

**RENATA MIRANDA LOPES**

**DETERMINAÇÃO DE RESVERATROL EM FOLHAS DE  
AMENDOIM SILVESTRE (*Arachis* sp.)**

**BRASÍLIA  
2011**

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**RENATA MIRANDA LOPES**

**DETERMINAÇÃO DE RESVERATROL EM FOLHAS DE  
AMENDOIM SILVESTRE (*Arachis* sp.)**

**Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Ciências da Saúde pelo programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.**

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Dâmaris Silveira**

**Co-orientadora: Dra. Tânia da Silveira  
Agostini Costa**

**BRASÍLIA  
2011**

**RENATA MIRANDA LOPES**

**DETERMINAÇÃO DE RESVERATROL EM FOLHAS DE AMENDOIM SILVESTRE  
(*Arachis* sp.)**

**Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Ciências da Saúde pelo programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.**

Aprovada em 31 de maio de 2011

**BANCA EXAMINADORA**

---

**Prof<sup>a</sup>. Dra. DÂMARIS SILVEIRA (PRESIDENTE)**

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**

---

**Prof<sup>a</sup>. Dra. YRIS MARIA FONSECA**

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**

---

**Dr. MARCOS APARECIDO GIMENES**

**EMBRAPA RECURSOS GENÉTICOS E BIOTECNOLOGIA**

---

**Prof. Dr. MAURICIO HOMEM DE MELLO**

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**

***Dedico este trabalho a minha família, em especial ao meu  
querido tio, Joel Machado Miranda (in memoriam).***

*“Não sei porque você se foi  
Quantas saudades eu senti  
E de tristezas vou viver  
E aquele adeus não pude dar...  
... E eu!  
Gostava tanto de você  
Gostava tanto de você...”*

**Édson Trindade**

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus por sempre atender minhas orações em busca de sabedoria, coragem e serenidade.

Aos meus pais Miranda e Odilon por todo cuidado e dedicação.

Aos meus irmãos Carina, César, Fátima, Leda e Paulinho pelo carinho, paciência e incentivo.

À minha orientadora Dâmaris Silveira por me conceder a oportunidade de ser sua orientanda, pelos seus ensinamentos, amizade, carinho e paciência.

À minha co-orientadora Tânia Agostini-Costa, que mais uma vez me recebeu de braços abertos em seu laboratório, pelos seus ensinamentos, amizade, carinho e paciência.

Ao pesquisador Marcos Gimenes por produzir as plantas, como também pelo tratamento das mesmas.

À doutoranda em Ciências da Saúde Ivelone pelo auxílio prestado.

À mestranda Paula de Vasconcelos pelo auxílio na execução das análises e pela amizade.

A pesquisadora Joseane Padilha e a sua bolsista Camila Milani pela análise estatística.

A EMBRAPA pelo financiamento da pesquisa.

Ao analista da Embrapa Agroenergia José Antônio pelo auxílio no CLAE.

Ao assistente Ismael pelos vários socorros prestados ao longo destes dois anos e principalmente por sua amizade, suas brincadeiras e seus valiosos conselhos e dicas.

Às queridas bolsistas do Laboratório de química de Produtos Naturais, Ana Flávia, Kellen e Luciane pelo companheirismo, amizade e excelentes conselhos.

Aos queridos amigos Aline Gomes, André Kennedy, Ângela Augusta, Dani Wondracek, Kelly Damares, Maria Dilva, Patty Medeiros e Wesley Rocha pela amizade, incentivo e ótimos conselhos.

Aos pesquisadores Dijalma Silva, Roberto Vieira e Rosa de Belém pelo carinho e incentivo.

À toda equipe da secretária de Pós-graduação em Ciências da Saúde.

A todos que participaram direta ou indiretamente da execução deste trabalho.

***“Lembre-se que as pessoas podem tirar tudo de você, menos o seu conhecimento. É o seu bem mais precioso. Explore; viaje; descubra. Conheça”.***

**Albert Einstein**

## RESUMO

O resveratrol é um dos principais compostos bioativos do amendoim (*Arachis hypogaea* L, Fabaceae), presente também na uva e no vinho, e é associado à redução do risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares e câncer destes alimentos. Neste trabalho foi realizada a determinação de *trans*-resveratrol em folhas de espécies silvestres desse gênero por CLAE. O estudo para definição e validação da metodologia envolveu a avaliação do solvente de extração, a técnica de preparação da amostra para análise e o método analítico. Após a padronização da metodologia, foi realizada a determinação de resveratrol em folhas de dez espécies silvestres de *Arachis*, estressadas por radiação UV. As espécies estudadas foram *A. kuhlmannii*, *A. cardenasii*, *A. duranensis*, *A. cruziana*, *A. gregoryii*, *A. batizocoi*, *A. simpsonii*, *A. ipäensis* e *A. kempff-mercadoi*, utilizando *A. hypogaea*, como referência. Os extratos foram obtidos utilizando EtOH 80% como solvente e posteriormente foram submetidos a extração líquido-líquido para eliminação de pigmentos e outros interferentes. A análise por CLAE foi realizada com coluna Zorbax XDB Agilent (250 mm x 4,6 mm, 5 µm), com gradiente de eluição, acetonitrila:ácido fosfórico 0,02%. O método apresentou linearidade entre 5,75 e 217,6 µg/mL, coeficiente de correlação ( $r^2$  0,9998) e repetibilidade de 1,18% (a 23 µg/mL). Todas as espécies do estudo expressaram resveratrol após a indução com UV e nenhuma apresentou teor de resveratrol significativamente mais elevado do que a espécie cultivada *A. hypogaea*. Contudo na análise de cluster as espécies *A. kuhlmannii*, *A. cardenasii*, *A. duranensis*, foram agrupadas no grupo de maior teor de resveratrol juntamente com a espécie cultivada. Os teores médios de resveratrol observados foram  $808,75 \pm 177,6$  µg/g para *A. kuhlmannii*,  $752,24 \pm 305,4$  µg/g para *A. cardenasii*,  $639,93 \pm 224,7$  µg/g para *A. duranensis*,  $564,67 \pm 205,1$  µg/g para *A. cruziana*,  $524,54 \pm 131,1$  µg/g para *A. batizocoi*,  $484,77 \pm 167,8$  µg/g para *A. magna*,  $370,14 \pm 103,7$  µg/g para *A. gregoryii*,  $318,37 \pm 146,9$  µg/g para *A. simpsonii*,  $314,07 \pm 76,8$  µg/g para *A. ipäensis* e  $299,49 \pm 89,1$  µg/g para *A. kempff-mercadoi*. Os resultados obtidos nesse trabalho sugerem que é possível agregar valor às folhas de amendoim, utilizando-as para a extração de resveratrol, após o processo de indução por radiação ultravioleta. Considerando as várias atividades biológicas do resveratrol e sua ampla utilização nas indústrias farmacêutica, cosmética e de suplementos alimentares, a utilização de folhas de amendoim pode constituir-se em um novo nicho nesse mercado.

Palavras chaves: *Arachis silvestres*, amendoim, resveratrol, CLAE, metodologia analítica.



## ABSTRACT

Resveratrol, main active component of peanut (*Arachis hypogaea* L, Fabaceae), is present also in grape and wine. Resveratrol present in these foods is associated to risk reduction of cardiovascular diseases and cancer. In this work, it was developed the HPLC determination of *trans*-resveratrol in leaves of wild species of *Arachis*. The study for method selection and method validate was based on the solvent extraction valuate, on the sample preparation for analysis and on the analytical method. After methodology standardization, it was carried out the determination of resveratrol in leaves of 10 *Arachis* wild species, stressed by UV light. The species studied were *A. kuhlmannii*, *A. cardenasii*, *A. duranensis*, *A. cruziana*, *A. gregoryii*, *A. batizocoi*, *A. simpsonii*, *A. ipäensis* e *A. kempff-mercadoi*, *A. hypogaea*, using *A. hypogaea* as a reference Resveratrol was extracted with 80 % EtOH and cleaning of extract was done by liquid-liquid extraction to remove pigments and others interfering. HPLC analysis was done using a Zorbax XDB Agilent (250 mm x 4.6 mm, 5 µm) and a gradient of acetonitrile : 0.02 % phosphoric acid. The method was linear between 5.75 and 217.6 µg/mL, the correlation coefficient ( $r^2$  0.9998) and injection repeatability was 1.18% (at 23 µg/mL). All species of the resveratrol study expressed after induction with UV and none specie showed levels of resveratrol significantly more high than the cultivated species *A. hypogaea*. . However in cluster analysis, the species *A. kuhlmannii*, *A. cardenasii*, *A. duranensis* were statistically grouped in the highest group content of resveratrol, along with the cultivated species. . The concentration of resveratrol observed were 808.75 ± 177.6 µg/g to *A. kuhlmannii*, 752.24 ± 305.4 µg/g to *A. cardenasii*, 639.93 ± 224.7 µg/g to *A. duranensis*, 564.67 ± 205.1 µg/g to *A. cruziana*, 524,54 ± 131.1 µg/g to *A. batizocoi*, 484.77 ± 167.8 µg/g to *A. magna*, 370.14 ± 103.7 µg/g to *A. gregoryii*, 318.37 ± 146.9 µg/g to *A. simpsonii*, 314.07 ± 76.8 µg/g to *A. ipäensis* and 299.49 ± 89.1 µg/g to *A. kempff-mercadoi*. The present results suggest that it is possible to add value to the peanut leaves, using them to extract resveratrol, after the process of induction by ultraviolet radiation. Considering the various biological activities of resveratrol and its wide use in the pharmaceutical, cosmetic and food supplements, the use of peanut leaves can form themselves into a new niche in this market.

Keywords: *Arachis* wild, peanut, resveratrol, HPLC, analytical methodology.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Rota biossintética do resveratrol	44
<b>Figura 2.</b> Algumas espécies utilizadas neste estudo, a) <i>A. gregoryii</i> , b) <i>A. batizocoi</i> , c) <i>A. kempff-mercadoi</i> , d) <i>A. simpsonii</i> e e) <i>A. duranensis</i> .	50
<b>Figura 3.</b> Folhas de <i>Arachis hypogaea</i> preparadas para indução com UV.	52
<b>Figura 4.</b> Cromatograma de extrato de folhas de <i>A. hypogaea</i> controle, sem indução de resveratrol (A) e teste (B), utilizando indução de resveratrol com UV. Resveratrol tR 32,3 min. Coluna Zorbax XDB, gradiente acetonitrila: ácido fosfórico 0,02% e fluxo 1 mL/min.	58
<b>Figura 5.</b> Perfil do espectro de ultravioleta (250 e 360nm) do pico do resveratrol no ápice (tR = 32,52 min) e na base (tR = ±0,35 min), A) em solução padrão e B) no extrato de folhas não induzidas, após extração líquido-líquido.	60
<b>Figura 6.</b> Cromatogramas do teste de purificação. A) padrão, B) extrato bruto, C) partição com hexano e D) mistura de alumina e celite. Resveratrol tR( aproximado) 22 min. Coluna Luna C18 (Phenomenex), gradiente acetonitrila: água e fluxo 1 mL/min.	61
<b>Figura 7.</b> Expansão dos cromatogramas obtidos com a coluna Luna C18 250 x 4,6 mm 5 µm (Phenomenex), gradiente Acetonitrila:água, tR 19,75 min (diferente da figura 6, pois houve diminuição da concentração de acetonitrila entre 19 e 22 min), mostrando os picos referentes ao resveratrol A) primeiras injeções de resveratrol, B) injeções subseqüentes.	63
<b>Figura 8.</b> Cromatogramas referentes à análise do padrão de resveratrol em coluna C18 Zorbax XDB Agilent (250 mm x 4,6 mm, 5 µm). A) 1º dia de injeção (tR 20,3 min, fluxo 1mL/min), B) 2º dia de injeção (tR 17,8 min, fluxo 1,5 mL/min), mesmas condições do dia anterior, com exceção do fluxo.	64
<b>Figura 9.</b> Gráfico de linearidade do resveratrol	65
<b>Figura 10.</b> Curva de calibração do resveratrol na faixa linear	65
<b>Figura 11.</b> Gráfico de linearidade da fenolftaleína	66

- Figura 12.** Curva de calibração da fenolftaleína na faixa linear 66
- Figura 13.** Cromatogramas de *A. hypogaea* e perfil do espectro, fornecido pelo detector de arranjo de fotodiodos (250-360 nm) no ápice ( $t_R = 31.97$  min) e na base do pico referente ao resveratrol na amostra induzida. A pureza do pico referente ao resveratrol foi de 99,5%. 72
- Figura 14.** Cromatogramas de *Arachis cruziana* e perfil do espectro, fornecido pelo detector de arranjo de fotodiodos (250-360 nm) no ápice ( $t_R = 32.18$  min) e na base do pico referente ao resveratrol na amostra induzida. A pureza do pico referente ao resveratrol foi de 95%. 73
- Figura 15.** Cromatogramas de *Arachis kuhlmannii* e perfil do espectro, fornecido pelo detector de arranjo de fotodiodos (250-360 nm) no ápice ( $t_R = 31,97$ min) e na base, do pico referente ao resveratrol na amostra induzida. A pureza do pico foi 92,0%. 74
- Figura 16.** Cromatogramas de *Arachis cardenasii* com perfil do espectro, fornecido pelo detector de arranjo de fotodiodos (250-360 nm,) no ápice ( $t_R = 31,89$  min) e na base do pico referente ao resveratrol na amostra induzida. A seta indica composto não identificados (NI), eluídos com  $t_R$  10,92 min e com  $\lambda_{max}$  em 313 nm que apareceu após o processo de indução. A pureza do pico foi 98,7%. 75
- Figura 17.** Cromatogramas de *Arachis magna* e perfil do espectro, fornecido pelo detector de arranjo de fotodiodos (250-360 nm) no ápice ( $t_R = 32,66$  min) e na base, do pico referente ao resveratrol na amostra induzida. A pureza do pico foi 95,6%. 76
- Figura 18.** Cromatogramas de *Arachis simpsonii* com perfil do espectro, fornecido pelo detector de arranjo de fotodiodos (250-360 nm), no ápice ( $t_R = 32,48$  min) e na base do pico referente ao resveratrol na amostra induzida. A seta indica compostos não identificados (NI), ( $t_R = 26,30$  min,  $\lambda_{max}$  324 nm;  $t_R = 45$  min,  $\lambda_{max}$  298 nm;  $t_R = 45,87$  min,  $\lambda_{max}$  296nm ) que apareceram após o processo de indução. A pureza do pico foi 98,1%. 77
- Figura 19.** . Cromatogramas de *Arachis gregoryii* e perfil do espectro fornecido pelo detector de arranjo de fotodiodos (250-360 nm), no ápice ( $t_R = 32,40$  min) e na base do pico referente aoo resveratrol na amostra induzida. A pureza foi 99%. 78

**Figura 20.** Cromatogramas de *Arachis ipaënsis* e perfil do espectro, fornecido pelo detector de arranjo de fotodiodos (250-360 nm), no ápice (tR = 32,64 min) e na base do pico referente ao resveratrol na amostra induzida.. A seta indica compostos não identificados (NI) (tR = 30,12 min,  $\lambda_{\max}$  329 nm; TR = 38,33 min,  $\lambda_{\max}$  324 nm) que apareceram após o processo de indução. A pureza do pico foi 98,8%. 79

**Figura 21.** . Cromatogramas de *Arachis kempff-mercadoi* com perfil do espectro, fornecido pelo detector de arranjo de fotodiodos (250-360 nm), no ápice (tR = 32,81 min) e na base do pico referente ao resveratrol na amostra induzida. A seta indica compostos não identificados (NI), (tR = 26,85 min,  $\lambda_{\max}$  323 nm; tR = 34,38 min  $\lambda_{\max}$  323nm) que apareceram após o processo de indução. A pureza do pico foi 97,0%. 80

**Figura 22.** Cromatogramas de *Arachis batizocoi* com perfil do espectro, fornecido pelo detector de arranjo de fotodiodos (250-360 nm), no ápice (tR = 32,48 min) e na base do pico referente ao resveratrol na amostra induzida. A seta indica compostos não identificados (NI) (tR = 26,44 min,  $\lambda_{\max}$  323 nm; tR = 29,50 min,  $\lambda_{\max}$  328 nm; tR = 38,17 min,  $\lambda_{\max}$  323nm) que surgiram após o processo de indução. A pureza do pico foi 99,67%. 81

**Figura 23.** Cromatogramas de *Arachis duranensis* e perfil do espectro, fornecido pelo detector de arranjo de fotodiodos (250-360 nm), no ápice (tR = 32,29 min) e na base do pico referente ao resveratrol na amostra induzida. A pureza do pico foi 99,65%. 82

**Figura 24.** Gráfico normal de probabilidade para o MLG Gama com função de ligação inversa ajustado para a variável 'resveratrol'. 84

**Figura 25.** Distribuição do resveratrol para nas diferentes espécies de *Arachis*. 84

**Figura 26.** Análise de cluster para espécies de *Arachis*, apresentando o valor mínimo e máximo de resveratrol para cada agrupamento. 86

**Figura 27.** Gráfico normal de probabilidade para o MLG Gama com função de ligação inversa ajustado para a variável resposta ' teor de resveratrol' 88

**Figura 28.** Distribuição da expressão de resveratrol de acordo com os diferentes genomas. 88

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Exportação brasileira de produtos de amendoim no ano de 2007.	16
<b>Tabela 2.</b> Composição de óleo, proteínas, carboidratos e cinzas de <i>Arachis</i> .sp.	25
<b>Tabela 3.</b> Composição mineral na espécie cultivada ( <i>A. hypogaea</i> ).	25
<b>Tabela 4.</b> Perfil de ésteres metílicos de ácidos graxos em <i>Arachis</i> .	26
<b>Tabela 5.</b> Derivados de estilbenos em <i>Arachis</i> .	27
<b>Tabela 6.</b> Derivados de flavonóides de <i>Arachis</i> .	28
<b>Tabela 7.</b> Ácidos fenólicos detectados em <i>Arachis</i> .	33
<b>Tabela 8.</b> Fitoesteróis encontrados em <i>Arachis</i> .	35
<b>Tabela 9.</b> Triterpenos encontrados em <i>Arachis</i> .	38
<b>Tabela 10.</b> Derivados nitrogenados presentes em <i>Arachis</i> .	39
<b>Tabela 11.</b> Dados dos tratamentos de indução de produção de resveratrol em acessos de <i>Arachis hypogaea</i> , cultivar Caiapó	51
<b>Tabela 12.</b> Avaliação de diferentes solventes na extração do resveratrol.	58
<b>Tabela 13.</b> Resultados do teste de purificação do extrato bruto de folhas de <i>Arachis hypogaea</i> .	59
<b>Tabela 14.</b> . Áreas do pico referente ao resveratrol nos cromatogramas do padrão normal e seco, considerando as diluições.	62
<b>Tabela 15.</b> Teores de resveratrol nas espécies de <i>Arachis</i> em amostras controle e induzidas com UV.	69
<b>Tabela 16.</b> Média $\pm$ desvio da concentração ( $\mu\text{g/g}$ ) de resveratrol de cada espécie do gênero <i>Arachis</i> por tratamento.	71
<b>Tabela 17.</b> Médias e desvios para grupos de clusters	86
<b>Tabela 18.</b> Expressão média de resveratrol após indução por UV, em folhas de espécies do gênero <i>Arachis</i> , por grupos de genoma	87

## LISTA DE ABREVIATURA

- 4CL - 4-coumarato:CoA ligase
- BAG - Banco ativo de germoplasma
- BBG - Bancos Base de Germoplasma
- C4H – 4- hidroxilase ácido cinâmico
- CLAE – Cromatografia líquida de alta eficiência
- COX-1 - Enzima cyclooxygenase-1
- DAD – Detector de arranjos de diodos
- EC<sub>50</sub> - Concentração eficaz 50%
- EEA – Extrato etanólico de *Arachis*
- EHA - Extrato hexânico de *Arachis*
- EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
- HL-60 - Células leucêmicas humanas
- IAC – Instituto agrônomo de Campinas
- IL-6 - Interleucina-6
- IPD - Isopentadienilresveratrol
- LPS - Lipossacarídeo
- ON - Óxido nítrico
- MCP - Morte celular programada
- PAL - fenilalanina amônia-lyase
- TNF-R - Fator receptor de necrose tumoral
- SIRT1 - Enzima sirtuina 1
- STS - estilbeno sintase
- UV - Ultravioleta

## SUMÁRIO

1	<b>CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO</b>	15
	HIPÓTESE	18
	OBJETIVOS	18
	OBJETIVO GERAL	18
	OBJETIVOS ESPÉCIFICOS	18
2	<b>CAPÍTULO 2 - REVISÃO DE LITERATURA</b>	19
2.1	O GÊNERO <i>ARACHIS</i> L.	20
2.1.1	Recursos genéticos de <i>Arachis</i>	20
2.1.2	Amendoim ( <i>A. hypogaea</i> L.)	22
2.1.3	Espécies silvestres de <i>Arachis</i>	23
2.1.4	Composição nutricional de <i>Arachis</i>	23
2.1.5	Composição química de <i>Arachis</i>	26
2.1.6	Atividade biológica de <i>Arachis</i> .	40
2.2	RESVERATROL	43
2.2.1	Resveratrol e Saúde	45
2.2.2	Mercado do resveratrol	45
2.2.3	Resveratrol em amendoim ( <i>Arachis hypogaea</i> L.)	46
3	<b>CAPÍTULO 3 – PADRONIZAÇÃO DA METODOLOGIA</b>	48
3.1	MATERIAIS E REAGENTES	49
3.2	PRODUÇÃO DE MATERIAL VEGETAL	49
3.3	INDUÇÃO DE RESVERATROL	50
3.4	PADRONIZAÇÃO	52
3.5	ANÁLISE POR CLAE	55
3.6	RESULTADOS E DISCUSSÃO.	57
4	<b>CAPÍTULO 4 – DETERMINAÇÃO DE RESVERATROL EM ESPÉCIES SILVESTRES DE <i>ARACHIS</i> sp.</b>	67
4.1	MATERIAIS E METODOS	68
4.2	CARACTERIZAÇÃO DE RESVERATROL EM ESPÉCIES SILVESTRES DE <i>ARACHIS</i>	68
5	<b>CAPÍTULO 5 - CONCLUSÕES</b>	91
	<b>REFERÊNCIAS</b>	93
	<b>APÊNDICE - Artigo publicado</b>	104

## **CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO**



## 1 INTRODUÇÃO

O gênero *Arachis* L. (Fabaceae) possui provável origem na região central do Brasil e é composto por 80 espécies descritas, reunidas em nove seções taxonômicas, sendo a de maior destaque a seção *Arachis*, que abriga o amendoim cultivado (*A. hypogaea* L.), além de outras 26 espécies (1). A espécie *A. hypogaea* é a de maior importância econômica, sendo considerada a quarta oleaginosa mais plantada no mundo (2) e em 2009 estava em quinta posição quanto à produção de óleo vegetal (3). As sementes podem ser consumidas *in natura* ou processadas, e utilizadas diretamente na alimentação humana, nas indústrias de conservas (enlatado), confeitarias, oleoquímica e na produção de biodiesel (2, 4). O Brasil é um grande produtor e também exportador de amendoim, em 2007 o país exportou cerca de 40,463 toneladas de produtos de amendoim (Tabela 1) (5).

Tabela 1. Exportação brasileira de produtos de amendoim no ano de 2007

<b>Produtos exportados</b>	<b>Quantidade</b>	<b>Quantidade em casca</b>
Amendoim em casca	246 toneladas	246 toneladas
Amendoim em grãos	28.120 toneladas	40.142 toneladas
Óleo de amendoim	9.151 toneladas	32.682 toneladas
Industrializados	3.946 toneladas	13.153 toneladas
<b>TOTAL</b>	<b>41.463 toneladas</b>	<b>86.223 toneladas</b>

Fonte: Próamendoim, 2011 (5)

O amendoim é um alimento com grande valor nutricional, apresentando alto teor de proteínas (33,44%) e óleo (44,78%), sendo considerado um dos alimentos humanos mais nutritivos e de fácil digestão (6-8).

A planta do amendoim pode produzir fitoalexinas (classe de compostos com função antibiótica) derivadas do estilbeno, entre as quais o resveratrol é encontrado em maior quantidade (9), podendo ser encontrado em diferentes partes dessa planta, tais como sementes, folhas e raízes (10,12).

Os efeitos benéficos do polifenol resveratrol (3,5,4-triidroxiestilbeno) não se restringem apenas às plantas, mas também à saúde humana; estudos epidemiológicos e clínicos têm mostrado que este composto está associado com a redução de doenças cardiovasculares e a redução de risco de câncer (9, 13).

Por ser uma das poucas plantas a sintetizar o resveratrol, o amendoim pode ser considerado um alimento funcional, que é definido por Pimentel e colaboradores (2005) (14) como qualquer alimento, natural ou preparado, que contenha uma ou mais substâncias, classificadas como nutrientes ou não nutrientes, capazes de atuar no metabolismo e na fisiologia humana, promovendo efeitos benéficos para a saúde, podendo retardar o estabelecimento de doenças crônico-degenerativas e melhorar a qualidade e a expectativa de vida das pessoas. Com o avanço dos estudos nesta área, cresce o interesse dos consumidores e das políticas públicas por alimentos que possam fornecer benefícios fisiológicos adicionais, como prevenção de doenças, além de atender as necessidades básicas nutricionais. A caracterização de substâncias bioativas com forte potencial antioxidante, como o resveratrol, pode favorecer o desenvolvimento de novos produtos com propriedades funcionais agregadas.

Uma das alternativas mais aceitas para aumentar o conteúdo de resveratrol no amendoim cultivado (*A. hypogaea*) é o cruzamento com espécies silvestres em programas de melhoramento do amendoim. O nível de resistência a fungos em acessos de amendoim está relacionado à concentração de resveratrol, sendo que os resistentes produzem maiores concentrações do que os susceptíveis (16). As espécies silvestres da seção *Arachis* são fortes candidatas a também produzirem resveratrol e em quantidades até maiores que o amendoim cultivado, uma vez que são geneticamente muito relacionadas a ele e possuem níveis de resistência a fungos maiores (15). Outra vantagem do cruzamento reside no fato que o aumento dos níveis de resveratrol em *A. hypogaea* pode fazer com que essa espécie tenha um papel maior como nutracêutico e como matéria-prima para indústria farmacêutica e dependendo dos níveis de resveratrol, as espécies silvestres e a cultivada podem também ser utilizadas diretamente na produção dessa substância.

## HIPÓTESE

Devido a maior resistência à infecção fúngica das espécies silvestres da seção *Arachis*, presume-se que estas, possuam conteúdo de resveratrol maior do que o encontrado em *A. hypogaea*.

## OBJETIVOS

Considerando:

Que as espécies silvestres do gênero *Arachis* são fonte potencial de produção de resveratrol;

A crescente demanda de material genético melhorado, com a presença de substâncias bioativas, com forte potencial antioxidante para atender as necessidades da indústria de alimentos e farmacêutica;

Os objetivos desse trabalho consistiram em:

## OBJETIVO GERAL

Determinar o teor de resveratrol em folhas de cinco espécies silvestres do genoma A e cinco do genoma B da seção *Arachis*, após indução por radiação ultravioleta, avaliando e comparando o potencial funcional das diferentes espécies.

## OBJETIVOS ESPÉCIFICOS

- Definir metodologia para determinação de resveratrol em folhas de *Arachis*.
- Induzir a produção de resveratrol em folhas de *Arachis* através da radiação ultravioleta.
- Identificar e quantificar o resveratrol em folhas de 10 espécies nativas de *Arachis*.

## **CAPÍTULO 2 - REVISÃO DE LITERATURA**

## 2.1 O GÊNERO *ARACHIS* L.

O gênero *Arachis* L. (Fabaceae) é tipicamente sul-americano, sendo seu provável ponto de origem a região central do Brasil, a qual se estende do sudeste do Estado do Mato Grosso do Sul à região sul do Estado de Goiás, distribuindo-se naturalmente por mais quatro países além do Brasil - Bolívia, Paraguai, Argentina e Uruguai (1, 17).

Engloba 80 espécies descritas, reunidas em nove seções taxonômicas: *Arachis*, *Heteranthae*, *Caulorrhizae*, *Erectoides*, *Extranervosae*, *Procumbentes*, *Rhizomatosae*, *Trirectoides*, e *Triseminatae*; as duas primeiras são endêmicas do Brasil (17, 18).

A seção *Arachis* é a maior e a mais heterogênea seção do gênero, abrangendo 32 espécies, as demais seções apresentam de 1 a 14 espécies (1,17). Também é a de maior interesse econômico, por abrigar o amendoim cultivado (*Arachis hypogaea* L.) (15).

O Brasil é o país com maior número de espécies, são 64, com representantes de todas as seções das quais 47 são exclusivas do Brasil (19). As espécies são perenes ou anuais, com folhas estipuladas, quatro (ou raramente três) folíolos, flores com corola papilionada e frutos subterrâneos; a maioria possui dois segmentos de frutos, são consideradas autógamas com ocasional fecundação cruzada feita por insetos, e há evidências de partenogênese (15). Lineu, em 1753, foi o primeiro a descrever a planta do amendoim e Bentham observou que existiam formas um pouco diferentes da planta estudada por Lineu, então as classificou como espécies silvestres do amendoim (6).

O interesse pelo gênero *Arachis* tem crescido com intensidade devido ao grande potencial demonstrado por algumas espécies silvestres no melhoramento do amendoim (*A. hypogaea* L.). No Brasil, os principais problemas da cultura de amendoim são as doenças fúngicas, porém estudos têm mostrado que várias espécies silvestres do gênero possuem resistência a pragas e doenças, superior a *A. hypogaea* (4, 20).

### 2.1.1 Recursos genéticos de *Arachis*

Entende-se por recursos genéticos a variabilidade de espécies de plantas, animais e microrganismos integrantes da biodiversidade, de interesse sócio-econômico atual e potencial para utilização em programas de melhoramento genético, biotecnologia e outras ciências afins (21). A espécie, unidade básica de classificação dos seres vivos, abrange indivíduos com grandes semelhanças físicas e fisiológicas, capazes de cruzarem entre si, originando descendentes férteis (21).

Acesso é uma amostra de germoplasma representativa de um indivíduo ou de vários indivíduos da população. Em caráter mais geral, qualquer registro individual constante de uma coleção de germoplasma, como por exemplo, uma plântula, uma maniva (21).

O germoplasma de espécies de amendoim no Brasil é amplo. Germoplasma é a base física da herança genética que é transmitida de uma geração para a outra (22). Os bancos de germoplasma se destinam à preservação da máxima variabilidade genética vegetal existente, desde as modernas cultivares até as espécies silvestres, tendo como objetivos: conservar fontes genéticas para o uso futuro em melhoramento e estudos em genética; manter coleções de diferentes genótipos devidamente caracterizados e avaliados para uso em programas de melhoramento; prevenir e evitar a perda de recursos genéticos (23).

O Banco Ativo de Germoplasma de amendoim (BAG-amendoim) está localizado no IAC - Instituto Agrônomo de Campinas, responsável pela manutenção das coleções conservadas a curto e médio prazo. A Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia é responsável pela conservação a longo prazo; seu banco de germoplasma de *Arachis* é constituído de 928 acessos, 847 dos quais originários do Brasil, 48 do Paraguai, 13 da Bolívia, 13 da Argentina e 7 do Uruguai; sendo o maior do mundo quando se trata de espécies silvestres (24-26) .

Dentro de uma mesma espécie pode existir diferentes cultivares. Cultivar trata-se de um conjunto de genótipos cultivados, o qual se distingue por características morfológicas, fisiológicas, citológicas, bioquímicas ou outras de grupos relacionados da mesma espécie, e que, quando multiplicado por via sexual ou assexual, mantém suas características distintivas (21). Cultivar é sinônimo de variedade, pode ser representada na forma abreviada por cv, é a menor categoria taxonômica para nomes reconhecidos pelo Código Internacional de Nomenclatura

de Plantas Cultivadas, é expressa em uma língua moderna e não no latim, não deve ser escrita em itálico e nem sublinhada (21, 27).

A espécie *Arachis hypogaea* possui diferentes cultivares, como por exemplo, *A. hypogaea* cv. Caiapó, lançada em 1997 pelo IAC. As características que a diferenciam das demais são o porte rasteiro, as sementes de coloração castanha, a alta produtividade, a resistência moderada a doenças foliares (mancha-castanha, mancha-preta, ferrugem, verrugose e mancha-barrenta) e o alto teor de óleo, 44%, qualidade interessante para a indústria de produção de óleo (24, 28).

### 2.1.2 Amendoim (*A. hypogaea* L.)

Acredita-se que a domesticação do amendoim se deu por volta de 6 a 7 mil anos atrás, havendo registros de seu plantio na região andina, desde o período pré-colombiano. Consta que suas sementes podem ter sido levadas, por vias transpacíficas da América até a China e à Índia, antes da chegada de Cristóvão Colombo à América (29).

O amendoim é uma planta cultivada, cujas sementes são produzidas abaixo do solo. É uma espécie alotetraplóide, ou seja, apresenta o número básico de cromossomos de cada um dos progenitores repetido duas vezes ( $2n=4x=40$  cromossomos), que por sua vez provêm de um cruzamento espontâneo entre dois genomas distintos, tecnicamente designados A e B. Supõe-se que o amendoim originou-se da união de gametas de duas espécies diplóide, provavelmente *A. ipaënsis* Krapov. & W. C. Greg. e *A. duranensis* Krapov. & W. C. Greg.; cada uma com  $2n=20$  cromossomos, que teria resultado um híbrido estéril ( $2n=20$  cromossomos e de genoma AB). Este processo foi seguido de duplicação dos cromossomos por mutação natural, levando à restauração da fertilidade do híbrido, formando assim uma nova espécie tetraplóide fértil (6, 19).

A espécie se subdivide em duas subespécies, *Arachis hypogaea* L. subespécie *hypogaea* e *Arachis hypogaea* subespécie *fastigiata*. A flor é completa, perfeita, hermafrodita, com corola papilionácea, de coloração amarela, esta agrupada em números variáveis ao longo do ramo principal ou secundário, conforme a cultivar (2).

É a quarta maior cultura oleaginosa plantada no mundo. Estima-se que a produção mundial esteja em mais de 30 milhões de toneladas por ano, sendo que o Brasil possuía, em 2006, cerca de 90.000 hectares plantados com amendoim com produção de aproximadamente 220.000 toneladas (4).

### 2.1.3 Espécies silvestres de *Arachis*

Algumas espécies silvestres de *Arachis* são cultivadas para produção de grãos e como forrageiras, ornamentais ou para o controle da erosão. Muitas apresentam grande variabilidade genética com caracteres úteis para o melhoramento do amendoim cultivado (30). Já foi obtido sucesso com melhoramento relacionado à resistência a nematóides, a manchas foliares e a ferrugem por introgressão interespecífica entre espécies silvestres e o amendoim cultivado (31).

O tamanho das sementes, folhas e flores das espécies silvestres se diferencia do amendoim cultivado, geralmente são menores (31). Apesar das flores menos vistosas que o comum, algumas espécies silvestres são utilizadas como plantas ornamentais, como é o caso de *A. repens* e *A. pintoj*, que possuem numerosas flores amarelas e folhas sempre verdes; são indicadas para a forração do solo como se fosse um gramado, dando um efeito decorativo.

Considerando o risco de extinção de espécies como *A. williamsii*, *A. cruziana*, *A. ipaënsis*, *A. martii*, *A. pietrarellii*, *A. vallsii*, e *A. monticola*, a literatura apresenta um apelo de conservação destas (32). A conservação em longo e médio prazo de recursos genéticos de *Arachis* é feita em Bancos Base de Germoplasma (BBG), conceito que se refere à manutenção em câmaras frias, *in vitro*, em salas de climatização ou em crioconservação por nitrogênio líquido. Já o termo Banco Ativo de Germoplasma (BAG) refere-se a coleções ativas, onde os acessos além de serem conservados a curto prazo, são plantados a campo ou em casa de vegetação, caracterizados e intercambiados (29).

### 2.1.4 Composição nutricional de *Arachis*



As sementes de *Arachis* representam uma importante fonte de proteína e óleo, podem ser consumidas cruas e possuem fácil digestão. Tais características permitiram que homem pré-histórico, que ainda não conhecia a cerâmica e nem dominava o fogo, necessários para o cozimento de muitos alimentos, pudesse utilizar essa planta como alimento (6).

O teor proteico da espécie cultivada varia entre 23,67% a 33,44% (8, 33), e nas espécies silvestres entre 25,8 a 30,1% (34) (Tabela 2). Esses dados mostram que os grãos de *Arachis* constituem-se excelente fonte proteica na alimentação de adultos e crianças (34). Cerca de 40% dos aminoácidos presentes no amendoim são compostos por ácido aspártico, ácido glutâmico e a arginina (35).

A umidade nos grãos é baixa (5,93%), o conteúdo de cinzas está entre 2,5 e 3,4%, o de carboidratos está em torno de 23,0%; os minerais mais abundantes são fósforo (263,60 mg/100g) e potássio (328,00-1359 mg/100g). A composição completa está expressa na Tabela 3 (8, 33, 34). O amendoim pode ser considerado uma boa fonte dos demais minerais apresentados, se comparado com outros alimentos normalmente consumidos (36).

O teor lipídico da espécie cultivada é elevado, cerca de 40 %; nas espécies silvestres é maior (Tabela 2) (7, 33, 34). Aproximadamente 80% do óleo é composto por ácidos graxos insaturados, o que indica que é um óleo saudável, com predominância de ácido oléico e de ácido linoleico (Tabela 4) (7, 34, 37, 38). Algumas variedades de *A. hypogaea* podem fornecer cerca de 80% de ácido oléico e apenas 2% de ácido linoléico (39).

Segundo estudo de Giannuzzo e colaboradores (2000) (40) sobre a composição lipídica e protéica de espécies silvestres de *Arachis* (*A. correntina*, *A. duranennensis*, *A. monticola*, *A. batizocoi*, *A. cardenasii*, *A. helodes*, *A. chacoensis* e *A. villosaque*), as que mais se aproximam de *A. hypogaea* para essas características são *A. monticola* e *A. batizocoi*.

Tabela 2. Composição de óleo, proteínas, carboidratos e cinzas de *Arachis sp.*

Espécie	Seção	Proteína %	Óleo %	Carboidratos %	Cinzas%
<i>A. hypogaea</i> **	Arachis	33,4	34,1	–	3,4
<i>A. hypogaea</i> ***	Arachis	23,7	48,9	23,0	–
<i>A. hypogaea</i> ****	Arachis	–	35,8	–	–
Média espécie cultivada		28,6	39,6	23,0	3,4
<i>A. trinitensis</i> *	Arachis	26,6	49,9	21,1	2,4
<i>A. kempff-mercadoi</i> *	Arachis	25,8	50,8	20,9	2,6
<i>A. diogoi</i> *	Arachis	28,6	47,0	22,5	2,6
<i>A. benensis</i> *	Arachis	27,1	48,5	21,8	2,6
<i>A. valida</i> *	Arachis	25,8	51,1	20,7	2,4
<i>A. helodes</i> *	Arachis	29,0	45,8	23,3	2,3
<i>A. kuhlmannii</i> *	Arachis	27,8	49,4	20,3	2,5
<i>A. williamsii</i> *	Arachis	28,7	48,7	20,1	2,5
<i>A. hoehnei</i> *	Arachis	28,6	47,1	21,3	2,5
<i>A. villosa</i> *	Arachis	29,5	48,6	19,4	2,5
<i>A. stenosperma</i> *	Arachis	25,0	51,8	20,0	2,5
<i>A. sylvestris</i> *	Heteranthae	30,1	45,7	21,7	2,5
<i>A. pintoii</i> *	Caulorrhizae	27,1	49,7	21,4	2,5
<i>A. chiquitana</i> *	Procumbentes	28,1	47,3	22,4	2,5
<i>A. appressipila</i> *	Procumbentes	26,4	50,4	20,6	2,6
<i>A. kretschmeri</i> *	Procumbentes	27,4	48,8	21,4	2,5
<i>A. matiensis</i> *	Procumbentes	28,9	46,2	23,1	2,5
Media espécies silvestres		27,7	48,6	21,3	2,5

\* Grosso *et al.* (2000)(34) \*\* Araújo *et al.* (2008)(8) \*\*\*Asibuo *et al.*, (2008)(33) \*\*\*\*Pighinelli *et al.* (2008) (7)

Tabela 3. Composição mineral na espécie cultivada (*A. hypogaea*).

Minerais mg/100g	<i>A. hypogaea</i> *	<i>A. hypogaea</i> **	Média
Ferro	2,3	2,8	2,5
Fósforo	263,6	–	263,6
Sódio	63,3	29,0	46,1
Potássio	328,0	1359,0	843,5
Cálcio	–	78,0	78,0
Magnésio	–	364,0	364,0
Manganês	–	2,1	2,1
Cobre	–	1,9	1,9
Zinco	–	5,2	5,2

\* Araújo *et al.* (2008)(8) \*\*Asibuo *et al.* (2008)(33)

Tabela 4. Perfil de ésteres metílicos de ácidos graxos em *Arachis*.

Espécie	Ácidos graxos %										
	C16:0	C18:0	C18:1	C18:2	C20:0	C20:1	C22:0	C24:0	SAT	MONO	POLI
<i>A. hypogaea</i> **	10,4	3,5	39,5	36,0	1,7	1,1	3,7	1,3	20,6	40,6	36,0
<i>A. hypogaea</i> ***	10,5	2,9	41,3	37,2	1,6	1,2	3,5	1,5	20,0	42,5	37,2
<i>A. hypogaea</i> ****	10,2	2,0	46,7	32,0	1,2	1,4	3,7	2,2	19,3	48,1	32,0
Média espécie cultivada	10,4	2,8	42,5	35,1	1,5	1,2	3,6	1,6	20,0	43,7	35,1
<i>A. trinitensis</i> *	10,5	2,6	35,1	45,3	1,0	1,3	2,0	1,9	18,0	36,4	45,3
<i>A. kempff-mercadoi</i> *	10,4	1,8	37,4	43,3	1,1	2,5	2,1	1,1	16,5	39,9	43,3
<i>A. diogoi</i> *	10,3	1,6	36,4	44,2	1,0	2,3	3,0	1,2	17,1	38,7	44,2
<i>A. benensis</i> *	11,1	2,4	31,6	43,3	1,8	2,3	5,8	1,8	22,9	33,9	43,3
<i>A. valida</i> *	9,8	1,8	41,6	35,7	2,0	2,1	5,4	1,7	20,7	43,7	35,7
<i>A. helodes</i> *	10,4	2,2	40,5	40,6	1,3	1,4	2,7	1,0	17,6	41,9	40,6
<i>A. kuhlmannii</i> *	10,2	2,0	41,5	37,9	1,3	2,1	3,7	1,4	18,6	43,6	37,9
<i>A. williamsii</i> *	11,7	1,8	35,5	39,8	1,5	1,5	5,7	1,7	22,4	37,0	39,8
<i>A. hoehnei</i> *	9,6	1,9	38,1	42,1	1,2	1,2	4,0	1,4	18,1	39,3	42,1
<i>A. villosa</i> *	10,7	2,5	46,8	34,1	1,3	1,3	2,1	1,1	17,7	48,1	34,1
<i>A. stenosperma</i> *	10,5	1,7	38,0	40,8	1,2	2,1	4,1	1,7	19,2	40,1	40,8
<i>A. sylvestris</i> *	10,0	1,6	39,5	41,2	1,0	1,9	3,2	1,6	17,4	41,4	41,2
<i>A. pintoii</i> *	9,9	1,7	35,5	44,7	1,3	1,5	4,0	1,5	18,4	37,0	44,7
<i>A. chiquitana</i> *	10,2	2,2	36,3	44,9	0,9	1,8	2,4	1,3	17,0	38,1	44,9
<i>A. appressipila</i> *	10,0	2,3	30,8	47,4	1,3	2,1	4,2	2,0	19,8	32,9	47,4
<i>A. kretschmeri</i> *	9,8	1,9	37,5	40,1	1,3	2,9	4,9	1,7	19,6	40,4	40,1
<i>A. matiensis</i> *	9,6	1,9	30,6	44,6	1,3	3,2	6,2	2,3	21,3	33,8	44,6
Média espécies silvestres	10,3	2,0	37,2	41,8	1,3	2,0	3,9	1,6	19,0	39,2	41,8

\* Grosso et al. (2000)(34) \*\* Berry (1982) \*\*\*Fernandez & Rosolem (1998 )(37) \*\*\*\*Pighinelli et al. (2008)(7)  
 SAT= ácidos graxos saturados, MONO= ácidos graxos monoinsaturados, POLI = ácidos graxos poliinsaturados

### 2.1.5 Composição química de *Arachis*

Nas plantas de *Arachis* já foram detectados diferentes compostos, tais como derivados de fenilpropanóides, principalmente estilbenos e flavonóides. Estes compostos estão envolvidos no mecanismo de defesa da planta contra lesões físicas, contaminação microbiana e proteção contra radiação ultravioleta.

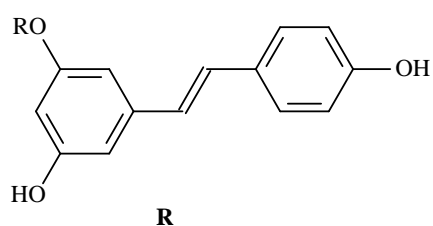
Derivados de estilbenos. São sintetizados por um grande grupo de espécies de plantas, entretanto ocorrem com freqüência em plantas não utilizadas rotineiramente como alimento ou ocorrem em partes não comestíveis. O amendoim e a manteiga de amendoim são considerados o maior recurso de estilbenos na dieta humana, junto com a uva e seus derivados (41).

Apesar dos estilbenos estarem associados à resistência do amendoim a doenças, em particular à contaminação fúngica, eles podem ser encontrados tanto em plantas infectadas como em plantas saudáveis, porém em menor quantidade.

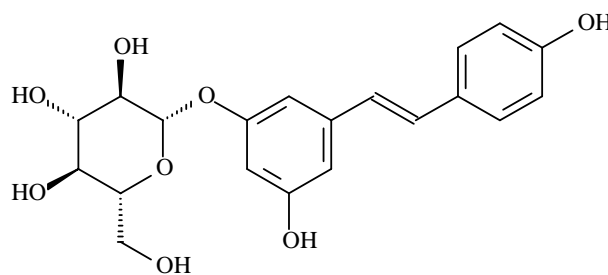
Estilbenos (Tabela 5) têm sido detectados em muitas variedades de *A. hypogaea* em diferentes órgãos da planta, como folhas, raízes e sementes.

Tabela 5. Derivados de estilbenos em *Arachis*.

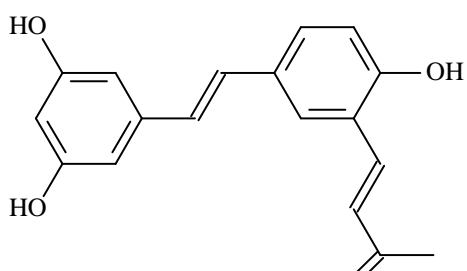
Composto	Estrutura	Referência
<i>trans</i> -resveratrol	1a	(13)
pteroestilbeno	1b	(45)
piceido	2	(11)
isopentadienilresveratrol (IPD)	3	(119)
piacetanol	4	(9)
Arachidina-1	5	
Arachidina-2	6	
Arachidina-3	7	
<i>trans</i> -SB-1	8	
chiricanina A	9	(43)
Arahipina-1	10	
Arahipina-2	11	
Arahipina-4	12	
Arahipina-3	13	
Arahipina-5	14	
<i>cis</i> -3,5,4'-tridroxi-4-isopentanilestilbeno	15	(44)
<i>cis</i> -resveratrol	16	(42)



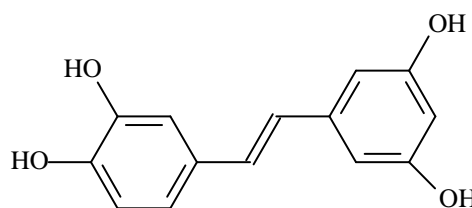
**1a** H *trans*-resveratrol  
**1b** Me pterostilbeno



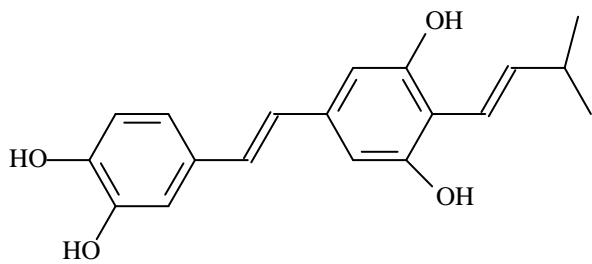
**2** piceido



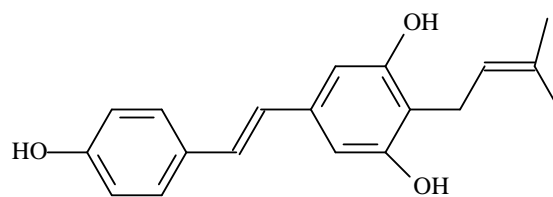
**3** isopentadienilresveratrol (IPD)



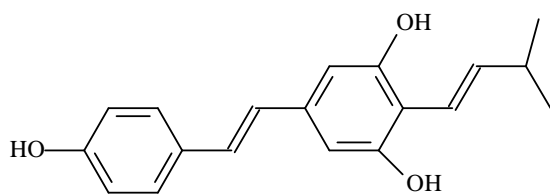
**4** picetanol



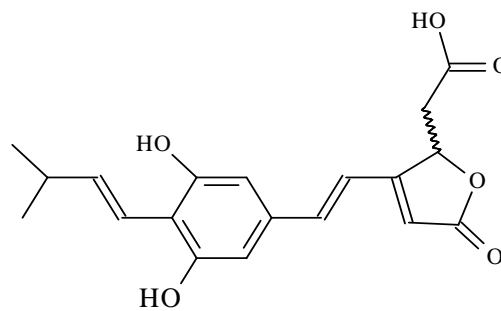
5 arachidina-1



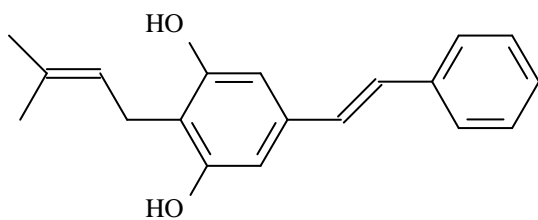
6 arachidina-2



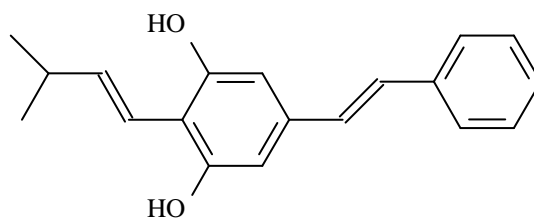
7 arachidina-3



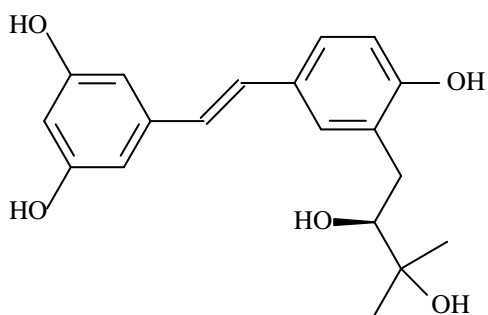
8 trans-SB-1



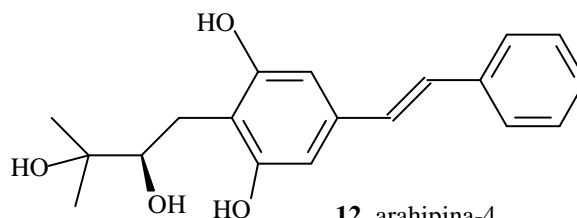
9 chiricanina A



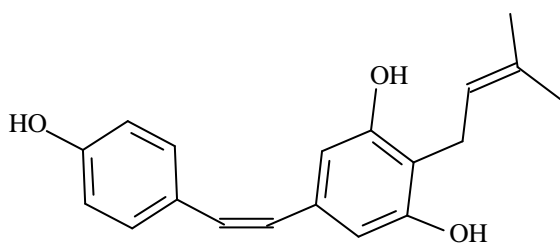
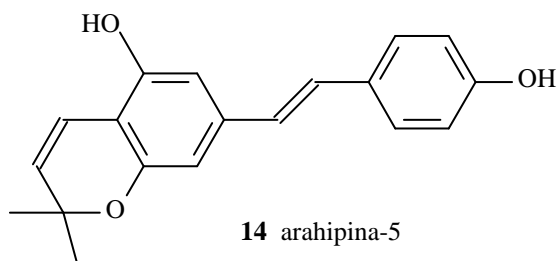
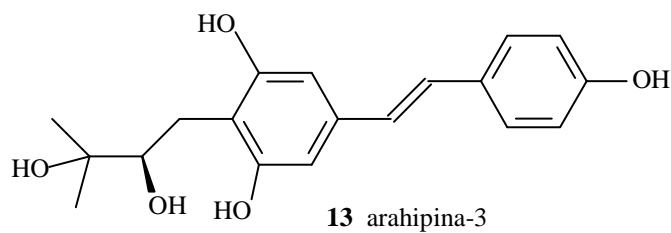
10 arahipina-1



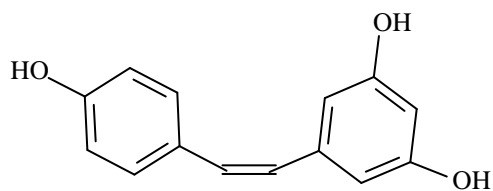
11 arahipina-2



12 arahipina-4



**15** *cis*-3,5,4'-trihidroxi-4 isopentanilestilbeno

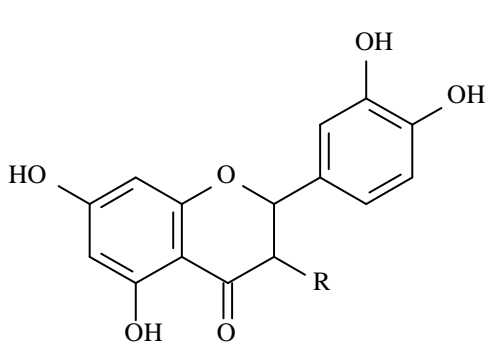


**16** *cis*-resveratrol

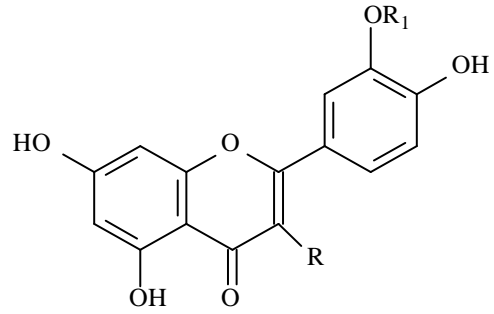
Derivados de flavonóides. Flavonóides e seus derivados (Tabela.6) podem ser encontrados em plantas de *Arachis* doentes ou sadias.

Tabela 6. Derivados de flavonóides de *Arachis*.

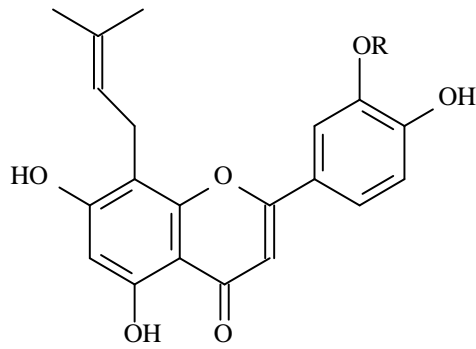
Composto	Estrutura	Referência
eriodictiol	18a	(120)
diidroxiquercetina	18b	(46)
luteolina	19a	
quercetina	19b	(49)
crisoeriol	19c	(47)
8-isopentanol-luteolina	20a	
8-isopentanolcrisoeriol	20b	
4,5-dihidroxi-2'',2''-dimetilpirano[5'',6'':7,8]- flavona	21	
glicosídeo de isorhamnetina	22	(48)
biochanina A	23a	(50)
daidzeina	23b	
genisteina	23c	
formonetina	23d	(51,52)
glicosídeo de formonetina	24	(48)
desmetilmedicarpina	25a	
medicarpina	25b	(51,52)
isomedicarpina	25c	(53)
aracarpino-1	26a	(54)
aracarpino-2	26b	
catequina	27a	(55)
epicatequina	27b	
condensação entre catequina e epicatequina	28	
proantocianidina A1	29a	(56)
proantocianidina A2	29b	



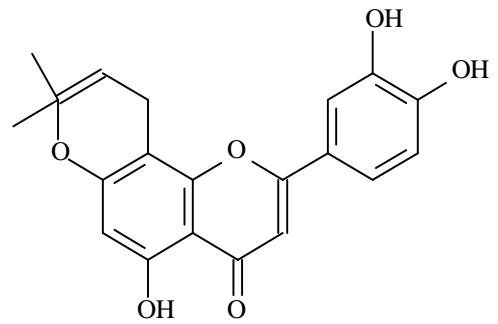
**R**  
**18a** H eriodictiol  
**18b** OH diidroquercetina



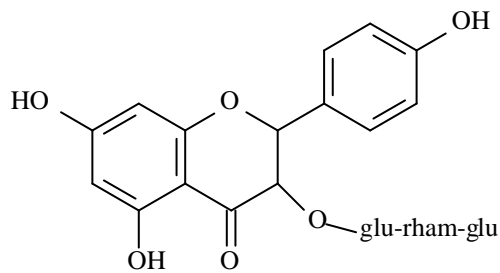
	<b>R</b>	<b>R1</b>	
<b>19a</b>	H	H	luteolina
<b>19b</b>	OH	H	quercetina
<b>19c</b>	H	Me	crisoriol



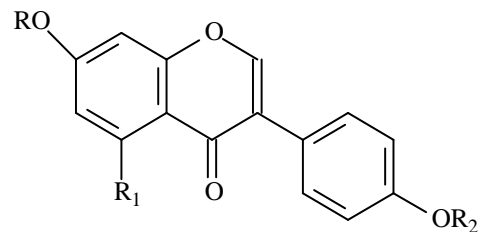
**20a** H 8-isopentenil luteolina  
**20b** Me 8-isopentenil crisoeriol



**21** 4,5-dihidroxi-2'',2''-dimetilpirano[5'',6'':7,8]-flavona

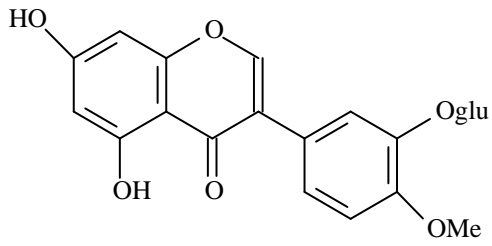


**22** glicosideo de isorhamnetina

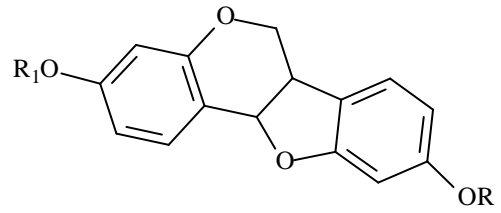


	<b>R</b>	<b>R1</b>	<b>R2</b>	
<b>23a</b>	H	OH	Me	biochanin A
<b>23b</b>	H	H	H	daidzeina
<b>23c</b>	H	OH	H	genisteina
<b>23d</b>	H	H	OH	formonetina

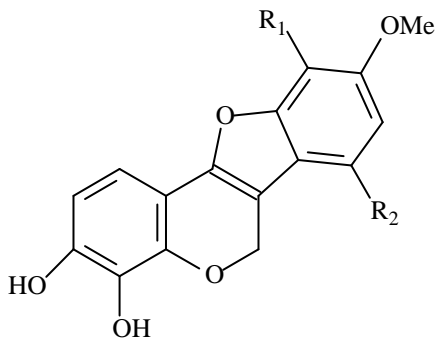




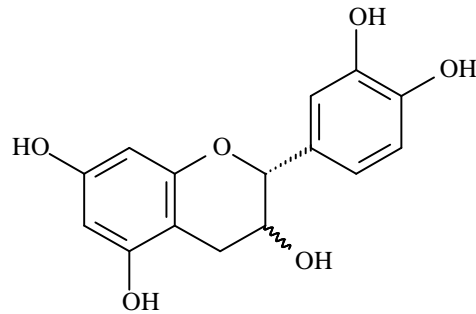
**24** glicosídeo de formonetina



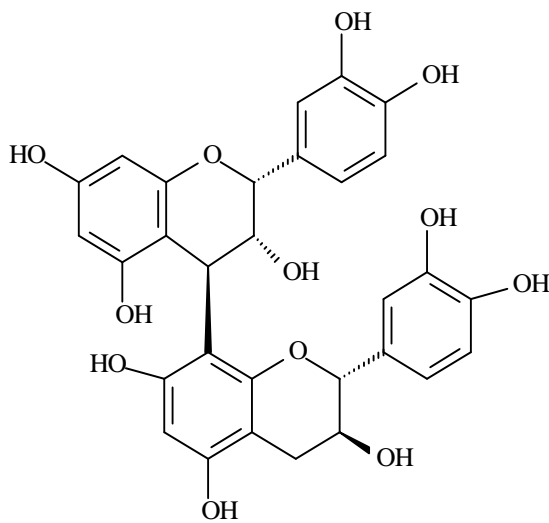
	R	R1	
<b>25a</b>	H	H	demetilcarpina
<b>25b</b>	Me	H	medicarpina
<b>25c</b>	H	Me	isomedicarpina



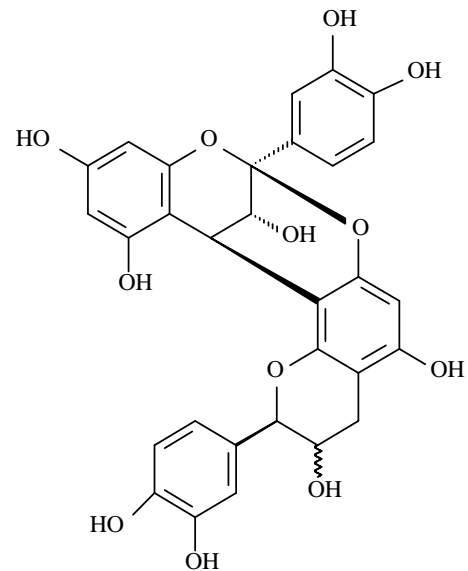
	R1	R2	
<b>26a</b>	OH	H	aracarpino-1
<b>26b</b>	H	OH	aracarpino-2



<b>27a</b>	~~~~~ = ———	catequina
<b>27b</b>	~~~~~ = ..... (dotted)	epicatequina



**28** condensação entre catequina e epicatequina

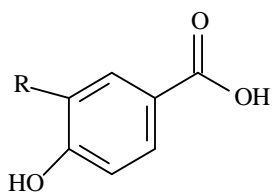


<b>29a</b>	~~~~~ = ..... (dotted)	
<b>29b</b>	~~~~~ = ——— (solid)	

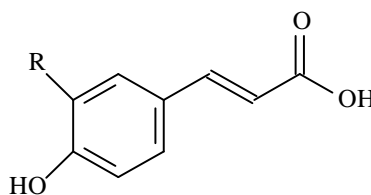
Ácidos fenólicos. Foram detectados em diferentes partes da planta como raízes, folhas e sementes torradas (Tabela.7).

Tabela 7. Ácidos fenólicos detectados em *Arachis*.

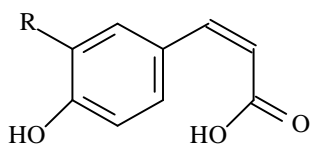
Composto	Estrutura	Referência
ácido vanílico	33a	
ácido protocatechuico	33b	
ácido 3,4-diidroxibenzoico	33c	(57)
ácido ferrulico	34a	
ácido caféico	34b	
ácido clorogênico	36	
ácido neoclorogênico	37	(58)
ácido 1-cafeoil-4-deoxiquinnico	38	
ácido chicórico	39	(59)



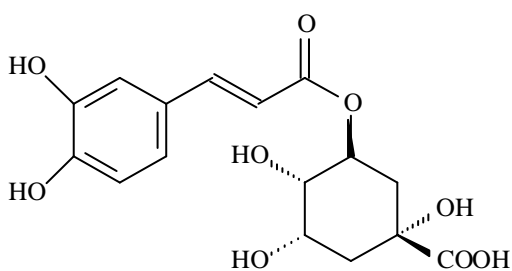
**R**  
**33a** OMe ácido vanílico  
**33b** OH ácido protocatechuico  
**33c** H ácido 3,4-diidroxibenzoico



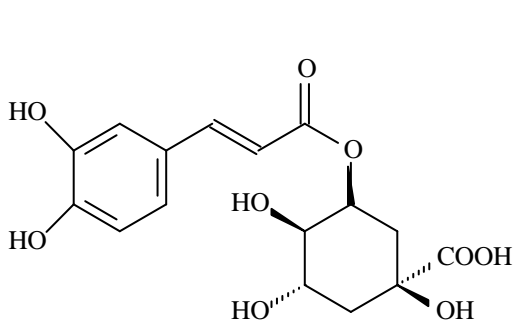
**R**  
**34a** OMe ácido ferúlico  
**34b** H ácido *p*-coumarico  
**34c** OH ácido caféico



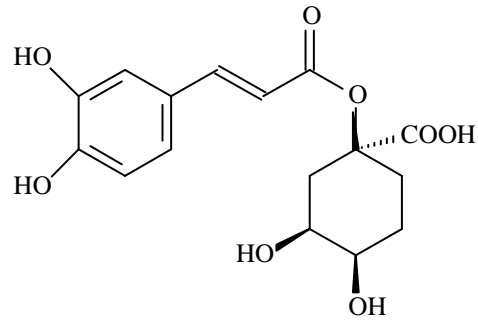
**R**  
**35a** OMe *cis*- ácido ferúlico  
**35b** H *cis*- ácido *p*-coumarico  
**35c** OH *cis*- ácido caféico



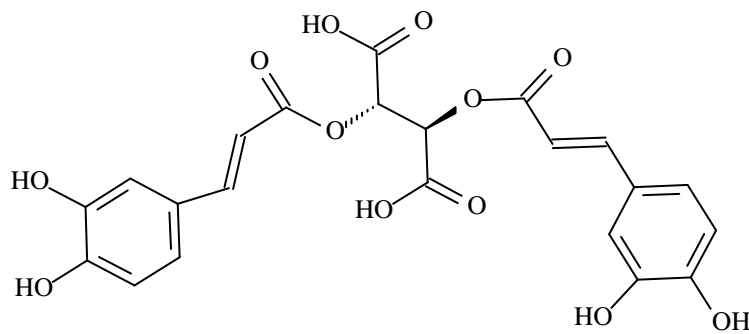
**36** ácido clorogênico



37 ácido neoclorogênico



38 ácido 1-cafeoil-4-deoxiquinnico

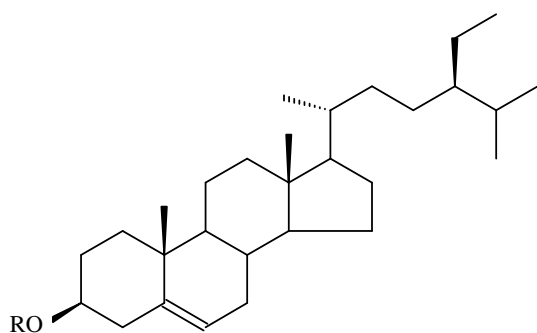


39 ácido chicórico

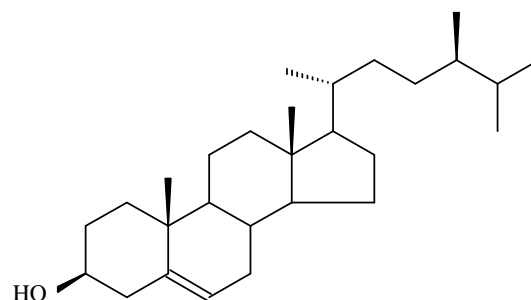
Fitoesteróis. Na manteiga, no óleo e sementes de *A. hypogaea* foram encontrados  $\beta$ -sitosterol [40], campesterol [41], estigmasterol [42], espinasterol [43],  $\Delta^5$ -avenasterol [44],  $\Delta^7$ -avenasterol [45], sitostanol [46], e campestanol [47]. Composição de esteróides similar foi encontrada em outras espécies de *Arachis* como *A. sylvestris*, *A. pintoii*, *A. chinquitana*, *A. appresipila*, *A. kretschmeri*, *A. matiensis*, *A. trinitensis*, *A. kempff-mercadoi*, *A. diogoi*, *A. benensis*, *A. valida*, *A. helodes*, *A. kuhlmannii*, *A. williamsii*, *A. hoehnei*, *A. villosa*, *A. stenosperma*, *A. fastigiata* var. *fastigiata*, e *A. fastigiata* var. *peruviana* (62) (Tabela 8).

Tabela 8. Fitoesteróis encontrados em *Arachis*.

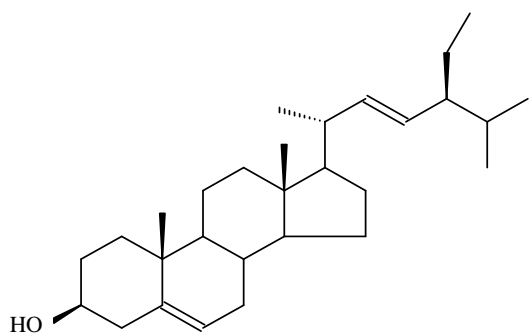
Composto	Estrutura	Referência
$\beta$ -sitosterol	40a	(60, 61)
daucosterol	40b	(53)
campesterol	41	
stigmasterol	42	
$\alpha$ -spinasterol	43	
$\Delta^5$ -avenasterol	44	(60, 61)
$\Delta^7$ -avenasterol	45	
sitostanol	46	
campestanol	47	
lofenol	48a	
24-etilofenol	48b	
obtusifoliol	49	
31-noricloartenol	50	(63, 64)
cicloleucalenol	51	
gramisterol	52	
citroestadienol	53	



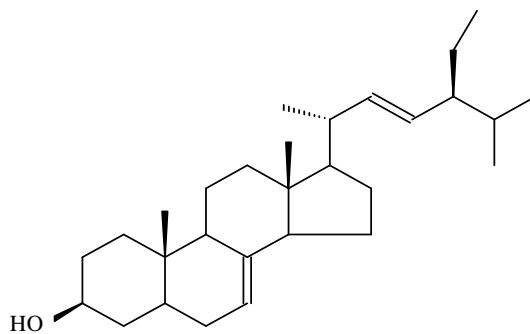
**R**  
**40a** H  $\beta$ -sitosterol  
**40b** glu daucosterol



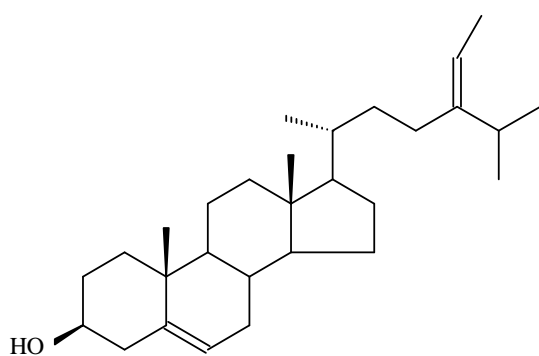
**41** campesterol



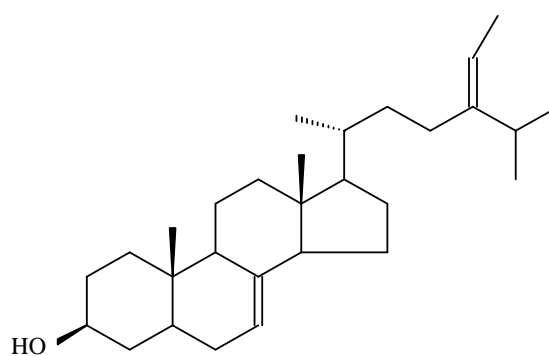
42 stigmasterol



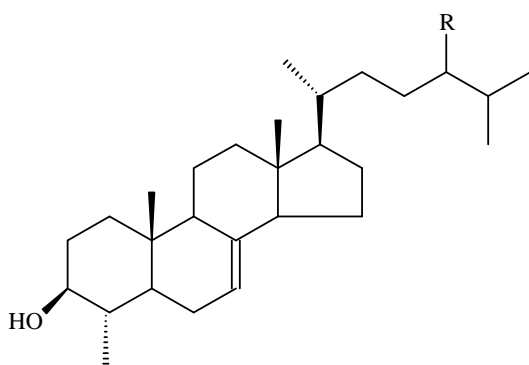
43  $\alpha$ -spinasterol



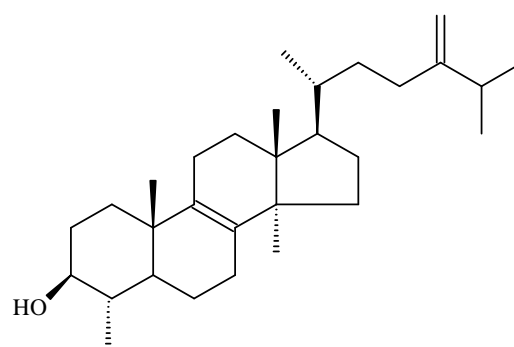
44  $\Delta^5$ -avenasterol



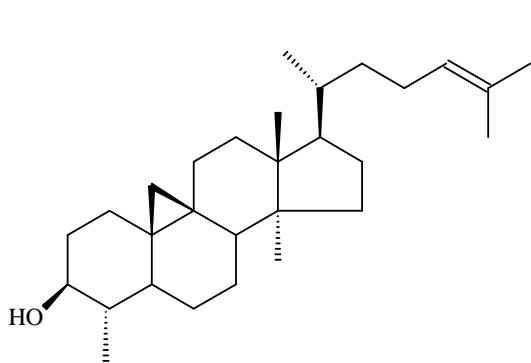
45  $\Delta^7$ -avenasterol



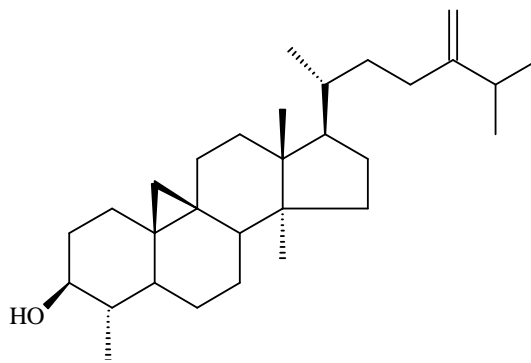
	<b>R</b>	
<b>48a</b>	H	Lofenol
<b>48b</b>	etil	



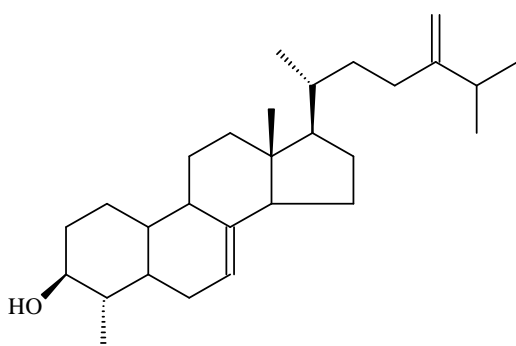
49 obtusifoliol



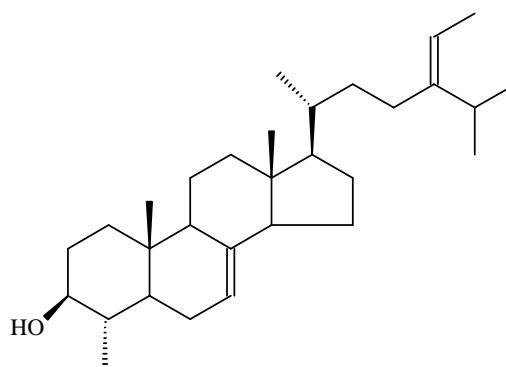
50 31-noricloartenol



51 cicloleucalenol



52 gramisterol

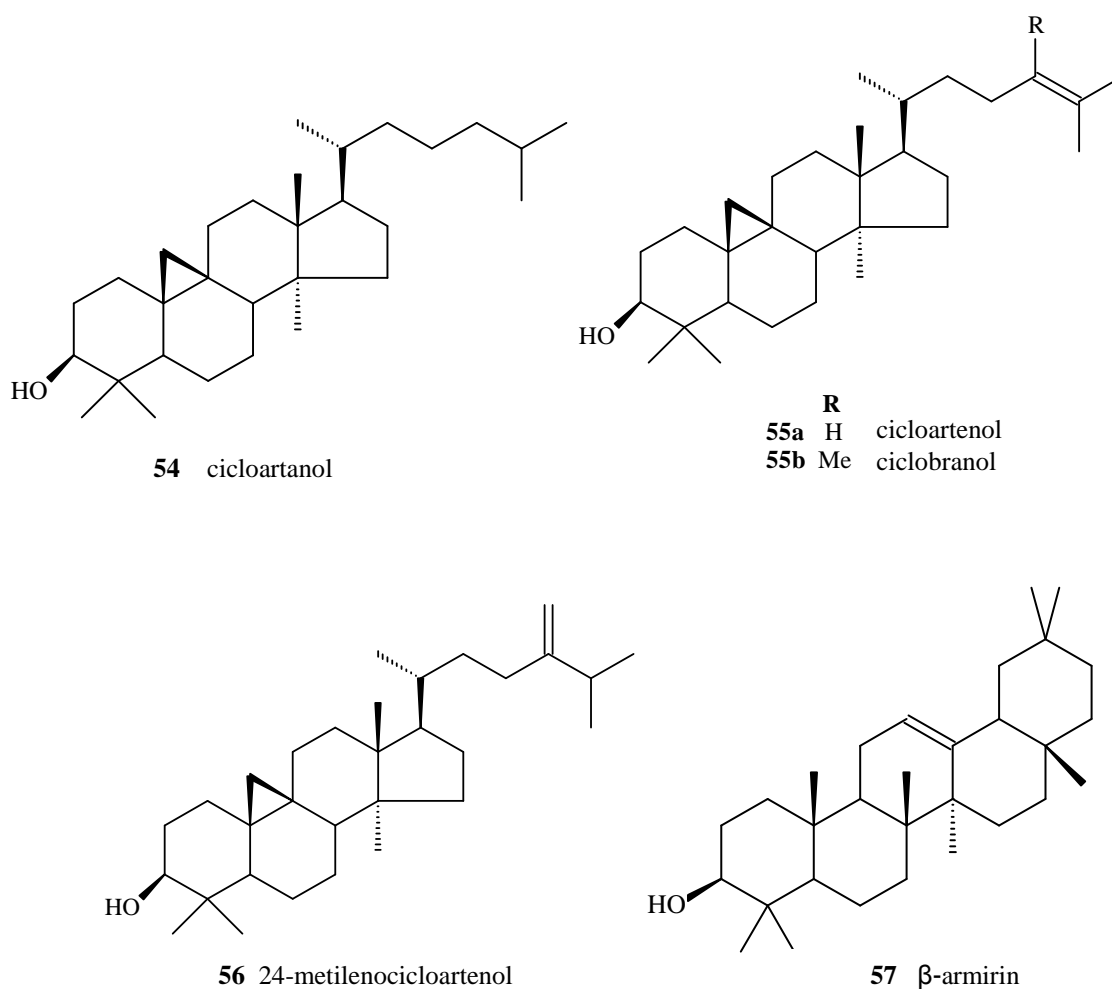


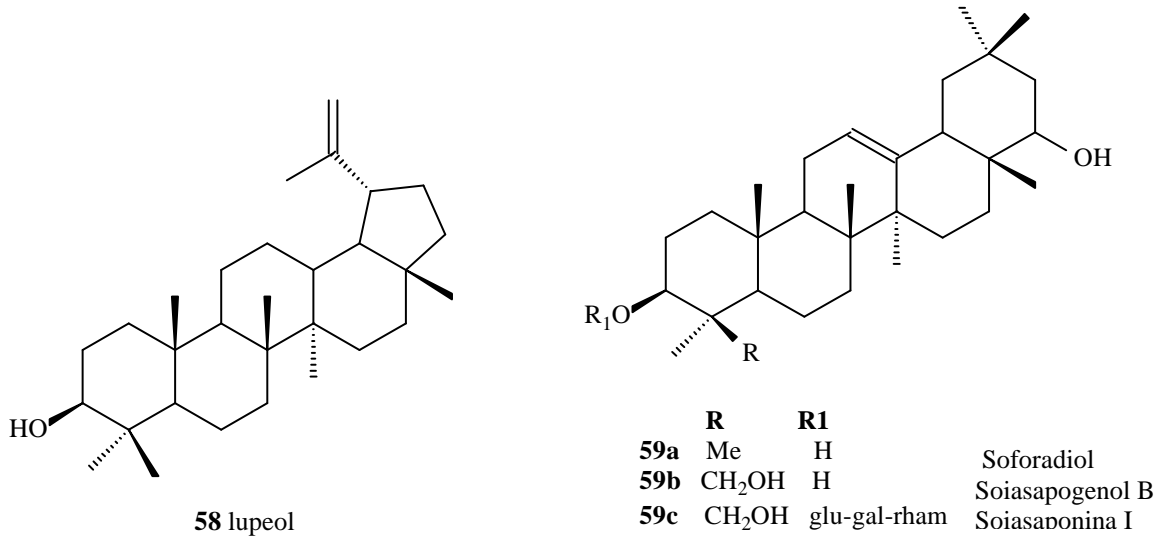
53 citrostadienol

Triterpenos. A presença de triterpenos no óleo de amendoim não é surpresa, considerando que triterpenos e esteróis são sintetizados via uma mesma rota metabólica e o óleo de *Arachis* é rico em  $\beta$ -sitosterol. Os triterpenos mais comuns no amendoim são cicloartanol, cicloartenol, ciclobranol, 24-metilenecicloartenol,  $\beta$ -amirin, e lupeol (Tabela 9) (63-65).

Tabela 9. Triterpenos encontrados em *Arachis*.

Composto	Estrutura	Referência
cicloartanol	54	
cicloartenol	55a	
ciclobranol	55b	(63-65)
24-metilenocicloartenol	56	
$\beta$ -armirin	57	
lupeol	58	
soforadiol	59a	(49)
soiasapogenol B	59b	
soiasaponina I glicosideo	59c	(66)

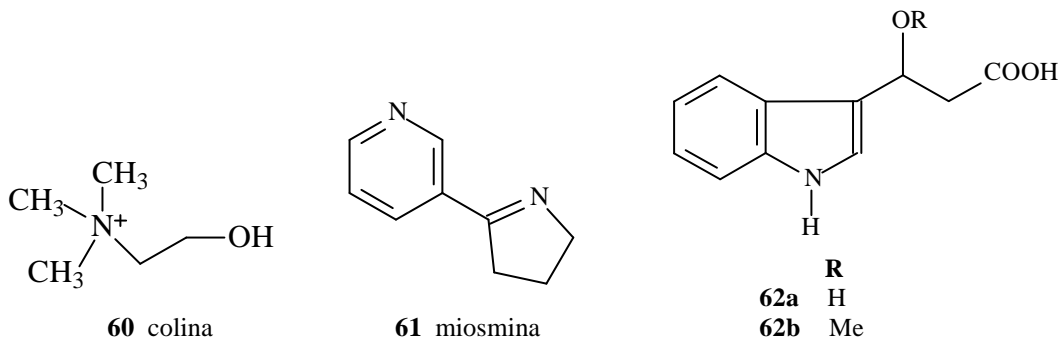




Alcalóides. A ocorrência de alcalóides em *Arachis* é pouco reportada. Provavelmente a primeira referência deste grupo em *Arachis* foi feita por Mooser (1904), quando descreveu o alcalóide chamado arachina. Entretanto Moll (1961) mostrou que arachina era, na verdade, colina (68). A Tabela 10 mostra este e outros compostos nitrogenados que ocorrem no gênero *Arachis*.

Tabela 10. Derivados nitrogenados presentes em *Arachis*.

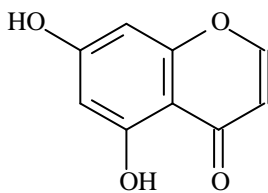
Composto	Estrutura	Referência
colina	60	(68)
miosmina	61	(69)
ácido 2-hidroxi-3-[3-(1-N-metil)indol]propiónico	62a	(48)
Ácido 2-metoxi-3-(3-indol) propiónico	62b	



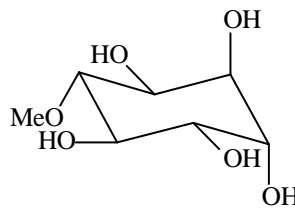


Outros compostos. O inositol D-pinitol [63]) foi isolado das sementes (70). Da vagem do amendoim foi isolada a cumarina 5,7-diidroxicromona [17] (71). Entre as vitaminas, foi encontrado 5-formiltetraidrofolato, a mais importante vitamina do tipo folato do amendoim, que também é uma boa fonte de tocoferol (vitamina E) (72).

O odor característico do amendoim torrado é devido a vários compostos como 2- e 3-metilbutanal, fenilacetaldéido, 2-metilbutanoato de etila, 3-metilbutanoato de etila, ácido butanóico, ácido metilbutanóico, 4-vinilfenol, 2-metoxifenol, 2-metoxi-4-vinilfenol,  $\beta$ -pineno, limoneno,  $\alpha$ -terpineol, e compostos de enxofre como 3-(metiltio)-propionaldeído, 4-hidroxi-2,5-dimetil-3(2H)-furanona, 2,5-dietil-3-dimetilpirazina, 2,3-dietil-5-metilpirazina, (*Z*)-2-nonenal, (*E,E*)-2,4-decadienal, (*E*)- $\beta$ -damascenona, 4-hidroxi-3-metoxibenzaldéido, e outros (73).



17 5,7-diidroxicromona



63 D-pinitol

#### 2.1.6 Atividade biológica de *Arachis*.

O uso tradicional do amendoim para fins medicinais é relatado desde os tempos antigos. A pele do amendoim é utilizada para tratar hemorragias e bronquites crônicas na China (56).

Extratos de amendoim foram utilizados no tratamento de pacientes diabéticos no norte Nigéria (74). *Arachis* é utilizado para reduzir o colesterol, auxiliar na perda de peso e na prevenção de doenças cardiovasculares e câncer (75).

O amendoim apresenta um perfil nutricional interessante, com vários componentes alimentares valorizados, incluindo fibras dietéticas, proteínas, micronutrientes e fitoquímicos, tais como fitoesteróis, compostos fenólicos, estilbenos e arginina (76, 77), com vários efeitos biológicos, incluindo cardioprotetor, antiinflamatório, anticâncer, entre outros. O resveratrol [1a], a luteolina [19], a quercetina [19b], e muitos outros compostos foram isolados a partir de tecidos de

amendoim, incluindo resíduos industriais (cascas, folhas, raízes, etc), e apresentam muitas atividades biológicas.

As folhas de *A. hypogaea* têm ação adstringente, além de várias outras propriedades biológicas. Elas são usadas terapêuticamente contra dor abdominal, bronquite, constipação e flatulência (77). O amendoim também tem efeitos terapêuticos em processos hemorrágicos em hemofílicos (78).

O amendoim é uma rica fonte de magnésio, folatos, fibras,  $\alpha$ -tocoferol, cobre, e arginina (79), e o consumo de amendoim tem sido estimulado (75).

Embora a atividade biológica dos compostos puros tenha sido provada, o consumo de amendoins ou de seus extratos pode às vezes ser mais favorável do que a ingestão de fitoquímicos puros. Por exemplo, a absorção de luteolina [19] mostrou-se mais eficiente a partir de extrato de casca de amendoim do que do composto puro (81).

Atividade antiinflamatória. Para praticamente todos os estilbenos presentes no amendoim foi relatada atividade antiinflamatória; o que poderia ser atribuído ao fato de que os estilbenos apresentam o grupo hidroxila em posição 4, como o determinante mais importante dessa bioatividade (82). Arachidina-1 [5], piceatanol [4] e resveratrol [1a] podem inibir a produção de lipopolissacarídeo (LPS) induzida pelo óxido nítrico (NO) (82).

Resveratrol [1a], em um modelo *ex vivo*, inibiu o anticorpo TNF-R (fator receptor de necrose tumoral) e IL-6 (interleucina-6) liberados de macrófagos, suprimindo assim macrófagos CM, induzindo uma resposta inflamatória no adipócitos (83). Além disso, o resveratrol exerceu efeitos anti-inflamatórios em microglia e astrócitos, inibindo diferentes citocinas pró-inflamatórias e sinalização chave de moléculas (84). No tratamento de camundongos com resveratrol [1<sup>a</sup>] ocorreu proteção contra colite por meio do aumento da regulação de SIRT1 (enzima sirtuina 1) em células do sistema imunológico no colon (85).

Atividade antitumoral. Há evidências quanto ao pape protetor dos fitosteróis, principalmente  $\beta$ -sitosterol [40], no cancer do cólon, de próstata e de mama (86). Como o amendoim e seus produtos, tais como o óleo, a manteiga e a farinha, são boas fontes de fitoesteróis, o consumo destes produtos pode trazer beneficios a saúde (86).

Piceatanol [4], arachidina-1 [5] e resveratrol [1a] também apresentaram alta citotoxicidade em macrófagos de ratos (82). Com base em estudos *in vitro* e *ex vivo*, e estudos em animais, o resveratrol [1a] e seus derivados inibem eventos celulares associados com o início, promoção e a progressão de tumores (87, 88). O resveratrol inibe a formação de radicais livres, o que inibe a formação do tumor, atuando como antimutagênico, pois induz a quinina redutase capaz desintoxicar cancerígenos, além disso, inibe o desenvolvimento de lesões pré-neoplásicas (89).

Dependendo da concentração e do tipo de célula, o resveratrol [1a] pode atuar como uma molécula pró-oxidante, e esse efeito pode ser um mecanismo de ação importante para a sua propriedades anticâncer e pró-apoptótica (90). Arachidina-1 [5], arachidina-3 [7], isopentadienylresveratrol [3] e resveratrol [1a] têm sido caracterizados como agentes antioxidantes e anti-inflamatórios. Alguns estudos têm indicado que o resveratrol induz a morte celular programada (MCP) em células leucêmicas HL-60 humanas, e a atividade anticâncer destes estilbenos foi determinada em células de mesma linhagem. Arachidina-1 [5] apresentou maior eficácia na indução da MCP em células HL-60, com  $EC_{50}$  cerca de 4 vezes menor que o resveratrol [1a], causando danos na membrana mitocondrial, ativação de caspases, e translocação nuclear de fator de indução de apoptose que resultam na degradação de cromossomos e morte celular. Portanto, arachidina-1 induz MCP em células HL-60 através de vias caspase-dependente e caspase-independente (91).

A administração oral de resveratrol na dose diária de 15 mg/kg foi eficaz como tratamento quimiopreventivo para metástase pulmonar das células CT26. Mais de 57,1% das células CT26- de camundongos BALB / tratados com resveratrol ficaram livre de nódulos tumorais nos pulmões (92).

Hipotina, uma proteína isolada de sementes de *Arachis*, mostrou atividade antiproliferativa em células hepatoma Bel-7402 do fígado humano. As isoflavonas são um importante grupo de fitoquímicos, não só por apresentarem propriedades anticancerígenas, mas também por desempenhar um papel na redução da osteoporose em mulheres na pós-menopausa (93).

Atividade antifúngica. A proteína hipogina, isolada do sementes de amendoim, apresenta atividade inibitória sobre o crescimento dos fungos *Mycosphaerella arachidicola*, *M. berkeleyi*, *Fusarium oxysporum*, e *Coprinus comatus* (94, 95). Hipotina exerce potente ação antifúngica contra várias espécies de fungos, incluindo

*Pythium aphanidermatum*, *Botrytis cinerea*, *Alternaria alternata*, *Physalospora piricola*, *Fusarium solani* e *F. oxysporum* (93).

Das raízes do amendoim duas proteínas antifúngicas denominadas PFPA-I e PFPA -II foram purificadas e caracterizadas, e mostraram forte inibição *in vitro* do crescimento de *Trichoderma viride*, *B. cinerea*, e *Cladosporium* spp (96). A cromona 17 apresentou atividade antimicrobiana contra fungos patogênicos do solo *R. solani* e *Sclerotium rolfsii* (97). Tal fato sugere que [17] desempenha papel na proteção contra fungos na contaminação do amendoim, juntamente com resveratrol [1a<sup>a</sup>] e seus derivados.

Atividade antibacteriana e antiproliferativa. O extrato aquoso das folhas de amendoim apresentou atividade antibacteriana contra *Enterobacter aerogenes* e *Klebsiella pneumoniae* (77). O extrato etanólico também foi ativo contra *K. pneumoniae*. Em contrapartida, esses extratos foram inativos contra *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Salmonella typhimurium* (77).

Hipotina apresentou atividade antibacteriana para *Staphylococcus aureus*. No entanto, esta proteína não apresentou qualquer efeito contra bactérias gram-negativas (93).

## 2.2 RESVERATROL

O resveratrol é um dos principais compostos bioativos do amendoim, presente também na uva e no vinho, e é associado à redução do risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares e câncer destes alimentos (98). Entre os estilbenos, o resveratrol é o de maior destaque, podendo ocorrer na forma de isômero *cis* ou *trans*, o isômero *trans*-resveratrol é convertido para *cis*-resveratrol em presença da luz visível, pois esta forma é mais estável (13, 99). O resveratrol, 3,5,4'-trihidroxiestilbeno (1a) ocorre naturalmente em várias famílias vegetais e tem a função de conferir resistência a patógenos aos vegetais (12).

Em algumas espécies de plantas a biossíntese do resveratrol é via rota dos fenilpropanóides, utilizando quatro enzimas: fenilalanina amônio-liase (PAL), 4-hidroxilase ácido cinâmico (C4H), 4-coumarato:CoA ligase (4CL) e estilbeno sintase (STS) também chamada de resveratrol sintase. As duas primeiras enzimas PAL e C4H, transformam o aminoácido fenilalanina a ácido *p*-coumarico. A terceira enzima

4CL, liga o ácido *p*-coumarico ao grupo panteteína da Coenzima-A (CoA) para produzir 4-coumaroil-CoA. A última enzima da via, estilbeno sintase, cataliza a condensação entre uma molécula de 4-coumaroil-CoA e três moléculas de malonil-CoA, formando o resveratrol (Figura 1) (123).

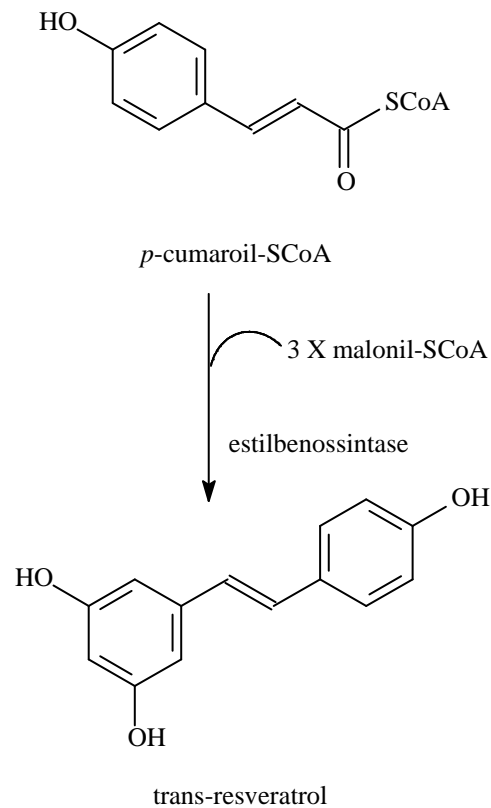


Figura 1. Rota biossintética do resveratrol

O resveratrol é encontrado em 31 gêneros e 12 famílias, totalizando 72 espécies; suas principais fontes na dieta humana são a uva (*Vitis vinífera* L.) e o amendoim (*A. hypogaea*). A mais rica fonte é a espécie *Polygonum cuspidatum*, cujas suas raízes são usadas na medicina chinesa e japonesa, para a prevenção de problemas cardiovasculares e para a saúde em geral (100, 101).

A capacidade do resveratrol de inibir o progresso de infecções causadas por fungos o inclui na classe dos compostos conhecidos como fitoalexinas – metabólitos secundários de baixo peso molecular com atividade antimicrobiana, sintetizados

pelos vegetais em resposta a estresses físicos, químicos ou biológicos, acumulando-se ao redor de uma infecção (102, 103).

### 2.2.1 Resveratrol e Saúde

Os benefícios cardiovasculares associados ao consumo moderado de vinho têm sido atribuídos ao resveratrol, que pode ser também umas das explicações para o “paradoxo francês”, isto é, a baixíssima mortalidade devido a doenças coronarianas na França, apesar da dieta rica em gorduras e pelo tabagismo (104). Estudos *in vitro* e em modelos animais sugerem que o resveratrol pode proteger contra doenças cardíacas por diferentes mecanismos: inibição de oxidação da lipoproteína LDL, inibição da agregação de plaquetas, inibição da proliferação celular e aumento da vaso-dilatação (104).

O resveratrol possui atividade antioxidante, inibindo a ação de radicais livres; sua estrutura química é similar ao estrogênio sintético, dietilestilbestrol, portanto apresenta propriedades parecidas com as desse hormônio, podendo ser usado nos tratamentos de pós-menopausa (104-107). O resveratrol pode ser convertido a piceatanol pela enzima CYP1B1, encontrada em tumores (108) ), composto que no estudo de Weider e colaboradores (2001) (109) mostrou ser um potente indutor de apoptose, morte programada de células, em análises de linfoblastos primários.

Alguns estudos mostraram a atividade anticancerígena do resveratrol, impedindo o crescimento do tumor através da inibição da enzima cyclooxygenase-1 (COX-1), responsável pela conversão do ácido araquidônico à substância pró-inflamatória que estimula o crescimento tumoral (101, 105, 110).

### 2.2.2 Mercado do resveratrol

Entre 2002 e 2009, 93 novos produtos contendo resveratrol foram lançados no mercado mundial (117). Em 2010, considerando somente produtos alimentícios, 16 novos produtos contendo resveratrol foram introduzidos no mercado mundial. E os produtos nessa categoria, lançados de janeiro a abril de 2011, já ultrapassou o número de todo o ano de 2009 (5 novos produtos - alimentos e bebidas) (118).

De acordo com o Datamonitor's Product Launch Analytics, citado pelo Instituto of Food Technologist (118), o número de alimentos e bebidas contendo ingredientes

com propriedades antioxidantes triplicou em 2010. Considerando essa tendência, resveratrol tem um grande potencial de mercado na área de alimentos funcionais.

### 2.2.3 Resveratrol em amendoim (*Arachis hypogaea* L.)

Em 1976, Ingham, citado por Chen e colaboradores (2002) (11), identificou pela primeira vez o resveratrol no amendoim, analisando hipocótilos infectados por fungos. Estudos posteriores mostraram o acúmulo de resveratrol também em diferentes partes da planta em resposta à infecção fúngica, como em cotilédones em diferentes estágios de maturidade em resposta à agressão mecânica (111), em calos em resposta à luz ultravioleta C (112), e em raízes, comparando as estações de outono e primavera (11).

Sanders e colaboradores (2000) (10) analisaram 15 cultivares de amendoim, representando três tipos comerciais e detectaram uma variação de 0,02 a 1,79 µg/g de resveratrol em grãos; Tokusüoglu e colaboradores (2005) (13), analisando cultivares da Turquia, encontraram 0,03 a 1,92 µg/g, valores bastante reduzidos quando comparado ao encontrado em vinhos tintos, 0,82 a 5,75 µg/mL (113). Chung e colaboradores (2003) (12), analisando folhas de amendoim submetidas a estresses bióticos e abióticos, observaram que o teor de resveratrol mais elevado foi de 0,78 µg/g em folhas submetidas a tratamento com ácido salicílico. A raiz foi a parte da planta que apresentou maior teor deste composto, provavelmente devido ao maior contato com patógenos, como também ao atrito entre o tecido vegetal e o solo durante o crescimento (12). Chen e colaboradores (2002) (11) encontraram teores elevados em raízes, variando entre 0,130 e 1,330 mg/g para amostras do outono de 2000 e entre 0,015 e 0,063 mg/g para amostras do inverno de 2001.

Comparando produtos de amendoim comercializados nos Estados Unidos da América, Sobolev & Cole (1999) (114) encontraram teores de resveratrol variando entre 0,02 e 0,08 µg/g para produtos torrados; 0,15 e 0,50 µg/g para cremes, e 0,05 a 7,87 µg/g para os produtos cozidos.

Embora as sementes sejam a parte da planta normalmente consumida na alimentação humana, as folhas de algumas espécies de *Arachis* também são consumidas na alimentação animal, como a espécie nativa forrageira *A. pintoii*, indicando a ausência de toxicidade das folhas (115). A produção de *Arachis*, visando

obtenção de sementes para atender a demanda industrial, gera uma grande quantidade de resíduo agrícola na forma de folhas e raízes. A avaliação de folhas com elevado teor de resveratrol pode gerar conhecimento sobre a possibilidade novos produtos que poderão ser aplicados no enriquecimento de alimentos funcionais ou na produção de extratos para atender demandas da indústria farmacêutica e cosmética. Além disso, o estudo do teor de resveratrol em folhas de *Arachis* pode selecionar diferentes espécies nativas com potencial para promover a biossíntese deste composto também nas sementes.



### **CAPÍTULO 3 – PADRONIZAÇÃO DA METODOLOGIA**

### 3.1 MATERIAIS E REAGENTES

**Solventes e reagentes.** Acetonitrila grau HPLC e ácido fosfórico foram obtidos da J.T.Baker; e hexano da Merck. Padrões de *trans*-resveratrol (>99%) e fenolftaleína (>98%) foram obtidos da Sigma-Aldrich; alumina foi obtida da Sigma e celite hyflosupercel da Diacel. Outros solventes e reagentes foram obtidos de fornecedores nacionais.

**Padrões.** Foram preparadas soluções estoque dos padrões de *trans*-resveratrol (230-460 µg/mL) e fenolftaleína (507,39-5854 µg/mL), em etanol absoluto e estocadas a -20°C por até três meses. Para evitar a isomerização da forma *trans* para *cis*, os frascos foram protegidos da luz, com papel alumínio.

**Equipamentos.** Para a análise foi utilizado cromatógrafo líquido de alta eficiência - CLAE (Varian®), com bomba ternária, amostrador automático e detector de arranjo de fotodiodos acoplados (PDA Varian® PS-240/PS-410/ PS-335/Software Galaxie 1.9). Para o preparo das amostras foram utilizados centrifuga (Herolab, Unicen MR®) e homogeneizador de tecidos Polytron®.

Para a indução do resveratrol foi utilizado um Fluxo Laminar: Trox Modelo FLV série: 235-81, com Lâmpada: Philips TUV 30W/ 630 TB LONGLIFE.

### 3.2 PRODUÇÃO DE MATERIAL VEGETAL

As folhas de *Arachis hypogaea* cv Caiapó usadas para padronização da metodologia foram coletadas na casa de vegetação da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF, em março e junho de 2010.

As espécies silvestres consideradas neste estudo foram *A. cruziana*, *A. kuhlmannii*, *A. magna*, *A. cardenasii*, *A. duranensis*, *A. ipaënsis*, *A. batizocoi*, *A. gregoryii*, *A. simpsonii* e *A. kempff-mercadoi* (Figura 2). Sementes de *A. hypogaea* e das 10 espécies silvestres de *Arachis* da Coleção de Trabalho da Embrapa foram plantadas em vasos e cultivadas em casa de vegetação da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia em outubro de 2010 e as folhas foram coletadas entre fevereiro e março de 2011. A espécie de amendoim cultivado, *A. hypogaea* foi usada neste experimento como referência.

O experimento foi conduzido em três blocos, sendo que as folhas foram coletadas em intervalo de uma semana para cada bloco; para cada espécie, as folhas foram coletadas no mesmo estágio de desenvolvimento vegetal a partir de um mesmo grupo de plantas.

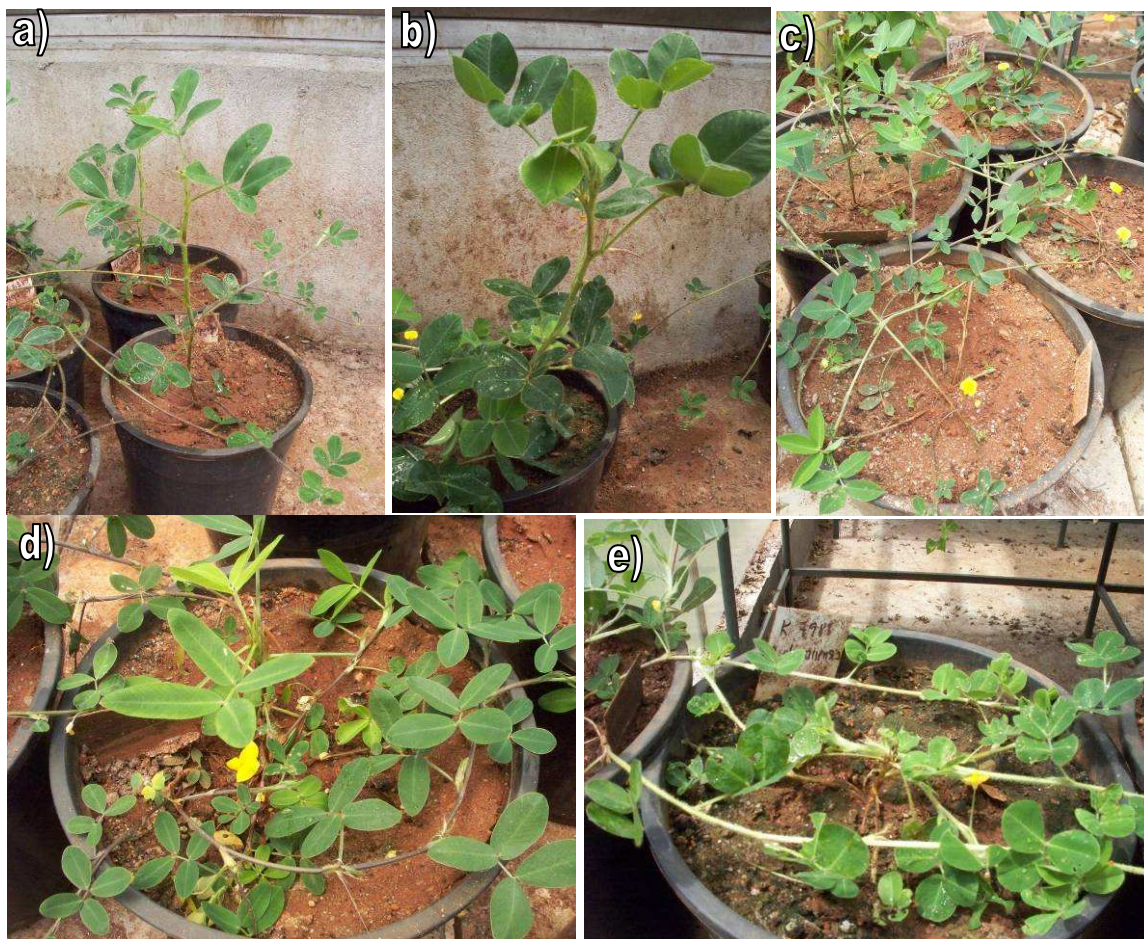


Figura 2. Algumas espécies utilizadas neste estudo, a) *Arachis gregoryii*, b) *A. batizocoi*, c) *A. kempff-mercadoi*, d) *A. simpsonii* e e) *A. duranensis*. Fotos: Marcos Gimenes.

### 3.3 INDUÇÃO DE RESVERATROL

**Padronização com *A. hypogaea*.** Para a padronização da metodologia de indução do resveratrol, foram utilizados três acessos da cultivar Caiapó de *A. hypogaea*, dos quais foram coletadas 30 folhas de cada um. A coleta ocorreu em junho de 2010 como mostra a Tabela 11. As folhas oriundas dos acessos Caiapó 1 e Caiapó 2 foram pesadas e ficaram em repouso por três horas até o momento da secagem em estufa; como amostra controle foram utilizadas as folhas do acesso

Caiapó 3, as quais ficaram em repouso por 24h, até o momento da secagem na estufa, por 44h a 40°C.

Tabela 11. Dados dos tratamentos de indução de produção de resveratrol em acessos de *Arachis hypogaea*, cultivar Caiapó

Acesso	Tratamento	Data e hora da coleta	Data e hora do início da secagem
Caiapó 1	Secagem estufa	24/6/2010 às 11:00h	
Caiapó 2	Secagem estufa		24/06/2010 às 14:00h
Caiapó 3	Exposição a luz UV + Secagem estufa	23/6/2010 às 14:00h	
Caiapó 3 Controle	Secagem estufa sem UV		

Para indução da produção do resveratrol, as folhas do Caiapó 3 foram pesadas e colocadas em placas de petri com algodão umedecido com água, onde receberam luz ultravioleta por 2h:30min; depois permaneceram em repouso por 19h. Em seguida, as folhas foram levadas à secagem em estufa a 40°C onde permaneceram por 44h. Após a secagem, as folhas foram pesadas novamente para aferição da umidade, acondicionadas em saco plástico e estocadas em freezer a -20°C até o momento da extração.

**Caracterização de resveratrol nas espécies silvestres.** Para a caracterização de resveratrol nas espécies silvestres, as folhas foram divididas em dois grupos submetidos a dois tratamentos: folhas teste, cuja indução de resveratrol foi conduzida na presença de radiação ultravioleta; e folhas controle, que não passaram por processo de indução com radiação ultravioleta.

Imediatamente após o corte em casa de vegetação, as folhas foram levadas para o Laboratório de Cultura de Tecidos da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. As folhas teste e controle de cada espécie foram colocadas em algodão umedecido com água, onde as folhas teste foram induzidas com luz ultravioleta por 2h30min, seguido de repouso no escuro por 15h. O controle foi submetido ao mesmo tratamento, com exceção da indução com radiação ultravioleta (Figura. 3).



Figura 3. Folhas de *Arachis hypogaea* preparadas para indução com UV. Fotos: Marcos Gimenes.

Em cada conjunto de espécies que eram induzidas, foi colocada junto uma amostra de *A. hypogaea*, que foi utilizada como referência.

Para a avaliação das espécies silvestres, 1g de folhas induzidas e controle de cada espécie/bloco foi pesado em tubos tipo falcon, protegido com papel alumínio, em triplicata. Os tubos com as folhas foram congelados em freezer a  $-80^{\circ}\text{C}$  entre 5 e 20 dias, até o momento da extração.

### 3.4 PADRONIZAÇÃO

As análises foram conduzidas no Laboratório de Química de Produtos Naturais da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Todas as etapas do método analítico, descritas abaixo, foram conduzidas sob proteção da luz, como forma de evitar a isomerização e a degradação do resveratrol.

#### **Extração**

- Folhas secas - As folhas de *A. hypogaea* induzidas e não induzidas (utilizadas para avaliar o processo de indução de resveratrol) foram secas em estufa com circulação e renovação de ar forçado a 40°C por 44h; em seguida foram trituradas em moinho para obtenção de um farelo fino e homogêneo (granulometria 40 mesh). O material botânico pulverizado foi acondicionado em frasco de vidro e armazenado em geladeira a 4°C até o momento da análise.

O procedimento de extração do resveratrol foi conduzido conforme método de Potrebko & Ressurreccion (2009) (100), desenvolvido para sementes de amendoim. Em um tubo tipo falcon, protegido da luz com papel alumínio, foram pesados 0,65 g de farelo das folhas com adição de 10 mL de etanol (EtOH) 80 %. O tubo foi levado para um homogeneizador de tecidos (Polytron) onde o resveratrol foi extraído por 2 min a 20.000 rpm em banho de gelo. As fases foram separadas em centrifuga a 4.000 rpm, 25°C por 6 min (rotor 6 x 80 G).

Além do EtOH 80 %, foram avaliados outros diferentes solventes na extração: mistura de EtOH e ácido fórmico nas proporções 80:0,1; 80:0,25; 80:0,6; e 80:1; acetona 70 %, mistura de metanol e etanol (80:20) e MeOH 80 %.

- Folhas *in natura* - A eficiência da extração também foi avaliada utilizando folhas de *A. hypogaea in natura*. As folhas foram congeladas em nitrogênio líquido e submetidas à fricção com auxílio de um bastão de vidro. Ao material pulverizado foram adicionados 10 mL de EtOH 80% e a extração foi realizada em Polytron por 2 min a 20.000 rpm; após a extração, o aparelho foi lavado com 2 mL de EtOH 80% para garantir a completa recuperação do material extraído.

**Limpeza do extrato.** Considerando a possível presença de interferentes típicos de folhas presentes no extrato bruto, tais como clorofila, outros pigmentos, etc., foram avaliados diferentes processos de tratamento do extrato antes da análise cromatográfica por CLAE.

- Extração em fase sólida - Conforme método de limpeza empregado para sementes de amendoim (100), uma coluna com mistura de alumina e celite

hyflosupercel (1:1), foi montada em uma seringa de plástico de 3 mL. Foram aplicados 2 mL do sobrenadante do extrato bruto, aqui chamado de extrato etanólico de *A. hypogaea* (EEA), seguidos de mais 2 mL de etanol 80% para garantir a recuperação da amostra. O extrato purificado foi acondicionado em frasco de 4 mL.

- Extração líquido-líquido - Foram adicionados 2 mL de EEA em frascos de 4 mL mais 2 mL de hexano. O frasco foi agitado manualmente em sentido horário, de modo que as duas fases se misturassem de forma eficiente; em seguida o frasco foi mantido em repouso por aproximadamente um minuto para a separação das fases. A fase superior, chamada extrato hexânico de *A. hypogaea* (EHA), que apresentou coloração verde intensa pela presença de clorofila, foi extraída cuidadosamente da mistura com auxílio de uma pipeta de pasteur e descartada. O mesmo procedimento foi repetido. Controle - Como controle da avaliação de limpeza, foi usado o extrato líquido bruto.

Cada processo de limpeza do extrato foi realizado em quatro repetições. Após os processos de limpeza do extrato, o solvente do EEA foi eliminado em chapa quente (60 °C) e jato de gás nitrogênio por 35-40 min. Em seguida, os frascos foram tampados, retirado o ar com o auxílio de uma seringa, vedada a tampa com filme e por fim estocados por 24 h a -20°C, antes da análise e por CLAE.

**Avaliação de perdas de *trans*-resveratrol por aquecimento.** Para averiguar perdas por aquecimento, foram preparadas duas soluções padrão, com concentração conhecida (2,09 µg/mL). O padrão A foi submetido ao processo de limpeza com hexano e secagem em chapa quente, conforme descrição do método para amostras, antes da injeção no CLAE; o padrão B foi injetado diretamente. Foram comparadas as áreas dos picos de cada padrão, após correção de áreas de acordo com as diluições do padrão tratado. Esta análise foi realizada em triplicata. O cálculo de perda foi realizado de acordo com as fórmulas a seguir:

$$\% = \left( \frac{APS \times 100}{APN} \right) - 100 \times (-1)$$

Onde:

APN é área média encontrada da triplicata do padrão normal (sem aquecimento);

APS é a área média encontrada da triplicata do padrão seco (com aquecimento).

**Preparo da amostra para injeção no CLAE.** Conforme método de Potrebko & Ressorreccion (2009) (100), o EEA purificado e seco foi diluído em 0,7 mL de etanol 15 %. O frasco, protegido por papel alumínio, foi agitado manualmente por 30 s para que o extrato desprendesse totalmente da parede, então submetido a banho de ultrassom dentro de um recipiente plástico, onde permaneceu por quatro minutos. Em seguida o extrato diluído foi transferido para microtubos tipo eppendorf de 1,5 mL e centrifugado por 15 min a 25°C a 18.000 rpm. O sobrenadante do material centrifugado foi acondicionado em frasco de 2 mL, protegido da luz, e posteriormente utilizado para injeção em cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE) com detector de arranjo de diodos acoplado (DAD/PDA).

### 3.5 ANÁLISE POR CLAE.

Para a análise, foi avaliada a eficiência de dois tipos de coluna: Luna C18 250 x 4,6 mm 5 µm (Phenomenex) com coluna de guarda Varian (4,6 mm e partícula de 5 µm); e C18 Zorbax XDB Agilent (250 x 4,6 mm, 5 µm).

Para a coluna Luna C18 250 x 4,6 mm 5 µm (Phenomenex) com coluna de guarda Varian (4,6 mm e partícula de 5 µm) foi utilizada a seguinte condição de análise: gradiente acetronitrila e água. Acetonitrila: 0 min, 5% ; 7 min, 78 %; 13 min, 77 %; 18-21 min, 38 % ; 26 min, 63 % ; 28 min, 80 % e 29-34 min, 5 %; fluxo de 1 mL/min. O volume de injeção foi de 40 µL. A detecção foi monitorada a 308 nm, 250 nm e também no comprimento de máxima absorção de cada eluente (DAD).

Para a coluna C18 Zorbax XDB Agilent (250 x 4,6 mm, 5 µm). Como fase móvel, foi empregado gradiente acetoneitrila e solução aquosa de ácido fosfórico 0,02%. Condição de análise: Acetonitrila: 0 min, 13 %; 6-9 min, 15 %; 17 min, 17 %; 28-33 min, 28 %; 40min, 50 %; 45 min, 60 %; 46-48 min, 80 %; 49-54 min, 13%; fluxo de 1,0 mL/min. A absorção UV foi monitorada a 308 nm, 280 nm e também no comprimento de máxima absorção de cada eluente (DAD); o volume de injeção foi de 10 µL.



**Identificação.** O pico do resveratrol no extrato de *Arachis sp* foi identificado por comparação do tempo de retenção com o padrão comercial adquirido, pelo perfil do espectro fornecido pelo detector de arranjo de diodos e por co-eluição com o padrão. Além disso, a confirmação deste composto foi feita por comparação dos cromatogramas das amostras induzidas e controle, após indução por UV ocorreu um aumento expressivo do pico no tempo de retenção correspondente ao do resveratrol.

**Quantificação.** O resveratrol foi quantificado por adição de fenolftaleína como padrão interno (100). As áreas dos picos de *trans*-resveratrol e fenolftaleína das análises do padrão foram usadas para calcular as concentrações de *trans*-resveratrol nas amostras de folhas de amendoim usando a seguinte equação:

$$\mu\text{g de } r \text{ na amostra} = \left( \frac{\left( \frac{\mu\text{g de } r \text{ no padrão}}{\text{AP de } r \text{ no padrão}} \right) \times \text{AP de } r \text{ na amostra}}{\left( \frac{\mu\text{g de PI no padrão}}{\text{AP de PI no padrão}} \right) \times \text{AP do PI na amostra}} \right) \times \mu\text{g de PI na amostra}$$

Onde:

*r* é a concentração de *trans*-resveratrol

PI (Padrão interno) é a concentração de fenolftaleína

AP é a área do pico.

**Linearidade.** O estudo da faixa de linearidade do resveratrol e da fenolftaleína (empregada como padrão interno) foi baseado nas razões área/concentração, calculadas a partir de pontos experimentais disponíveis para a construção da curva: 15 valores entre 0,27 e 9942,03 mAU para resveratrol e 1,47 e 11714,47 mAU para fenolftaleína, associados a uma faixa de 0,01 a 217,6 µg/mL para *trans*-resveratrol e 0,15 a 2352,0 µg/mL para fenolftaleína. Foram considerados na faixa linear os pontos cujas razões área/concentração não tivessem apresentado

diferença superior a 5% do coeficiente angular da reta. Cada ponto foi injetado três vezes. Todas as soluções foram filtradas em filtros Millipore de 0,45 µm de diâmetro.

. **Repetibilidade.** Para avaliar a precisão das injeções, uma solução com concentração 23 µg/mL de *trans*-resveratrol e 292,7 µg/mL de fenolftaleína foi injetada dez vezes (100). A repetibilidade foi expressa usando o coeficiente de variação.

### 3.6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### PADRONIZAÇÃO DA METODOLOGIA

**Indução do resveratrol.** Não foi detectado o pico de *trans*-resveratrol em qualquer das cinco repetições dos acessos Caiapó 1 e 2 e Caiapó 3 controle de *A. hypogaea*; porém na amostra do acesso Caiapó 3 tratada com UV foi encontrado um pico expressivo no tempo de retenção 32,30 min, com área entre 22075 e 22348 mAU.seg, sendo que o pico apresentou tempo de retenção e  $\lambda_{\max}$  (comprimento de onda máximo) em 304 nm na fase móvel, compatível com o padrão de resveratrol eluído nas mesmas condições (Figura 4), mostrando que o tratamento com UV utilizado foi eficiente na indução do resveratrol em folhas de *A. hypogaea*.

**Extração.** Entre os solventes avaliados, o etanol 80 % e o metanol 80% não apresentaram diferença significativa para a extração de resveratrol em folhas, mas os dois solventes foram mais eficientes na extração do que a mistura metanol:etanol (80:20). A utilização de etanol acidificado e de acetona 70% forneceu extratos de composição complexa, o que dificultou a quantificação.

Com base nos resultados obtidos (Tabela 12), e considerando os dados da literatura (100), etanol 80%, que apresentou bom potencial de extração e é um solvente de baixa toxicidade, foi selecionado para a extração de resveratrol em folhas de *Arachis sp.*

Para avaliação de resveratrol nas espécies silvestres foi escolhida a indução por UV por 2h30min mais repouso por 15h e extração com folhas *in natura*.

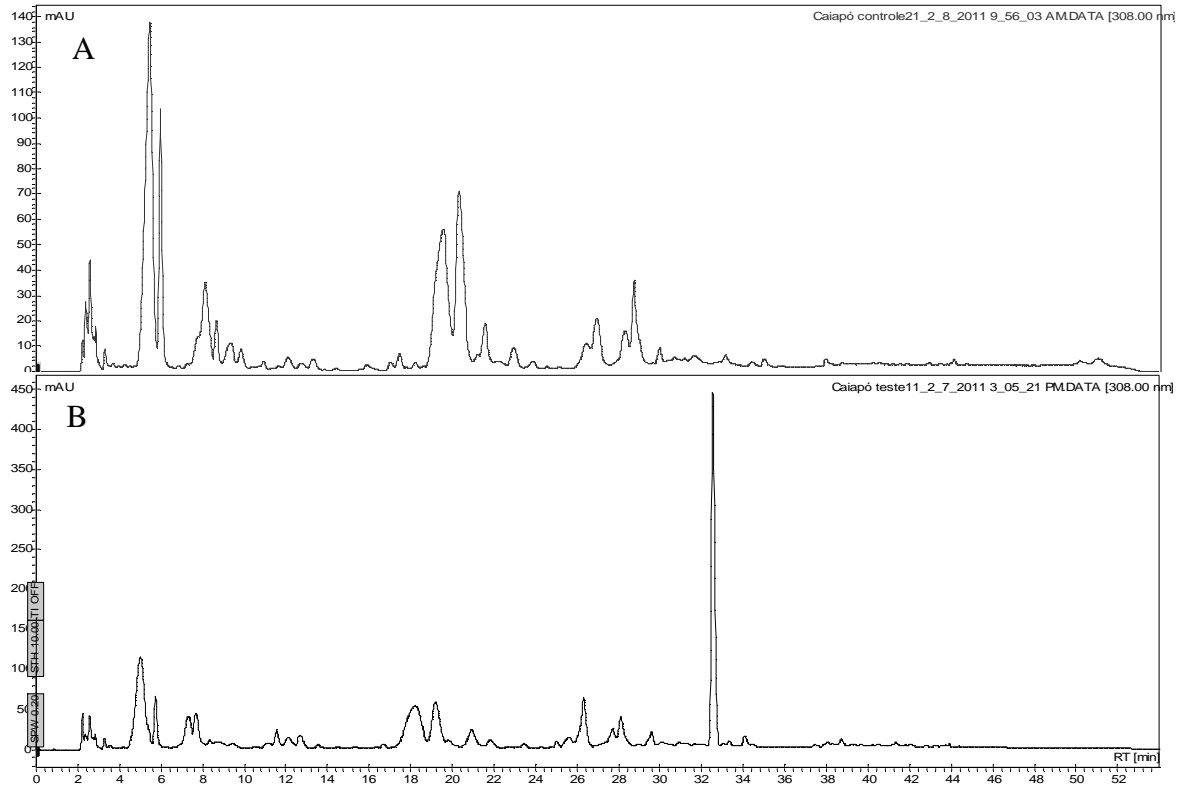


Figura 4. Cromatograma de extrato de folhas de *A. hypogaea* controle, sem indução de resveratrol (A) e teste (B), utilizando indução de resveratrol com UV. Resveratrol tR 32,3 min. Coluna Zorbax XDB, gradiente acetonitrila: ácido fosfórico 0,02% e fluxo 1 mL/min.

Tabela 12. Avaliação de diferentes solventes na extração do resveratrol.

Solvente	Repetição	mAU.seg	Média	DP	CV
EtOH80%	1	526,4	512,1	18,7	3,7
	2	490,9			
	3	518,9			
MeOH:EtOH(80:20)	1	448,7	445,9	3,6	0,8
	2	447,2			
	3	441,8			
MeOH80%	1	527,2	495,1	34,5	7,0
	2	499,5			
	3	458,6			

**Limpeza do extrato.** A extração líquido-líquido (limpeza com hexano) apresentou melhor eficiência, com maior área do pico de resveratrol em relação ao procedimento de extração em fase sólida (limpeza com celite:alumina), sem diferir significativamente do extrato bruto, como está expresso na Tabela 13. A pureza dos picos foi monitorada pelo acompanhamento do perfil do espectro fornecido pelo detector de arranjo de fotodiodos (Figura 5).

A extração em fase sólida resultou em um extrato menos complexo, com menor grau de impureza detectada no início do cromatograma em CLAE (Figura 6); contudo, no processo, parte do resveratrol presente na amostra foi retido na fase sólida, resultando, na análise por CLAE, em as áreas de picos significativamente menores do que aquelas apresentadas no cromatograma do EEA bruto.

Assim, a extração líquido-líquido mostrou ser o processo mais adequado, pois além de reduzir o teor de interferentes que poderiam comprometer análise sem comprometer os resultados, foi também o mais prático e de menor custo.

As áreas médias do pico correspondente ao resveratrol nos cromatogramas da amostra tratada e do EEA bruto foram semelhantes 857,65 mAU.Sec e 857,53 mAU.Sec, respectivamente. O processo de extração líquido-líquido mostrou ser eficiente quanto à limpeza do extrato para injeção no CLAE, sem levar à perda de resveratrol, assim foi o método escolhido para este trabalho.

Tabela 13. Resultados do teste de purificação do extrato bruto de folhas de *Arachis hypogaea*

Tipo de purificação	Área (mAU.Sec)	Média	DP	CV
Partição com hexano	888,6	857,65 <sup>a</sup>	32,88	3,83
	883,0			
	824,1			
	834,9			
	607,7			
Filtração com mistura de alumina e celite	568,8	623,60 <sup>b</sup>	45,91	7,36
	642,1			
	675,8			
	842,8			
Amostra bruta	804,2	857,53 <sup>a</sup>	49,051	5,72
	861,2			
	921,9			

Letras diferentes na mesma coluna apresentam diferença significativa ao nível de 5 %, segundo teste de tukey.

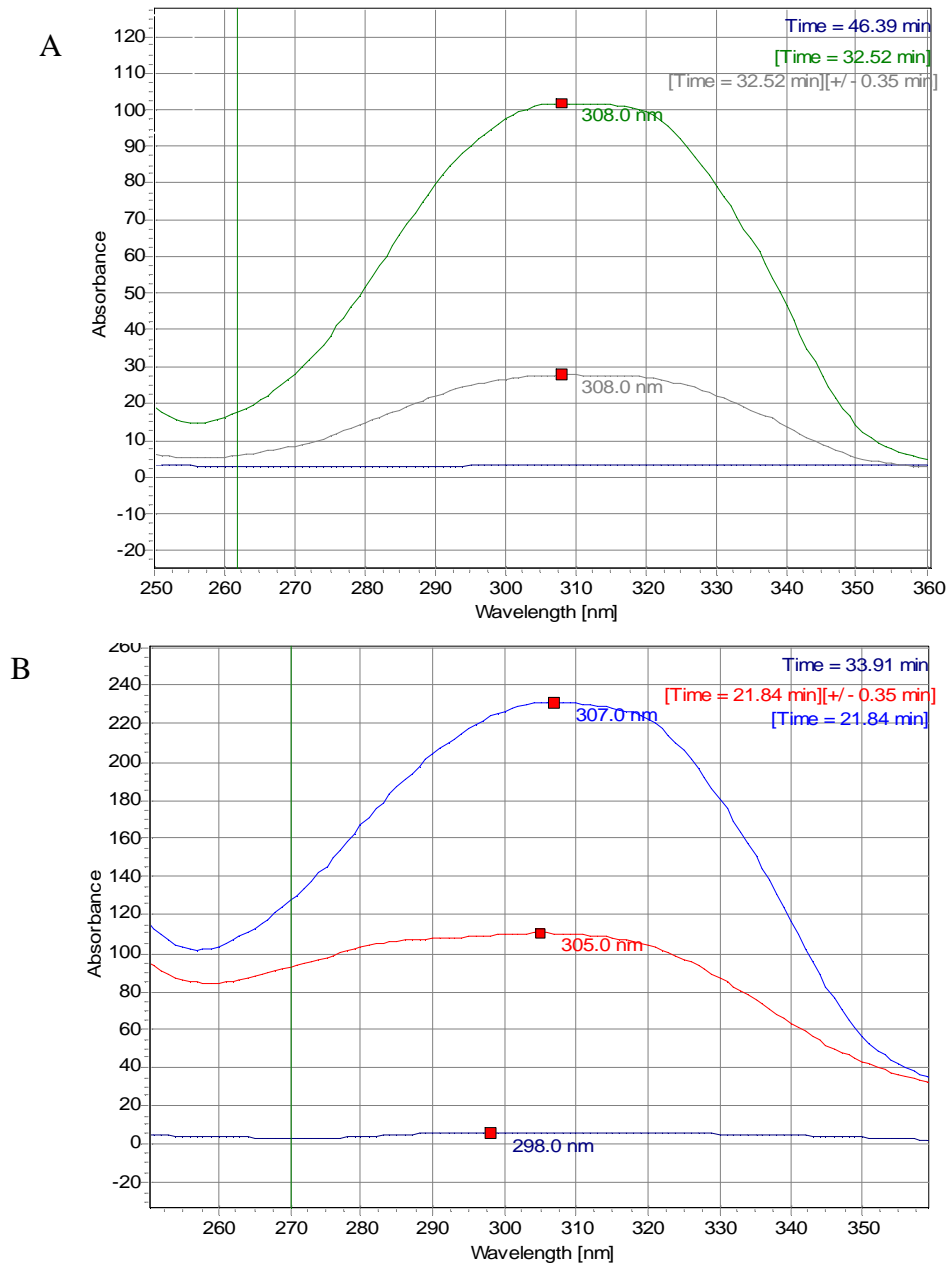


Figura 5. Perfil do espectro de ultravioleta (250 e 360nm) do pico do resveratrol no ápice ( $t_R = 32,52$  min) e na base ( $t_R = \pm 0,35$  min), A) em solução padrão e B) no extrato de folhas não induzidas, após extração líquido-líquido.

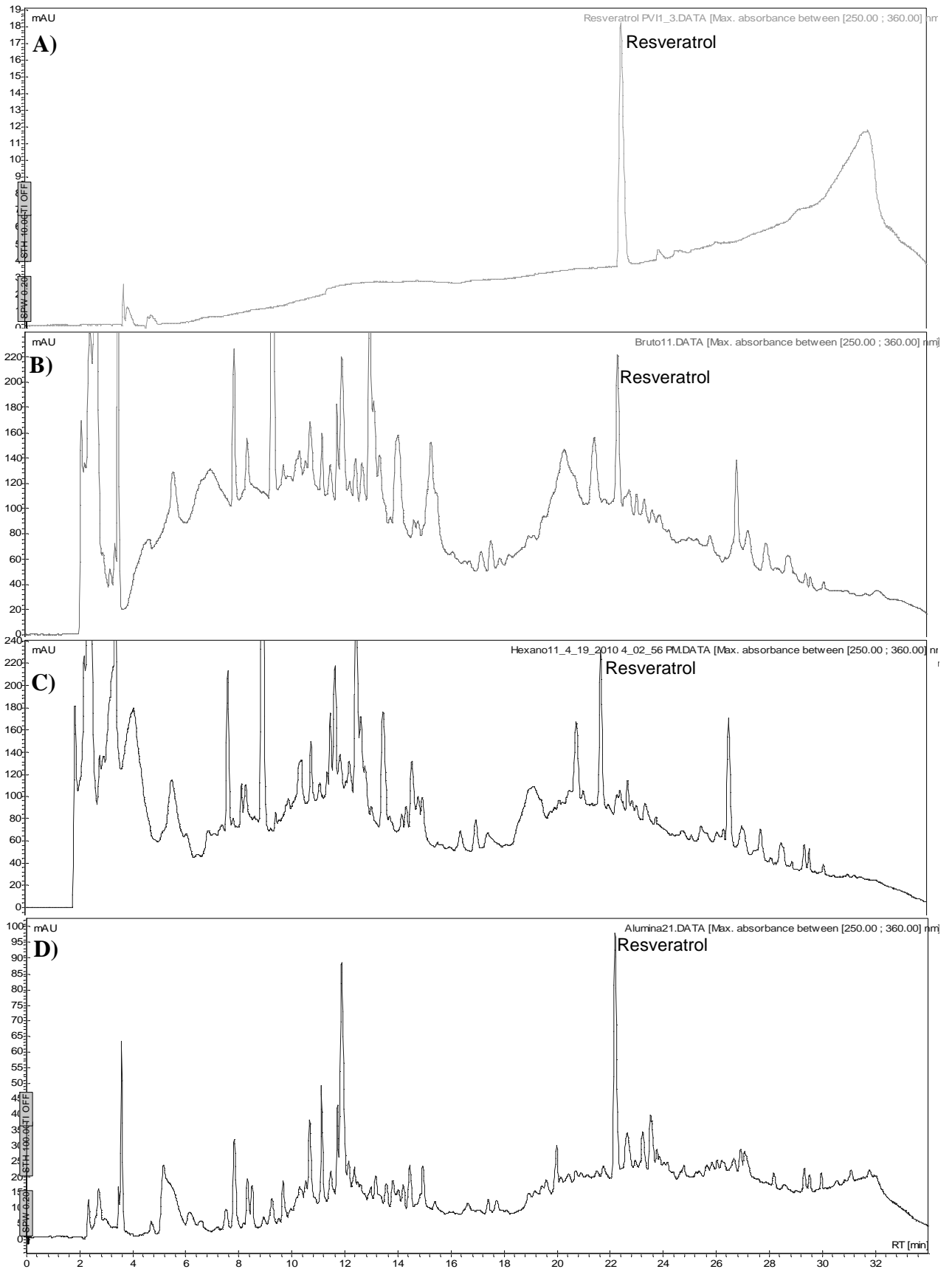


Figura 6. Cromatogramas do teste de purificação. A) padrão, B) extrato bruto, C) partição com hexano e D) mistura de alumina e celite. Resveratrol tR( aproximado) 22 min.Coluna Luna C18 (Phenomenex), gradiente acetonitrila: água e fluxo 1 mL/min.

**Perdas por aquecimento.** De acordo com a Tabela 14 e com os cálculos da fórmula mostrada na página 41, a análise dos cromatogramas obtidos de amostras submetidas a limpeza envolvendo aquecimento mostrou que processo resultou em perda de 6,2% da área do pico.

Tabela 14. Áreas do pico referente ao resveratrol nos cromatogramas do padrão normal e seco, considerando as diluições.

Amostra*	mAU.sec	Média	DP	CV
Padrão normal 1	1259,7			
Padrão normal 2	1204,9	1234,8	27,8	2,2
Padrão normal 3	1239,9			
Padrão seco 1	1144,2			
Padrão seco 2	1176,4	1158,3	16,5	1,4
Padrão seco 3	1154,2			

\*experimento em triplicata

**Análise por CLAE.** Durante o desenvolvimento do trabalho foram encontradas algumas dificuldades com relação à quantificação dos picos de resveratrol e de fenolftaleína, devido à dissociação dos mesmos. Embora os cromatogramas obtidos com a coluna Luna C18 250 x 4,6 mm 5 µm (Phenomenex) tenham apresentado picos simétricos no início do trabalho, com o uso da coluna e aumento do número de análises, os picos passaram a apresentar cauda indicativa de dissociação e adsorção na fase estacionária, conforme Figura 7.

A análise por CLAE utilizando coluna C18 Zorbax XDB Agilent (250 mm x 4,6 mm, 5 µm), também forneceu cromatogramas com picos bem definidos nas primeiras injeções. Com o andamento das análises, conforme mostrado na Figura 8, os cromatogramas mostraram picos que apresentaram ombros, indicando uma possível dissociação do resveratrol.

Na busca da resolução do problema, foram feitas alterações nas condições de análise, a saber:

- Alteração da fase móvel:
  - 1) substituição da solução de ácido fosfórico 0,02 % por a) solução de ácido acético 0,1%; b) solução de ácido acético 1%; c) solução de ácido fórmico 0,1% ;

2) substituição da acetonitrila por: a) mistura acetonitrila com 0,05 % de trietilamina; b) metanol (grau CLAE);

3) substituição do método utilizando gradiente por método isocrático utilizando com fase móvel ácido fórmico (solução 1%):Acetonitrila:isopropanol (70:22:8);

Todas as tentativas de alteração das condições de análise citadas acima mostraram ser ineficazes.

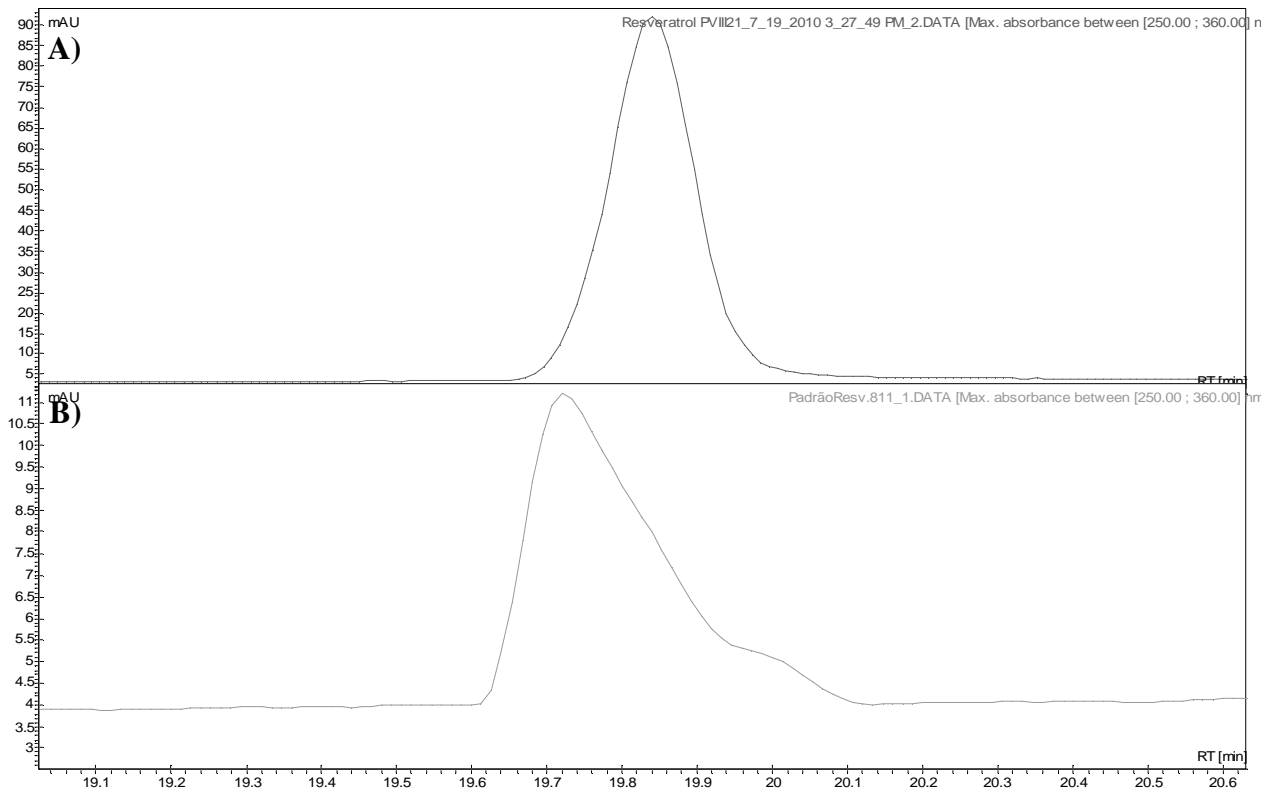


Figura 7. Expansão dos cromatogramas obtidos com a coluna Luna C18 250 x 4,6 mm 5  $\mu$ m (Phenomenex), gradiente Acetonitrila:água, tR 19,75 min (diferente da figura 6, pois houve diminuição da concentração de acetonitrila entre 19 e 22 min), mostrando os picos referentes ao resveratrol A) primeiras injeções de resveratrol, B) injeções subsequentes.



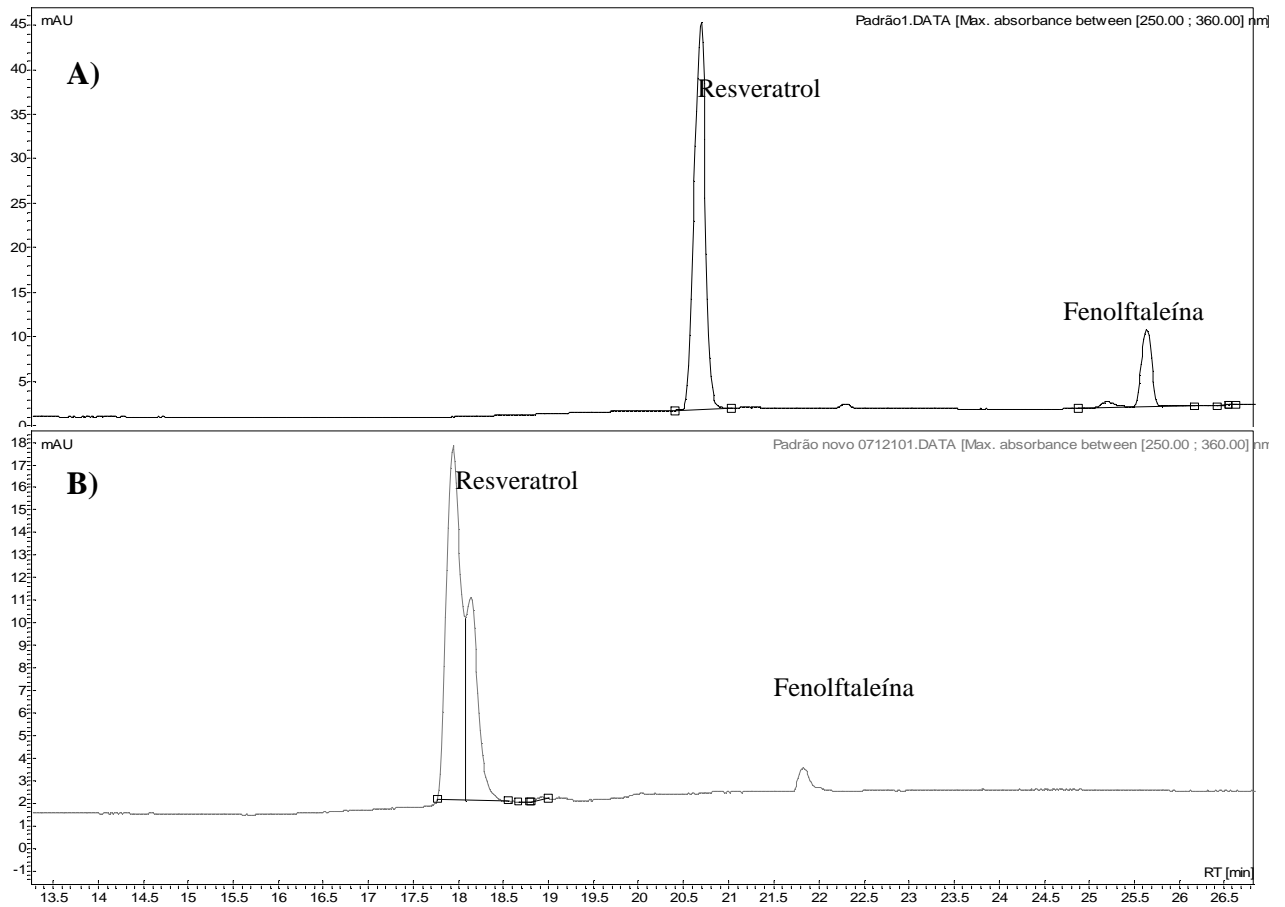


Figura 8. Cromatogramas referentes à análise do padrão de resveratrol em coluna C18 Zorbax XDB Agilent (250 mm x 4,6 mm, 5  $\mu$ m). A) 1º dia de injeção (tR 20,3 min, fluxo 1mL/min), B) 2º dia de injeção (tR 17,8 min, fluxo 1,5 mL/min), mesmas condições do dia anterior, com exceção do fluxo.

Ainda no sentido de resolver o problema da perda de resolução do pico referente ao resveratrol, foi avaliada a condição de análise na qual foi utilizada a coluna Zorbax XDB Agilent (250 mm x 4,6 mm, 5  $\mu$ m), sem a coluna de guarda, empregando acetonitrila:ácido fosfórico 0,02%, com o gradiente de eluição (acetonitrila) 0 min, 13 %; 6-9 min, 15 %; 17 min, 17 %; 28-33 min, 28%; 40 min, 50 %; 45 min, 60 %; 46-48 min, 80%; 49-54 min, 13 %. Volume de injeção: 10  $\mu$ L.

Nestas condições os cromatogramas apresentaram picos bem definidos. Assim, as condições expressas acima foram utilizadas neste trabalho.

**Linearidade.** A faixa linear para quantificação do resveratrol permaneceu entre 5,75 e 217,6  $\mu\text{g/mL}$  (Figura 9 e 10), apresentando um coeficiente de correlação igual a 0,9998 ( $y = 45,56x + 24,52$ ).

A faixa linear para quantificação do padrão interno, fenolftaleína, permaneceu entre 146,5 e 2352,0  $\mu\text{g/mL}$  (Figura 11 e 12), apresentando um coeficiente de correlação igual a 0,999 ( $y = 4,87x + 457,91$ ).

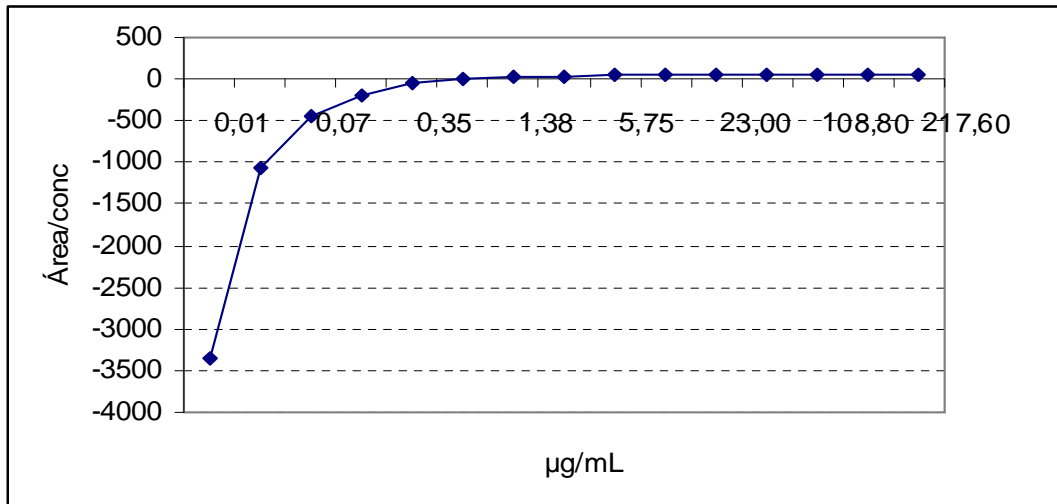


Figura 9. Gráfico de linearidade do resveratrol

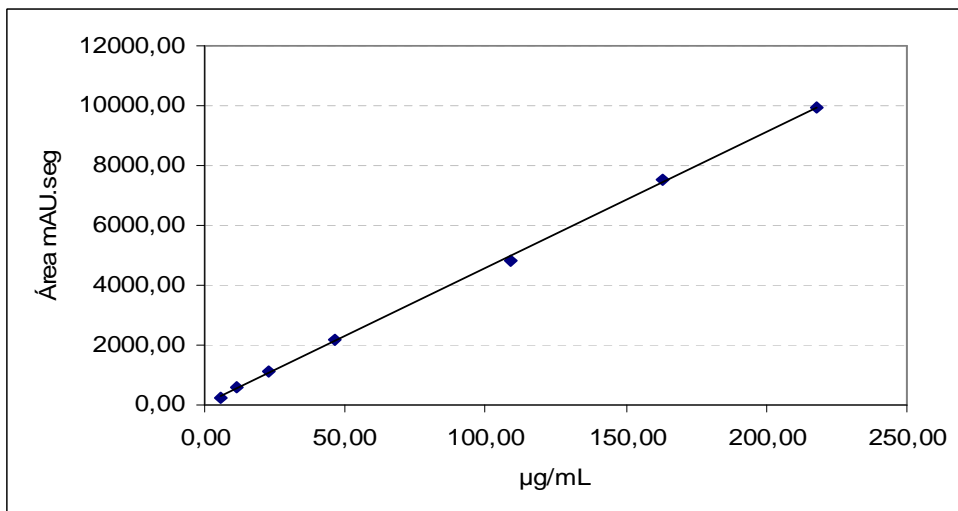


Figura 10. Curva de calibração do resveratrol na faixa linear

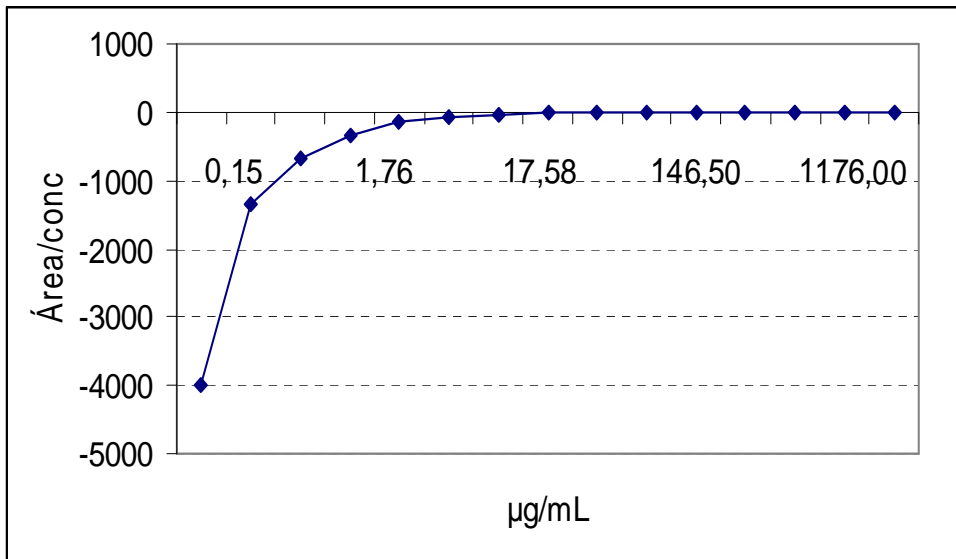


Figura 11. Gráfico de linearidade da fenolftaleína

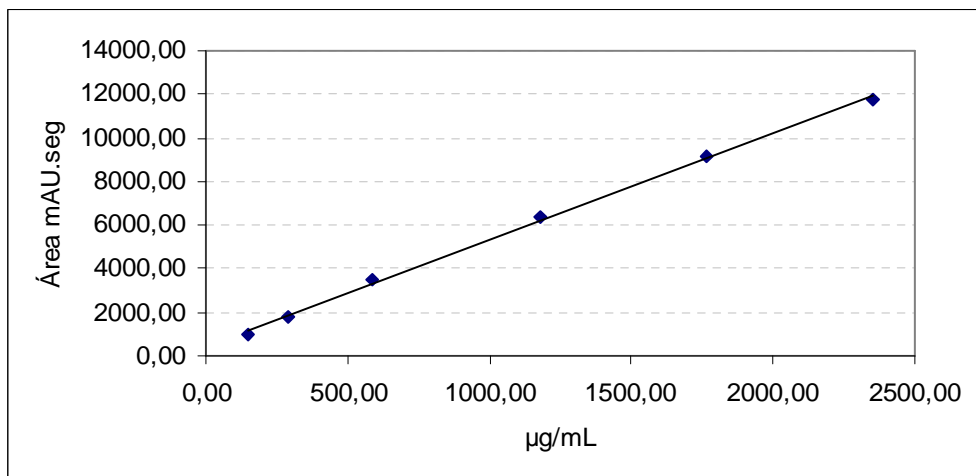


Figura 12. Curva de calibração da fenolftaleína na faixa linear

**Repetibilidade.** Os coeficientes de variação após 10 injeções de *trans*-resveratrol (23 µg/mL) e de fenolftaleína (292,7 µg/mL), em concentrações próximas aquelas observadas para as amostras induzidas, foram de 1,19 e 1,64 %, respectivamente.

**Limite de detecção e limite de quantificação.** O limite de detecção, calculado automaticamente no CLAE foi de 0,03 µg/mL. O limite de quantificação calculado a partir da curva de calibração foi de 5,75 µg/mL.

**CAPÍTULO 4 – DETERMINAÇÃO DE RESVERATROL EM ESPÉCIES  
SILVESTRES DE *ARACHIS* sp.**

#### 4.1 MATERIAIS E METODOS

**Material vegetal.** As folhas de 10 espécies silvestres de *Arachis* (*A. cruziana*, *A. kuhlmannii*, *A. magna*, *A. cardenasii*, *A. duranensis*, *A. ipaënsis*, *A. batizocoi*, *A. gregoryii*, *A. simpsonii* e *A. kempff-mercadoi*) com indução ultravioleta (teste) e sem indução ultravioleta (controle) foram caracterizadas, em três blocos, com relação ao teor de resveratrol, usando metodologia por CLAE padronizada neste trabalho. *Arachis hypogaea* foi utilizada como referência.

**Análise de dados.** Primeiramente, a expressão média de resveratrol foi comparada entre os tratamentos UV e controle através do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, considerando que não foi possível encontrar uma distribuição probabilística capaz de acomodar a variabilidade presente nos dados. Em seguida, para o tratamento UV, foi avaliado o efeito dos três blocos experimentais quanto à expressão do resveratrol. Uma vez detectada que a expressão média de resveratrol não diferia entre os blocos, os três blocos foram reunidos e foi aplicada a análise de clusters (método UPGMA) para agrupar as espécies quanto à similaridade em relação à expressão de resveratrol. Devido à assimetria da distribuição dos dados, os genomas A, B e Bk foram comparados quanto à expressão média através da distribuição Gama, considerando o nível de 5 % de significância estatística. O software estatístico adotado nas análises foi o programa de linguagem estatística R, livre para download no sitio <http://www.r-project.org/> (122).

#### 4.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

**Tratamentos.** Todas as espécies de *Arachis* estudadas responderam positivamente ao processo de indução de resveratrol e apresentaram teores elevados deste composto após o tratamento com UV; as amostras controle, ou seja, não submetidas ao tratamento com luz UV, apresentaram baixos teores de resveratrol (Tabela. 15).

Por meio do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, foi possível concluir que houve influência do tratamento UV sobre a expressão média de resveratrol para

todas as espécies do estudo, uma vez que a média deste diferiu ao nível de significância de 5% do controle.

A Tabela 16 mostra as estatísticas descritivas para o experimento e nas Figuras 13 a 23 são apresentados os cromatogramas das amostras controle e induzidas, além do perfil do espectro do pico do resveratrol.

Tabela 15. Teores de resveratrol nas espécies de *Arachis* em amostras controle e induzidas com UV.

Espécie	Tratamento	BLOCO 1				BLOCO 2				BLOCO 3			
		µg/g	Média	DP	CV	µg/g	Média	DP	CV	µg/g	Média	DP	CV
<i>A. cruziana</i>	UV	531,6				402,0				909,7			
		472,8	477,9	51,4	10,8	389,0	437,3	72,7	16,6	NA	886,0	33,6	3,8
		429,2				520,9				862,2			
	controle	traços				traços				traços			
		traços				traços				traços			
		traços				traços				traços			
<i>A. kuhlmanii</i>	UV	1028,5				441,6				831,2			
		980,3	947,6	101,2	10,7	676,4	639,1	181,8	28,4	940,8	839,5	97,4	11,6
		834,1				799,3				746,6			
	controle	traços				traços				56,7			
		50,3	37,7	15,8	41,9	traços				63,2	59,5	3,4	5,6
		42,7				NA				58,6			
<i>A. cardenasii</i>	UV	676,5				668,0				492,8			
		727,2	751,4	89,5	11,9	706,7	633,0	96,1	15,2	609,3	541,2	60,7	11,2
		850,6				524,3				521,5			
	controle	25,3				traços				27,0			
		32,8	29,1	3,8	12,9	traços				26,3	25,5	2,1	8,1
		29,1				traços				23,1			
<i>A. duranensis</i>	UV	601,1				904,1				432,0			
		786,4	721,7	104,6	14,5	801,1	836,1	58,9	7,0	309,8	362,0	63,0	17,4
		777,6				803,0				344,2			
	controle	traços				39,1				traços			
		traços				35,8	34,9	4,8	13,7	traços			
		traços				29,7				traços			
<i>A. ipaënses</i>	UV	262,7				439,7				274,0			
		251,1	256,9	8,2	3,2	432,4	380,8	95,8	25,2	304,4	285,5	16,5	5,8
		NA				270,2				278,0			
	controle	13,7				traços				traços			
		15,0	15,4	1,9	12,4	traços				traços			
		17,4				traços				traços			
<i>A. batizacoi</i>	UV	642,7				550,5				427,7			
		473,4	586,7	98,2	16,7	727,9	602,7	108,9	18,1	325,1	384,2	53,0	13,8
		644,1				529,8				399,7			
	controle	traços				traços				traços			
		traços				traços				traços			
		traços				traços				traços			



Tabela 16. Média  $\pm$  desvio da concentração ( $\mu\text{g/g}$ ) de resveratrol de cada espécie do gênero *Arachis* por tratamento.

<b>Espécie</b>	<b>Controle</b>	<b>UV</b>
<i>A.batizocoi</i>	5,48 $\pm$ 4,4 <sup>a</sup>	524,54 $\pm$ 131,1 <sup>b</sup>
<i>A.cardenasii</i>	18,18 $\pm$ 13,8 <sup>a</sup>	752,24 $\pm$ 305,4 <sup>b</sup>
<i>A.cruziana</i>	4,92 $\pm$ 4,7 <sup>a</sup>	564,67 $\pm$ 205,1 <sup>b</sup>
<i>A.duranensis</i>	16,35 $\pm$ 14,5 <sup>a</sup>	639,93 $\pm$ 224,7 <sup>b</sup>
<i>A.gregoryii</i>	2,97 $\pm$ 1,5 <sup>a</sup>	370,14 $\pm$ 103,7 <sup>b</sup>
<i>A.hypogaea</i>	6,68 $\pm$ 4,8 <sup>a</sup>	704,10 $\pm$ 270,3 <sup>b</sup>
<i>A.ipaensis</i>	9,48 $\pm$ 6,6 <sup>a</sup>	314,07 $\pm$ 76,8 <sup>b</sup>
<i>A.kempff-mercadoi</i>	9,04 $\pm$ 8,8 <sup>a</sup>	299,49 $\pm$ 89,1 <sup>b</sup>
<i>A.kuhlmannii</i>	37,09 $\pm$ 25 <sup>a</sup>	808,75 $\pm$ 177,6 <sup>b</sup>
<i>A.magna</i>	25,16 $\pm$ 18,6 <sup>a</sup>	484,77 $\pm$ 167,8 <sup>b</sup>
<i>A.simpsonii</i>	7,73 $\pm$ 4,1 <sup>a</sup>	318,37 $\pm$ 146,9 <sup>b</sup>

\*Médias seguidas de letras iguais nas colunas, não diferem ao nível de 5% de significância, segundo o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis.



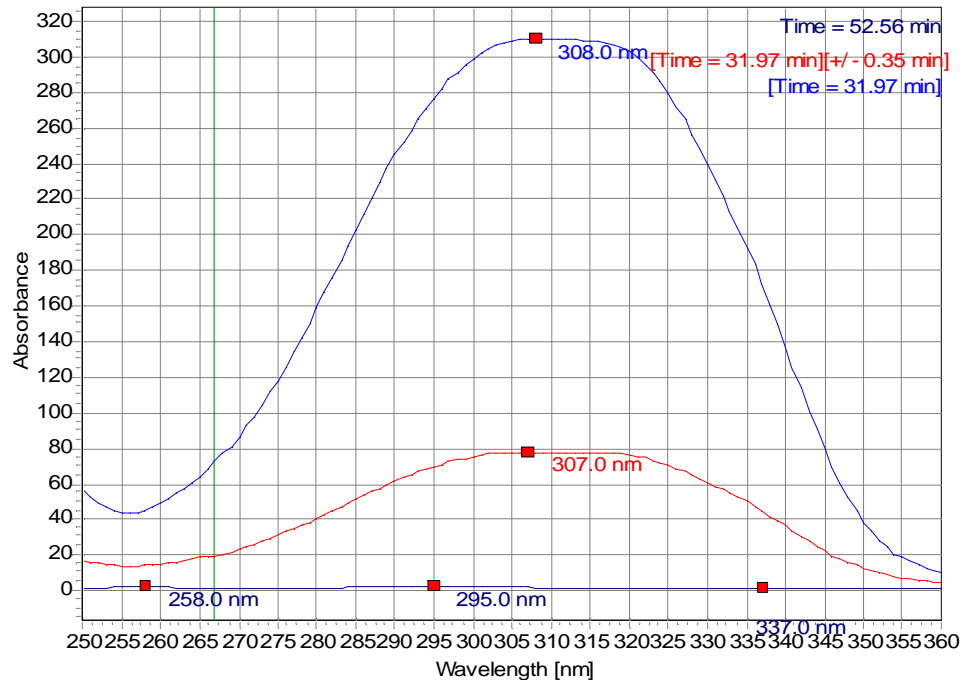
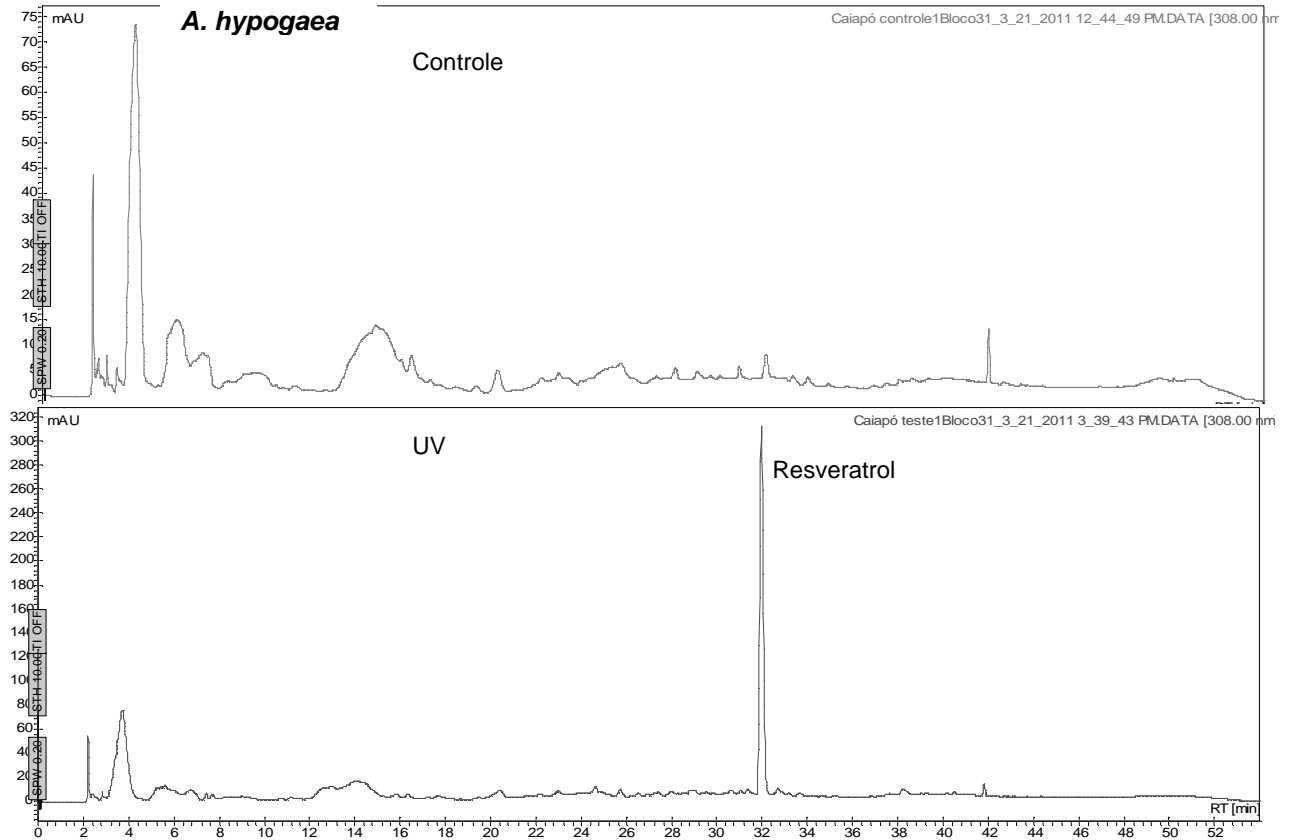


Figura 13 . Cromatogramas de *A. hypogaea* e perfil do espectro, fornecido pelo detector de arranjo de fotodiodos (250-360 nm) no ápice ( $t_R = 31.97$  min) e na base do pico referente ao resveratrol na amostra induzida. A pureza do pico referente ao resveratrol foi de 99,5%.

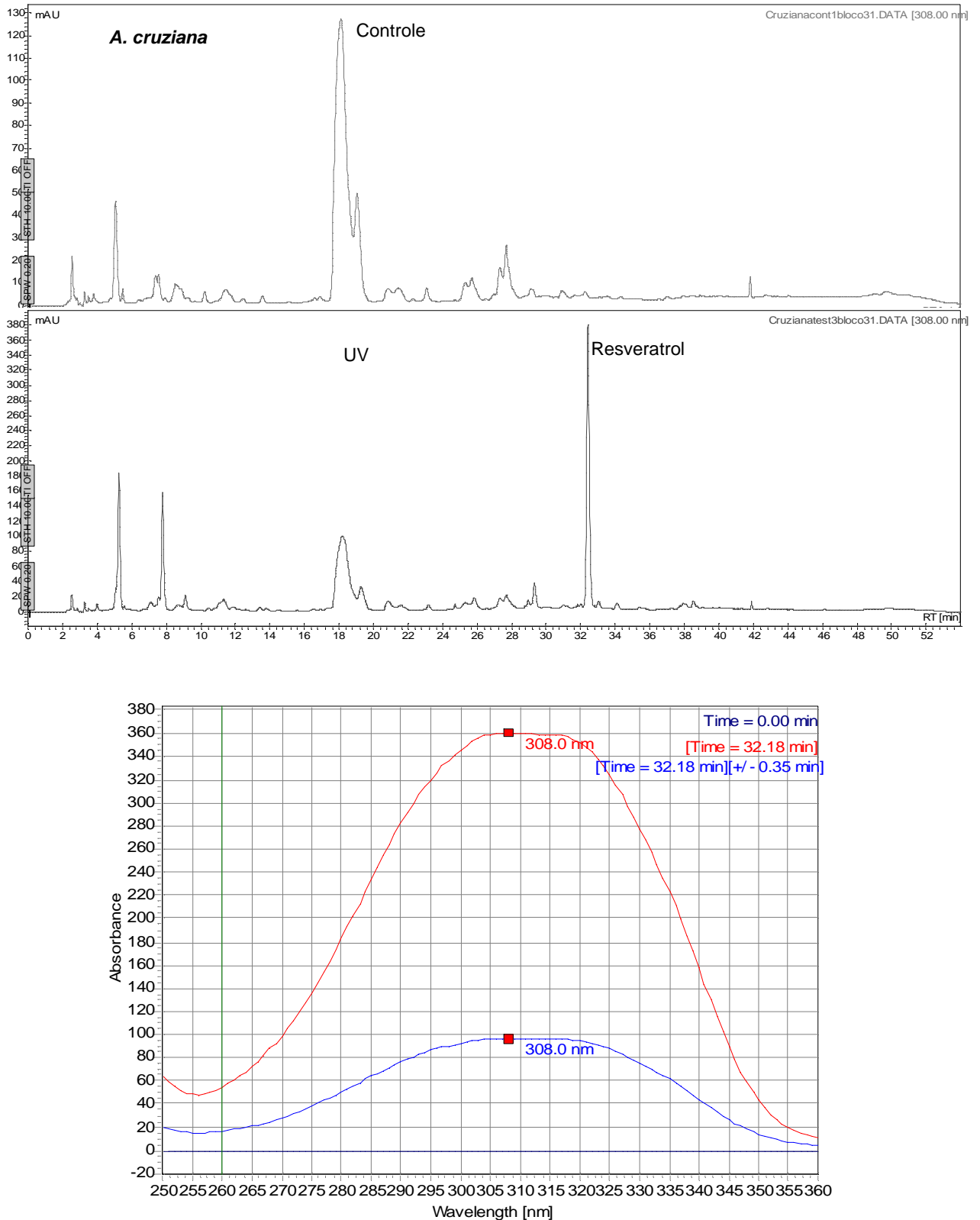


Figura 14. Cromatogramas de *Arachis cruziana* e perfil do espectro, fornecido pelo detector de arranjo de fotodiodos (250-360 nm) no ápice (tR = 32.18 min) e na base do pico referente ao resveratrol na amostra induzida. A pureza do pico referente ao resveratrol foi de 95%.

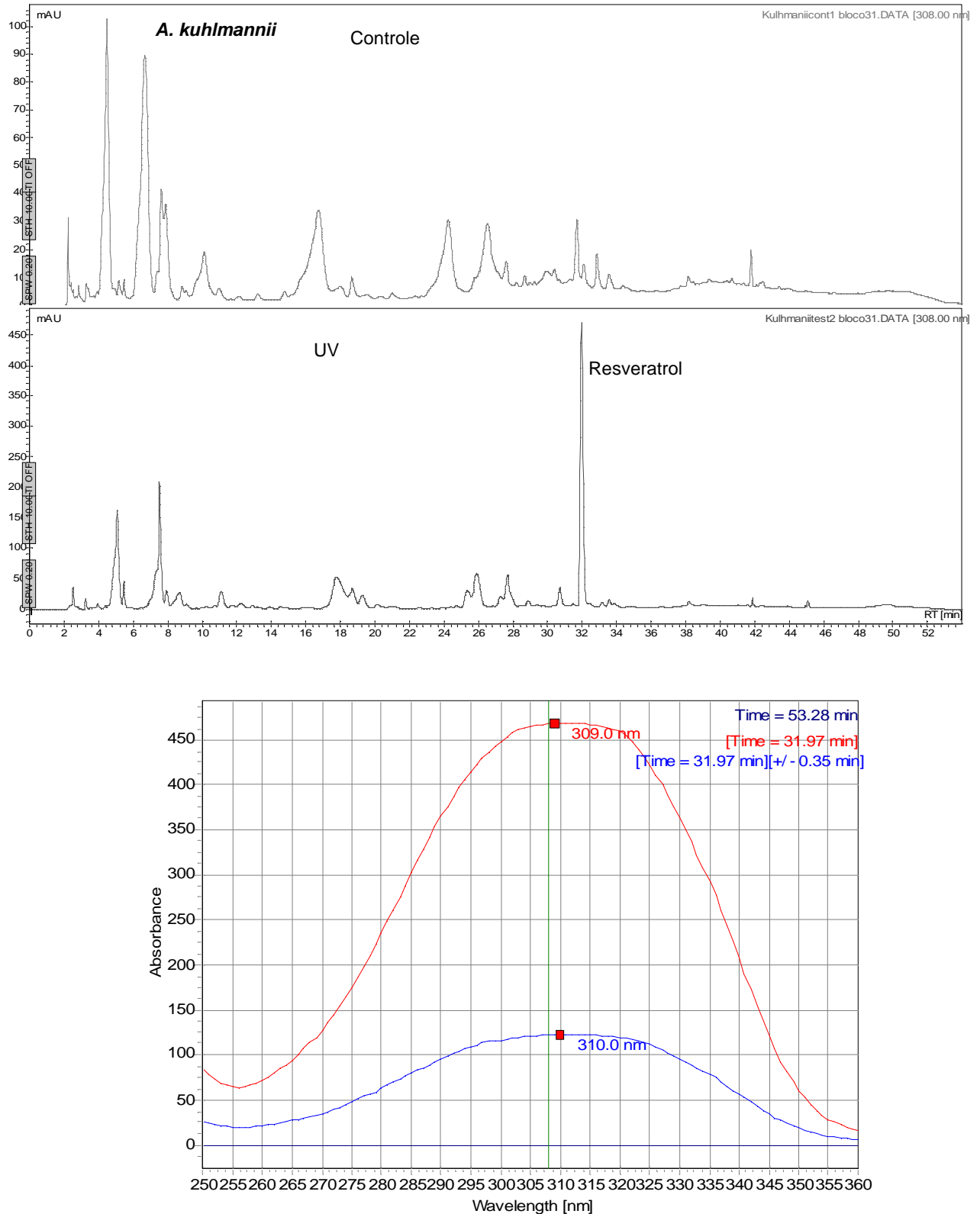


Figura 15. Cromatogramas de *Arachis kuhlmannii* e perfil do espectro, fornecido pelo detector de arranjo de fotodiodos (250-360 nm) no ápice (tR = 31,97min) e na base, do pico referente ao resveratrol na amostra induzida. A pureza do pico foi 92,0%.

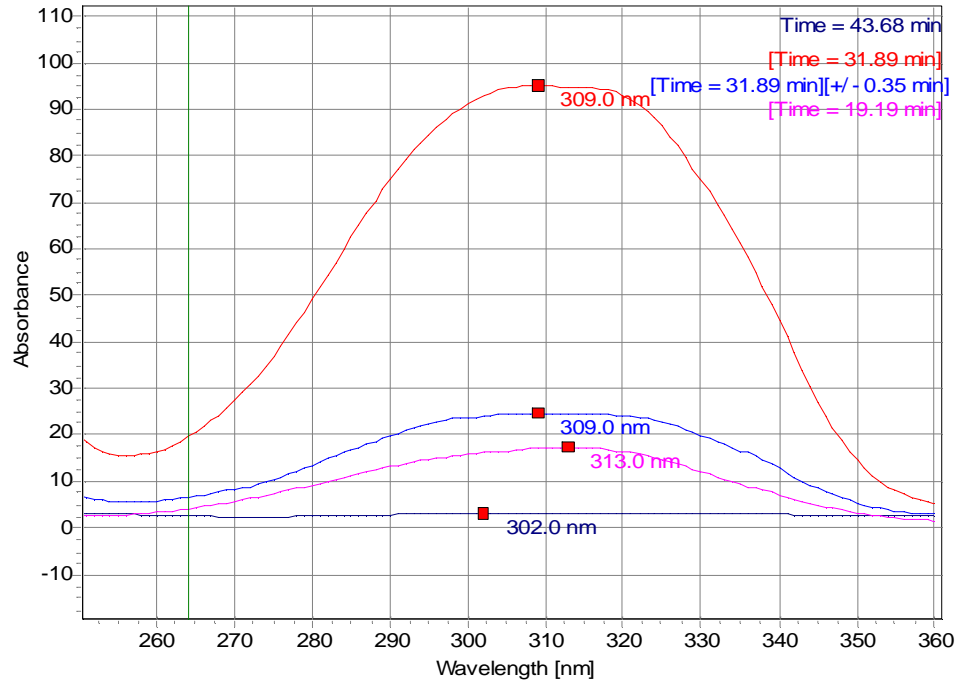
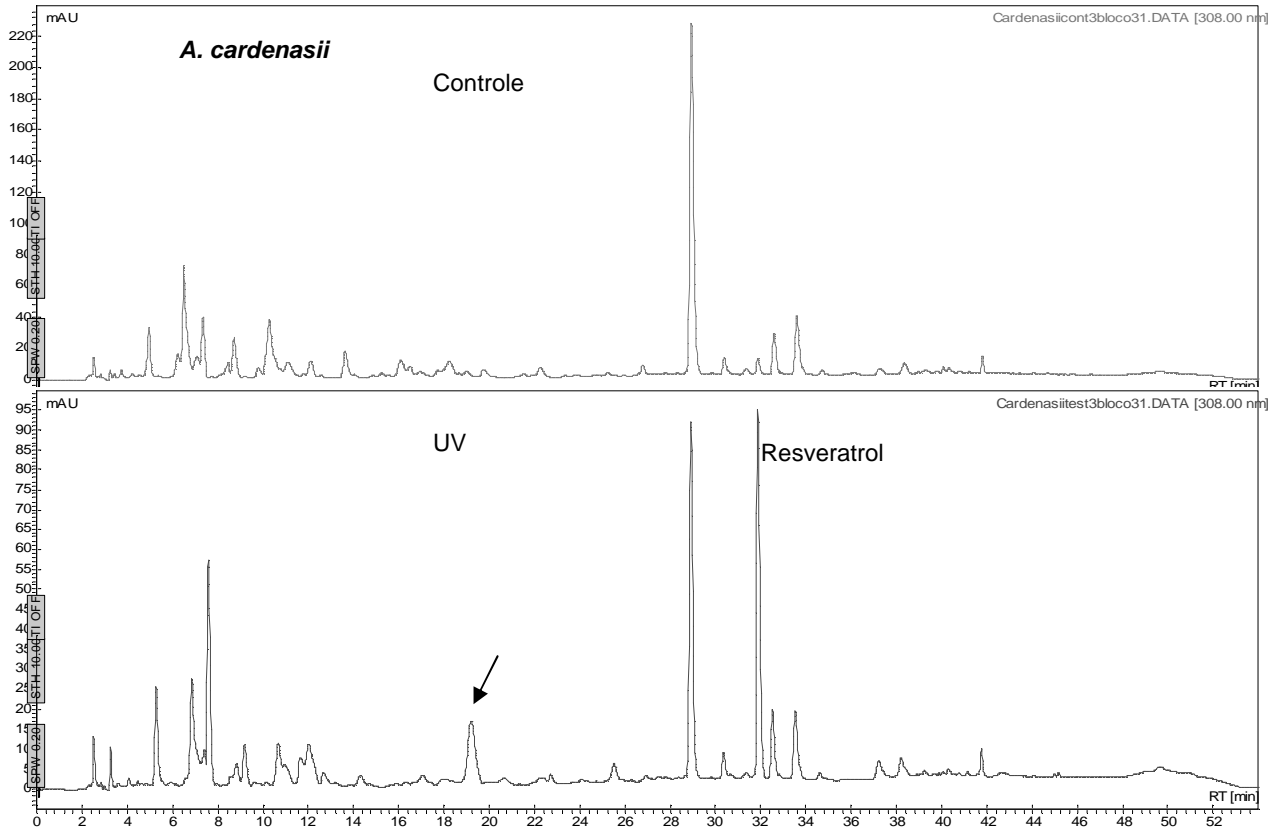


Figura 16. Cromatogramas de *Arachis cardenasii* com perfil do espectro, fornecido pelo detector de arranjo de fotodiodos (250-360 nm,) no ápice ( $t_R = 31,89$  min) e na base do pico referente ao resveratrol na amostra induzida. A seta indica composto não identificados (NI), eluídos com  $t_R$  10,92 min e com  $\lambda_{max}$  em 313 nm que apareceu após o processo de indução. A pureza do pico foi 98,7%.

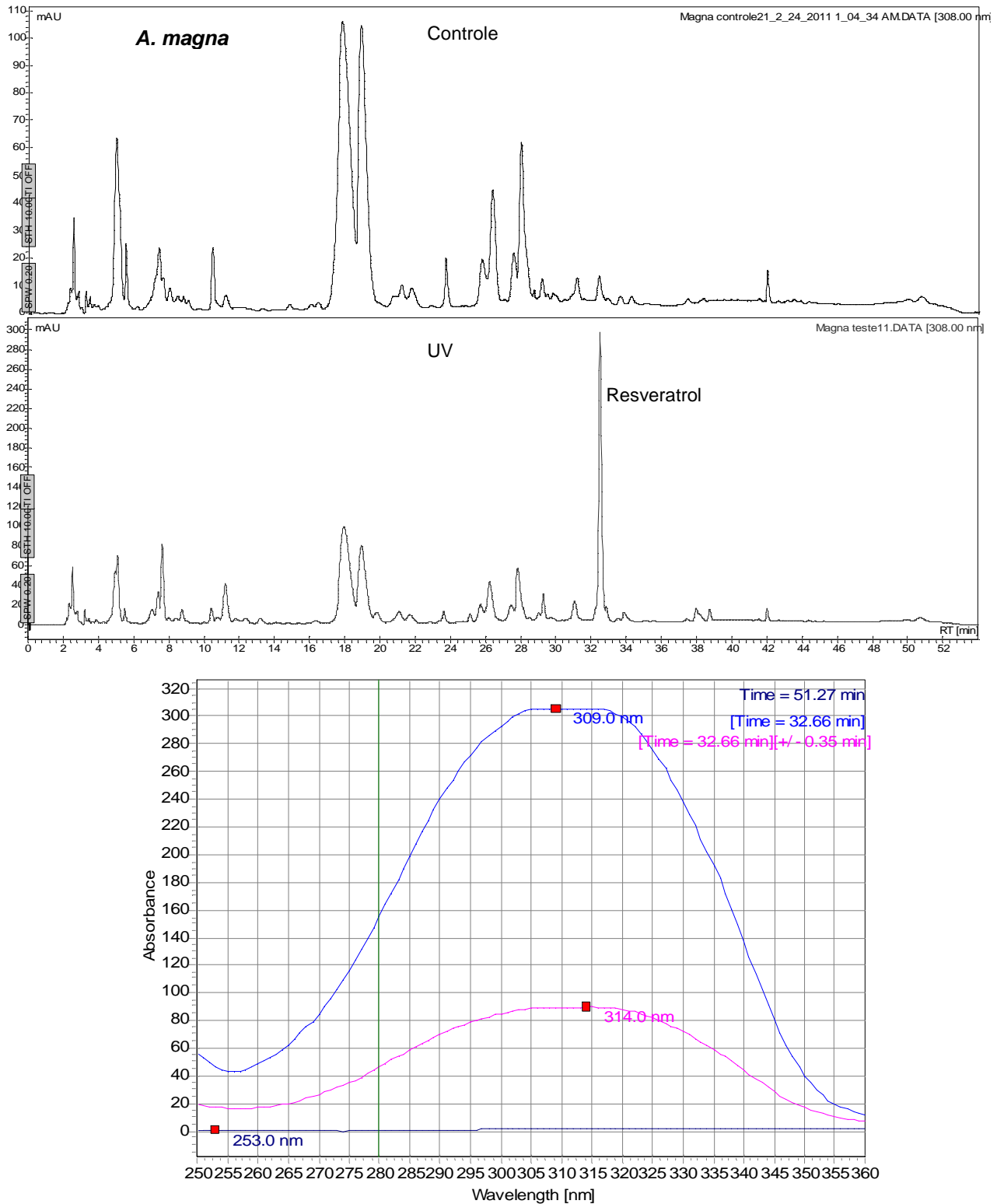


Figura 17. Cromatogramas de *Arachis magna* e perfil do espectro, fornecido pelo detector de arranjo de fotodiodos (250-360 nm) no ápice ( $t_R = 32,66$  min) e na base, do pico referente ao resveratrol na amostra induzida. A pureza do pico foi 95,6%.

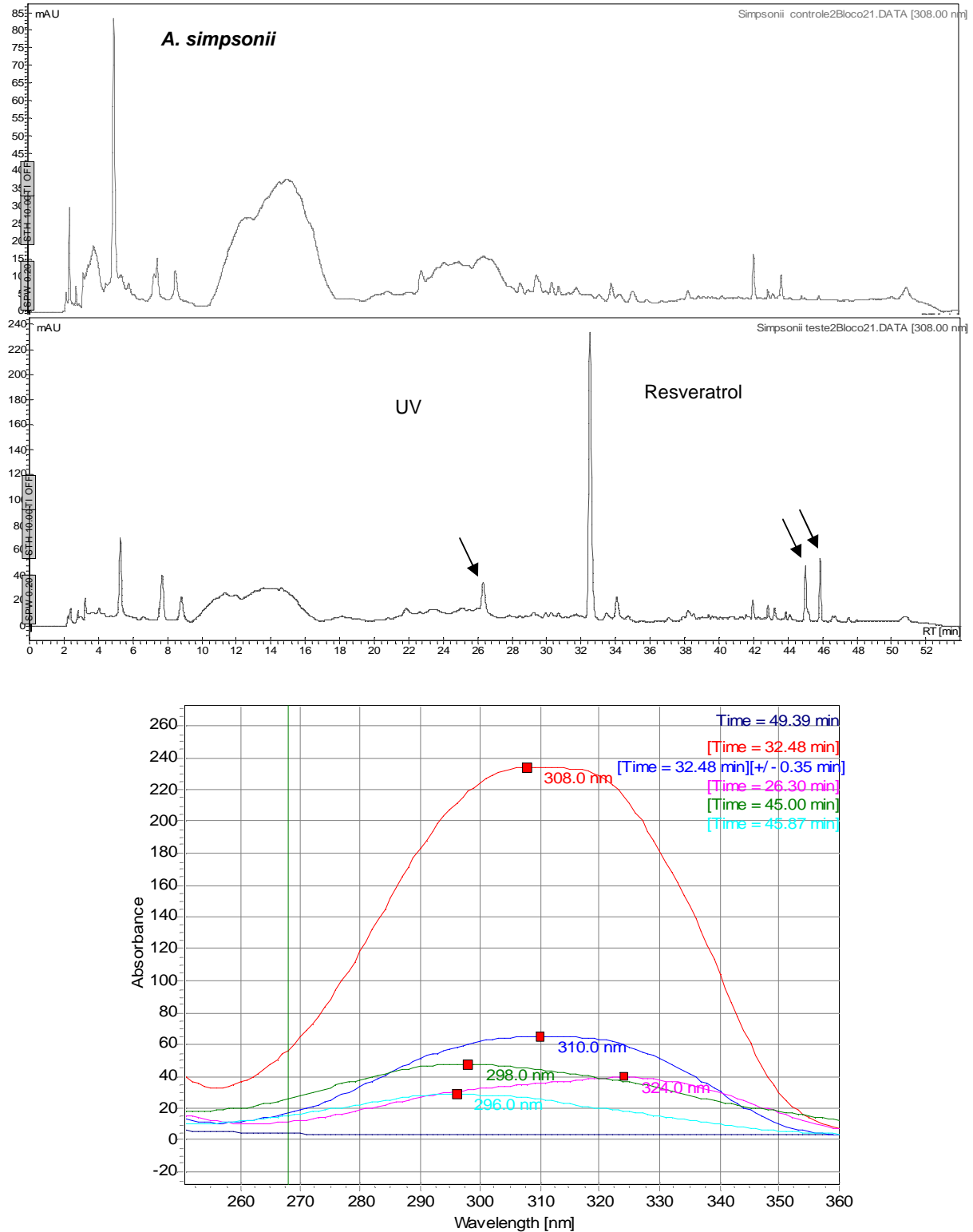


Figura 18. Cromatogramas de *Arachis simpsonii* com perfil do espectro, fornecido pelo detector de arranjo de fotodiodos (250-360 nm), no ápice ( $t_R = 32,48$  min) e na base do pico referente ao resveratrol na amostra induzida. A seta indica compostos não identificados (NI), ( $t_R = 26,30$  min,  $\lambda_{max}$  324 nm;  $t_R = 45$  min,  $\lambda_{max}$  298 nm;  $t_R = 45,87$  min,  $\lambda_{max}$  296nm ) que apareceram após o processo de indução. A pureza do pico foi 98,1%.

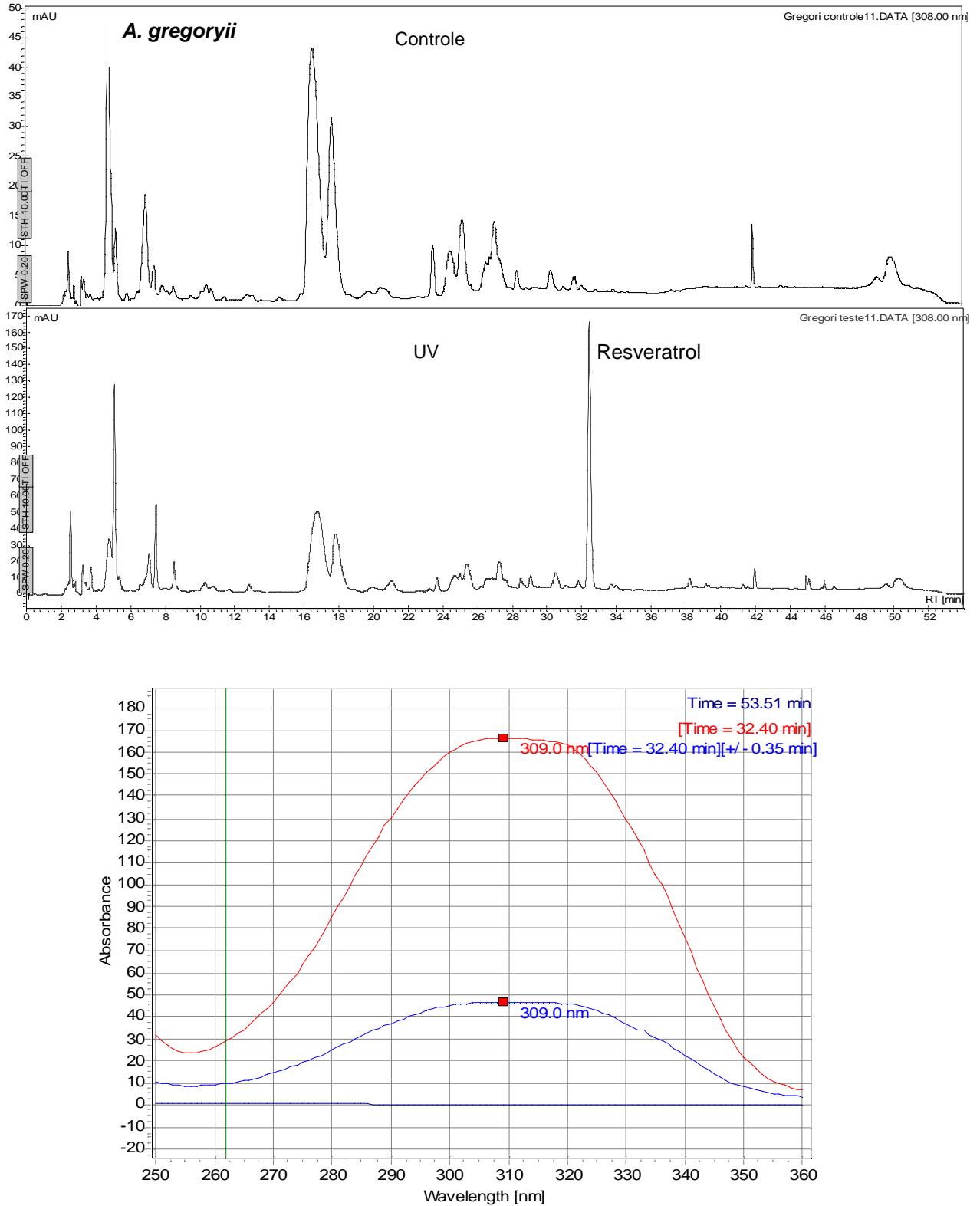


Figura 19. Cromatogramas de *Arachis gregoryii* e perfil do espectro fornecido pelo detector de arranjo de fotodiodos (250-360 nm), no ápice (tR = 32,40 min) e na base do pico referente ao resveratrol na amostra induzida. A pureza foi 99%.

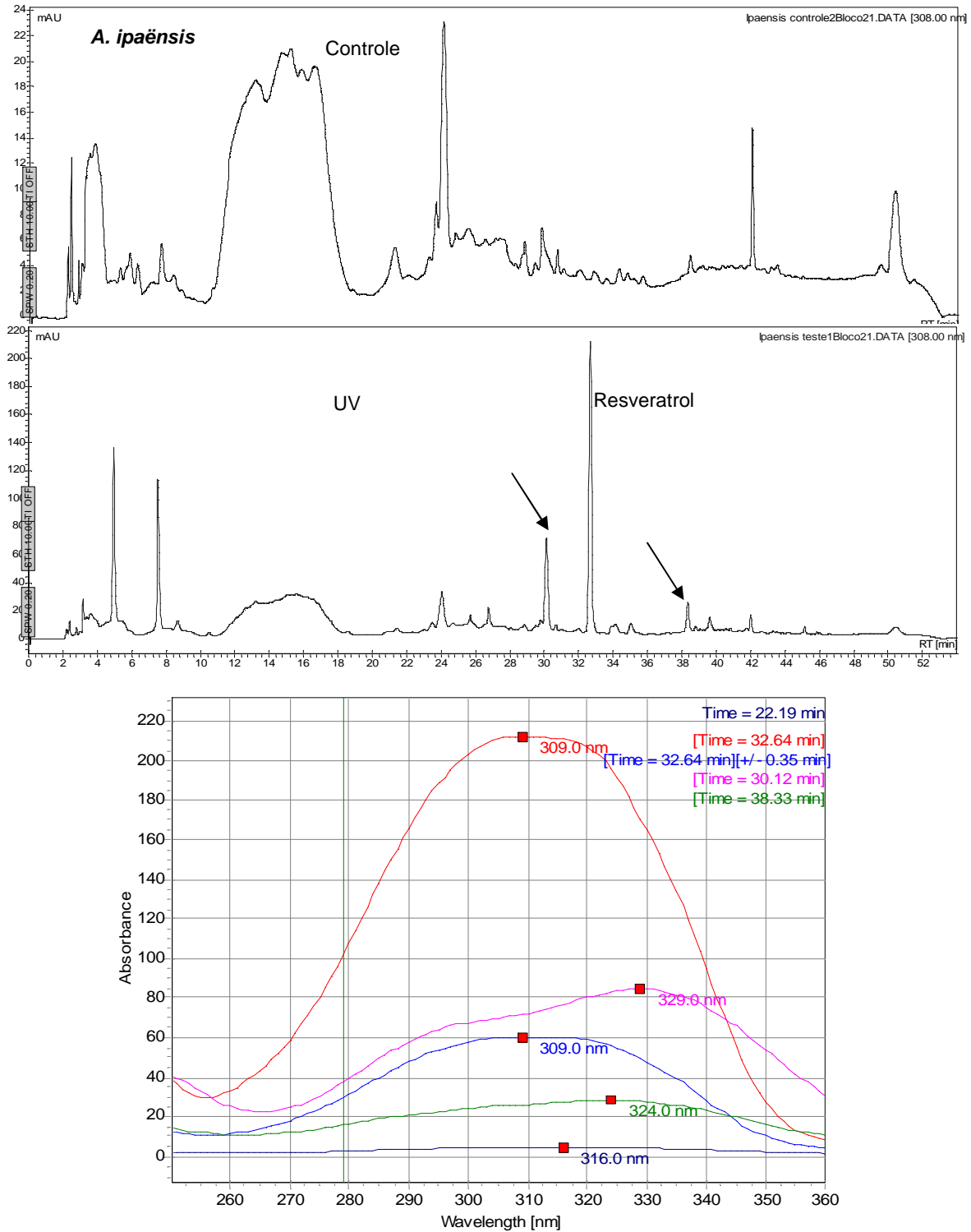


Figura 20. Cromatogramas de *Arachis ipaënsis* e perfil do espectro, fornecido pelo detector de arranjo de fotodiodos (250-360 nm), no ápice ( $t_R = 32,64$  min) e na base do pico referente ao resveratrol na amostra induzida.. A seta indica compostos não identificados (NI) ( $t_R = 30,12$  min,  $\lambda_{max}$  329 nm;  $t_R = 38,33$  min,  $\lambda_{max}$  324 nm) que apareceram após o processo de indução. A pureza do pico foi 98,8%.



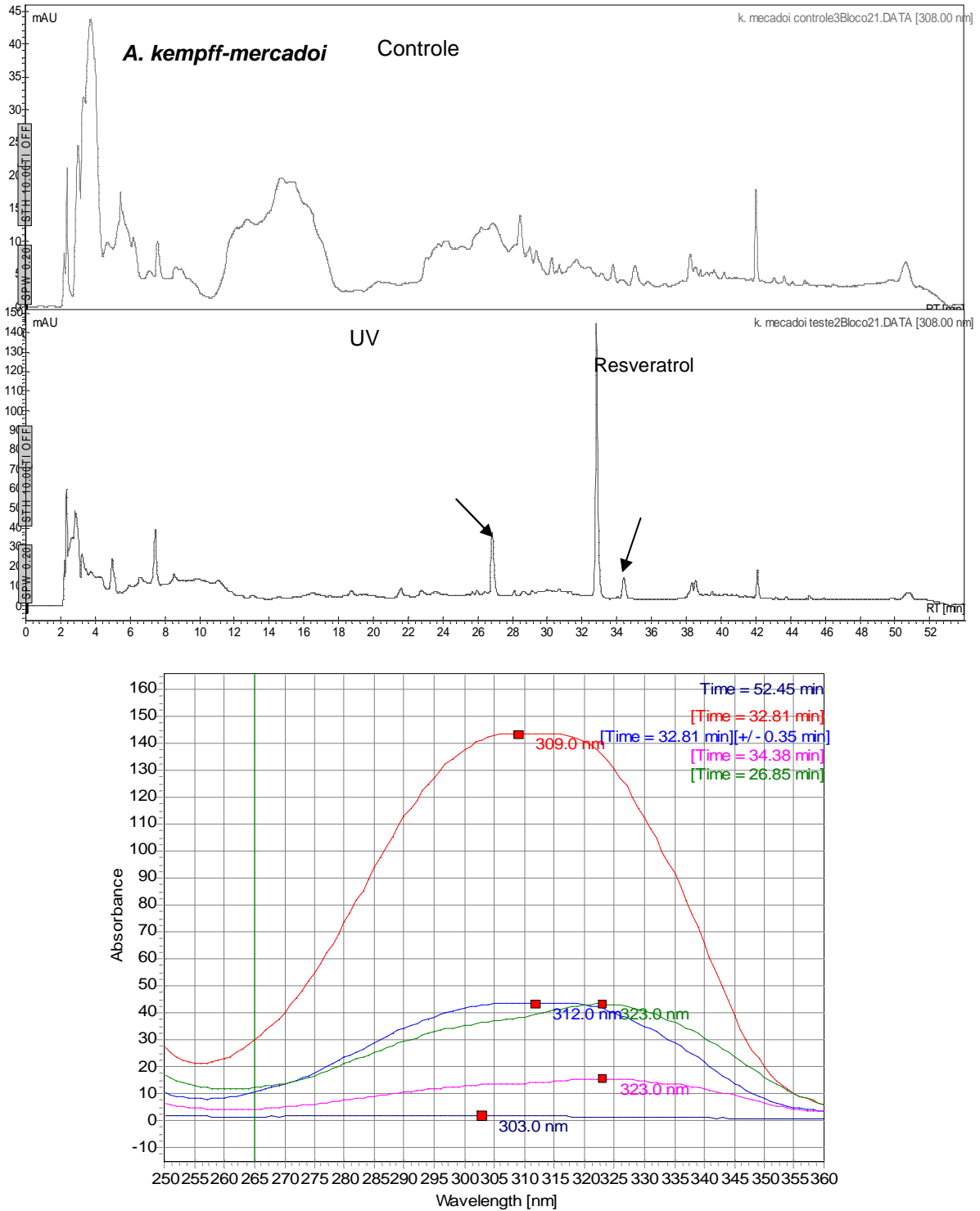


Figura 21. Cromatogramas de *Arachis kempff-mercadoi* com perfil do espectro, fornecido pelo detector de arranjo de fotodiodos (250-360 nm), no ápice ( $t_R = 32,81$  min) e na base do pico referente ao resveratrol na amostra induzida. A seta indica compostos não identificados (NI), ( $t_R = 26,85$  min,  $\lambda_{max}$  323 nm;  $t_R = 34,38$  min  $\lambda_{max}$  323nm) que apareceram após o processo de indução. A pureza do pico foi 97,0%.

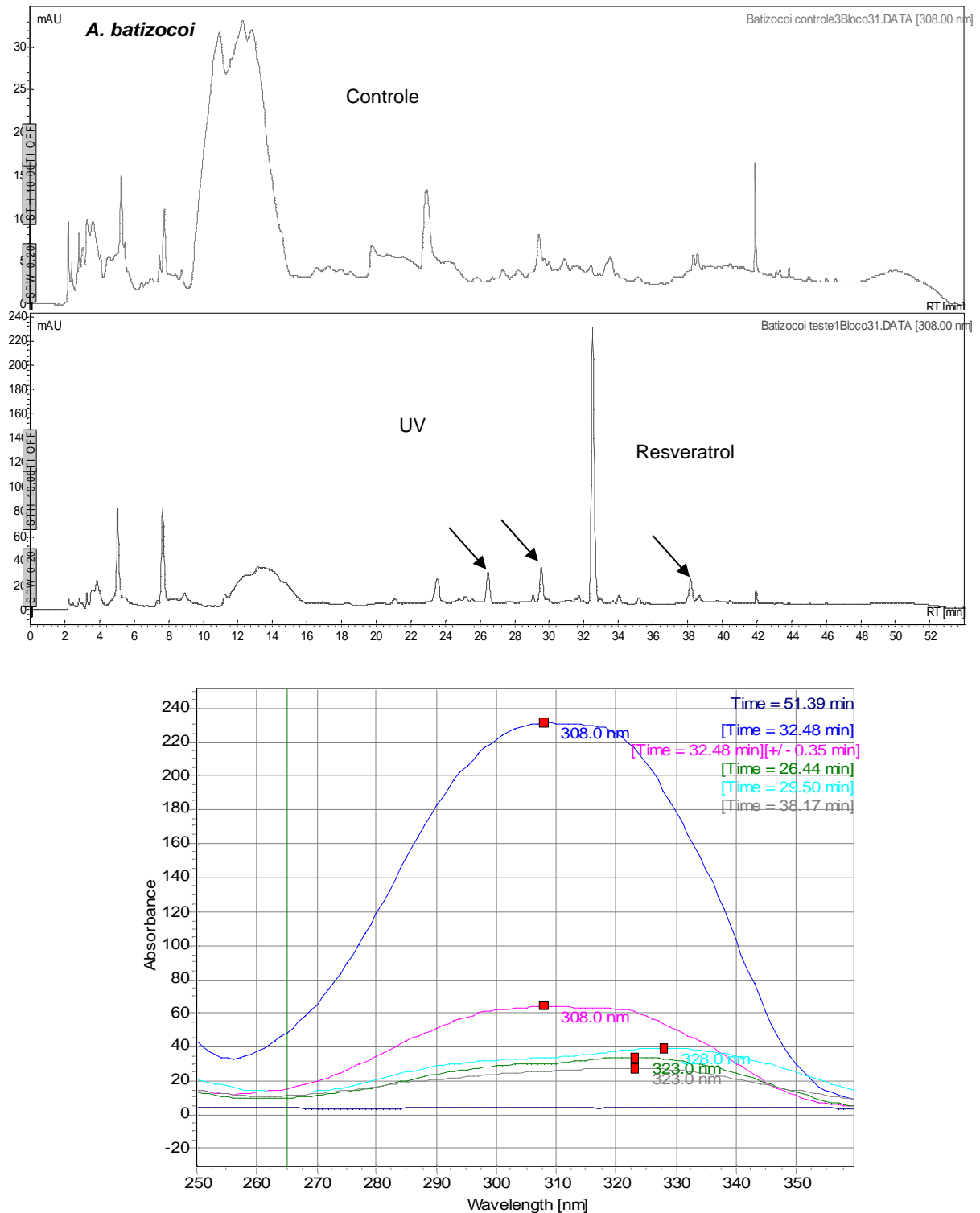


Figura 22. Cromatogramas de *Arachis batizocoi* com perfil do espectro, fornecido pelo detector de arranjo de fotodiodos (250-360 nm), no ápice ( $t_R = 32,48$  min) e na base do pico referente ao resveratrol na amostra induzida. A seta indica compostos não identificados (NI) ( $t_R = 26,44$  min,  $\lambda_{max}$  323 nm;  $t_R = 29,50$  min,  $\lambda_{max}$  328 nm;  $t_R = 38,17$  min,  $\lambda_{max}$  323nm) que surgiram após o processo de indução. A pureza do pico foi 99,67%.

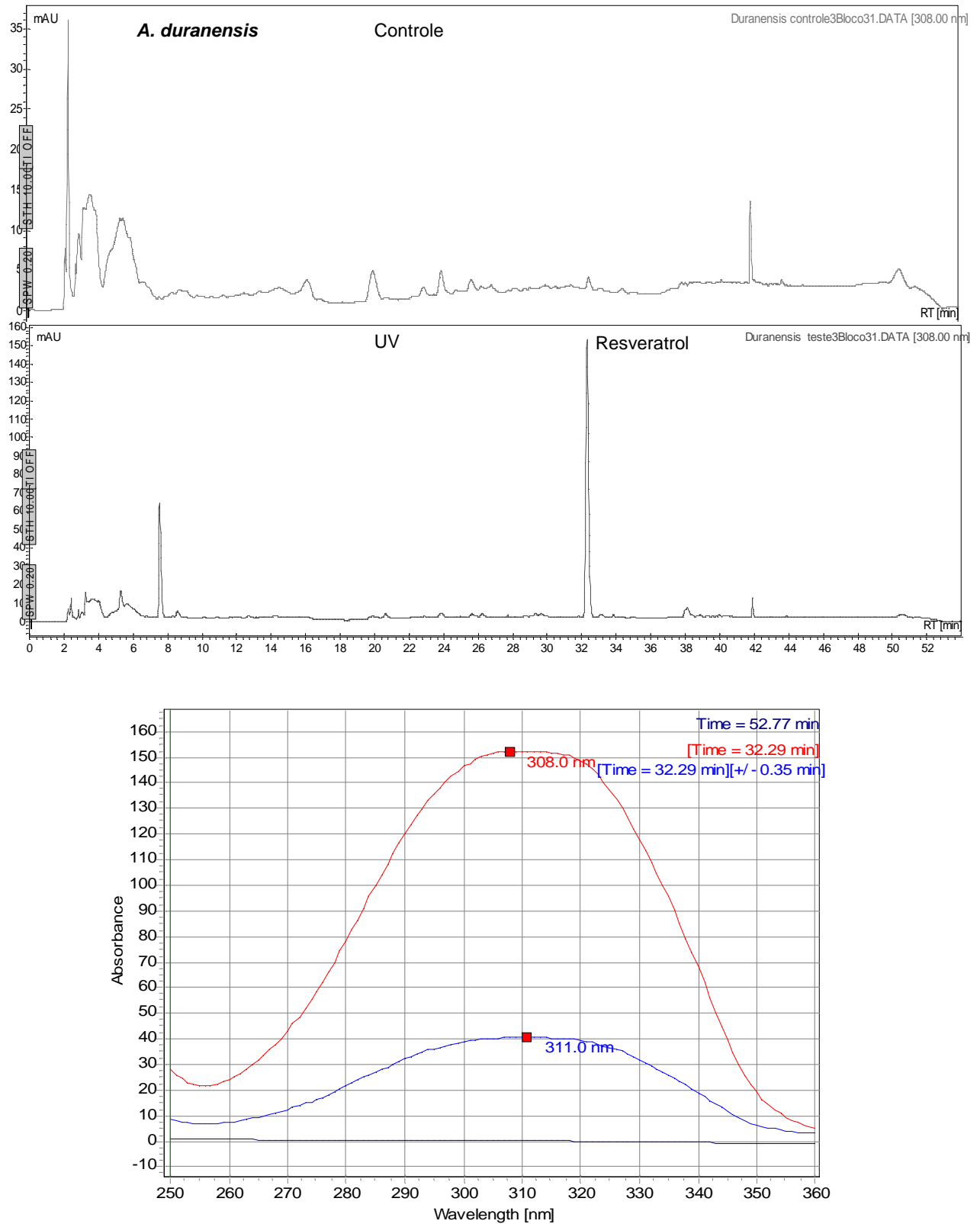


Figura 23. Cromatogramas de *Arachis duranensis* e perfil do espectro, fornecido pelo detector de arranjo de fotodiodos (250-360 nm), no ápice ( $t_R = 32,29$  min) e na base do pico referente ao resveratrol na amostra induzida. A pureza do pico foi 99,65%.

É possível perceber, pela análise dos cromatogramas obtidos (Figuras 13 a 23), que em algumas espécies além do resveratrol, o tratamento da amostra com radiação UV induziu a produção de outros compostos não identificados, provavelmente outras fitoalexinas. *Arachis cardenasii* apresentou um pico não identificado no tR = 10,92 min com  $\lambda_{\max}$  313 nm; *A. simpsonii*, *A. kempff-mercadoi* e *A. batizocoi* apresentaram um pico com tR = 26,3-26,9 min,  $\lambda_{\max}$  323-326 nm; *A. batizocoi* e *A. ipaënsis* apresentaram um pico com tR = 29,5-30 min,  $\lambda_{\max}$  328-329 nm e outro pico com tR = 38 min e  $\lambda_{\max}$  323-324 nm; *A. kempff-mercadoi* apresentou um pico com tR = 34,38 min,  $\lambda_{\max}$  323 nm; *A. simpsonii* apresentou dois picos não identificados em tR = 45 min;  $\lambda_{\max}$  298 nm e tR = 45,87 min,  $\lambda_{\max}$  296 nm. Estes compostos não identificados serão objeto de estudo futuro.

De acordo com dados da literatura, as fitoalexinas mais prevalentes em folhas de espécies de *Arachis* são resveratrol, dimetilmedicarpina, formononetina, 7,4'-dimetoxi-2'-hidroxisoflavanona e medicarpina (51).

**Análise dos blocos.** O ajuste da distribuição Gama aos dados indicou que não há diferença significativa (5% de significância) entre as médias dos blocos quanto à expressão de resveratrol para o tratamento com radiação UV. A Figura 24 mostra que a distribuição Gama comporta o ajuste dos dados sob investigação.

**Precisão e distribuição do resveratrol nas espécies.** A análise do gráfico apresentado na Figura 25 mostra que as espécies *A. batizocoi*, *A. cardenasii* e *A. kuhlmannii* apresentaram distribuição dos resultados mais próximos da distribuição normal, ou seja, os dados se distribuíram ocupando os quatro quartis ao redor da mediana, de maneira mais uniforme. Entretanto, para as demais espécies avaliadas neste estudo, a distribuição dos dados foi assimétrica ao redor da mediana; por isso a análise de dados deste trabalho foi baseada na distribuição Gama.

A Figura 25 também fornece informação sobre a precisão dos dados, para cada espécie. De acordo com este gráfico, *A. ipaënsis* apresentou maior precisão de resposta, com o intervalo de dados mais próximos à mediana, enquanto que *A. hypogaea* e *A. duranensis* apresentaram respostas de indução menos precisas, com intervalo de dados mais dispersos em relação à mediana.

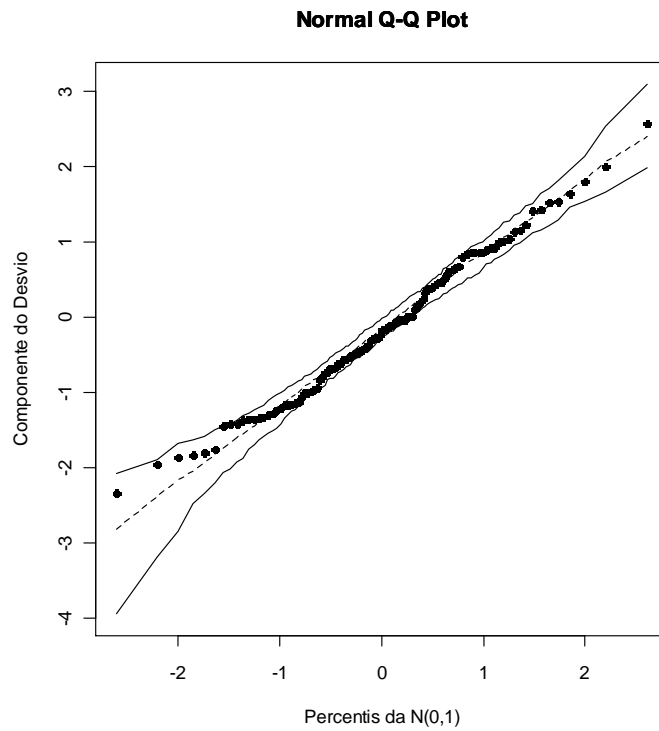


Figura 24– Gráfico normal de probabilidade para o MLG Gama com função de ligação inversa ajustado para a variável 'resveratrol'.

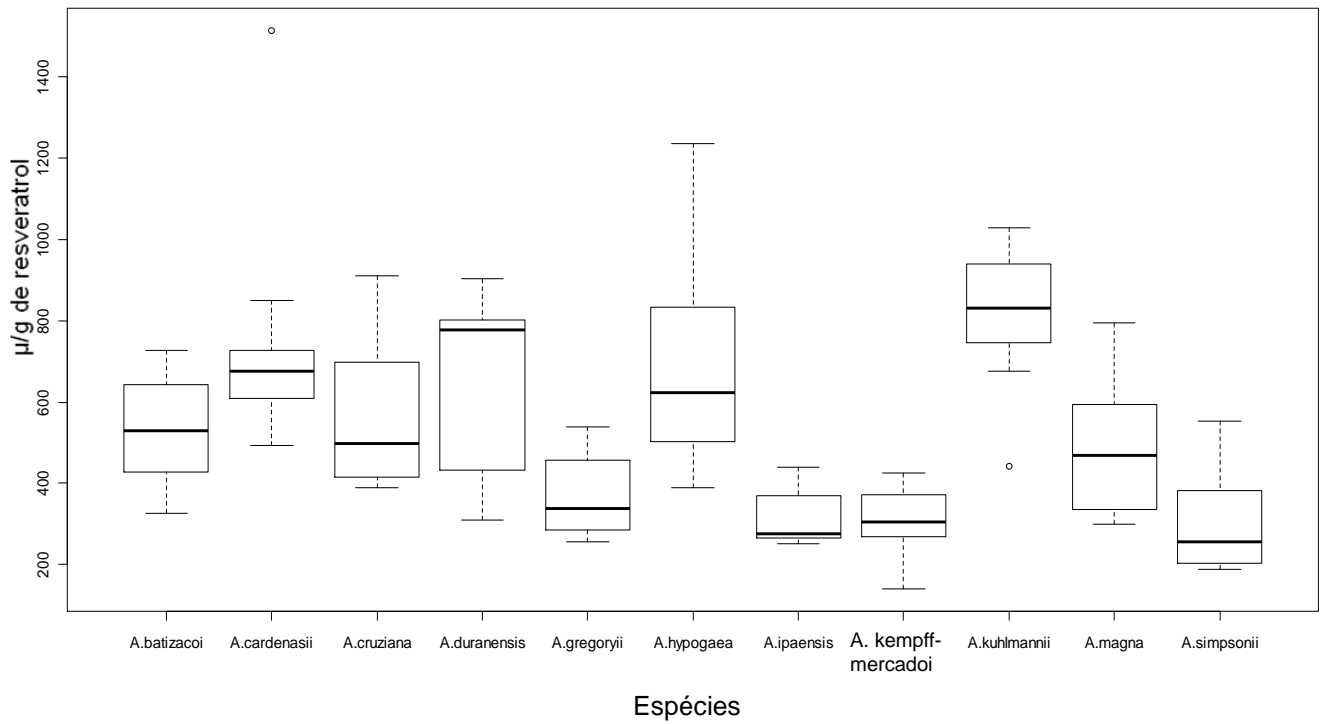


Figura 25- Distribuição do resveratrol para as diferentes espécies de *Arachis*.

**Análise de agrupamento.** Segundo a metodologia de clusterização aplicada (Figura 26 e Tabela 17), as espécies em estudo se dividem em três grupos heterogêneos entre si, com base no teor de resveratrol, a saber:

- Grupo A: *Arachis duranensis*, *A. cardenasii*, *A. kuhlmannii* e o controle (*A. hypogaea*). Tais espécies agruparam-se por apresentarem, em média, maiores valores de resveratrol em relação às demais espécies.
- Grupo B: *Arachis gregoryii*, *A. kempff-mercadoidi*, *A. simpsonii* e *A. ipaensis*, que apresentaram valores baixos de resveratrol;
- Grupo C: formado pelas espécies que apresentaram teores médios de resveratrol: *A. magna*, *A. cruziana* e *A. batizocoi*, as duas últimas espécies são de genoma B e K.

O teste de Kruskal Wallis confirmou que os 3 clusters são realmente diferentes entre si (p-valor=0,011)

## Análise de agrupamento

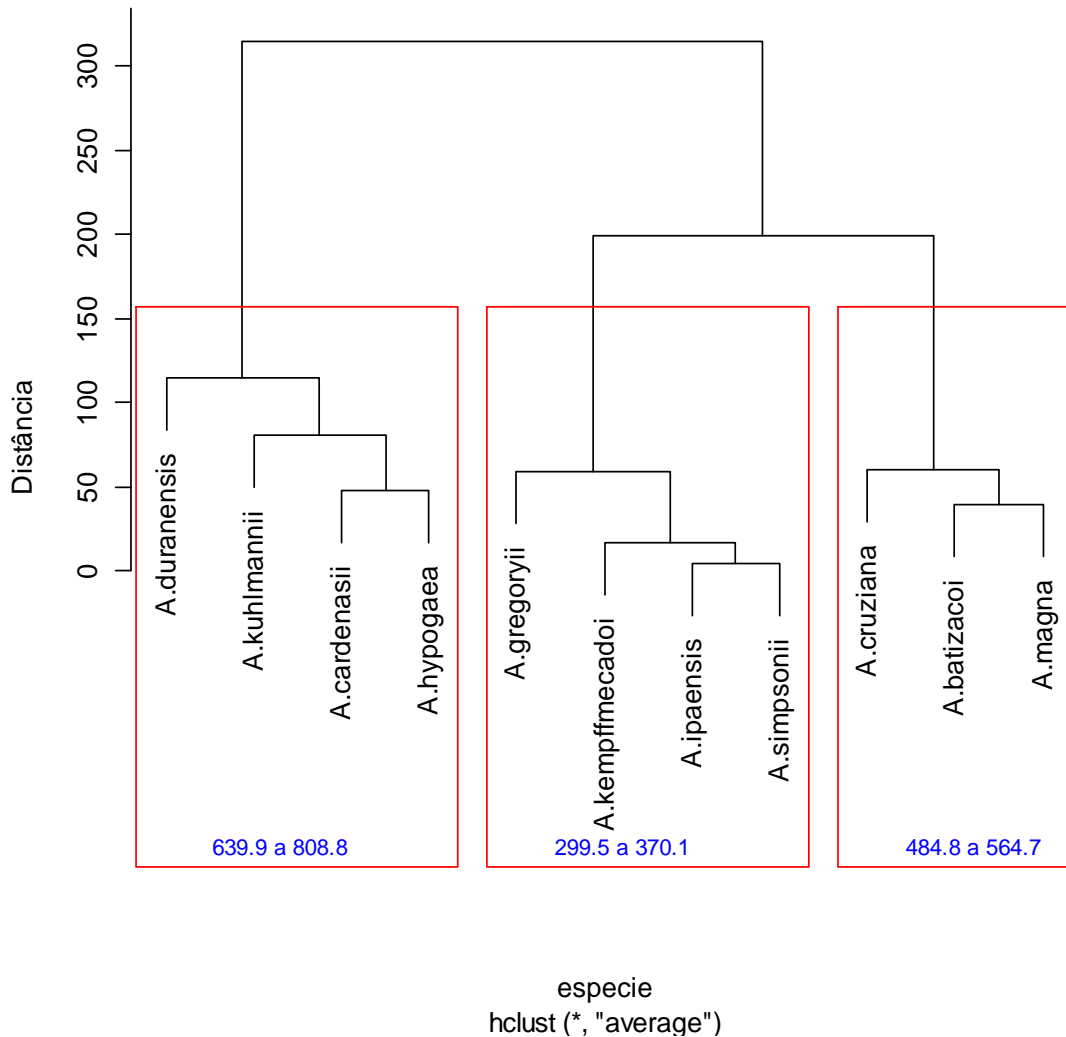


Figura 26- Análise de cluster para espécies de *Arachis*, apresentando o valor mínimo e máximo de resveratrol para cada agrupamento

Tabela 17. Médias e desvios para grupos de clusters

	Grupo A	Grupo B	Grupo C
<b>Média</b>	726,26 <sup>a</sup>	325,52 <sup>b</sup>	524,66 <sup>c</sup>
<b>Desvio</b>	71,70	30,83	39,95

\*Médias seguidas de letras iguais nas mesmas linhas, não diferem ao nível de 5% de significância, segundo o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis

No amendoim cultivado há presença de dois pares de cromossomos diferentes dos demais (29). Um par é denominado A, com coloração diferenciada e bem menor que os demais cromossomos; o outro par, com constrição secundária, é chamado de B (116). As espécies de genoma A são aquelas pertencentes à seção

*Arachis* e possuidoras do par de cromossomos A. Já as espécies de genoma B são aquelas pertencentes à seção *Arachis* que não possuem o par A e compartilham o genoma B do amendoim cultivado (29,116). Dentre as 31 espécies da seção *Arachis*, 15 não apresentam o par de cromossomo A (29).

Neste trabalho, além da espécie cultivada *A hypogaea*, foram avaliadas cinco espécies de *Arachis* silvestres que apresentam o genoma A (*A. kuhlmannii*, *A. cardenasii*, *A. duranensis*, *A. simpsonii* e *A. kempff-mercadoi*) e cinco espécies do genoma B (*A. magna*, *A. ipäensis*, *A. gregoryii* e *A. batizocoi* e *A. cruziana*), sendo que, recentemente, *A. batizocoi* e *A. cruziana* também foram classificadas como tendo também o genoma K, além do genoma B (116, 121).

As espécies agrupadas no genoma A apresentaram teores de resveratrol significativamente superior ao das espécies agrupadas em B. As duas espécies pertencentes simultaneamente aos genomas B e K apresentaram expressão intermediária de resveratrol, estatisticamente igual aos teores fornecidos pelas espécies do genoma A e estatisticamente maior do que os teores fornecidos pelas espécies do genoma B. Ao serem consideradas apenas as espécies dos genomas A e B, foi possível observar que esses resultados também são estatisticamente diferentes quanto à expressão de resveratrol. A Tabela 18 apresenta estes resultados.

Tabela 18. Expressão média de resveratrol após indução por UV, em folhas de espécies do gênero *Arachis*, por grupos de genoma

Genoma	Media
A	608.42 ± 289.97 <sup>a</sup>
Bk	543.43 ± 165.68 <sup>a</sup>
B	392.57 ± 139.01 <sup>b</sup>

\*Letras iguais não diferem significativamente segundo os contrastes do modelo linear generalizado Gama.

A Figura 27 mostra que a distribuição Gama comporta o ajuste dos dados sob investigação. A assimetria dos dados pode ser visualizada através da Figura 28.

Ao retirar o genoma k do modelo, a expressão média do genoma A continua diferindo significativamente do genoma B, segundo o modelo generalizado Gama (LR Chisq= 16.814,gl=1,p-valor=<0.0001).



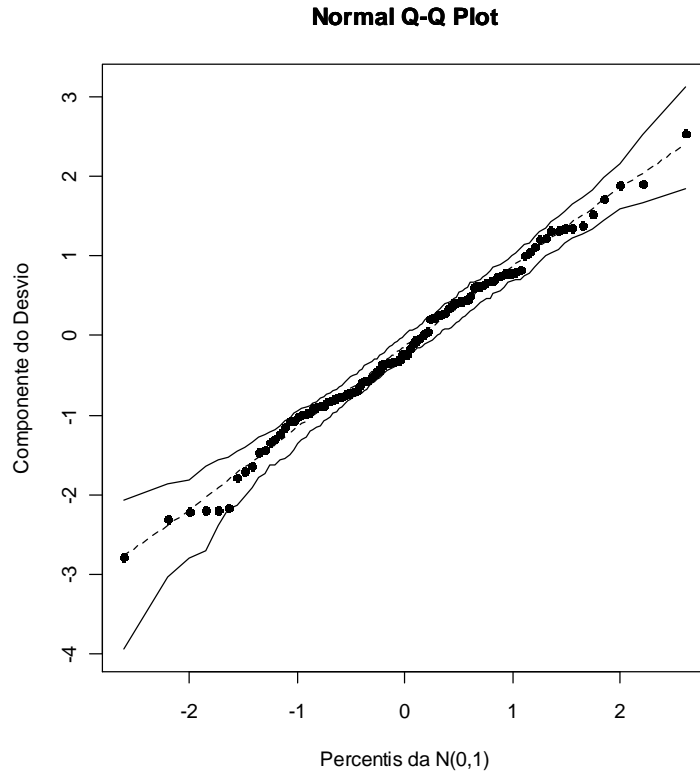


Figura 27– Gráfico normal de probabilidade para o MLG Gama com função de ligação inversa ajustado para a variável resposta ' teor de resveratrol'

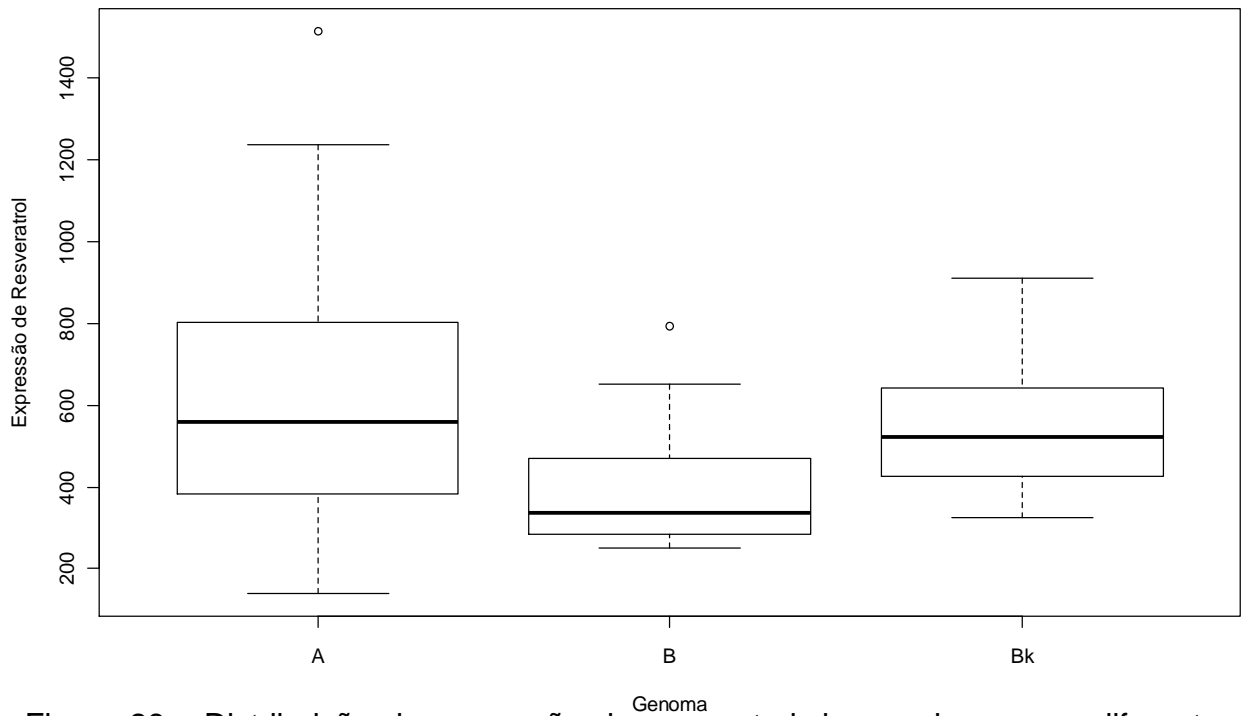


Figura 28 - Distribuição da expressão de resveratrol de acordo com os diferentes genomas.

De acordo com a análise de agrupamento e a análise de expressão de resveratrol entre genomas, o maior teor pode está associado ao par de cromossomo A, considerando que todas as espécies agrupadas no grupo de maior teor ( *A. kuhlmannii*, *A. cardenasii*, *A. duranensis*, *hypogaea* ) são de genoma A.

É possível sugerir que o genoma K também possa estar associado à expressão de resveratrol, pois as espécies *A. batizocoi* e *A. cruziana*, que apresentam este genoma, foram agrupadas no grupo que apresentou teor intermediário. Além disso, na análise dos genomas, as espécies de genoma A e de genoma B e K apresentaram teores mais elevados e não diferiram estatisticamente.

Com relação à espécie *A. magna*, que foi agrupada no grupo de teor intermediário juntamente com as espécies de genoma B e K, valeria a pena investigar a possibilidade de presença do genoma K nesta espécie. Entretanto, independente do genoma K, as três espécies agrupadas com teor intermediário de resveratrol (*A. batizocoi*, *A. cruziana* e *A. magna*) parecem apresentar uma grande proximidade genética na árvore filogenética apresentada por Bechara et al. (2010) (116).

Nenhuma das espécies de *Arachis* silvestres estudadas apresentou teor de resveratrol significativamente mais elevado que a espécie cultivada *A. hypogaea*. Contudo, três espécies, *A. duranensis*, *A. kuhlmannii*, *A. cardenasii*, foram agrupadas no grupo de maior teor de resveratrol junto com a espécie cultivada (Figura 26). Estas espécies silvestres são diplóides e apresentam planta com estruturas menores em relação à *Arachis hypogaea* que é uma espécie tetraplóide, isto indica que as espécies silvestres citadas acima possuem potencial para a produção de resveratrol, além disso, estas espécies apresentaram resveratrol mesmo nas amostras não induzidas (Tabela 13).

De acordo com o gráfico de caixa para a distribuição dos resultados da indução de resveratrol entre as diferentes espécies (Figura 24), a espécie *A. ipaensis*, provável doador do genoma B para espécie cultivada *A. hypogaea* (116), apresentou uma mediana bastante baixa para o resveratrol e maior precisão de resultados em relação às demais espécies silvestres.

O tratamento estatístico dos resultados na mesma Figura também mostrou que *A. duranensis*, provável doador do genoma A para a espécie cultivada *A. hypogaea* (116), apresentou uma mediana de resveratrol bastante elevada, com resultados bastante dispersos, assim como *A. hypogaea*. Estes dados reforçam a

idéia de que o maior teor de resveratrol pode está associado ao par de cromossomo A. Por outro lado, o conhecimento sobre a diferença entre os genomas destas espécies ainda não é suficiente para explicar a menor mediana de resveratrol fornecida para *A simpsonii*, ou mesmo para *A. kempff-mercadoi*, que também são portadoras do genoma A.

## **CAPÍTULO 5. CONCLUSÕES**

Nesse trabalho é proposto um método de análise de resveratrol em folhas de espécies do gênero *Arachis*, por CLAE, que mostrou ser eficiente. Para isso foram avaliadas e otimizadas, além das condições analíticas, as condições de extração do composto e tratamento de amostras.

Pela primeira vez foi avaliada a presença de resveratrol em folhas de amendoim silvestre. As espécies silvestres avaliadas, não induzidas, apresentaram baixos teores de resveratrol. Porém foi possível induzir a produção de resveratrol em folhas de *Arachis sp.* por radiação UV.

Todas as espécies silvestres de *Arachis* expressaram resveratrol após a indução com luz UV; apesar deste fato, nenhuma espécie apresentou expressão superior ao amendoim cultivado. Porém *A. kuhlmannii*, *A. cardenasii* e *A. duranensis*, espécies de genoma A e diplóides, foram agrupadas no grupo de maior teor de resveratrol, junto com *A. hypogaea* que uma espécie de genoma AABB, tetraplóide. Além disso, estas espécies apresentaram resveratrol até nas amostras não induzidas, o que reforça a idéia delas terem potencial para a produção de resveratrol.

Os teores de resveratrol entre os genomas A e BK foram estatisticamente iguais.

Folhas de amendoim é subproduto do amendoim cultivado para a produção de óleo ou outro fim e geralmente são subutilizadas. Contudo, os resultados obtidos mostram que é possível agregar valor aos subprodutos (folhas) oriundos do processamento do amendoim, utilizando-os para obtenção de resveratrol. Considerando as várias atividades biológicas do resveratrol e sua ampla utilização nas indústrias farmacêutica, cosmética e de suplementos alimentares, a utilização de folhas de amendoim pode constituir-se em um novo nicho nesse mercado.

Estudos posteriores deverão ser desenvolvidos para complementar a padronização e validar a metodologia analítica. A determinação de resveratrol em outras espécies da seção *Arachis* e em espécies de outras seções, também deve ser avaliada, como também o tempo de exposição das folhas a luz ultravioleta.

## REFERÊNCIAS

1. Freitas FO, Moretzsohn MC, Valls JF. Genetic variability of Brazilian Indian landraces of *Arachis hypogaea* L. *Genet Mol Res.* 2007; 6(3):675-84.
2. Graciano ESA. Estudos fisiológicos e bioquímicos de cultivares de amendoim (*Arachis hypogaea* L.) submetidas à deficiência hídrica [Dissertation]. Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco; 2009.
3. Tillman BL, Stalker HT. Peanut. In: Vollmann J, Rajcan I, editors. *Oil Crops*. New York: Springer Science+Business Media, LLC; 2009. p. 287-315.
4. Fávero AP, Moraes SA, Garcia AAF, Valls JFM, Vello NA. Characterization of rust, early and late leaf spot resistance in wild and cultivated peanut germplasm. *Sci Agric.* 2009; 66(2):110-7.
5. Pró-amendoim. Safras/ estatísticas: Comercio mundial. Disponível em: [http://www.proamendoim.com.br/safras\\_estatisticas\\_comercio\\_mundial.php](http://www.proamendoim.com.br/safras_estatisticas_comercio_mundial.php). Acesso em 01 de maio de 2011
6. Freitas FO, Penãloza ADPS, Valls JFM. O amendoim contador de história. Embrapa, editor. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia; 2003.
7. Pighinelli ALMT, Park KJ, Rauen AM, Bevilaqua G, Guillaumon Filho JA. Optimization peanut grain expelling. *Ciência e Tecnologia de Alimentos.* 2008; 28(1):66-71.
8. Araújo IA, Gondim TMS, Costa MLM, Suassuna TMF, Feitosa RM. Características Físico-Químicas de Sementes de Diferentes Genótipos de Amendoim. *Revista Brasileira de Biociências.* 2008; 5(S1):870-2.
9. Sobolev VS. Localized Production of Phytoalexins by Peanut (*Arachis hypogaea*) Kernels in Response to Invasion by *Aspergillus* Species. *J Agric Food Chem.* 2008; 56(6):1949-54.
10. Sanders TH, McMichael RW, Hendrix KW. Occurrence of resveratrol in edible peanuts. *J Agric Food Chem.* 2000; 48(4):1243-6.
11. Chen RS, Wu PL, Chiou RYY. Peanut roots as a source of resveratrol. *J Agric Food Chem.* 2002; 50(6):1665-7.

12. Chung IM, Park MR, Chun JC, Yun SJ. Resveratrol accumulation and resveratrol synthase gene expression in response to abiotic stresses and hormones in peanut plants. *Plant Science*. 2003; 164(1):103-9.
13. Tokusoglu O, Unal MK, Yemis F. Determination of the phytoalexin resveratrol (3,5,4'-trihydroxystilbene) in peanuts and pistachios by high-performance liquid chromatographic diode array (HPLC-DAD) and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). *J Agric Food Chem*. 2005; 53(12):5003-9.
14. Pimentel CVMB, Francki VM, Gollücke APB. *Alimentos Funcionais*. São paulo: Varela; 2005.
15. Fávero AP. Cruzabilidade entre espécies silvestres de *Arachis*, visando a introgressão de genes de resistência a doenças no amendoim cultivado [Thesis]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2004.
16. Sobolev VS, Guo BZ, Holbrook CC, Lynch RE. Interrelationship of phytoalexin production and disease resistance in selected peanut genotypes. *J Agric Food Chem*. 2007; 55(6):2195-200.
17. Ferguson ME, Jarvis A, Stalker HT, Williams DE, Guarino L, Valls JFM, et al. Biogeography of wild *Arachis* (Leguminosae): distribution and environmental characterisation. *Biodiversity and Conservation*. 2005; 14(7):1777-98.
18. Silva SC, Martins MIG, Santos RC, Peñaloza APS, Melo Filho PA, Benko-Iseppon AM, et al. Karyological features and banding patterns in *Arachis* species belonging to the *Heterantheae* section. *Plant Systematics and Evolution*. 2010; 285(3):201-7.
19. Valls JFM, Simpson CE. New species of *Arachis* (Leguminosae) from Brazil, Paraguay and Bolivia. *Bonplandia*. 2005; 14(1):35-63.
20. Favero AP, Suassuna TF. Obtenção de três eventos - elite através da hibridação entre *A. hypogaea* e anfidiplóides sintéticos e sua inserção no programa de melhoramento da Embrapa. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia 2007.
21. Valois ACC, Salomão AN, Allem AC, Gasparotto CR, Togawa RC, Werneck AA. Glossário de Recursos Genéticos Vegetais. Disponível em <<http://www.cenargen.embrapa.br/recgen/glossario/c.html>>. Brasília: Embrapa SPI; 1996.

22. Embrapa. O que é Intercâmbio de Germoplasma. Disponível em <http://www.cenargen.embrapa.br/recgen/intercambio/definicao.html>. Brasília: Embrapa/Cenargen; [cited 2011].
23. Carvalho JMFC, Castro JPC, Furtado CM, Suassuna TMF, Santos JW, Santos TS. Regeneração de germoplasma de amendoim (*Arachis hypogaea*) in vitro. Embrapa, editor. Campina Grande: Embrapa Algodão; 2005.
24. Santos RC. Utilização de recursos genéticos e melhoramento de *Arachis hypogaea* L. no nordeste brasileiro. In: Queiróz MA, Goedert CO, Ramos SRR, editors. Recursos Genéticos e Melhoramento de Plantas para o Nordeste brasileiro. Petrolina/Brasília: Embrapa Semi-Árido/Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia; 1999.
25. Wetzel MMV, Silva DB, Valls JFM, Pais OP. Conservação de amendoim (*Arachis hypogaea* L.) a longo prazo. Embrapa, editor. Brasília: Embrapa; 2005.
26. José ACVF, Guimarães PM, Bertioli DJ, Leal-Bertioli SCM. Utilização de marcadores RAPD na construção de um mapa genético de *Arachis sternosperma* x *A. duranensis*. Embrapa, editor. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia; 2004.
27. Jenks MA. Plant Nomenclature. Disponível em <http://www.hort.purdue.edu/hort/courses/hort217/Nomenclature/description.htm>. West Lafayette: Department of Horticulture and Landscape Architecture, Purdue University; 2011 [cited 2011].
28. IAC. Cultivares: IAC Caiapó. Disponível em: <http://www.iac.sp.gov.br/UniPesquisa/GraosFibras/Cultivares/Amendoim.asp>. Campinas: Instituto Agrônomo de Campinas.; 2011 [cited 2011].
29. Favero AP, Veiga RFA. Amendoim. In: Stumpf ERT, Barbieri RL, editors. Origem e Evolução de Plantas Cultivadas. Brasília: Embrapa; 2008. p. 123-48.
30. Lavia GI, Ortiz AM, Fernández A. Karyotypic studies in wild germplasm of *Arachis* (Leguminosae). Genetic resources and crop evolution. 2009; 56(6):755-64.
31. Wang ML, Barkley NA, Chinnan M, Stalker HT, Pittman RN. Oil content and fatty acid composition variability in wild peanut species. Plant Genetic Resources. 2010; 8(3):232-4.



32. Jarvis A, Ferguson ME, Williams DE, Guarino L, Jones PG, Stalker HT, et al. Biogeography of wild *Arachis*: assessing conservation status and setting future priorities. *Crop Science*. 2003; 43(3):1100-8.
33. Asibuo JY, Akromah R, Safo-Kantanka O, Adu-Dapaah HK, Ohemeng-Dapaah S, Agyeman A. Chemical composition of groundnut, *Arachis hypogaea* (L) landraces. *African Journal of Biotechnology*. 2008; 7(13):2203-8.
34. Grosso NR, Nepote V, Guzman CA. Chemical composition of some wild peanut species (*Arachis* L.) seeds. *J Agric Food Chem*. 2000; 48(3):806-9.
35. Chopra BAK, Sidhu GS. Nutritive value of groundnut (*Arachis hypogaea*). *British Journal of Nutrition*. 1967; 21(3):519-25.
36. Franco G. Tabela de Composição Química de Alimentos. 9 ed. São Paulo: Atheneu; 2001.
37. Fernandez EM, Rosolem CA. Ácidos graxos e proteína em grãos de amendoim em função da calagem e do método de secagem. *Bragantia*. 1998; 57(1):35-9.
38. Berry SK. Fatty acid composition of 16 groundnut (*Arachis hypogaea*, L.) cultivars grown under Malaysian conditions. *Pertanika*. 1982; 5(1):20-4.
39. Chung SY, Maleki S, Champagne ET, Buhr KL, Gorbet DW. High-oleic peanuts are not different from normal peanuts in allergenic properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2002; 50(4):878-82.
40. Giannuzzo AN, Grosso NR, Guzmán CA. Studies of lipids and proteins in a wild species of the *Arachis* (Fabaceae) gender. *Molecules*. 2000; 5(3):545-6.
41. Cassidy A, Hanley B, Lamuela Raventos RM. Isoflavones, lignans and stilbenes—origins, metabolism and potential importance to human health. *J Sci Food and Agr*. 2000; 80(7):1044-62.
42. Ingham JL. 3,5,4'-trihydroxystilbene as a phytoalexin from groundnuts (*Arachis hypogaea*). *Phytochemistry*. 1976; 15(11):1791-3.
43. Sobolev VS, Neff SA, Gloer JB. New stilbenoids from peanut (*Arachis hypogaea*) seeds challenged by an *Aspergillus caelatus* strain. *J Agric Food Chem*. 2009; 57(1):62-8.
44. Keen NT, Ingham JL. New stilbene phytoalexins from American cultivars of *Arachis hypogaea*. *Phytochemistry*. 1976; 15(11):1794-5.

45. Medina-Bolivar F, Condori J, Rimando AM, Hubstenberger J, Shelton K, O'Keefe SF, et al. Production and secretion of resveratrol in hairy root cultures of peanut. *Phytochemistry*. 2007; 68(14):1992-2003.
46. Hsu W-C, Cho PJ, Wu MJ, Chiou RYY. A rapid and small-scale method for estimating antioxidative potency of peanut sprouts. *J Food Sci*. 2002; 67(7):2604-8.
47. Tsai WJ, Lin YL, Ho YC, Kuo YC. Inhibition of cyclic AMP phosphodiesterase and blockage of arachidonate metabolism by antiplatelet principles from the seed hulls of *Arachis hypogaea*L. *Zhonghuá yáoxué zázhi*. 2003; 55(5):335-45.
48. Lou HX, Yuan HQ, Yamazaki Y, Sasaki T, Oka SC. Alkaloids and flavonoids from peanut skins. *Planta Med*. 2001; 67(4):345-9.
49. Lee YY, Kwon SH, Kim HJ, Park HJ, Yang EJ, Kim SK, et al. Isolation of oleanane triterpenes and trans-resveratrol from the root of peanut (*Arachis hypogaea*). *J Korean Soc Appl Biol Chem*. 2009; 52(1):40-4.
50. Chukwumah YC, Walker LT, Verghese M, Bokanga M, Ogutu S, Alphonse K. Comparison of extraction methods for the quantification of selected phytochemicals in peanuts (*Arachis hypogaea*). *J Agric Food Chem*. 2007; 55(2):285-90.
51. Edwards C, Strange RN. Separation and identification of phytoalexins from leaves of groundnut (*Arachis hypogaea*) and development of a method for their determination by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J Chromatog A*. 1991; 547(2):185-93.
52. Edwards C, Strange RN, Cole DL. Accumulation of Isoflavonoid Phytoalexins in Leaves of *Arachis-Hypogaea* Differing in Reaction to Rust (*Puccinia-Arachidis*) and Early Leafspot (*Cercospora-Arachidicola*). *Plant Pathol*. 1995; 44(3):573-9.
53. Liu J, Wang G, Wang G. Chemical constituents in aerial parts of *Arachis hypogaea* (III). *Chin Tradit Patent Med*. 2009; 31(12):1902-3.
54. Sobolev VS, Neff SA, Gloer JB, Khan SI, Tabanca N, De Lucca AJ, et al. Pterocarpenes elicited by *Aspergillus caelatus* in peanut (*Arachis hypogaea*) seeds. *Phytochemistry*. 2010; 71(17-18):2099-107.
55. Monagas M, Garrido I, Lebroñ n-Aguilar R, Goñ mez-Cordovel s MC, Rybarczyk A, Amarowicz R, et al. Comparative Flavan-3-ol Profile and

- Antioxidant Capacity of Roasted Peanut, Hazelnut, and Almond Skins. *J Agr Food Chem.* 2009; 57(22):10590-9.
56. Lou H, Yamazaki Y, Sasaki T, Uchida M, Tanaka H, Oka S. A-type proanthocyanidins from peanut skins. *Phytochemistry.* 1999; 51(2):297-308.
  57. Lee JH, Baek IY, Kang NS, Ko JM, Kim HT, Jung CS, et al. Identification of phenolic compounds and antioxidant effects from the exudate of germinating peanut (*Arachis hypogaea*). *Food Sci Biotech.* 2007; 16(1):29-36.
  58. Stevenson PC, Anderson JC, Blaney WM, Simmonds MSJ. Developmental inhibition of *Spodoptera litura* (Fab.) larvae by a novel caffeoylquinic acid from the wild groundnut, *Arachis paraguariensis* (Chod et Hassl.). *Journal of Chemical Ecology.* 1993; 19(12):2917-33.
  59. Snook ME, Lynch RE, Culbreath AK, Costello CE. 2, 3-Di-(E)-caffeoyl-(2R, 3R)-(+)-tartaric acid in terminals of peanut (*Arachis hypogaea*) varieties with different resistances to late leaf spot disease (*Cercosporidium personatum*) and the insects tobacco thrips (*Frankliniella fusca*) and potato leafhopper (*Empoasca fabae*). *J Agric Food Chem.* 1994; 42(7):1572-4.
  60. Phillips KM, Ruggio DM, Ashraf-Khorassani M. Phytosterol composition of nuts and seeds commonly consumed in the United States. *J Agric Food Chem.* 2005; 53(24):9436-45.
  61. Shin EC, Pegg RB, Phillips RD, Eitenmiller RR. Commercial Peanut (*Arachis hypogaea* L.) Cultivars in the United States: Phytosterol Composition. *J Agric Food Chem.* 2010; 58(16):161-7.
  62. Grosso NR, Zygadlo JA, Burrioni LV, Guzman CA. Fatty acid, sterol and proximate compositions of peanut species (*Arachis L.*) seeds from Bolivia and Argentina. *Grasas Y Aceites.* 1997; 48(4):219-25.
  63. Cherif AO, Ben Messaouda M, Kaabi B, Pellerin I, Boukhchina S, Kallel H, et al. Characteristics and pathways of bioactive 4-desmethylsterols, triterpene alcohols and 4[alpha]-monomethylsterols, from developing Tunisian cultivars and wild peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Plant Physiology and Biochemistry.* 2011; In Press, Corrected Proof ( [doi:10.1016/j.plaphy.2011.02.009](https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2011.02.009))
  64. Gaydou EM, Bianchini JP, Ratovohery JV. Triterpene alcohols, methylsterols, sterols, and fatty acids in five Malagasy legume seed oils. *J Agric Food Chem.* 1983; 31(4):833-6.

65. Bansal UK, Satija DR, Ahuja KL. Oil composition of diverse groundnut (*Arachis hypogaea* L) genotypes in relation to different environments. *J Sci Food Agric.* 1993; 63(1):17-9.
66. Kinjo J, Hatakeyama M, Udayama M, Tsutanaga Y, Yamashita M, Nohara T, et al. HPLC profile analysis of oleanene-glucuronides in several edible beans. *Biosci Biotechnol Biochem.* 1998; 62(3):429-33.
67. Mooser W. To the Knowledge of the *Arachis*. . *Landwirtschaftlichen Versuchsstationen* (in: SciFinder database). 1904; 60:321-46.
68. Moll F. Die chemische natur des "erdnusalkaloid" arachin. *Planta Med.* 1961; 9(3):213-5.
69. Zwickenspflug W, Meger M, Richter E. Occurrence of the tobacco alkaloid myosmine in nuts and nut products of *Arachis hypogaea* and *Corylus avellana*. *J Agric Food Chem.* 1998; 46(7):2703-6.
70. Barkley NA, Chamberlin KDC, Wang ML, Pittman RN. Development of a real-time PCR genotyping assay to identify high oleic acid peanuts (*Arachis hypogaea* L.). *Mol Breeding.* 2010; 25(3):541-8.
71. Pendse R, Rao AV, Venkataraman K. 5, 7-Dihydroxychromone from *Arachis hypogaea* shells. *Phytochemistry.* 1973; 12(8):2033-4.
72. Chaubal R, Pawar PV, Hebbalkar GD, Tungikar VB, Puranik VG, Deshpande VH, et al. Larvicidal activity of *Acacia nilotica* extracts and isolation of D-pinitol-a bioactive carbohydrate. *Chem Biodivers.* 2005; 2(5):684-8.
73. Rychlik M, Englert K, Kapfer S, Kirchhoff E. Folate contents of legumes determined by optimized enzyme treatment and stable isotope dilution assays. *J Food Comp Anal.* 2007; 20(5):411-9.
74. Bilbis LS, Shehu RA, Abubakar AG. Hypoglycemic and hypolipidemic effects of aqueous extract of *Arachis hypogaea* in normal and alloxan-induced diabetic rats. *Phytomedicine.* 2002; 9(6):553-5.
75. Vijaya T, Maouli KC, Rao SD. Phytoresources as potential therapeutic agents for cancer treatment and prevention *J Global Pharma Tech.* 2009; 1(1):4-18.
76. Higgs J. The beneficial role of peanuts in the diet-Part 2. *Nut Food Sci.* 2003; 33(2):56-64.
77. Kris-Etherton PM, Hu FB, Ros E, Sabate J. The role of tree nuts and peanuts in the prevention of coronary heart disease: multiple potential mechanisms. *J Nutr.* 2007; 138(9):1746S.

78. Parekh J, Chanda S. In vitro screening of antibacterial activity of aqueous and alcoholic extracts of various Indian plant species against selected pathogens from Enterobacteriaceae. *African J Microb Res.* 2007; 1(6):92-9.
79. Al-Qura'n S. Taxonomical and Pharmacological Survey of Therapeutic Plants in Jordan. *J Nat Prod.* 2008; 1(1):10-26.
80. Alper CM, Mattes RD. Peanut consumption improves indices of cardiovascular disease risk in healthy adults. *J Am Coll Nutr.* 2003; 22(2):133-41.
81. Zhou P, Li LP, Luo SQ, Jiang HD, Zeng S. Intestinal absorption of luteolin from peanut hull extract is more efficient than that from individual pure luteolin. *J Agric Food Chem.* 2008; 56(1):296-300.
82. Djoko B, Robin YYC, Shee JJ, Liu YW. Characterization of immunological activities of peanut stilbenoids, arachidin-1, piceatannol, and resveratrol on lipopolysaccharide-induced inflammation of RAW 264.7 macrophages. *J Agric Food Chem.* 2007; 55(6):2376-83.
83. Kang L, Heng W, Yuan A, Baolin L, Fang H. Resveratrol modulates adipokine expression and improves insulin sensitivity in adipocytes: Relative to inhibition of inflammatory responses. *Biochimie.* 2010; 92(7):789-96.
84. Lu X, Ma L, Ruan L, Kong Y, Mou H, Zhang Z, et al. Resveratrol differentially modulates inflammatory responses of microglia and astrocytes. *J Neuroinflammation.* 2010; 7(1):46-60.
85. Singh UP, Singh NP, Singh B, Hofseth LJ, Price RL, Nagarkatti M, et al. Resveratrol (Trans-3,5,4-trihydroxystilbene) Induces Silent Mating Type Information Regulation-1 and Down-Regulates Nuclear Transcription Factor- $\kappa$ B Activation to Abrogate Dextran Sulfate Sodium-Induced Colitis. *J Pharmacol Exp Ther.* 2010; 332(3):829-39.
86. Awad AB, Chan KC, Downie AC, Fink CS. Peanuts as a source of beta-sitosterol, a sterol with anticancer properties. *Nutr Cancer.* 2000; 36(2):238-41.
87. Basini G, Tringali C, Baioni L, Bussolati S, Spatafora C, Grasselli F. Biological effects on granulosa cells of hydroxylated and methylated resveratrol analogues. *Molecular Nutrition & Food Research.* 2010; 54(S2):S236-S43.
88. Bishayee A, Politis T, Darvesh AS. Resveratrol in the chemoprevention and treatment of hepatocellular carcinoma. *Cancer Treat Rev.* 2010; 36(1):43-53.

89. Chong J, Poutaraud A, Huguene P. Metabolism and roles of stilbenes in plants. *Plant Sci.* 2009; 177(3):143-55.
90. Gagliano N, Aldini G, Colombo G, Rossi R, Colombo R, Gioia M, et al. The potential of resveratrol against human gliomas. *Anti-Cancer Drugs.* 2010; 21(2):140-50
91. Huang C-P, Au L-C, Chiou RYY, Chung P-C, Chen S-Y, Tang W-C, et al. Arachidin-1, a Peanut Stilbenoid, Induces Programmed Cell Death in Human Leukemia HL-60 Cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 2010; 58(23):12123-9.
92. Weng Y-L, Liao H-F, Li AF-Y, Chang J-C, Chiou RYY. Oral administration of resveratrol in suppression of pulmonary metastasis of BALB/c mice challenged with CT26 colorectal adenocarcinoma cells. *Mol Nutr Food Res.* 2010; 54(2):259-67.
93. Wang SY, Shao B, Rao PF, Lee YY, Ye XY. Hypotin, a novel antipathogenic and antiproliferative protein from peanuts with a sequence similar to those of chitinase precursors. *J Agric Food Chem.* 2007; 55(24):9792-9.
94. Abdou YAM. The sources and nature of resistance in *Arachis L.* species to *Mycosphaerella arachidicola* Jenk. and *Mycosphaerella berkeleyi* Jenk., and factors influencing sporulation of these fungi. Raleigh: North Carolina University; 1966.
95. Ye X, Ng TB. Hypogin, a novel antifungal peptide from peanuts with sequence similarity to peanut allergen. *J Pept Res.* 2001; 57(4):330-6.
96. Devi SI, Vashista P, Sharma CB. Purification to homogeneity and characterization of two antifungal proteins from the roots of *Arachis hypogaea L.* *National Acad Sci Lett-India.* 2005; 28(1-2):21-8.
97. Vaughn SF. Phytotoxic and antimicrobial activity of 5, 7-dihydroxychromone from peanut shells. *J Chem Ecol.* 1995; 21(2):107-15.
98. Fulda S. Resveratrol and derivatives for the prevention and treatment of cancer. *Drug discovery today.* 2010; 15(17/18):757-65.
99. Sautter CK, Denardin S, Alves AO, Mallmann CA, Penna NG, Hecktheuer LH. Determinação de resveratrol em sucos de uva no Brasil. *Ciência e Tecnologia de Alimentos.* 2005; 25(3):437-42.
100. Potrebko I, Resurreccion AVA. Effect of Ultraviolet Doses in Combined Ultraviolet- Ultrasound Treatments on trans-Resveratrol and trans-Piceid

- Contents in Sliced Peanut Kernels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2009; 57(17):7750-6.
101. Jang M, Cai L, Udeani GO, Slowing KV, Thomas CF, Beecher CWW, et al. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science*. 1997; 275(5297):218-20.
  102. Moraes LAS. Óleos essenciais no controle fitossanitário. In: Bettiol W, Morandi MAB, editors. *Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas*. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente; 2009. p. 139-52.
  103. Taiz L, Zeiger E. *Fisiologia Vegetal*. 3a ed. Porto Alegre: Artmed; 2004.
  104. Bradamante S, Barenghi L, Villa A. Cardiovascular protective effects of resveratrol. *Cardiovascular drug reviews*. 2004; 22(3):169-88.
  105. Frémont L. Biological effects of resveratrol. *Life Sciences*. 2000; 66(8):663-73.
  106. Frémont L, Belguendouz L, Delpal S. Antioxidant activity of resveratrol and alcohol-free wine polyphenols related to LDL oxidation and polyunsaturated fatty acids. *Life Sciences*. 1999; 64(26):2511-21.
  107. Ratna WN, Simonelli JA. The action of dietary phytochemicals quercetin, catechin, resveratrol and naringenin on estrogen-mediated gene expression. *Life Sciences*. 2002; 70(13):1577-89.
  108. Ku KL, Chang PS, Cheng YC, Lien CY. Production of stilbenoids from the callus of *Arachis hypogaea*: a novel source of the anticancer compound piceatannol. *J Agric Food Chem*. 2005; 53(10):3877-81.
  109. Wieder T, Prokop A, Bagci B, Essmann F, Bernicke D, Schulze-Osthoff K, et al. Piceatannol, a hydroxylated analog of the chemopreventive agent resveratrol, is a potent inducer of apoptosis in the lymphoma cell line BJAB and in primary, leukemic lymphoblasts. *Leukemia*. 2001; 15(11):1735-42.
  110. Subbaramaiah K, Chung WJ, Michaluart P, Telang N, Tanabe T, Inoue H, et al. Resveratrol inhibits cyclooxygenase-2 transcription and activity in phorbol ester-treated human mammary epithelial cells. *Journal of Biological Chemistry*. 1998; 273(34):21875-82.
  111. Arora MK, Strange RN. Phytoalexin accumulation in groundnuts in response to wounding. *Plant Science*. 1991; 78(2):157-63.
  112. Fritzeimer KH, Rolfs CH, Pfau J, Kindl H. Action of ultraviolet-C on stilbene formation in callus of *Arachis hypogaea*. *Planta*. 1983; 159(1):25-9.

113. Souto AA, Carneiro MC, Seferin M, Senna MJH, Conz A, Gobbi K. Determination of trans-resveratrol concentrations in Brazilian red wines by HPLC. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2001; 14(4):441-5.
114. Sobolev VS, Cole RJ. trans-resveratrol content in commercial peanuts and peanut products. *J Agric Food Chem*. 1999; 47(4):1435-9.
115. Argel PJ, Pizarro EA. Germplasm case study: *A. pinto*. In: CIAT, editor. *Technology & Engineering Pastures for the tropical lowlands: CIAT's contribution*. Cali: CIAT; 1992. p. 57-74.
116. Bechara MD, Moretzsohn MC, Palmieri DA, Monteiro JP, Bacci M, Martins J, et al. Phylogenetic relationships in genus *Arachis* based on ITS and 5.8S rDNA sequences. *BMC Plant Biology*. 2010; 10(1):255.
117. Heller L. Markets: A global break-down for resveratrol (<http://www.nutraingredients.com/Industry/Markets-A-global-break-down-for-resveratrol>). William Reed Business Media; 2009 [cited 2011]; Available from: <http://www.nutraingredients.com/Industry/Markets-A-global-break-down-for-resveratrol>.
118. IFT. Resveratrol begins to catch on (<http://www.ameft.org/cms/?pid=1000056&pid=1478>). Chicago: Institute of Food Technologists; 2011 [cited 2011].
119. Cooksey C. J.; Garratt, P. J.; Richards, S. E.; Strange, R. N. A dienylyl stilbene phytoalexin from *Arachis hypogaea*. *Phytochemistry* 1988, 27, 1015–1016.
120. 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. *Afr. J. Biotechnol*. 2008, 7, 3788–3790.
121. Friend S. A.; Quandt D.; Tallury S. P.; Stalker H. T.; Hilu K. W. Species, genomes, and section relationships in the genus *Arachis* (Fabaceae): a molecular phylogeny. *Plant Syst Evol*. 2010, 199, 290:185.
122. Programa estatístico R. Disponível em <http://www.r-project.org/>. Acesso em 10 de abril de 2011.
123. Halls, C.; Yu, O. Potential for metabolic engineering of resveratrol biosynthesis. *Cell Press*. 2008, 26, 2, 77:81.



**APÊNDICE A - ARTIGO PUBLICADO**

## Chemical Composition and Biological Activities of *Arachis* Species

Renata Miranda Lopes,<sup>†,§</sup> Tânia da Silveira Agostini-Costa,<sup>§</sup> Marcos Aparecido Gimenes,<sup>§</sup> and Dâmaris Silveira<sup>\*,†</sup>

<sup>†</sup>Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro, Asa Norte, 70910-900 Brasília DF, Brazil

<sup>§</sup>Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Parque Estação Biológica PqEB, Av. W5 Norte (final), Caixa Postal 02372. Brasília DF, Brazil

**ABSTRACT:** *Arachis hypogaea*, known as the peanut, is native to South America. Peanut contains several active components including flavonoids, phenolic acids, phytosterols, alkaloids, and stilbenes. Some therapeutic effects have been reported for peanut seed extracts, such as antioxidative, antibacterial, antifungal, and anti-inflammatory activities. This paper aims to give an overview of the chemical composition, focusing on secondary metabolites, and of the biological activity of *A. hypogaea*, to stimulate new studies about species of the *Arachis* genus.

**KEYWORDS:** *Arachis hypogaea*, peanut, active constituents, biological activity

### INTRODUCTION

The genus *Arachis* L. (Fabaceae) is native to South America with a probable center of origin in Brazil, in a region extending from the southwest of Mato Grosso do Sul State to the south of Goiás.<sup>1</sup> The genus has 80 described species, grouped into 9 taxonomic sections. The most remarkable section is *Arachis*, because it includes *A. hypogaea*, the most economically important species, considered the fourth oleaginous plant in the world. This species is cultivated in Asia, Africa, and America, mainly for high-quality vegetal oil production, as a feedstock, and as natural or processed food for human consumption.<sup>1,2</sup> Beyond its nutritional characteristics and commercial value, several studies have pointed to the biological properties of *A. hypogaea*. Thus, the present review aims to examine the chemical composition and biological activity of *Arachis* species to stimulate new studies about this genus.

### ACTIVE CONSTITUENTS

The class of compound most found in this genus is that of phenylpropanoid derivatives, mainly stilbenes and flavonoids. These compounds are involved in a defense mechanism against physical injuries and microbial contamination. Indeed, the correlation between the concentration of several compounds and their effects on injuries or contamination has been fully reported. Therefore, this review does not intend to discriminate the described active compounds as having been isolated from healthy plants or from injured ones, considering that it is not rare for the same compounds to be found in both injured (mainly fungal contamination) and healthy specimens.<sup>3–12</sup>

**Stilbene Derivatives.** Since resveratrol was postulated to be involved in the health benefits associated with a moderate consumption of red wine, plant stilbenes have received notable interest.<sup>13</sup> Stilbenes are characterized by a 1,2-diphenylethylene backbone, usually derived from the basic unit *trans*-resveratrol (3,5,4'-trihydroxy-*trans*-stilbene, **1a**), although other structures are found in particular plant families.<sup>14</sup> Ring A usually carries two hydroxy groups in the *m*-position, whereas ring B is replaced by

hydroxy and methoxy groups in the *o*-, *m*-, or *p*-position. They are synthesized from cinnamic acid derivatives, and the substitution pattern of the cinnamic acids determines that of ring B of the adduct.<sup>15</sup>

Stilbenes are synthesized by a wide range of plant species; however, they are often in plants that are not routinely consumed for food or in the edible tissue. Peanuts (1.3–3.7 μg of resveratrol/g) and peanut butter are considered major dietary sources of stilbenes, along with grapes and their derivatives.<sup>15</sup>

Stilbene synthesis has been associated with resistance to some common peanut diseases, in particular to fungal contamination. As long as peanuts had the ability for phytoalexin production, they were not contaminated with aflatoxins.<sup>9</sup> Also, stilbene production is elicited by injuries, fungal contamination, insect damage, and other attacks.<sup>9,16</sup> However, stilbenes can be found in uninfected and uninjured plants, albeit in minor amounts.

The stilbenes that have been reported for several varieties from *A. hypogaea* in different organs from the plant, such as leaves, roots, and seeds, seem to be derived from *trans*-resveratrol (**1a**), such as piceid (**2**),<sup>17–19</sup> isopentadienylresveratrol (IPD) (*trans*-3'-isopentadienyl-3,5,4'-trihydroxystilbene, **3**),<sup>20</sup> piceatannol (3,4,3',5'-tetrahydroxy-*trans*-stilbene, **4**), arachidin-1 [*trans*-4-(3-methyl-1-butenyl)-3,5,3',4'-tetrahydroxystilbene, **5**], arachidin-2 (**6**), arachidin-3 [*trans*-4-(3-methyl-1-butenyl)-3,5,4'-trihydroxystilbene, **7**],<sup>11,21,22</sup> and *trans*-SB-1 (**8**).<sup>22</sup>

After an experiment using spores of *Aspergillus caelatus* NRRL to elicit phytoalexin production in peanuts, the stilbenes **1a**, **3**, and **5–8** were isolated, as well as chiricanine A (*trans*-4'-deoxyarachidin-2, **9**), arahypin-1 (*trans*-4'-deoxyarachidin-3, **10**), arahypin-2 [*trans*-3'-(2'',3''-dihydroxy-3''-methylbutyl)resveratrol, **11**], arahypin-4 [*trans*-4-(2'',3''-dihydroxy-3''-methylbutyl)-4'-deoxyresveratrol, **12**], arahypin-3 [*trans*-4-(2'',3''-dihydroxy-3''-methylbutyl)resveratrol, **13**], and arahypin-5 (**14**).<sup>8</sup> Keen

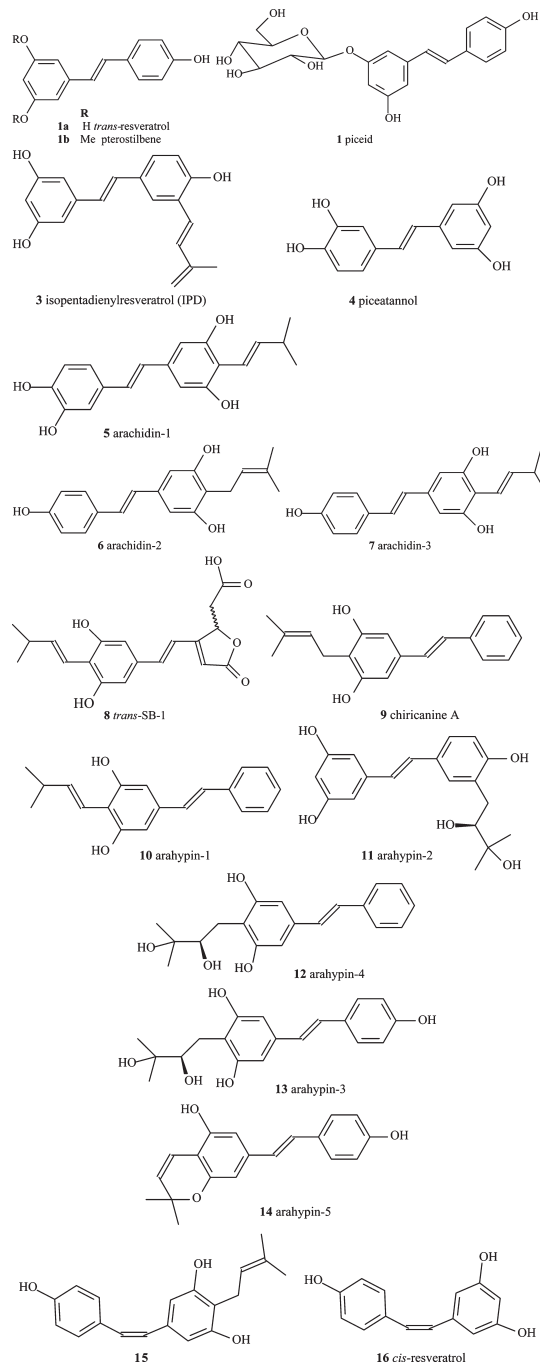
**Received:** December 12, 2010

**Revised:** March 20, 2011

**Accepted:** March 22, 2011

**Published:** March 22, 2011

and Ingham characterized the *cis*-3,5,4'-trihydroxy-4-isopentenylstilbene (**15**) from American varieties of *Arachis*.<sup>23</sup> Ingham also isolated the *cis*-isomer of resveratrol (**16**) from the infected hypocotyls of *A. hypogaea*.<sup>24</sup>

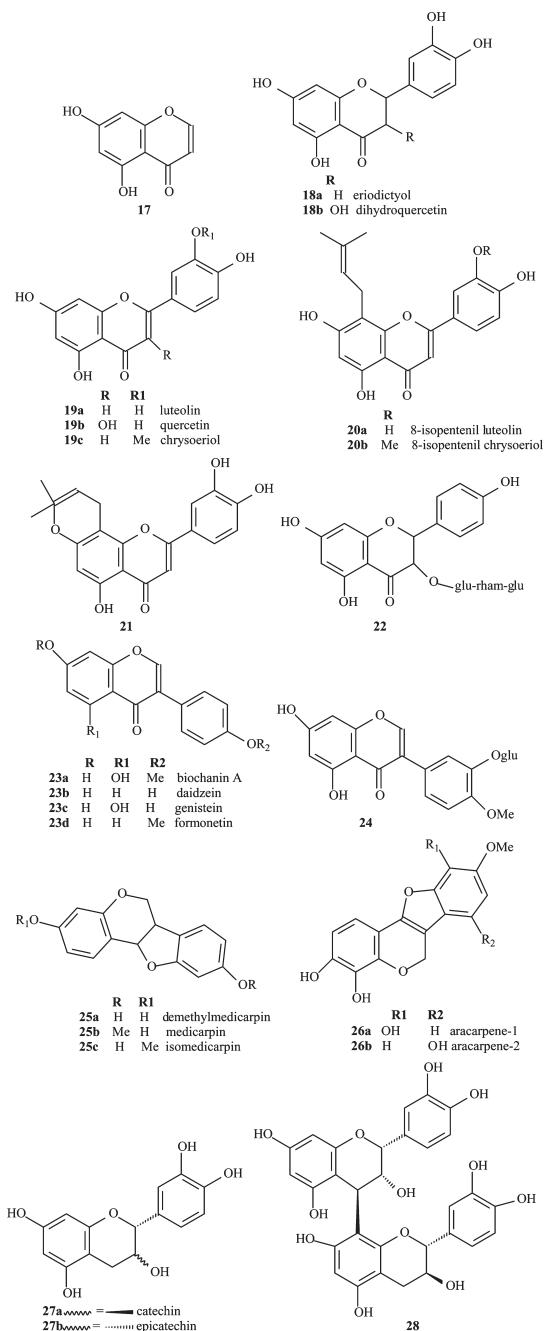


From hairy roots of *A. hypogaea* were isolated resveratrol (**1a**) and its derivative pterostilbene (**1b**).<sup>25</sup>

**Flavonoid Derivatives.** Flavonoids and derivatives can be found in both infected and uninfected *Arachis* plants. From peanut pods 5,7-dihydroxychromone (**17**), eriodictyol (**18a**), and luteolin (3',4',5',7-tetrahydroxyflavone) (**19a**),<sup>3,16</sup> dihydroquercetin (**18b**),<sup>26</sup> and chrysoeriol (**19c**) were isolated, as well as the derivatives 8-isopentenyl-luteolin (**20a**), 8-isopentenylchrysoeriol (**20b**), and 4',5-dihydroxy-2'',2''-dimethylpyrano[5'',6'':7,8]-

flavone (**21**).<sup>27</sup> The isorhamnetin glucoside (**22**) was also isolated from the water-soluble fraction of peanut skin,<sup>28</sup> whereas quercetin (**19b**) was isolated from the exudate of germinating peanut.<sup>29</sup>

The isoflavones biochanin A (**23a**), daidzein (**23b**), and genistein (**23c**)<sup>30</sup> and formonetin (**23d**)<sup>31,32</sup> can also be found, besides glucoside (**24**)<sup>28</sup> and medicarpin (**25b**) and demethylmedicarpin (**25a**).<sup>31,32</sup> It is important to consider that demethylmedicarpin (**25a**) seems to be a degradation product from medicarpin (**25b**). Isomedicarpin was isolated from aerial parts of *A. hypogaea* (**25c**).<sup>33</sup>

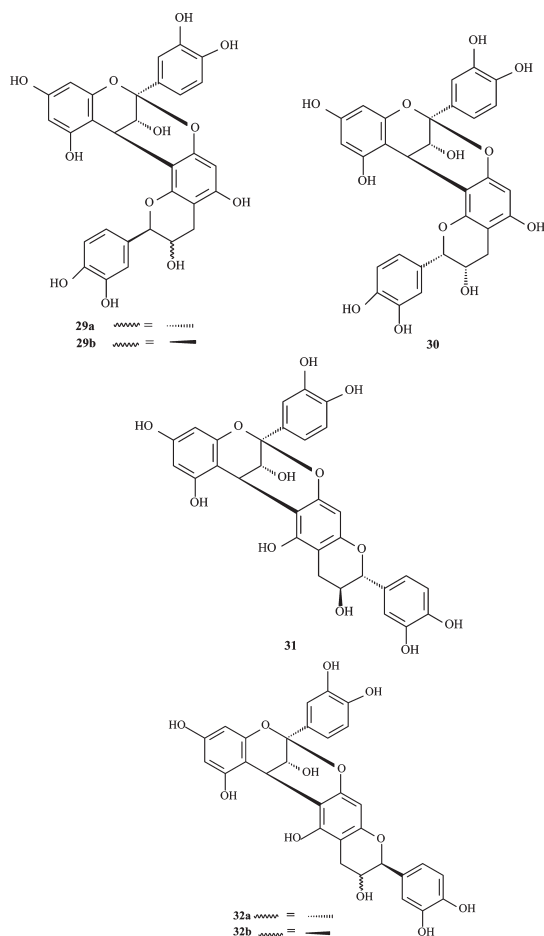


Medicarpin (**25b**) was able to promote bone mass and strength achieved at the end of the growth period, commonly designated peak bone mass (PBM), in a *ex vivo* model and likely acts via estrogen receptor  $\beta$  (ER $\beta$ ) in osteoblasts.<sup>34</sup>

This compound was also isolated from fungus-infected leaves of *A. hypogaea*, as well as the pterocarpan arcarpene-1 (**26a**) and arcarpene-2 (**26b**).<sup>35</sup> Pterocarpan is a class of compounds considered to have the highest antifungal activity among the phytoalexins in the flavonoid-based group of compounds.<sup>36</sup>

The ethyl acetate fraction from aqueous extract of peanuts skin gave catechin (**27a**), epicatechin (**27b**), the condensation product **28**, and the proanthocyanidins A<sub>1</sub> (**29a**) and A<sub>2</sub> (**29b**).

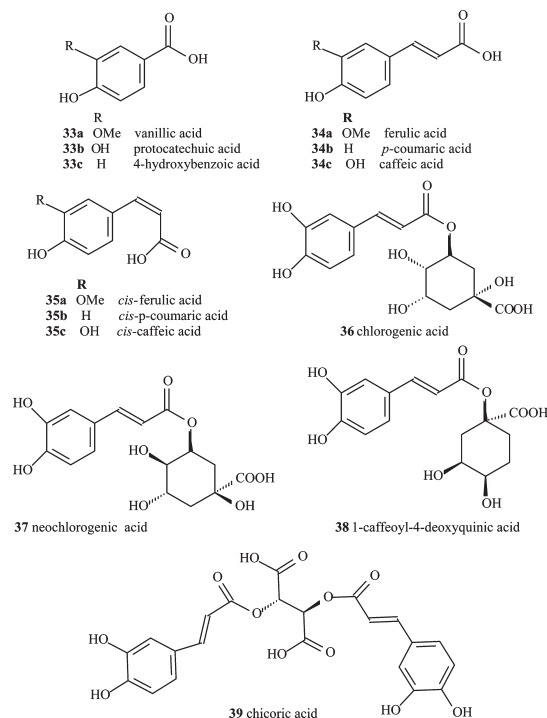
Roasted peanut skins exhibit a considerable content of proanthocyanidin.<sup>37</sup> Six A-type proanthocyanidins were isolated from the water-soluble fraction of peanut skins, the proanthocyanidins A<sub>1</sub> (**29a**), A<sub>2</sub> (**29b**), and **29a** epimer (**30**), as well as compounds **31**, **32a**, and **32b**.<sup>38</sup>



**Phenolic Acids.** From exudate of germinating peanut were isolated the phenolic acids vanillic (4-hydroxy-3-methoxybenzoic acid, **33a**), protocatechuic (3,4-dihydroxybenzoic acid, **33b**), ferulic (4-hydroxy-3-methoxycinnamic acid, **34a**), and caffeic (4-hydroxycinnamic acid, **34b**).<sup>29</sup>

From peanut roots inoculated with mycorrhizal and *Rhizobium*, besides vanillic (**33a**), protocatechuic (**33b**), ferulic (**34a**), and *p*-coumaric (**34b**) acids, 4-hydroxybenzoic acid (**33c**), caffeic acid (**34c**), the *cis*-isomers from **34a**, **34b**, and **34c** (**35a**–**35c**, respectively), and chlorogenic acid (**36**)<sup>5</sup> were isolated. Ferulic (**33a**) and *p*-coumaric (**33b**) acids were also isolated as major compounds from dry-roasted peanuts.<sup>39</sup> Compounds **1a**, **2**, and **34a**–**34c** were also detected in peanuts submitted to combined ultrasound and ultraviolet treatments.<sup>40</sup>

Chlorogenic acid (**36**) was also isolated from leaves of *A. paraguariensis*, besides neochlorogenic (**37**) and 1-caffeoyl-4-deoxyquinnic acid (**38**).<sup>41</sup>



Chicoric acid (**39**)<sup>42</sup> was isolated from partially opened vegetative quadrifoliate leaf buds of peanuts presenting late leaf spot disease fungus (*Cercosporidium personatum*), insect tobacco thrips (*Frankliniella fusca*), and potato leafhopper (*Empoasca fabae*).

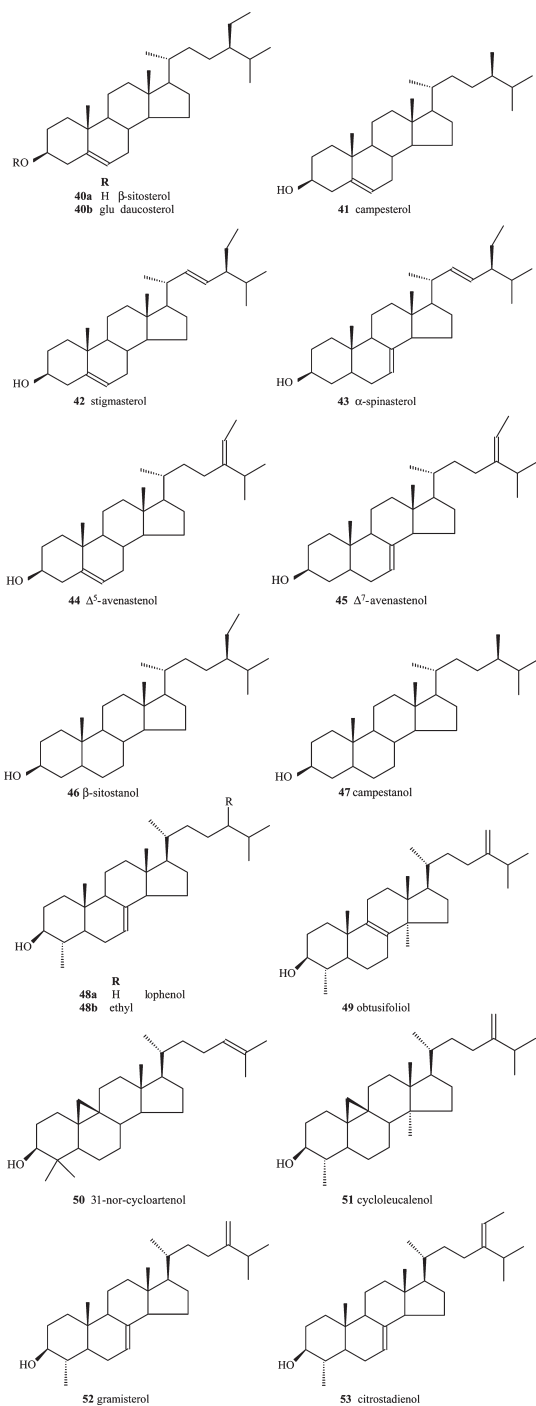
**Phytosterols.** In peanut butter, oil and groundseed were found  $\beta$ -sitosterol (**40a**), campesterol (**41**), stigmasterol (**42**),  $\alpha$ -spinasterol (**43**),  $\Delta^5$ -avenasterol (**44**),  $\Delta^7$ -avenasterol (**45**), sitostanol (**46**), and campestanol (**47**).<sup>43–50</sup> A similar steroid composition was found in other *Arachis* species such as *A. sylvestris*, *A. pintoi*, *A. chinquitana*, *A. appresipila*, *A. kretschmeri*, *A. matiensis*, *A. trinitensis*, *A. kempff-mercadoi*, *A. diogoi*, *A. benensis*, *A. valida*, *A. helodes*, *A. kuhlmannii*, *A. williamsii*, *A. hoehnei*, *A. villosa*, *A. stenosperma*, *A. fastigiata* var. *fastigiata*, and *A. fastigiata* var. *peruviana*.<sup>44,47</sup> According to the authors,<sup>47</sup> there were no significant changes in steroid content.  $\beta$ -Sitosterol (**40a**) was also isolated from aerial parts of *A. hypogaea*, as well as daucosterol (**40b**).<sup>33</sup>

Other phytosterols can be found in *Arachis*: lophenol (**48a**), 24-ethyllophenol (**48b**), obtusifoliol (**49**), 31-norcycloartenol (**50**), cycloleucalenol (**51**), gramisterol (**52**), and citrostadienol (**53**).<sup>45,51</sup>

**Triterpenes.** The presence of triterpene in peanut oil is not surprising, considering that triterpenes and sterols are synthesized via the same metabolic route and *Arachis* oil is rich in sterols, mainly  $\beta$ -sitosterol (**40a**). The most usual triterpenes in peanut seem to be cycloartenol (**54**), cycloartenol (**55a**), cyclobranol (**55b**), 24-methylenecycloartenol (**56**),  $\beta$ -amyrin (**57**), and lupeol (**58**).<sup>45,51,52</sup>

From roots were isolated sophoradiol (**59a**) and soyasapogenol B (**59b**).<sup>53</sup> Soyasapogenol B (**59b**) was also isolated from aerial parts.<sup>33</sup> From groundnuts were isolated **59b** and its glucoside soyasaponin I (**59c**).<sup>54</sup>

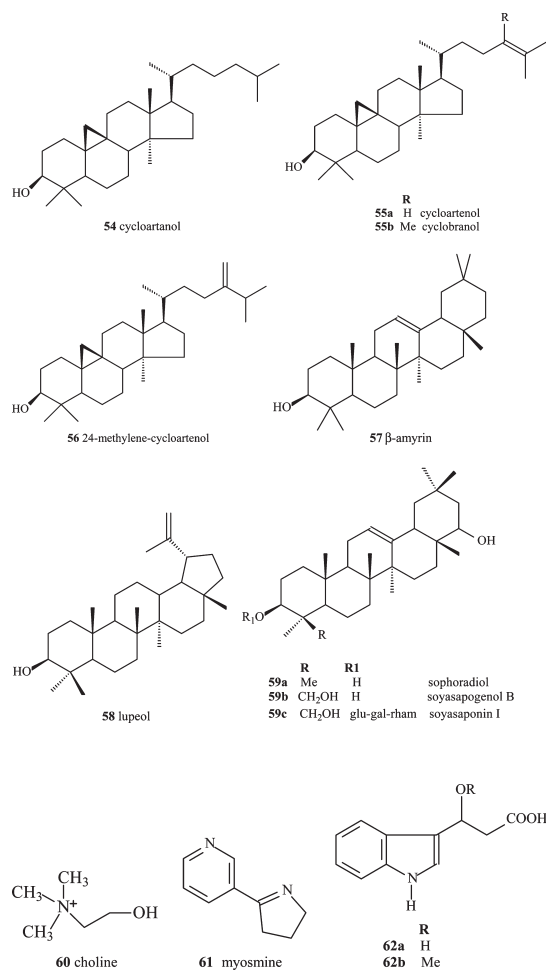
**Alkaloids.** There are few reports of the occurrence of alkaloids in the *Arachis* genus. Probably the first report of these compounds in *Arachis* was made by Mooser (1904), which described the alkaloid named arachine.<sup>55</sup> However, Moll (1961) showed that arachine was, in fact, choline (**60**).<sup>56</sup>



Myosmine [3-(1-pyrroline-2-yl)pyridine, **61**] was first structurally identified as a tobacco alkaloid present along with nicotine in tobacco smoke, presenting low toxicity to mammals.<sup>57</sup> Myosmine (**61**) was detected in untreated and roasted groundnuts, as well as in the oil from both untreated and roasted groundnuts.<sup>57</sup>

From the water-soluble fraction of peanut skins were isolated 2-hydroxyl-3-[3-(1-N-methyl)indolyl]propionic acid (**62a**) and 2-methoxyl-3-(3-indolyl)-propionic acid (**62b**).<sup>28</sup>

**Fatty Acids.** The following fatty acids were detected in several varieties of peanut (*A. hypogaea*): palmitic (16:0), stearic (18:0), oleic (18:1), linoleic (18:2), arachidic (20:0), eicosenoic (gadoleic) (20:1), behenic (22:0), and lignoceric (24:0) acids.<sup>58–60</sup> However, no significant differences could be found among varieties.<sup>46,52</sup> The same fatty acid composition was found in other species from the *Arachis* genus, such as *A. sylvestris*, *A. pinto*, *A. chinquitana*, *A. appressipila*, *A. kretschmeri*, *A. matiensis*, *A. trinitensis*, *A. kempff-mercadoi*, *A. diogoi*, *A. benensis*, *A. valida*, *A. helodes*, *A. kuhlmannii*, *A. williamsii*, *A. hoehnei*, *A. currentina*, *A. durannensis*, *A. monticola*, *A. batizocoi*, *A. cardenasii*, *A. villosa*, *A. stenosperma*, *A. fastigiata* var. *fastigiata*, and *A. fastigiata* var. *peruviana*.<sup>44,47,61</sup> Peanut, peanut oil, and peanut butter from six varieties of *A. hypogaea* from Nigeria and two from Turkey also presented capric (10:0), lauric (12:0), myristic (14:0), palmitoleic (16:1n-7), and linolenic acids (18:3).<sup>58,62</sup>

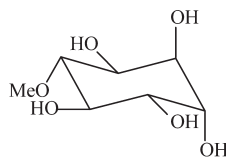


The fatty acid composition usually varies among species, except for stearic acid.<sup>47</sup> Oleic and linoleic acids were the major components of the fatty acid fraction from groundnut oil.<sup>52,63</sup>

**Other Compounds.** The inositol D-pinitol (**63**) was isolated from groundnuts.<sup>64</sup> Among vitamins, 5-formyltetrahydrofolate was found to be the most important folate vitamin in peanut.<sup>65</sup> Peanuts are a good source of tocopherol (vitamin E).<sup>48</sup>

The characteristic odor from raw or roasted peanut is due to several compounds such as 2- and 3-methylbutanal, phenylacetaldehyde, ethyl 2-methylbutanoate, ethyl 3-methylbutanoate, butanoic acid, methylbutanoic acid, 4-vinylphenol,

2-methoxyphenol, 2-methoxy-4-vinylphenol,  $\beta$ -pinene, limonene,  $\alpha$ -terpineol, and sulfur compounds such as 3-(methylthio)-propionaldehyde, 4-hydroxy-2,5-dimethyl-3(2*H*)-furanone, ethyl 2-methylbutanoate, 2,5-ethyl-3-dimethylpyrazine, 2,3-diethyl-5-methylpyrazine, (*Z*)-2-nonenal, (*E,E*)-2,4-decadienal, (*E*)- $\beta$ -damascenone, 4-hydroxy-3-methoxybenzaldehyde, and others.<sup>66</sup>



63 D-pinitol

## ■ BIOLOGICAL ACTIVITIES OF *A. HYPOGAEA*

The traditional use of peanuts for a medicinal purpose has been reported since ancient times. In 2003, a Qualified Health Claim was approved, stating that eating 42 g of nuts per day may reduce the risk of heart disease.<sup>67</sup> Peanut skins are used to treat chronic hemorrhage and bronchitis in China.<sup>68</sup> Groundnut extracts have been used in the management of diabetic patients in northern Nigeria.<sup>68</sup> In fact, *Arachis* is used to lower cholesterol, aid weight loss, and prevent cardiovascular diseases and cancer.<sup>69</sup>

Peanuts have been shown to have a favorable nutrient profile, presenting several highly valued dietary constituents, including dietary fibers, proteins, micronutrients, and phytochemicals such as phytosterols, phenolics, stilbenes, and arginine,<sup>70,71</sup> which elicit several biological effects, including cardioprotective, anti-inflammatory, anticancer, and others. Indeed, resveratrol (**1a**), luteolin (**19a**), quercetin (**19b**), and many other phytochemicals have already been isolated from peanut tissues, including industrial residues (shells, leaves, roots, etc.), presenting many biological activities.

The leaves of *A. hypogaea* have astringent action and several biological properties. They are used therapeutically against abdominal pain, bronchitis, constipation, and flatulence.<sup>72</sup> Peanut also has therapeutic effects as a solvent for bleeding in hemophiliacs.<sup>73</sup>

Peanuts are a rich source of magnesium, folate, fiber,  $\alpha$ -tocopherol, copper, and arginine,<sup>74</sup> and dietary consumption of peanuts has been stimulated.<sup>70</sup> Although the biological activity of pure compounds has been proved, the intake of peanuts or their extract may sometimes be more favorable than the ingestion of pure phytochemicals. For example, the absorption of luteolin (**19a**) was proved to be more efficient from peanut hull extract than that of the pure compound.<sup>75</sup>

**Anti-inflammatory Activity.** Usually all tested peanut stilbenoids presented anti-inflammatory activities; this could be attributed to the fact that stilbenoids bear a 4'-hydroxyl group, as the most important determinant of bioactivity.<sup>76</sup> Arachidin-1 (**5**), piceatannol (**4**), and resveratrol (**1a**) could effectively inhibit lipopolysaccharide (LPS)-induced nitric oxide (NO) production; piceatannol (**4**) presents strongest inhibitory potency on LPS-induced prostaglandin E<sub>2</sub>/NO production, C/EBP $\delta$  gene expression, and nuclear factor- $\kappa$ B activation.<sup>77</sup> In general, arachidin-1 (**5**), piceatannol (**4**), and resveratrol (**1a**) perform effective anti-inflammatory activity following an identical mechanism but with different potencies among molecules. The authors suggested these compounds might be of importance in further development for nutraceutical or chemopreventive applications.<sup>77</sup>

Resveratrol (**1a**), in an ex vivo model, inhibited TNF- $\alpha$  and IL-6 released from macrophages, thereby suppressing macrophage-CM-induced inflammatory response in adipocytes.<sup>78</sup> Also, resveratrol exerts anti-inflammatory effects in microglia and astrocytes by inhibiting different pro-inflammatory cytokines and key signaling molecules.<sup>79</sup>

Resveratrol (**1a**) treatment of mice presented protection against colitis through up-regulation of SIRT1 in immune cells in the colon.<sup>80</sup>

**Antitumor Activity.** There is evidence suggesting a protective role of phytosterols, especially  $\beta$ -sitosterol (**40a**), in colon, prostate, and breast cancer.<sup>81</sup> Because peanuts and their products, such as peanut oil, peanut butter, and peanut flour, are good sources of phytosterols, consuming these products can bring health benefits.<sup>81</sup>

Piceatannol (**4**), arachidin-1 (**5**), and resveratrol (**1a**) also showed high cytotoxicity in mouse macrophages.<sup>77</sup> On the basis of in vitro, ex vivo, and animal studies, resveratrol (**1a**) and derivatives inhibit cellular events associated with the beginning, promotion, and progression of tumors.<sup>82–84</sup> Resveratrol inhibits free radical formation, which will inhibit tumor formation; it acts as an antimutagen, because it induces the quinone reductase able to detoxify carcinogens; moreover, it inhibits the development of preneoplastic lesions.<sup>15</sup>

Depending on the concentration and cell type, resveratrol (**1a**) can act as a pro-oxidant molecule, and this effect could be an important action mechanism for its anticancer and pro-apoptotic properties.<sup>85</sup>

Arachidin-1 (**5**), arachidin-3 (**7**), isopentadienylresveratrol (**3**), and resveratrol (**1a**) have been isolated from germinating peanut kernels and characterized as antioxidant and anti-inflammatory agents. Some studies have indicated that **1a** induces programmed cell death (PCD) in human leukemia HL-60 cells, and the anticancer activity of these stilbenoids was determined in the same lineage cells. Arachidin-1 (**5**) had the highest efficacy in inducing PCD in HL-60 cells, with an approximately 4-fold lower EC<sub>50</sub> than resveratrol (**1a**), causing mitochondrial membrane damage, activation of caspases, and nuclear translocation of apoptosis-inducing factor and resulting in chromosome degradation and cell death. Therefore, **5** induces PCD in HL-60 cells through caspase-dependent and caspase-independent pathways. Arachidin-1 (**5**) demonstrates its efficacy as an anticancer agent by inducing caspase-independent cell death, which is an alternative death pathway of cancer cells with mutations in key apoptotic genes.<sup>86</sup>

Oral administration of resveratrol at a daily dose of 15 mg/kg was effective as chemopreventive treatment for pulmonary metastasis of the challenged CT26 cells. More than 57.1% of the CT26-challenged BALB/c mice treated with resveratrol were free of tumor nodules in their lungs. Of further merit is the observation that resveratrol-treated mice that survived were highly resistant (100%) to tumor colonization by the second challenge of CT26 cells.<sup>87</sup>

Hypotin, a protein isolated from *Arachis* seeds, showed anti-proliferative activity toward human liver hepatoma Bel-7402 cells.<sup>88</sup>

Isoflavones are an important group of the phytochemicals that have been reported not only to have anticarcinogenic properties but also to play a role in the mitigation of osteoporosis in postmenopausal women.<sup>30</sup>

**Antifungal Activity.** The protein hypogin was isolated from seeds of peanut and shows inhibitory activity on the growth of the

fungi *Mycosphaerella arachidicola*, *M. berkeleyi*, *Fusarium oxysporum*, and *Coprinus comatus*.<sup>89,90</sup> Hypotin exerted potent antifungal action against various fungal species, including *Pythium aphanidermatum*, *Botrytis cinerea*, *Alternata alternata*, *Physalospora piricola*, *Fusarium solani*, and *F. oxysporum*.<sup>88</sup> From roots of peanut two antifungal proteins named PAFP-I and PAFP-II were purified to homogeneity and characterized, and these showed strong in vitro growth inhibition of *Trichoderma viride*, *B. cinerea*, and *Cladosporium* spp.<sup>91</sup>

The chromone **17** presented antimicrobial activity against soil pathogenic fungi *R. solani* and *Sclerotium rolfisii*.<sup>92</sup> This suggests **17** plays a role in the protection of peanuts against fungal contamination, together with resveratrol (**1a**) and derivatives. Furthermore, the stilbene derivative **3** was inhibitory to both spore germination and hyphal extension of the fungus *Aspergillus flavus*.<sup>20</sup>

**Antibacterial and Antiproliferative Activity.** The aqueous extract from peanut leaves presented antibacterial activity against *Enterobacter aerogenes* and *Klebsiella pneumoniae*.<sup>72</sup> The ethanol extract was also active against *K. pneumoniae*. In contrast, these extracts were inactive against *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, and *Salmonella typhimurium*.<sup>72</sup>

Hypotin exerted antibacterial activity toward the Gram-positive bacterium *Staphylococcus aureus*. However, this protein did not present any effect against Gram-negative strains.<sup>88</sup>

**Antioxidant Effects.** The antioxidant activity of peanuts has been widely reported. Several authors describe different models to assess this activity,<sup>29,93,94</sup> usually attributed to the phenolic contents.<sup>39,95</sup> The methanol extract from peanut presented 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical-scavenging activity. The isolated stilbenes resveratrol (**1a**), IPD (**3**), arachidin-1 (**5**), and arachidin-3 (**7**) displayed potent antioxidant activity; in particular, arachidin-1 (**5**) showed equivalent or even better antioxidant activity than BHT did.<sup>76</sup> The compounds quercetin (**19b**), 3,4-dihydroxybenzoic acid (**33b**), ferulic acid (**34a**), and 4-hydroxycinnamic acid (**34b**) presented potent antioxidant activity in DPPH as well as ABTS assays.<sup>29</sup>

In dry-roasted peanuts, *p*-coumaric acid (**34b**) seems to be responsible for the major antioxidant activity among the isolated polyphenols.<sup>39</sup> The antioxidant capacity of whole extracts from roasted peanut skins was determined by various methods (i.e., total antioxidant capacity, ORAC, DPPH test, and reducing power), and the results showed that these extracts present high antioxidant activity, mainly due to the polyphenol content.<sup>37</sup>

The volatile fraction from a Pakistani cultivar of peanut exhibits antiradical activities by both DPPH and phosphomolybdenum complex methods, as well as an antioxidant potential similar to that of butylated hydroxytoluene (BHT).<sup>96</sup>

**Hypoglycemic and Hypolipidemic Activities.** Frequent nut consumption, including that of peanut, is associated with a reduced risk of developing diabetes and cardiovascular disease. The exact mechanisms are not known but may relate to beneficial changes in blood lipids and reduction in oxidative damage and inflammatory biomarkers.<sup>97</sup> The low-density lipoprotein-cholesterol (LDL-C)-lowering response of peanut studies is greater than expected on the basis of the blood cholesterol-lowering equations that are derived from changes in the fatty acid profile of the diet. Thus, in addition to a favorable fatty acid profile, peanuts contain other bioactive compounds that explain their multiple cardiovascular benefits.<sup>71</sup>

Peanut shell ethanol extract was screened for inhibitory effects on pancreatic lipase (PL) and lipoprotein lipase (LPL) activities

as well as on lipolysis of 3T3-L1 adipocytes. Treated Wistar rats showed increased fecal lipid excretion compared to that of the control group. Body weight, body weight gain, and liver size were significantly lower in rats fed the high-fat diet with 1% of extract than in those fed the high-fat diet alone. Additionally, the rats treated with peanut extract showed reduced triacylglycerol content in the liver, as well as serum glucose and insulin. The observed decline in intracellular lipolytic activity of cultured 3T3-L1 adipocytes suggests that peanut ethanol extract may reduce the levels of circulating free fatty acids. The observed effects may, at least in part, be attributed to the fat absorption inhibition in the digestive tract and the decrease in adipocyte lipolysis.<sup>98</sup> Also, resveratrol (**1a**) presented reversed inflammation-related adverse changes in adipokines, facilitated insulin signaling transduction by phosphorylation modification of IRS-1, and improved insulin sensitivity in 3T3-L1 cells.<sup>78</sup>

In an experiment with streptozotocin-induced diabetic rats, diet supplementation with peanut in the diabetic group led to significantly higher high-density lipoprotein-cholesterol (HDL-C) levels and lower atherogenic index (AI) levels compared to a control group. In addition, peanut consumption increased glutathione (GSH) levels significantly in both control and diabetic groups, showing that peanut consumption may improve oxidant-antioxidant status in healthy and diabetic rats without increasing blood lipids, suggesting that peanut consumption may have protective effects against cardiovascular complications of diabetes.<sup>99</sup>

The aqueous extract from groundnuts was evaluated for hypoglycemic and hypolipidemic activity on alloxan-induced diabetic rats. The extract promoted a decrease in glucose level, as well as causing a drop in serum triglyceride, total cholesterol, LDL-C, and HDL-C in both normal and diabetic rats.<sup>68</sup> Because of their structure, stilbenes, if absorbed, could accumulate at the water-lipid boundary and might therefore protect LDLs and cellular membranes from oxidative damage.<sup>15</sup> Recent human clinical trials have demonstrated the cardiovascular protective properties of *A. hypogaea* in decreasing LDL-C without reducing HDL-C.<sup>100,101</sup> Peanut, peanut oil, and fat-free peanut flour reduced the cardiovascular disease factor and the development of atherosclerosis in animals consuming an atherosclerosis-inducing diet.<sup>101</sup>

A 30-week, randomized, crossover trial study conducted with healthy Ghanaian adults suggested that regular consumption of peanuts lowers the total cholesterol and triacylglycerol concentrations.<sup>102</sup> In addition, peanut oil consumption can elicit significant blood pressure reduction in normolipidemic adults.<sup>103</sup>

The protein arachin and its hydrolysis products are at least partly responsible for the hypotensive activity of peanuts, due to angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibition activity.<sup>104</sup>

**Antiplatelet Aggregation Activity.** The antiplatelet activity of phenolic compounds isolated from *A. hypogaea* was determined in washed rabbit platelets. Eriodictyol (**18**), luteolin (**19a**), chrysoeriol (**19c**), 8-isopentenyl-luteolin (**20a**), 8-isopentenylchrysoeriol (**20b**), and the luteolin derivative **21** inhibited platelet aggregation induced by arachidonic acid, collagen, platelet-activating factor (PAF), and thrombin in a concentration-dependent manner.<sup>27</sup>

Fat-free peanut flour, peanuts, and peanut oil were evaluated for their effects on cardiovascular disease risk factors in male Syrian golden hamsters. All samples (fat-free peanut flour, peanuts, and peanut oil) were able to retard the development of atherosclerosis in animals consuming an atherosclerosis-inducing diet.

In addition, the results showed they were able to retard the increase of aortic cholesteryl ester, a primary metabolic parameter associated with the development of atherosclerosis, suggesting that peanuts, peanut oil, and fat-free peanut flour retard the development of atherosclerosis.<sup>101</sup>

**Enzyme Inhibition.** Water-soluble fractions from peanut skins present the ability to inhibit hialuronidase activity, because of the presence of tannin and proanthocyanidins.<sup>38</sup>

Protease inhibitors presenting low molecular weights were isolated from peanut seeds. They were able to inhibit bovine trypsin and chymotrypsin.<sup>105–107</sup>

The protein hypogin presents suppressive action on human immunodeficiency virus (HIV) reverse transcriptase and enzymes associated with HIV infection, including  $\alpha$ - and  $\beta$ -glucosidase.<sup>89</sup>

**Sedative and Hypnotic Effect.** The aqueous extract from *A. hypogaea* leaves presented a mildly hypnotic effect on sleep ameliorations in rats.<sup>108</sup>

**Other Effects.** Clinical trials reveal little or no weight change with inclusion of various types of nuts in the diet over 1–6 months, and mechanistic studies indicate this is largely attributable to the high satiety properties of nuts. Additionally, due to resistance of the cell walls of nuts to degradation in the intestinal tract and poor bioaccessibility of lipids, there is a limited efficiency of energy absorption. The literature suggests nuts may be included in the diet, in moderation, to enhance palatability and nutrient quality without posing a threat of weight gain.<sup>103</sup> Also, the consumption of peanuts may augment energy expenditure, suggesting that this food may be useful in the management of obesity.<sup>109</sup>

Allelopathy includes both positive and negative effects of one plant or substance on another through the environment. It plays a key role in both natural and managed ecosystems. In agroecosystems, several weeds, crops, agro-forestry trees, and fruit trees have been shown to exert an allelopathic influence on the crops, adversely affecting their germination and growth. The chromone 17, isolated from peanut shells, presents phytotoxicity (radicle elongation).<sup>92</sup> Also, 17 can inhibit the germination of velvetleaf (*Abutilon theophrasti* Medic) seeds.<sup>110</sup>

The procyanidin level is related to resistance of *Arachis* species against *Aphis craccivora*. The high concentration of procyanidin can inhibit the fertility of this aphid.<sup>111</sup>

The caffeic acid derivatives 36–38 and the flavonoid quercetin 19b can inhibit the development of *Spodoptera litura* larvae. The resistance of *A. paraguayensis* to attachment of these larvae seems to be due to the presence of these compounds.<sup>41</sup>

The saponin-rich fraction from hydroethanol extract of peanuts inhibits both the emergence and development of *Callosobruchus chinensis* larvae, an important pest of stored seeds.<sup>112</sup> The oil of *A. hypogaea* presented toxicity on the larval development of *C. maculatus*.<sup>113</sup>

D-Pinitol (63) presents larvicidal activity against *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus*.<sup>64</sup>

The species *A. hypogaea* is commonly remembered as a good source of oil and protein, but studies have shown that peanuts have a strong potential as functional food besides having therapeutic and other biological uses. Peanuts present great diversity of secondary metabolites, and many of them are responsible for plant defense against herbivores or pathogenic microorganisms and for response to damage in any plant tissue, as well as protection against ultraviolet radiation.

Several *Arachis* wild species have higher resistance levels to diseases when compared to *A. hypogaea* germplasm accessions,<sup>114</sup> so it is believed that those species have higher concentrations of these metabolites. Therefore, phytochemical and pharmacological studies with wild species are necessary, seeking new potential genetic resources for application in medicine, agriculture, and food science as for the commercial species.

## AUTHOR INFORMATION

### Corresponding Author

\*E-mail: damaris@unb.br. Phone: +55-61-3307-2979. Fax: +55-61-3340-2134.

## REFERENCES

- (1) Freitas, F. O.; Moretzsohn, M. C.; Valls, J. F. Genetic variability of Brazilian Indian landraces of *Arachis hypogaea* L. *Genet. Mol. Res.* **2007**, *6*, 675–684.
- (2) Raina, S. N.; Rani, V.; Kojima, T.; Ogihara, Y.; Singh, K. P.; Devarumath, R. M. RAPD and ISSR fingerprints as useful genetic markers for analysis of genetic diversity, varietal identification, and phylogenetic relationships in peanut (*Arachis hypogaea*) cultivars and wild species. *Genome* **2001**, *44*, 763–772.
- (3) Pendse, R.; Rao, A. V.; Venkataraman, K. 5,7-Dihydroxychromone from *Arachis hypogaea* shells. *Phytochemistry* **1973**, *12*, 2033–2034.
- (4) 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 Sci. Biotechnol.* **2008**, *17*, 475–482.
- (5) Charitha Devi, M.; Reddy, M. N. Phenolic acid metabolism of groundnut (*Arachis hypogaea* L.) plants inoculated with VAM fungus and *Rhizobium*. *Plant Growth Regul.* **2002**, *37*, 151–156.
- (6) 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. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 3505–3511.
- (7) Sobolev, V. S.; Neff, S. A.; Gloer, J. B. New dimeric stilbenoids from fungal-challenged peanut (*Arachis hypogaea*) seeds. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 875–881.
- (8) Sobolev, V. S.; Neff, S. A.; Gloer, J. B. New stilbenoids from peanut (*Arachis hypogaea*) seeds challenged by an *Aspergillus caelatus* strain. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 62–68.
- (9) Sobolev, V. S.; Guo, B. Z.; Holbrook, C. C.; Lynch, R. E. Interrelationship of phytoalexin production and disease resistance in selected peanut genotypes. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 2195–2200.
- (10) Sobolev, V. S.; Deyrup, S. T.; Gloer, J. B. New peanut (*Arachis hypogaea*) phytoalexin with prenylated benzenoid and but-2-enolide moieties. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 2111–2115.
- (11) Sobolev, V. S.; Cole, R. J.; Dorner, J. W.; Yagen, B. Isolation, purification, and liquid chromatographic determination of stilbene phytoalexins in peanuts. *J. AOAC Int.* **1995**, *78*, 1177–1182.
- (12) Sobolev, V. S.; Cole, R. J. *trans*-Resveratrol content in commercial peanuts and peanut products. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 1435–1439.
- (13) Stervbo, U.; Vang, O.; Bonnesen, C. A review of the content of the putative chemopreventive phytoalexin resveratrol in red wine. *Food Chem.* **2007**, *101*, 449–457.
- (14) Chong, J.; Poutaraud, A.; Huguency, P. Metabolism and roles of stilbenes in plants. *Plant Sci.* **2009**, *177*, 143–155.
- (15) Cassidy, A.; Hanley, B.; Lamuela Raventos, R. M. Isoflavones, lignans and stilbenes – origins, metabolism and potential importance to human health. *J. Sci. Food Agric.* **2000**, *80*, 1044–1062.
- (16) 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. *Afr. J. Biotechnol.* **2008**, *7*, 3788–3790.



- (17) Tokusoglu, O.; Unal, M. K.; Yemis, F. Determination of the phytoalexin resveratrol (3,5,4'-trihydroxystilbene) in peanuts and pistachios by high-performance liquid chromatographic diode array (HPLC-DAD) and gas chromatography–mass spectrometry (GC-MS). *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 5003–5009.
- (18) Sanders, T. H.; McMichael, R. W.; Hendrix, K. W. Occurrence of resveratrol in edible peanuts. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 1243–1246.
- (19) Chen, R. S.; Wu, P. L.; Chiou, R. Y. Y. Peanut roots as a source of resveratrol. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 1665–1667.
- (20) Cooksey, C. J.; Garratt, P. J.; Richards, S. E.; Strange, R. N. A dienyln stilbene phytoalexin from *Arachis hypogaea*. *Phytochemistry* **1988**, *27*, 1015–1016.
- (21) Ku, K. L.; Chang, P. S.; Cheng, Y. C.; Lien, C. Y. Production of stilbenoids from the callus of *Arachis hypogaea*: a novel source of the anticancer compound piceatannol. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 3877–3881.
- (22) Sobolev, V. S. Localized production of phytoalexins by peanut (*Arachis hypogaea*) kernels in response to invasion by *Aspergillus* species. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 1949–1954.
- (23) Keen, N. T.; Ingham, J. L. New stilbene phytoalexins from American cultivars of *Arachis hypogaea*. *Phytochemistry* **1976**, *15*, 1794–1795.
- (24) Ingham, J. L. 3,5,4'-Trihydroxystilbene as a phytoalexin from groundnuts (*Arachis hypogaea*). *Phytochemistry* **1976**, *15*, 1791–1793.
- (25) 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* **2007**, *68*, 1992–2003.
- (26) Hsu, W.-C.; Cho, P. J.; Wu, M. J.; Chiou, R. Y. Y. A rapid and small-scale method for estimating antioxidative potency of peanut sprouts. *J. Food Sci.* **2002**, *67*, 2604–2608.
- (27) Tsai, W. J.; Lin, Y. L.; Ho, Y. C.; Kuo, Y. C. Inhibition of cyclic AMP phosphodiesterase and blockage of arachidonate metabolism by antiplatelet principles from the seed hulls of *Arachis hypogaea* L. *Zhonghua Yaoxue Zazhi* **2003**, *55*, 335–345.
- (28) Lou, H. X.; Yuan, H. Q.; Yamazaki, Y.; Sasaki, T.; Oka, S. C. Alkaloids and flavonoids from peanut skins. *Planta Med.* **2001**, *67*, 345–349.
- (29) Lee, J. H.; Baek, I. Y.; Kang, N. S.; Ko, J. M.; Kim, H. T.; Jung, C. S.; Park, K. Y.; Ahn, Y. S.; Suh, D. Y.; Ha, T. J. Identification of phenolic compounds and antioxidant effects from the exudate of germinating peanut (*Arachis hypogaea*). *Food Sci. Biotechnol.* **2007**, *16*, 29–36.
- (30) 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*). *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 285–290.
- (31) Edwards, C.; Strange, R. N.; Cole, D. L. Accumulation of isoflavonoid phytoalexins in leaves of *Arachis hypogaea* differing in reaction to rust (*Puccinia arachidis*) and early leafspot (*Cercospora arachidicola*). *Plant Pathol.* **1995**, *44*, 573–579.
- (32) Edwards, C.; Strange, R. N. Separation and identification of phytoalexins from leaves of groundnut (*Arachis hypogaea*) and development of a method for their determination by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr., A* **1991**, *547*, 185–193.
- (33) Liu, J.; Wang, G.; Wang, G. Chemical constituents in aerial parts of *Arachis hypogaea* (III). *Chin. Tradit. Patent Med.* **2009**, *31*, 1902–1903.
- (34) Bhargavan, B.; Singh, D.; Gautam, A. K.; Mishra, J. S.; Kumar, A.; Goel, A.; Dixit, M.; Pandey, R.; Manickavasagam, L.; Dwivedi, S. D.; Chakravarti, B.; Jain, G. K.; Ramachandran, R.; Maurya, R.; Trivedi, A.; Chattopadhyay, N.; Sanyal, S. Medicarpin, a legume phytoalexin, stimulates osteoblast differentiation and promotes peak bone mass achievement in rats: evidence for estrogen receptor [ $\beta$ ]-mediated osteogenic action of medicarpin. *J. Nutr. Biochem.* **2011**, doi: 10.1016/j.jnutbio.2010.11.002.
- (35) Sobolev, V. S.; Neff, S. A.; Gloer, J. B.; Khan, S. I.; Tabanca, N.; De Lucca, A. J.; Wedge, D. E. Pterocarpenes elicited by *Aspergillus caelatus* in peanut (*Arachis hypogaea*) seeds. *Phytochemistry* **2010**, *71*, 2099–2107.
- (36) Jiménez-González, L.; Álvarez-Corral, M.; Muñoz-Dorado, M.; Rodríguez-García, I. Pterocarpanes: interesting natural products with antifungal activity and other biological properties. *Phytochem. Rev.* **2008**, *7*, 125–154.
- (37) Monagas, M.; Garrido, I.; Lebrón-Aguilar, R.; Gómez-Cordovés, M. C.; Rybarczyk, A.; Amarowicz, R.; Bartolomé, B. Comparative flavan-3-ol profile and antioxidant capacity of roasted peanut, hazelnut, and almond skins. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 10590–10599.
- (38) Lou, H.; Yamazaki, Y.; Sasaki, T.; Uchida, M.; Tanaka, H.; Oka, S. A-type proanthocyanidins from peanut skins. *Phytochemistry* **1999**, *51*, 297–308.
- (39) Duncan, C. E.; Gorbet, D. W.; Talcott, S. T. Phytochemical content and antioxidant capacity of water-soluble isolates from peanuts (*Arachis hypogaea* L.). *Food Res. Int.* **2006**, *39*, 898–904.
- (40) Sales, J. M.; Resurreccion, A. V. A. Phenolic profile, antioxidants, and sensory acceptance of bioactive-enhanced peanuts using ultrasound and UV. *Food Chem.* **2010**, *122*, 795–803.
- (41) Stevenson, P. C.; Anderson, J. C.; Blaney, W. M.; Simmonds, M. S. J. Developmental inhibition of *Spodoptera litura* (Fab.) larvae by a novel caffeoylquinic acid from the wild groundnut, *Arachis paraguariensis* (Chod et Hassl.). *J. Chem. Ecol.* **1993**, *19*, 2917–2933.
- (42) Snook, M. E.; Lynch, R. E.; Culbreath, A. K.; Costello, C. E. 2,3-Di-(E)-caffeoyl-(2R,3R)-(+)-tartaric acid in terminals of peanut (*Arachis hypogaea*) varieties with different resistances to late leaf spot disease (*Cercosporidium personatum*) and the insects tobacco thrips (*Frankliniella fusca*) and potato leafhopper (*Empoasca fabae*). *J. Agric. Food Chem.* **1994**, *42*, 1572–1574.
- (43) Phillips, K. M.; Ruggio, D. M.; Ashraf-Khorassani, M. Phytosterol composition of nuts and seeds commonly consumed in the United States. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 9436–9445.
- (44) Grosso, N. R.; Zygadlo, J. A.; Burrioni, L. V.; Guzman, C. A. Fatty acid, sterol and proximate compositions of peanut species (*Arachis* L.) seeds from Bolivia and Argentina. *Grasas Aceites* **1997**, *48*, 219–225.
- (45) Gaydou, E. M.; Bianchini, J. P.; Ratovohery, J. V. Triterpene alcohols, methylsterols, sterols, and fatty acids in five Malagasy legume seed oils. *J. Agric. Food Chem.* **1983**, *31*, 833–836.
- (46) Grosso, N. R.; Guzmán, C. A. Lipid, protein, and ash contents, and fatty acid and sterol compositions of peanut (*Arachis hypogaea* L.) seeds from Ecuador. *Peanut Sci.* **1995**, *22*, 84–89.
- (47) Grosso, N. R.; Nepote, V.; Guzman, C. A. Chemical composition of some wild peanut species (*Arachis* L.) seeds. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 806–809.
- (48) Jonnalá, R. S.; Dunford, N. T.; Dashiell, K. E. Tocopherol, phytosterol and phospholipid compositions of new high oleic peanut cultivars. *J. Food Compos. Anal.* **2006**, *19*, 601–605.
- (49) Cherif, A. O.; Trabelsi, H.; Ben Messaouda, M.; Kaabi, B.; Pellerin, I.; Boukhchina, S.; Kallel, H.; Pepe, C. Gas chromatography-mass spectrometry screening for phytochemical 4-desmethylsterols accumulated during development of Tunisian peanut kernels (*Arachis hypogaea* L.). *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 8709–8714.
- (50) Shin, E. C.; Pegg, R. B.; Phillips, R. D.; Eitenmiller, R. R. Commercial peanut (*Arachis hypogaea* L.) cultivars in the United States: phytosterol composition. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 161–167.
- (51) Cherif, A. O.; Ben Messaouda, M.; Kaabi, B.; Pellerin, I.; Boukhchina, S.; Kallel, H.; Pepe, C. Characteristics and pathways of bioactive 4-desmethylsterols, triterpene alcohols and 4[ $\alpha$ ]-monomethylsterols, from developing Tunisian cultivars and wild peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Plant Physiol. Biochem.* **2011**, doi: 10.1016/j.plaphy.2011.02.009.
- (52) Bansal, U. K.; Satija, D. R.; Ahuja, K. L. Oil composition of diverse groundnut (*Arachis hypogaea* L.) genotypes in relation to different environments. *J. Sci. Food Agric.* **1993**, *63*, 17–19.
- (53) Lee, Y. Y.; Kwon, S. H.; Kim, H. J.; Park, H. J.; Yang, E. J.; Kim, S. K.; Yoon, Y. H.; Kim, C. G.; Park, J. W.; Song, K. S. Isolation of

oleanane triterpenes and trans-resveratrol from the root of peanut (*Arachis hypogaea*). *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* **2009**, *52*, 40–44.

(54) Kinjo, J.; Hatakeyama, M.; Udayama, M.; Tsutanaga, Y.; Yamashita, M.; Nohara, T.; Yoshiki, Y.; Okubo, K. HPLC profile analysis of oleanene-glucuronides in several edible beans. *Biosci., Biotechnol., Biochem.* **1998**, *62*, 429–433.

(55) Mooser, W. To the knowledge of the *Arachis*. *Landwirtsch. Vers.-Stn.* **1904**, *60*, 321–346.

(56) Moll, F. Die chemische natur des "erdnusalkaloid" arachin. *Planta Med.* **1961**, *9*, 213–215.

(57) Zwickenpflug, W.; Meger, M.; Richter, E. Occurrence of the tobacco alkaloid myosmine in nuts and nut products of *Arachis hypogaea* and *Corylus avellana*. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 2703–2706.

(58) Özcan, M.; Seven, S. Physical and chemical analysis and fatty acid composition of peanut, peanut oil and peanut butter from COM and NC-7 cultivars. *Grasas Aceites* **2003**, *54*, 12–18.

(59) Carrín, M. E.; Carelli, A. A. Peanut oil: compositional data. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2010**, *112*, 697–707.

(60) 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 Genet. Resour.* **2010**, *8*, 71–73.

(61) Kaveri, S. B.; Nadaf, H. L.; Salimath, P. M. Comparison of two methods for fatty acid analysis in peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Indian J. Agric. Res.* **2009**, *43*, 215–218.

(62) Anyasor, G. N.; Ogunwenmo, K. O.; Oyelana, O. A.; Ajayi, D.; Dangana, J. Chemical analyses of groundnut (*Arachis hypogaea*) oil. *Pakistan J. Nutr.* **2009**, *8*, 269–272.

(63) Barkley, N. A.; Chamberlin, K. D. C.; Wang, M. L.; Pittman, R. N. Development of a real-time PCR genotyping assay to identify high oleic acid peanuts (*Arachis hypogaea* L.). *Mol. Breed.* **2010**, *25*, 541–548.

(64) Chaubal, R.; Pawar, P. V.; Hebbalkar, G. D.; Tungikar, V. B.; Puranik, V. G.; Deshpande, V. H.; Deshpande, N. R. Larvicidal activity of *Acacia nilotica* extracts and isolation of D-pinitol – a bioactive carbohydrate. *Chem. Biodivers.* **2005**, *2*, 684–688.

(65) Rychlik, M.; Englert, K.; Kapfer, S.; Kirchhoff, E. Folate contents of legumes determined by optimized enzyme treatment and stable isotope dilution assays. *J. Food Compos. Anal.* **2007**, *20*, 411–419.

(66) Chetschik, I.; Granvogel, M.; Schieberle, P. Comparison of the key aroma compounds in organically grown, raw West-African peanuts (*Arachis hypogaea*) and in ground, pan-roasted meal produced thereof. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 10237–10243.

(67) King, J. C.; Blumberg, J.; Ingwersen, L.; Jenab, M.; Tucker, K. L. Tree nuts and peanuts as components of a healthy diet. *J. Nutr.* **2007**, *138*, 1736S–1740S.

(68) Bilbis, L. S.; Shehu, R. A.; Abubakar, A. G. Hypoglycemic and hypolipidemic effects of aqueous extract of *Arachis hypogaea* in normal and alloxan-induced diabetic rats. *Phytomedicine* **2002**, *9*, 553–555.

(69) Vijaya, T.; Maouli, K. C.; Rao, S. D. Phytoresources as potential therapeutic agents for cancer treatment and prevention. *J. Global Pharma Technol.* **2009**, *1*, 4–18.

(70) Higgs, J. The beneficial role of peanuts in the diet – part 2. *Nut Food Sci.* **2003**, *33*, 56–64.

(71) Kris-Etherton, P. M.; Hu, F. B.; Ros, E.; Sabate, J. The role of tree nuts and peanuts in the prevention of coronary heart disease: multiple potential mechanisms. *J. Nutr.* **2007**, *138*, 1746S.

(72) Parekh, J.; Chanda, S. In vitro screening of antibacterial activity of aqueous and alcoholic extracts of various Indian plant species against selected pathogens from Enterobacteriaceae. *Afr. J. Microb. Res.* **2007**, *1*, 92–99.

(73) Al-Qura'n, S. Taxonomical and pharmacological survey of therapeutic plants in Jordan. *J. Nat. Prod.* **2008**, *1*, 10–26.

(74) Alper, C. M.; Mattes, R. D. Peanut consumption improves indices of cardiovascular disease risk in healthy adults. *J. Am. Coll. Nutr.* **2003**, *22*, 133–141.

(75) Zhou, P.; Li, L. P.; Luo, S. Q.; Jiang, H. D.; Zeng, S. Intestinal absorption of luteolin from peanut hull extract is more efficient than that from individual pure luteolin. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 296–300.

(76) Chang, J. C.; Lai, Y. H.; Djoko, B.; Wu, P. L.; Liu, C. D.; Liu, Y. W.; Chiou, R. Y. Biosynthesis enhancement and antioxidant and anti-inflammatory activities of peanut (*Arachis hypogaea* L.) arachidin-1, arachidin-3, and isopentadienylresveratrol. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 10281–10287.

(77) Djoko, B.; Robin, Y. Y. C.; Shee, J. J.; Liu, Y. W. Characterization of immunological activities of peanut stilbenoids, arachidin-1, piceatannol, and resveratrol on lipopolysaccharide-induced inflammation of RAW 264.7 macrophages. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 2376–2383.

(78) Kang, L.; Heng, W.; Yuan, A.; Baolin, L.; Fang, H. Resveratrol modulates adipokine expression and improves insulin sensitivity in adipocytes: relative to inhibition of inflammatory responses. *Biochimie* **2010**, *92*, 789–796.

(79) Lu, X.; Ma, L.; Ruan, L.; Kong, Y.; Mou, H.; Zhang, Z.; Wang, Z.; Wang, J. M.; Le, Y. Resveratrol differentially modulates inflammatory responses of microglia and astrocytes. *J. Neuroinflammation* **2010**, *7*, 46–60.

(80) Singh, U. P.; Singh, N. P.; Singh, B.; Hofseth, L. J.; Price, R. L.; Nagarkatti, M.; Nagarkatti, P. S. Resveratrol (trans-3,5,4'-trihydroxystilbene) induces silent mating type information regulation-1 and down-regulates nuclear transcription factor- $\kappa$ B activation to abrogate dextran sulfate sodium-induced colitis. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2010**, *332*, 829–839.

(81) Awad, A. B.; Chan, K. C.; Downie, A. C.; Fink, C. S. Peanuts as a source of  $\beta$ -sitosterol, a sterol with anticancer properties. *Nutr. Cancer* **2000**, *36*, 238–241.

(82) Bishayee, A.; Politis, T.; Darvesh, A. S. Resveratrol in the chemoprevention and treatment of hepatocellular carcinoma. *Cancer Treat. Rev.* **2010**, *36*, 43–53.

(83) Patel, K. R.; Brown, V. A.; Jones, D. J. L.; Britton, R. G.; Hemingway, D.; Miller, A. S.; West, K. P.; Booth, T. D.; Perloff, M.; Crowell, J. A.; Brenner, D. E.; Steward, W. P.; Gescher, A. J.; Brown, K. Clinical pharmacology of resveratrol and its metabolites in colorectal cancer patients. *Cancer Res.* **2010**, *70*, 7392–7399.

(84) Basini, G.; Tringali, C.; Baioni, L.; Bussolati, S.; Spatafora, C.; Grasselli, F. Biological effects on granulosa cells of hydroxylated and methylated resveratrol analogues. *Mol. Nutr. Food Res.* **2010**, *54*, S236–S243.

(85) Gagliano, N.; Aldini, G.; Colombo, G.; Rossi, R.; Colombo, R.; Gioia, M.; Milzani, A.; Dalle-Donne, I. The potential of resveratrol against human gliomas. *Anti-Cancer Drugs* **2010**, *21*, 140–150.

(86) Huang, C.-P.; Au, L.-C.; Chiou, R. Y. Y.; Chung, P.-C.; Chen, S.-Y.; Tang, W.-C.; Chang, C.-L.; Fang, W.-H.; Lin, S.-B. Arachidin-1, a peanut stilbenoid, induces programmed cell death in human leukemia HL-60 cells. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 12123–12129.

(87) Weng, Y.-L.; Liao, H.-F.; Li, A. F.-Y.; Chang, J.-C.; Chiou, R. Y. Y. Oral administration of resveratrol in suppression of pulmonary metastasis of BALB/c mice challenged with CT26 colorectal adenocarcinoma cells. *Mol. Nutr. Food Res.* **2010**, *54*, 259–267.

(88) Wang, S. Y.; Shao, B.; Rao, P. F.; Lee, Y. Y.; Ye, X. Y. Hypotin, a novel antipathogenic and antiproliferative protein from peanuts with a sequence similar to those of chitinase precursors. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 9792–9799.

(89) Ye, X.; Ng, T. B. Hypogin, a novel antifungal peptide from peanuts with sequence similarity to peanut allergen. *J. Pept. Res.* **2001**, *57*, 330–336.

(90) Abdou, Y. A. M. The sources and nature of resistance in *Arachis* L. species to *Mycosphaerella arachidicola* Jenk. and *Mycosphaerella berkeleyi* Jenk., and factors influencing sporulation of these fungi. North Carolina State University, Raleigh, NC, 1966.

(91) Devi, S. I.; Vashista, P.; Sharma, C. B. Purification to homogeneity and characterization of two antifungal proteins from the roots of *Arachis hypogaea* L. *Natl. Acad. Sci. Lett. – India* **2005**, *28*, 21–28.

(92) Vaughn, S. F. Phytotoxic and antimicrobial activity of 5,7-dihydroxychromone from peanut shells. *J. Chem. Ecol.* **1995**, *21*, 107–115.

(93) Yen, G. C.; Duh, P. D. Antioxidant activity of methanolic extracts of peanut hulls from various cultivars. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1995**, *72*, 1065–1067.

- (94) Green, R. J. Antioxidant activity of peanut plant tissues. North Carolina State University, Raleigh, NC, 2004.
- (95) Gülçin, I. Antioxidant properties of resveratrol: a structure–activity insight. *Innovative Food Sci. Emerging Technol.* **2010**, *11*, 210–218.
- (96) Abbasi, M. A.; Riaz, T.; Khan, F. M.; Aziz-Ur-Rehman; Shahwar, D.; Ahmad, N.; Shahzadi, T.; Ajaib, M.; Ahmad, V. U. Chemical composition of volatile fraction of Pakistani peanut and its antiradical activities. *J. Chem. Soc. Pakistan* **2009**, *31*, 955–959.
- (97) Jenkins, D. J. A.; Hu, F. B.; Tapsell, L. C.; Josse, A. R.; Kendall, C. W. C. Possible benefit of nuts in type 2 diabetes. *J. Nutr.* **2008**, *138*, 1752S.
- (98) Moreno, D. A.; Ilic, N.; Poulev, A.; Raskin, I. Effects of *Arachis hypogaea* nutshell extract on lipid metabolic enzymes and obesity parameters. *Life Sci.* **2006**, *78*, 2797–2803.
- (99) Emekli-Alturfan, E.; Kasikci, E.; Yarat, A. Peanut (*Arachis hypogaea*) consumption improves glutathione and HDL-cholesterol levels in experimental diabetes. *Phytother. Res.* **2008**, *22*, 180–184.
- (100) Ghadimi Nouran, M.; Kimiagar, M.; Abadi, A.; Mirzazadeh, M.; Harrison, G. Peanut consumption and cardiovascular risk. *Public Health Nutr.* **2010**, *13*, 1581–1586.
- (101) Stephens, A. M.; Dean, L. L.; Davis, J. P.; Osborne, J. A.; Sanders, T. H. Peanuts, peanut oil, and fat free peanut flour reduced cardiovascular disease risk factors and the development of atherosclerosis in Syrian Golden hamsters. *J. Food Sci.* **2010**, *75*, H116–H122.
- (102) Lokko, P.; Lartey, A.; Armar-Klimesu, M.; Mattes, R. D. Regular peanut consumption improves plasma lipid levels in healthy Ghanaians. *Int. J. Food Sci. Nutr.* **2007**, *58*, 190–200.
- (103) Sales, R. L.; Coelho, S. B.; Costa, N. M. B.; Bressan, J.; Iyer, S.; Boateng, L. A.; Lokko, P.; Mattes, R. D. The effects of peanut oil on lipid profile of normolipidemic adults: a three-country collaborative study. *J. Appl. Res.* **2008**, *8*, 216–225.
- (104) Jimsheena, V. K.; Gowda, L. R. Angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides derived from arachin by simulated gastric digestion. *Food Chem.* **2010**, *125*, 561–569.
- (105) Norioka, S.; Omichi, K.; Ikenaka, T. Purification and characterization of protease inhibitors from peanuts (*Arachis hypogaea*). *J. Biochem.* **1982**, *91*, 1427–1434.
- (106) Norioka, S.; Ikenaka, T. Amino acid sequence of a trypsin–chymotrypsin inhibitor, B-III, of peanut (*Arachis hypogaea*). *J. Biochem.* **1983**, *93*, 479–485.
- (107) Norioka, S.; Ikenaka, T. Amino acid sequences of trypsin–chymotrypsin inhibitors (A-I, A-II, B-I, and B-II) from peanut (*Arachis hypogaea*): a discussion on the molecular evolution of legume Bowman–Birk type inhibitors. *J. Biochem.* **1983**, *94*, 589–599.
- (108) Zu, X.-Y.; Zhang, Z.-Y.; Liu, J.-Q.; Hu, H.-H.; Xing, G.-Q.; Zhang, Y.; Guan, D. Sedative effects of peanut (*Arachis hypogaea* L.) leaf aqueous extracts on brain ATP, AMP, adenosine and glutamate/GABA of rats. *J. Biomed. Sci. Eng.* **2010**, *3*, 268–273.
- (109) Mattes, R. D.; Dreher, M. L. Nuts and healthy body weight maintenance mechanisms. *Asia Pac. J. Clin. Nutr.* **2010**, *19*, 137–141.
- (110) Spencer, G. F.; Tjarks, L. W. Germination inhibition by 5,7-dihydroxychromone, a flavanoid decomposition product. *J. Plant Growth Regul.* **1985**, *4*, 177–180.
- (111) Grayer, R. J.; Kimmins, F. M.; Padgham, D. E.; Harborne, J. B.; Ranga Rao, D. V. Condensed tannin levels and resistance of groundnuts (*Arachis hypogaea*) against *Aphis craccivora*. *Phytochemistry* **1992**, *31*, 3795–3800.
- (112) Applebaum, S. W.; Marco, S.; Birk, Y. Saponins as possible factors of resistance of legume seeds to the attack of insects. *J. Agric. Food Chem.* **1969**, *17*, 618–622.
- (113) Boughdad, A.; Gillon, Y.; Gagnepain, C. Effect of *Arachis hypogaea* seed fats on the larval development of *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera: Bruchidae). *J. Stored Prod. Res.* **1987**, *23*, 99–103.
- (114) Fávero, A. P.; Moraes, S. A.; Garcia, A. A. F.; Valls, J. F. M.; Vello, N. A. Characterization of rust, early and late leaf spot resistance in wild and cultivated peanut germplasm. *Sci. Agric.* **2009**, *66*, 110–117.