



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

Gabriel Casimiro Lopes Silva Santos

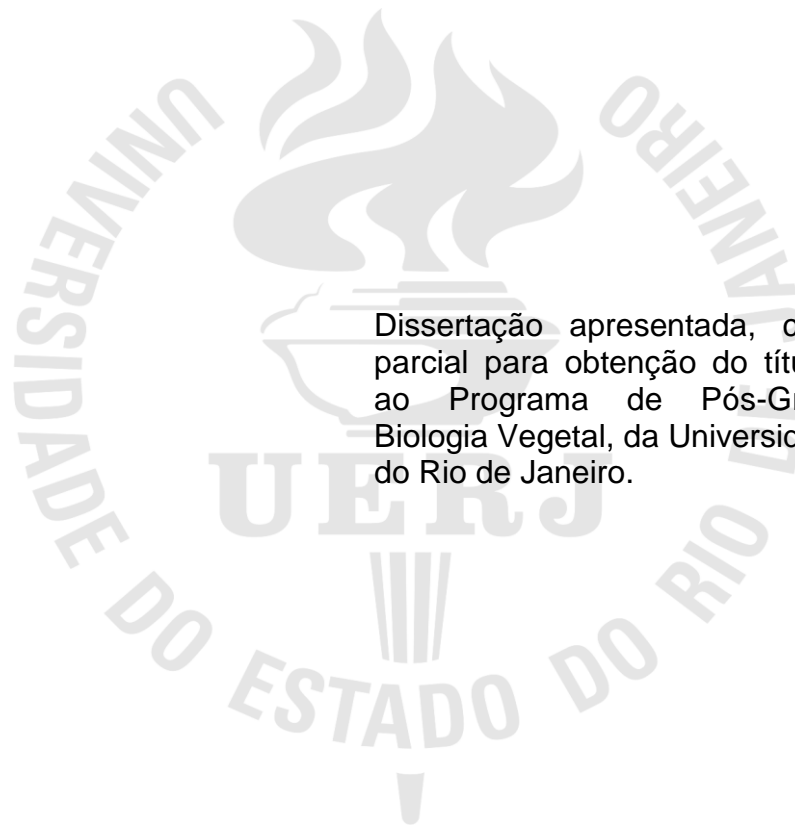
**Determinação de atividade antioxidante, compostos fenólicos totais e teor de resveratrol em cinco cultivares brasileiras de *Arachis hypogaea* L. com a utilização de duas metodologias extrativas**

Rio de Janeiro

2013

Gabriel Casimiro Lopes Silva Santos

**Determinação de atividade antioxidante, compostos fenólicos totais e teor de resveratrol em cinco cultivares brasileiras de *Arachis hypogaea* L. com a utilização de duas metodologias extrativas**



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

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

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

Rio de Janeiro

2013

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

S237 Santos, Gabriel Casimiro Lopes Silva.  
Cultura de tecidos, atividade antioxidante, teor de fenóis totais e  
detecção de resveratrol em *Arachis villosulicarpa* Hoehne L. e cultivares  
de *Arachis hypogaea* L. / Gabriel Casimiro Lopes Silva Santos. – 2013.  
101f : 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 Alcântara Gomes.  
Inclui bibliografia.

1. Amendoim - Teses. 2. Amendoim - Propagação-in-vitro - Teses. 3.  
Antioxidantes - Pesquisa - Teses. I. Oliveira, Elisabeth Atalla Mansur de.  
II. Almeida, Georgia Pacheco Peters de. III. Universidade do Estado do  
Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. IV. Título.

CDU 633.368

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

---

Assinatura

---

Data

Gabriel Casimiro Lopes Silva Santos

**Determinação de atividade antioxidante, compostos fenólicos totais e teor de resveratrol em cinco cultivares brasileiras de *Arachis hypogaea* L. com a utilização de duas metodologias extrativas**

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

Aprovada em 25 de fevereiro de 2013.

Banca Examinadora:

---

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

---

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

---

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

---

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

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Ivana Correa Ramos Leal  
Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ

Rio de Janeiro

2013

## DEDICATÓRIA

À minha família  
Aos meus amigos  
Às minhas orientadoras

## AGRADECIMENTOS

À Prof<sup>a</sup> Dra. Elisabeth Atalla Mansur de Oliveira, orientadora desta dissertação, por todo empenho, sabedoria, compreensão e, acima de tudo, nível de exigência.

À Prof<sup>a</sup> Dra. Georgia Pacheco Peters de Almeida, co-orientadora desta dissertação, por me aconselhar e ajudar em diversos momentos.

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

À Prof<sup>a</sup> Dra. Ivana Correa Ramos Leal e aos integrantes do Grupo de Biocatálise e Síntese Orgânica da Universidade Federal do Rio de Janeiro (BossGroup-UFRJ), em especial ao doutorando Felipe Sutili, que tornaram possível a realização da etapa de extração assistida por micro-ondas.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudos.

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

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

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

À Dra. Renata de Oliveira Garcia, pela amizade e por ter sido uma pessoa de vital importância à realização deste trabalho.

À Prof. Dra. Rachel Fátima Gagliardi Araujo, pelos aconselhamentos e contribuições positivas.

Ao Leonardo Garcia, pela amizade e por estar junto comigo a cada desafio ao longo deste trabalho.

Ao Thiago Saide, por me proporcionar bons momentos de convívio pessoal e profissional.

À Emely Kazan, pelo auxílio extremamente importante na parte referente à análise cromatográfica.

À Camila Caliocane, pela colaboração como estagiária PIBIC durante a realização deste trabalho.

Aos demais integrantes do Laboratório de Micropropagação e Transformação de Plantas (LABMIT): Ana, Bianka, Isabela, Jamine, Juliana Cochofel, Juliana Portella, Liane, Luiz, Marcela, Mariana, Mariela e Nathália pelo apoio e convívio diário.

Ao pessoal do Laboratório de Biotecnologia de Plantas (LABPLAN), nossos queridos “vizinhos” e companheiros no Núcleo de Biotecnologia Vegetal (NBV).

Às secretárias do PGBV, Vera e Teresa, pelo apoio constante.

A meus pais, pelo amor, estímulo e sustento.

À minha família pelo apoio incondicional e por estarem ao meu lado em todos os momentos.

Aos meus amigos, pelos excelentes momentos de convivência.

A todos que contribuíram de alguma forma com a realização deste trabalho.

O cientista não é o homem que fornece as verdadeiras respostas;  
é quem faz as verdadeiras perguntas.

*Claude Lévi-Strauss*



## RESUMO

SANTOS, Gabriel Casimiro Lopes Silva. *Determinação de atividade antioxidante, compostos fenólicos totais e teor de resveratrol em cinco cultivares brasileiras de Arachis hypogaea L. com a utilização de duas metodologias extrativas*. 2013. 101f. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013.

O amendoim *A. hypogaea* L. é a quarta oleaginosa mais consumida no mundo e suas sementes são altamente energéticas, com grandes quantidades de lipídios, proteínas, vitaminas e carboidratos. Diversas atividades farmacológicas já foram observadas em extratos de raízes, folhas e sementes, sendo a principal delas a atividade antioxidante. Neste trabalho, foi realizada a comparação entre duas metodologias (por maceração e assistida por micro-ondas) para a extração de compostos antioxidantes, incluindo o resveratrol. Também foi realizada a comparação entre extratos de diferentes órgãos de cultivares brasileiras (IAC 886, IAC Caiapó, IAC Tatu ST, IAC 8112 e IAC 99-1) quanto à atividade antioxidante, por DPPH, ao teor de compostos fenólicos, por Folin-Ciocalteu, e ao teor de resveratrol, por HPLC. Por fim, foram estabelecidos protocolos de cultura de tecidos para explantes de sementes, visando à produção de calos e plantas *in vitro* para posterior dosagem de compostos de interesse, tendo em vista a possibilidade de modulação das condições *in vitro*. As melhores condições determinadas para a extração por maceração de antioxidantes de *A. hypogaea* foram 80% de etanol em água como solvente, trituração com almofariz e pistilo, 50 mL solvente por grama de material vegetal seco, 120 minutos de incubação e dois estágios de extração. As melhores condições para a extração de resveratrol assistida por micro-ondas foram o uso de 37 mL de solvente/g material vegetal seco, com agitação de 1200 rpm por 15 minutos, a 37°C. De uma maneira geral, os extratos de raízes e oriundos de micro-ondas apresentaram maior atividade antioxidante (até  $92,36 \pm 2,71\%$ ), teor de compostos fenólicos (até  $54,15 \pm 1,39$  mg EAG/g extrato) e teor de resveratrol (até  $1,614 \pm 0,356$  mg/g extrato). Dentre as cultivares estudadas, IAC Tatu e IAC 99-1 foram as que apresentaram os teores mais elevados. Brotos e calos friáveis foram obtidos a partir de cotilédones, eixos embrionários e folíolos embrionários cultivados em meios suplementados com BAP e picloram, respectivamente.

Palavras-chave: *Arachis hypogaea*. DPPH. Folin-Ciocalteu. Cultura de tecidos. Resveratrol. Micro-ondas.

## ABSTRACT

Peanut *A. hypogaea* L. is the fourth most consumed oleaginous in the world and its seeds are high energetic, with high amounts of lipides, proteins, vitamins and carbohydrates. Several pharmacological activities have been observed in extracts of roots, leaves and seeds, especially an antioxidant activity. In this work, the comparison between two extraction methodologies (by maceration and microwave assisted extraction) for the extraction of antioxidant compounds, including resveratrol, was studied. We also carried out a comparison between extracts from different organs of Brazilian cultivars (IAC 886, IAC Caiapó, Tatu ST IAC, IAC 8112 and IAC 99-1) for antioxidant activity by DPPH, the content of phenolic compounds by Folin-Ciocalteu and the resveratrol content by HPLC. Finally, we established tissue culture protocols for seed explants, aiming at the production of *in vitro* plant material for future measurement of compounds of interest in the view of possible modulation of *in vitro* conditions. The best conditions for the extraction of antioxidant from *A. hypogaea* compounds by maceration were 80% of ethanol in water as a solvent, trituration by mortar and pestle, 50 mL solvent/g dry plant, 120 minutes of incubation and two stages of extraction. The best conditions for the extraction of resveratrol assisted by micro-wave were the use of 37 mL of solvent for each gram of dry plant, with 1200 rpm of agitation for 15 minutes, with 37°C. In general, root extracts and assisted by microwave showed higher antioxidant activity (until  $92,36 \pm 2,71\%$ ), phenolic (until  $54,15 \pm 1,39$  mg AGE/g extract) and resveratrol content (until  $1,614 \pm 0,356$  mg/g extract). Among the studied cultivars, IAC Tatu and IAC 99-1 showed the best results. In tissue culture, shoots and friable calli were obtained from cotyledons, embryonic axis and embryonic leaflet cultured in media supplemented with BAP and picloram, respectively.

Keywords: *Arachis hypogaea*. Antioxidant activity. Phenolic content. Tissue culture. Resveratrol. Microwave.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– Área de ocorrência das seções do gênero <i>Arachis</i> .....	17
Figura 2	– Planta de amendoim.....	20
Figura 3	– Subespécies, variedades botânicas e tipos agrônômicos de <i>Arachis hypogaea</i> .....	21
Figura 4	– Principais estilbenos encontrados em <i>A. hypogaea</i> .....	23
Figura 5	– Metabólitos secundários já identificados em espécies do gênero <i>Arachis</i> .....	25
Figura 6	– Curva de concentração-resposta da captura do radical DPPH pela quercetina.....	44
Figura 7	– Curva-padrão de ácido gálico.....	45
Figura 8	– Cromatograma do padrão e do espectro de absorção de luz UV de <i>trans-resveratrol</i> por CLAE.....	46
Figura 9	– Curva-padrão de resveratrol.....	47
Figura 10	– Captura do radical DPPH por extratos de partes aéreas da cultivar IAC Caiapó em diferentes concentrações (2, 5 e 10 mg/mL), com diferentes proporções de etanol em água (20, 40, 60, 80 e 100%)....	49
Figura 11	– Rendimento de extratos de partes aéreas da cultivar IAC Caiapó, preparados em diferentes proporções de etanol em água (20, 40, 60, 80 e 100%).....	50
Figura 12	– Captura do radical DPPH por extratos de partes aéreas da cultivar IAC Caiapó em diferentes concentrações (2, 5 e 10 mg/mL) com diferentes tipos de trituração do material vegetal seco (almofariz e pistilo, moinho e Nitrogênio líquido).....	51
Figura 13	– Rendimento de extratos de partes aéreas da cultivar IAC Caiapó com diferentes tipos de trituração do material vegetal seco (almofariz e pistilo, moinho e Nitrogênio líquido).....	51
Figura 14	– Captura do radical DPPH por extratos de partes aéreas da cultivar IAC Caiapó em diferentes concentrações (2, 5 e 10 mg/mL) com diferentes proporções solvente/sólido para a extração (30, 40, 50, 60 e 70 mL/g).....	52

Figura 15 – Rendimento de extratos de partes aéreas da cultivar IAC Caiapó com diferentes proporções solvente-sólido para a extração (30, 40, 50, 60 e 70 mL/g).....	53
Figura 16 – Captura do radical DPPH por extratos de partes aéreas da cultivar IAC Caiapó em diferentes concentrações (2, 5 e 10 mg/mL) com diferentes tempos de extração (15, 30, 45, 60, 120, 240, 720 e 1440 minutos).....	54
Figura 17 – Rendimento de extratos de partes aéreas da cultivar IAC Caiapó com diferentes tempos de extração (15, 30, 45, 60, 120, 240, 720 e 1440 minutos).....	54
Figura 18 – Captura do radical DPPH por extratos de partes aéreas da cultivar IAC Caiapó em diferentes concentrações (2, 5 e 10 mg/mL) com diferentes estágios de extração (1, 2, 3, 4 e 5).....	55
Figura 19 – Rendimento de extratos de partes aéreas da cultivar IAC Caiapó em diferentes estágios de extração (1, 2, 3, 4 e 5).....	56
Figura 20 – Superfície de resposta (A) e curva de contorno (B) para a extração de resveratrol em função da proporção e da temperatura.....	61
Figura 21 – Superfície de resposta (A) e curva de contorno (B) para a extração de resveratrol em função da agitação e da temperatura.....	61
Figura 22 – Superfície de resposta (A) e curva de contorno (B) para a extração de resveratrol em função da agitação e da proporção.....	62
Figura 23 – Otimização do tempo de extração assistida por micro-ondas.....	63
Figura 24 – Cromatograma da concentração de resveratrol (A) e do espectro de absorção de luz UV (B) pelo extrato de raiz da cultivar IAC Tatu ST oriundo de maceração.....	69
Figura 25 – Formação de calos organogênicos a partir de explantes da cultivar IAC Tatu ST em resposta a BAP 30,8µM, após 45 dias, a 25±2°C. Barra = 1cm.....	70
Figura 26 – Formação de calos friáveis a partir de explantes da cultivar IAC Caiapó, em resposta a PIC 1,25µM, após 45 dias, a 25±2°C. Barra = 1cm.....	72

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Seções e espécies do gênero <i>Arachis</i> .....	18
Quadro 2 – Cultura de tecidos de espécies do gênero <i>Arachis</i> .....	29
Quadro 3 – Cultura de tecidos e produção de metabólitos secundários no gênero <i>Arachis</i> .....	34

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	– Valores reais e codificados para as variáveis independentes utilizadas no planejamento fatorial fracionado ( $2^{3-1}$ ).....	56
Tabela 2	– Planejamento fatorial fracionado e resultados dos respectivos experimentos para a extração de resveratrol.....	57
Tabela 3	– Estimativa dos efeitos das variáveis estudadas para a extração de resveratrol em partes aéreas da cultivar IAC Caiapó, de <i>A. hypogaea</i> .....	57
Tabela 4	– Valores reais e codificados para as variáveis independentes utilizadas no delineamento composto central rotacional, $2^3$ .....	58
Tabela 5	– Planejamento composto central rotacional e resultados dos experimentos para a extração de resveratrol.....	59
Tabela 6	– Análise de variância para a validação dos modelos matemáticos (ANOVA).....	60
Tabela 7	– Captura do radical DPPH por extratos obtidos por maceração e assistidos por micro-ondas de órgãos de diferentes cultivares de <i>A. hypogaea</i> .....	64
Tabela 8	– Teor de compostos fenólicos de extratos obtidos por maceração e assistidos por micro-ondas de órgãos de diferentes cultivares de <i>A. hypogaea</i> .....	66
Tabela 9	– Concentração de resveratrol em extratos obtidos por maceração e assistidos por micro-ondas de órgãos de diferentes cultivares de <i>A. hypogaea</i> .....	68
Tabela 10	– Frequência de regeneração a partir de explantes das cultivares de <i>A. hypogaea</i> em meio MS suplementado com diferentes concentrações de BAP, após 45 dias de cultura a $25\pm 2^\circ\text{C}$ e a $30\pm 2^\circ\text{C}$ .....	71
Tabela 11	– Frequência de regeneração a partir de explantes das cultivares de <i>A. hypogaea</i> em meio MS suplementado com diferentes concentrações de PIC, após 45 dias de cultura a $25\pm 2^\circ\text{C}$ e a $30\pm 2^\circ\text{C}$ .....	73

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABA	Ácido abscísico
AIA	Ácido indol-3-acético
ANA	Ácido 1-naftalenoacético
2,4D	Ácido 2,4 diclorofenoxiacético
BAP	Benzilaminopurina
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DPPH	1,1-difenil-2-picrilhidrazil
EAG	Equivalente de ácido gálico
GA <sub>3</sub>	Ácido giberélico
IAC	Instituto Agronômico de Campinas
KIN	Cinetina
MS	Murashige & Skoog
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Carbonato de sódio
PIC	Picloram
UV	Ultravioleta
TDZ	Thidiazuron

## SUMÁRIO

	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	17
1	<b>OBJETIVOS</b> .....	40
1.1	<b>Objetivo geral</b> .....	40
1.2	<b>Objetivos específicos</b> .....	40
2	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	41
2.1	<b>Material vegetal</b> .....	41
2.2	<b>Preparo de extratos</b> .....	41
2.2.1	<u>Extração por maceração</u> .....	41
2.2.2	<u>Extração assistida por micro-ondas</u> .....	42
2.3	<b>Avaliação da atividade antioxidante</b> .....	43
2.4	<b>Determinação do teor de compostos fenólicos</b> .....	44
2.5	<b>Determinação do teor de resveratrol por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)</b> .....	45
2.6	<b>Cultura <i>in vitro</i></b> .....	47
2.7	<b>Análise estatística</b> .....	48
3	<b>RESULTADOS</b> .....	49
3.1	<b>Extração por maceração</b> .....	49
3.1.1	<u>Efeito da proporção etanol-água como solvente de extração</u> .....	49
3.1.2	<u>Efeito do tipo de trituração do material vegetal seco</u> .....	50
3.1.3	<u>Efeito da proporção solvente-sólido</u> .....	52
3.1.4	<u>Efeito do tempo de extração</u> .....	53
3.1.5	<u>Efeito do número de estágios da extração</u> .....	55
3.2	<b>Extração assistida por micro-ondas</b> .....	56
3.3	<b>Estudos comparativos entre as cinco cultivares de <i>A. hypogaea</i></b> ....	63
3.3.1	<u>Atividade antioxidante</u> .....	63
3.3.2	<u>Teor de compostos fenólicos</u> .....	65
3.3.3	<u>Teor de resveratrol</u> .....	67
3.4	<b>Cultura de Tecidos</b> .....	70
3.4.1	<u>Morfogênese induzida por BAP</u> .....	70
3.4.2	<u>Morfogênese induzida por PIC</u> .....	72



4	<b>DISCUSSÃO.....</b>	74
5	<b>CONCLUSÕES.....</b>	80
6	<b>PERSPECTIVAS.....</b>	81
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	82

## INTRODUÇÃO

### O gênero *Arachis*

O amendoim (*Arachis hypogaea*) pertence à família Fabaceae (Leguminosae) e à subfamília Faboideae (Papilonoideae). A família Fabaceae inclui também várias espécies que produzem grãos dispostos em vagens, tais como a ervilha (*Pisum sativum*), o feijão (*Phaseolus vulgaris*), o grão-de-bico (*Cicer arietinum*) e a soja (*Glycine max*).

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

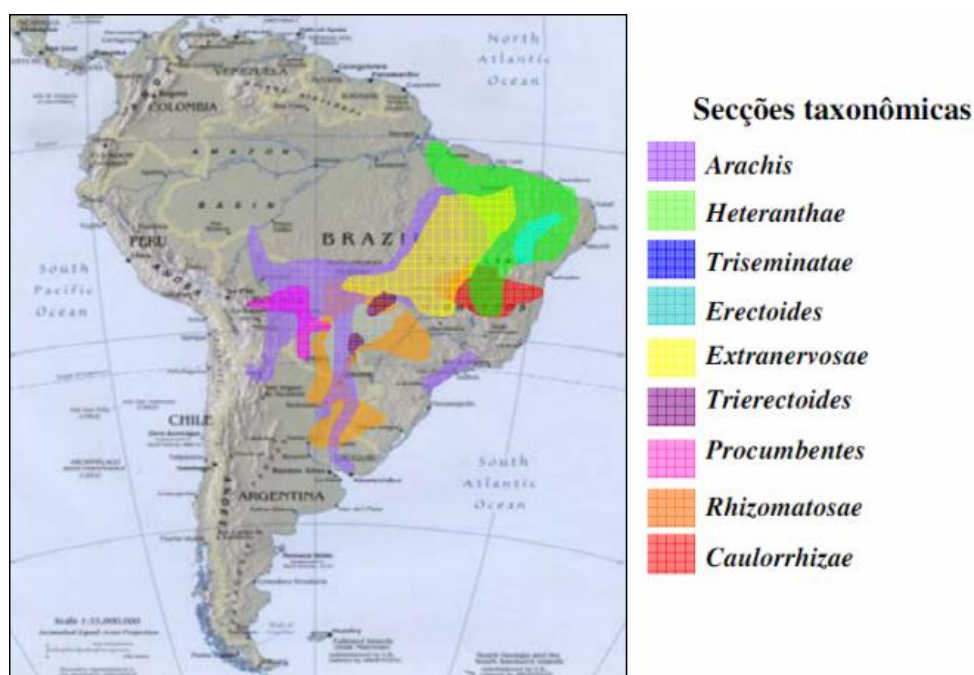


Figura 1 – Área de ocorrência das seções do gênero *Arachis*.  
Fonte: KRAPOVICKAS; GREGORY, 1994.

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

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

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

Fonte: KRAPOVICKAS; GREGORY, 1994.

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

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

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

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

A planta do amendoim (Figura 2) possui uma coloração verde clara nos pecíolos, que são firmes e finos, e verde escura nas folhas, que são extremamente pilosas. As folhas (Figura 2A) são formadas por quatro folíolos cada uma, pareados dois a dois. Os folíolos superiores são geralmente maiores que os inferiores, sendo sempre simétricos e elípticos (VEIGA *et al.*, 1994). As flores (Figura 2B), que costumam aparecer de quatro a seis semanas após a germinação em campo, contêm cinco pétalas e dez estames (COFFELT, 1989). Possuem cor amarelada, por vezes com estrias vermelhas (SILVA, 1997), são hermafroditas e costumam fazer autopolinização (GODOY *et al.*, 1989). Os frutos (Figura 2C) são vagens de coloração amarelo-palha e o número de sementes em seu interior pode variar de um a quatro (SILVA, 1997). As sementes possuem dois cotilédones (que correspondem a 96% do peso total) e um eixo embrionário formado por hipocótilo, epicótilo e radícula (MOSS; RAO, 1995).

As espécies do gênero *Arachis*, assim como várias outras leguminosas, possuem importante papel ecológico na fixação do nitrogênio atmosférico no solo, pela ação de bactérias do gênero *Rhizobium*, que formam nódulos em suas raízes. Tal relação simbiótica faz com que o nitrogênio seja o elemento químico mais absorvido pelo amendoim, seguido por potássio, cálcio, magnésio, fósforo e enxofre (MIRANDA *et al.*, 2003).

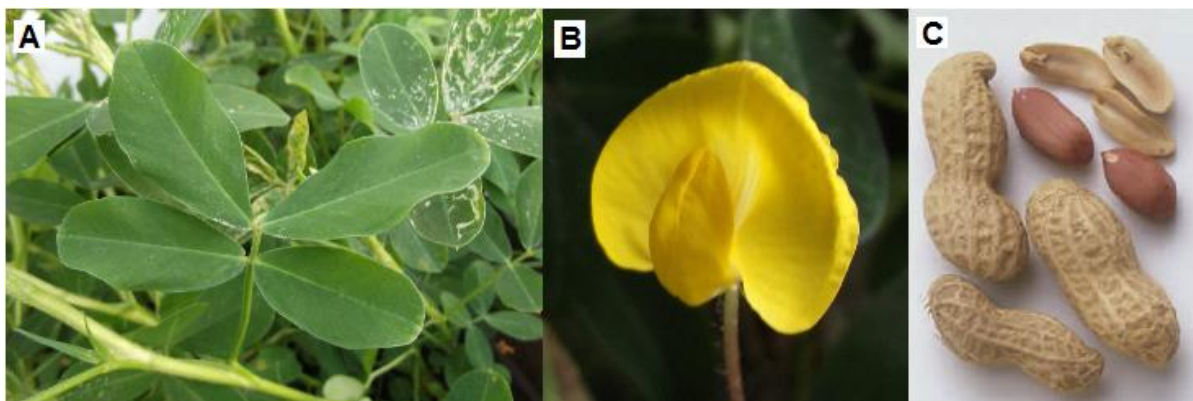


Figura 2 – Planta de amendoim.

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

### *Arachis hypogaea*

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

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

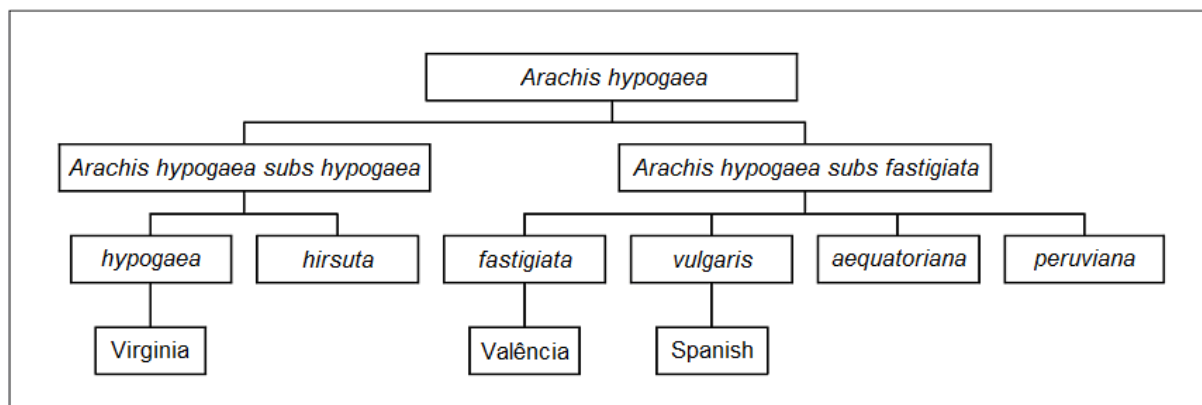


Figura 3 – Subespécies, variedades botânicas e tipos agrônômicos de *Arachis hypogaea*.  
Fonte: HERSELMAN, 2003.

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

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

## Metabólitos secundários em *Arachis*

Estudos recentes têm demonstrado a importância medicinal e fitofisiológica de metabólitos secundários presentes no amendoim. Os metabólitos secundários (ou especiais) são substâncias de baixo peso molecular, que não são diretamente relacionadas à vida dos vegetais. A habilidade para a síntese dos metabólitos foi selecionada ao longo da evolução, e apenas poucas linhagens de plantas produzem um tipo de metabólito específico (DUDAREVA; PICHERSKY, 2000). A função de um mesmo metabólito em diferentes linhagens pode variar (KNUDSEN; TOLLSTEN, 1993). Muitos vegetais são fontes de metabólitos secundários amplamente utilizados para fins medicinais e industriais, entre outros (KARUPPUSAMY, 2009).

A principal classe de compostos presentes no gênero *Arachis* são os derivados de fenilpropanoides, principalmente estilbenos e flavonoides. Podem ser encontrados em todas as partes da planta e estão envolvidos em mecanismos de defesa contra injúrias mecânicas, contaminação microbiana, danos provocados por insetos e radiação ultravioleta. (LEE *et al.*, 2008; LOPES *et al.*, 2011; PENDSE *et al.*, 1973). Entretanto, os estilbenos, hidrocarbonetos aromáticos que possuem duas isoformas (*cis* e *trans*), também podem ser encontrados em partes não elicidadas de diversos vegetais, mas em concentrações menores (SOBOLEV *et al.*, 2007).

Desde que vários benefícios à saúde humana começaram a ser atribuídos aos estilbenos, como o efeito anti-inflamatório, as plantas produtoras dessas substâncias, como o amendoim, passaram a ser alvo de diversas pesquisas científicas (STERVBO *et al.*, 2007). Diversos trabalhos já detectaram a presença de estilbenos em diversos órgãos de *A. hypogaea*, tais como folhas (CHUNG *et al.*, 2003), raízes (CHEN *et al.*, 2002) e sementes (SANDERS *et al.*, 2000). Entre esses estilbenos pode-se citar, além do *trans-resveratrol*, o *trans-piceidio* (SALES; RESURRECCION, 2009), o isopentenilresveratrol (KU *et al.*, 2005), o piceatanol, o araquidin-1, o araquidin-2, o araquidin-3 e o *trans-SB-1* (Figura 4) (SOBOLEV *et al.*, 2009).

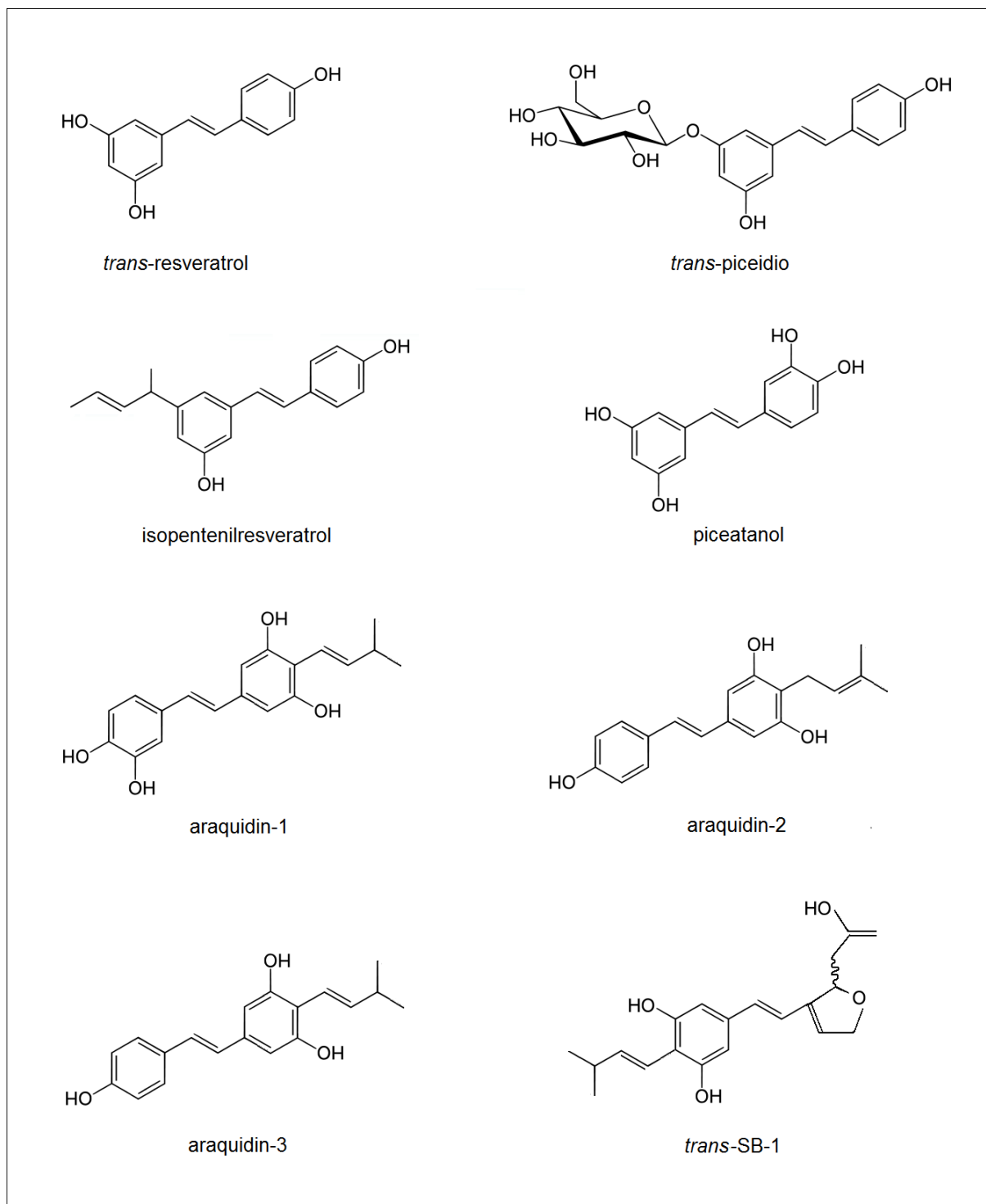


Figura 4 – Principais estilbenos encontrados em *A. hypogaea*.



Os flavonoides e seus derivados podem ser encontrados tanto em plantas de amendoim infectadas como em plantas não infectadas. Correspondem a um dos grupos de metabólitos secundários mais presentes no Reino *Plantae*, e possuem propriedades anti-inflamatórias, anticarcinogênicas e hormonais, entre outras (HARBORNE *et al.*, 1975). Entre os flavonoides, as isoflavonas são os mais presentes nas leguminosas. Diferentes flavonoides já foram isolados a partir de diferentes órgãos do amendoim, incluindo a diidroxicromona, o eriodictiol e a luteolina, na vagem (PENDSE *et al.*, 1973; LEE *et al.*, 2008), a isoramnetina glicosídica no tegumento (LOU *et al.*, 2001) e a isomedicarpina nas partes aéreas (LIU *et al.*, 2009).

Além dos derivados de fenilpropanoides, outros grupos de metabólitos secundários também já foram estudados dentro do gênero *Arachis*. Alguns tipos de ácidos fenólicos, tais como o cafeico, o *p*-cumárico, o ferúlico e o vanílico (Figura 5), que estão associados a diversos processos antioxidantes do metabolismo humano, já foram detectados em raízes inoculadas com bactérias do gênero *Rhizobium* (LEE *et al.*, 2008). Da mesma forma, vários tipos de fitosteróis também já foram identificados na manteiga e no óleo do amendoim. Importantes na redução do colesterol, os fitosteróis não são produzidos pelo corpo humano. Nas plantas, possuem funções estruturais semelhantes às do próprio colesterol (FRANCISCO; RESURRECCION, 2008). O campesterol, o estigmasterol e o avenasterol (Figura 5) estão entre os fitosteróis mais presentes nos alimentos. Entretanto, o  $\beta$ -sitosterol (Figura 5) é o fitosterol mais encontrado no amendoim, estando presente também em espécies silvestres do gênero *Arachis* (GROSSO *et al.*, 2000; PHILLIPS *et al.*, 2005).

Também já foram detectados, em concentrações menores, outros grupos de metabólitos secundários em diferentes partes da planta de *A. hypogaea*: i) triterpenos, tais como o cicloartanol e o lupeol (Figura 5) (GAYDOU *et al.*, 1983); ii) alcaloides, como por exemplo a colina e a miosmina (Figura 5) (MOLL, 1961; ZWICKENPFLUG *et al.*, 1998), e iii) ácidos graxos, como o palmítico, o esteárico e o oleico (Figura 5) (CARRÍN; CARELLI, 2010; WANG *et al.*, 2010).

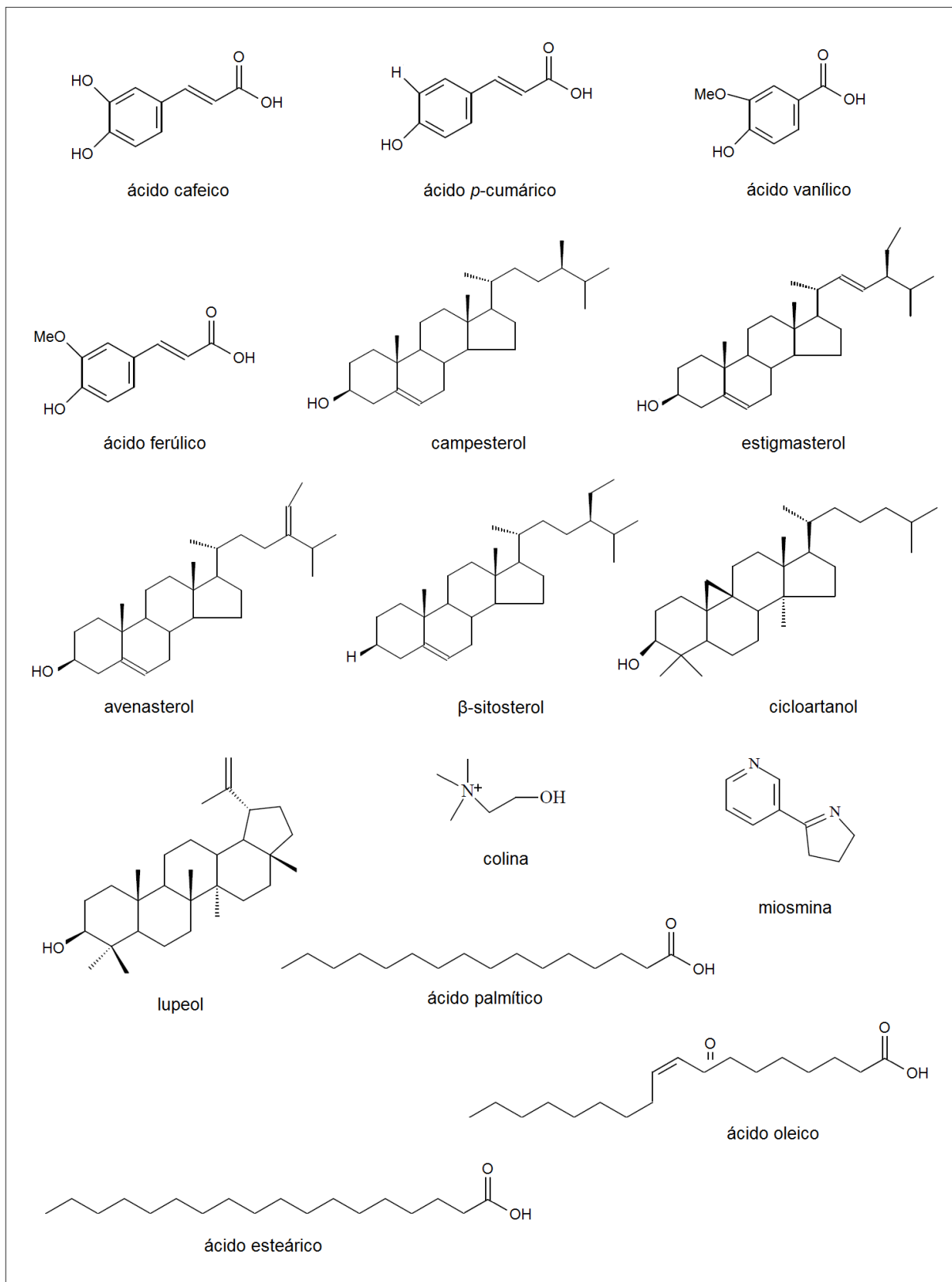


Figura 5 – Metabólitos secundários já identificados em espécies do gênero *Arachis*.

A produção de metabólitos secundários nas plantas *in vivo* pode apresentar variações na qualidade e no tipo de substâncias produzidas, que são influenciadas principalmente por: a) fase do ciclo, pois boa parte dos metabólitos secundários é produzida nos estágios iniciais de crescimento da planta; b) período de coleta, diante da tendência de algumas espécies em produzir mais metabólitos durante seu fotoperíodo; e c) estação de coleta, uma vez que em épocas mais ensolaradas as espécies tendem a produzir mais metabólitos (ABDIN *et al.*, 2003). O desenvolvimento de técnicas de cultivo *in vitro* permite contornar essas questões para a produção de plantas medicinais e seus extratos (NASIM *et al.*, 2010).

### **Cultura de tecidos vegetais**

Na cultura de tecidos vegetais, pequenos fragmentos (explantes) são isolados da planta doadora, desinfestados e cultivados sob condições assépticas. A aplicação mais utilizada na cultura de tecidos vegetais é a micropropagação, que possui esse nome devido ao tamanho dos propágulos utilizados. O objetivo principal da micropropagação é a obtenção de novos indivíduos, com genótipos idênticos (TORRES *et al.*, 2000).

Os explantes são mantidos em condições controladas de luz e temperatura, que podem variar muito conforme a espécie. Na fase de multiplicação, com o objetivo de renovar o meio de cultura, são realizadas subculturas (ou repiques) para que o material micropropagado continue a se desenvolver (EMBRAPA, 2009).

Existem três sistemas de micropropagação: i) proliferação a partir de meristemas apicais e gemas axilares; ii) organogênese, que é o surgimento e a proliferação de gemas, e iii) embriogênese somática, que é o processo de formação de embriões a partir de células somáticas dos explantes. Tanto a organogênese como a embriogênese podem ocorrer de duas maneiras: direta, sem a formação de calo (massas celulares desorganizadas que se originam da proliferação desordenada a partir de tecidos ou órgãos cultivados *in vitro*), ou indireta, com a formação de calo. Os calos podem ser compactos, quando as células estão muito aderidas entre si, ou friáveis, quando as células estão pouco aderidas entre si (GEORGE *et al.*, 2008).

## Cultura de tecidos em *Arachis*

Nos últimos anos a cultura de tecidos em *A. hypogaea* foi bastante investigada, com a obtenção de sistemas de regeneração com base em diferentes explantes e fitorreguladores. Em geral, a indução de organogênese é eficiente em resposta a citocininas isoladas, tais como BAP (6-benzilaminopurina) e TDZ (thidiazuron), ou em combinação com auxinas, a partir de eixos embrionários (MCKENTLY *et al.*, 1990; MORRIS *et al.*, 1995; RADHAKRISHNAN *et al.*, 2000), cotilédones (MCKENTLY *et al.*, 1990; PESTANA *et al.*, 1999; RADHAKRISHNAN *et al.*, 2000) e folhas (MCKENTLY *et al.*, 1991; SARKER; ISLAM, 2000; JOSHI *et al.*, 2003).

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

No caso das espécies silvestres do gênero, também foram obtidas diferentes vias regenerativas, com o objetivo principal de preservar e aumentar a disponibilidade de germoplasma para utilização em programas de melhoramento. A organogênese foi obtida a partir de cotilédones em meio contendo BAP (GAGLIARDI *et al.*, 2000) e BAP com ANA (MANSUR *et al.*, 1993), em espécies da seção *Extranervosae*. Utilizando o mesmo explante, mas com espécies da seção *Arachis*, também foi observada organogênese em meios suplementados com BAP e AIA (RANI; REDDY, 1996). A produção de brotos em espécies da seção *Extranervosae* foi também obtida a partir de eixos embrionários na presença de BAP (GAGLIARDI *et al.*, 2000) e de segmentos nodais, em resposta a baixas concentrações de ANA (GAGLIARDI *et al.*, 2002). Adicionalmente, o processo foi induzido em folíolos da seção *Arachis* na presença de ANA e BAP, utilizados separadamente ou em conjunto (MCKENTLY *et al.*, 1991; MANSUR *et al.*, 1993; REY *et al.*, 2000) e TDZ (MROGINSKI *et al.*, 2004).

A embriogênese somática em espécies silvestres de *Arachis* foi obtida em resposta à combinação de PIC e BAP, incluindo *A. pintoi* (REY *et al.*, 2000), *A. glabrata* (VIDOZ *et al.*, 2004) e *A. correntina* (VIDOZ *et al.*, 2006). Esta também foi

induzida por BAP em *A. archeri*, *A. porphyrocalix* (seção *Erectoides*) e *A. appressipila* (seção *Procumbentes*) (PACHECO *et al.*, 2007a).

Instituições de pesquisa da Índia e dos Estados Unidos possuem o maior número de trabalhos envolvendo cultura de tecidos no gênero *Arachis*. Universidades do Canadá, Brasil e Argentina também possuem um número elevado de publicações. Nesses dois últimos, onde se situam centros de origem de algumas espécies, a maior parte das publicações envolve espécies silvestres. Alguns países asiáticos (Bangladesh, China, Coréia do Sul, Japão e Paquistão), europeus (Alemanha, Eslováquia e Turquia), além de Quênia e Austrália, também possuem instituições de pesquisa com ao menos uma publicação relacionada ao tema. No Brasil, o Núcleo de Biotecnologia Vegetal (NBV) da Universidade do Estado do Rio de Janeiro tem uma contribuição bastante importante na área. O Quadro 2 apresenta um levantamento em ordem cronológica dos trabalhos publicados sobre cultura de tecidos de espécies do gênero *Arachis*.

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

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

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

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

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

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



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

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

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

Referência	Espécies	Explantos	Fitorreguladores	Sistemas
PACHECO <i>et al.</i> , 2007a	<i>A. archeri</i> , <i>A. porphyrocalix</i> e <i>A. appressipila</i>	Eixo e folíolo	BAP	Embriogênese indireta
PACHECO <i>et al.</i> , 2007b	17 espécies silvestres	Eixo embrionário, folíolo e cotilédone	BAP	Organogênese direta
PACHECO <i>et al.</i> , 2008	<i>A. stenosperma</i>	Eixo embrionário, folíolo e cotilédone	BAP	Organogênese indireta
BERA; BHATT, 2008	<i>A. hypogaea</i> e espécies silvestres	Antera	ANA + BAP	Organogênese
JOSHI <i>et al.</i> , 2008	<i>A. hypogaea</i>	Eixo embrionário	2,4D	Embriogênese
TIWARI; TULI, 2008	<i>A. hypogaea</i>	Cotilédone desembrionado	2,4D + BAP	Organogênese
FONTANA <i>et al.</i> , 2009	<i>A. villosa</i>	Folha	BAP + TDZ	Organogênese
RANI <i>et al.</i> , 2009	<i>A. hypogaea</i>	Eixo embrionário	2,4D	Embriogênese direta
SINGH; HAZRA, 2009	<i>A. hypogaea</i>	Porção final da plúmula	2,4D	Organogênese e Embriogênese
SHAN <i>et al.</i> , 2009	<i>A. hypogaea</i>	Epicótilo e eixo embrionário	BAP + GA <sub>3</sub>	Organogênese indireta
TIWARI; TULI, 2009	<i>A. hypogaea</i>	Folha imatura	BAP + ANA	Organogênese
SRINIVASAN <i>et al.</i> , 2010	<i>A. diogeni</i> , <i>A. stenosperma</i> , <i>A. duranensis</i> , <i>A. cardenasii</i> e <i>A. correntina</i>	Nó cotiledonar	BAP + ANA	Organogênese
MAINA <i>et al.</i> , 2010	<i>A. hypogaea</i>	Cotilédone	BAP e 2,4D	Organogênese
MAINA, 2011	<i>A. hypogaea</i>	Cotilédone	BAP e 2,4D	Organogênese
ROBINSON <i>et al.</i> , 2011	<i>A. hypogaea</i>	Cotilédone	2,4D + KIN	Embriogênese
NAZIR <i>et al.</i> , 2011	<i>A. hypogaea</i>	Cotilédone desembrionado	BAP + ANA	Organogênese
IQBAL <i>et al.</i> , 2011	<i>A. hypogaea</i>	Nó cotiledonar	PIC	Embriogênese
GENG <i>et al.</i> , 2011	<i>A. hypogaea</i>	Folíolo	ANA + TDZ	Organogênese
CASTRO <i>et al.</i> , 2012	<i>A. hypogaea</i>	Eixo embrionário	BAP	Organogênese

A busca por métodos que permitam otimizar a produção de metabólitos especiais que possam ser utilizados para fins medicinais ou industriais é um tema que tem recebido ampla atenção de pesquisadores da área (PHILIPSON, 1990). Dentro desse contexto, a cultura de tecidos vegetais é uma alternativa que tem sido bastante investigada (RAO; RAVISHANKAR, 2002).

As vantagens do uso da cultura de tecidos com esse objetivo incluem: i) possibilidade de eliminação da influência de fatores ambientais que afetam a produção de metabólitos secundários; ii) seleção de cultivares com produções mais altas; e iii) possibilidade do uso de agentes eleitores (JHA *et al.* 1998; ABDIN *et al.* 2003; KARUPPUSAMY, 2009; JUNAID *et al.*, 2009). A produção de metabólitos já foi analisada em diferentes sistemas de cultura de tecidos, principalmente cultura de calos e de células em suspensão.

Vários estudos já avaliaram a composição e as propriedades biológicas de extratos de materiais *in vitro* de *A. hypogaea* (Quadro 3). A classe de compostos mais encontrada são os estilbenos, incluindo o resveratrol.

Quadro 3 – Cultura de tecidos e produção de metabólitos secundários no gênero *Arachis*.

<b>Fonte</b>	<b>Sistema</b>	<b>Metabólitos secundários</b>
PARK <i>et al.</i> , 2003	Diferentes tecidos da plântula	Resveratrol
KU <i>et al.</i> , 2005	Cultura de calos	Piceatanol
CHANG <i>et al.</i> , 2006	Plantas <i>in vitro</i>	Araquidin-1, araquidin-3 e isopentadienilresveratrol
SOBOLEV <i>et al.</i> , 2006	Planta nos primeiros estágios de crescimento	Estilbenos e ácidos fenólicos
MEDINA-BOLIVAR <i>et al.</i> , 2007	Cultura de raízes	Resveratrol
ABBOTT <i>et al.</i> , 2010	Cultura de raízes	Araquidin-1, araquidin-3 e resveratrol
CONDORI <i>et al.</i> , 2010	Cultura de raízes	Araquidin-1, araquidin-3 e resveratrol
KIM <i>et al.</i> , 2010	Cultura de raízes	Resveratrol
YANG <i>et al.</i> , 2010	Cultura de calos	Resveratrol

## Resveratrol

O resveratrol está presente em mais de 70 tipos de plantas, tais como Kojokon (*Polygonum cuspidatum*), Kashuwu (*Polygonum multiflorum*) (KUBO *et al.*, 1981), eucalipto (*Eucalyptus* spp.) (HILLIS *et al.*, 1974), pinheiro (*Pinus* spp.) (PASSOS *et al.*, 2001), uva (*Vitis vinifera* e *Vitis labruscae*) (LANGCAKE *et al.*, 1979) e amendoim, no qual foi descoberto há pouco mais de três décadas (INGHAM, 1976). O resveratrol é um polifenol (hidroxilas ligadas a um anel aromático) não flavonoide (DAVID *et al.*, 2007), e sua síntese é efetuada pela enzima resveratrol sintase, a partir de uma molécula de coumaroil-CoA e três moléculas de malonil-CoA, em um processo regulado pelos genes RS (CHUNG *et al.*, 2003). O resveratrol é sintetizado em duas isoformas: *trans*-resveratrol (*trans*-3,5,4'-trihidroxiestilbeno) e *cis*-resveratrol (*cis*-3,5,4' trihidroxiestilbeno). Apesar de o isômero *trans* ser convertido à forma *cis*, mais estável em presença de luz visível, as pesquisas são geralmente direcionadas à investigação das propriedades do isômero *trans* (SAUTTER *et al.*, 2005).

Em *A. hypogaea*, o resveratrol é produzido em plântulas, hipocótilos (ARORA; STRANGE, 1991), sementes (SANDERS *et al.* 2000), raízes (CHEN *et al.*, 2002), folhas, vagens, tegumento (PARK *et al.*, 2003), brotos e calos produzidos *in vitro* (CHANG *et al.*, 2006). Também já foi relatado que a planta jovem possui uma capacidade maior de produção de resveratrol do que a planta madura (DORNER *et al.*, 1989).

Dentre as diversas atividades farmacológicas do resveratrol, pode-se citar a atividade antioxidante, por meio da inibição da atividade da enzima lipoxigenase ou remoção de radicais livres (PINTO *et al.*, 1999; CHATTERJEE *et al.*, 2011); a capacidade anti-inflamatória (anticoagulante), pela inibição das enzimas ciclooxigenase (COX-1 e COX-2), assim inibindo a síntese de tromboxinas (SUBBARAMAIAH *et al.*, 1998; O'LEARY *et al.*, 2004); a redução do risco de aterosclerose, aumentando os níveis de colesterol sob a forma de HDL e diminuindo os sob a forma de LDL, ajudando a desobstruir as artérias (GALFI *et al.*, 2005); o aumento do apetite e atraso do envelhecimento celular (DAVID *et al.*, 2007) e a capacidade de atuar de maneira análoga ao estrogênio, já que possui estrutura

química similar, assim podendo ser considerado em estudos de reposição hormonal (RATNA; SIMONELLI, 2002).

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

Um dos fatores que mais influenciaram as pesquisas sobre o resveratrol foi o chamado “Paradoxo Francês”, formulado no final do século XX. Pesquisas indicavam que, mesmo possuindo as mesmas taxas de colesterol que os americanos, os franceses morriam muito menos por aterosclerose. Este fato foi atribuído ao hábito francês de beber vinho, uma vez que a uva possui elevados teores de resveratrol. A partir de então, fontes alternativas de resveratrol passaram a ser buscadas (SAUTTER *et al.*, 2005).

## **Metodologias de extração**

A metodologia de extração é um fator que pode influenciar consideravelmente a obtenção do metabólito de interesse. O processo de extração pode ser precedido por um pré-tratamento, e ambos podem ser realizadas de diferentes formas (STALIKAS, 2007).

O pré-tratamento pode ser efetuado por homogeneização, moagem ou secagem. Os dois primeiros tipos aumentam a superfície de contato entre o solvente e a amostra. Por outro lado, a secagem aumenta o rendimento por unidade de massa e a durabilidade do material vegetal, diminuindo o espaço utilizado para a estocagem. As etapas de pré-tratamento podem ser utilizadas em conjunto ou de forma isolada (ROUTRAY; ORSAT, 2012).

O método mais apropriado para a extração depende da origem e do tipo de material a ser extraído. A eficiência da extração pode ser influenciada por parâmetros que incluem tempo de incubação, tipo de solvente, proporção solvente/material vegetal, entre outros. Os principais sistemas para a extração de compostos fenólicos a partir de frutas e vegetais pode ser classificados em tradicionais e modernos (GARCIA-SALAS *et al.*, 2010).

Os métodos de extração tradicionais incluem a extração por maceração, a extração por soxhlet e a extração de fase sólida. Na extração por maceração, o material vegetal é colocado em contato com o solvente extrator, em um recipiente preferencialmente fechado. É um método amplamente utilizado, por ser fácil e barato. Entretanto, os gastos com solventes orgânicos e com tempo são maiores que nos outros métodos (MAHUGO *et al.* 2009). No caso de compostos fenólicos, a extração por maceração costuma ser realizada em temperatura ambiente, para evitar a degradação. O tempo total de extração depende dos períodos determinados para a incubação com o solvente, a centrifugação e a evaporação (GARCIA-SALAS *et al.*, 2010).

A extração por soxhlet é uma das técnicas mais antigas, sendo amplamente utilizada para o isolamento de substâncias de baixa volatilidade, como os lipídios. Proporciona um alto rendimento, mas necessita de um longo período de tempo, além de gastos elevados com solvente e energia elétrica. O aparelho utilizado é um sistema contínuo com dois compartimentos, no qual o solvente é aquecido em um balão volumétrico com o auxílio de uma manta térmica. Após evaporar, o solvente condensa, extraindo o constituinte de interesse do material colocado no compartimento superior (ROMANIK *et al.*, 2007).

A extração de fase sólida é uma técnica que vem sendo cada vez mais utilizada, embora seus custos sejam mais elevados do que a extração por maceração. O aparelho é constituído por uma fibra de sílica fundida e recoberta com filmes de adsorventes poliméricos (polidimetilsiloxano ou poliacrilato) ou sólidos adsorventes (carvão ativado ou resina poliestireno-divinilbenzeno) em aglutinantes poliméricos. A fibra recoberta é colada na ponta de um microtubo de aço inox adaptado com uma agulha hipodérmica, formando o conjunto de fibra. O conjunto de fibra é montado em um aplicador similar a uma microsseringa convencional. A pressão no êmbolo do aplicador faz com que o microtubo com a fibra de sílica presa corra no interior da agulha hipodérmica, expondo a fibra coberta com adsorvente. A

extração de fase sólida dispensa o uso de solventes orgânicos, e os componentes extraídos são imediatamente analisados em cromatógrafo (VALENTE; AUGUSTO, 2000).

As extrações de fluido supercrítico, líquido pressurizado e assistidas por ultrassom e micro-ondas são os métodos modernos, e apresentam várias vantagens em relação às técnicas tradicionais. A extração de fluido supercrítico utiliza baixas temperaturas, evitando a degradação da amostra e reduzindo o consumo de energia. No entanto, essa técnica é limitada a constituintes de baixa ou média polaridade. O solvente mais utilizado é o dióxido de carbono supercrítico, por não ser tóxico nem inflamável, além de quimicamente estável (CASTRO-VARGAS *et al.*, 2010). Inicialmente as amostras são colocadas em contato com o solvente em um cartucho, que é inserido na célula do aparelho para a extração e submetido a resfriamento, devido à expansão do CO<sub>2</sub>. Em seguida, os extratos são evaporados, dissolvidos na fase móvel, e imediatamente injetados em cromatógrafo (MAHUGO *et al.*, 2009).

A extração de líquido pressurizado é feita com solventes orgânicos em altas pressões e temperaturas acima do ponto de ebulição. A amostra sólida é embalada em uma célula de extração de aço inoxidável e extraída sob altas temperaturas (entre 40 e 200°C) e pressões (entre 500 e 3000 psi), em um curto período de tempo. A amostra é levada para um tubo com o auxílio de um gás comprimido, filtrada, seca e injetada em cromatógrafo (KLEJDUSA *et al.*, 2009).

A extração assistida por ultrassom é utilizada tanto para amostras orgânicas como para amostras inorgânicas, e requer tempos de extração bem menores do que as outras técnicas (DOBIÁŠ *et al.*, 2010). É considerada uma das metodologias de extração mais simples, pois é facilmente exequível em qualquer laboratório, necessitando apenas de um banho ultrassônico. A amostra triturada é misturada com o solvente e colocada no banho ultrassônico, com ajuste de temperatura e tempo (KLEJDUSA *et al.*, 2009).

Na extração assistida por micro-ondas (EAM), ondas eletromagnéticas com energia muito baixa, entre 0,3 e 300 GHz, são utilizadas para gerar uma oscilação no campo elétrico. A capacidade extrativa é determinada pelo aumento da probabilidade de choques intermoleculares, devido às sucessivas mudanças de orientação das moléculas polares. Os aparelhos de micro-ondas também são utilizados em processos de síntese orgânica, e proporcionam o controle de fatores

que influenciam a eficiência de extração, tais como agitação, temperatura, pressão, potência e tempo (DE SOUZA; MIRANDA, 2011).

Assim como na extração de fluido supercrítico e de líquido pressurizado, a EAM é realizada na ausência de luz, fator ao qual os compostos fenólicos são bastante sensíveis. Dessa forma, evita a conversão de *trans*-resveratrol em sua isoforma que não é bioativa, o *cis*-resveratrol. Outras importantes vantagens da EAM são os curtos períodos de extração, que raramente superam uma hora de duração, e a possibilidade de extração simultânea de várias amostras (SUTIVISEDSAK *et al.*, 2010).



## 1 OBJETIVOS

### 1.1 Objetivo geral

Comparar duas metodologias extrativas (maceração e micro-ondas) para posterior determinação de atividade antioxidante, compostos fenólicos totais e teor de resveratrol em raízes, folhas e sementes de cinco cultivares brasileiras de *Arachis hypogaea* L.

### 1.2 Objetivos específicos

- Determinar as condições mais adequadas para a extração de substâncias antioxidantes por maceração, utilizando partes aéreas da cultivar IAC Caiapó;
- Estabelecer as melhores condições para a extração de resveratrol assistida por micro-ondas, utilizando partes aéreas da cultivar IAC Caiapó;
- Comparar a atividade antioxidante, o teor de fenóis totais e de resveratrol em extratos de raízes, folhas e sementes de cinco cultivares de *A. hypogaea* obtidos por extração por micro-ondas e maceração;
- Obter culturas *in vitro* a partir de explantes de sementes (cotilédone, eixo embrionário e folíolo) de cinco cultivares de *A. hypogaea*, visando à produção de metabólitos secundários.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Material vegetal

Sementes das cultivares de *A. hypogaea* IAC 886 (Virginia Runner), IAC Caiapó (Virginia Runner), IAC Tatu ST (Valência), IAC 8112 (Spanish) e IAC 99-1 (Virgina Bunch) foram cedidas pelo Dr. Ignácio José de Godoy (Instituto Agronômico de Campinas) em janeiro de 2011. As sementes foram armazenadas na ausência de luz, em baixa umidade e mantidas a -4°C até sua utilização.

Parte das sementes foi plantada em vasos contendo Plantmax<sup>®</sup> HA (não aditivado com fertilizante), para a obtenção de plantas. As plantas foram mantidas em casa de vegetação, protegidas por Sombrite<sup>®</sup>, com redução de 70%.

### 2.2 Preparo de extratos

#### 2.2.1 Extração por maceração

Partes aéreas de plantas da cultivar IAC Caiapó (Virginia Runner) com 30 dias de idade foram secas em estufa a 45°C, trituradas, pesadas e maceradas em etanol, sob agitação, no escuro e em temperatura ambiente. Após filtração em papel-filtro e rotaevaporação a 45°C, o extrato foi pesado e armazenado em temperatura entre -10°C e -4°C até sua utilização.

Foram testados os seguintes fatores que influenciam a eficiência de extração (NEPOTE *et al.*, 2005):

a) proporção etanol-água como solvente de extração: os extratos foram preparados com 20, 40, 60, 80 ou 100% de etanol em água. As partes aéreas foram trituradas com almofariz e pistilo, a relação solvente/sólido para a extração foi de 60mL/g, com um período de incubação de 120 minutos, sendo a extração realizada em um único estágio.

b) tipo de trituração do material vegetal seco: o material vegetal seco foi triturado com almofariz e pistilo (com ou sem o uso de nitrogênio líquido) ou moinho elétrico. Nesses experimentos, foi utilizada uma proporção de etanol em água de 80%, com uma relação solvente/sólido de 60mL/g, incubação de 120 minutos e um estágio.

c) relação solvente/sólido para a extração: foram utilizados 30, 40, 50, 60 ou 70 mL por grama de material vegetal seco triturado com almofariz e pistilo, sem o uso de nitrogênio líquido, utilizando 80% de etanol em água e 120 minutos de incubação em um estágio.

d) tempo de extração: foram testados 15, 30, 45, 60, 120, 240, 720 ou 1440 minutos. A trituração do material vegetal foi realizada com almofariz e pistilo, sem o uso de nitrogênio líquido, A proporção de etanol em água foi de 80%, com uma relação solvente/sólido de 50 mL/g em um estágio.

e) número de estágios de extração: de um a cinco, sendo o material vegetal triturado com almofariz e pistilo. A proporção de etanol em água foi de 80%, com uma relação solvente/sólido de 50 mL/g durante 120 minutos.

As melhores condições definidas para a extração por maceração foram utilizadas para a realização das etapas descritas nos itens 2.3, 2.4 e 2.5, com extratos de partes aéreas, raízes e sementes das cultivares selecionadas.

O rendimento dos extratos foi calculado de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{rendimento (\%)} = \frac{\text{extrato (g)} \times 100}{\text{material vegetal seco (g)}}$$

### 2.2.2 Extração assistida por micro-ondas

Foram utilizadas folhas de plantas *in vivo* da cultivar IAC Caiapó (Virginia Runner), secas em estufa a 45°C e trituradas. Os experimentos foram realizados em um aparelho de micro-ondas da marca Anton Paar<sup>®</sup>, modelo Monowave 300, com a avaliação do efeito da temperatura, proporção solvente/sólido e agitação. O tempo de extração foi fixado em 30 minutos (CORRÊA *et al.*, 2012).

Inicialmente, foi realizado um planejamento fatorial fracionado  $2^{3-1}$ , no qual foram realizados sete experimentos, com o objetivo de determinar as variáveis mais influentes no processo, bem como a melhor faixa de valores para a realização dos experimentos subsequentes. Em seguida, foi realizado um planejamento composto central rotacional, com 17 experimentos, a fim de estabelecer as condições ótimas de extração (JÚNIOR, 2011).

A cinética do processo extrativo foi avaliada em uma etapa posterior, com base nos valores ótimos obtidos nos experimentos anteriores, utilizando 5, 10, 15, 30, 60 e 90 minutos. O tempo de extração não é geralmente considerado como sendo uma variável em planejamentos experimentais desta natureza, uma vez que causa grandes influências no sistema e sobre as outras variáveis, podendo mascarar eventuais respostas (JÚNIOR, 2011).

Os extratos dos materiais obtidos a partir das diferentes cultivares foram preparados utilizando as melhores condições definidas nos experimentos descritos acima.

### 2.3 Avaliação da atividade antioxidante

A atividade antioxidante dos diferentes extratos foi determinada com base na metodologia de captura do radical livre 2,2-difenil-1-picril hidrazil (DPPH) (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, Milwaukee, Wisconsin, EUA) de acordo com BRAND-WILLIAMS *et al.* (1995). Os extratos foram ressuspensos para um volume final de 25 $\mu$ L, em três concentrações diferentes, e adicionados a 975 $\mu$ L de solução metanólica de radical DPPH (24  $\mu$ g/mL). As misturas foram inseridas em tubos *ependorfs* (1,5 mL) e mantidas durante uma hora no escuro. Em seguida, a absorbância foi medida a 515nm, em cubetas de vidro, com espectrofotômetro UV160A (Shimadzu<sup>®</sup>, Tóquio, Japão). O metanol foi utilizado como branco e a solução metanólica de DPPH foi utilizada como controle negativo. Como controle positivo foi utilizada a quercetina, cuja capacidade de captura do radical DPPH é mostrada na Figura 6. As amostras foram preparadas em triplicata e os experimentos foram repetidos duas vezes. A atividade de captura de radicais foi expressa como percentual de atividade antioxidante, de acordo com a seguinte fórmula:

captura do radical (%) =  $[(\text{absorbância do DPPH} - \text{absorbância da amostra}) / (\text{absorbância do DPPH})] \times 100$ .

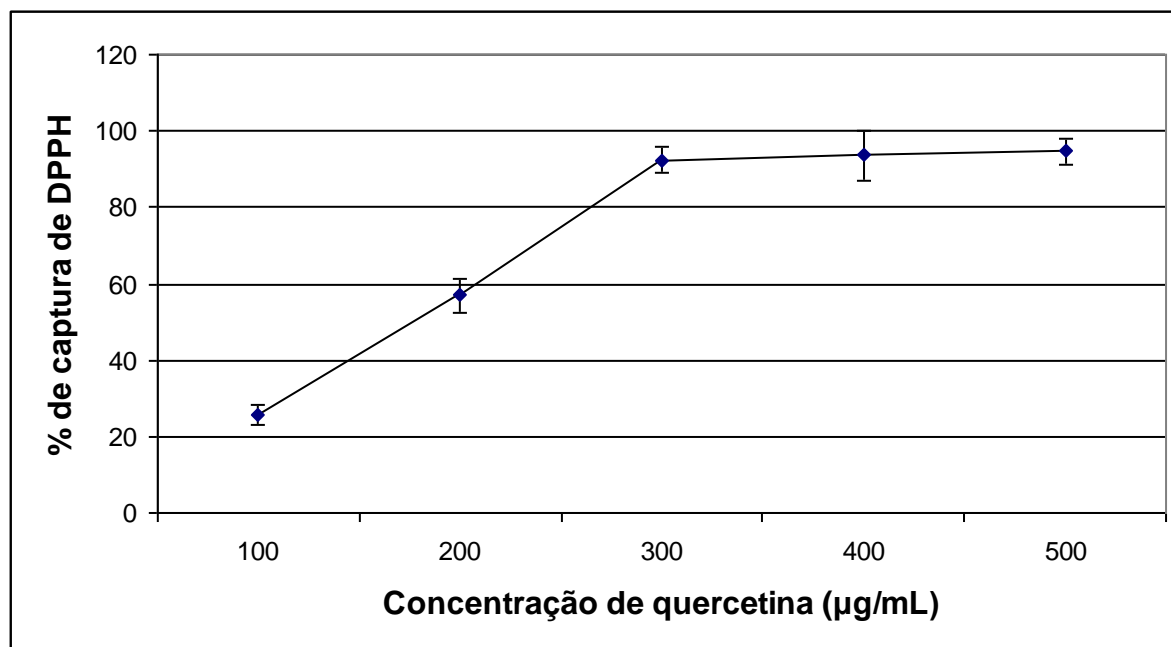


Figura 6 – Curva de concentração-resposta da captura do radical DPPH pela quercetina.

#### 2.4 Determinação do teor de compostos fenólicos

O teor de compostos fenólicos dos extratos foi avaliado pelo método de Folin-Ciocalteu, de acordo com HOLLAND *et al.* (2011). Para cada amostra, 180µL de reagente de Folin-Ciocalteu (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, Milwaukee, Wisconsin, EUA) a 10% (v/v) foram adicionados a 90µL de extrato a 10 mg/mL. Após cinco minutos, foram adicionados 730µL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> a 100mM, seguindo-se uma incubação no escuro por 2h após esse período. A absorbância da amostra foi medida a 765 nm em espectrofotômetro UV160A (Shimadzu<sup>®</sup>, Tóquio, Japão), utilizando como branco uma solução contendo todos os reagentes, com exceção do extrato. As amostras foram preparadas em triplicata e os experimentos foram realizados duas vezes. Os resultados foram expressos em miligramas de equivalente em ácido gálico (EAG) / g extrato seco, de acordo com a curva-padrão mostrada na Figura 7.

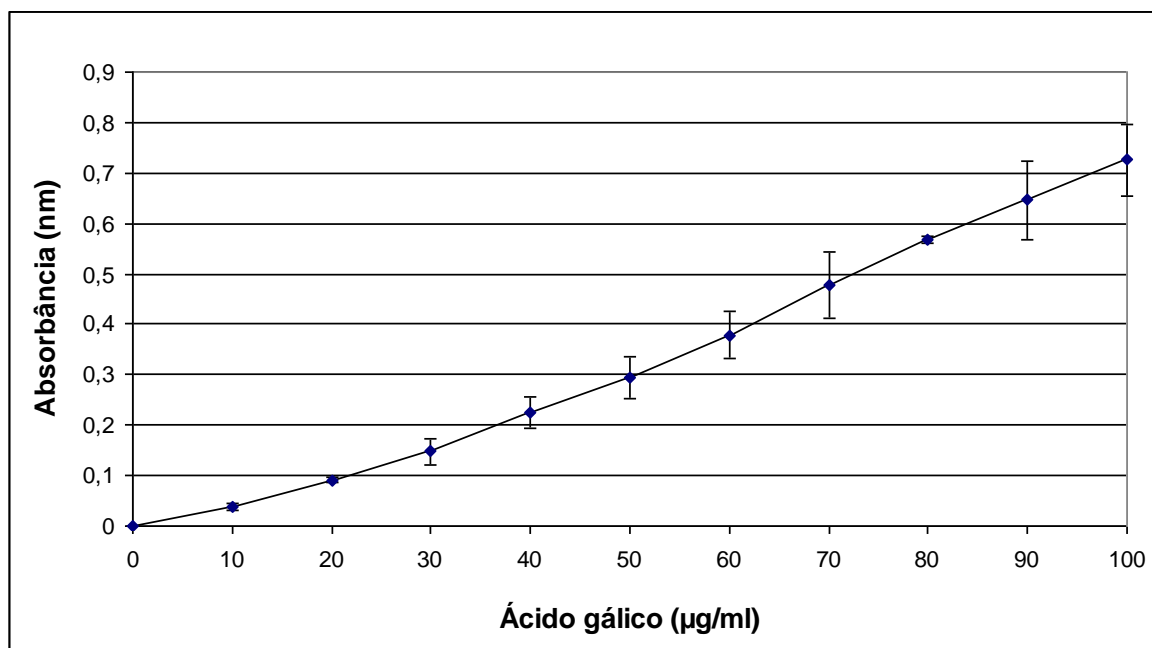


Figura 7 – Curva-padrão de ácido gálico.

## 2.5 Determinação do teor de resveratrol por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Inicialmente foram testados diferentes métodos para a análise das amostras, nos quais foram avaliadas diferentes proporções dos solventes da fase móvel e temperaturas. Foi utilizado um cromatógrafo Dionex<sup>®</sup>, modelo Ultimate 3000, com um detector *Diode Array* e coluna ACCLAIM C18 (Dionex Bonded Silica Products, 5 µm, 120 Å, com 4,6 x 250 mm). A fase móvel foi constituída pelo seguinte gradiente: água:metanol:acetonitrila (90:8:2), por 2 minutos. Aos 2 minutos, o gradiente passou para água:metanol:acetonitrila (70:8:22), até 10 minutos. Aos 10 minutos, a relação passou para água:acetonitrila (5:95), até 18 minutos. A temperatura do aparelho foi ajustada para 30°C, o volume injetado foi de 20µL, a taxa de fluxo foi de 1 mL/min e o comprimento de onda utilizado para a comparação do ultravioleta (UV) foi de 307 nm. Cada amostra foi injetada três vezes (n=3) (p < 0,05).

O cromatograma do padrão e o espectro de absorção de luz UV do *trans*-resveratrol por CLAE (Figura 8) foram definidos para fins de comparação com as amostras. A concentração de resveratrol foi determinada com base na curva padrão (Sigma<sup>®</sup>) construída com o mesmo método (Figura 9).

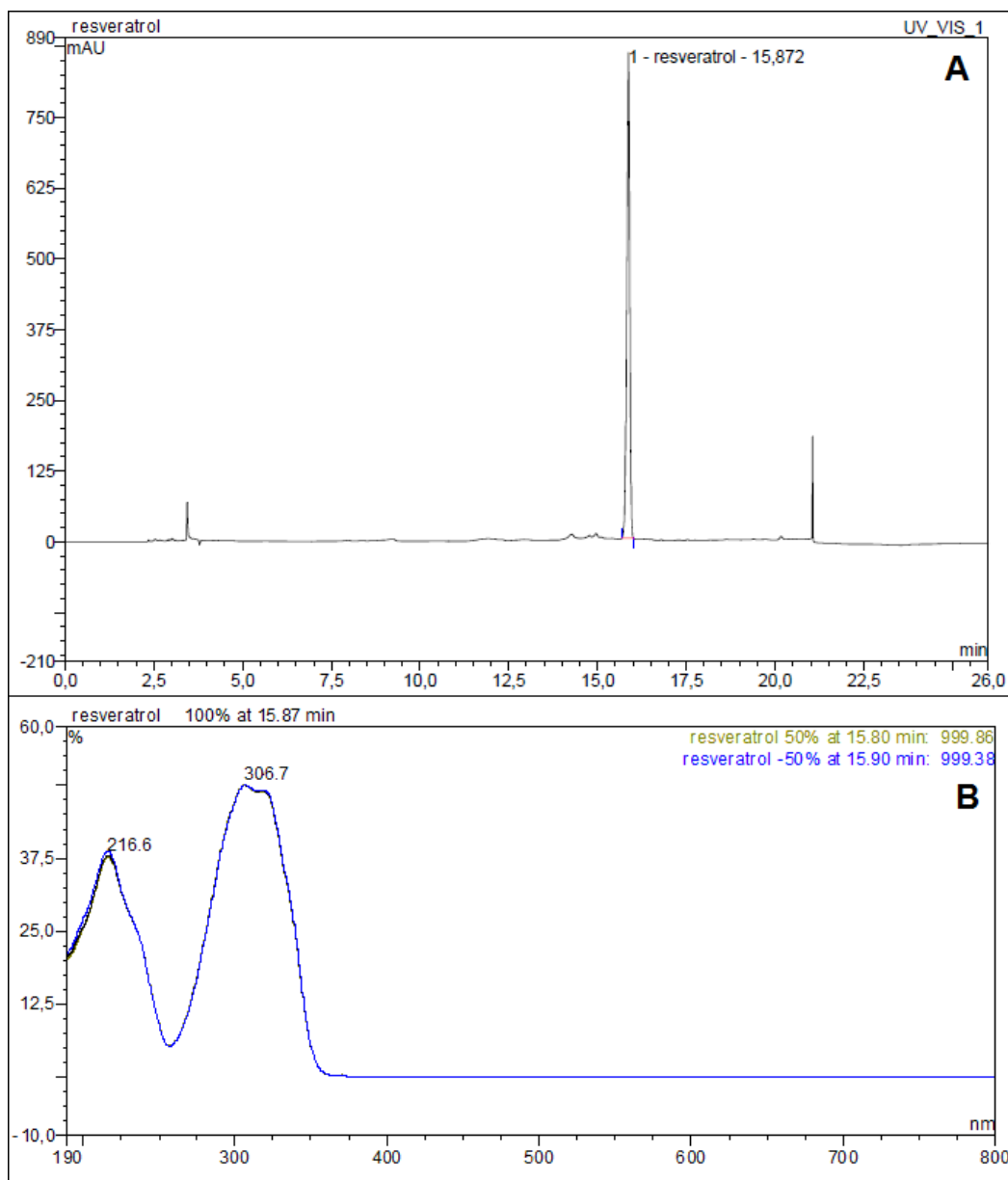


Figura 8 – Cromatograma do padrão (A) e do espectro de absorção de luz UV de *trans*-resveratrol (B) por CLAE.

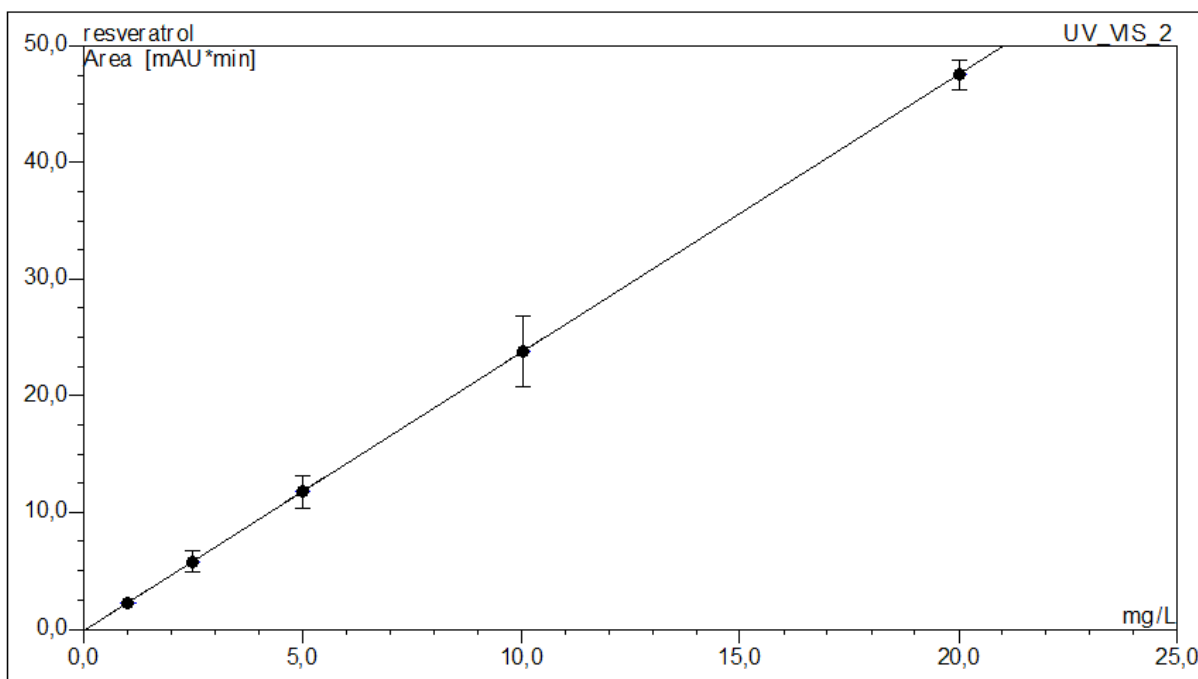


Figura 9 – Curva-padrão de resveratrol.

## 2.6 Cultura *in vitro*

Sementes de *A. hypogaea* das cinco cultivares foram lavadas três vezes com água e detergente. Depois de enxaguadas com água destilada, foram lavadas com etanol a 70% e imersas em cloreto de mercúrio ( $\text{HgCl}_2$ ) a 0,2% durante 30 minutos, sob agitação. Após esse período, foram realizadas três lavagens em água destilada, em câmara de fluxo laminar.

Para indução de morfogênese *in vitro*, cotilédones, folíolos e eixos embrionários foram excisados de sementes e inoculados em frascos vedados com tampas em polipropileno, contendo 25 mL de meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) semissólido, suplementado com diferentes concentrações de BAP (4,4; 8,8; 22; 30,8 e 44 $\mu\text{M}$ ) ou picloram (1,25; 2,5; 5; 10 e 20 $\mu\text{M}$ ), sacarose a 3% e solidificado com ágar a 0,75%. O pH do meio foi ajustado para 5,8 antes da esterilização em autoclave (15 minutos a 121°C e 1,0 atm). As culturas foram mantidas a 25 $\pm$ 2°C ou 30 $\pm$ 2°C, sob fotoperíodo de 16h, com intensidade luminosa média de 46  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  fornecida por lâmpadas fluorescentes do tipo branca fria.



## 2.7 Análise estatística

A avaliação estatística dos dados experimentais da extração por maceração, atividade antioxidante e teor de compostos fenólicos foi realizada através da análise de variância (ANOVA) e do teste de comparação de Tukey, com o auxílio do programa Graphpad InStat<sup>®</sup>. Foram considerados significativos os valores de  $p \leq 0,05$ , tendo sido adotado um intervalo de confiança de 95%.

A análise dos dados referentes à otimização da extração assistida por micro-ondas, foi realizada com o auxílio do programa Statistica 7.0<sup>®</sup> (Statsoft, Inc., USA). A significância dos coeficientes de regressão e as probabilidades foram determinadas pelo teste “t” de student. A variância explicada pelo modelo é dada pelo coeficiente de múltipla determinação,  $R^2$ .

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 Extração por maceração

Os fatores testados foram a proporção etanol-água do solvente de extração, o tipo de trituração do material vegetal seco, a proporção solvente-sólido, o tempo e o número de estágios de extração. A avaliação da eficiência de extração foi medida através da atividade de captura do radical DPPH e do rendimento dos extratos.

##### 3.1.1 Efeito da proporção etanol-água como solvente de extração

Quando a concentração de etanol aumentou de 20 a 80% (v/v), o percentual de captura do radical DPPH dos extratos aumentou de  $20,36 \pm 7,56\%$  para  $82,36 \pm 0,81\%$ , na concentração de 10 mg/mL (Figura 10).

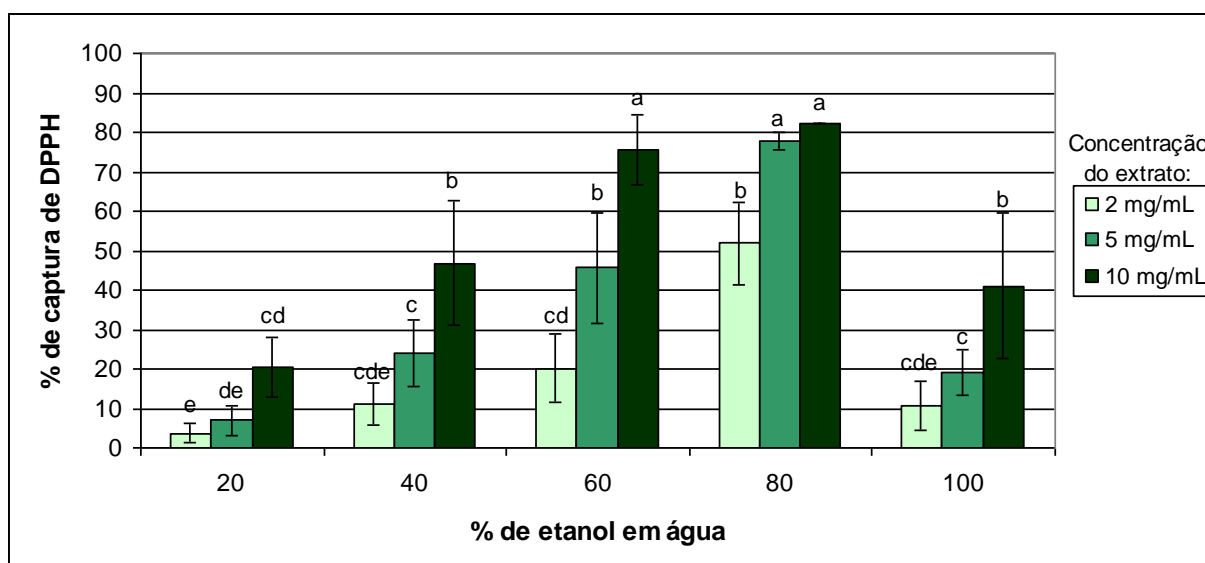


Figura 10 – Captura do radical DPPH por extratos de partes aéreas da cultivar IAC Caiapó em diferentes concentrações (2, 5 e 10 mg/mL), com diferentes proporções de etanol em água (20, 40, 60, 80 e 100%).

Os dados representam média  $\pm$  desvio padrão. Letras iguais indicam não haver diferença estatisticamente significativa entre os valores, pelo método de Tukey.

O mesmo pôde ser observado para o rendimento dos extratos, que aumentou de  $11,96 \pm 0,55\%$  para  $21,21 \pm 0,83\%$ , quando o conteúdo de etanol aumentou de 20 para 80% (v/v) (Figura 11).

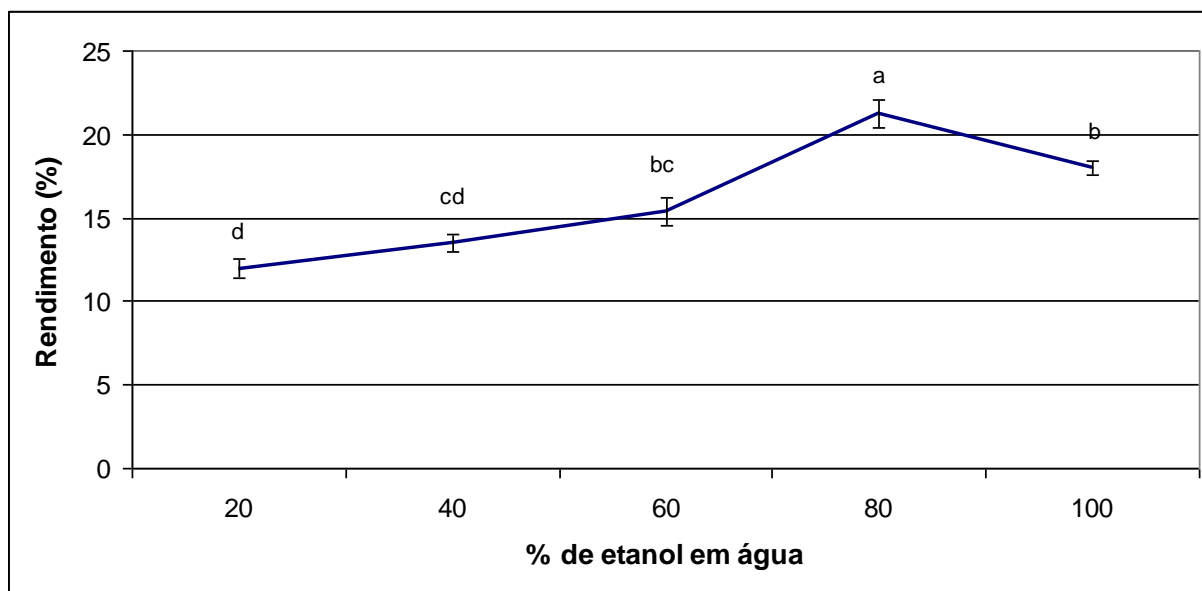


Figura 11 – Rendimento de extratos de partes aéreas da cultivar IAC Caiapó, preparados em diferentes proporções de etanol em água (20, 40, 60, 80 e 100%). Os dados representam média  $\pm$  desvio padrão. Letras iguais indicam não haver diferença estatisticamente significativa entre os valores, pelo método de Tukey.

### 3.1.2 Efeito do tipo de trituração do material vegetal seco

Não houve diferença estatisticamente significativa, tanto para a captura do radical DPPH (Figura 12), como para o rendimento dos extratos (Figura 13). Dessa forma, a trituração por almofariz e pistilo foi escolhida para os experimentos subsequentes, por ser considerada mais simples.

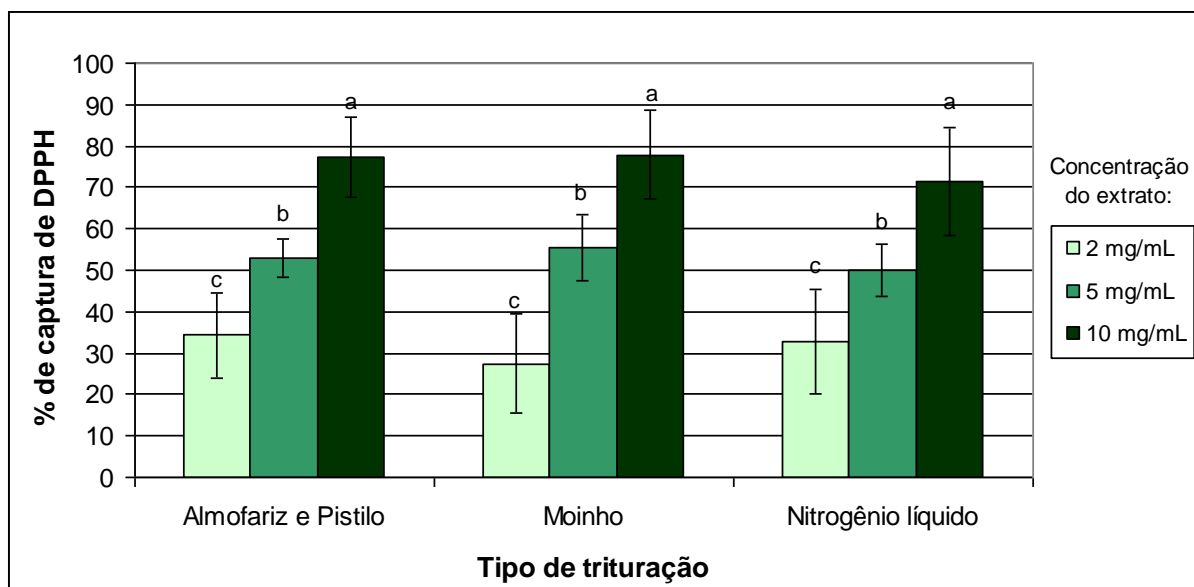


Figura 12 – Captura do radical DPPH por extratos de partes aéreas da cultivar IAC Caiapó em diferentes concentrações (2, 5 e 10 mg/mL) com diferentes tipos de trituração do material vegetal seco (almofariz e pistilo, moinho e Nitrogênio líquido). Os dados representam média  $\pm$  desvio padrão. Letras iguais indicam não haver diferença estatisticamente significativa entre os valores, pelo método de Tukey.

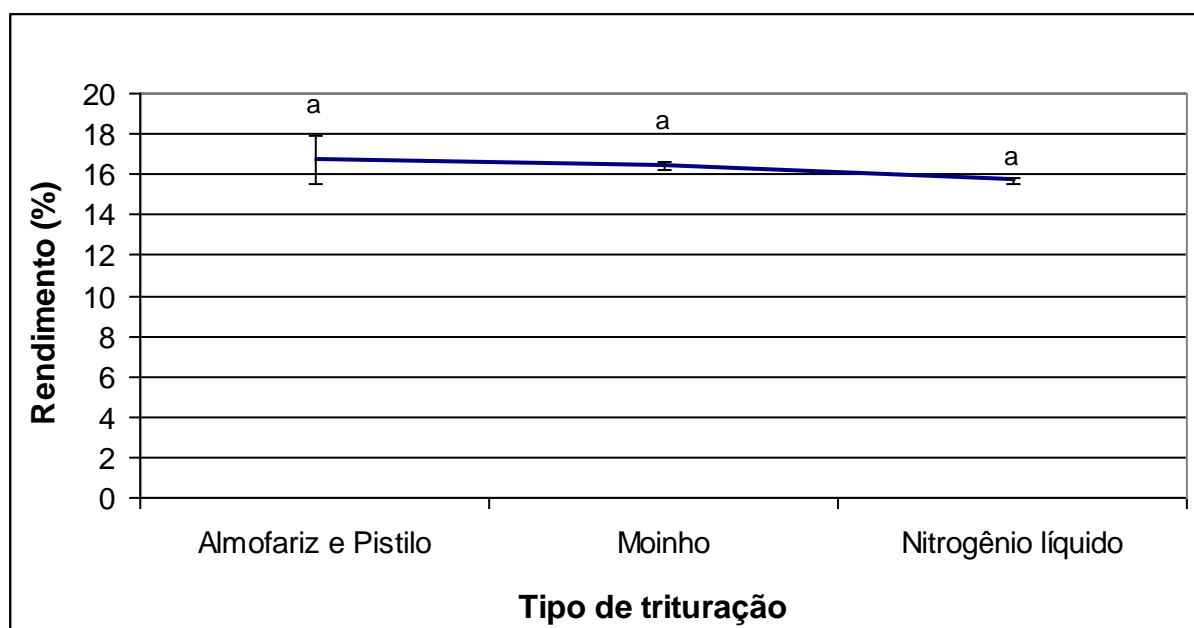


Figura 13 – Rendimento de extratos de partes aéreas da cultivar IAC Caiapó com diferentes tipos de trituração do material vegetal seco (almofariz e pistilo, moinho e Nitrogênio líquido). Os dados representam média  $\pm$  desvio padrão. A mesma letra indica não haver diferença estatisticamente significativa entre os valores, pelo método de Tukey.

### 3.1.3 Efeito da proporção solvente-sólido

Com relação à atividade de captura do radical DPPH, não houve diferença estatisticamente significativa entre as amostras obtidas em diferentes proporções solvente-sólido (Figura 14).

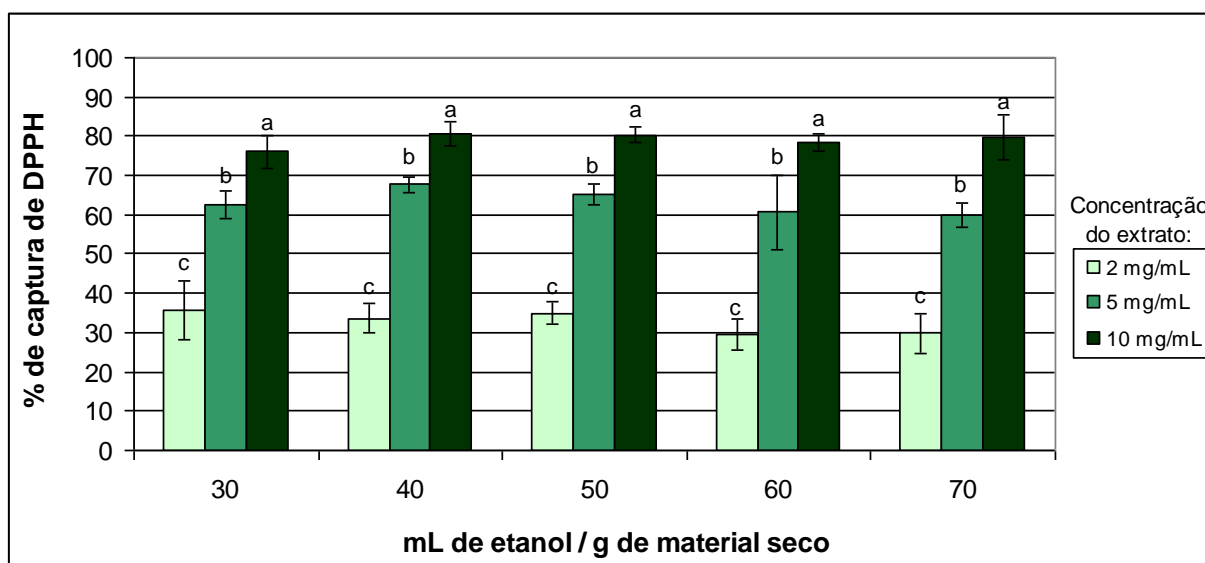


Figura 14 – Captura do radical DPPH por extratos de partes aéreas da cultivar IAC Caiapó em diferentes concentrações (2, 5 e 10 mg/mL) com diferentes proporções solvente/sólido para a extração (30, 40, 50, 60 e 70 mL/g).

Os dados representam média  $\pm$  desvio padrão. Letras iguais indicam não haver diferença estatisticamente significativa entre os valores, pelo método de Tukey.

A proporção solvente-sólido de 50 mL/g resultou no maior rendimento da extração (Figura 15).

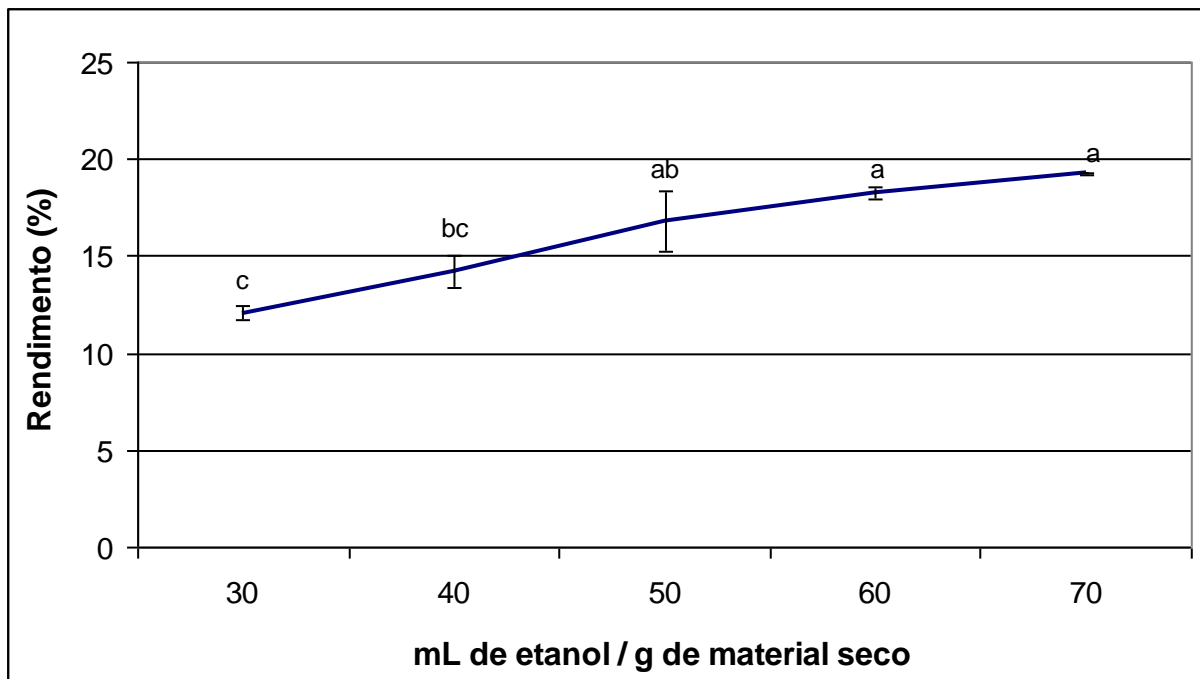


Figura 15 – Rendimento de extratos de partes aéreas da cultivar IAC Caiapó com diferentes proporções solvente-sólido para a extração (30, 40, 50, 60 e 70 mL/g). Os dados representam média  $\pm$  desvio padrão. Letras iguais indicam não haver diferença estatisticamente significativa entre os valores, pelo método de Tukey.

#### 3.1.4 Efeito do tempo de extração

Na concentração de 2 mg/mL, os tempos de 120 e 240 minutos proporcionaram os maiores percentuais de captura do radical DPPH ( $32,70 \pm 12,80\%$  e  $38,78 \pm 7,97\%$ , respectivamente) (Figura 16).

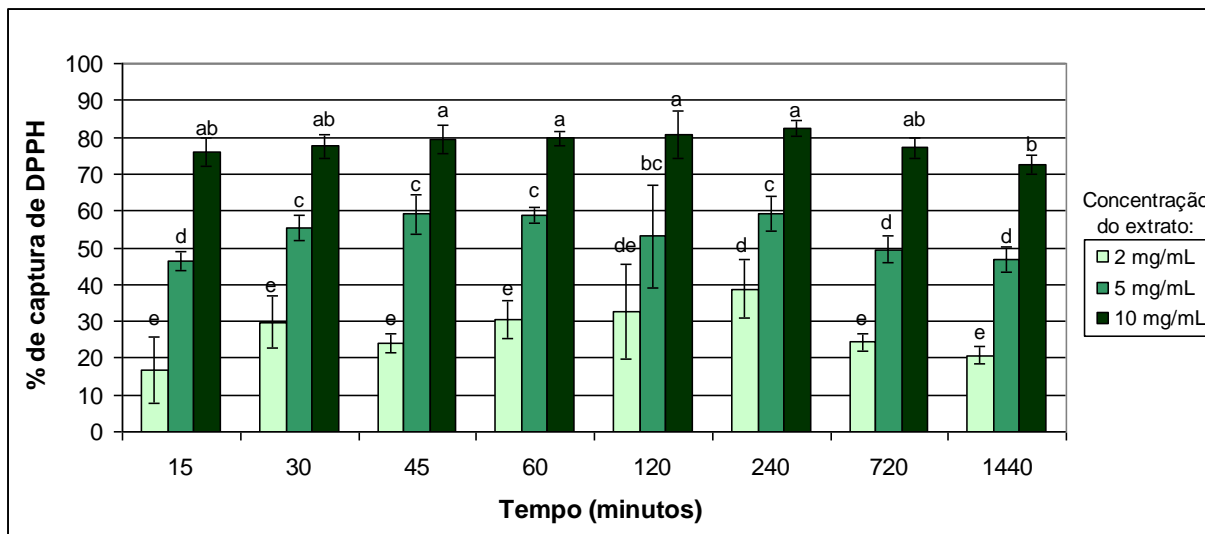


Figura 16 – Captura do radical DPPH por extratos de partes aéreas da cultivar IAC Caiapó em diferentes concentrações (2, 5 e 10 mg/mL) com diferentes tempos de extração (15, 30, 45, 60, 120, 240, 720 e 1440 minutos).

Os dados representam média  $\pm$  desvio padrão. Letras iguais indicam não haver diferença estatisticamente significativa entre os valores, pelo método de Tukey.

Não houve diferença estatisticamente significativa no rendimento dos extratos obtidos com tempos de extração superiores a 120 minutos. Dessa forma, foi adotado o tempo de 120 minutos, cujo rendimento foi de  $17,92 \pm 3,84\%$  (Figura 17).

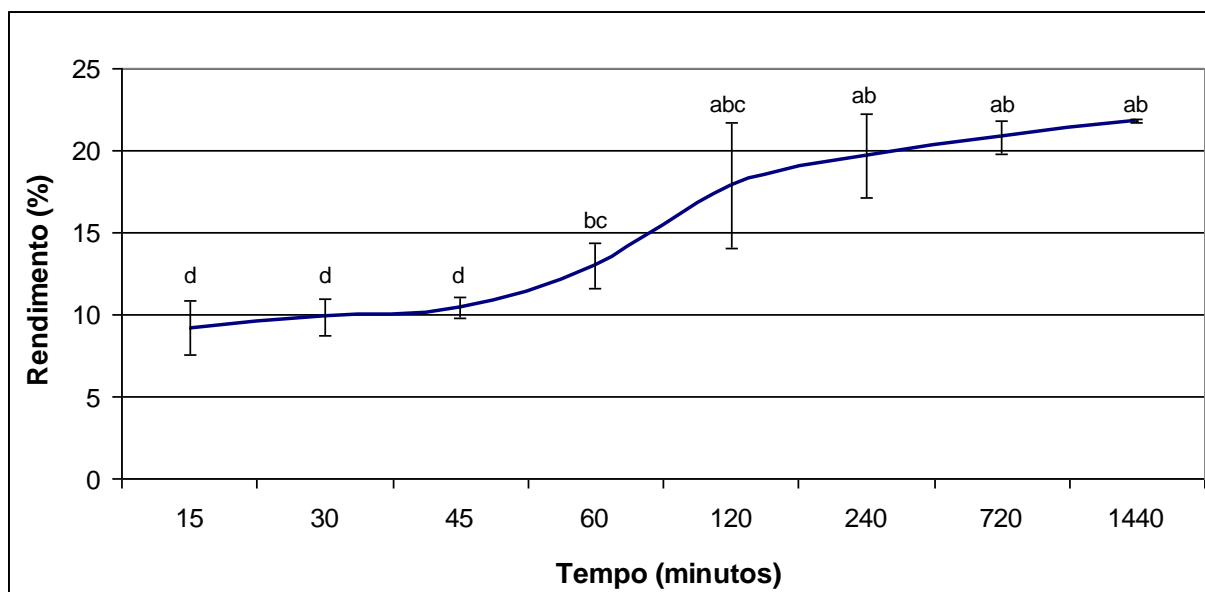


Figura 17 – Rendimento de extratos de partes aéreas da cultivar IAC Caiapó com diferentes tempos de extração (15, 30, 45, 60, 120, 240, 720 e 1440 minutos).

Os dados representam média  $\pm$  desvio padrão. Letras iguais indicam não haver diferença estatisticamente significativa entre os valores, pelo método de Tukey.

### 3.1.5 Efeito do número de estágios da extração

O percentual de captura do radical DPPH não foi influenciado pelo número de estágios em que foi efetuada a extração (Figura 18).

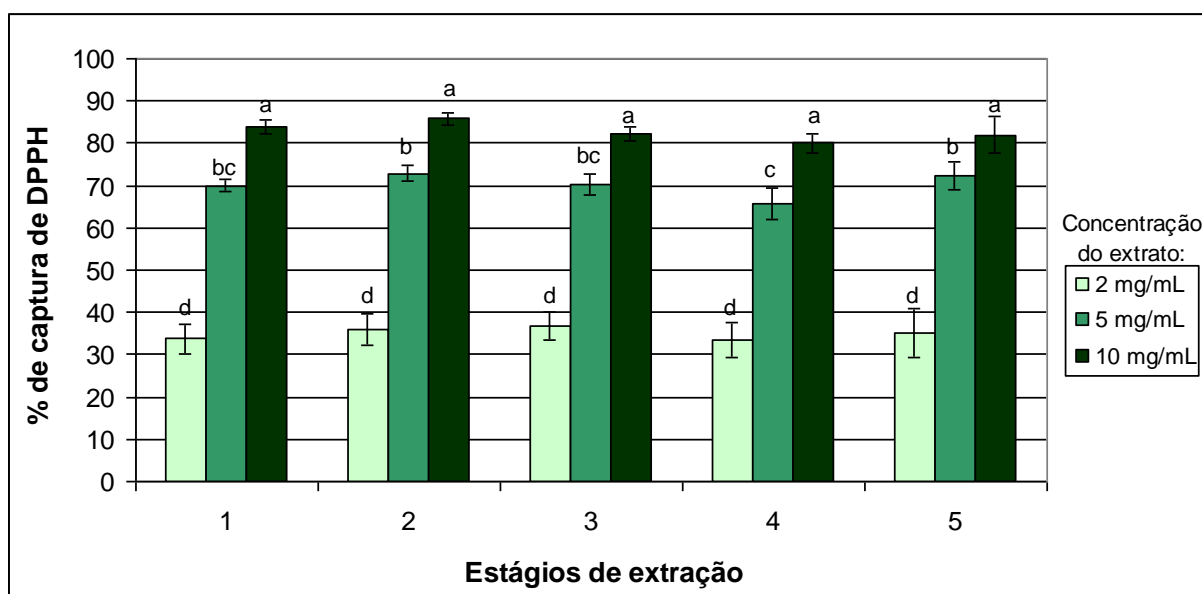


Figura 18 – Captura do radical DPPH por extratos de partes aéreas da cultivar IAC Caiapó em diferentes concentrações (2, 5 e 10 mg/mL) com diferentes estágios de extração (1, 2, 3, 4 e 5). Os dados representam média  $\pm$  desvio padrão. Letras iguais indicam não haver diferença estatisticamente significativa entre os valores, pelo método de Tukey.

O rendimento da extração de dois a cinco estágios variou de  $20,36 \pm 0,36\%$  até  $21,54 \pm 0,16\%$  (Figura 19). Como consequência, o uso de mais de dois estágios não é recomendado porque o aumento do volume de solvente utilizado não é justificado pelo aumento do rendimento da extração.



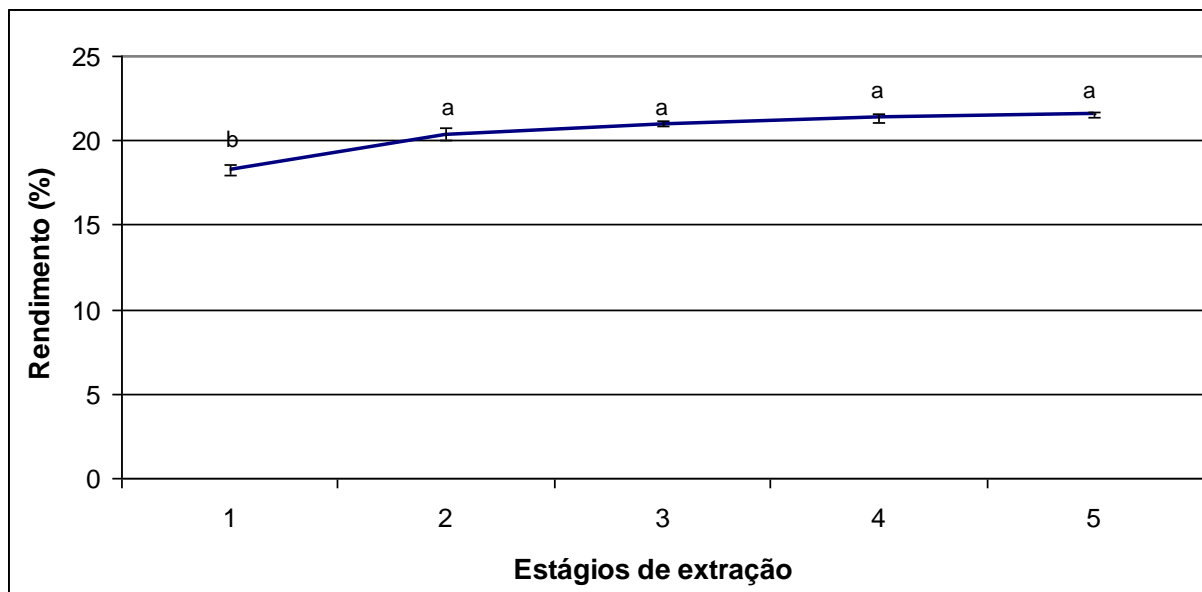


Figura 19 – Rendimento de extratos de partes aéreas da cultivar IAC Caiapó em diferentes estágios de extração (1, 2, 3, 4 e 5). Os dados representam média  $\pm$  desvio padrão. Letras iguais indicam não haver diferença estatisticamente significativa entre os valores, pelo método de Tukey.

### 3.2 Extração assistida por micro-ondas

Para o estabelecimento de uma metodologia de extração, foram estudadas as seguintes variáveis: temperatura, proporção solvente/material seco e agitação, em extratos de partes aéreas da cultivar IAC Caiapó, de *A. hypogaea*. O parâmetro adotado para avaliar a eficiência do processo foi a quantidade de resveratrol extraído. Inicialmente, foi realizado o planejamento fatorial fracionado. Os níveis utilizados para as variáveis nesse planejamento são apresentados na Tabela 1, enquanto que o planejamento experimental com os respectivos resultados é mostrado na Tabela 2.

Tabela 1 – Valores reais e codificados (+ nível superior, 0 nível intermediário, - nível inferior) para as variáveis independentes utilizadas no planejamento fatorial fracionado ( $2^{3-1}$ ).

Variáveis	-1	0	+1
Temperatura (°C)	30	50	70
Proporção solvente/sólido (mL/g)	40	50	60
Agitação (rpm)	600	900	1200

Tabela 2 – Planejamento fatorial fracionado e resultados dos respectivos experimentos para a extração de resveratrol.

Entrada	Níveis das variáveis			Resveratrol (mg/g extrato)
	Temperatura	Proporção	Agitação	
1	-1 (30)	-1 (30)	+1 (1200)	0,6105
2	+1 (70)	-1 (30)	-1 (600)	0,1814
3	-1 (30)	+1 (70)	-1 (600)	0,0687
4	+1 (70)	+1 (70)	+1 (1200)	0,0877
5	0 (50)	0 (50)	0 (900)	0,0579
6	0 (50)	0 (50)	0 (900)	0,0577
7	0 (50)	0 (50)	0 (900)	0,0612

A estimativa dos efeitos e o valor de  $p$  são mostrados na Tabela 3, onde é possível observar que a temperatura e a proporção tiveram efeitos negativos na faixa estudada, ou seja, quanto mais baixos os valores para essas variáveis, maior a extração de resveratrol. Também foi possível observar que a agitação teve uma influência positiva nesse processo.

Todas as influências das variáveis testadas no planejamento fatorial fracionado foram estatisticamente significativas, pois todas apresentaram um valor de  $p < 0,05$  (Tabela 3).

Tabela 3 – Estimativa dos efeitos das variáveis estudadas para a extração de resveratrol em partes aéreas da cultivar IAC Caiapó, de *A. hypogaea*.

Variável	Efeito	Valor de $p$
Média	0,802576	0,000269
Curvatura	- 0,356367	0,000075
Temperatura	- 0,086329	0,006157
Proporção solvente/sólido	- 0,056613	0,014145
Agitação	0,196407	0,000990

Após a realização do planejamento fatorial fracionado, foram determinadas novas faixas de valores para as variáveis significativas: temperatura de 30 a 50°C, proporção solvente/sólido de 30 a 50 mL/g e agitação de 900 a 1200 rpm. Em seguida, foi empregado um planejamento composto central rotacional, para a obtenção das condições ótimas de extração de resveratrol. Os parâmetros envolvidos nesse processo são os mesmos citados anteriormente ( $p < 0.05$ ) e as variáveis com os valores codificados e não codificados são mostrados na Tabela 4.

Tabela 4 – Valores reais e codificados (+ nível superior, 0 nível intermediário, - nível inferior) para as variáveis independentes utilizadas no delineamento composto central rotacional, 2<sup>3</sup>.

Variável	-1,68	-1	0	+1	+1,68
Temperatura (°C)	30	34	40	46	50
Proporção solvente/sólido (mL/g)	30	34	40	46	50
Agitação (rpm)	900	961	1050	1139	1200

No planejamento composto central rotacional, cada uma das três variáveis apresentou cinco níveis diferentes. Para a determinação dos valores a serem adotados em cada uma das variáveis, a análise dos dados indicou a necessidade de realização de 17 experimentos, com seis pontos fatoriais e três pontos centrais, permitindo a obtenção de um modelo quadrático. Os resultados obtidos em cada um desses experimentos são apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 – Planejamento composto central rotacional e resultados dos experimentos para a extração de resveratrol.

Entrada	Níveis das variáveis			Resveratrol (mg/g extrato)
	Temperatura	Proporção	Agitação	
1	-1 (34)	-1 (34)	-1 (961)	0,1421
2	+1 (46)	-1 (34)	-1 (961)	0,2257
3	-1 (34)	+1 (46)	-1 (961)	0,4278
4	+1 (46)	+1 (46)	-1 (961)	0,6169
5	-1 (34)	-1 (34)	+1 (1139)	1,0093
6	+1 (46)	+1 (46)	+1 (1139)	0,7210
7	-1 (34)	+1 (46)	+1 (1139)	0,9700
8	+1 (46)	+1 (46)	+1 (1139)	0,4564
9	-1,68 (30)	0 (40)	0 (1050)	0,7454
10	+1,68 (50)	0 (40)	0 (1050)	0,5808
11	0 (40)	-1,68 (30)	0 (1050)	0,7345
12	0 (40)	+1,68 (50)	0 (1050)	0,7598
13	0 (40)	0 (40)	-1,68 (900)	0,5875
14	0 (40)	0 (40)	+1,68 (1200)	1,1453
15	0 (40)	0 (40)	0 (1050)	0,7907
16	0 (40)	0 (40)	0 (1050)	0,7677
17	0 (40)	0 (40)	0 (1050)	0,8134

Os dados experimentais foram ajustados ao modelo proposto e a adequação foi realizada pela análise da variância e do coeficiente de múltipla determinação ( $R^2$ ). A equação a seguir representa o modelo matemático para a extração de resveratrol em função das variáveis.

$$Y = 0,802 - 0,059T - 0,086T^2 + 0,030P - 0,056P^2 + 0,196Agt - 0,134TAgt - 0,122PAgt$$

Onde  $Y$  é a quantidade de resveratrol extraído, e  $T$ ,  $P$  e  $Agt$  são os valores não codificados de temperatura, proporção e agitação, respectivamente.

A Tabela 6 representa a análise de variância dos dados pelo teste  $F$ . O valor do  $F$  calculado (8,48) foi maior que o  $F$  tabelado (3,29), mostrando a validação do

modelo experimental utilizado. A validação do modelo pode ser determinada pelo coeficiente de múltipla determinação ( $R^2$ ). O coeficiente de determinação múltipla ( $R^2 = 0.87$ ) indica a capacidade de validação do modelo, em função das variáveis independentes consideradas. No presente experimento, 87% dos valores para a extração de resveratrol são atribuídos às variáveis independentes e podem ser precisamente explicados pelo modelo.

Tabela 6 – Análise de variância para a validação dos modelos matemáticos (ANOVA).

Fator	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Valor quadrático médio	<i>F</i> calculado	<i>F</i> tabelado	Valor de <i>p</i>
Regressão	0,9500	7	0,1356	8,4783	3,2927	0,0024
Resíduos	0,1400	9	0,0159			
Falta de ajuste	0,1430	7				
Erro puro	0,0010	2				
TOTAL	1,0935	16				

Na análise da interação entre as variáveis, foi obtido um ponto de ótimo para a variável temperatura e a proporção, a partir do qual, um aumento dessas variáveis gera uma menor extração de resveratrol (Figura 20).

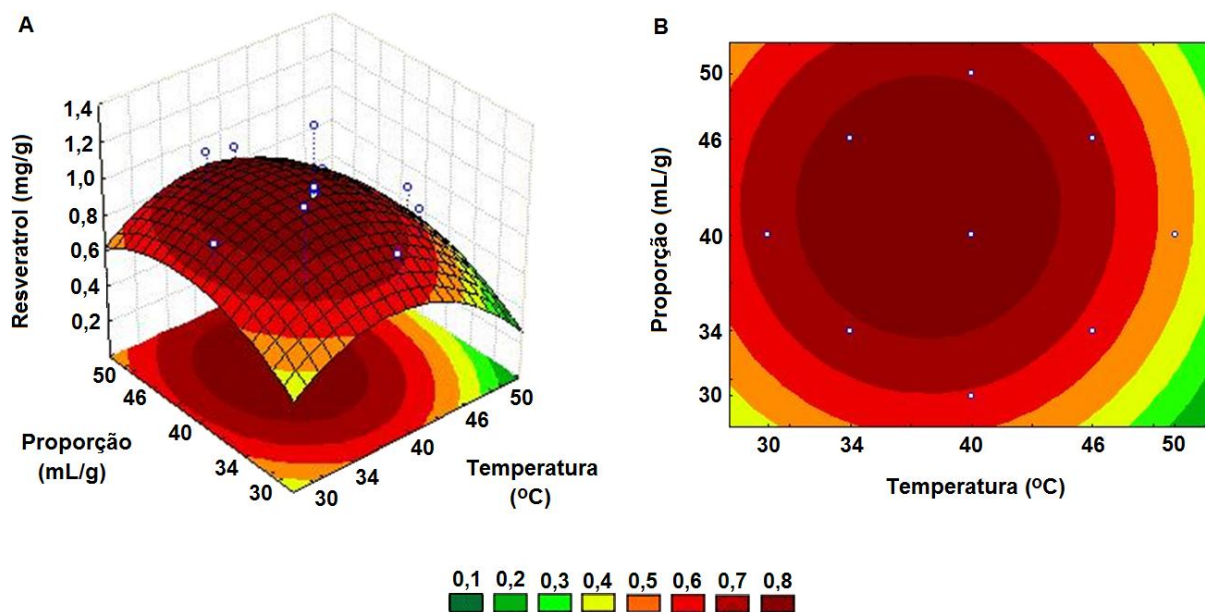


Figura 20 – Superfície de resposta (A) e curva de contorno (B) para a extração de resveratrol em função da proporção e da temperatura.

Na análise da interação entre as variáveis agitação e temperatura, observou-se que a primeira teve uma influência positiva no processo de extração de resveratrol, enquanto a segunda teve uma influência negativa (Figura 21).

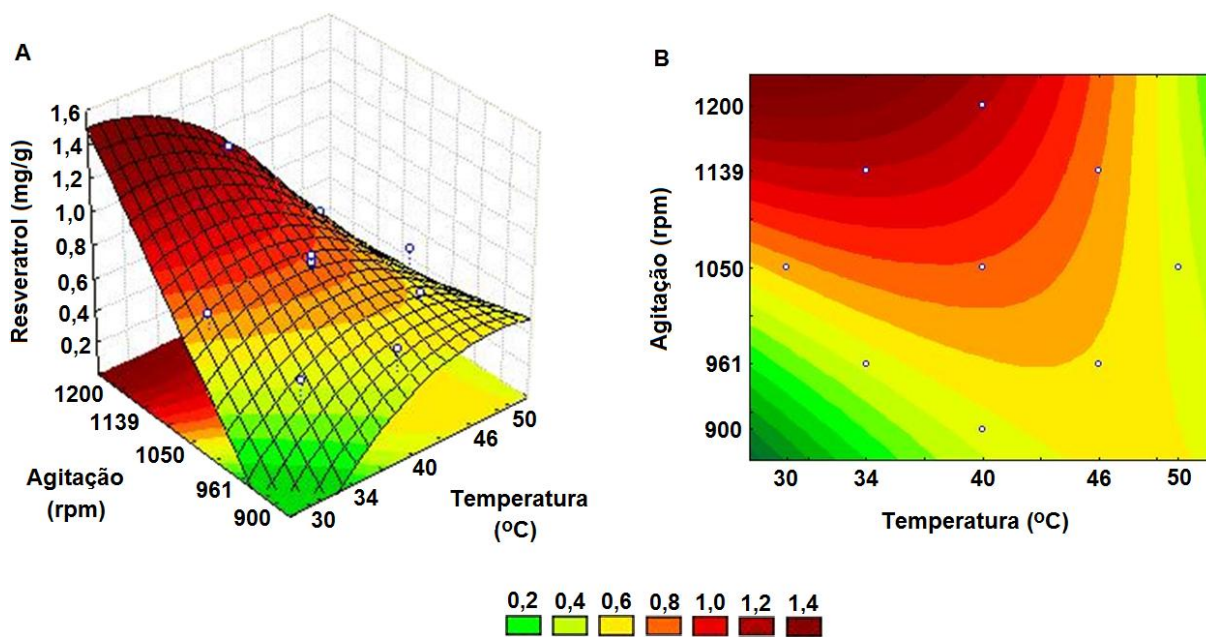


Figura 21 – Superfície de resposta (A) e curva de contorno (B) para a extração de resveratrol em função da agitação e da temperatura.

Com relação à interação entre as variáveis agitação e proporção, observou-se que a máxima agitação possível proporcionou a maior capacidade de extração, enquanto as proporções de solvente menores proporcionaram uma maior extração de resveratrol (Figura 22).

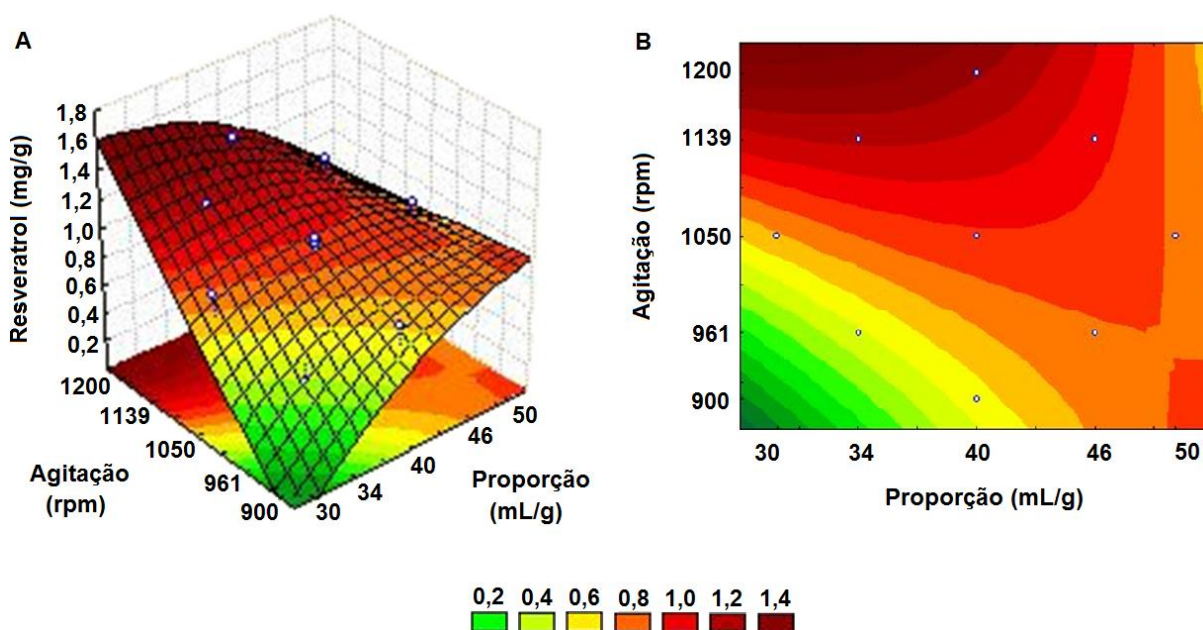


Figura 22 – Superfície de resposta (A) e curva de contorno (B) para a extração de resveratrol em função da agitação e da proporção.

Os resultados mostraram que as melhores condições para extração foram a temperatura de 37°C, com proporção solvente/sólido de 37 mL/g e maior agitação possível (1200 rpm).

Por fim, foi realizada a avaliação do melhor tempo de extração, com as condições otimizadas. Verificou-se que quinze minutos foram suficientes para a extração da maior quantidade de resveratrol (Figura 23).

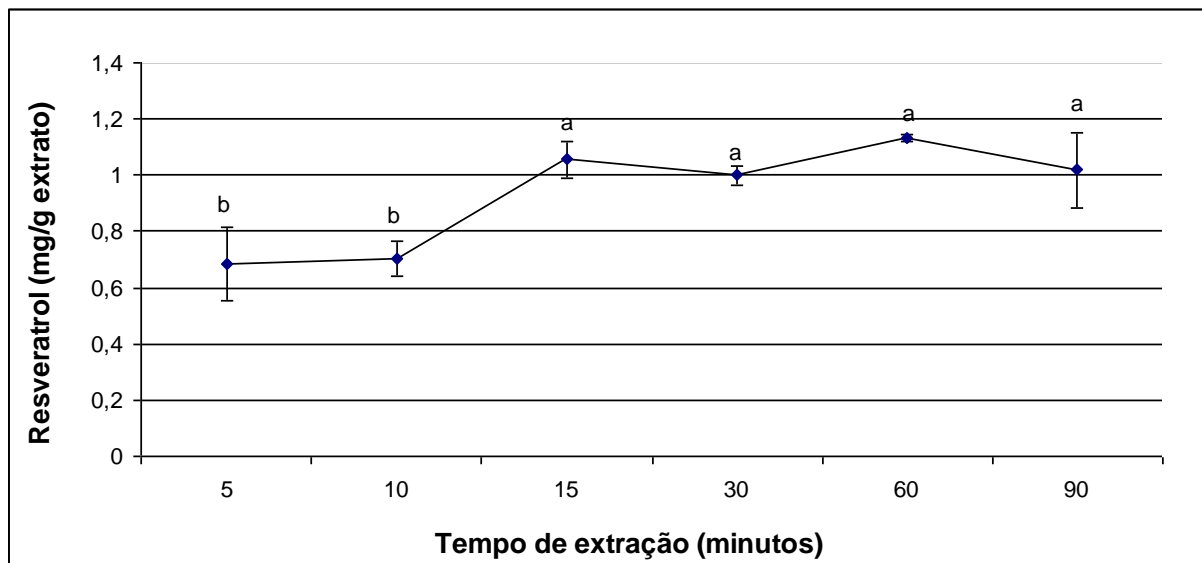


Figura 23 – Otimização do tempo de extração assistida por micro-ondas.

### 3.3 Estudos comparativos entre as cinco cultivares de *A. hypogaea*.

Uma vez otimizadas as variáveis para a extração de antioxidantes por maceração e para a extração de resveratrol assistida por micro-ondas, foram realizados estudos comparativos da eficiência das duas metodologias nas cinco cultivares estudadas, utilizando como parâmetros a atividade antioxidante, o teor de fenóis totais e o teor de resveratrol dos diferentes extratos.

#### 3.3.1 Atividade antioxidante

A capacidade de captura do radical DPPH foi maior nos extratos de raízes das cultivares IAC Caiapó ( $92,36 \pm 2,71\%$ ), IAC 8112 ( $88,28 \pm 3,97\%$ ) e IAC 99-1 ( $91,26 \pm 1,23\%$ ), preparados com o auxílio de micro-ondas. Os extratos de sementes foram os que tiveram menor atividade antioxidante, sendo que os extratos de sementes da cultivar 8112, obtidos por maceração ( $17,14 \pm 0,71\%$ ), foram os que apresentaram a menor atividade antioxidante (Tabela 7).



Tabela 7 – Captura do radical DPPH por extratos obtidos por maceração e assistidos por micro-ondas de órgãos de diferentes cultivares de *A. hypogaea*.

Cultivar	Material Vegetal	Captura de DPPH <sup>(1)</sup>	
		(%)	
		Maceração	Micro-ondas
IAC 886	Parte aérea	77,20 ± 2,25 <sup>c</sup>	58,25 ± 1,69 <sup>d</sup>
	Raiz	62,02 ± 7,08 <sup>cd</sup>	71,79 ± 7,52 <sup>c</sup>
	Semente	24,29 ± 2,32 <sup>ef</sup>	22,17 ± 4,12 <sup>efg</sup>
IAC Caiapó	Parte aérea	78,48 ± 4,18 <sup>bc</sup>	80,29 ± 4,56 <sup>b</sup>
	Raiz	77,26 ± 5,41 <sup>bc</sup>	92,36 ± 2,71 <sup>a</sup>
	Semente	21,28 ± 2,47 <sup>fg</sup>	19,28 ± 0,17 <sup>g</sup>
IAC Tatu ST	Parte aérea	84,17 ± 1,73 <sup>b</sup>	74,25 ± 7,29 <sup>bc</sup>
	Raiz	83,36 ± 2,43 <sup>b</sup>	82,10 ± 3,52 <sup>bc</sup>
	Semente	25,96 ± 3,89 <sup>ef</sup>	26,10 ± 1,47 <sup>e</sup>
IAC 8112	Parte aérea	78,37 ± 1,65 <sup>b</sup>	85,19 ± 2,89 <sup>b</sup>
	Raiz	66,05 ± 3,52 <sup>c</sup>	88,28 ± 3,97 <sup>ab</sup>
	Semente	17,14 ± 0,71 <sup>h</sup>	20,45 ± 8,68 <sup>efgh</sup>
IAC 99-1	Parte aérea	83,48 ± 2,31 <sup>b</sup>	82,96 ± 3,59 <sup>b</sup>
	Raiz	82,28 ± 4,26 <sup>b</sup>	91,26 ± 1,23 <sup>a</sup>
	Semente	20,66 ± 2,73 <sup>fg</sup>	19,25 ± 0,59 <sup>g</sup>

Nota<sub>1</sub>: Letras iguais indicam não haver diferença estatisticamente significativa entre os dados, de acordo com o teste de Tukey.

Nota<sub>2</sub>: Os dados representam média ± desvio padrão.

<sup>(1)</sup> Extratos a 10 mg/mL.

### 3.3.2 Teor de compostos fenólicos

Os extratos de raízes e partes aéreas foram os que apresentaram o maior teor de compostos fenólicos. Extratos de raízes das cultivares IAC Caiapó e IAC 8112 assistidos por micro-ondas apresentaram  $54,15 \pm 1,39$  e  $50,63 \pm 7,25$  mg EAG/g extrato, respectivamente. Um extrato de raiz preparado com maceração, da cultivar IAC Tatu, também apresentou elevado teor de compostos fenólicos ( $52,17 \pm 0,92$  mg EAG/g extrato). Dentre os extratos de partes aéreas, os das cultivares IAC Caiapó e IAC 8112 assistidos por micro-ondas apresentaram o maior teor de compostos fenólicos ( $50,18 \pm 2,77$  e  $51,87 \pm 6,32$  mg EAG/g extrato, respectivamente) (Tabela 8).

O menor teor de compostos fenólicos foi observado em extratos de sementes das cultivares IAC 886 e IAC Caiapó processados em micro-ondas ( $14,82 \pm 4,25$  e  $10,58 \pm 0,29$  mg EAG/g extrato, respectivamente). Extratos de sementes da cultivar IAC 886 provenientes de maceração também apresentaram teores baixos de compostos fenólicos ( $11,58 \pm 2,89$  mg EAG/g extrato), quando comparados aos demais (Tabela 8).

Tabela 8 – Teor de compostos fenólicos de extratos obtidos por maceração e assistidos por micro-ondas de órgãos de diferentes cultivares de *A. hypogaea*.

Cultivar	Material Vegetal	Teor de compostos fenólicos (mg EAG/g extrato)	
		Maceração	Micro-ondas
IAC 886	Parte aérea	20,90 ± 1,71 <sup>f</sup>	36,98 ± 2,51 <sup>cd</sup>
	Raiz	31,44 ± 1,12 <sup>e</sup>	49,89 ± 1,53 <sup>b</sup>
	Semente	11,58 ± 2,89 <sup>hi</sup>	14,82 ± 4,25 <sup>ghi</sup>
IAC Caiapó	Parte aérea	31,89 ± 0,80 <sup>e</sup>	50,18 ± 2,77 <sup>ab</sup>
	Raiz	31,15 ± 1,72 <sup>e</sup>	54,15 ± 1,39 <sup>a</sup>
	Semente	13,28 ± 2,85 <sup>h</sup>	10,58 ± 0,29 <sup>i</sup>
IAC Tatu ST	Parte aérea	35,02 ± 1,34 <sup>de</sup>	45,25 ± 3,29 <sup>b</sup>
	Raiz	52,17 ± 0,92 <sup>a</sup>	45,32 ± 3,16 <sup>b</sup>
	Semente	18,65 ± 0,58 <sup>fg</sup>	16,25 ± 2,65 <sup>gh</sup>
IAC 8112	Parte aérea	31,34 ± 0,87 <sup>de</sup>	51,87 ± 6,32 <sup>a</sup>
	Raiz	32,20 ± 4,11 <sup>de</sup>	50,63 ± 7,25 <sup>a</sup>
	Semente	18,28 ± 4,93 <sup>fg</sup>	17,21 ± 6,51 <sup>fg</sup>
IAC 99-1	Parte aérea	34,72 ± 1,43 <sup>de</sup>	43,22 ± 2,69 <sup>b</sup>
	Raiz	38,50 ± 1,70 <sup>cd</sup>	44,98 ± 3,11 <sup>b</sup>
	Semente	19,67 ± 2,47 <sup>fg</sup>	16,25 ± 5,62 <sup>fg</sup>

Nota<sub>1</sub>: Letras iguais indicam não haver diferença estatisticamente significativa entre os dados, de acordo com o teste de Tukey.

Nota<sub>2</sub>: Os dados representam média ± desvio padrão.

### 3.3.3 Teor de resveratrol

Os extratos de raízes foram os que apresentaram maior concentração de resveratrol. Na maceração, os extratos das cultivares IAC Tatu ST ( $1,614 \pm 0,356$  mg/g extrato) e IAC 99-1 ( $1,428 \pm 0,551$  mg/g extrato) foram os que apresentaram maior concentração de resveratrol. Na extração assistida por micro-ondas, além dos extratos de raízes, os extratos de partes aéreas das cultivares IAC Tatu St ( $1,074 \pm 0,099$  mg/g extrato) e IAC 99-1 ( $1,073 \pm 0,210$  mg/g extrato) também apresentaram a maior concentração de resveratrol.

Extratos de sementes apresentaram as menores concentrações de resveratrol, tanto na extração assistida por micro-ondas, quanto na extração por maceração. Para alguns extratos de parte aérea e raiz, em diferentes cultivares, a extração por micro-ondas foi mais eficiente do que a extração por maceração (Tabela 9).

O cromatograma referente à concentração de resveratrol e o espectro de absorção de luz UV pelo extrato de raiz da cultivar IAC Tatu ST oriundo de maceração são mostrados na Figura 24.

Tabela 9 – Concentração de resveratrol em extratos obtidos por maceração e assistidos por micro-ondas de órgãos de diferentes cultivares de *A. hypogaea*.

Cultivar	Material Vegetal	Resveratrol (mg/g extrato)	
		Maceração	Micro-ondas
IAC 886	Parte aérea	0,299 ± 0,054 <sup>de</sup>	0,739 ± 0,027 <sup>bc</sup>
	Raiz	0,536 ± 0,291 <sup>bcd</sup>	1,228 ± 0,104 <sup>a</sup>
	Semente	0,212 ± 0,045 <sup>ef</sup>	0,229 ± 0,008 <sup>ef</sup>
IAC Caiapó	Parte aérea	0,409 ± 0,161 <sup>d</sup>	0,929 ± 0,145 <sup>bc</sup>
	Raiz	0,418 ± 0,007 <sup>d</sup>	1,188 ± 0,097 <sup>ab</sup>
	Semente	0,125 ± 0,089 <sup>f</sup>	0,318 ± 0,070 <sup>de</sup>
IAC Tatu ST	Parte aérea	0,862 ± 0,058 <sup>bc</sup>	1,074 ± 0,099 <sup>ab</sup>
	Raiz	1,614 ± 0,356 <sup>a</sup>	1,371 ± 0,074 <sup>a</sup>
	Semente	0,417 ± 0,025 <sup>d</sup>	0,345 ± 0,039 <sup>d</sup>
IAC 8112	Parte aérea	0,249 ± 0,063 <sup>def</sup>	0,739 ± 0,039 <sup>bc</sup>
	Raiz	0,432 ± 0,092 <sup>d</sup>	1,281 ± 0,026 <sup>ab</sup>
	Semente	0,278 ± 0,098 <sup>def</sup>	0,261 ± 0,004 <sup>e</sup>
IAC 99-1	Parte aérea	0,645 ± 0,111 <sup>bcd</sup>	1,073 ± 0,210 <sup>abc</sup>
	Raiz	1,428 ± 0,551 <sup>ab</sup>	1,256 ± 0,013 <sup>ab</sup>
	Semente	0,301 ± 0,044 <sup>de</sup>	0,282 ± 0,046 <sup>def</sup>

Nota<sub>1</sub>: Letras iguais indicam não haver diferença estatisticamente significativa entre os dados, de acordo com o teste de Tukey.

Nota<sub>2</sub>: Os dados representam média ± desvio padrão.

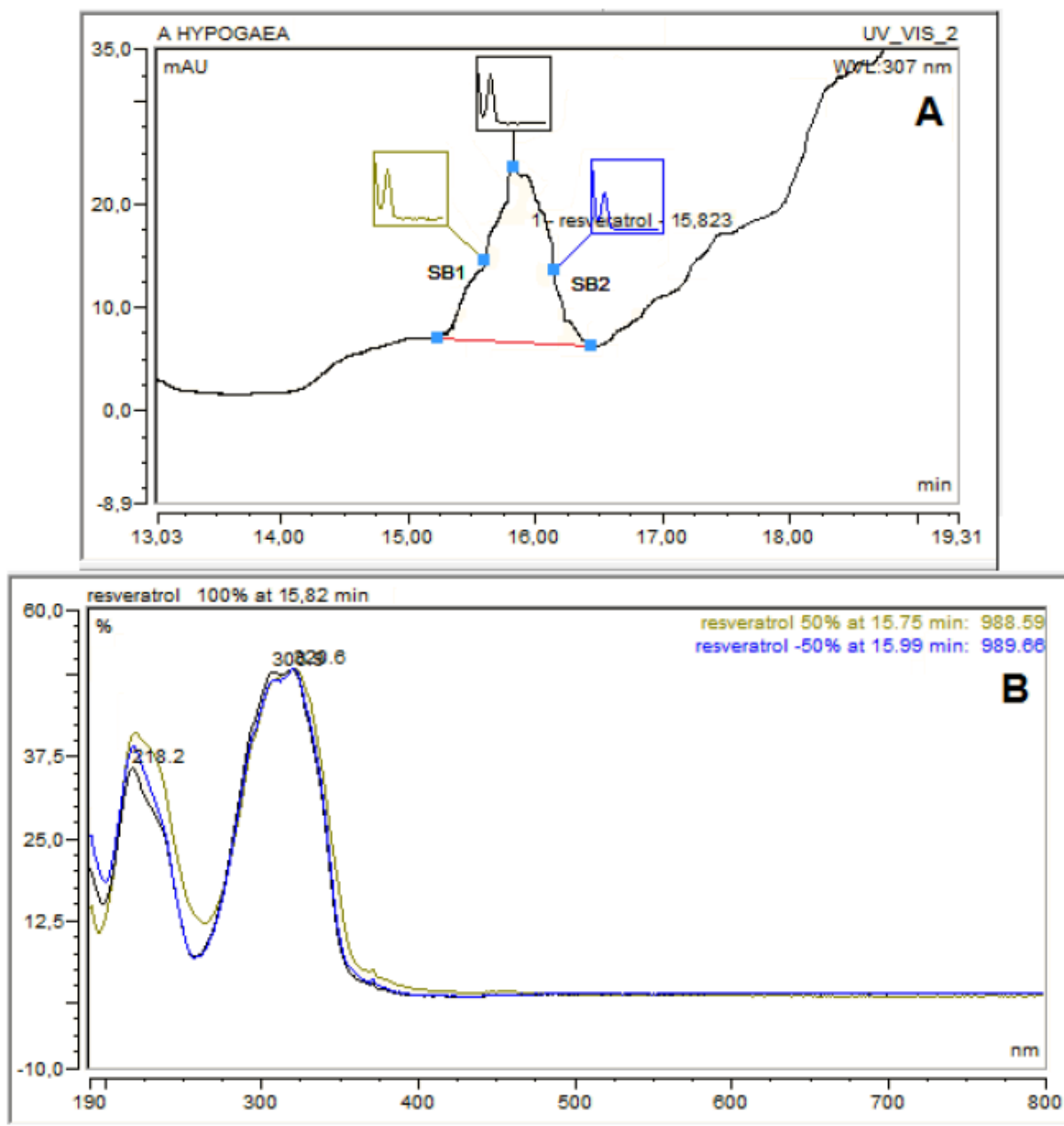


Figura 24 – Cromatograma da concentração de resveratrol (A) e do espectro de absorção de luz UV (B) pelo extrato de raiz da cultivar IAC Tatu ST oriundo de maceração.

### 3.4 Cultura de Tecidos

Considerando o potencial de uso de sistemas *in vitro* para a produção de metabólitos em *A. hypogaea*, foram também realizados estudos de cultura de tecidos a partir de explantes das cultivares escolhidas para este trabalho. Além dos fitorreguladores mencionados a seguir, o 2,4D também foi utilizado, mas não apresentou valores significativos para a morfogênese.

#### 3.4.1 Morfogênese induzida por BAP

Alguns padrões puderam ser observados neste procedimento. Cotilédones e eixos embrionários foram os explantes mais responsivos, principalmente na temperatura de  $25\pm 2^{\circ}\text{C}$  (Tabela 10). Dentre as diferentes concentrações de BAP, as mais altas foram as que apresentaram os melhores resultados (22 a  $44\ \mu\text{M}$ ). As cultivares IAC Caiapó e IAC Tatu ST (Figura 25) foram aquelas nas quais os explantes mais apresentaram regeneração (Tabela 10).

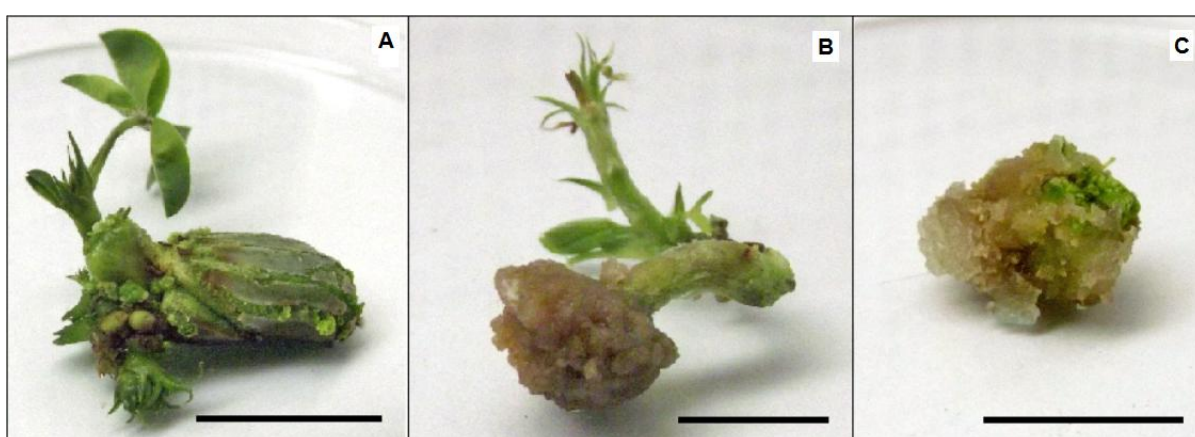


Figura 25 – Formação de calos organogênicos a partir de explantes da cultivar IAC Tatu ST em resposta a BAP  $30,8\ \mu\text{M}$ , após 45 dias, a  $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ . Barra = 1cm.

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

Tabela 10 – Frequência de regeneração a partir de explantes das cultivares de *A. hypogaea* em meio MS suplementado com diferentes concentrações de BAP, após 45 dias de cultura a 25±2°C e a 30±2°C.

Explantes responsivos (%)											
Explante	Concentração de BAP (µM)	IAC 886		IAC Caiapó		IAC Tatu ST		IAC 8112		IAC 99-1	
		25±2°C	30±2°C	25±2°C	30±2°C	25±2°C	30±2°C	25±2°C	30±2°C	25±2°C	30±2°C
Cotilédone	4,4	30	25	35	30	35	30	25	15	25	-
	8,8	25	30	45	35	35	30	15	10	35	30
	22	50	45	55	40	35	30	35	25	35	25
	30,8	55	35	45	35	40	40	25	30	30	20
	44	40	35	45	40	25	25	45	25	45	15
Eixo embrionário	4,4	30	10	50	55	70	50	40	30	15	-
	8,8	35	30	65	25	65	45	40	40	35	15
	22	45	45	65	50	75	65	55	45	45	45
	30,8	45	30	70	55	75	80	45	45	50	45
	44	35	15	55	-	75	60	55	-	45	45
Folíolo embrionário	4,4	-	10	-	25	50	45	35	35	35	-
	8,8	-	15	45	20	45	30	40	30	35	20
	22	35	-	40	-	40	05	20	15	35	20
	30,8	15	-	-	35	45	15	-	15	25	25
	44	-	-	35	-	45	40	45	40	35	25



### 3.4.2 Morfogênese induzida por PIC

A maior parte dos calos friáveis foi formada a partir de cotilédones e folíolos embrionários, na temperatura de  $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ , nos meios suplementados com as concentrações mais baixas de PIC (1,25; 2,5 e  $5\mu\text{M}$ ) (Tabela 11). Dentre as cultivares, IAC Caiapó (Figura 26) e IAC 8112 foram as que mais formaram calos friáveis quando comparadas com as demais (Tabela 11).



Figura 26 – Formação de calos friáveis a partir de explantes da cultivar IAC Caiapó, em resposta a PIC  $1,25\mu\text{M}$ , após 45 dias, a  $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ . Barra = 1cm.

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

Tabela 11 – Frequência de regeneração a partir de explantes das cultivares de *A. hypogaea* em meio MS suplementado com diferentes concentrações de PIC, após 45 dias de cultura a 25±2°C e a 30±2°C.

<b>Calogênese (%)</b>											
<b>Explante</b>	<b>Concentração de PIC (µM)</b>	<b>IAC 886</b>		<b>IAC Caiapó</b>		<b>IAC Tatu ST</b>		<b>IAC 8112</b>		<b>IAC 99-1</b>	
		<b>25±2°C</b>	<b>30±2°C</b>	<b>25±2°C</b>	<b>30±2°C</b>	<b>25±2°C</b>	<b>30±2°C</b>	<b>25±2°C</b>	<b>30±2°C</b>	<b>25±2°C</b>	<b>30±2°C</b>
Cotilédone	1,25	30	35	40	50	35	35	45	45	35	-
	2,5	35	40	55	45	45	30	55	50	40	40
	5	30	25	65	50	50	45	60	55	45	35
	10	25	15	55	45	-	40	60	40	40	40
	20	-	25	55	-	30	35	40	45	30	30
Eixo embrionário	1,25	20	15	35	40	30	25	35	35	15	15
	2,5	20	10	30	25	20	25	40	30	15	10
	5	25	10	40	20	20	15	40	25	20	05
	10	-	05	-	25	-	20	30	15	20	25
	20	-	-	30	30	15	-	30	-	-	10
Folíolo embrionário	1,25	40	30	45	50	35	40	55	45	45	35
	2,5	35	30	65	45	45	40	65	40	40	25
	5	35	25	40	45	55	35	50	45	30	-
	10	-	25	55	45	40	30	55	45	35	-
	20	25	-	-	45	35	20	55	40	25	15

## 4 DISCUSSÃO

O estudo dos metabólitos secundários vem recebendo bastante atenção da comunidade científica nos últimos tempos, considerando sua importância do ponto de vista social e econômico, incluindo a promoção de vários benefícios à saúde (LIU *et al.*, 2011). Um dos principais benefícios é a atividade antioxidante, presente em diversos grupos de alimentos que possuem a capacidade de minimizar os efeitos provocados pelo estresse oxidativo, através da captura de espécies reativas de oxigênio (EROs). Os radicais livres são poderosos agentes oxidantes que podem ser produzidos como consequência das próprias atividades metabólicas das células, além de estarem presentes no ar, nos alimentos ou na água. Embora sejam importantes em diversos processos, sua produção excessiva pode provocar danos a uma série de biomoléculas, levando ao desenvolvimento de várias enfermidades. Nesse sentido, a busca por antioxidantes que sejam capazes de minimizar os efeitos provocados pelo estresse oxidativo é alvo de vários estudos (LIU; HOTCHKISS, 1995; BIANCHI; ANTUNES, 1999).

Atualmente, diversos antioxidantes sintéticos são aplicados na indústria alimentícia, como butilhidroxianisol (BHA), butilhidroxitolueno (BHT) e terc-butilhidroquinona (TBHQ). Entretanto, seu uso é controlado devido aos possíveis riscos à saúde, pelo fato de seus mecanismos de ação não estarem totalmente elucidados. Diante disso, os metabólitos oriundos de alimentos naturais representam uma alternativa mais saudável e econômica (VALENTÃO *et al.*, 2002).

Na obtenção e análise de metabólitos secundários, a metodologia de extração pode ser crucial para a qualidade e a quantidade obtidas. Além disso, fatores como solvente, temperatura, tempo, proporção solvente/sólido e número de estágios devem ser analisados. Outros fatores inerentes à própria planta, como a espécie, o genótipo ou acesso, o local e a época de coleta, a idade e o órgão, também são bastante importantes (ANDREO; JORGE, 2006). Neste trabalho foram buscadas as melhores condições para a extração de substâncias antioxidantes de partes aéreas da cultivar IAC Caiapó. A atividade antioxidante dos extratos foi determinada através do método do radical DPPH, em uma reação onde o extrato atua como agente redutor e o radical como agente oxidante. Os compostos antioxidantes presentes nos extratos transferem elétrons para o radical. A mudança de coloração, de roxo

para amarelo, indica a ocorrência da reação, que é verificada por espectrofotometria (BRAND-WILIAMS *et al.*, 1995).

Os resultados obtidos mostraram as seguintes condições como sendo as melhores para os extratos preparados por maceração: i) 80% de proporção etanol-água como solvente; ii) almofariz e pistilo para a trituração do material vegetal seco; iii) 50 mL/g de relação solvente-sólido; iv) 120 minutos de tempo de maceração e v) dois estágios de extração. Em um trabalho similar, que buscou a otimização da extração de antioxidantes em tegumentos de amendoim argentino, foram encontrados 70% de proporção etanol-água, 20 mg/mL de relação solvente/sólido, 10 minutos de tempo de extração e três estágios como sendo as melhores condições para a extração (NEPOTE *et al.*, 2005). Essas diferenças podem ser explicadas, em parte, pelo maior teor de lipídios presentes no tegumento.

Foi também estudada a extração assistida por micro-ondas, adotando como parâmetro o teor de resveratrol obtido. Nesse tipo de extração, uma agitação alta proporcionou maior número de choques entre o material e o solvente, assim facilitando a extração do composto. A elevação da temperatura proporcionou uma maior extração de resveratrol até determinado ponto, a partir do qual houve degradação do composto. Na proporção entre solvente e material vegetal, a quantidade de solvente foi suficiente para atingir todo o material, mas não tão grande que permitisse uma diluição excessiva dos compostos extraídos. O tempo de reação não é geralmente considerado como sendo uma variável em planejamentos experimentais, uma vez que causa grandes influências no sistema e nas outras variáveis, podendo mascarar ou confundir eventuais respostas. Quanto maior o tempo, maior tende a ser a extração, embora elevados tempos de extração possam promover a degradação do composto de interesse (CORRÊA *et al.*, 2012).

A otimização da extração de resveratrol foi realizada através da metodologia de superfície de resposta, onde foi possível avaliar a influência da temperatura, da proporção solvente/sólido e da agitação no processo de extração (SANTOS *et al.*, 2008). Esta é uma ferramenta estatística para o desenvolvimento e otimização de processos com uma ou mais respostas influenciadas, ou não, por diferentes variáveis. Este tipo de planejamento experimental permite a coleta de um maior número de informação a partir de um número relativamente pequeno de experimentos. Além disso, o uso dessa metodologia também permite a observação

dos efeitos das variáveis individualmente e a combinação da interação destas na resposta desejada (JÚNIOR, 2011).

As melhores condições encontradas para a extração de resveratrol foram: temperatura de 37°C, proporção solvente/sólido de 37 mL/g e agitação de 1200 rpm. Quando comparados com trabalhos de otimização da extração de flavonolignanas (DHOBÍ *et al.*, 2009) e antocianinas (SUN *et al.*, 2007), esses resultados são similares com relação ao tempo. Entretanto, a proporção solvente/material vegetal considerada ótima nesses outros trabalhos foi inferior à proporção encontrada no presente trabalho.

Após a padronização das duas metodologias de extração, foram realizados testes de atividade antioxidante, teor de fenóis totais e teor de resveratrol para a comparação entre órgãos das diferentes cultivares, com extratos preparados utilizando as metodologias otimizadas.

Com relação à atividade antioxidante, de uma maneira geral, os extratos de raízes tiveram os maiores percentuais dentre todos os materiais vegetais analisados. Extratos de raízes da cultivar IAC 8112 (10 mg/mL) processados em micro-ondas apresentaram  $88,28 \pm 3,97\%$  de captura do radical DPPH. Esse resultado pode ser considerado muito bom, pois corresponde a 0,39 mg/mL de equivalente em quercetina, um valor semelhante ao encontrado por DUARTE-ALMEIDA *et al.* (2006) em extratos de acerola, e cerca de três vezes superior ao encontrado pelo mesmo autor em extratos de amora e açaí. Outro trabalho, realizado com cascas e raízes de *A. hypogaea*, também apresentou resultados similares (SIM *et al.*, 2012).

A capacidade antioxidante de extratos vegetais está relacionada, principalmente, aos compostos fenólicos, que são divididos em diversos subgrupos, tais 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). Os compostos fenólicos podem apresentar uma capacidade antioxidante maior que a dos carotenoides e a vitamina E, por exemplo. Essa capacidade pode ser atribuída à sua habilidade de quelação de íons metálicos envolvidos na produção de radicais livres (YANG *et al.*, 2001).

A dosagem do teor de fenóis totais foi realizada com a utilização do reagente de Folin-Ciocalteu, uma mistura dos ácidos fosfomolibídico e fosfotungstístico, na qual o molibdênio e o tungstênio encontram-se em estado de oxidação. Na presença de agentes redutores, como os compostos fenólicos, formam-se o molibdênio azul e

o tungstênio azul, nos quais os diferentes estados de oxidação permitem a determinação da concentração das substâncias redutoras (SOUSA *et al.*, 2007). Os extratos de partes aéreas e raízes foram os que apresentaram maior teor de compostos fenólicos totais. O maior valor foi encontrado em extratos de raízes da cultivar IAC Caiapó, preparados com auxílio de micro-ondas ( $54,15 \pm 1,39$  mg EAG/g extrato). Esses resultados foram similares aos encontrados por NEPOTE *et al.* (2002), em um trabalho com extratos de tegumento de amendoim feitos com diferentes solventes, e superiores aos encontrados por ASHRAF *et al.* (2011), em um trabalho realizado com frutas tropicais.

Com relação ao teor de resveratrol, foi observado que extratos de raízes também apresentaram os valores mais elevados, seguidos por extratos de partes aéreas e de sementes. Enquanto o teor de resveratrol mais alto encontrado em extratos raízes foi de  $1,614 \pm 0,356$  mg/g de extrato, o maior valor para extratos de partes aéreas foi de  $1,074 \pm 0,099$  mg/g e para sementes foi de  $0,417 \pm 0,025$  mg/g. Esses resultados são similares aos encontrados em outros trabalhos que também avaliaram a produção de resveratrol em plantas *in vivo* de *A. hypogaea*. CHUNG *et al.* (2003) obtiveram mais resveratrol em raízes ( $2,8$   $\mu\text{g/g}$  de material fresco), seguidas por folhas ( $1,2$   $\mu\text{g/g}$ ) e sementes ( $0,14$   $\mu\text{g/g}$ ). PARK *et al.* (2003) encontraram valores de resveratrol bastante similares:  $2,8$   $\mu\text{g/g}$  de material fresco, para raízes,  $2,1$   $\mu\text{g/g}$  para folhas e  $0,05$   $\mu\text{g/g}$  para sementes. Os valores mais elevados para o teor de resveratrol em raízes foram atribuídos pelos autores ao maior contato das raízes com agentes patogênicos do solo ou substrato. Já os valores mais baixos para as sementes podem ser atribuídos ao teor lipídico das mesmas, o que dificulta a extração pelos métodos adotados.

Na comparação realizada com a extração de resveratrol por maceração, a extração assistida por micro-ondas teve uma maior eficácia em boa parte dos tratamentos, resultando na obtenção de maiores concentrações do composto. No caso de extratos de raízes da cultivar IAC Caiapó, por exemplo, o valor encontrado para a extração assistida por micro-ondas ( $1,188 \pm 0,097$  mg/g de extrato) foi quase três vezes superior ao encontrado na maceração ( $0,418 \pm 0,007$  mg/g). Esses resultados foram similares aos encontrados por CHUKWUMAH *et al.* (2007), que também compararam a extração de resveratrol e outros compostos fitoquímicos (genisteína, daidzeína e biochanina), por esses e outros métodos (agitação, sonicação, soxtec e micro-ondas) em sementes de *A. hypogaea*. O valor encontrado

para o teor de resveratrol em sementes mecanicamente desengorduradas e processadas em micro-ondas ( $1,953 \pm 0,228$  mg/100 g de amendoim) foi quase 75% maior do que o encontrado em sementes agitadas ( $1,120 \pm 0,307$  mg/100 g).

De uma maneira geral, os teores de resveratrol encontrados foram bastante expressivos, tendo em vista que vários trabalhos anteriores com uvas e vinhos, duas das maiores fontes de resveratrol existentes, encontraram valores similares, ou até menores. No presente trabalho, extratos de partes aéreas da cultivar IAC Tatu ST, cujo rendimento foi de cerca de 20%, apresentaram teores de  $1,074 \pm 0,099$  mg/g extrato. TOBAR-REYES *et al.* (2009) encontraram concentrações de até 39,5  $\mu$ g/g em peso fresco de folhas de uvas silvestres mexicanas. Dessa forma, os extratos de folhas do amendoim apresentaram teores de resveratrol cinco vezes maiores de que os apresentados em folhas de uvas silvestres. Em trabalho realizado com diferentes tipos de vinhos, BOUTEGRABET *et al.* (2011) encontraram menos de 0,7 mg/L de resveratrol em algumas variedades. A uma concentração de 10 mg/L, extratos de raiz da cultivar IAC Tatu ST apresentaram 20 vezes mais resveratrol do que o encontrado em certas amostras daquele trabalho.

Na cultura de tecidos, a maior parte dos estudos com espécies do gênero *Arachis* são realizados com *A. hypogaea*. Por ser a espécie mais cultivada e de maior importância econômica dentro do gênero, a busca por sistemas de regeneração *in vitro* que permitam a obtenção de materiais vegetais de interesse vem desde a década de 70 do século XX (RUSSO; VARNELL, 1978), na mesma época em que também foi publicado o primeiro trabalho sobre cultura de tecidos envolvendo outras espécies do gênero *Arachis* (MROGINSKI; FERNANDEZ, 1979). Embora até hoje alguns trabalhos explorem essencialmente a cultura de tecidos no gênero (CASTRO *et al.*, 2012), atualmente, diversos estudos utilizam a cultura de tecidos como ferramenta para a análise dos metabólitos especiais (MEDINA-BOLIVAR *et al.*, 2007). É importante frisar, conforme ressaltado por ARAFEH *et al.* (2006), a importância dos calos para a produção de metabólitos secundários de interesse econômico, farmacológico, medicinal e etc. A cultura de tecidos permite a modulação das condições de produção, através do controle de parâmetros *in vitro* como os fitorreguladores, a luminosidade e a temperatura, além da possibilidade de uso de substâncias elicitoras (KU *et al.*, 2005). Dessa forma, considerando que a utilização de técnicas biotecnológicas apresenta-se como um recurso alternativo para a produção de metabólitos, neste trabalho foram desenvolvidos sistemas *in*

*vitro* visando à produção de materiais vegetais, como calos friáveis e brotos, para futura avaliação de compostos de interesse em *A. hypogaea*.

Com relação às respostas *in vitro*, cotilédones e eixos embrionários cultivados em BAP a 22 $\mu$ M foram os explantes que mais geraram brotos. Esse resultado é similar ao encontrado em diversos trabalhos publicados ao longo das últimas décadas, envolvendo a utilização deste fitorregulador em explantes em *A. hypogaea* (ATREYA *et al.*, 1984; MCKENTLY *et al.*, 1990; GILL; SAXENA, 1992; PESTANA *et al.*, 1999; RADHAKRISHNAN *et al.*, 2000; MAINA *et al.*, 2011). A formação de brotos em resposta a BAP é bastante comum para diversas espécies (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

A formação de calos friáveis ocorreu em meios suplementados com PIC, principalmente a partir de folíolos e eixos embrionários. Trabalhos anteriores descreveram a indução de embriogênese indireta a partir de eixos e cotilédones (MCKENTLY, 1991; OZIAS-AKINS *et al.*, 1992; EAPEN *et al.*, 1993). Este tipo de resposta já foi observada para outras espécies, inclusive cereais, em resposta a esse mesmo fitorregulador (BHASKARAN; SMITH, 1990).

Outro fator bastante relevante na regeneração *in vitro* de *A. hypogaea*, além das condições de cultivo, é o genótipo. Foi possível perceber diferenças entre as cultivares brasileiras avaliadas, de forma similar ao observado em trabalhos anteriores, com cultivares americanas (MCKENTLY *et al.*, 1990), indianas (BANERJEE *et al.*, 2007) e chinesas (SHAN *et al.*, 2009).

Em síntese, os resultados descritos ao longo deste trabalho sugerem diretrizes a serem seguidas nas análises fitoquímicas e farmacológicas de *A. hypogaea*. A análise mais profunda dos parâmetros testados, bem como a avaliação de outros parâmetros envolvidos nos processos extrativos, tais como o tipo de solvente e o tipo de elicitação, faz-se necessária na medida em que este campo de estudo é bastante vasto. Além disso, a produção de novos materiais *in vitro*, como calos friáveis e brotos, visando à produção de compostos bioativos de interesse, também é uma área a ser explorada.



## 5 CONCLUSÕES

- A otimização da extração de compostos antioxidantes por maceração permitiu o estabelecimento das melhores condições de proporção etanol/água como solvente, trituração, proporção solvente/sólido, tempo e número de estágios para esse processo;
- A otimização da extração de resveratrol assistida por micro-ondas permitiu o estabelecimento das melhores condições de temperatura, proporção solvente/sólido, agitação e tempo para esse processo;
- Os extratos de raízes das cultivares IAC Caiapó, IAC 8112 e IAC 99-1 processados em micro-ondas apresentaram a maior atividade de captura do radical DPPH quando comparados com extratos obtidos por maceração;
- Os extratos processados em micro-ondas foram os que apresentaram o maior teor de compostos fenólicos, quando comparados aos extratos obtidos por maceração;
- Os extratos de raízes, principalmente os processados em micro-ondas, foram os que apresentaram o maior teor de resveratrol, quando comparados com extratos de folhas e sementes;
- O uso de BAP foi capaz de induzir a formação de brotos a partir de cotilédones e eixos embrionários, principalmente nas cultivares IAC Caiapó e IAC Tatu ST;
- O uso de PIC foi capaz de induzir a formação de calos friáveis a partir de cotilédones e folíolos, principalmente nas cultivares IAC Caiapó e IAC 8112.

## 6 PERSPECTIVAS

- Estudar as diferentes metodologias para a extração (maceração e micro-ondas) de compostos de interesse em outros materiais obtidos a partir das diferentes cultivares;
- Analisar o efeito da elicitação por diferentes agentes (injúria mecânica, sonicação e luz ultravioleta) em diferentes materiais vegetais (calos compactos, calos friáveis e brotos), na modulação da síntese de compostos de interesse;
- Avaliar as diferentes frações obtidas a partir de extratos quanto à atividade biológica e à natureza fitoquímica;
- Determinar o perfil cromatográfico dos diferentes materiais e definir a natureza fitoquímica dos picos mais significativos encontrados nas amostras de extratos.

## REFERÊNCIAS

- ABBOTT, J.A.; MEDINA-BOLIVAR, F.; MARTIN, E.M.; ENGELBERTH, A.S.; VILLAGARCIA, H.; CLAUSEN, E.C.; CARRIER, D.J. Purification of resveratrol, arachidin-1, and arachidin-3 from hairy root cultures of peanut (*Arachis hypogaea*) and determination of their antioxidant activity and cytotoxicity. *Biotechnology Progress*, v.26, p.1344-1351, 2010.
- ABDIN, M.Z.; ISRAR, R.U.; REHMAN, S.K.; JAIN, S.K. Artemisinin a novel antimalarial drug: biochemical and molecular approaches for enhanced production. *Planta Medica*, v.69, p.289-299, 2003.
- AGRIBUS. São Paulo: Instituto FNP, 2012. 482 p.
- AKASAKA, Y.; DAIMON, H.; MII, M. Improved plant regeneration from cultured leaf segments in peanut (*Arachis hypogaea* L.) by limited exposure to thidiazuron. *Plant Science*, v.56, p.169-175, 2000.
- ANDREO, D.; JORGE, N. Antioxidantes naturais: técnicas de extração. *Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos*, v.24, n.2, p.319-336, 2006.
- ARAFEH, R.M.; SHIBLI, R.A.; AL-MAHMOUD, M.; SHATNAWI, M.A. Callusing, cell suspension culture and secondary metabolites production in persian oregano (*Origanum vulgare* L.) and Arabian oregano (*O. syriacum* L.). *Jordan Journal of Agricultural Sciences*, v.2, n.3, p.274-281, 2006.
- ARORA, M.K.; STRANGE, R.N. Phytoalexin accumulation in groundnuts in response to wounding. *Plant Science*, v.78, p.157-163, 1991.
- ATREYA, C.D.; PAPA RAO, J.; SUBRAHMANYAM, N.C. In vitro regeneration of peanut (*Arachis hypogaea* L.) plantlets from embryo axes and cotyledon segments. *Plant Science Letters*, v.34, p.379-383, 1984.
- BAJAJ, Y.P.S.; LABANA, K.S.; DHANJU, M.S. Induction of pollen-embryos and pollen-callus in anther cultures of *Arachis hypogaea* e *Arachis glabrata*. *Protoplasma*, v.103, p.397-399, 1980.
- BAJAJ, Y.P.S.; RAM, A.K.; LABANA, K.S.; SINGH, H. Regeneration of genetically variable plants from the anther-derived callus of *Arachis hypogaea* and *Arachis villosa*. *Plant Science Letters*, v.23, p.35-39, 1981.
- BAKER, C.M.; WETZSTEIN, H.Y. Leaflet development, induction time, and medium influence somatic embryogenesis in peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Plant Cell Reports*, v.17, p.925-929, 1998.
- BAKER, C.M.; WETZSTEIN, H.Y. Repetitive somatic embryogenesis in peanut cotyledon cultures by continual exposure to 2,4D. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, v.40, p.249-254, 1995.

- BANERJEE, P.; MAITY, S.; MAITI, S.S.; BANERJEE, N. Influence of genotype on in vitro multiplication potential of *Arachis hypogaea* L. *Acta Botanica Croatica*, v.66, n.1, p.15-23, 2007.
- BATHIA, C.R.; MURTHY, G.S.S.; MATHEWS, V.H. Regeneration of plants from “de-embryonated” peanut cotyledon cultures without nutrients and agar. *Journal of Plant Breeding*, v.94, p.149-155, 1985.
- BERA, S.K.; BHATT, K.M. Genotypic comparison for androgenic callogenesis and organogenesis among cultivated, wild and interspecific hybrid of groundnut. *The Indian Journal of Genetics and Plant Breeding*, v.68, n.3, p.261-264, 2008.
- BHASKARAN, S.; SMITH, R.H. Regeneration in Cereal Tissue Culture. Review. *Crop Science*, v.30, n.6, p. 1328-1337, 1990.
- BIANCHI, M.; ANTUNES, L. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. *Revista de Nutrição de Campinas*, v.12, n.2, p.123-130, 1999.
- BORGES, W.L. *Análise da variabilidade genética e avaliação da fixação biológica de nitrogênio entre acessos de amendoim (Arachis hypogaea L.)*. 2006. 48 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2006.
- BOUTEGRABET, L.; FEKETE, A.; HERTKORN, N.; PAPASTAMOULIS, Y.; WAFFO-TÉGUO, P.; MÉRILLON, J.M.; JEANDET, P.; GOUGEON, R.D.; SCHMITT-KOPPLIN, P. Determination of stilbene derivatives in Burgundy red wines by ultra-high-pressure liquid chromatography. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v.401, p.1513-1521, 2011.
- BRAND-WILIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Science and Technology*, v.28, p.25-30, 1995.
- BRAR, G.S.; COHEN, B.A.; VICK, C.L.; JOHNSON, G.W. Recovery of transgenic peanut (*Arachis hypogaea* L.) plants from elite cultivars utilizing ACCELL technology. *Plant Journal*, v.5, p.745-753, 1994.
- BURTNİK, O.J.; MROGINSKI, L.A. Regeneration of *Arachis pinto* (Leguminosae) plants through the in vitro culture of leaf tissue. *Oleagineux*, v.40, n.12, p.609-611, 1985.
- CASTRO, J.P.; FURTADO, C.M.; CARVALHO, J.M.F.C.; SUASSUNA, T.M.F. Indução do superbrotamento *in vitro* de eixos embrionários de *Arachis hypogaea* L. *Revista de Biologia e Farmácia*, v.8, n.1, p. 99-103, 2012.
- CASTRO-VARGAS, H.I.; RODRÍGUEZ-VARELA, L.I.; FERREIRA, S.R.S.; PARADA-ALFONSO, F. Extraction of phenolic fraction from guava seeds (*Psidium guajava* L.) using supercritical carbon dioxide and co-solvents. *Journal of Supercritical Fluid*, v.51, p.319-324, 2010.

- CARRÍN, M.E.; CARELLI, A.A. Peanut oil: Compositional data. *European Journal of Lipid Science and Technology*, v.112, p.697-707, 2010.
- CHANG, J.-C.; LAI, Y.-H.; DJOKO, B.; WU, P.-L.; LIU, C.-D.; LIU, Y.-W.; CHIOU, R. Y.-Y. J. Biosynthesis Enhancement and Antioxidant and Anti-inflammatory Activities of Peanut (*Arachis hypogaea* L.) Arachidin-1, Arachidin-3, and Isopentadienylresveratrol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.54, p.10281-10287, 2006.
- CHATTERJEE, M.; DAS, S.; JANARTHAN, M.; RAMACHANDRAN, K.; CHATTERJEE, M. Role of 5-lipoxygenase in resveratrol mediated suppression of 7,12-dimethylbenz(α)anthracene-induced mammary carcinogenesis in rats. *European Journal of Pharmacology*, v.668, n.1, p. 99-106, 2011.
- CHEN, R.-S.; WU, P.-L.; ROBIN Y.-Y. CHIOU. Peanut Roots as a Source of Resveratrol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.50, p.1665-1667, 2002.
- CHEN, W.Q.; JOHNSON, B.; SHERWOOD, J.L. A two step process for the regeneration of *Arachis* spp.by shoot tip culture of greenhouse-grown plants. *Peanut Science*, v.17, n.1, p.25-27, 1990.
- CHENG, M.; HIS, D.; PHILLIPS, G. In vitro regeneration of Valencia-type peanut (*Arachis hypogaea* L.) from cultured cotyledons, epicotyl sections and other seedling explants. *Peanut Science*, v.19, n.2, p.82-87, 1992.
- CHENGALRAYAN, K.; HAZRA, S.; GALLO-MEAGHER, M. Histological analysis of somatic embryogenesis and organogenesis induced from mature zygotic embryo-derived leaflets of peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Plant Science*, v.161, p.415-421, 2001.
- CHENGALRAYAN, K.; MHASKE, B.; HAZRA, S. High-frequency conversion of abnormal peanut somatic embryos. *Plant Cell Reports*, v.16, p.783-786, 1997.
- CHENGALRAYAN, K.; SATHAYE, S.; HAZRA, S. Somatic embryogenesis from the mature embryo-derived leaflets of peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Plant Cell Reports*, v.13, p.578-581, 1994.
- CHENGALRAYAN, K.; VANDANA, B.; MHASKE, B.; HAZRA, S. In vitro regulation of morphogenesis in peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Plant Science*, v.110, p.259-268, 1995.
- CHUKWUMAH, Y.C.; WALKER, L.T.; VERGHESE, M.; BOKANGA, M.; OGUTU, S.; ALPHONSE, K. Comparison of extraction methods for the quantification of selected phytochemicals in peanuts (*Arachis hypogaea*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.55, p.285-290, 2007.
- CHUNG, I.-M.; PARK, M.-R.; CHUN, J.-C.; YUN, S.-J. Resveratrol accumulation and resveratrol synthase gene expression in response to abiotic stresses and hormones in peanut plants. *Plant Science*, v.164, p.103-109, 2003.

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

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

CORRÊA, F.; SUTILI, F.; MIRANDA, L.; LEITE, S.; DE SOUZA, R.; LEAL, I. Epoxidation of oleic acid catalyzed by PSCI-Amano lipase optimized by experimental design. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v.81, p.7-11, 2012.

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

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

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

DE SOUZA, R.O.M.A.; MIRANDA, L.S.M. Irradiação de micro-ondas aplicada à síntese orgânica: uma história de sucesso no Brasil. *Química Nova*, v.34, n.3, p.497-506, 2011.

DHOBI, M.; MANDAL, V.; HEMALATHA, S. Optimization of microwave assisted extraction of bioactive flavonolignan – silybinin. *Journal of Chemical Metrology*, v.3, n.1, p.13-23, 2009.

DOBIÁŠ, P.; PAVLÍKOVÁ, P.; ADAM, M.; EISNER, A.; BEŇOVÁ, B.; VENTURA, K. Comparison of pressurised fluid and ultrasonic extraction methods for analysis of plant antioxidants and their antioxidant capacity. *Central European Journal of Chemistry*, v.8, p.87-95, 2010.

DORNER, J.W.; COLE, R. J.; SANDERS, T.H.; BLANKENSHIP, P.D. Interrelationship of Kernel Water Activity, Soil Temperature, Maturity, and Phytoalexin Production in Preharvest Aflatoxin Contamination of Drought-Stressed Peanuts. *Mycopathologia*, v.105, p.117-128, 1989.

DUARTE-ALMEIDA, J.M.; SANTOS, R.J.; GENOVESE, M.I.; LAJOLO, F.M. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico e método de sequestro de radicais DPPH. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.26, n.2, p.446-452, 2006.

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

DUNBAR, K.B.; PITTMAN, R.N. Adventitious shoot formation from mature leaf explants of *Arachis species*. *Plant Physiology and Biochemistry*, v.32, n.6, p.1353-1356, 1992.

DURHAM, R.E.; PARROT, W.A. Repetitive somatic embryogenesis from peanut cultures in liquid medium. *Plant Cell Reports*, v.11, p.122-125, 1992.

EAPEN, S.; GEORGE, L. Plant regeneration from leaf discs of peanut and pigeonpea: Influence of benzyladenine, indolacetic acid and indolacetic acid-amino acid conjugates. *Biologia Plantarum*, v.35, n.3, p.223-227, 1993.

EAPEN, S.; GEORGE, L.; RAO, P.S. Plant regeneration through somatic embryogenesis in peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Biologia Plantarum*, v.35, p.499-504. 1993.

EMBRAPA. *Aspectos práticos da micropropagação de plantas*. Cruz das Almas, BA: EMBRAPA, 2009. 385 f.

ESKILSSON, C.; BJORKLUND, E. Analytical-scale microwave-assisted extraction. *Journal of Chromatography A*, v.902, p.227-250, 2000.

FAGUNDES, M.H. *Sementes de amendoim: alguns comentários*. [S.l.: s.n.], 2002. 11 p. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/download/cas/especiais/semente-de-amendoim-internet.pdf>>. Acesso em: 8 abr. 2011.

FENG, Q.; STALKER, H.T.; PATEE, H.E. Plant recovery of selfs and interspecific hybrids of *Arachis* by in vitro culture of peg tips. *Crop Science*, v.36, n.6, p.1660-1666, 1996.

FONTANA, M.L.; MROGINSKI, L.A.; REY, H.Y. Organogenesis and plant regeneration of *Arachis villosa* Benth. (Leguminosae) through leaf culture. *Biocell*, v.33, n.3, p.179-186, 2009.

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

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

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

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

- GAGLIARDI, R.F.; PACHECO, G.P.; COCULILO, S.P.; VALLS, J.F.M.; MANSUR, E. In vitro plant regeneration from seed explants of wild groundnut species (Genus *Arachis*, Section *Extranervosae*). *Biodiversity and Conservation*, v.9, p.943–951, 2000.
- GAGLIARDI, R.F.; PACHECO, G.P.; VALLS, J.F.M.; MANSUR, E. Germplasm preservation of wild *Arachis* species through culture of shoot apices and axillary buds from in vitro plants. *Biologia Plantarum*, v.45, n.3, p.353-357, 2002.
- GALFI, P.; JAKUS, J.; MALMAR, T.; NEOGRADY, S.; CASORDAS, A. Divergent effects of resveratrol, a poly phenolic phytoestrogen, on free radical levels and type of cell death induced by the histone deacetylase inhibitors butyrate and trichostatin. *Journal of Steroid Biochemistry*, v.94, p.39-47, 2005.
- GANZLER, K.; BATI, J.; VALKO, K. A novel sample preparation method for chromatography. *Journal of Chromatography Science*, v.371, p.299-306, 1986.
- GARCIA, L.C. *Cultura de tecidos e análise fitoquímica de Arachis repens HANDRO*. 2012. 73 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes; Universidade do Estado do Rio de Janeiro; Rio de Janeiro; 2012.
- GARCIA-SALAS, M.; MORALES-SOTO, A.; SEGURA-CARRETERO, A.; FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, A. Phenolic-compound-extraction systems for fruit and vegetable samples. *Molecules*, v.15, p.8813-8826, 2010.
- GAYDOU, E.M.; BIANCHINI, J.P.; RATOVOHERY, J.V. Triterpene alcohols, methylsterols, sterols, and fatty acids in five Malagasy legume seed oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.31, p.833-836, 1983.
- GENG, L.; NIU, L.; SHU, C.; SONG, F.; HUANG, D.; ZHANG, J. High-efficiency regeneration of peanut (*Arachis hypogaea* L.) plants from leaf discs. *African Journal of Biotechnology*, v.10, n.59, p.12680-12682, 2011.
- GEORGE, E.F.; HALL, M.H.; DE KLERK, G.J. *Plant Propagation by Tissue Culture*. 3 ed. Berlin: Springer, 2008. v.1, 501p.
- GILL, R.; SAXENA, P.K., Direct somatic embryogenesis and direct somatic embryogenesis and regeneration of plants from seedling explants of peanut (*Arachis hypogaea*) - promotive role of thidiazuron. *Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne de Botanique*, v.70, n.6, p.1186-1192, 1992.
- GILL, R.; OZIAS-AKINS, P. Thidiazuron-induced highly morphogenic callus and high frequency regeneration of fertile peanut (*Arachis hypogaea* L.) plants. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, v.35, n.6, p.445-450, 1999.
- GODOY, I.J.; MORAES, S.A.; MORAES, A.R.A.; KASAI, F.S.; MARTINS, A.L.M.; PEREIRA, J.C.V.N.A. Potencial produtivo de linhagens de amendoim do grupo ereto precoce com e sem controle de doenças foliares. *Bragantia*, v.60, n.2, p.101-110, 2001.



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

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

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: Ministério da Agricultura, 1998. v.1, p.183-242.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

HOLLAND, K.; BALOTA, M.; EIGEL, W.; MALLIKARJUNAN, P.; TANKO, J.; ZHOU, K.; O'KEEFE, S. ORAChromatography and total phenolics content of peanut root extracts. *Journal of Food Science*, v.76, n.3, p.380-384, 2011.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

JÚNIOR, I.; SUTILI, F.K.; LEITE, S.; MIRANDA, L.; LEAL, I.; DE SOUZA, R. DoE oriented reaction optimization on the lipase-catalyzed monostearin synthesis. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v.72, p.313-318, 2011.

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

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

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

KERRIDGE, P.C.; HARDY, B. Biology and agronomy of forage *Arachis*. Cali: 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 Journal of Biotechnology*, v.7, n.20, p.3788-3790, 2010.
- KLEJDUSA, B.; KOPECKÝ, J.; BENESOVÁ, L.; VACEKA, J. Solid-phase/supercritical-fluid extraction for liquid chromatography of phenolic compounds in freshwater microalgae and selected cyanobacterial species. *Journal of Chromatography A*, v.1216, p.763-771, 2009.
- KNUDSEN, J.T.; TOLLSTEN, L. Trends in floral scent chemistry in pollination syndromes: floral scent composition in moth-pollinated taxa. *Botanical Journal of the Linnean Society*, v.113, p.263-284, 1993.
- KORNILOVA, O.; ROSELL-MELE, A. Application of microwave assisted extraction to the analysis of biomarker climate proxies in marine sediments. *Organic Geochemistry*, v.34, p.1517-1523, 2003.
- KRAPOVICKAS, A. The Origin, Variability, and Spread of the Groundnut (*Arachis hypogaea*). In *The Domestication and Exploitation of Plants and Animals*. P.J. Ucko and J.W. Dumbleby. *Aldine*, p.427-441, 1969.
- KRAPOVICKAS, A.; GREGORY, W.C. Taxonomia del género *Arachis* (Leguminosae) *Bonplandia*, v. 8, p.1-186, 1994.
- KRAPOVICKAS, A.; SIMPSON, C.E.; VALLS, J.F. *Arachis villosulicarpa* (Leguminosae), un proceso de domesticación aislado. In: *CONGRESO ARGENTINO DE GENÉTICA*, 16, 1985, Rosário. Anais...[S.l.:s.n.], 1985.
- KU, K.L.; CHANG, P.S.; CHENG, Y.C.; LIEN, C.Y. Production of stilbenoids from the callus of *Arachis hypogaea*: a novel source of the anticancer compound piceatannol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.53, p.3877-3881, 2005.
- KUBO, M.; KIMURA, Y.; SHIN, H.; HANEDA, T.; TANI, T., NAMBA, K. Studies on the antifungal substance of crude drug: 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.
- LAXMI, G.V.; GIRI, C. Plant regeneration via organogenesis from shoot base-derived callus of *Arachis stenosperma* e *Arachis villosa*. *Current Science*, v.85, n.11, p.1624-1629, 2003a.
- LAXMI, G.V.; GIRI, C. Rapid in vitro multiplication and establishment of five wild species (India). *Journal of Genetics and Breeding*, v.57, n.3, p.213-218, 2003b.
- LEE, J.H.; BAEK, I.-Y.; HA, T.J.; CHOUNG, M.-G.; KO, J.-M.; OH, S.-K.; KIM, H.-T.; RYU, H.W.; PARK, K.Y.; PARK, K.H. Identification and Characterization of Phytochemicals from Peanut (*Arachis hypogaea* L) Pods. *Food Science and Biotechnology*, v.17, p.475-482, 2008.

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

LI, Z.; JARRET, R.; PITTMAN, R. N.; DUNBAR, K.B.; DEMSKI, J.W. Efficient plant regeneration from protoplasts of *Arachis paraguariensis* Chod. et Hassl. using a nurse culture method. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, v.34, p.83-90, 1993.

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.

LIU, R.H.; HOTCHKISS, J.H. Potential genotoxicity of chronically elevated nitric oxide: a review. *Mutation Research*, v.339, n.2, p.73-89, 1995.

LIU, R.H. Health benefits of fruit and vegetables are from additive and synergistic combinations of phytochemicals. *The American Journal of Clinical Nutrition*, v.78, 517-520, 2011. Microwave assisted extraction of organic compounds. *Analisis*, v.27, p.259-271, 1999.

LIVINGSTONE, D.M.; BIRCH, R.G. Plant regeneration and microprojectile-mediated gene transfer in embryonic leaflets of peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Australian Journal of Plant Physiology*, v.22, n.4, p.585-591, 1995.

LOPES, R.M.; AGOSTINI, T.S.; GIMENES, M.A.; SILVEIRA, D. Chemical composition and biological activities of *Arachis* species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.59, p.4321-4330, 2011.

LOU, H.X.; YUAN, H.Q.; YAMAZAKI, Y.; SASAKI, T.; OKA, S.C. Alkaloids and flavonoids from peanut skins. *Planta Medica*, v.67, p.345-349, 2001.

LOURENZANI, W. L.; LOURENZANI, A.E.B.S. Potencialidades do agronegócio brasileiro de amendoim. In: *CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ECONOMIA E SOCIOLOGIA RURAL*, 2006, Fortaleza, CE. Anais... [S.l.:s.n.], 2006.

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

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

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

MANNA, S.K.; MUKHOPADHYAY, A.; AGGARWAL, B.B. Resveratrol suppresses TNF-induced activation of nuclear transcription factors NF- $\kappa$ B, activator protein-1, and apoptosis: potential role of reactive oxygen intermediates and lipid peroxidation. *Journal of Immunology*, v.164, p.6509-6519, 2000.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

NACZK, M.; WILLIAMS, J.; BRENNAN, K.; LIYANAPATHIRANA, C.; SHAHIDI, F. Compositional characteristics of green crab (*Carcinus maenas*). *Food Chemistry*, v.88, n.3, p.429-434, 2004.

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

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

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

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

NEPOTE, V.; GROSSO, N.R.; GUZMAN, C.A. Optimization of extraction of phenolic antioxidants from peanut skins. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v.85, p.33-38, 2005.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

PHILIPSON, J.D. Plants as source of valuable products. In: B.V. CHALWOOD and M.J. RHODES (Eds.), Secondary products from plant tissue culture. *Clarendon Press*, p.1-21, 1990.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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



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

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

RAO, R.S.; RAVISHANKAR, G.A. Plant tissue cultures, chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnology Advances*, v.20, n.101-153, 2002.

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

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

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

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

RIOS, M. Amendoim ganha espaço na rotação com a cana. *Jornal Cana*, Adamantina, 2010, p. 63. Disponível em: <<http://www.jornalcana.com.br/pdf/201/%5cproducao.pdf>>. Acesso em: 8 de abril de 2011.

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

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

RODRIGUES, F.R.; ALMEIDA, W.A.B. Calogênese em *Cissus sicyoides* L. a partir de segmentos foliares visando à produção de metabólitos *in vitro*. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v.12, n.3, p.333-340, 2010.

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

- ROLFS, C.H.; SCHÖN, H.; STEFFENS, M.; KINDL, H. Cell-suspension culture of *Arachis hypogaea* L.: model system of specific enzyme induction in secondary metabolism. *Planta*, v.172, n.2, p.238-244, 1987.
- ROMANIK, G.; GILGENAST, E.; PRZYJAZNY, A.; KAMIŃSKI, M. Techniques of preparing plant material for chromatographic separation and analysis. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, v.70, p.253-261, 2007.
- ROUTRAY, W.; ORSAT, V. Microwave-Assisted Extraction of Flavonoids: A Review. *Food and Bioprocess Technology*, v.5, p.409-424, 2012.
- RUSSO, S.L.; VARNELL, R.J. In vitro responses of peanut tips to 2,4D and Kinetin. *Crop Science*, v.37, p.34-36, 1978.
- SALES, J.M.; RESURRECCION, A.V.A. Maximising resveratrol and piceid contents in UV and ultrasound treated peanuts. *Food Chemistry*, v.117, 674-680, 2009.
- SANDERS, T.H.; MCMICHAEL, R.W.; HENDRIX, K.W. Occurrence of resveratrol in edible peanuts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.48, n.4, 1243-1246, 2000.
- SANTOS, F.M.; MACEDO, G.R.; SILVA, L.H.; SOUZA, L.A.; PINTO, A.S. Aplicação da metodologia de superfície de resposta no estudo da produção e extração da poligalacturonase. *Química Nova*, v.31, n.8, p.1973-1978, 2008
- SASTRI, D.C.; NALINI, M.S.; MOSS, J.P. Tissue culture and prospects for improvement of *Arachis hypogaea* and other oil seed crops. *Tissue Culture of Economically Important Plants*, v.31, p.42-57, 1981.
- SAUTTER, C.K.; DENARDIN, S.; ALVES, A.O.; MALLMANN, C. A.; PENNA, N.G.; HECKTHEUER, L.H. Determinação de Resveratrol em sucos de uva no Brasil. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.25, n.3, p.437-442, 2005.
- SAXENA, P.K.; MALIK, K.A.; GILL, R. Induction by thidiazuron of somatic embryogenesis in intact seedlings of peanut. *Planta*, v.87, n.3, p.421-424, 1992.
- SEITZ, M.H.; STALKER, H.T.; GREEN, C.C. Genetic variation for regenerative response in immature leaflet cultures of the cultivated peanut, *Arachis hypogaea*. *Plant Breeding*, v.98, n.2, p.104-110 1987.
- SELLARS, R.M.; SOUTHWARD, G.M.; PHILLIPS, G.C. Adventitious somatic embryogenesis from cultured immature zygotic embryos of peanut and soybean. *Crop Science*, v.30, n.2, p.408-414, 1990.
- SHAN, L.; TANG, G.; XU, P.; LIU, Z.; BI, Y. High efficiency in vitro plant regeneration from epicotyls explants of Chinese peanut cultivars. *In Vitro Cellular Developmental Biology-Plant*, v.45, p.525-531, 2009.
- SILVA, S. *Flores do alimento*. São Paulo: Empresa das Artes, 1997.

- SRINIVASAN, T.; KUMAR, K.; KIRTI, P. Establishment of efficient and rapid regeneration system for some diploid wild species of *Arachis*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, v.101, p.303-309, 2010.
- SIM, E.W.; LAI, S.Y.; CHANG, Y.P. Antioxidant capacity, nutritional and phytochemical content of peanut (*Arachis hypogaea* L.) shells and roots. *African Journal of Biotechnology*, v.11, n.53, p.11547-11551, 2012.
- SINGH, S.; HAZRA, S. Somatic embryogenesis from the axillary meristems of peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Plant Biotechnology Reports*, v.3, p.333-340, 2009.
- SOBOLEV, V.S.; HORN, B.W.; POTTER, T.L.; DEYRUP, S.T.; GLOER, J.B. Production of stilbenoids and phenolic acids by the peanut plant at early stages of growth. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.54, p.3505-3511, 2006.
- SOBOLEV, V.S.; GUO, B.Z.Z.; HOLBROOK, C.C.; LYNCH, R.E. Interrelationship of phytoalexin production and disease resistance in selected peanut genotypes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.55, p.2195-2200, 2007.
- SOBOLEV, V.S.; NEFF, S.A.; GLOER, J.B. New stilbenoids from peanut (*Arachis hypogaea*) seeds challenged by an *Aspergillus caelatus* strain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.57, p.62-68, 2009.
- SOUSA, S.; SILVA, H.; VIEIRA, G.; AYRES, M.; COSTA, C.; ARAÚJO, D.; CAVALCANTE, L.; BARROS, E.; ARAÚJO, P.; BRANDÃO, M.; CAHVES, M. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. *Química Nova*, v.30, n.2, p.351-355, 2007.
- STALIKAS, C.D. Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *Journal of Separation Science*, v.30, n.18, p.3268–3295, 2007.
- STALKER, H.T.; SIMPSON, C.E. Genetic resources in *Arachis*. In H. E. Pattee and H. T. Stalker (Ed.), *Advances in Peanut Science: American Peanut Research and Education*. Texas: American Peanut Research and Education, 1995. p.14-53,
- STERVBO, U.; VANG, O.; BONNESEN, C. A review of the content of the putative chemopreventive phytoalexin resveratrol in red wine. *Food Chemistry*, v.101, p.449-457, 2007.
- STEWART, J.R.; CHRISTMAN, K.L.; O'BRIAN, C.A. Effects of resveratrol on the autophosphorylation of phorbol ester-responsive protein kinases: Inhibition of protein kinase D but not protein kinase C isozyme autophosphorylation. *Biochemical Pharmacology*, v.60, n.9, p.1355-1359, 2000.
- STILL, P.E.; PLATA, M.I.; CAMPBELL, R.J.; BUENO, L.C.; CHICHESTER, E.A.; NIBLETT, C.L. Regeneration of fertile *Arachis paraguariensis* plants from callus and suspension cultures. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, v.9, p.37-43, 1987.

- SUBBARAMAIAH, K.; CHUNG, W.J.; MICHALUART, P.; TELANG, N.; TANABE, T.; INOUE, H.; JANG, M.; PEZZUTO, J. M.; DANNENBERG, A.J. Resveratrol inhibits cyclooxygenase-2 transcription and activity in phorbol ester-treated human mammary epithelial cells. *Journal of Biological Chemistry*, v.273, n.34, p.21875-21882, 1998.
- SUN, Y.; LIAO, X.; WANG, Z.; HU, X.; CHEN, F. Optimization of microwave-assisted extraction of anthocyanins in red raspberries and identification of anthocyanin of extracts using high-performance liquid chromatography – mass spectrometry. *European Food Research and Technology*, v.225, p.511-523, 2007.
- SUTIVISEDSEK, N.; CHENG, H.N.; WILLETT, J.L.; LESCH, W.C.; TANGSRUD, R.R.; BISWAS, A. Microwave-assisted extraction of phenolics from bean (*Phaseolus vulgaris* L.), *Food Research International*, v.43, p.516-519, 2010.
- TIWARI, S.; TULI, R. Factors promoting efficient in vitro regeneration from de-embryonated cotyledon explants of *Arachis hypogaea* L. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, v.92, p.15-24, 2008.
- TIWARI, S.; TULI, R. Multiple shoot regeneration in seed-derived immature leaflet explants of peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Scientia Horticulturae*, v.121, p.223-227, 2009.
- TOBAR-REYES, J.R.; FRANCO-MORA, O.; MORALES-ROSALES, E.J.; CRUZ-CASTILLO, J.G. Resveratrol content in leaves of Mexican wild grapevines (*Vitis* spp.). *Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias*, v.41, n.2, p.127-137, 2009.
- TORRES, A.C.; FERREIRA, A.T.; SÁ, F.G.; BUSO, J.A.; CALDAS, L.S.; NASCIMENTO, A.S.; BRÍGIDO, M.M.; ROMANO, E. *Glossário de biotecnologia vegetal*. Brasília, DF: Embrapa, 2000.
- 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. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.50, p.4989-4993, 2002.
- VALENTE, A.; AUGUSTO, F. Microextração por fase sólida. *Química Nova*, v.22, n.4, p.523-530, 2000.
- VALLS, J.F.M. Diversidade genética no gênero *Arachis* e a origem do amendoim. In: Temas de genética e melhoramento, 17, 2000. *Anais...* Piracicaba, SP: EMBRAPA, 2000.
- VALLS, J.F.M.; SIMPSON, C.E. New species of *Arachis* L. (Leguminosae) from Brazil, Paraguay and Bolivia. *Bonplandia*, n.14, p.35-64, 2005.
- VASANTH, K.; PRABHA, A.L.; MUTHASAMY, A. JAYABALAM, N. Multiple shoot induction and plant regeneration of groundnuts (*Arachis hypogaea* L.). *Plant Cell Biotechnology Molecular Biology*, v. 5, p.89-94, 2004.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

YANG, C.S.; LANDAU, J.M.; HUANG, M.-T.; NEWMARK, H.L. Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. *Annual Review of Nutrition*, v.21, p.381-406, 2001.

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

ZWICKENPFLUG, W.; MEGER, M.; RICHTER, E. Occurrence of the Tobacco Alkaloid Myosmine in Nuts and Nut Products of *Arachis hypogaea* and *Corylus avellana*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.46, p.2703-2706, 1998.