Analisar diferentes métodos de preparo de extratos para avaliação da produção de moléculas bioativas em plantas *in vivo* e em materiais obtidos *in vitro*;
- Estudar o efeito da elicitação por diferentes agentes na produção de resveratrol;
- Determinar o perfil cromatográfico dos diferentes materiais e definir a natureza fitoquímica dos picos mais significativos encontrados.

REFERÊNCIAS

- AL-MAMARY, M.; AL-MEERI, A.; AL-HABORI M. Antioxidant activities and total phenolics of different types of Honey. *Nutr Res*, v. 22, p. 1041-1047, 2002.
- ANDRADE, J. C. M.; TAVARES, S. R. L.; MAHLER, C. F. *O uso de plantas na melhoria da qualidade ambiental*. São Paulo: Oficina de textos, 2007.
- ARDESTANI A.; YAZDANPARAST R. Antioxidant and free radical scavenging potential of Achillea santolina extracts. *Food Chemistry*. v. 104, p. 21-29, 2007.
- AWAD, M. A.; DE JAGER, A.; VAN WESTING, L. M. Flavonoid and chlorogenic acid levels in apple fruit characterization of variation. *Science Horticultural*, v. 83, n. 3-4, p. 249-263, 2000.
- BAJAJ, Y. P. S.; RAM A. K.; LABANA K. S.; SINGH H. Regeneration of genetically variable plants from the another-derived callus of *Arachis hypogaea* and *Arachis villosa*. *Plant Science Letters*, v. 23: p. 35-39, 1981.
- BALASUBAHINI, S.M.; RUKKUMANI, R.; MENON, V.P. Protective effects of ferulic acid on hyperlipidemic diabetic rats. *Acta Diabetol*. v. 40, p. 118-122, 2003.
- BANERJEE, P.; MAITY S.; MAITI, S. S.; BANERJEE, N. Influence of genotype on *in vitro* multiplication potential of *Arachis hypogaea* L. *Acta Botanica Croatica*, v. 66, p. 15-23, 2007.
- SARKAR, R.; HAZRA, B.; MANDAL, S.; BISWAS, S.; MANDAL, N. Assessment of *in vitro* Antioxidant and Free Radical Scavenging Activity of *Cajanus cajan*. *Journal of Complementary and Integrative Medicine*, v. 6, n. 1, p.1553-3840, sep. 2009.
- BONOLI, M.; VERARDO, V.; MARCONI, E.; CABONI, M. F. Antioxidant phenols in barley (*Ordeum vulgare* L.) flour: Comparative spectrophotometric study among extraction methods of free and bound phenolic compounds. *Journal Agriculture Food Chemistry*, n.52, p. 5192-5200, 2004.
- BRACA, A.; SORTINO, C.; POLITI, M.; MORELLI, I.; MENDEZ, J. Antioxidant activity of flavonoids from *L. licaniaeflora*. *J Ethnopharmacol*, n.79, p.379-381, 2002.
- BUCKLEY, P.; DeWILDE, T.; REED, B. Characterization and identification of bacteria isolated from micropropagated mint plants. *In Vitro Cell. Dev. Biol*, v.31, p. 58-64, 1995.
- BURTNIK, O. J.; MROGINSKI, L. A. Regeneración de plantas de *Arachis Pintoi* (*Leguminosae*) por cultivo *in vitro* de tejidos foliares. *Oleagineux* , v.40, p.609-611, 1985.
- CAI, Y.; LUO, Q.; SUN, M.; CORKE, H. Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life Science*, v.74, p. 2157-2184, 2004.

- CAMARGO, A. C.; CANNIATTI-BRAZACA, S. G.; MANSI, D. N.; DOMINGUES, M. A. C.; ARTHUR, V. Gamma radiation effects at color, antioxidant capacity and fatty acid profile in peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas*, v. 31, p. 11-15, 2011.
- CHANWITHEESUK, A.; TEERAWUTGULRAG, A.; RAKARIYATHAM, N. Screening of antioxidant activity and antioxidant compounds of some edible plants of Thailand. *Food Chemistry*, v. 92, p.491-497, 2005.
- CHARITHA, D. M.; REDDY, M. N. Phenolic acid metabolism of groundnut (*Arachis hypogaea* L.) plants inoculated with VAM fungus and Rhizobium. *Plant Growth Regulation*, v.37, p.151-156, 2002.
- CHEN, R. S.; WU, P. L.; CHIOU, R. Y. Y. Peanut Roots as a Source of Resveratrol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.50, n.6, p.1665 - 1667, 2002.
- CHENG, M.; HIS, D. C. H.; PHILLIPS, G. C. *In vitro* regeneration of Valencia-type peanut (*Arachis hypogaea* L.) from cultured petiolules, epicotyl sections and other seedling explants. *Peanut Science*, v.19, p.82-87, 1992.
- CHENGALRAYAN, K.; HAZRA, S.; GALLO-MEAGHER, M. Histological analysis of somatic embryogenesis and organogenesis induced from mature zygotic embryo-derived leaflets of peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Plant Science*, v.161, p.415-421, 2001.
- CHUN, S.S.; VATTEM, A.V.; LIN, Y.T. AND SHETTY, K. Phenolic antioxidants from clonal oregano (*Origanum vulgare*) with antimicrobial activity against *Helicobacter pylori*. *Proces Biochemistry*, n.40, 809-816, 2005.
- CLARKSON, P. M.; THOMPSON, H. S. *Antioxidants: what role do they play in physical activity an health.* *Am j Clin Nutr*, v.72, p. 637-646, 2000.
- COODSEY, C. J.; GARRATT, P. S.; RICHARDS, S. E.; STRANGE, R. N. A dienylyl stilbene from *Arachis hypogaea*. *Phytochemistry*, v. 27, p. 1015-1016, 1988.
- CROTEAU R, KUTCHAN TM, LEWIS NG. *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. Rockville, MD: American Society of Plant Physiologists, 2000. p. 1250–1318.
- DANTAS, S.; OLIVEIRA, S.; CÂMARA, T. Contaminação microbiana no cultivo *in vitro* de plantas. In: LUZ, W. C. da (Org.). *Revisão anual de patologia de plantas*. 10. ed. Passo Fundo, RS: RAPP, 2002. v.10, p. 391-407
- DELAZAR, A.; TALISCHI, B.; NAZEMIYEH, H.; REZAZADEH, H.; NAHAR, L. ;SARKER, S.D. Chrozophorin: a new acylated flavone glucoside from *Chrozophora tinctoria* (Euphorbiaceae). *Revista Brasileira Farmacognosia*, v. 16, p. 286-290, 2006.
- EDWARDS, C.; STRANGE, R. N. Separation and identification of phytoalexins from leaves of groundnut (*Arachis hypogaea*) and development of a method for their determination by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J Chromatog A*, n.547, p.185-193, 1991.

EDWARDS, C.; STRANGE, R. N. ; COLE, D. L. Accumulation of Isoflavonoid Phytoalexins in Leaves of *Arachis hypogaea* Differing in Reaction to Rust (Puccinia-Arachidis) and Early Leafspot (Cercospora-Arachidicola). *Plant Pathol*, n.44, 573-579, 1995.

ERIG, A. C.; SCHUCH, M. W. Tipo de explante e controle da contaminação e oxidação no estabelecimento *in vitro* de plantas de Macieira (*Malus domestica* Borkh.) CVS, Maxigala e Mastergala. *Revista Brasileira de Agrociência*, n. 3, v.9, p. 221-227, 2003.

Flick. 2011. Disponível em: <<http://www.flickr.com/photos/mercadanteweb/page25/>>. Acesso em: 19 de dez. 2011.

FRASER. J.D.; URBAN. R.G.; STROMINGERDJ. L.; ROBINSON. H. Zinc regulates the function of two superantigens. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, n.89, p.5507-5511, 1992.

FREITAS, F.O. Ampliação da área de ocorrência da espécie *Arachis villosulicarpa* Hoehne. *Comunicado Técnico*, n. 106, maio 2004.

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

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

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

GARCIA, E. V.; RAFAEL, M. Control de la oxidacion y contaminacion em microesquejes de café (*Coffea arabica* “Catimor”) cultivados *in vitro*. *Agronomia Tropical*, v.40, p. 281-290, 1990.

GAYDOU, E. M.; BIANCHINI, J. P.; RATOVOHERY, J. V. Triterpene alcohols, methylsterols, sterols, and fatty acids in five Malagasy legume seed oils. *J Agric Food Chem*, n.31, 833-836, 1983.

GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; GEERT-JAN K. Plant propagation by tissue culture. 3rd. Dordrecht, Netherlands ; Norwell, MA, U.S.A.: Springer, 2008. (Volume 1- The Background)

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

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Brasília, DF: Ministério da Agricultura, 1998. v. 1, p. 183-242.

- GROSSO, N. R.; ZYGADLO, J. A.; BURRONI, L. V.; GUZMAN, C. A. Fatty acid, sterol and proximate compositions of peanut species (*Arachis L.*) seeds from Bolivia and Argentina. *Grasas Y Aceites*, n.48, p.219-225, 1997.
- GROSSO, N. R.; NEPOTE, V.; GUZMAN, C. A. Chemical 533 composition of some wild peanut species (*Arachis L.*) seeds. *J Agric Food Chem*, 48, p.806-9, 2000.
- HALLIWELL. B.; ZHAO. K.; WHITEMAN. M. Nitric oxide and peroxyxynitrite: the ugly, the uglier and the not so good: a personal view of recent controversies. *Free Radic Res*, n.31, p.651-669, 1999.
- HAMMONS, R. O. The origin and history of the groundnut. In: SMARTT, J. *The Groundnut Crop. A scientific basis for improvement*. London: Chapman & Hall, 1994. cap. 2, p.24-42.
- HANDA, L.; SAMPAIO, P.; QUISEN, R. Cultura *in vitro* de embriões e de gemas de mudas de pau-rosa (*Aniba rosaodora* Ducke). *Acta amazônica*, v.35, p. 29-33, 2005.
- HASLAM, E. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible modes of action. *Journal of Natural Products*, v. 59, p. 205-215, 1996.
- HILLIS, W.E.; HART, J.H. & YAZAKI, Y. Polyphenols of *Eucalyptus sideroxylon*. *Phytochemistry* (Oxford), v.13, n.8, p. 1591-1959, 1974.
- HOFMAN, C. L. *The Native Population of Pre-columbian Saba. Pottery Styles and their Interpretations*. Tese(Ph.D. Dissertation) - University Leiden , Faculty of Archaeology, Leiden, 1993. Pt. 1.
- INGHAM, J. L. 3,5,4'-trihydroxystilbene as a phytoalexin from groundnuts (*Arachis hypogaea*). *Phytochemistry*, n.15, 1791-1793, 1976.
- JANG, M.; CAI, L.; UDEANI G.O.; SLOWING, K.V.; THOMAS, C.F.; BEECHER, C.W.W.; FONG, H.H.; FARNSWORTH, N.R.; KINGHORN, A.D.; METHA, R.G.; MOON, R.C. ; PEZZUTO, J.M. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science*, n. 275 p.218-220, 1997.
- JONES MPA, YI Z, MURCH SJ, SAXENA PK. Thidiazuroninduced regeneration of *Echinacea purpurea* L.: micropropagation in solid and liquid culture systems. *Plant Cell Reports*, v. 26, p. 13-19, 2007.
- KERBAUY, G. B. Clonagem de plantas *in vitro*. *Biotecnologia ciência e Desenvolvimento*, Brasília, v. 1, n. 1, p. 30-33, 1997.
- KERRIDGE, P.C.; HARDY, B. *Biology and agronomy of forage Arachis*. Cali, Colombia: CIAT, 1994.
- 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 J Biotechnol*, n.7, p.3788-3790, 2006.

KIM, H.J.; WAATAJA J.J.; THAYER S.A. Cannabinoids inhibit networkdriven synapse loss between hippocampal neurons in culture. *J Pharmacol Exp Ther*, n.325, p.850– 858, 2008.

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

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

KU K.;L.; CHANG P.S.; CHENG Y.C.; LIEN C.Y.. Production of Stilbenoids from the Callus of *Arachis hypogaea*: a Novel Source of the Anticancer Compound Piceatannol. *J. Agric. Food Chem*, v. 53, p. 3877-3881, 2005.

KUBO, M.; KIMURA, Y.; SHIN, H.; HANEDA, T.; TANI, T. & NAMBA, K. Studies on the antifungal substance of crude drug: 2. On the roots of *Polygonum cuspidatum* (Poligonaceae). *Shoyakugaku Zasshe*, v. 35, n. 1, p. 58-61, 1981.

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

LEE, J. H.; BAEK, I. Y.; KANG, N. S.; KO, J. M.; KIM, H. 483 T.; JUNG, C. S.; PARK, K. Y.; AHN, Y. S.; SUH, D. Y.; HA, T. J. Identification of phenolic compounds and antioxidant effects from the exudate of germinating peanut (*Arachis hypogaea*). *Food Sci Biotech*, n.16, p.29-36, 2007.

LEIFERT, C.; RITCHIE, J. Y.; WAITES, W. M. Contaminantes of plant-tissue and cell cultures. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v.7, p. 452-469, 1991.

LIMA A.R, BARBOSA V.C, SANTOS FILHO P.R, GOUVÊA C.M.C.P. Avaliação in vitro da atividade antioxidante do extrato hidroalcoólico de folhas de bardana. *Rev Bras Farmacogn.*, v. 16, p. 531-536, 2006.

LIU, J.; WANG, G.; WANG, G. Chemical constituents in aerial parts of *Arachis hypogaea* (III). *Chinese Traditional Patent Medicine*, v.31, p. 1902-1903, 2009.

MAXWELL, D.G. *Measuring food insecurity. The frequency and severity of "coping strategies"*. Washington, DC: International Food Policy Research Institute. 1995. (Discussion Paper n. 8)

MCKENTLY AH, MOORE GA, GARDNER FP. Regeneration of peanut and perennial peanut from cultured leaf tissue. *Crop Science*, v. 31, p. 833-837, 1991.

MOREIRA D.L, ENGELHARDT R.L, REIS A.S, SANCHES E.M, LEITÃO S.G, LEITÃO G.G. Substâncias fenólicas com atividade antioxidante de *Pseudopiptadenia contorta* (Leguminosae-Mimosoideae). *Rev Bras Farmacogn*, v.12, p.124-125, 2002.

MROGINSKI E, REY HY, GONZALEZ AM, MROGINSKI LA. Thidiazuron promotes *in vitro* plant regeneration of *Arachis correntina* (Leguminosae) via organogenesis. *Journal PlantGrowth Regulation*, v. 23, p. 129-134, 2004.

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

NAHAR, L. & SARKER, S.D. Chenoalbuside: an antioxidant phenolic glycoside from the seeds of *Chenopodium album*L. (Chenopodiaceae). *Revista Brasileira de Farmacogn*, v. 15, p. 279-282, 2005.

NEPOTE, V.; GROSSO, N.R.; GUZMAN, C.A. Extraction of antioxidant components from peanut skin. *Grasas y aceites*, v. 53, n. 4, p. 391-395, 2002.

NIKI, E., NOGUSHI, N., TSUCHIHASHI, H., GOTOH, N. Interaction among vitamin C, vitamin E, and b-carotene. *American Journal of Clinical Nutrition*, v.62, n.6, p.1322-1326, 1995.

ONO, K.; HIROHATA, M.; YAMADA, M. Ferulic acid destabilizes preformed b- amyloidi fibrils *in vitro*. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, v. 336, p. 444-449, 2005.

PACHECO, G.; GAGLIARDI, R.F.; CARNEIRO, L.A.; CALLADO, C.H.; VALLS, J.F.M.; MANSUR, E. 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*, v. 88, n. 2, p. 121-126, 2007.

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

PATOCKA, J. “Biologically active pentacyclic triterpenes and their current medicine signification”. *Journal of Applied Biomedicine*, v.1, p.7-12, 2003.

PENNINGTON, B. F. *The development of psychopathology*. New York: Guilford. 2002.

PEREIRA, J.; FORTES, G. Toxicidade de antibióticos no cultivo *in vitro* da batata em meios semi-sólido e líquido. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, n.11, v.38, p. 1273-1279, 2003.

PEREIRA, J. C.; VINCENZI, M. L.; LOVATO, P. E. Roland Ristow: uma contribuição ao estudo da agricultura sustentável. *Eisforia*, v. 1, n. 1, p. 63-97, 2003.

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

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

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

RAGAB, A., THOMPSON, E.C., TRAVERS, A.A. High mobility group proteins HMGD and HMGZ interact genetically with the Brahma chromatin remodeling complex in *Drosophila*. *Genetics*, v.172, n.2, p.1069-1078, 2006.

REED, Barbara et al. Internal bacterial contamination of micropropagated hazelnut: Identification and antibiotic treatment. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v.52, p. 67-70, 1998.

RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; MORAIS, S. M.; SAMPAIO, C. G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. D. Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre ABTS. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2007.

SAIKO, P.; SZAKMARY, A.; JAEGER, W.; SZEKERES, T. Resveratrol and its analogs: Defense against cancer, coronary disease and neurodegenerative maladies or just a fad? *Mutation Research Review*, v. 658, n. 1-2, p. 68-94, 2008.

SANTOS, R. M.; VIEIRA, F. A.; FAGUNDES, M.; NUNES, Y. R. F. e GUSMÃO, E. Riqueza e similaridade florística de oito remanescentes florestais no norte de Minas Gerais, Brasil. *Revista Árvore*, v.31, n.1, p.135-144. 2007.

SAUTTER, C.K.; DENARDIN, S.; ALVES, A.O.; MALLMANN, C. A.; PENNA, N.G. ; HECKTHEUER, L.H. Determinação de Resveratrol em sucos de uva no Brasil. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, v.25, n.3, p.437-442, jul./set. 2005.

SAMARTH, R.M.; PANWAR, M.; KUMAR, M.; SONI, A.; KUMAR, M.; KUMAR, A. Evaluation of antioxidant and radicalscavenging activities of certain radioprotective plant extracts. *Food Chem.*, v. 106, p. 868-873, 2008.

SCALBERT. A.; MANACH. C.; MORAND. C.; REMESY, C.; JIMENEZ L. Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 45. p. 287-306, 2005.

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

SHUKLA, S.; MEHTA, A.; JOHN, J.; SINGH, S.; MEHTA, P.; VYAS, S.P. Antioxidant activity and total phenolic content of ethanolic extract of *Caesalpinia bounducella* seeds. *Food Chem Toxicol.*, v. 47, p. 1848-1857, 2009.

SILVA, T. S. et al. The effect of antibiotics on the growth response of chrysanthemum and tobacco stem transverse *in vitro* thin cell layers (tTCLs). *Scientia Horticulture*, v. 97, p. 397-410, 2003.

SILVA I.M, PEIXOTO A.L. Antimicrobial screening of some medicinal plants from Mato-Grosso Cerrado. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, v.19, p. 325-332, 2009.

SINGH ND, SAHOO L, SARIN NB, JAIWAL PK. The effect of thidiazuron on organogenesis and somatic embryogenesis in pigeonpea (*Cajanus cajan* L. Millsp). *Plant Science*, v. 164, p. 341-347, 2003.

- SOARES, B.O. Caracterização botânica de plantas de *Petiveria alliacea* L. ocorrentes no Rio de Janeiro e estabelecimento do cultivo *in vitro*. Monografia de Bacharelado. Departamento de Biologia Vegetal do IBRAG, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, 2010.
- SOBOLEV, V. S.; GUO, B. Z.; HOLBROOK, C. C.; LYNCH, R. E. Interrelationship of phytoalexin production and disease resistance in selected peanut genotypes. *J Agric Food Chem*, v.55, p.2195-200, 2007.
- SOLEAS, G.J; DIAMANDIS, E.P; GOLDBERG, D.M. Resveratrol: a molecule whose time has come? And gone? *Clinical Biochemistry*, v. 30, n.2, p. 91-113, 1997.
- SOUSA, C.M.M.; SILVA, H.R.; VIEIRA-JR, G.M.; AYRES, M.C.C.; COSTA, C.L.S.; ARAÚJO, D.S.; CAVALCANTE, L.C.D.; BARROS, E.D.S.; ARAÚJO, P.B.M.; BRANDÃO, M.S.; CHAVES, M.H. Fenóis Totais E Atividade Antioxidante De Cinco Plantas Medicinais. *Quim. Nova*, v. 30, p. 351-355, 2007.
- SOUZA, G.G.; MENEGHIN, L.O.; COELHO, S.P.; MAIA, J.F; SILVA, A.G. A uva roxa, *Vitis vinifera* L. (Vitaceae) – seus sucos e vinhos na prevenção de doenças cardiovasculares. *Natureza on line*, v. 4, n. 2, p. 80-86. 2006.
- STALKER, H. T. and C. E. SIMPSON. Genetic resources in *Arachis*, In: H. E. Pattee and H. T. Stalker (Ed.). *Advances in Peanut Science*. [S.l]: Amer. Peanut Res. Educ. Soc., 1995. p. 14-53.
- STEVENSON, P. C.; ANDERSON, J. C.; BLANEY, W. M.; SIMMONDS, M. S. J. Developmental inhibition of *Spodoptera litura* (Fab.) larvae by a novel caffeoylquinic acid from the wild groundnut, *Arachis paraguariensis* (Chod et Hassl.). *J Chem Ecol*, v.19, 2917-2933, 1993.
- STERVBO, U.; VANG, O.; BONNESEN, C. A review of the content of the putative chemopreventive phytoalexin resveratrol in red wine. *Food and chemistry*, v.101, n.2, p. 449-457, 2007.
- TANPRESERT, P; REED, B. Detection and identification of bacterial contaminants os strawberry runner explants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v. 52, p. 53-55, 1998.
- TORRES, A.C.; FERREIRA, A.T.; SÁ, F.G.; BUSO, J.A.; CALDAS, L.S.; NASCIMENTO, A.S.; BRÍGIDO, M.M.; ROMANO, E. *Glossário de biotecnologia vegetal*. Brasília, DF: Embrapa Hortaliças, 2000.
- VALENTÃO, P.; FERNANDES, E.; CARVALHO, F.; ANDRADE, P.B.; SEABRA, R.M.; BASTOS, M.L. Antioxidative properties of cardoon (*Cynara cardunculus* L.) infusion against superoxide radical, hydroxyl radical and hypochlorous acid. *J Agric Food Chem.*, v. 50, p. 4989-4993, 2002.
- VALLS, J. F. M. Gênero *arachis* l. (Leguminosae): importante fonte de proteínas na pré-história sul-americana. In: REUNIÃO DA SOCIEDADE DE ARQUEOLOGIA BRASILEIRA, 8, 1996, Porto Alegre. *Anais ...* Porto Alegre: EDIPUCRS, 1996. v.2

VALLS, J. F. M. Diversidade genética no gênero *Arachis* e a origem do amendoim. In: ENCONTRO SOBRE TEMAS DE GENÉTICA E MELHORAMENTO, 17, 2000. Anais... Piracicaba: EMBRAPA, 200.

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

VERPOORTE , R.; MEMELINK , J. Engeneering secondary metabolite in plants. *Cur. Opinion in Biotech.*, v.13, p.181-187, 2002.

YANG, M.H.; KUO, C.H.; HSIEH, W.C.; KU, K.L. Investigation of Microbial Elicitation of *trans*-Resveratrol and *trans*-Piceatannol in Peanut Callus Led to the Application of Chitin as a Potential Elicitor. *J. Agric. Food Chem.*, v. 58 n.17, p. 9537–9541, 2010.

YAZDANPARAST, R., BAHRAMIKIA, S., ARDESTANI, A. Nasturtium officinale reduces oxidative stress and enhances antioxidant capacity in hypercholesterolaemic rats. *Chem. Biol. Interact.*, v. 172, p. 176-184, 2008.

YEN, C.G.; DUH, P.D. Antioxidant activity of methanolic extracts of peanut hulls from various cultivars. *J Am Oil Cem Soc.*, v. 72, p. 1065-1067, 1995.

WANG, M.L.; PITTMAN, R.N. Resveratrol content in seeds of peanut germplasm quantified by HPLC. *Plant Genetic Resources: Characterization and Utilization.*, v. 7, n.1, p. 80-83, 2008.

WU J.H.; TUNG Y.T.; WANG S.Y.; SHYUR L.F.; KUO Y.H.; CHANG S.T.; Phenolic antioxidants from the heartwood of *Acacia confusa*. *J Agric Food Chem*, v. 53, p. 5917-5921, 2005.

ANEXO - Tabela de composição do meio MS

Macronutrientes	Concentração m mol.l ⁻¹
NH ₄ NO ₃	20,6
KNO ₃	18,8
CaCl ₂ .2 H ₂ O	3,0
MgSO ₄ .7 H ₂ O	1,5
KH ₂ PO ₄	1,25
Micronutrientes	
MnSO ₄ .4 H ₂ O	0,100
ZnSO ₄ .7 H ₂ O	0,030
H ₃ BO ₃	0,100
KI	0,005
Na ₂ MoO ₄ .2 H ₂ O	0,001
CuSO ₄ .5 H ₂ O	0,0001
CoCl ₂ .6 H ₂ O	0,0001
FeEDTA	
Na ₂ EDTA.2 H ₂ O	0,100
FeSO ₄ .7 H ₂ O	0,100
Vitaminas e aminoácidos	
Ácido nicotínico	0,004
Piridoxina.HCl	0,0024
Tiamina.HCl	0,0003
Glicina	0,027
Mio-inositol	0,55
Sacarose	87,6