**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Propriedades funcionais em genótipos de amendoim adaptados ao
semiárido: capacidade de desativação de espécies reativas do
oxigênio e acessibilidade de polifenóis**

Adna Prado Massarioli

Tese apresentada para obtenção do título de
Doutora em Ciências. Área de concentração:
Ciência e Tecnologia de Alimentos

**Piracicaba
2018**

Adna Prado Massarioli
Engenheiro de Alimentos

**Propriedades funcionais em genótipos de amendoim adaptados
ao semiárido: capacidade de desativação de espécies reativas do
oxigênio e acessibilidade de polifenóis**

Orientador:
Prof. Dr. **SEVERINO MATIAS DE ALENCAR**
Co-orientadora:
Profa. Dra. **ROSEANE CAVALCANTI DOS
SANTOS**

Tese apresentada para obtenção do título de
Doutora em Ciências. Área de concentração:
Ciência e Tecnologia de Alimentos

Piracicaba
2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP

Massarioli, Adna Prado

Propriedades funcionais em genótipos de amendoim adaptados ao semiárido: capacidade de desativação de espécies reativas do oxigênio e acessibilidade de polifenóis / Adna Prado Massarioli - - Piracicaba, 2018.

137 p.

Tese (Doutorado) - - USP / Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. *Arachis hypogaea* L. 2. Compostos bioativos 3. Antioxidante 4. Tolerância à seca L. I. Título

Aos meus pais, Helió e Sandra,
ao meu querido esposo Flávio
e à minha filhinha Lívia

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus, toda honra e glória.

Aos meus pais, Helio e Sandra, pelo empenho e energia em oferecer sempre o melhor.

Ao meu amigo, companheiro, esposo, Flávio, por todo apoio, paciência, compreensão e amor.

À minha herança, Livia, por me fazer uma mãe cientista.

À minha irmã, Arodí, por tudo o que vivemos e compartilhamos até o momento.

À minha família em Cristo, pelas orações incessantes.

Ao meu orientador, prof. Severino Matias de Alencar, pela confiança e incentivo para encarar os desafios que a ciência traz.

À minha co-orientadora, profa. Roseane Cavalcanti dos Santos, pela confiança, pelos ensinamentos e por estar junto durante todo o trabalho.

À profa. Liziane Maria de Lima, pela parceria e conhecimentos compartilhados.

Ao prof. Pedro Rosalen, pela confiança e ensinamentos.

À Embrapa-Algodão, Campina Grande-PB, pelo fornecimento dos genótipos de amendoim.

Aos professores Ramiro e Vanessa que me receberam durante o estágio nos EUA.

Às amigas brasileiras nos EUA: Juliana Noguti, Carol e Bruna.

Aos amigos do Laboratório de Bioquímica e Análise Instrumental: Heloísa, Camila, Jackeline, Anna, Daniel, Priscilla, Luciano e Ivani, pela amizade e pelos momentos compartilhados. Agradeço especialmente à Fernanda que esteve comigo no trabalho com os genótipos de amendoim e que me muito me ajudou.

À amigas do Laboratório de Óleos e Gorduras: Naiane, também mãe cientista, e Larissa, por todos os momentos que passamos juntas.

Aos amigos da FOP: Josy e Bruno, pelos conhecimentos e momentos que compartilhamos.

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” e aos professores e funcionários do Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição.

Ao amigo que a sala Caco-2 me deu: José Eduardo, por embarcar comigo no desafio de trabalhar com células.

Ao CNPq (processo nº 455644/2014-4) e à FAPESP (processo nº 2016/06514-4) pelo suporte financeiro.

“E ainda que conhecesse todos os mistérios e toda a ciência...e não tivesse amor, nada seria.”

1 Coríntios 13:2

SUMÁRIO

SUMÁRIO.....	7
RESUMO.....	10
ABSTRACT	11
LISTA DE FIGURAS	12
LISTA DE TABELAS	14
1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
1.1 Características gerais do amendoim	17
1.2 Compostos fenólicos.....	20
1.2.1 Ácidos fenólicos	22
1.2.2 Flavonoides.....	22
1.2.3 Estilbenos.....	23
1.2.4 Taninos	24
1.2.5 Cumarinas.....	25
1.2.6 Lignanas.....	25
1.2.7 Compostos fenólicos no amendoim	25
1.3 Atividade antioxidante dos compostos fenólicos.....	29
1.3.1 Espécies reativas de oxigênio (ERO) e de nitrogênio (ERN)	32
1.4 O estresse hídrico e os compostos fenólicos.....	34
1.5 Bioacessibilidade de compostos fenólicos.....	36
Referências.....	37
2 OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS DE AMENDOIM UTILIZANDO A METODOLOGIA DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA	51
Resumo	51
Abstract.....	51
2.1 Introdução.....	52
2.2 Material e Métodos	53
2.2.1 Obtenção das amostras	53
2.2.2 Preparo das amostras	53
2.2.3 Delineamento experimental.....	54
2.2.4 Preparo dos extratos	55
2.2.5. Compostos fenólicos totais	55
2.2.6 Atividade antioxidante pelo sequestro do radical livre ABTS (ABTS ^{•+})	56
2.2.7 Sequestro do radical peroxila (ORAC)	56
2.2.8 Caracterização fenólica dos extratos por espectrometria de massas de alta resolução (LC-ESI-QTOF-MS)	57

2.3 Resultados e Discussão	58
2.4 Conclusão	77
Referências	78
3 CAPACIDADE DE DESATIVAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO POR GENÓTIPOS DE AMENDOIM TOLERANTES E SUSCEPTÍVEIS AO ESTRESSE HÍDRICO.....	85
Resumo.....	85
Abstract	85
3.1 Introdução	86
3.2 Material e Métodos.....	87
3.2.1 Obtenção das amostras.....	87
3.2.2 Preparo das amostras e extração.....	89
3.2.3 Compostos fenólicos totais	89
3.2.4 Sequestro do radical peroxila ($\text{ROO}^\bullet$).....	89
3.2.5 Sequestro do radical superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$)	90
3.2.6 Sequestro do ácido hipocloroso (HOCl)	90
3.2.7 Sequestro do peróxido de hidrogênio (H_2O_2).....	91
3.2.8 Sequestro do radical hidroxila ($^\bullet\text{OH}$).....	91
3.2.9 Quantificação dos compostos fenólicos por cromatografia líquida de alta eficiência.....	92
3.2.10 Análise estatística	92
3.3 Resultados e Discussão.....	93
3.4 Conclusão	111
Referências	111
4 ACESSIBILIDADE DE COMPOSTOS FENÓLICOS DO AMENDOIM PELO MÉTODO DE DIGESTÃO SIMULADA <i>IN VITRO</i>	117
Resumo.....	117
Abstract.....	117
4.1 Introdução	118
4.2 Material e Métodos.....	119
4.2.1 Amostra	119
4.2.2 Preparo do extrato	119
4.2.3 Digestão gastrointestinal <i>in vitro</i>	119
4.2.4 Compostos fenólicos totais	120
4.2.5 Sequestro do radical peroxila ($\text{ROO}^\bullet$).....	121
4.2.6 Quantificação de compostos fenólicos por cromatografia líquida de alta eficiência (LC-DAD).....	121

4.2.7 Caracterização fenólica por espectrometria de massas de alta resolução (LC-ESI-QTOF-MS).....	122
4.2.8 Análise estatística	122
4.3 Resultados e Discussão	123
4.4 Conclusão.....	130
Referências.....	130
CONCLUSÕES/CONSIDERAÇÕES FINAIS	135
5 PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA AMBIENTAL NA PESQUISA – ESALQ/USP	136
APÊNDICES.....	137
Apêndice A	137

RESUMO

Propriedades funcionais em genótipos de amendoim adaptados ao semiárido: capacidade de desativação de espécies reativas do oxigênio e acessibilidade de polifenóis

O amendoim é um alimento conhecido pelo seu alto conteúdo proteico e lipídico, também, destaca-se com alto teor de compostos fenólicos, conhecidos por suas propriedades antioxidantes. A cultura do amendoim possui uma ampla adaptabilidade às condições tropicais e o seu cultivo no nordeste brasileiro possui um papel importante para a renda dos pequenos agricultores da região. Em atendimento a esses agricultores, a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) detém o programa de melhoramento genético do amendoim para ambientes semiáridos, no desenvolvimento de cultivares tolerantes ao estresse hídrico. No presente estudo, um total de 14 genótipos pertencentes Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa (sendo 6 genótipos tolerantes, 1 médio tolerante e 7 não tolerantes à seca) foram analisados quanto à composição fenólica e o potencial no sequestro de espécies reativas do oxigênio, além da análise da bioacessibilidade desses compostos após a digestão simulada *in vitro*, nunca antes determinados para tais genótipos. Este trabalho está organizado em quatro capítulos, divididos na seguinte forma: Capítulo I destina-se à revisão da literatura; Capítulo II descreve o estudo com os genótipos BR1 (tolerante à seca) e LViPE-06 (não tolerante à seca) para determinar as melhores condições de obtenção do extrato rico em compostos fenólicos com atividade antioxidante e para determinar o perfil fenólico dos cotilédones e películas pela técnica LC-ESI-QTOF-MS; Capítulo III, com base nas condições estabelecidas para a extração, foram produzidos os extratos (cotilédones e películas) dos 14 genótipos de amendoins e analisados quanto ao sequestro de cinco diferentes espécies reativas de oxigênio; Capítulo IV, a acessibilidade dos compostos fenólicos majoritários do amendoim, inclusive o ácido *p*-cumárico, do genótipo BR1 foi determinada por meio da digestão simulada *in vitro*. Os valores estabelecidos de temperatura e grau de hidratação do etanol para a obtenção dos extratos dos cotilédones foram de 60°C e 35% e para os extratos das películas os valores foram de 40°C e 60%, que permitiram obter extratos com os maiores teores de compostos fenólicos e atividade antioxidante. Por meio da técnica LC-ESI-QTOF-MS os principais compostos fenólicos presentes nos extratos dos cotilédones foram os derivados do ácido *p*-cumárico e do *p*-cumaroil e nos extratos das películas, as procianidinas oligoméricas do tipo A. Quanto ao sequestro de espécies reativas, os extratos de películas se mostraram excelentes, especialmente no sequestro do radical hidroxila cujos valores do IC₅₀ foram inferiores à concentração de 0,1 µg/mL e, concentrações maiores dos extratos (IC₅₀= 29,07 - 42,84 µg/mL) foram necessárias para o sequestro do peróxido de hidrogênio. Entre os extratos dos cotilédones, se destacou o extrato do amendoim do genótipo BR1, no sequestro do radical superóxido (inibição de 28,85% na concentração de 50 µg/mL), peróxido de hidrogênio (IC₂₅= 304,61 µg/mL) e radical peroxila (738,97 µmol Trolox/g). A acessibilidade de sete compostos fenólicos majoritários de amendoim variou de 7 a 100% sendo que o ácido *p*-cumárico se apresentou em maior concentração após a digestão simulada *in vitro* (252,86 µg/g) quando comparada à do extrato da amostra não digerida (68,55 µg/g).

Palavras-chave: *Arachis hypogaea* L.; Compostos bioativos; Antioxidante; Tolerância à seca.

ABSTRACT

Functional properties of peanut genotypes adapted to the Brazilian semiarid region: reactive oxygen species scavenging activity and accessibility of polyphenols

Peanut is a food known for its high protein and lipid content as well as for its high content of phenolic compounds, which are described to have antioxidant properties. Peanut cultivation has a wide adaptability to tropical conditions and plays an important role in income generation among small local farmers in northeastern Brazil. To meet these farmers' needs, the Brazilian Agricultural Research Corporation (*Embrapa*) holds a peanut genetic improvement program for semi-arid environments through which they develop cultivars tolerant to water stress. In this study, a total of fourteen genotypes from the *Embrapa*'s Germplasm Active Collection (six drought-tolerant genotypes, one mild tolerant and seven non-drought tolerant) were analyzed for their phenolic composition, potential for scavenging reactive oxygen species, and bio-accessibility after *in vitro* simulated digestion, which have never been investigated for such genotypes. This study is organized into four chapters, as follows: Chapter I corresponds to the literature review; Chapter II describes the study with BR1 (drought tolerant) and LViPE-06 (non-drought tolerant) genotypes to determine the optimal conditions to obtain a phenolics-rich extract with antioxidant activity, as well as to determine the phenolic profile of peanut cotyledon and skin by the LC-ESI-QTOF-MS technique; Chapter III, based on the conditions established for extraction, cotyledon and skin extracts of the fourteen peanut genotypes were produced, which were analyzed for their scavenging capacity with five different reactive oxygen species; Chapter IV, the accessibility of the major phenolic compounds present in BR1 peanut genotype, including *p*-coumaric acid, was determined by *in vitro* simulated digestion. The optimal temperature and ethanol hydration to obtain the peanut cotyledon and skin extracts were 60°C and 35% and 40°C and 60%, respectively, which yielded extracts with the highest contents of phenolic compounds and strong antioxidant activity. The analysis by LC-ESI-QTOF-MS identified the main phenolic compounds present in the extracts, namely: derivatives of *p*-coumaric acid and *p*-cumaroil in cotyledon extracts, and type A oligomeric procyanidins in skin extracts. Skin extracts showed excellent reactive species scavenging activity, especially of hydroxyl radical, as IC_{50} values were lower than 0.1 $\mu\text{g/mL}$; higher concentrations of the extracts (IC_{50} = 29.07-42.84 $\mu\text{g} / \text{mL}$) were required for scavenging hydrogen peroxide. Among the cotyledon extracts, the extract from peanut genotype BR1 showed promising capacity to scavenge superoxide radical (inhibition of 28.85% at 50 $\mu\text{g/mL}$), hydrogen peroxide (IC_{25} = 304.61 $\mu\text{g/mL}$) and peroxyl radical (738.97 $\mu\text{mol Trolox/g}$). The bio-accessibility of seven major phenolic compounds ranged from 7% to 100%, with a higher concentration of *p*-coumaric acid found after *in vitro* simulated digestion (252.86 $\mu\text{g/g}$) as compared to the undigested extract (68.55 $\mu\text{g/g}$).

Key-words: *Arachis hypogaea* L.; Phenolics, Antioxidant; Drought tolerance.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Principais classes dos compostos fenólicos encontrados em alimentos. .	21
Figura 2 - Ácidos hidroxibenzoicos: (1) ácido gálico e (2) ácido protocatecuico; e ácidos hidroxicinâmicos: (3) ácido <i>p</i> -cumárico e (4) e ácido ferúlico.	22
Figura 3 - Estrutura básica de um flavonoide e suas subclasses.	23
Figura 4 - Estrutura química do resveratrol (à esquerda) e do seu derivado mono glicosilado, o <i>trans</i> -piceid (à direita).....	24
Figura 5 - Procianidinas diméricas do tipo A (à esquerda) e do tipo B (à direita).	25
Figura 6 - Estrutura química do <i>p</i> -cumaroil.....	28
Figura 7 - Estrutura de um flavonoide contendo a indicação de ligações, grupos e funções que favorecem o aumento da atividade antioxidante.	30
Figura 8 - Respostas fisiológicas, bioquímicas e moleculares em plantas superiores sob estresse hídrico.....	35
Figura 9 - Superfícies de resposta dos modelos matemáticos para as respostas das variáveis dependentes dos cotilédones, genótipos BR1 e LViPE-06.....	63
Figura 10 - Superfícies de resposta dos modelos matemáticos para as respostas das variáveis dependentes das películas, genótipos BR1 e LViPE-06.....	65
Figura 11 - Quatorze genótipos de amendoins pertencentes ao Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Algodão, Campina Grande-PB, usados para análises de compostos fenólicos e atividade antioxidante.....	88
Figura 12 - Rendimento (%) das extrações para os cotilédones e películas de 14 genótipos de amendoins.....	93
Figura 13 - Porcentagem de inibição do $O_2^{\bullet-}$ pela ação dos extratos dos cotilédones comparado à ação do ácido gálico, um efetivo sequestrador do radical livre.	99
Figura 14 - Dispersões gráficas em relação aos eixos que representam os componentes principais CP1 (eixo x) e CP2 (eixo y), obtidos a partir dos resultados das variáveis para os extratos dos cotilédones (dispersão superior) e películas (dispersão inferior).....	105
Figura 15 - Teor total de compostos fenólicos dos extratos, antes e após a digestão simulada <i>in vitro</i> das sementes de amendoim (genótipo BR1).	123
Figura 16 - Atividade antioxidante (ORAC) dos extratos, antes e após a digestão simulada <i>in vitro</i> das sementes de amendoim (genótipo BR1).	124

Figura 17 - Cromatogramas obtidos por LC-DAD dos compostos majoritários detectados à 310 nm e identificados pela técnica de LC-ESI-QTOF-MS dos extratos, antes e após a digestão simulada *in vitro* do amendoim: (1) isômero do ácido *p*-cumaroil tartárico, (2) isômero do ácido *p*-cumaroil tartárico, (3) ácido *p*-cumárico, (4) não identificado, (5) ácido di-*p*-cumaroil-tartárico, (6) ácido *p*-cumaroil-sinapoil-tartárico e (7) ácido *p*-cumaroil-feruloil-tartárico.....126

Figura 18 - Acessibilidade (%) dos ácidos fenólicos no amendoim, genótipo BR1. n.i = não identificado.128

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Descritores de amendoim dos grupos Virgínia, Valência e Spanish.....	18
Tabela 2 - Produção total de amendoim no Brasil nas safras 2015/2016 e 2016/2017.	19
Tabela 3 - Compostos fenólicos presentes em diferentes partes do amendoim.....	27
Tabela 4 - Planejamento experimental (Delineamento Composto Central Rotacional) para cada genótipo de amendoim (BR1 e LViPE-06).	55
Tabela 5 - Teor total de compostos fenólicos (CF) e atividade antioxidante dos extratos de cotilédone e película do genótipo BR1.	58
Tabela 6 - Teor total de compostos fenólicos (CF) e atividade antioxidante dos extratos de cotilédone e película do genótipo LViPE-06.	59
Tabela 7 - Análise dos efeitos significativos para a resposta do teor de fenólicos totais.	60
Tabela 8 - Análise dos efeitos significativos para as respostas da atividade antioxidante medida pelo método do sequestro do radical ABTS.	60
Tabela 9 - Análise dos efeitos significativos para as respostas da atividade antioxidante medida pelo método ORAC.	61
Tabela 10 - Modelos matemáticos que descrevem a superfície de resposta dos extratos dos cotilédones e películas do amendoim dos genótipos BR1 e LViPE-06.	66
Tabela 11 - Análise de variância para teor de fenólicos totais e atividade antioxidante, genótipo BR1.	68
Tabela 12 - Análise de variância para teor de fenólicos totais e atividade antioxidante, genótipo LViPE-06.	69
Tabela 13 - Valores observados e previstos, das variáveis dependentes.	70
Tabela 14 - Identificação por tentativa dos compostos fenólicos presentes nos cotilédones de amendoins (genótipos BR1 e LViPE-06) analisados pela técnica LC- ESI-QTOF-MS.	73
Tabela 15 - Identificação por tentativa dos compostos fenólicos presentes nas películas de amendoins (genótipos BR1 e LViPE-06) analisados pela técnica LC- ESI-QTOF-MS.	76
Tabela 16 - Características dos 14 genótipos de amendoim pertencentes ao Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Algodão, Campina Grande-PB.	87
Tabela 17 - Fenólicos totais em extratos dos cotilédones e películas de 14 genótipos do BAG de amendoim da Embrapa Algodão, Campina Grande-PB.	95

Tabela 18 - Sequestro de espécies reativas de oxigênio de extratos obtidos a partir dos cotilédones de 14 genótipos	97
Tabela 19 - Sequestro de espécies reativas de oxigênio de extratos obtidos a partir das películas de 14 genótipos	102
Tabela 20 - Elementos de variância obtidos a partir da matriz formada pelas variáveis analisadas para os extratos obtidos dos cotilédones e películas dos amendoins.....	104
Tabela 21 - Contribuição relativa dos componentes das variáveis (fenólicos totais e sequestro de espécies reativas do oxigênio) para classificação dos genótipos de amendoim.....	107
Tabela 22 - Quantificação de compostos fenólicos identificados por HPLC-DAD em extratos dos cotilédones de 14 genótipos de amendoins do BAG da Embrapa Algodão, Campina Grande-PB.	108
Tabela 23 - Quantificação de compostos fenólicos identificados por HPLC-DAD em extratos das películas de 14 genótipos de amendoins do BAG da Embrapa Algodão, Campina Grande-PB.	109
Tabela 24 - Identificação por tentativa por LC-ESI-QTOF-MS e quantificação por LC-DAD dos compostos fenólicos majoritários do extrato do amendoim não digerido e nas alíquotas após a digestão simulada <i>in vitro</i>	127

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 Características gerais do amendoim

O amendoim é uma planta originária da América do Sul, cujo cultivo se dava no México, Argentina, Paraguai, Bolívia, Brasil e extensivamente no Peru durante o período da exploração europeia. A partir desses países, por meio dos exploradores portugueses e espanhóis, a cultura se expandiu até alcançar o continente europeu, costas da África, Ásia e Ilhas do Pacífico. Nos Estados Unidos, se admite que a entrada da cultura coincidiu com o período da escravidão, durante o comércio de negros advindos da costa ocidental africana (Hammons et al., 2016).

O amendoim pertence à família Leguminosae e ao gênero *Arachis*, sendo que a espécie *Arachis hypogaea* L. é a de maior valor comercial e à qual pertence o amendoim cultivado (Nogueira et al., 2013). O amendoim cultivado possui seis variedades botânicas: *hypogaea*, *hirsuta*, *fastigiata*, *peruviana*, *aequatoriana*, e *vulgaris*, sendo que as duas primeiras pertencem à subespécie *hypogaea* e as quatro últimas à subespécie *fastigiata* (He et al., 2005). Dentro das variedades botânicas *hypogaea*, *fastigiata* e *vulgaris*, encontram-se os amendoins dos grupos vegetativos Virgínia, Valência e Spanish, respectivamente, cujas principais características estão descritas na Tabela 1.

O amendoim é uma planta herbácea, ramificada, com hábito de crescimento ereto ou rasteiro. Possui uma haste principal que varia entre 12 e 60 cm de comprimento e uma raiz principal axial que pode atingir profundidades entre 1,9 m e 2,4 m. Dessa raiz, partem as raízes laterais, formando o sistema radicular do amendoim que se concentra nas camadas mais superficiais do solo, mais especificamente nos primeiros 20 a 35 cm. O grau de aprofundamento das raízes varia de acordo com o grupo vegetativo. As folhas são alternas e as flores aparecem nas axilas das folhas. Os frutos são vagens indeiscentes (que não se abrem após atingir a maturação), de cor amarelo palha, abrigando de 1 a 5 sementes, que varia de acordo com o grupo vegetativo. As sementes possuem o tegumento seminal (película que envolve os cotilédones), que pode ser branco, roxo, rosado, vermelho, negro ou variegado. A casca representa de 25 a 35% do peso do fruto seco e o tegumento seminal, 3% em peso das sementes (Câmara et al., 1982).

Graças à adaptabilidade da cultura, o amendoim é cultivado desde as regiões equatoriais até as de maiores latitudes (40° no hemisfério norte e 35° no hemisfério sul) (Câmara et al., 1982).

Tabela 1 - Descritores de amendoim dos grupos Virgínia, Valência e Spanish.

	Grupo Vegetativo		
	Virgínia	Valência	Spanish
Crescimento	rasteiro ou arbustivo	ereto	ereto
Haste principal	curta ou pouco proeminente, sem flores	longa, ereta, proeminente, com flores	ereta, pouco proeminente, com flores
Ramificação	alternada	sequencial	sequencial
Ciclo de crescimento (SE brasileiro)	longo (130 a 160 dias)	curto (90 a 110 dias)	curto (100 a 120 dias)
Folíolos	pequenos (4 a 5cm), verde-escura	maiores (6 a 7cm), verde-claro	maiores (6 a 7cm), verde-claro
Vagens	2 grãos de tamanho médio (tipo “runner”) ou grande de formato oblongo (tipo “virgínia”) ou muito grande (tipo “jumbo” ou “cavalo”)	3 a 4 grãos de tamanho pequeno ligeiramente arredondado ou achatado	2 grãos de formato ligeiramente arredondado
Cor da película	acastanhada ou rosada; vermelha ou variegada	vermelha (mais comum), acastanhada ou quase preto	acastanhada (mais comum) ou vermelha

Fonte: Adaptado de Godoy (2018)

Segundo dados da USDA (United States Department of Agriculture) (2016), a produção mundial de amendoim, a quarta oleaginosa mais produzida no mundo, tem sido crescente com o passar dos anos e atingiu um total de 42,77 milhões de toneladas entre os anos de 2016/2017. Desse total, a China respondeu por 40% da produção, seguida pela Índia (16%), Nigéria (7%), Estados Unidos (6%) e Birmânia (3%). O Brasil respondeu em torno de 1% da produção mundial do amendoim, sendo que o estado de São Paulo participou com 90,5% desse total (Conab, 2017). Embora a maior região produtora seja a região Sudeste, o amendoim também é cultivado nas outras regiões do país.

A Tabela 2 apresenta a produção total de amendoim nas regiões do Brasil, nas safras 2015/2016 e 2016/2017.

Tabela 2 - Produção total de amendoim no Brasil nas safras 2015/2016 e 2016/2017.

Região/Estado	Produção (em mil t)	
	Safra 2015/2016	Safra 2016/2017
NORTE	1,2	1,4
TO	1,2	1,4
NORDESTE	3,3	3,9
CE	0,1	0,3
PB	0,2	0,4
SE	1,5	1,8
BA	1,5	1,4
CENTRO-OESTE	0,1	10,5
MT	0,1	-
MS	-	10,5
SUDESTE	385,1	427,0
MG	7,6	9,4
SP	377,5	417,6
SUL	16,4	18,6
PR	4,8	6,8
RS	11,6	11,8
NORTE/NORDESTE	4,5	5,3
CENTRO-SUL	401,6	456,1
BRASIL	406,1	461,4

Fonte: Conab (2017)

O amendoim se destaca pelos altos teores de óleo (40 a 55%) e proteína (26 a 32%), o que confere a esse alimento um alto valor energético e nutritivo, respectivamente. Inicialmente, era destinado apenas à alimentação animal e somente no final do século XIX é que foi introduzido na alimentação humana. Nos Estados Unidos, aproximadamente 60% da produção é destinada ao consumo humano e 63% desse total é processado à pasta. Além de cru ou em pasta, o amendoim é consumido torrado, salgado ou como ingrediente de bolos e paçocas (Chang et al., 2013).

Além de lipídeos e proteínas, o amendoim também se destaca pelo conteúdo de vitaminas e minerais sendo considerado um dos alimentos de origem vegetal mais completo, porém com a vantagem do custo inferior quando comparado à outros alimentos (Freire et al., 2013).

De acordo com os dados do USDA (USDA-National Nutrient Database for Standard Reference, 2016), a quantidade de 100 g de amendoim cru contém por

volta de 567 kcal, 26 g de proteína, 49 g de lipídeos, 16 g de carboidratos, 8 g de fibras, dentre os minerais, 92 mg de cálcio, 4,6 g de ferro, 376 mg de fósforo, 705 mg de potássio, 168 mg de magnésio, 3 mg de zinco, dentre as vitaminas, 0,64 mg de tiamina, 0,135 mg de riboflavina, 12 mg de niacina, 0,348 mg de vitamina B6, 0,24 mg de folato e 8,33 mg de vitamina E (alfa-tocoferol). Para comprovar o aspecto nutritivo do amendoim, Griel et al. (2004) conduziram um estudo e mostraram que indivíduos que incluem este grão na alimentação têm melhora na qualidade do perfil nutricional da vitamina E, folato e magnésio a cada 1000 kcal ingeridos.

Além do grão como um todo, o óleo do amendoim também se caracteriza como um alimento nutritivo. Os componentes majoritários do óleo compreendem os triacilgliceróis e dentre os minoritários estão os ácidos graxos livres, diacilgliceróis e fosfolipídios (saponificáveis) e esteróis, metilesteróis, álcoois triterpênicos, tocoferóis e tocotrienóis (insaponificáveis). Em sua composição de ácidos graxos estão presentes em maiores concentrações o palmítico (C16:0), oleico (C18:1) e linoleico (C18:2). Em menores proporções estão o esteárico (C18:0), araquídico (C20:0), eicosenoico (C20:1), behênico (C22:0) e lignocérico (C24:0) e, em traços, o ácido linolênico (C18:3) (Carrín & Carelli, 2010). Em cultivares de amendoim desenvolvidas pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), o teor de ácidos graxos saturados varia de 12 a 21,5% e insaturados de 77,6 a 88%, dos quais 25,5 a 51% são ácidos graxos monoinsaturados. Essa característica da composição em ácidos graxos insaturados faz do óleo de amendoim um importante alimento, aliado à prevenção de doenças cardiovasculares (Freire et al., 2013).

1.2 Compostos fenólicos

Compostos fenólicos são metabólitos secundários encontrados em plantas e fungos, geralmente produzidos como um mecanismo de defesa contra o ataque em alguma parte específica da planta ou do fungo ou diante de condição de estresse, como temperaturas desfavoráveis, disponibilidade hídrica, condições de luz e pH. O composto fenólico mais simples é o fenol, que possui um anel benzênico e um grupo hidroxila como substituinte, uma característica comum entre todas as substâncias desse grupo. O grande número de compostos fenólicos existentes na natureza ocorre devido à diversidade estrutural, que abrange desde as substâncias mais simples, como os fenóis simples (C6), até as mais complexas com alto grau de polimerização, como os taninos condensados (C6-C3-C6)_n, que são polímeros de

flavan-3-ol e/ou flavan-3,4-diol (Robards & Antolovich, 1997; Dias et al., 2016). As principais classes dos compostos fenólicos encontrados na natureza estão representadas na Figura 1.

Figura 1 - Principais classes dos compostos fenólicos encontrados em alimentos.

Fonte: Adaptado de Shahidi & Ambigaipalan (2015)

A principal via de biossíntese dos compostos fenólicos é a via do ácido chiquímico na qual uma molécula do ácido fosfoenolpirúvico, proveniente da glicólise, e uma molécula de eritrose-4-fosfato, proveniente da via da pentose fosfato, combinam-se para formar o açúcar 3-deoxi-O-arabino-heptolusonato fosfato (DAHP), que então é convertido na forma cíclica para ser reduzido à forma chiquimato. A partir dessa estrutura, ocorre a formação dos ácidos fenólicos que são precursores para a produção de outros compostos, ou a partir do DAHP, formam-se aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina e triptofano). A produção de

compostos fenólicos mais complexos se inicia com a desaminação da fenilalanina a ácido cinâmico, o qual é convertido a ácido *p*-cumárico. A partir do ácido *p*-cumárico ocorre a formação dos ácidos hidroxicinâmicos ou a formação de lignina. Pela ação de várias enzimas, o ácido *p*-cumárico é convertido a flavonóis e flavan-3-óis (Dias et al., 2016).

1.2.1 Ácidos fenólicos

Os ácidos fenólicos podem ser subdivididos em dois grupos: ácidos hidroxibenzoicos e ácidos hidroxicinâmicos. Podem ser encontrados tanto na forma livre, quanto conjugados. Os ácidos hidroxibenzoicos possuem o esqueleto carbônico na configuração C6-C1, sendo os mais simples encontrados na natureza. Os ácidos hidroxicinâmicos possuem o esqueleto carbônico na configuração C6-C3 (Murkovic, 2016), conforme ilustrados na Figura 2.

Figura 2 - Ácidos hidroxibenzoicos: (1) ácido gálico e (2) ácido protocatecuico; e ácidos hidroxicinâmicos: (3) ácido *p*-cumárico e (4) e ácido ferúlico.

1.2.2 Flavonoides

Os flavonoides compõem um grupo vasto de substâncias que possuem em comum o esqueleto básico de 15 carbonos na configuração de três anéis (C6-C3-C6), denominados de anéis A, B e C (Figura 3). Os anéis A e B são necessariamente aromáticos e o anel C, com 3 carbonos e que geralmente possui um átomo de oxigênio, conecta os outros dois anéis formando uma ponte. As subclasses dos flavonoides são diferenciadas de acordo com o grau de insaturação e o grau de oxidação do anel C. Dentro de cada uma das subclasses, a diferenciação é baseada no número e na natureza dos grupos substituintes ligados nos anéis (Figura 3). A classe flavonoides subdivide-se em: flavonóis, flavonas,

flavanonas, isoflavanos, flavanóis (flavan-3-óis), flavanonois e antocianidinas/antocianinas (Robards & Antolovich, 1997; Rice-Evans et al., 1997).

Figura 3 - Estrutura básica de um flavonoide e suas subclasses.

A biossíntese dos flavonoides ocorre por meio da via do fenilpropanoides na qual a fenilalanina se transforma em ácido cinâmico e seus derivados, que posteriormente são modificados e formam hidroxicinamoil CoA's, que se condensam com malonil-CoA's (da via poliketídeo sintase) (Cohen & Kennedy, 2010).

1.2.3 Estilbenos

Os estilbenos, também classificados como fitoalexinas, compõem um pequeno grupo dos fenilpropanoides que têm como característica comum o esqueleto do composto 1,2-difeniletileno (C6-C2-C6), similar à chalcona. A maioria dos estilbenos em plantas são derivados do *trans*-resveratrol, que é o estilbeno mais conhecido além do seu derivado mono glicosilado, o *trans*-piceid, cujas estruturas

químicas estão apresentadas na Figura 4 (Chong et al., 2009; Gil-Muñoz et al., 2017).

Figura 4 - Estrutura química do resveratrol (à esquerda) e do seu derivado mono glicosilado, o *trans*-piceid (à direita).

1.2.4 Taninos

Os taninos formam o grupo de substâncias que possuem massa molecular relativamente alta e dividem-se em duas subclasses: taninos hidrolisáveis e taninos condensados. Pelo produto da hidrólise, os taninos hidrolisáveis ainda se dividem em galotaninos e elagitaninos, que são polímeros dos ácidos gálico e elágico, respectivamente. Entre os taninos condensados estão os vários tipos de compostos que diferem entre si pela estereoquímica e padrão de hidroxilação dos flavonoides, sendo os mais comuns as procianidinas e prodelfinidinas (Barbehenn & Constabel, 2011; Cong-Cong et al., 2017).

As procianidinas geralmente são oligômeros de unidades dos flavan-3-óis (+)-catequina (2,3-*trans*) e (-)-epicatequina (2,3-*cis*) unidas pela ligação C-C. As procianidinas do tipo A possuem ligação interflavonoide do tipo 4 β →8 (ligação entre os carbonos C4-C6 ou C4-C8) e 2 β →O→7 (ligação éter envolvendo o carbono C2). As procianidinas do tipo B possuem apenas uma ligação interflavonoide do tipo 4 β →8. As procianidinas do tipo A e B são diméricas (Figura 5), enquanto que as do tipo C são triméricas, caracterizadas pelas ligações interflavonoide do tipo B ou D (quando uma ligação é do tipo B e outra do tipo A). As procianidinas poliméricas possuem mais de 6 unidades monoméricas em sua estrutura. As prodelfinidinas são polímeros da galocatequina e epigalocatequina (Shahidi & Naczki, 2004; Bolling et al., 2011; Murkovic, 2016).

Figura 5 - Procianidinas diméricas do tipo A (à esquerda) e do tipo B (à direita).

1.2.5 Cumarinas

As cumarinas possuem o esqueleto carbônico na configuração C6-C3 e são lactonas (benzo- α -pirona), derivadas dos ácidos o-hidroxicinâmicos pela ciclização da cadeia lateral do ácido o-cumárico. Este grupo de compostos pode ser encontrado na forma livre ou combinada com açúcares, formando e glicosídeos (Cheynier et al., 2013).

1.2.6 Lignanas

As lignanas compõem o grupo de compostos constituídos por unidades do fenilpropano (C6-C3)₂. Em geral, são formadas por dimerização de unidades fenilpropanoides (eugenol, álcool coniferílico, isoeugenol, etc.) por meio de acoplamento oxidativo. Tal grupo é dividido em lignanas (contendo duas unidades C6-C3 unidas pela ligação 3 β -(8-8')), neolignanas (contendo duas unidades C6-C3 que não fazem ligação do tipo 3 β) e lignanas híbridas (contendo a unidade C6-C3 ligada a uma outra estrutura, tais como flavonoides) (Kiyama, 2016).

1.2.7 Compostos fenólicos no amendoim

O amendoim é um alimento com potencial para oferecer benefícios à saúde àqueles que o consomem. Além do aspecto nutritivo, dado pelo seu conteúdo e qualidade em proteínas e lipídeos, o amendoim apresenta em sua composição os chamados fitoquímicos, que incluem os compostos fenólicos, por exemplo. Esses

compostos exibem propriedades biológicas, como atividades antioxidante e anti-inflamatória, as quais estão inversamente associadas a doenças cardiovasculares e proteção contra o câncer (Higgs, 2003; Nishi et al., 2014). Ademais, os compostos fenólicos do amendoim podem ter aplicação prática de grande interesse à indústria de alimentos, especialmente os encontrados na película (Francisco & Resurreccion, 2008).

Os estudos da composição fenólica em amendoim começaram a mais de 40 anos. Em 1974, os pesquisadores Maga e Lorenz determinaram a composição química em ácidos fenólicos livres em fontes proteicas, entre elas, o amendoim, onde foram encontrados os ácidos siríngico, ferúlico e vanílico. Nos últimos 10 anos o total de trabalhos (artigos de pesquisa, revisão, capítulos de livro) relacionados ao amendoim e a compostos fenólicos somaram quase 4.000 publicações. O motivo para este número expressivo de publicações de um material relativamente simples é, sem dúvida, devido à complexidade química, atrelada aos avanços das técnicas de identificação cada vez mais acuradas e precisas, que agora permitem a identificação de um composto ou um grupo de compostos nunca descritos antes para esta matriz. Um exemplo foi o estudo recente realizado por Chiou et al. (2017) que identificou dois estilbenos, até então nunca antes descritos para brotos de amendoim (*A. hypogaea* L., cultivar do grupo Spanish).

Os compostos fenólicos estão presentes em várias partes do amendoim, tanto na forma livre quanto ligados à um polímero insolúvel. Em cada uma delas predomina uma classe específica e uma determinada concentração desses compostos, que também variam de acordo com a cultivar, estágio da germinação, época/região do plantio e condições do armazenamento (Limmongkon et al., 2018) e/ou aplicação de algum tratamento como a torrefação, cozimento, blanchamento, irradiação (Chukwumah et al., 2007; de Camargo et al. 2015). A película é a parte onde se concentra o maior teor dos compostos fenólicos do amendoim comparado ao cotilédone. Em estudo realizado por Attree et al. (2015) com seis variedades de amendoim, o teor total dos compostos fenólicos variou de 97,3 a 133,5 mg GAE/g na película, enquanto que nos cotilédones variou de 0,88 a 1,85mg GAE/g. No período de germinação do amendoim (broto), essa diferença também foi observada por Limmongkon et al. (2018), em que o teor total dos compostos fenólicos variou de 0,43 a 2,39 mg GAE/g na película e de 0,16 a 0,27 mg GAE/g nos cotilédones.

Tabela 3 - Compostos fenólicos presentes em diferentes partes do amendoim.

(continua)

Amendoim	Composto	Referência
Cotilédone	Ácido cafeico	Win et al. (2011);
	Ácido <i>p</i> -cumárico	Sales & Resurreccion (2010);
	Éster do ácido <i>p</i> -cumárico	Aljuhaimi & Özcan (2017);
	Ácido ferúlico	Chukwumah et al. (2007);
	Ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico	Talcott et al. (2005)
	Éster do ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico	
	Ácido clorogênico	
	Ácido gálico	
	Ácido protocatecuico	
	Ácido vanílico	
	Ácido siríngico	
	Quercetina	
	Canferol	
	Biochanina A	
	Genisteína	
	Daidzeína	
	Formononetina	
	<i>Trans</i> -resveratrol	
	<i>Trans</i> -piceid	
Película	Ácido quínico	Oldoni et al. (2016);
	Ácido gálico	Ma et al. (2014);
	Ácido <i>p</i> -cumárico	Bodoira et al. (2017);
	Ácido <i>o</i> -cumárico	de Camargo et al. (2015);
	Ácido cafeico	Larrauri et al. (2016);
	Ácido elágico	Qiu et al. (2012)
	Ácido ferúlico	
	Ácido sinápico	
	Ácido coutárico	
	Ácido caftárico	
	Ácido protocatecuico	
	Ácido <i>p</i> -cumaroil-nicotinoil-tartárico	
	Ácido <i>p</i> -cumaroil-sinapoil-tartárico	
	Ácido <i>p</i> -cumaroil-feruloil-tartárico	
	Ácido <i>o</i> -cumaroil- <i>O</i> -pentosídeo	
	Ácido Formononetina-7- <i>O</i> - <i>p</i> -coumaroil-tartárico	
	(-)-Epicatequina	
	(+)-Catequina	
	Galocatequina	
	Epicatequina-galato	
	Catequina-galato	
	Quercetina hexosídeo	
	Isoquercetina	
	Isoramnetina hexosídeo	
	Isoramnetina rutinosídeo	
	Crisina	
	Apigenina	
	Luteolina	
	Biochanina A	

	Manniflavanona	
	Eriodictol	
	Procianidina A (dímero)	
	Procianidina A (trímero)	
	Procianidina A (tetramero)	
	Procianidina A (pentâmero)	
	Procianidina B (dímero)	
	Procianidina C2 (trímero)	
	Proantocianidina (dímero)	
	Proantocianidina (trímero)	
	Proantocianidina A1	
	Proantocianidina A2	
	Prodelfinidina A (dímero)	
	Prodelfinidina B (dímero)	
	<i>Trans</i> -resveratrol	
	<i>Trans</i> -piceatannol	
Folhas e Raízes	<i>Trans</i> -resveratrol	Chen et al. (2002); Chung et al. (2003)

De acordo com Talcott et al. (2005), o composto fenólico com potencial antioxidante predominante em cotilédones do amendoim *in natura*, sem a película, é o ácido fenólico *p*-cumárico, que variou de 8 a 66 mg/kg nas cultivares estudadas.

As proantocianidinas podem representar 17% do peso total da película do amendoim no estágio maduro (Karchesy & Hemingway, 1986). Elas estão presentes em muitos tipos, sendo que em sua maioria a do tipo A, nas formas diméricas, triméricas e tetraméricas (Sarnoski et al., 2012), estão em quantidade significativamente maior do que dos demais compostos fenólicos, dentre os quais 75% são derivadas do *p*-cumaroil, cuja estrutura está representada na Figura 6 (Ma et al., 2014).

Figura 6 - Estrutura química do *p*-cumaroil.

1.3 Atividade antioxidante dos compostos fenólicos

Um composto antioxidante é definido como sendo “uma substância que, quando presente em baixas concentrações, comparado a de um substrato oxidável, atrasa ou impede a oxidação desse substrato” (Halliwell, 1990). Tal definição é universalmente aceita e abrange tanto as substâncias que agem contra espécies reativas presentes no organismo, quanto nos processos de oxidação em alimentos e outras matrizes. Todos os antioxidantes apresentam pelo menos um dos sete mecanismos de ação a seguir (Carocho et al., 2018):

- Sequestro de radicais livres em um determinado meio;
- Quelação de íons metálicos;
- Inibição de enzima produtoras de radicais livres;
- Ativação de enzimas antioxidantes endógenas;
- Prevenção da peroxidação lipídica;
- Prevenção de danos ao DNA;
- Prevenção de modificação de proteínas e destruição de açúcares.

Com base na atividade antioxidante, os compostos fenólicos são antioxidantes primários e agem principalmente como sequestradores de radicais livres (Shahidi & Ambigaipalan, 2015). Assim, previnem reações oxidativas no organismo, que levam ao aparecimento de várias doenças ou evitam a ocorrência da oxidação lipídica, também uma das principais reações de deterioração em alimentos (Halliwell et al., 1995).

A atividade antioxidante dos compostos fenólicos está relacionada diretamente com a estrutura química que apresentam, ou seja, pela presença e localização de insaturações, grupos hidroxila e grupos catecol (Shahidi & Ambigaipalan, 2015; Croft, 2016).

Nos flavonoides, os grupos hidroxila são essenciais para a ocorrência da atividade sequestrante de radicais livres, sendo que, quanto maior o grau de hidroxilação da estrutura química inativa, uma flavona, por exemplo, maior é a atividade. Entretanto, não somente o número, mas a posição e o padrão de hidroxilação também contribuem para o aumento da atividade de sequestro. A atividade antioxidante dos flavonoides como sequestradores de radicais livres se dá pela rápida doação de hidrogênios para os radicais (Rice-Evans et al., 1996; Seyoum et al., 2006).

A presença das substituições *orto*-di-hidroxi (catecol), pirogalol ou 3-OH na estrutura dos flavonoides, também favorecem alta atividade sequestrante comparada às substituições mono-hidroxi ou *meta*-di-hidroxi, na maioria dos casos. Flavonóis e flavonas que contêm um grupo catecol no anel B são altamente ativos, entretanto, os flavonóis comparados às flavonas correspondentes, são mais ativos devido à presença do grupo 3-OH. Os substituintes glicosídeos em flavonoides glicosilados não são determinantes para o aumento da atividade antioxidante (Pietta, 2000; Seyoum et al., 2006).

Rice-Evans et al. (1996) mostraram a importância da dupla ligação na posição 2-3 no anel C conjugada a um grupo 4-oxo na estrutura dos flavonoides, os quais influenciaram positivamente na atividade antioxidante. Assim, flavanonois e flavanonas por não apresentarem a dupla ligação na posição 2-3 em conjugação com o grupo 4-oxo, são tidos como antioxidantes fracos (Figura 7). Em suma, a existência da dupla ligação nos carbonos 2 e 3 em conjugação com um grupo carbonila no carbono 4, aliado a determinados padrões de hidroxilação, especialmente o catecol no anel B, grupos metoxilas e um baixo número de glicosilações, conferem alta atividade antioxidante para os flavonoides, como pode ser observado na Figura 7. A hidrofobicidade é um outro fator a ser considerado quando se trata da absorção dos flavonoides através da bicamada lipídica de membranas (Wang et al., 2018).

Figura 7 - Estrutura de um flavonoide contendo a indicação de ligações, grupos e funções que favorecem o aumento da atividade antioxidante.

Fonte: Adaptado de Williams, Spencer & Rice-Evans (2004)

A atividade antioxidante também pode ser influenciada pelo meio onde estão presentes os compostos fenólicos, se em meio aquoso ou lipídico. A eficiência da catequina em meio lipídico é equivalente à da quercetina, que possui um grupo 3-OH ligado à dupla ligação 2-3 e adjacente a um grupo 4-oxo no anel C. Essas características potencializam a atividade antioxidante em meio aquoso, facilitando a deslocalização do elétron do anel B para o anel A, portanto, a atividade antioxidante da quercetina é superior a da catequina nesse meio. Entretanto, essas diferenças estruturais não resultam em diferenças na ação do flavonoide em testes de peroxidação lipídica. A atividade antioxidante da catequina presente em meio lipídico é substancialmente diminuída com a substituição de um grupo 3-OH pelo galoil éster no anel C. De fato, o ácido gálico é um fraco inibidor em reações de peroxidação lipídica. A polimerização de moléculas de catequina diminui a habilidade em prevenir o dano dos radicais livres em sistema lipídico, enquanto que em sistemas aquosos a atividade aumenta da forma monômera até trímera e decai da forma trímera a tetrâmera (Plumb et al., 2009).

A atividade antioxidante de ácidos fenólicos e seus ésteres também depende do número de grupos hidroxila na molécula. Os ácidos monohidroxibenzóicos não possuem capacidade de doar hidrogênio em soluções aquosas, nos casos em que o grupo hidroxila se encontra nas posições *orto* ou *para* em comparação com as moléculas que possuem o grupo hidroxila na posição *meta*, que então apresentam atividade antioxidante (Rice-Evans et al., 1996).

Os derivados do ácido di-hidroxibenzóico possuem atividade antioxidante dependente das posições dos grupos hidroxila em relação ao grupo carboxila, sendo que os compostos que possuem as hidroxilas nas posições *orto* e *meta* em relação à carboxila possuem atividade antioxidante um pouco mais elevada quando comparado aos compostos que possuem as hidroxilas nas posições *meta* e *para*. O ácido gálico, ácido tri-hidroxibenzóico, possui maior atividade antioxidante comparado a dos compostos anteriormente citados, sendo que a esterificação diminui tal atividade (Rice-Evans et al., 1996).

Em relação aos ácidos hidroxicinâmicos, a inserção do grupo etilênico entre o anel fenila com um grupo hidroxila na posição *para*, como no ácido *p*-cumárico, favorece as propriedades redutoras comparadas às do ácido cinâmico. A incorporação de um grupo hidroxila adjacente à posição *para* do ácido *p*-cumárico, gerando o ácido caféico, confere atividade antioxidante ao composto e, a partir do

ácido caféico com a substituição do grupo 3-OH por uma metoxila (ácido ferúlico), a atividade antioxidante é favorecida. Todos os monofenóis são menos eficientes que os polifenóis quanto à atividade antioxidante em sistema lipídico, entretanto a atividade é favorecida com a inserção de grupos –OH e grupos –CH₃ (ácido sinápico > ácido ferúlico > ácido *p*-cumárico) (Rice-Evans et al., 1996).

A atividade antioxidante dos ácidos fenólicos é superior quando estes estão ligados à albumina do soro humano, entretanto, a afinidade dos compostos com a proteína é influenciada pela posição dos grupos hidroxila (posição *orto* possui mais afinidade que a posição *para*); metilação dos grupos –OH ou substituição destes por grupos metila nas posições 3- e 4- do anel benzeno melhora a afinidade com a proteína (Zhang et al., 2018).

1.3.1 Espécies reativas de oxigênio (ERO) e de nitrogênio (ERN)

As espécies reativas estão presentes nos sistemas biológicos (células e tecidos) em baixas concentrações, porém mensuráveis. Tais concentrações são determinadas pelo balanço entre a taxa de produção e a de sequestro dessas espécies pelos antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos. O estresse oxidativo é o estado do organismo em que há o desbalanço da produção de ERO/ERN e o sistema antioxidante não é capaz de eliminar o excesso dessas espécies. Quando presentes em baixas a moderadas concentrações (picomolar), as espécies reativas agem em favor da proteção celular por meio de mecanismos de sinalização, no entanto, quando estão em excesso, causam danos às macromoléculas (DNA, lipídeos, proteínas). O estado de estresse oxidativo é um distúrbio à homeostase e é geralmente considerado um fator de risco para o início e progressão de doenças como diabetes mellitus, câncer, aterosclerose, artrite reumatoide, doenças neurodegenerativas e do coração, entre outras (Dröge, 2002; Carocho et al., 2018). Portanto, a regulação da concentração dessas espécies reativas é crítica para a manutenção da homeostase celular.

Entre as espécies reativas encontram-se as provenientes do oxigênio, chamadas de espécies reativas de oxigênio (ERO) e do nitrogênio, chamadas de espécies reativas de nitrogênio (ERN). As ERO compreendem o ânion superóxido (O₂^{•-}), radical hidroxila (•OH), radical peroxila (ROO[•]), peróxido de hidrogênio (H₂O₂), ácido hipocloroso (HOCl), oxigênio singlete (¹O₂), entre outros, e as ERN compreendem o óxido nítrico (NO[•]), dióxido de nitrogênio (NO₂[•]) e o peroxinitrito

(ONOO⁻). Essas espécies são provenientes, nos organismos, de vários sistemas celulares localizados na membrana plasmática, citossol, nos peroxissomos, membranas da mitocôndria e no retículo endoplasmático (Meo et al., 2016).

Os principais compostos/enzimas envolvidos na produção de ERO são: xantina oxidase, catecolaminas e flavinas (citossol); oxidases da cadeia respiratória (mitocôndria); ciclooxigenases, lipoxigenases e NADPH oxidase (membrana plasmática); citocromo P450, citocromo b5 e Ero 1p (retículo endoplasmático). O óxido nítrico é produzido a partir do metabolismo da L-arginina pelas óxido nítrico sintases (Meo et al., 2016).

A exposição de células e tecidos a essas espécies reativas provocam uma série de reações que induz a ativação de mecanismos de defesa no organismo. Uma das principais enzimas antioxidantes que agem na primeira linha de defesa é a superóxido dismutase (SOD), que catalisa a reação de dismutação do ânion superóxido a peróxido de hidrogênio e oxigênio molecular. Outras importantes enzimas são a catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GT) e peroxiredoxinas (Prxs), que são responsáveis por neutralizar o peróxido de hidrogênio (Mironczuk-Chodakowska et al., 2018).

Substâncias não enzimáticas também fazem parte dessa primeira linha de defesa e são representadas pela ceruloplasmina, ferritina, tranferrina e albumina que agem de forma a inibir a formação de novas espécies reativas ligando-se aos metais de transição (ferro e cobre). A segunda linha de defesa antioxidante contra espécies reativas envolve os antioxidantes não enzimáticos que são representados por moléculas que rapidamente inativam radicais e oxidantes. A terceira linha de defesa consiste em mecanismos de reparo do dano causado pela ação das espécies reativas. Essa forma de proteção é conduzida por enzimas antioxidantes que reparam os danos no DNA, proteínas, membranas celulares e moléculas, além de agirem na cadeia de propagação dos radicais peroxila (Mironczuk-Chodakowska et al., 2018).

Os antioxidantes provenientes da dieta, também chamados de antioxidantes exógenos, como os compostos fenólicos, podem afetar a atividade dos antioxidantes endógenos. Ambos podem agir em sinergismo a fim de manter ou reestabelecer a condição de homeostase do organismo.

1.4 O estresse hídrico e os compostos fenólicos

Basicamente, as plantas precisam de energia (luz), água, carbono e minerais para o seu crescimento. O estresse abiótico é definido como a condição ambiental que afeta o crescimento e a produtividade abaixo dos níveis considerados ótimos para uma determinada planta. Quando submetidas ao estresse abiótico, as plantas reprogramam seu crescimento modulando a divisão e expansão celular a fim de minimizar os efeitos deletérios e completar o seu ciclo sob condições adversas (Skirycz & Inzé, 2010; Cramer et al., 2011).

A aridez ou seca ocorre em várias partes do mundo, principalmente em regiões de climas árido e semiárido e em regiões de precipitação adequada, mas não uniforme, e em ambientes de limitação hídrica. Durante o estresse hídrico, as plantas fecham seus estômatos e acumulam solutos (compostos orgânicos de baixo peso molecular como a prolina, sacarídeos e ácidos orgânicos) a fim de reduzir o potencial hídrico e consequentemente, a desidratação. Além disso, limitam as trocas gasosas, reduzem a transpiração e detêm as taxas de assimilação de carbono. Simultaneamente, são sintetizadas proteínas que exercem ação de proteção, tais como deidrinas e antioxidantes, que restringem os danos a outras proteínas e membranas celulares e diminuem os níveis de ERO, cuja produção é acentuada durante o estresse hídrico (Hare et al., 1998; Skirycz & Inzé, 2010). A Figura 8 aponta as principais mudanças que ocorrem em plantas superiores sob estresse hídrico.

Os compostos fenólicos apresentam função de defesa em plantas e estão presentes em seus tecidos promovendo proteção contra os estresses biótico e abiótico. Diversos estudos descrevem o comportamento dos compostos fenólicos em plantas sob o estresse hídrico e sugerem que, alguns desses compostos, podem ser utilizados como indicadores à adaptabilidade de plantas nessa condição adversa (Cheruiyot et al., 2007; Popović et al., 2016; Varela et al., 2016). No estudo realizado por Popović et al. (2016), em regime de déficit hídrico houve melhora no teor de alguns flavonoides como crisina, miricetina, canferol e ácido isoferúlico localizados na raiz de álamo bem como no teor total de compostos fenólicos e atividade antioxidante em folhas. Cheruiyot et al. (2007) observaram que o declínio no conteúdo de água no solo limitou o crescimento de *Camellia sinensis* L. e diminuiu o teor dos polifenóis e que, os compostos fenólicos dos clones tolerantes ao estresse tiveram flutuação restrita frente às mudanças do conteúdo de água no solo.

Figura 8 - Respostas fisiológicas, bioquímicas e moleculares em plantas superiores sob estresse hídrico.

Fonte: Shao et al. (2008)

O estudo com folhas de tomates cereja, realizado por Sánchez-Rodrigues et al. (2011), mostrou que, de modo geral, a concentração dos derivados do ácido cafeoilquínico e flavonoides diminuiu em todos os genótipos estudados que foram submetidos ao estresse hídrico, exceto para uma determinada cultivar, altamente tolerante ao estresse hídrico. Nessa cultivar foi demonstrado que houve aumento da concentração desses compostos, especialmente os flavonoides derivados da quercetina e canferol o que dá suporte à tese de que o estresse hídrico moderado pode ativar a via do ácido chiquímico. Sob o estresse hídrico moderado também foi observado um significativo aumento no teor de compostos fenólicos em alface (Oh et

al., 2010), em genótipos tolerantes de folhas de milho (Hura et al., 2008) e em partes aéreas de *Salvia officinalis* L. (Bettaieb et al., 2011).

O estresse hídrico pode influenciar o teor de compostos fenólicos em diferentes partes da planta. Aninbon et al. (2016) avaliaram o efeito do déficit de água em cinco genótipos de amendoim (tolerantes e sensíveis a seca), próximo do momento da colheita, no teor de compostos fenólicos, e observaram uma redução do conteúdo fenólico nas sementes de todos os genótipos e um aumento desse teor nas folhas e caules.

1.5 Bioacessibilidade de compostos fenólicos

A bioacessibilidade é definida como sendo “a quantidade de um determinado componente que é liberada de uma matriz alimentar para o fluido do trato gastrointestinal, e então está disponível para a absorção através da mucosa intestinal” (Garrett et al., 1999; Heaney, 2001).

Atualmente, os métodos de digestão *in vitro* são largamente empregados para o estudo da bioacessibilidade de compostos comparados ao modelo humano por serem métodos mais rápidos, de menor custo e trabalho e não exigirem restrições éticas. Tais métodos têm por base procedimentos que simulam as etapas e condições fisiológicas da digestão no trato gastrointestinal humano, considerando a presença de enzimas digestivas e suas concentrações, pH, tempo de digestão, concentração de sais e outros fatores (Minekus et al., 2014). A digestão *in vitro* acoplada a experimentos com cultura de células Caco-2 simulam a absorção dos compostos no intestino delgado e consiste no método mais utilizado para o estudo da bioacessibilidade/biodisponibilidade desses compostos (Barba et al., 2017).

Nos últimos anos os compostos bioativos, que incluem as vitaminas, polifenóis, carotenoides e fibras dietéticas, têm sido estudados visando o desenvolvimento de alimentos funcionais e nutracêuticos, fármacos, entre outras aplicações. No entanto, deve-se ter em mente que qualquer efeito benéfico é dependente da biodisponibilidade desses compostos, sendo que tal característica é mais significativa quando comparada à quantidade dessas substâncias bioativas presentes na matriz alimentar, ou seja, a bioacessibilidade e a biodisponibilidade de compostos bioativos, após a digestão, determinam a ação biológica no organismo (Lucas-González et al., 2018a).

Um grande e crescente número de estudos tem sido publicados, relacionados à bioacessibilidade de compostos fenólicos e suas propriedades antioxidantes, provenientes de diferentes alimentos, principalmente os de origem vegetal, como frutas (Chen et al., 2014), especialmente as *berries* (Liang et al., 2012; Huang et al., 2014; Pinto et al., 2017; Rocchetti, et al., 2018), feijões (Sancho et al., 2015), nozes e sementes, incluindo o amendoim tostado (Herbello-Hermelo et al., 2018), sucos (Pérez-Vicente et al., 2002; Rodríguez-Roque et al., 2013), azeite extra virgem (Dinnella et al., 2007), café (Podio et al., 2015), farinhas (Lucas-González et al., 2018b), pão (Dall'Asta et al., 2016), resíduos da agroindústria (Blancas-Benites et al., 2015; Jara-Palacios et al., 2018), entre outros.

Apesar das importantes e reconhecidas propriedades biológicas dos compostos fenólicos presentes nos alimentos, como a antioxidante e anti-inflamatória, o estudo da bioacessibilidade e biodisponibilidade de tais compostos e demais substâncias bioativas é que determina, de fato, as suas reais ações biológicas, visto que, a bioacessibilidade dos polifenóis, após a etapa da digestão, é geralmente muito baixa. Assim, se esses compostos são absorvidos, às vezes, as concentrações presentes nos tecidos alvo são insuficientes para haver algum mecanismo antioxidante e conseqüentemente, haver algum efeito protetor. Dessa forma, estudos envolvendo propriedades antioxidantes de compostos naturais, determinadas por técnicas de *screening in vitro*, devem ser acompanhados por ensaios biológicos utilizando cultura celular, digestão simulada, preferencialmente determinações *in vivo*, de acordo com os editores da revista científica "Food Chemistry" (Granato et al., 2018).

Referências

- ALJUHAIMI, F.; ÖZCAN, M.M. Influence of oven and microwave roasting on bioproperties, phenolic compounds, fatty acid composition, and mineral contents of nongerminated peanut and germinated peanut kernel and oils. **Journal of Food Processing and Preservation**, p. 1-8, 2017.
- ANINBON, C.; JOGLOY, S.; VORASOOT, N.; PATANOTHAI, A.; NICHADOMRONG, S.; SENAWONG. Effect of end of season water deficit on phenolic compounds in peanut genotypes with different levels of resistance to drought. **Food Chemistry**, v. 196, p. 123-129, 2016.

ATTREE, R.; DU, B.; XU, B. Distribution of phenolic compounds in seed coat and cotyledon, and their contribution to antioxidant capacities of red and black seed coat peanuts (*Arachis hypogaea* L.). **Industrial Crops and Products**, v. 67, p. 448-456, 2015.

BARBA, F.J.; MARIUTTI, L.R.B.; BRAGAGNOLO, N.; MERCADANTE, A.Z.; BARBOSA-CÁNOVAS, G.V.; ORLIEN, V. Bioaccessibility of bioactive compounds from fruits and vegetables after thermal and nonthermal processing. **Trends in Food Science & Technology**, v. 67, p.195-206, 2017.

BARBEHENN, R.V.; CONSTABEL, C.P. Tannins in plant-herbivore interactions. **Phytochemistry**, v. 72, p. 1551-1565, 2011.

BETTAIEB, I.; HAMROUNI-SELLAMI, I; BOURGOU, S.; LIMAM, F.; MARZOUK, B. Drought effects on polyphenol composition and antioxidant activities in aerial parts of *Salvia officinalis* L. **Acta Physiologiae Platarum**, v. 33, p. 1103-1111, 2011.

BLANCAS-BENITES, F.J.; MERCADO-MERCADO, G.; QUIROS-SAUCEDA, A.E.; MONTALVO-GONZALEZ, E.; GONZALEZ-AGUIAR, G.A.; SAYAGO-AYERDI, S.G. Bioaccessibility of polyphenols associated with dietary fiber and in vitro kinetics release of polyphenols in Mexican 'Ataulfo' mango (*Mangifera indica* L.) by-products. **Food & Function**, v. 6, p. 859-868, 2015.

BODOIRA, R.; ROSSI, Y.; MONTENEGRO, M.; MAESTRI, D.; VELEZ, A. Extraction of antioxidant polyphenolic compounds from peanut skin using water-ethanol at high pressure and temperature conditions. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 128, p. 57-65, 2017.

BOLLING, B.W.; CHEN, C.Y.O.; MCKAY, D.L.; BLUMBERG, J.B. Tree nut phytochemicals: composition, antioxidant capacity, bioactivity, impact factors. A systematic review of almonds, Brazils, cashews, hazelnuts, macadamias, pecans, pine nuts, pistachios and walnuts. **Nutrition Research Reviews**, v. 24, p. 244-275, 2011.

CÂMARA, G.M.S.; GODOY, O.P.; MARCOS FILHO, J.; FONSECA, H. **Amendoim: produção, pré-processamento e transformação agroindustrial**. São Paulo: Promocet, 1982, p. 1-83. (Série de Extensão Agroindustrial 3).

CAROCHO M.; MORALES, P.; FERREIRA, I.C.F.R. Antioxidants: Reviewing the chemistry, food applications, legislation and role as preservatives. **Trends in Food Science & Technology**, v. 71, p. 107-120, 2018.

CARRÍN, M.E.; CARELLI, A.A. Peanut oil: compositional data. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 112, p. 697-707, 2010.

CHANG, A.S.; SREEDHARAN, A.; SCHNEIDER, K.R. Peanut and peanut products: A food safety perspective. **Food Control**, v. 32, p. 296-303, 2013.

CHEN, G.L.; CHEN, S.G.; ZHAO, Y.Y.; LUO, C.X.; LI, J.; LAO, Y.Q. Total phenolic contents of 33 fruits and their antioxidant capacities before and after in vitro digestion. **Industrial Crops and Products**, v. 57, p. 150-157, 2014.

CHEN, R.S.; WE, P.L.; CHIOU, R.Y.Y. Peanut roots as a source of resveratrol. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 1665-1667, 2002.

CHEYNIER, V.; COMTE, G.; DAVIES, K.M.; LATTANZIO, V.; MARTENS, S. Plant phenolics: Recent advances on their biosynthesis, genetics, and ecophysiology. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 72, p. 1-20, 2013.

CHERUIYOT, E.K.; MUMERA, L.M.; NG'ETICH, W.K.; HASSANALI, A.; WACHIRA, F. Polyphenols as potential indicators for drought tolerance in tea (*Camellia sinesis* L.). **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 71, p. 2190-2197, 2007.

CHIOU, R.Y.-Y.; CHIU, P.-C.; CHANG, J.-C.; LI, Y.-J.; HSIEH, C.-W.; WU, J.-Y.; LIN, S.-M.; LIN, Y.-L.; WENG, B.B.-C. Discovery of new stilbene antioxidants of the bio-elicited peanut sprout powder (BPSP) and longevity extension of mice fed with BPSP-supplemented diets. **Food and Nutrition Sciences**, v. 8, p. 141-162, 2017.

CHONG, J.; POUTARAUD, A.; HUGUENEY, P. Metabolism and roles of stilbenes in plants. **Plant Science**, v. 177, p. 143-155, 2009.

CHUNG, I.M.; PARK, M.R.; CHUN, J.C.; YUN, S.J. Resveratrol accumulation and resveratrol synthase gene expression in response to abiotic stresses and hormones in peanut plants. **Plant Science**, v. 164, p. 103-109, 2003.

CHUKWUMAH, Y.; WALKER, L.; VOGLER, B.; VERGHESE, M. Changes in phytochemical composition and profile of raw, boiled, and roasted peanuts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 9266-9273, 2007.

COHEN, S.D.; KENNEDY, J.A. Plant metabolism and the environment: implications for managing phenolics. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 50, p. 620-643, 2010.

CONAB. COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Acompanhamento de safra brasileira – grãos: Décimo primeiro levantamento, agosto 2017 – safra 2016/2017. Brasília: Companhia Nacional de Abastecimento. 2017. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/graos> . Acesso em: 04-01-2018.

CONG-CONG, X.U.; BING, W.; YI-QIONG, P.U.; JIAN-SHENG, T.; TONG, Z. Advances in extraction and analysis of phenolic compounds from plant materials. **Chinese Journal of Natural Medicines**, v. 15, p. 721-731, 2017.

CRAMER, G.R.; URANO, K.; DELROT, S.; PEZZOTTI, M.; SHINOZAKI, K. Effects of abiotic stress on plants: a systems biology perspective. **BMC Plant Biology**, v. 11, p. 1-14, 2011.

CROFT, K.D. Dietary polyphenols: Antioxidants or not? **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 595, p. 120-124, 2016.

DALL'ASTA, M.; BRESCIANI, L.; CALANI, L.; COSSU, M.; MARTINI, D.; MELEGARI, C.; SCAZZINA, F. In vitro bioaccessibility of phenolic acids from a commercial aleurone-enriched bread compared to a whole grain bread. **Nutrients**, v. 8, p. 42-51, 2016.

DE CARMARGO, A.C.; REGITANO-D'ARCE, M.A.B.; GALO, C.R.; SHAHIDI, F. Gamma-irradiation induced changes in microbiological status, phenolic profile and antioxidant activity of peanut skin. **Journal of Functional Foods**, v. 12, p. 129-143, 2015.

DIAS, M.I.; SOUSA, J.; ALVES, R.C.; FERREIRA, I.C.F.R. Exploring plant tissue culture to improve the production of phenolic compounds: A review. **Industrial Crops and Products**, v. 82, p. 9-22, 2016.

DINNELLA, C.; MINICHINO, D.; D'ANDREA, A.A.; MONTELEONE, E. Bioaccessibility and antioxidant activity stability of phenolic compounds from extra-virgin olive oils during in vitro digestion. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 8423-8429, 2007.

DRÖGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiological reviews**, v. 82, p. 47-95, 2002.

FRANCISCO, M.L.D.L.; RESURRECCION, A.V.A. Functional Components in Peanuts. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 48, p. 715-746, 2008.

FREIRE, R.M.M.; NARAIN, N.; MIGUEL, A.M.R.O.; DOS SANTOS, R.C. Aspectos nutricionais do amendoim e seus derivados. In: DOS SANTOS, R.C.; FREIRE, R.M.M.; DE LIMA, L.M., eds. O agronegócio do amendoim no Brasil. 2.ed. Brasília, DF: Embrapa, 2013. Cap.9, p. 391-419.

GARRETT, D.A.; FAILLA, M.L.; SARAMA, R.J. Development of a in vitro digestion method to assess carotenoid bioavailability from meals. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, p. 4301-4309, 1999.

GIL-MUÑOZ, R.; FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ, J.I.; CRESPO-VILLEGAS, O.; GARDE-CERDÁN, T. Elicitors use as tool to increase stilbenes in grapes and wine. **Food Research International**, v. 98, p. 34-39, 2017.

GRANATO, D.; SHAHIDI, F.; WROLSTAD, R.; KILMARTIN, P.; MELTON, L.D.; HIDALGO, F.J.; MIYASHITA, K.; VAN CAMP, J.; ALASALVAR, C.; ISMAIL, A.B.; ELMORE, S.; BIRCH, G.G.; CHARALAMPOPOULOS, D.; ASTLEY, S.B.; PEGG, R.; ZHOU, P.; FINGLAS, P. Antioxidant activity, total phenolics and flavonoids contents: Should we ban in vitro screening methods? **Food Chemistry**, v. 264, p. 471-475, 2018.

GODOY, I.J. Como são denominados os tipos de amendoim. Disponível em: www.infoamendoim.com.br/saibamaissobreoamendoim. Acesso em 03-01-2018.

GRIEL, A.E.; EISSENSTAT, B.; JUTURU, V.; HSIEH, G.; KRIS-ETHERTON, P.M. Improved diet quality with peanut consumption. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 23, p. 660-668, 2004.

HALLIWELL, B.; AESCHBACH, R.; LÖLIGER, J.; ARUOMA, O.I. The characterization of antioxidants. **Food and Chemical Toxicology**, v. 33, p. 601-617, 1995.

HALLIWELL, B. How to characterize a biological antioxidant. **Free Radical Research Communications**, v. 9, p. 1-32, 1990.

HAMMONS, R.O.; HERMAN, D.; STALKER, H.T. Origin and early history of the peanut. In: **Peanuts**. p. 1-26, 2016.

HARE, P.D.; CRESS, W.A.; VAN STADEN, J. Dissecting the roles of osmolyte accumulation during stress. **Plant, Cell and Environment**, v. 21, p. 535-553, 1998.

HEANEY, R.P. Factor influencing the measurement of bioavailability, taking calcium as a model. **The Journal of Nutrition**, v. 131, p. 1344S-1348S, 2001.

HE, G.; MENG, R.; GAO, H.; GUO, B.; GAO, G.; NEWMAN, M.; PITTMAN, R.N.; PRAKASH, C.S. Simple sequence repeat markers for botanical varieties of cultivated peanut (*Arachis hypogaea* L.). **Euphytica**, v. 142, p. 131-136, 2005.

HERBELLO-HERMELO, P.; LAMAS, J.P.; LORES, M.; GONZÁLEZ, R.D.; BERMEJO-BARRERA, P.; MOREDA-PIÑEIRO, A. Polyphenol bioavailability in nuts and seeds by an *in vitro* dialyzability approach. **Food Chemistry**, v. 254, p. 20-25, 2018.

HIGGS, J. The beneficial role of peanuts in the diet – Part 2. **Nutrition & Food Science**, v. 33, p. 56-64, 2003.

HUANG, H.; SUN, Y.; LOU, H.; LI, H.; YE, X. *In vitro* digestion combined with cellular assay to determine the antioxidant activity in Chinese bayberry (*Myrica rubra* Sieb et Zucc.) fruits: A comparison with traditional methods. **Food Chemistry**, v. 146, p. 363-370, 2014.

HURA, T.; HURA, K.; GRZESIAK, S. Contents of total phenolics and ferulic acid, and PAL activity during water potential changes in leaves of maize single-cross hybrids of different drought tolerance. **Journal of Agronomy and Crop Science**, v. 194, p. 104-112, 2008.

JARA-PALACIOS, M.J.; GONÇALVES, S.; HERNANZ, D.; HEREDIA, F.J.; ROMANO, A. Effects of *in vitro* gastrointestinal digestion on phenolic compounds and antioxidant activity of different white winemaking byproducts extracts. **Food Research International**, v. 109, p. 433-439, 2018.

KARCHESY, J.J.; HEMINGWAY, R.W. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 34, p. 966-970, 1986.

KIYAMA, R. Biological effects induced by estrogenic activity of lignans. **Trends in Food Science & Technology**, v. 54, p. 186-196, 2016.

LAURRARI, M.; ZUNINO, M.P.; ZYGADLO, J.A.; GROSSO, N.R.; NEPOTE, V. Chemical characterization and antioxidant properties of fractions separated from extract of peanut skin derived from different industrial processes. **Industrial Crops and Products**, v. 94, p. 964-971, 2016.

LIANG, L.; WU, X.; ZHAO, T.; ZHAO, J.; LI, F.; YE, Z.; YANG, L. *In vitro* bioaccessibility and antioxidant activity of anthocyanins from mulberry (*Morus atropurpurea* Roxb.) following simulated gastro-intestinal digestion. **Food Research International**, v. 46, p. 76-82, 2012.

LIMMONGKON, A.; NOPPRANG, P.; CHAIKEANDEE, P.; SOMBOON, T.; WONGSHAYA, P.; PILAISANGSUREE, V. LC/MS profiles and interrelationships between the anti-inflammatory activity, total phenolic content and antioxidant potential of Kalasin 2 cultivar peanut sprout crud extract. **Food Chemistry**, v. 239, p. 569-578, 2018.

LUCAS-GONZÁLEZ, R.; VIUDA-MARTOS, M.; PÉREZ-ALVARÉZ, J.A.; FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J. In vitro digestion models suitable for foods: Opportunities for new fields of application and challenges. **Food Research International**, v. 107, p. 423-436, 2018a.

LUCAS-GONZÁLEZ, R.; VIUDA-MARTOS, M.; PÉREZ-ALVARÉZ, J.A.; FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J. Changes in bioaccessibility, polyphenol profile and antioxidant potential of flours obtained from persimmon fruit (*Diospyros kaki*) co-products during *in vitro* gastrointestinal digestion. **Food Chemistry**, v. 256, p. 252-258, 2018b.

MA, Y.; KOSIŃSKA-CAGNAZZO, A.; KERR, W.L.; AMAROWICZ, R.; SWANSON, R.B.; PEGG, R.B. Separation and characterization of phenolic compounds from dry-blanching peanut skins by liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1356, p. 64-81, 2014.

MAGA, J.A.; LORENZ, K. Gas-liquid chromatography separation of the free phenolic acid fraction in various oilseed protein sources. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 25, p. 797-802, 1974.

MEO, S.D.; REED, T.T.; VENDITTI, P.; VICTOR, V.M. Role of ROS and RNS sources in physiological and pathological conditions. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016.

MINEKUS, M.; ALMINGER, M.; ALVITO, P.; BALLANCE, S.; BOHN, T.; BOURLIEU, C.; CARRIÈRE, F. et al. A standardised static in vitro digestion method suitable for food – an international consensus. **Food & Function**, v. 5, p. 1113-1124, 2014.

MIROŃCZUK-CHDAKOWSKA, I.; WITKOWSKA, A.M.; ZUJKO, M.E. Endogenous non-enzymatic antioxidants in the human body. **Advances in Medical Sciences**, v. 63, p. 68-78, 2018.

MURKOVIC, M. Phenolic compounds: occurrence, classes, and analyses. **Encyclopedia of Food and Health**, p. 346-351, 2016.

NISHI, S.K.; KENDALL, C.W.C.; BAZINET, R.P.; BASHYAM, B.; IRELAND, C.A.; AUGUSTIN, MEJIA, S.B.; SIEVENPIPER, J.L.; JENKINS, D.J.A. Nut consumption, serum fatty acid profile and estimated coronary heart disease risk in type 2 diabetes. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**, v. 24, p. 845-852, 2014.

NOGUEIRA, R.J.M.C.; TÁVORA, F.J.A.F.; ALBUQUERQUE, M.B.; NASCIMENTO, H.H.C.; DOS SANTOS, R.C. Ecofisiologia do amendoim (*Arachis hypogaea* L.). In: DOS SANTOS, R.C.; FREIRE, R.M.M.; DE LIMA, L.M., eds. **O agronegócio do amendoim no Brasil**. 2.ed. Brasília, DF: Embrapa, 2013. Cap.3, p. 71-113.

OLDONI, T.L.C.; MELO, P.S.; MASSARIOLI, A.P.; MORENO, I.A.M.; BEZERRA, R.M.N.; ROSALEN, P.L.; DA SILVA, G.V.J.; NASCIMENTO, A.M.; ALENCAR, S.M. Bioassay-guided isolation of proanthocyanidins with antioxidant activity from peanut (*Arachis hypogaea*) skin by combination of chromatography techniques. **Food Chemistry**, v. 192, p. 306-312, 2016.

OH, M.M.; CAREY, E.E.; RAJASHEKAR, C.B. Regulated water deficits improve phytochemical concentration in lettuce. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 135, p. 223-229, 2010.

PÉREZ-VICENTE, A.; GIL-IZQUIERDO, A.; GARCIA-VIGUERA, C. *In vitro* gastrointestinal digestion study of pomegranate juice phenolic compounds, anthocyanins, and vitamin C. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 2308-2312, 2002.

PIETTA, P-G. Flavonoids as antioxidants. **Journal of Natural Products**, v. 63, p. 1035-1042, 2000.

PINTO, J.; SPÍNOLA, V.; LLORENT-MARTÍNEZ, E.J.; CÓRDOVA, M.L.F.; MOLINA-GARCÍA, L.; CASTILHO, P.C. Polyphenolic profile and antioxidant activities of Madeiran elderberry (*Sambucus lanceolata*) as affected by simulated in vitro digestion. **Food Research International**, v. 100, p. 404-410, 2017.

PLUMB, G.W.; PACUAL-TERESA, S.; SANTOS-BUELGA, C.; CHEYNIER, V.; WILLIAMSON, G. Antioxidant properties of catechins and proanthocyanidins: Effect on polymerisation, galloylation and glycosylation. **Free Radical Research**, v. 29, p. 351-358, 2009.

PODO, N.S.; LÓPEZ-FROILÁN, R.; RAMIREZ-MORENO, E.; BERTRAND, L.; BARONI, M.V.; PÉREZ-RODRÍGUEZ, M.L.; WUNDERLIN, D.A. Matching in vitro bioaccessibility of polyphenols and antioxidant capacity of soluble coffee by boosted regression trees. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, p. 9572-9582, 2015.

POPOVIĆ, B.M.; ŠTAJNER, D.; ŽDERO-PAVLOVIĆ, R.; TUMBAS-ŠAPONJAC, V.; ČANADANOVIĆ-BRUNET, J.; ORLOVIĆ, S. Water stress induce changes in polyphenol profile and antioxidant capacity in poplar plants (*Populus* spp.). **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 105, p. 242-250, 2016.

QIU, J.; CHEN, L.; ZHU, Q.; WANG, D.; WANG, W.; SUN, X.; LIU, X.; DU, F. Screening natural antioxidants in peanut shell using DPPH-HPLC-DAD-TOF/MS methods. **Food Chemistry**, v. 135, p. 2366-2371, 2012.

RICE-EVANS, C.A.; MILLER, N.J.; PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radical Biology & Medicine**, v.20, p. 933-956, 1996.

RICE-EVANS, C.A.; MILLER, N.J.; PAGANGA, G. Antioxidant properties of phenolic compounds. **Trends in Plant Science**, v. 2, p. 152-159, 1997.

ROBARDS, K.; ANTOLOVICH, M. Analytical chemistry of fruit bioflavonoids: A Review. **Analyst**, v. 122, p. 11R-34R, 1997.

ROCCHETTI, G.; CHIODELLI, G.; GIUBERTI, G.; GHISONI, S.; BACCOLO, G.; BLASI, F.; MONTESANO, D.; TREVISAN, M.; LUCINI, L. UHPLC-ESI-QTOF-MS profile of polyphenols in Goji berries (*Lycium barbarum* L.) and its dynamics during in vitro gastrointestinal digestion and fermentation. **Journal of Functional Foods**, v. 40, p. 564-572, 2018.

RODRÍGUEZ-ROQUE, M.J.; ROJAS-GRAU, M.A.; ELEZ-MARTÍNEZ, P.; MARTÍN-BELLOSO, O. Soymilk phenolic compounds, isoavones and antioxidant activity as affected by in vitro gastrointestinal digestion. **Food Chemistry**, v. 135, p. 206-212, 2013.

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

SÁNCHEZ-RODRÍGUEZ, E.; MORENO, D.A.; FERRERES, F.; RUBIO-WILHELMI, M.M.; RUIZ, J.M. Differential responses of five cherry tomato varieties to water stress: Changes on phenolic metabolites and related enzymes. **Phytochemistry**, v. 72, p. 723-729, 2011.

SANCHO, R.A.S.; PAVAN,V.; PASTORE, G.M. Effect of *in vitro* digestion on bioactive compounds and antioxidant activity of common bean seed coats. **Food Research International**, v. 76, p. 74-78, 2015.

SARNOSKI, P.J.; JOHNSON, J.V.; REED, K.A.; TANKO, J.M.; O'KEEFE, S.F. Separation and characterization of proanthocyanidins in Virginia type peanut skins by LC-MSⁿ. **Food Chemistry**, v. 131, p. 927-939, 2012.

SEYOUM, A.; ASRES, K.; EL-FICK, F.K. Structure-radical scavenging activity relationships of flavonoids. **Phytochemistry**, v. 67, p. 2058-2070, 2006.

SHAHIDI, F.; AMBIGAIPALAN, P. Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: antioxidant activity and health effects – a review. **Journal of Functional Foods**, v. 18, p. 820-897, 2015.

SHAHIDI, F.; NACZK, M. Phenolics in Food and Nutraceuticals. CRC press, 2004.

SHAO, H-B.; CHU, L-Y.; JALEEL, C.A.; ZHAO, C-X. Water-deficit stress-induced anatomical changes in higher plants. **Comptes Rendus Biologies**, v. 331, p. 215-225, 2008.

SKIRYCZ, A.; INZÉ, D. More from less: plant growth under limited water. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 21, p. 197-203, 2010.

TALCOTT, S.T.; PASSERETTI, S.; DUNCAN, C.E.; GORBET, D.W. Polyphenolic content and sensory properties of normal and high oleic acid peanuts. **Food Chemistry**, v. 90, p. 379-388, 2005.

VARELA, M.C.; ARSLAN, I.; REGINATO, M.A.; CENZANO, A.M.; LUNA, M.V. Phenolic compounds as indicators of drought resistance in shrubs from Patagonian shrublands (Argentina). **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 104, p. 81-91, 2016.

WANG, T.; LI, Q.; BI, K. Bioactive flavonoids in medicinal plants: Structure, activity and biological fate. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 13, p. 12-23, 2018.

WILLIAMS, R.J.; SPENCER, J.P.E.; RICE-EVANS, C. Flavonoids: antioxidants or signalling molecules? **Free Radical Biology and Medicine**, v. 36, p. 838-849, 2004.

WIN, M.M.; ABDUL-HAMID, A.; BAHARIN, B.S.; ANWAR, F.; SABU, M.C.; PAK-DEK, M.S. Phenolic compounds and antioxidant activity of peanut's skin, hull, raw kernel and roasted kernel flour. **Pakistan Journal of Botany**, v. 43, p. 1635-1642, 2011.

ZHANG, Y.; WU, S.; QIN, Y.; LIU, J.; WANG, Q.; REN, F.; ZHANG, H. Interaction of phenolic acids and their derivatives with human serum albumin: Structure-affinity relationships and effects on antioxidant activity. **Food Chemistry**, v. 240, p. 1072-1080, 2018.

2 OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS DE AMENDOIM UTILIZANDO A METODOLOGIA DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA

Resumo

O amendoim é um alimento de alto valor proteico e energético e se destaca pelo conteúdo de compostos fenólicos com propriedades antioxidantes. O propósito deste capítulo foi estabelecer as melhores condições de extração de compostos fenólicos com atividade antioxidante, de cotilédones e películas de dois diferentes genótipos de amendoins. Foi utilizada a metodologia de superfície de resposta empregando o delineamento composto central rotacional com dois fatores e dois níveis. As variáveis independentes compreenderam a temperatura e o solvente de extração (grau de hidratação do etanol). O efeito da temperatura foi menor quando comparado ao efeito do solvente para a extração de compostos fenólicos com atividade antioxidante, medida pelo sequestro do radical ABTS e o método ORAC. As condições que maximizaram a extração de compostos fenólicos e atividade antioxidante dos cotilédones e películas compreenderam intervalos de temperatura e solvente, sendo que para os cotilédones as condições de temperatura e grau de hidratação do etanol para a extração foram de 60°C e 35%, e para as películas, 40°C e 60%, respectivamente. Esses parâmetros foram utilizados para a produção de extratos para a identificação dos compostos fenólicos pela técnica LC-ESI-QTOF-MS. Nos extratos dos cotilédones dos amendoins prevaleceram os derivados do *p*-cumaroil, enquanto que nas películas, os oligômeros das procianidinas do tipo A foram os compostos majoritários.

Palavras-chave: *Arachis hypogaea* L.; Análise multivariada; Polifenóis; Atividade antioxidante.

Abstract

Peanut is a food with high protein and energy content that is known to have phenolic compounds with antioxidant properties. The purpose of this chapter was to establish the optimal conditions for extraction of phenolic compounds with antioxidant activity from cotyledons and skins of two different peanut genotypes. The response surface method was utilized, with central rotational composite design with two factors and two levels. The independent variables consisted of temperature and extraction solvent (ethanol hydration). The effect of temperature was lower than that of the solvent for the extraction of phenolic compounds with antioxidant activity, which was determined by the ABTS radical scavenging and ORAC methods. The optimal conditions for extraction of phenolic compounds with antioxidant activity comprised different temperature and solvent hydration ranges. For the cotyledon and skin extracts, the optimal temperature and ethanol hydration for extraction were 60°C and 35% and 40°C and 60%, respectively. These parameters were used to obtain extracts which were subjected to the analysis of phenolic compounds by the LC-ESI-QTOF-MS technique. *p*-cumaroil derivatives were the major compounds found in cotyledon extracts, as compared to type A procyanidin oligomers in skin extracts.

Key-words: *Arachis hypogaea* L.; Multivariate analysis; Polyphenols; Antioxidant activity.

2.1 Introdução

O amendoim (*Arachis hypogaea* L.) é um alimento que possui um alto valor energético e nutritivo, advindo do conteúdo em lipídeos (48-50%), proteínas (25-28%) e carboidratos (20-26%), além de vitaminas e minerais. Também é considerado como fonte de compostos que apresentam propriedades bioativas, principalmente os compostos fenólicos, os quais estão presentes tanto nos cotilédones quanto na película (Francisco & Resurreccion, 2008; Bishi et al., 2015). Dentre os compostos fenólicos presentes nos cotilédones do amendoim estão ácidos fenólicos, flavonoides e estilbenos (*Trans*-resveratrol), sendo que o ácido *p*-cumárico é o composto fenólico antioxidante predominante (Talcott et al., 2005), enquanto que na película predominam os taninos condensados, mais especificamente as procianidinas, em sua maioria do tipo A, em vários graus de polimerização (Francisco & Resurreccion, 2008; Sarnoski, et al., 2012).

A extração é a etapa fundamental para o processo de identificação e quantificação de compostos de interesse de uma matriz, bem como para se mensurar suas propriedades biológicas, como a antioxidante, por exemplo. A extração por solvente é utilizada com mais frequência para obtenção de antioxidantes naturais cujo rendimento, assim como a atividade antioxidante, dependem diretamente da polaridade do solvente utilizado (Moure et al., 2001). Em geral, os solventes mais empregados para extração de compostos fenólicos compreendem soluções ácida de metanol/água (50:50, v/v; pH 2,0), seguido de acetona/água (70:30, v/v) e etanol em diferentes graus de hidratação (Domínguez-Rodríguez et al., 2017), o que não é exceção para os compostos fenólicos obtidos a partir do cotilédone e da película do amendoim (Nepote et al., 2005; Talcott et al., 2005; Chukwumah et al., 2007; Ma et al., 2014; Tsujita et al., 2014; Larrauri et al., 2016; Oldoni et al., 2016; de Camargo et al., 2017; Calomeni et al., 2017; Adhikari et al., 2018). Outros fatores, além do tipo e composição do solvente, também afetam o rendimento e a qualidade da extração de compostos fenólicos, como temperatura, pH, relação sólido/solvente e número de extrações (Bey et al., 2013).

Uma vez que a atividade antioxidante está relacionada com o teor de compostos fenólicos, estudos comparativos para a seleção do melhor solvente combinado a outros fatores de variação são necessários para cada matriz estudada. A metodologia utilizando superfície de resposta consiste numa técnica estatística multivariada utilizada para modelagem e análise de problemas, nos quais a variável

resposta é influenciada por vários fatores (Bezerra et al., 2008), sendo utilizada para otimização da extração de compostos fenólicos a partir de várias fontes (Sales & Resurreccion, 2010; Bey et al. 2013; Melo et al., 2015; de Torres et al., 2018).

Sobre a otimização da extração de compostos fenólicos com atividade antioxidante em amendoim, alguns estudos já foram realizados utilizando a película (Nepote et al., 2005; Ballard et al., 2010; Zhang et al., 2013a; Zhang et al., 2013b; Bodoira et al., 2017; Franco et al., 2018), porém não há estudos sobre a otimização da extração dos compostos fenólicos dos cotilédones. Assim, o objetivo deste trabalho foi otimizar a extração de compostos fenólicos com atividade antioxidante, provenientes dos cotilédones e películas de dois genótipos de amendoim (tolerante e susceptível ao estresse hídrico), utilizando a metodologia de superfície de resposta.

2.2 Material e Métodos

2.2.1 Obtenção das amostras

Dois genótipos de amendoim pertencentes à coleção de germoplasma da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa-Algodão) foram utilizados para o estudo de extração de compostos fenólicos e determinação da atividade antioxidante: BR1, do tipo botânico Valência, película vermelha, tolerante à seca e LViPE-06, do tipo botânico Virgínia, película bege, sensível à seca.

2.2.2 Preparo das amostras

Após as amostras serem recebidas no Laboratório de Bioquímica e Análise Instrumental do Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição da ESALQ, as películas foram separadas manualmente dos cotilédones, os quais foram mantidos na temperatura de -20°C até o momento das extrações. Os cotilédones foram triturados em moinho (IKA A11 basic) e desengordurados utilizando hexano, na proporção de uma parte de amostra para dez partes do solvente. Após agitação, as amostras foram centrifugadas (Eppendorf 5810R, Eppendorf AG, Hamburg, Germany) a 8000xg, durante 10 minutos a 25°C. O sobrenadante foi removido e o procedimento de desengorduramento repetido por mais duas vezes. As amostras foram então utilizadas para obtenção dos extratos, de acordo com o delineamento

experimental. As películas foram também moídas e utilizadas para obtenção dos extratos.

2.2.3 Delineamento experimental

Com a finalidade de maximizar o conteúdo de compostos fenólicos com atividade antioxidante após o processo de extração, foi utilizado o planejamento experimental multivariado empregando o Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR), contendo dois fatores e dois níveis (2^2).

As variáveis independentes do delineamento experimental compreenderam: os diferentes graus de hidratação do etanol (solvente extrator) e temperatura de extração. Os materiais analisados foram os cotilédones e películas de dois genótipos de amendoim (BR1 e LViPE-06). Assim, o delineamento consistiu de treze ensaios com cinco repetições do ponto central. As variáveis independentes foram codificadas aos níveis de -1,41; -1; 0; 1 e 1,41. As variáveis dependentes foram: teor total de compostos fenólicos e atividade antioxidante medida por meio dos métodos do sequestro do radical livre ABTS e ORAC. A Tabela 4 apresenta o planejamento experimental com valores codificados e reais das variáveis independentes.

Os efeitos das variáveis independentes foram analisados e os modelos matemáticos de regressão para cada resposta das variáveis dependentes (Y) foram ajustados de acordo com a Equação 1:

$$Y = b_0 + b_1X + b_2Z + b_{11}X^2 + b_{22}Z^2 + b_{12}XZ \quad (1)$$

Em que Y é a resposta das variáveis dependentes, $b_0; b_i; b_{ii}; b_{ij};$ são coeficientes de regressão, X e Z são valores decodificados das variáveis independentes que afetam a resposta.

O ajuste polinomial dos modelos gerados foi avaliado por meio do coeficiente de determinação (R^2) e pelo teste F. O valor F ($p < 0,05$) para a falta de ajuste foi obtido pela Análise de Variância (ANOVA) e utilizado para verificar a significância e, a validação do modelo foi determinada comparando-se os valores experimentais e os valores preditos. Todas as análises estatísticas do delineamento experimental foram realizadas utilizando o software Statistica versão 13.0 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA).

Tabela 4 - Planejamento experimental (Delineamento Composto Central Rotacional) para cada genótipo de amendoim (BR1 e LViPE-06).

Ensaio	Valores codificados		Cotilédone (valores reais)		Película (valores reais)	
	Temp.	EtOH/H ₂ O	Temp. (°C)	EtOH/H ₂ O (%)	Temp. (°C)	EtOH/H ₂ O (%)
1	-1	+1	46	78	46	85,5
2	+1	+1	74	78	74	85,5
3	-1	-1	46	42	46	14,5
4	+1	-1	74	42	74	14,5
5	0	0	60	60	60	50
6	0	0	60	60	60	50
7	0	0	60	60	60	50
8	0	0	60	60	60	50
9	0	0	60	60	60	50
10	-1,41	0	40	60	40	50
11	0	-1,41	60	35	60	0
12	+1,41	0	80	60	80	50
13	0	+1,41	60	85	60	100

2.2.4 Preparo dos extratos

Os extratos contendo os compostos fenólicos foram preparados a partir das películas e das amostras desengorduradas dos cotilédones dos amendoins. Foi utilizada a proporção de 1:20 (amostra:solvente extrator, m/v), com a composição do solvente extrator (etanol:água) de acordo com o delineamento estatístico (Tabela 4). O tempo da extração foi de 30 minutos em banho termostatizado em diferentes temperaturas, também de acordo com o delineamento estatístico. Na sequência as amostras contendo os solventes permaneceram 15 minutos sob sonicação (UltraCleaner 1400A, Unique, Indaiatuba, SP, Brasil). Após esse procedimento, os extratos foram centrifugados a 7000xg, por 10 minutos a 21°C, e os sobrenadantes recolhidos para as análises do teor de compostos fenólicos e atividade antioxidante.

2.2.5. Compostos fenólicos totais

O teor de compostos fenólicos totais das amostras de amendoim foi determinado conforme descrito por Melo et al. (2015), com base nos conceitos de

Singleton et al. (1999). Uma alíquota de 20µL de extrato, devidamente diluído ou padrão, juntamente com 100 µL da solução de Folin-Ciocalteu 10%, foram adicionados em poços de microplacas de 96 poços. Decorridos 5 minutos foram acrescentados 75 µL de solução de Na₂CO₃ 7,5% em água. Após agitação e decorrido o tempo de 40 minutos, as leituras das absorbâncias foram realizadas em leitor de microplacas (SpectraMax M3, Molecular Devices, LLC, Sunnyvale, CA, USA) à 740nm. A curva de calibração foi construída utilizando como padrão o ácido gálico e os resultados foram expressos em equivalentes ao ácido gálico (µg AG/mg amostra).

2.2.6 Atividade antioxidante pelo sequestro do radical livre ABTS (ABTS^{•+})

A determinação da atividade antioxidante dos extratos, pelo método do sequestro do radical livre ABTS, foi realizado de acordo com Melo et al. (2015), com base nos conceitos de Re et al. (1999). Primeiramente o radical ABTS foi formado após 16 horas, ao abrigo da luz, pela mistura de 5mL da solução de ABTS (7mM) e 88µL da solução de K₂S₂O₈ (140mM), ambas as soluções preparadas em água destilada. A solução de trabalho do radical ABTS foi ajustada até a absorbância de $0,70 \pm 0,01$ com tampão fosfato de potássio 75mM e pH 7,4. O total de 20µL do extrato diluído ou padrão foram adicionados aos poços da microplaca de 96 poços juntamente com 220µL da solução de trabalho do radical ABTS. Após agitação e incubação por 6 minutos, as leituras das absorbâncias foram realizadas em leitor de microplacas à 730nm. A curva de calibração foi construída utilizando como padrão o Trolox e os resultados foram expressos em equivalentes ao Trolox (µmol Trolox/g amostra).

2.2.7 Sequestro do radical peroxila (ORAC)

Denominado como “Oxygen peroxila Radical Absorbance Capacity” (ORAC), o sequestro do radical peroxila (ROO[•]) se baseia no decaimento da fluorescência da fluoresceína, durante um determinado tempo, oxidada pelo ROO[•] (Ou et al., 2001). A análise do sequestro do radical peroxila foi realizada de acordo com o método descrito por Melo et al. (2015). Uma alíquota de 30 µL de extrato, padrão ou controle (tampão fosfato 75mM, pH 7,4) foram adicionados nos poços da microplaca opaca e preta, de 96 poços. Na sequência, foi adicionada uma alíquota de 60 µL da solução de fluoresceína 508 nM, preparada em tampão fosfato de potássio 75mM, pH 7,4) e,

por último, foi adicionado o volume de 110 µL da solução de AAPH 76mM, preparada no mesmo tampão. A reação ocorreu a 37°C e as leituras da fluorescência foram realizadas, a cada minuto durante 120 minutos, em leitor de microplacas com Ex./Em. de 485nm/528nm. A curva de calibração foi construída utilizando como padrão o Trolox e os resultados foram expressos em equivalentes ao Trolox (µmol Trolox/g amostra). A proteção dos extratos e do Trolox sobre a fluoresceína, retardando o decaimento da fluorescência, foi calculada como a área líquida sob a curva (AUC_{net}) de acordo com as equações 2 e 3:

$$AUC = 1 + \left(\frac{f_1 + f_2 + f_3 + \dots + f_i}{f_0} \right) \quad (2)$$

$$AUC_{net} = AUC_{extrato} \text{ ou } AUC_{padrão} - AUC_{controle} \quad (3)$$

Em que f_1 , f_2 , f_3 , f_i são valores da fluorescência no tempo i ; f_0 é o valor da fluorescência no tempo 0. $AUC_{extrato}$, $AUC_{padrão}$ e $AUC_{controle}$ são os valores das áreas sob a curva do extrato, padrão e controle, respectivamente.

2.2.8 Caracterização fenólica dos extratos por espectrometria de massas de alta resolução (LC-ESI-QTOF-MS)

Os extratos dos cotilédones e películas produzidos com a combinação das melhores condições de temperatura e grau de hidratação do etanol, com os maiores teores de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante, foram submetidos à análise detalhada do perfil fenólico utilizando a técnica de espectrometria de massas de alta resolução (LC-ESI-QTOF-MS).

As análises foram conduzidas em sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, Shimadzu) equipado com bombas LC-30AD, autoinjeter SIL-30AC, forno CTO-20A e controlador CBM-20A. A separação cromatográfica ocorreu em coluna Phenomenex Luna C18 (4,6 x 250 mm x 5 µm). A fase móvel consistiu em Fase A (Água:Ácido Fórmico 99,75:0,25 v/v) e Fase B (Acetonitrila:Água:Ácido Fórmico 80:19,75:0,25 v/v/v) cujo gradiente de separação iniciou com 10% da fase B aumentando para 20% em 10 minutos; 30% em 20 minutos; 50% em 30 minutos e diminuindo para 10% em 38 minutos. O fluxo foi de 1 mL/min e a coluna foi mantida a 30°C durante toda a corrida.

A análise de alta resolução ocorreu em espectrômetro de massas q-TOF MAXIS 3G – Bruker Daltonics (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) equipado com uma fonte de ionização por eletronebulização, em modo negativo (ESI-), nas seguintes condições: intervalo de m/z 100-2000; resolução 30.000; voltagem da fonte de 4,5 KV, respectivamente; gás secante a 8L/min e o gás nebulização na pressão de 29 psi e temperatura do capilar em 200°C. A identificação dos compostos fenólicos foi realizada no software Bruker Compass DataAnalysis 4.3 por comparação das massas exatas e dos espectros de massas MS/MS disponíveis na literatura.

2.3 Resultados e Discussão

A partir do delineamento experimental, os resultados do teor total de compostos fenólicos e atividade antioxidante para os extratos dos genótipos BR1 e LViPE-06 estão apresentados nas Tabelas 5 e 6, respectivamente.

Tabela 5 - Teor total de compostos fenólicos (CF) e atividade antioxidante dos extratos de cotilédone e película do genótipo BR1.

	Cotilédone			Película		
	CF ($\mu\text{gAG/mg}$)	ABTS (μmol Trolox/g)	ORAC (μmol Trolox/g)	CF ($\mu\text{gAG/mg}$)	ABTS (μmol Trolox/g)	ORAC (μmol Trolox/g)
1	1,49	38,09	126,52	45,39	748,34	620,38
2	1,66	42,22	164,33	49,87	680,63	806,00
3	3,77	57,47	223,23	40,65	591,97	624,35
4	4,16	63,03	193,48	37,29	545,98	550,06
5	1,91	53,53	186,50	62,50	850,45	803,08
6	1,82	49,86	171,55	67,79	934,36	887,56
7	1,88	52,14	183,46	68,93	1000,95	857,41
8	1,88	53,74	178,25	68,62	969,58	753,46
9	1,87	53,35	180,78	74,93	973,40	816,95
10	1,76	50,12	177,82	70,55	949,81	900,08
11	4,27	64,81	211,23	32,02	403,88	406,80
12	3,75	58,50	217,32	72,36	987,40	897,67
13	1,25	26,77	76,95	8,33	160,06	137,54

Tabela 6 - Teor total de compostos fenólicos (CF) e atividade antioxidante dos extratos de cotilédone e película do genótipo LViPE-06.

	Cotilédone			Película		
	CF ($\mu\text{gAG/mg}$)	ABTS (μmol Trolox/g)	ORAC (μmol Trolox/g)	CF ($\mu\text{gAG/mg}$)	ABTS (μmol Trolox/g)	ORAC (μmol Trolox/g)
1	1,23	39,05	78,97	92,42	1150,13	650,53
2	1,45	43,65	110,89	91,47	1039,99	721,71
3	2,84	59,18	121,26	84,19	953,72	563,30
4	3,51	64,81	111,72	68,28	742,09	554,97
5	1,67	55,43	100,23	93,12	1070,93	771,90
6	1,56	50,59	83,86	107,33	1104,29	771,36
7	1,49	53,03	83,39	101,20	1049,62	741,30
8	1,56	55,32	91,19	108,24	1148,04	698,17
9	1,60	54,91	94,86	95,92	1168,62	731,29
10	1,46	51,67	90,08	101,61	1225,25	758,66
11	3,63	66,64	106,20	61,00	610,79	406,87
12	3,54	59,89	131,37	96,44	1043,23	776,58
13	1,10	27,50	42,26	85,63	977,99	740,53

A análise estatística das variáveis dependentes indicou o ajuste quadrático como melhor opção, cujos coeficientes de determinação (R^2) foram maiores comparados aos ajustes dos efeitos lineares. Os coeficientes de determinação do ajuste linear para os extratos dos cotilédones de ambos os genótipos foram maiores que 0,60, atingindo valores de 0,90 para as respostas provenientes da análise da atividade antioxidante pelo método do sequestro do radical ABTS, porém, todos os efeitos quadráticos apresentaram valores acima de 0,85. Em relação às respostas das variáveis dependentes dos extratos das películas, os ajustes lineares tiveram os valores dos coeficientes de determinação abaixo de 0,45, enquanto que o ajuste que produziu efeitos quadráticos apresentou valores do R^2 acima de 0,88 (Tabelas 7 a 9).

Os efeitos das variáveis independentes foram em sua maioria considerados altamente significativos ($p < 0,01$) (Tabelas 7 a 9), porém, os efeitos da temperatura e da interação temperatura x grau de hidratação do etanol não foram significativos ($p > 0,05$) para as respostas das variáveis dependentes das películas do amendoim.

Tabela 7 - Análise dos efeitos significativos para a resposta do teor de fenólicos totais.

	Efeito	Erro Puro	<i>p</i> -valor	R ²
Cotilédone BR1				
Média	1,88	0,006	<0,01	0,94
Temperatura (L)	0,81	0,011	<0,01	
Temperatura (Q)	0,91	0,011	<0,01	
EtOH/H ₂ O (L)	-2,40	0,011	<0,01	
EtOH/H ₂ O (Q)	0,96	0,012	<0,01	
Temp. x EtOH/H ₂ O	-0,04	0,015	0,04	
Cotilédone LViPE-06				
Média	1,56	0,01	<0,01	0,95
Temperatura (L)	0,95	0,02	<0,01	
Temperatura (Q)	0,88	0,02	<0,01	
EtOH/H ₂ O (L)	-1,95	0,02	<0,01	
EtOH/H ₂ O (Q)	0,78	0,02	<0,01	
Temp. x EtOH/H ₂ O	-0,23	0,03	<0,01	
Película BR1				
Média	68,54	1,97	<0,01	0,91
EtOH/H ₂ O (Q)	-49,93	3,37	<0,01	
Película LViPE-06				
Média	101,15	3,00	<0,01	0,91
EtOH/H ₂ O (L)	16,59	4,75	0,02	
EtOH/H ₂ O (Q)	-29,08	5,12	<0,01	

Tabela 8 - Análise dos efeitos significativos para as respostas da atividade antioxidante medida pelo método do sequestro do radical ABTS.

	Efeito	Erro Puro	<i>p-valor</i>	R ²
Cotilédone BR1				
Média	52,52	0,72	<0,01	0,97
Temperatura (L)	5,36	1,13	<0,01	
EtOH/H ₂ O (L)	-23,67	1,15	<0,01	
EtOH/H ₂ O (Q)	-6,82	1,25	<0,01	
Cotilédone LViPE-06				
Média	53,85	0,92	<0,01	0,96
Temperatura (L)	5,44	1,45	0,02	
EtOH/H ₂ O (L)	-24,34	1,47	<0,01	
EtOH/H ₂ O (Q)	-6,82	1,61	0,013	
Película BR1				
Média	945,79	26,06	<0,01	0,91
EtOH/H ₂ O (Q)	-659,35	44,50	<0,01	
Película LViPE-06				
Média	1108,32	22,44	<0,01	0,96
Temperatura (L)	-143,98	35,30	0,015	
EtOH/H ₂ O (L)	253,90	35,55	<0,01	
EtOH/H ₂ O (Q)	-312,049	38,31	<0,01	

Tabela 9 - Análise dos efeitos significativos para as respostas da atividade antioxidante medida pelo método ORAC.

	Efeito	Erro Puro	<i>p-valor</i>	R ²
Cotilédone BR1				
Média	180,08	2,54	<0,01	0,93
Temperatura (L)	15,95	4,00	0,017	
Temperatura (Q)	20,41	4,24	<0,01	
EtOH/H ₂ O (L)	-79,49	4,05	<0,01	
EtOH/H ₂ O (Q)	-33,64	4,43	<0,01	
Temp. x EtOH/H ₂ O	33,77	5,68	<0,01	
Cotilédone LViPE-06				
Média	90,66	3,22	<0,01	0,85
Temperatura (L)	20,13	5,08	0,016	
Temperatura (Q)	26,199	5,38	<0,01	
EtOH/H ₂ O (L)	-33,57	5,15	<0,01	
Temp. x EtOH/H ₂ O	20,72	7,22	0,04	
Película BR1				
Média	823,85	23,04	<0,01	0,88
EtOH/H ₂ O (Q)	-521,60	39,33	<0,01	
Película LViPE-06				
Média	743,69	13,76	<0,01	0,90
EtOH/H ₂ O (L)	181,71	21,80	<0,01	
EtOH/H ₂ O (Q)	-194,44	23,49	<0,01	

As superfícies de respostas apresentadas tridimensionalmente nas Figuras 9 e 10 indicam as regiões onde foram obtidas as diferentes respostas das variáveis dependentes em função das variáveis independentes. No presente estudo, o interesse do uso de tal ferramenta estatística, foi obter uma combinação de temperatura e grau de hidratação do etanol que resultasse em maiores valores da concentração de fenólicos totais e atividade antioxidante dos extratos.

Na Figura 9, observa-se que a região do gráfico que mostra os maiores valores do teor de fenólicos totais dos extratos dos cotilédones foi aquela onde houve o uso da combinação de maiores temperaturas (60 a 80°C), com porcentagem de etanol/água (v/v) de 35 a 50%. Para as respostas da atividade antioxidante, também foi observado maiores valores nas regiões que combinaram maiores temperaturas e menores porcentagens de etanol/água, porém, numa maior amplitude comparada à região de maiores concentrações de fenólicos totais. Para a resposta da atividade antioxidante medida pelo método do sequestro do radical ABTS, a região onde foram observados os maiores valores foi aquela de intervalo de temperatura de 40 a 80°C e grau de hidratação do etanol de 35 a 60%. Em relação às respostas da atividade antioxidante medida pelo sequestro do radical peroxila, o

intervalo de temperatura e a porcentagem de hidratação do etanol foi semelhante à do método anterior para o extrato obtido do cotilédone da amostra BR1. Para o extrato do cotilédone obtido da amostra LViPE-06, houve duas regiões em que foram obtidos os maiores valores da atividade antioxidante: a primeira região caracterizou-se pela combinação do intervalo de temperatura de 40 a 55°C, com o grau de hidratação do etanol de 35 a 50%, e a segunda região foi delimitada pelo intervalo de temperatura de 70 a 80°C e mesmo intervalo de porcentagem de hidratação de etanol da primeira região.

Figura 9 - Superfícies de resposta dos modelos matemáticos para as respostas das variáveis dependentes dos cotilédones, genótipos BR1 e LViPE-06.

Na Figura 10, onde estão apresentadas as superfícies de resposta dos extratos das películas, é possível observar que a variável temperatura não influenciou ou teve pouca influência nos resultados das variáveis dependentes sendo que, as regiões onde estão os maiores teores de fenólicos totais e atividade antioxidante foram delimitadas principalmente pelo intervalo da porcentagem de hidratação do etanol. Os maiores valores do teor de fenólicos totais foram obtidos no intervalo de 35 a 60% de etanol/água para o genótipo BR1 e de 40 a 60% para a amostra LViPE-06. Para a resposta da atividade antioxidante medida pelo sequestro do radical ABTS, o intervalo que delimitou a região com maior atividade foi de 40 a 60% de etanol/água para o genótipo BR1 e de 40 a 78% para o genótipo LViPE-06. Por fim, para as respostas da atividade antioxidante medida pelo sequestro do radical peroxila, a região com maior atividade foi delimitada pelo intervalo de 30 a 60% de etanol/água para o genótipo BR1 e de 60 a 75% para o genótipo LViPE-06.

(continua)

(conclusão)

Figura 10 - Superfícies de resposta dos modelos matemáticos para as respostas das variáveis dependentes das películas, genótipos BR1 e LViPE-06.

Com base nas observações anteriores, foram estabelecidas as melhores condições de extração para obtenção dos extratos dos cotilédones e películas de maneira que, a combinação de valores de temperatura e solvente pertencesse ao intervalo onde foram encontrados os maiores resultados das variáveis dependentes. Para a obtenção dos extratos dos cotilédones estabeleceu-se a temperatura de 60°C e porcentagem de hidratação do etanol de 35%. Para a obtenção dos extratos das películas, as mesmas variáveis foram de 40°C e 60%, respectivamente.

Os modelos matemáticos gerados para cada uma das respostas estão apresentados na Tabela 10. A letra “z” representa o valor das variáveis dependentes: Fenólicos Totais (FT) e a atividade antioxidante medida pelos métodos do sequestro do radical ABTS e ORAC. As letras “x” e “y” representam os valores de temperatura (°C) e grau de hidratação do etanol (%), respectivamente.

Tabela 10 - Modelos matemáticos que descrevem a superfície de resposta dos extratos dos cotilédones e películas do amendoim dos genótipos BR1 e LViPE-06.

Amostras/Variáveis dependentes	Modelo Matemático
<i>Cotilédone BR1</i>	
FT	$z=16,168330852532-0,22282799982998*x+0,0022211516201093*x^2-0,22043813279071*y+0,0014211373356292*y^2-0,0002254964858266*x*y+0$
ABTS	$z=41,857232443703+0,19153076775489*x+0,65236644859713*y-0,010917572177819*y^2+0$
ORAC	$z=520,2506063508-9,7020992966593*x+0,052091112941989*x^2+0,0016583671548207*y-0,051924587849016*y^2+0,067016876624298*x*y+0$
<i>Cotilédone ViPE-06</i>	
FT	$z=12,505890109537-0,19018621074645*x+0,0020920727810134*x^2-0,15748874293483*y+0,0011115369148508*y^2-0,00044463329467646*x*y+0$
ABTS	$z=44,066844335929+0,19430398201093*x+0,6381744901323*y-0,01095357994041*y^2+0$
ORAC	$z=499,65914438741-10,129351770226*x+0,069840400143878*x^2-3,4004323090731*y+0,041128158362325*x*y+0$
<i>Película BR1</i>	
FT	$z=47,710222750728-0,69769105842182*x+0,0044452634903467*x^2+1,6881334293823*y-0,01981337497039*y^2+0,0039413324174702*x*y+0$
ABTS	$z=591,44586499073-9,6955273561062*x+0,080929560275339*x^2+26,630110347506*y-0,26159690657948*y^2-0,010927042731891*x*y+0$
ORAC	$z=1639,4382363866-38,098149238025*x+0,27095519450946*x^2+12,400128094119*y-0,20694509778046*y^2+0,13073995785466*x*y+0$
<i>Película LViPE-06</i>	
FT	$z=68,025923235496+0,3438318876857*x-0,0077881686295513*x^2+0,93625481898839*y-0,011540961021436*y^2+0,0075268079733311*x*y+0$
ABTS	$z=934,97319393144-5,1422216892858*x+16,116772995127*y-0,12540677162242*y^2+0$
ORAC	$z=422,22254313188+10,283094372293*y-0,077236758672946*y^2+0$

Variáveis dependentes “z” (Fenólicos Totais (FT); ABTS ou ORAC)

Variáveis independentes “x” e “y” indicam temperatura (°C) e grau de hidratação do etanol (%), respectivamente.

Com a finalidade da verificação da validade dos modelos experimentais, ou seja, o quanto os modelos matemáticos gerados representam os dados dos experimentos nos intervalos estudados, foi realizada a análise de variância (ANOVA) da regressão a 95% de confiança. Também, foi verificada a significância da falta de ajuste, que compõe o resíduo junto com o erro puro (Tabelas 11 e 12).

Todas as regressões foram significativas a 95% de confiança ($p < 0,05$), indicando que os modelos matemáticos gerados podem ser utilizados para fins preditivos (Tabelas 11 e 12).

De acordo com Teófilo e Ferreira (2006), um bom modelo necessita ter uma regressão significativa e uma falta de ajuste não significativa. A variação, pertencente aos resíduos, é destinada ao erro puro e não à falta de ajuste, que está relacionada com o modelo. Porém, uma regressão significativa, assegurada pelo teste F, nem sempre pode ser preditiva. De acordo com Barros Neto et al. (2010), uma regra útil e prática para fins preditivos é que o valor do $F_{\text{calculado}}$ seja aproximadamente dez vezes o valor do F_{tabelado} . Nesse contexto, as regressões dos modelos da atividade antioxidante (ORAC) para os cotilédones e películas de ambos os genótipos; fenólicos totais para os cotilédones BR1 e LVipe-06, apesar de significativas, o $F_{\text{calculado}}$ foi menor que dez vezes o F_{tabelado} (Tabelas 11 e 12).

A falta de ajuste para a maioria dos modelos não foi significativa, porém, para três modelos matemáticos (fenólicos totais dos cotilédones dos genótipos BR1 e LVipe-06; atividade antioxidante medida pelo ORAC para o extrato de cotilédone do genótipo BR1) a falta de ajuste foi significativa ao nível de 95% de confiança. Tal resultado pode ser explicado pela baixa variação do erro puro, o que elevou o valor da razão da média quadrática da falta de ajuste sobre a média quadrática do erro puro ($F_{\text{calculado}}$) (Tabela 11).

Tabela 11 - Análise de variância para teor de fenólicos totais e atividade antioxidante, genótipo BR1.

Cotilédone BR1					
	Soma dos quadrados	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F calculado	F tabelado (95%)
Fenólicos totais					
Regressão	14,148	5	2,829668	30,59479	3,97
Resíduo	0,647	7	0,092489		
Falta de Ajuste	0,643	3	0,214217	179,6366	6,59
Erro Puro	0,005	4	0,001193		
Total	14,796	12			
ABTS					
Regressão	1243,308	3	414,436	84,38169	3,86
Resíduo	44,203	9	4,911444		
Falta de Ajuste	33,794	5	6,7588	2,597291	6,26
Erro Puro	10,409	4	2,60225		
Total	1287,511	12			
ORAC					
Regressão	17030,520	5	3406,104	22,39048	3,97
Resíduo	1064,860	7	152,1229		
Falta de Ajuste	935,510	3	311,8367	9,64319	6,59
Erro Puro	129,350	4	32,3375		
Total	18095,380	12			
Película BR1					
	Soma dos quadrados	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F calculado	F tabelado (95%)
Fenólicos totais					
Regressão	4452,884	1	4452,884	118,7842	4,84
Resíduo	412,359	11	37,48718		
Falta de Ajuste	334,231	7	47,74729	2,444567	6,09
Erro Puro	78,128	4	19,532		
Total	4865,243	12			
ABTS					
Regressão	772143,200	1	772143,2	124,1863	4,84
Resíduo	68393,800	11	6217,618		
Falta de Ajuste	54803,800	7	7829,114	2,304375	6,09
Erro Puro	13590,000	4	3397,5		
Total	840537,000	12			
ORAC					
Regressão	541889,800	2	270944,9	37,91412	4,1
Resíduo	71462,800	10	7146,28		
Falta de Ajuste	61004,700	6	10167,45	3,888833	6,16
Erro Puro	10458,100	4	2614,525		
Total	613352,600	12			

Tabela 12 - Análise de variância para teor de fenólicos totais e atividade antioxidante, genótipo LViPE-06.

Cotilédone LViPE-06					
	Soma dos quadrados	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F calculado	F tabelado (95%)
Fenólicos totais					
Regressão	10,30196	5	2,060392	24,28889	3,97
Resíduo	0,59380	7	0,084829		
Falta de Ajuste	0,57788	3	0,192627	48,39866	6,59
Erro Puro	0,01592	4	0,00398		
Total	10,89576	12			
ABTS					
Regressão	1316,406	3	438,802	86,88384	3,86
Resíduo	45,454	9	5,050444		
Falta de Ajuste	28,383	5	5,6766	1,330115	6,26
Erro Puro	17,071	4	4,26775		
Total	1361,860	12			
ORAC					
Regressão	4832,976	3	1610,992	12,17188	3,86
Resíduo	1191,182	9	132,3536		
Falta de Ajuste	982,572	5	196,5144	3,768072	6,26
Erro Puro	208,610	4	52,1525		
Total	6024,158	12			
Película LViPE-06					
	Soma dos quadrados	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F calculado	F tabelado (95%)
Fenólicos totais					
Regressão	2130,312	2	1065,156	52,86737	4,1
Resíduo	201,477	10	20,1477		
Falta de Ajuste	21,200	6	3,533333	0,078398	6,16
Erro Puro	180,277	4	45,06925		
Total	2331,789	12			
ABTS					
Regressão	344821,100	3	114940,4	68,81924	3,86
Resíduo	15031,600	9	1670,178		
Falta de Ajuste	4958,300	5	991,66	0,393778	6,26
Erro Puro	10073,300	4	2518,325		
Total	359852,700	12			
ORAC					
Regressão	131976,600	2	65988,3	38,81779	4,1
Resíduo	16999,500	10	1699,95		
Falta de Ajuste	13210,000	6	2201,667	2,323965	6,16
Erro Puro	3789,500	4	947,375		
Total	148976,100	12			

Novo ensaio da extração foi realizado para a verificação dos modelos na prática. Os valores obtidos no novo ensaio foram comparados com os previstos pelos modelos matemáticos (Tabela 13). Para a obtenção dos extratos dos cotilédones, os valores de temperatura e grau de hidratação do etanol foram de 50°C e 45%, já para as películas foram de 70°C e 30%, respectivamente.

Tabela 13 - Valores observados e previstos, das variáveis dependentes.

Cotilédone				
	Previstos		Observados	
	BR1	LViPE-06	BR1	LViPE-06
Fenólicos Totais	4,65	2,57	3,93±0,22 (15,5%)	2,85±0,05 (10,9%)
ABTS	58,67	31,61	56,30±2,78 (4%)	43,53±1,83 (19,3%)
ORAC	209,80	105,40	180,15±12,63 (14,1%)	96,13±3,54 (8,8%)
Película				
	Previstos		Observados	
	BR1	LViPE-06	BR1	LViPE-06
Fenólicos Totais	61,74	87,44	50,72±0,97 (17,8%)	75,11±3,37 (14,1%)
ABTS	849,83	795,17	510,54±19,85 (39,9%)	735,59±24,26 (7,4%)
ORAC	760,55	661,20	581,40±8,94 (23,5%)	553,70±17,82 (16,2%)

*Média ± erro padrão.

Entre parênteses: erro percentual ((Valor observado-Valor previsto)/Valor previsto)*100

De acordo com a Tabela 10, o erro percentual dos valores observados em relação aos valores previstos variou de 4% a aproximadamente 40%. A maior parte desses valores pode ser considerada elevada já que os modelos matemáticos foram considerados válidos pela falta de ajuste não significativa e regressão significativa. Na otimização dos parâmetros de extração da casca da romã, por exemplo, Živković et al. (2018) obtiveram o erro percentual no valor máximo de 3,7% e Pandey et al. (2018), na otimização da extração de compostos fenólicos do rizoma de *Rheum moorcroftianum* encontraram valores abaixo de 5,8% do erro percentual entre os valores observados em relação aos valores previstos.

Uma possível explicação para o erro percentual elevado seria a abrangência dos modelos gerados, que poderia estar restrita à uma faixa específica das variáveis

independentes estudadas. Além disso, existe a variação das análises *in vitro*, utilizadas para a obtenção do teor de fenólicos totais e atividade antioxidante. Na Tabela 10, observa-se que os erros percentuais para as películas foram, no geral, maiores quando comparados com os cotilédones, o que pode também ser explicado pelo fator da diluição dos extratos das películas terem sido maiores ao dos extratos dos cotilédones a fim de serem analisados.

A temperatura e o grau de hidratação de etanol selecionados permitiram a obtenção de extratos dos cotilédones e películas de amendoins em que os compostos fenólicos majoritariamente detectados foram os ácidos fenólicos (Tabela 14) e procianidinas oligoméricas do tipo A (Tabela 15), respectivamente.

Os ácidos fenólicos estão entre os compostos não flavonoides mais amplamente distribuídos em plantas e têm sido extensivamente estudados devido às suas propriedades biológicas. O ácido ferulico, por exemplo, atenuou o estado de estresse oxidativo em animais diabéticos (Balasubashini et al., 2004); o ácido sinápico demonstrou atividade anti-inflamatória em camundongos (Yun et al., 2008) e o ácido *p*-cumárico revelou atividade antitumoral (Heleno et al., 2014).

Em relação às procianidinas presentes na película do amendoim, foi demonstrado o seu efeito anti-inflamatório, na diminuição de citocinas e interleucinas-6 em cultura de células (Tatsuno et al., 2012) e atividade antiproliferativa em células de câncer de próstata humanas (Chen et al., 2018).

Dezoito compostos foram identificados no cotilédone do genótipo BR1, dentre esses, apenas três não foram identificados no genótipo LViPE-06. A pertence ao grupo dos ácidos fenólicos, entretanto, também foram identificados três flavonoides (rutina, isoramnetina-3-*o*-rutinosídeo e isoramnetina 3-2"-acetil-glucosídeo), uma cumarina (6,7-dihidroxycumarina) e um estilbeno (resveratrol-3-*o*-*p*-ácido cumaroil-tartárico). Dentre os ácidos fenólicos encontrados, destaca-se a presença dos ácidos hidroxicinâmicos, tais como os ácidos *p*-cumárico, cafeico e seus ésteres com o ácido tartárico (ácidos coutárico e caftárico), além do ácido fertárico e ácido *p*-coumaroil-feruloil-tartárico. No cotilédone do genótipo LViPE-06 não foram identificados o derivado do ácido coutárico no tempo de 12,9 minutos, bem como a 6,7-dihidroxycumarina e a isoramnetina 3-(2"-acetil-glicosídeo).

A fragmentação do ácido *p*-cumárico e derivados gerou o íon molecular *m/z* 163.0399 ou íons com valores de massa muito próximos a esse, o que permitiu a identificação do composto com o erro de até 5 ppm em relação à massa exata do

ácido *p*-cumárico. O íon proeminente m/z 119 no espectro MS^2 caracterizou a perda do grupo CO_2 da porção do ácido carboxílico (Li et al., 2017). Os ésteres do ácido *p*-cumárico (ácido coutárico) foram identificados por tentativa, devido ao íon molecular m/z 295,0454 e ao fragmento no espectro MS^2 m/z 163, referente ao íon [ácido *p*-cumárico $-H$] $^-$.

O ácido cafeico foi caracterizado pelo íon molecular m/z 179,0305 e pelo fragmento m/z 135 no espectro MS^2 referente à perda de um grupo CO_2 ([M-H-44] $^-$) e seu éster, o ácido caftárico exibiu [M-H] $^-$ m/z 311,0393 e no espectro MS^2 , o íon m/z 179,0345, que caracterizou o resíduo do ácido tartárico ([M-H-132]).

O derivado do ácido sinápico gerou no espectro MS^2 os íons m/z 223,0619 e 179,0722, que corresponderam ao íon molecular do ácido sinápico e seu íon descarboxilado, respectivamente.

O derivado do ácido ferúlico produziu os íons m/z 193,0496 e 149,0594 no espectro MS^2 , referentes ao íon molecular do ácido ferúlico e seu íon descarboxilado. O éster (ácido fertárico) teve como íon molecular m/z 325,0562 e fragmentos no espectro MS^2 os íons m/z 193,0497 e 149,0595.

O composto ácido *p*-cumaroil-feruloil-tartárico foi identificado por tentativa pela presença do íon molecular m/z 471,0916 e fragmentos no espectro MS^2 m/z 307,0456 [M-H-146 (*p*-cumaroil) - 18 (H_2O)] $^-$ e m/z 203,0343 [M-H-176 (feruloil) - 18 (H_2O) - 74 ($C_2H_2O_3$)].

A rutina (quercetina-3-O-rutinosídeo) apresentou o íon molecular m/z 609,1454 e, no espectro MS^2 , o íon correspondente à quercetina m/z 301,0336. A isoramnetina-3-O-rutinosídeo apresentou o íon molecular de m/z 623,1636 e o íon referente à perda do rutinosídeo m/z 315,0511 ([M-H-308] $^-$, como o mais abundante no espectro MS^2). A isoramnetina acetil-glucosídeo mostrou como íon molecular o íon de m/z 519,1153 e no espectro MS^2 o íon m/z 315,0531, referente à perda do acetil-glucosídeo [M-H-204] $^-$.

O resveratrol-3-*o*-ácido *p*-cumaroil-tartárico apresentou o íon molecular de m/z 505,1706 e no espectro MS^2 apresentou os íons m/z 277,0345, referente à perda do resveratrol [M-H-228] $^-$, e m/z 203,0328, referente à perda do resveratrol e da estrutura $C_2H_2O_3$, de acordo com a fragmentação proposta por Ma et al. (2014).

O composto 6,7-dihidroxycumarina (aesculetina) apresentou o íon molecular m/z 177,0197 e no espectro MS^2 apresentou o fragmento m/z 133,0310, conforme também apresentado na identificação feita por Michel et al. (2015).

Tabela 14 - Identificação por tentativa dos compostos fenólicos presentes nos cotilédones de amendoins (genótipos BR1 e LViPE-06) analisados pela técnica LC-ESI-QTOF-MS.

Identificação tentativa	Genótipo	TR (min)	Fórmula molecular	Massa exata	[M-H] ⁻ m/z	Erro (ppm)	MS ²
Ácido cumárico (derivado)	BR1/ LViPE-06	5,8 a 7,9	C ₉ H ₈ O ₃	164,0473	163,0389	-3,657	119,0503; 93,0339
Ácido caftárico (ácido cafeoil-tartárico)	BR1/ LViPE-06	10,1	C ₁₃ H ₁₂ O ₉	312,0481	311,0393	-3,205	135,0452; 179,0345
Ácido caféico	BR1/ LViPE-06	10,1	C ₉ H ₈ O ₄	180,0420	179,0345	0,555	135,0427; 149,0093
Ácido coutárico (ácido <i>p</i> -cumaroil-tartárico)	BR1/ LViPE-06	12,9	C ₁₃ H ₁₂ O ₈	296,0530	295,0454	0,000	163,0381; 119,0479
Ácido coutárico (ácido <i>p</i> -cumaroil-tartárico) (derivado)	BR1	12,9	C ₁₃ H ₁₂ O ₈	296,0530	295,0454	0,000	163,0381; 119,0479
Ácido cumárico (derivado)	BR1/ LViPE-06	12,9	C ₉ H ₈ O ₃	164,0473	163,0394	-0,610	119,0484; 93,0332
Ácido fertárico (ácido feruloil-tartárico)	BR1/ LViPE-06	14,5	C ₁₄ H ₁₄ O ₉	326,0640	325,0562	0,000	134,0371; 193,0497; 149,0595
Ácido ferúlico (derivado)	BR1/ LViPE-06	14,6	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	194,0579	193,0496	-2,577	134,0357; 149,0594
Ácido coutárico (derivado)	BR1/ LViPE-06	16,1	C ₁₃ H ₁₂ O ₈	296,0530	295,0462	2,702	163,0400; 119,0516
Ácido <i>p</i> -cumárico	BR1/ LViPE-06	19,3	C ₉ H ₈ O ₃	164,0473	163,0399	2,438	119,0503; 93,0341
Rutina	BR1/ LViPE-06	19,6	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	610,1533	609,1454	-0,164	300,0275; 301,0336
Isoramnetina-3- <i>o</i> -rutinosídeo	BR1/ LViPE-06	22,6	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₆	624,1690	623,1636	3,845	314,0447; 315,0511; 299,0204
6,7-dihidroxycumarina (aesculetina)	BR1	23,8	C ₉ H ₅ O ₄	178,0266	177,0197	5,055	655,0027; 107,0141; 133,0310
Isoramnetina 3-(2"-acetil-glicosídeo)	BR1	26,4	C ₂₄ H ₂₄ O ₁₃	520,1220	519,1153	2,115	300,0251; 315,0531; 255,0273; 361,1670
Resveratrol-3- <i>o</i> -ácido <i>p</i> -cumaroil-tartárico	BR1/ LViPE-06	27,2			505,1706		119,0495; 163,0395; 203,0328; 277,0345; 227,1279
Ácido sinápico (derivado)	BR1/ LViPE-06	27,4		224,0684	223,0619	5,802	179,0722
Ácido cumárico (derivado)	BR1/ LViPE-06	29 a 29,4	C ₉ H ₈ O ₃	164,0473	163,0395	0,000	163,0402; 119,0498; 203,0351; 175,0398
Ácido <i>p</i> -cumaroil-feruloil-tartárico	BR1/ LViPE-06	29,7		164,0473	471,0916		203,0343; 119,0494; 233,0453; 175,0375; 307,0456

O total de vinte e seis compostos fenólicos foi identificado na película do genótipo BR1, dentre esses, 6 compostos não foram identificados na película do genótipo LViPE-06. Os compostos que prevaleceram em ambos os extratos foram os oligômeros da procianidina tipo A (trímeros e tetrâmeros). Entre os dímeros foram identificadas as procianidinas do tipo A e B, incluindo o que está ligado à luteolina ou canferol. Dentre os flavonoides, foram identificados os seguintes compostos: (+)-catequina, rutina, isoquercetina, isoramnetina-3-*o*-rutinosídeo, canferol-3-*o*-glucosídeo, epicatequina mono-galato e quercetina. Os ácidos fenólicos identificados foram: ácidos protocatecuico, *p*-cumárico (derivado), chicórico e derivados do *p*-cumaroil.

Os trímeros de procianidinas tipo A apresentaram os íons moleculares de m/z 863,18 (uma ligação do tipo A) e m/z 861,1699 (duas ligações do tipo A). Em ambos, o fragmento comum no espectro MS² foi o íon m/z 289,07. A procianidina do tipo A (dímero) foi caracterizada pelo íon molecular m/z 575,1200 e o fragmento m/z 289,0722 no MS² (Ma et al., 2014). Já a procianidina do tipo B (dímero) apresentou o íon molecular de m/z 577,1357. Entre os fragmentos do espectro MS² encontraram-se os íons m/z 407,07 e m/z 289,07. Tal composto foi identificado como procianidina B1, pela comparação do tempo de retenção (9,6 minutos) do padrão analítico autêntico.

Os tetrâmeros das procianidinas tipo A (Tabela 14) não sofreram fragmentação no espectro MS², porém apresentaram sinal no espectro da primeira fragmentação. Os íons moleculares de m/z 1151,2464 e 1149,2325 foram muito próximos às massas dos íons dos tetrâmeros (m/z 1151,2463 e 1149,2306) identificados em extratos de lichia por Lv et al. (2014).

O íon molecular m/z 289,0711 sugeriu a massa molecular da catequina e epicatequina, porém, a catequina foi confirmada pelo tempo de retenção do padrão analítico autêntico.

O dímero da procianidina contendo luteolina ou canferol apresentou o íon molecular m/z 573,1059 e como íons resultantes no espectro MS², os de massas m/z 447,0704; 289, 0711 e 283,0264, conforme o padrão de quebra apresentado por Sarnoski et al. (2012).

O ácido protocatecuico apresentou o íon molecular de m/z 153,0195 e o fragmento proeminente m/z 109,0297 no espectro MS², referente à perda do CO₂ da porção ácido carboxílico.

O composto ácido chicórico (ácido di-cafeoil-tartárico) foi identificado pelo íon molecular m/z 473,0734 e seus fragmentos no espectro MS² m/z 179,0354 [ácido caféico-H]⁻ e m/z 149,0093 [ácido tartárico-H]⁻, que corresponderam à perda de uma porção do ácido tartárico e um resíduo do cafeoil, respectivamente.

O ácido di-*p*-cumaroil-tartárico apresentou o íon molecular de m/z 441,0836 e no espectro MS² os fragmentos m/z 163,0404 [ácido cumárico-H]⁻ e m/z 119,0502 [ácido cumárico-H-CO₂]⁻.

A isoquercetrina (quercetina-3-*o*-glucosídeo) caracterizou-se pela presença do íon molecular m/z 463,0892. No espectro MS² os fragmentos mais proeminentes foram os íons m/z 301,0323 e m/z 300,0281, resultantes da perda da hexose e da formação do ânion quinona, respectivamente. O ânion quinona é formado pela quebra homolítica da ligação *o*-glicosídica (Cádiz-Gurrea et al., 2013)

Os compostos não identificados encontrados apenas na película de LViPE-06 foram: procianidina B1, (+)-catequina, isômero do trímero da procianidina tipo A (tempo 16,0 minutos), o dímero da procianidina com uma luteolina ou canferol e o canferol-3-*o*-glucosídeo. Somente no tempo de 25,7 minutos foi identificado um trímero da procianidina tipo A.

Tabela 15 - Identificação por tentativa dos compostos fenólicos presentes nas películas de amendoins (genótipos BR1 e LViPE-06) analisados pela técnica LC-ESI-QTOF-MS.

Identificação tentativa	Genótipo	TR (min)	Fórmula molecular	Massa exata	[M-H] ⁻	Erro (ppm)	MS ²
Ácido protocatecuico	BR1/ LViPE-06	8,5	C ₆ H ₇ O ₄	154,0266	153,0195	4,545	109,0297; 108,0216; 91,0190
Procianidina B1	BR1	9,6	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂	578,1424	577,1357	1,903	203,0761; 289,0756; 407,0712
(+)-catequina	BR1/ LViPE-06	11,6	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	290,079	289,0711	-0,345	109,0283; 203,0698; 83,0132
Procianidina tipo A (trímero)	BR1/ LViPE-06	12,6	C ₄₅ H ₃₆ O ₁₈		863,1850		575,1219; 452,0783; 285,0398
Procianidina tipo A (dímero)	BR1/ LViPE-06	13,0	C ₃₀ H ₂₃ O ₁₂	576,127	575,1200	1,389	289,0722; 125,0244; 411,00716
Procianidina tipo A (trímero)	BR1/ LViPE-06	13,3	C ₄₅ H ₃₆ O ₁₈		863,1813		575,1198; 285,0394
Ácido coutárico	BR1/ LViPE-06	13,3	C ₁₃ H ₁₂ O ₈	296,053	295,0459	1,689	163,0399; 119,0498
Ácido cumárico (derivado)	BR1/ LViPE-06	13,3	C ₉ H ₈ O ₃	164,0473	163,0396	0,610	119,0498
Procianidina tipo A (trímero)	BR1/ LViPE-06	14,4	C ₄₅ H ₃₆ O ₁₈		863,1852		289,0725; 411,0733
Procianidina tipo A (trímero)	BR1	16,0			861,1699		289,0732; 283,0259; 445,0549; 573,1036
Procianidina tipo B (dímero)	BR1/ LViPE-06	16,5	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂	578,1424	577,1373	4,670	289,0729; 125,0245; 407,0793
Procianidina tipo A (trímero)	BR1/ LViPE-06	17,7	C ₄₅ H ₃₆ O ₁₈		863,1869		285,0409; 575,1205; 125,0246
Procianidina tipo A (tetrâmero)	BR1/ LViPE-06	18,6	C ₆₀ H ₄₇ O ₂₄		1151,2493		
Rutina	BR1/ LViPE-06	19,7	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	610,1533	609,147	2,458	300,0281; 301,0346; 271,0269
Procianidina tipo A (trímero)	BR1/ LViPE-06	19,7	C ₄₅ H ₃₆ O ₁₈		863,1820		289,0729; 285,0400; 411,0725
Isoquercetrina	BR1/ LViPE-06	20,7	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	464,0954	463,0892	3,448	300,0284; 301,0323; 271,0257; 255,0312
Procianidina tipo A (tetrâmero)	BR1/ LViPE-06	20,7	C ₆₀ H ₄₇ O ₂₄		1151,2464		
Procianidina tipo A (tetrâmero)	BR1/ LViPE-06	21,4	C ₆₀ H ₄₇ O ₂₄		1151,2484		
Procianidina tipo A (tetrâmero)	BR1/ LViPE-06	21,9			1149,2325		
Ácido chicórico	BR1/ LViPE-06	22,3	C ₂₂ H ₁₈ O ₁₂	474,0798	473,0734	2,953	179,0354; 149,0093
Isoramnetina-3-o-rutinosídeo	BR1/ LViPE-06	22,9	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₆	624,169	623,1619	1,121	315,0517; 271,0258; 151,0042
Procianidina dímero --> luteolina ou canferol	BR1	23,6			573,1059		283,0264; 447,0704; 255,0307; 289,0711
Procianidina tipo A (trímero)	BR1/ LViPE-06	23,6	C ₄₅ H ₃₄ O ₁₈		861,1689		571,0852; 449,0905; 285,0415; 125,0244
Canferol-3-o-glucosídeo (astragalin)	BR1	24,4	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	448,101	447,0949	3,794	
Procianidina tipo A (trímero)	LViPE-06	25,7			861,1709		289,0732; 283,0259; 445,0549; 573,1036
Ácido di- <i>p</i> -cumaroil-tartárico	BR1/ LViPE-06	29,0		442,0899	441,0836	3,393	163,0404; 119,0502; 203,0352; 145,0293
Quercetina	BR1/ LViPE-06	30,6	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	302,0426	301,0345	-0,993	151,0039; 107,0119; 65,0031

O ácido protocatecuico apresentou o íon molecular de m/z 153,0195 e o fragmento proeminente m/z 109,0297 no espectro MS^2 , referente à perda do CO_2 da porção ácido carboxílico.

O composto ácido chicórico (ácido di-cafeoil-tartárico) foi identificado pelo íon molecular m/z 473,0734 e seus fragmentos no espectro MS^2 m/z 179,0354 [ácido caféico- H] $^-$ e m/z 149,0093 [ácido tartárico- H] $^-$, que corresponderam à perda de uma porção do ácido tartárico e um resíduo do cafeoil, respectivamente.

O ácido di-*p*-cumaroil-tartárico apresentou o íon molecular de m/z 441,0836 e no espectro MS^2 os fragmentos m/z 163,0404 [ácido cumárico- H] $^-$ e m/z 119,0502 [ácido cumárico- $H-CO_2$] $^-$.

A isoquercetrina (quercetina-3-*o*-glucosídeo) caracterizou-se pela presença do íon molecular m/z 463,0892. No espectro MS^2 os fragmentos mais proeminentes foram os íons m/z 301,0323 e m/z 300,0281, resultantes da perda da hexose e da formação do ânion quinona, respectivamente. O ânion quinona é formado pela quebra homolítica da ligação *o*-glicosídica (Cádiz-Gurrea et al., 2013)

Os compostos não identificados no extrato da película LViPE-06 comparados aos encontrados no extrato do genótipo BR1 foram: procianidina B1, (+)-catequina, isômero do trímero da procianidina tipo A (tempo 16,0 minutos), o dímero da procianidina com uma luteolina ou canferol e o canferol-3-*o*-glucosídeo. Somente no tempo de 25,7 minutos foi identificada um trímero da procianidina tipo A no extrato LViPE_06.

2.4 Conclusão

Com o uso da metodologia de superfície de resposta foi possível estabelecer duas condições diferentes de temperatura e grau de hidratação do etanol para a extração de compostos fenólicos de amendoim. Ficou evidente a diferença entre as classes de compostos fenólicos nos cotilédones e películas. Não houve diferenças das variáveis independentes na extração de compostos fenólicos entre cotilédones e películas dos dois genótipos.

Com base na identificação dos compostos fenólicos por espectrometria de massas de alta resolução, nos cotilédones prevaleceram os ácidos fenólicos, especialmente os derivados do *p*-cumaroil e nas películas, os taninos condensados, principalmente as procianidinas do tipo A. Entre os genótipos de amendoim,

tolerante e susceptível à seca, prevaleceram características semelhantes da composição fenólica considerando a mesma matriz (cotilédono ou película).

Referências

ADHIKARI, B.; DHUNGANA, S.K.; ALI, M.W.; ADHIKARI, A.; KIM, I.D.; SHIN, D.H. Antioxidant activities, polyphenol, flavonoid, and amino acid contents in peanut shell. **Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences**, <https://doi.org/10.1016/j.jssas.2018.02.004>.

BALASUBASHINI, M.S.; RUKKUMANI, R.; VISWANATH, P.; VENUGOPAL, M. Ferulic acid alleviates lipid peroxidation in diabetic rats. **Phytoterapy Research**, v. 18, p. 310-314, 2004.

BALLARD, T.S.; MALLIKARJUNAN, P.; ZHOU, K.; O'KEEFE, S. Microwave-assisted extraction of phenolic compounds from peanut skins. **Food Chemistry**, v.120(4), p.1185-1192, 2010.

BARROS-NETO, B.; SCARMINIO, I.S.; BRUNS, R.E. **Como fazer experimentos**. 4 ed. Porto Alegre: Bookman, 2010. 414p.

BEY, M.; LOUAILECHE, H.; ZEMOURI, S. Optimization of phenolic compound recovery and antioxidant activity of light and dark dried fig (*Ficus carica* L.) varieties. **Food Science and Biotechnology**, v.22, p.1613-1619, 2013.

BEZERRA, M.A.; SANTELLI, R.E.; OLIVEIRA, E.P.; VILLAR, L.S.; ESCALEIRA, L.A. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. **Talanta**, v.76(5), p.965-977, 2008.

BISHI, S.K.; LOKESH, K.; MAHATMA, M.K.; KHATEDIYA, N.; CHAUHAN, S.M.; MISRA, J.B. Quality traits of Indian peanut cultivars and their utility as nutritional and functional food. **Food Chemistry**, v. 167, p.107-114, 2015.

BODOIRA, R.; ROSSI, Y.; MONTENEGRO, M.; MAESTRI, D.; VELEZ, A. Extraction of antioxidant polyphenolic compounds from peanut skin using water-ethanol at high pressure and temperature conditions. **The Journal of Supercritical Fluids**, v.128, p.57-65, 2017.

CÁDIZ-GURREA, M. de la L.; FERNÁNDEZ-ARROYO, S.; JOVEN, J.; SEGURA-CARRETERO, A. Comprehensive characterization by UHPLC-ESI-Q-TOF-MS from an *Eryngium bourgatii* extract and their antioxidant and anti-inflammatory activities. **Food Research International**, V. 50(1), P.197-204, 2013.

CALOMENI, A.V.; SOUZA, V.B.; TULINI, F.L.; THOMAZINI, M.; OSTROSCHI, L.C., ALENCAR, S.M.; MASSARIOLI, A.P.; BALIEIRO, J.C.C.; CARVALHO, R.A.; FAVARO-TRINDADE, C. Characterization of antioxidant and antimicrobial properties of spray-dried extracts from peanut skins. **Food and Bioproducts Processing**, v.105, p.215-223, 2017.

CHUKWUMAH, Y.; WALKER, L.; VOGLER, B.; VERGHESE, M. Changes in phytochemical composition and profile of raw, boiled, and roasted peanuts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.55, p.9266-9273, 2007.

DE CAMARGO, A.C.; REGITANO-D'ARCE, M.A.B.; RASERA, G.B.; CANNIATTI-BRAZACA, S.G.; PRADO-SILVA, L.; ALVARENGA, V.O.; SANT'ANA, A.S.; SHAHIDI, F. Phenolic acids and flavonoids of peanut by-products: Antioxidant capacity and antimicrobial effects. **Food Chemistry**, v.237, p.538-544, 2017.

DE TORRES, A.; ESPÍNOLA, F.; MOYA, M.; ALCALÁ, S.; VIDAL, A.M.; CASTRO, E. Assessment of phenolic compounds in virgin olive oil by response surface methodology with particular focus on flavonoids and lignans. **LWT-Food Science and Technology**, v.90, p.22-30, 2018.

CHEN, L.; YAN, F.; CHEN, W.; ZHAO, L.; ZHANG, J.; LU, Q.; LIU, R. Procyanidin from peanut skin induces antiproliferative effect in human prostate carcinoma cells DU145. **Chemico-Biological Interactions**, v. 288, p. 12-23, 2018.

DOMÍNGUEZ-RODRÍGUEZ, G.; MARINA, M.L.; PLAZA, M. Strategies for the extraction and analysis of non-extractable polyphenols from plants. **Journal of Chromatography A**, v.1514, p.1-15, 2017.

ESTADOS UNIDOS, 2016. Department of Agriculture. USDA.gov – United States Department of Agriculture. Disponível em: <https://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods/show/16087>. Acesso em: 09-01-2018.

ESTADOS UNIDOS, 2017. Department of Agriculture. USDA.gov – United States Department of Agriculture. Disponível em: <https://www.fas.usda.gov/data/world-agricultural-production>. Acesso em: 09-01-2018.

FRANCISCO, M.L.D.L.; RESURRECCION, A.V.A. Functional Components in Peanuts. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.48, p. 715-746, 2008.

FRANCO, D.; RODRÍGUEZ-AMADO, I.; AGREGÁN, R.; MUNEKATA, P.E.S.; VÁSQUEZ, J.A.; BARBA, F.J.; LORENZO, J.M. Optimization of antioxidants extraction from peanut skin to prevent oxidative processes during soybean oil storage. **LWT-Food Science and Technology**, v. 88, p.1-8, 2018.

HELENO, S.A.; FERREIRA-RICARDO, C.F.R.; CALHELHA, C.; ESTEVES, A.P.; MARTINS, A.; QUEIROZ, J.R.P. Cytotoxicity of *Coprinopsis atramentaria* extract, organic acids and their synthesized methylated and glucuronate derivatives. **Food Research International**, v. 55, p. 170-175, 2014.

LARRAURI, M.; ZUNINO, M.P.; ZYGADLO, J.A.; GROSSO, N.R.; NEPOTE, V. Chemical characterization and antioxidant properties of fractions separated from extract of peanut skin derived from different industrial processes. **Industrial Crops and Products**, v.94, p.964-971, 2016.

LI, H.; ZHANG, D.; TAN, L.-H.; YU, B.; ZHAO, S.-P.; CAO, W.-G. Comparison of the antioxidant properties of various solvent extracts from *Dipsacus asperoides* and identification of phenolic compounds by LC-ESI-QTOF-MS–MS. **South African Journal of Botany**, v.109, p.1-8, 2017.

LV, Q.; SI, M.; YAN, Y.; LUO, F.; HU, G.; WU, H.; SUN, C.; LI, X.; CHEN, K. Effects of phenolic-rich litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) pulp extracts on glucose consumption in human HepG2 cells. **Journal of Functional Foods**, v.7, p. 621-629, 2014.

MA, Y.; KOSIŃSKA-CAGNAZZO, A.; KERR, W.L.; AMAROWICZ, R.; SWANSON, R.B.; PEGG, R.B. Separation and characterization of phenolic compounds from dry-blanching peanut skins by liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v.1356, p.64-81, 2014.

MELO, P.S.; MASSARIOLI, A.; DENNY, C.; DOS SANTOS, L.F.; FRANCHIN, M.; PEREIRA, G.E.; VIEIRA, T.M.F.S.; ROSALEN, P.L.; ALENCAR, S.M. Winery by-products: Extraction optimization, phenolic composition and cytotoxic evaluation to act as a new source of scavenging of reactive oxygen species. **Food Chemistry**, v. 181, p.160-169, 2015.

MICHEL, T.; KHLIF, I.; KANAKIS, P.; TERMENTZI, A.; ALLOUCHE, N.; HALABALAKI, M.; SKALTSOUNIS, A-L. UHPLC-DAD-FLD and UHPLC-HRMS/MS based metabolic profiling and characterization of different *Olea europaea* organs of Koroneiki and Chetoui varieties. **Phytochemistry Letters**, v.11, p.424-439, 2015.

MOURE, A.; CRUZ, J.M.; FRANCO, D.; DOMÍNGUEZ, J.M.; SINEIRO, J.; DOMÍNGUEZ, H.; NÚÑEZ, M.J.; PARAJO, J.C. Natural antioxidants from residual sources. **Food Chemistry**, v.72(2), p.145-171, 2001.

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

OLDONI, T.L.C.; MELO, P.S.; MASSARIOLI, A.P.; MORENO, I.A.M.; BEZERRA, R.M.N.; ROSALEN, P.L.; DA SILVA, G.V.J.; NASCIMENTO, A.M.; ALENCAR, S.M. Bioassay-guided isolation of proanthocyanidins with antioxidant activity from peanut (*Arachis hypogaea*) skin by combination of chromatography techniques. **Food Chemistry**, v.192, p.306-312, 2016.

OU, B.; HAMPSCH-WOODILL, M.; PRIOR, R.L. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.49, p.4619-4626, 2001.

PANDEY, A.; BELWAL, T.; SEKAR, K.C.; BHATT, I.D.; RAWAL, R.S. Optimization of ultrasonic-assisted extraction (UAE) of phenolics and antioxidant compounds from rhizomes of *Rheum moorcroftianum* using response surface methodology (RSM). **Industrial Crops & Products**, v. 119, p. 218-225, 2018.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, v.26(9-10), p.1231-1237, 1999.

SARNOSKI, P.J.; JOHNSON, J.V.; REED, K.A.; TANKO, J.M.; O'KEEFE, S.F. Separation and characterization of proanthocyanidins in Virginia type peanut skins by LC-MSn. **Food Chemistry**, v.131, p.927-939, 2012.

SALES, J.M.; RESURRECCION, A.V.A. Maximizing phenolics, antioxidants and sensory acceptance of UV and ultrasound-treated peanuts. **LWT - Food Science and Technology**, v.43(7), p.1058-1066, 2010.

SINGLETON, V.L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R.M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. **Methods in Enzymology**, v.299, p.152-178, 1999.

TALCOTT, S.T.; PASSERETTI, S.; DUNCAN, C.E.; GORBET, D.W. Polyphenolic content and sensory properties of normal and high oleic acid peanuts. **Food Chemistry**, v.90, p.379-388, 2005.

TATSUNO, T.; JINNO, M. ARIMA, T.; KAWABATA, T.; HASEG, N.; YAHAGI, N.; TAKANO, F.; OHTA, T. Anti-inflammatory and anti-melanogenic proanthocyanidin oligomers from peanut skin. **Biological and Pharmaceutical Bulletin** v. 35, p. 909-916, 2012.

TEÓFILO, R.F. & FERREIRA, M.M.C. Quimiometria II: Planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos experimentais, um tutorial. **Química Nova**, v.29(2), p.338-350.

TSUJITA, T.; SHINTANI, T.; SATO, H. Preparation and characterisation of peanut seed skin polyphenols. **Food Chemistry**, v.151, p.15-20, 2014.

YUN, K.; KOH, D.; KIM, S.; PARK, S.J.; RYE, J.H.; KIM, D.; LEE, J.; LEE, K. Anti-inflammatory effects of sinapic acid through the suppression of inducible nitric oxide synthase, cyclooxygenase-2, and proinflammatory cytokines expressions via nuclear factor-kappa b inactivation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 10265-10272, 2008.

ŽIVKOVIĆ, J.; ŠAVIKIN, K.; JANKOVIĆ, T.; ČUJIĆ, N.; MENKOVIĆ, N. Optimization of ultrasound-assisted extraction of polyphenolic compounds from pomegranate peel using response surface methodology. **Separation and Purification Technology**, v. 194, p. 40-47, 2018.

ZHANG, G.; HU, M.; HE, L.; FU, P.; WANG, L.; ZHOU, J. Optimization of microwave-assisted enzymatic extraction of polyphenols from waste peanut shells and evaluation of its antioxidant and antibacterial activities in vitro. **Food and Bioproducts Processing**, v. 91(2), p.158-168, 2013a.

ZHANG, H.; LIU, M.; HAN, S.; WEY, Y. Optimizing the extraction of catechin from peanut red skin using response surface methodology and its antioxidant activity. **IERI Procedia**, v.5, p. 312-320, 2013b.

3 CAPACIDADE DE DESATIVAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO POR GENÓTIPOS DE AMENDOIM TOLERANTES E SUSCEPTÍVEIS AO ESTRESSE HÍDRICO

Resumo

O presente estudo avaliou o sequestro de espécies reativas do oxigênio e a composição fenólica de extratos de quatorze genótipos de amendoins, sendo 6 genótipos tolerantes, um genótipo de média tolerância e sete genótipos não tolerantes à seca, pertencentes à coleção de germoplasma da EMBRAPA. As espécies reativas do oxigênio analisadas foram: radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), radical peroxila ($ROO^{\bullet}$), ácido hipocloroso ($HOCl$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila. O extrato do cotilédone do genótipo BR1, tolerante ao estresse hídrico, apresentou o maior teor em compostos fenólicos (28,72 mg AG/g extrato) e o maior desempenho para o sequestro do radical superóxido (28,65%), radical peroxila (738,97 μ mol Trolox/g) e peróxido de hidrogênio (IC_{25} 304,61 μ g/mL), destacando-se de todos os demais extratos de cotilédones. Entre os extratos das películas, o genótipo Senegal 55437, tolerante à seca, se sobressaiu por apresentar o melhor desempenho no sequestro de quatro espécies reativas: radical superóxido (IC_{50} 12,23 μ g/mL), ácido hipocloroso (IC_{50} 1,68 μ g/mL), radical hidroxila (IC_{50} 0,050 μ g/mL) e radical peroxila (IC_{50} 5.151,17 μ g/mL). Os principais compostos identificados e quantificados nos extratos dos cotilédones foram os ácidos caféico e *p*-cumárico e nas películas, a procianidina A2. Somente nas películas de coloração vermelha é que foi identificada a quercetina-3- β -D-glicosídeo.

Palavras-chave: *Arachis hypogaea* L.; ERO; Atividade antioxidante; Película; Cotilédone; Seca.

Abstract

This study investigated the reactive oxygen species scavenging activity and phenolic composition of extracts of fourteen peanut genotypes (six drought tolerant, one mild tolerant, and seven non-drought tolerant) from the *Embrapa's* germplasm collection. The reactive oxygen species superoxide radical ($O_2^{\bullet-}$), peroxy radical ($ROO^{\bullet}$), hypochlorous acid ($HOCl$), hydrogen peroxide (H_2O_2), and hydroxyl radical, were analyzed. The cotyledon extract from BR1 peanut genotype (tolerant to water stress) showed the highest content of phenolic compounds (28.72 mg GA/g extract) and the highest capacity to scavenge superoxide radical (28.65%), peroxy radical (738.97 μ mol Trolox/g) and hydrogen peroxide (IC_{25} 304.61 μ g/mL), with a significant difference from all other cotyledon extracts. Among the peanut skin extracts, the genotype Senegal 55437 showed high ability to scavenge four reactive species: superoxide radical (IC_{50} 12.23 μ g/mL), hypochlorous acid (IC_{50} 1.68 μ g/mL), hydroxyl radical (IC_{50} 0.050 μ g/mL) and peroxy radical (IC_{50} 5151.17 μ g/mL). The main compounds identified and quantitated in cotyledon extracts were caffeic and *p*-coumaric acids, as compared to procyanidin A2 in skin extracts. Only red colored skins showed the presence of quercetin-3- β -D-glucoside.

Key-words: *Arachis hypogaea* L.; ROS; Antioxidant activity; Peanut skin; Cotyledon; Dry.

3.1 Introdução

Os compostos fenólicos, naturalmente presentes nos alimentos, são continuamente estudados devido às suas propriedades biológicas, especialmente a antioxidante e, como consequência, podem ser utilizados para fins nutracêuticos, farmacêuticos e como possíveis substituintes aos antioxidantes sintéticos utilizados na indústria alimentícia (Andrade et al., 2011).

Os antioxidantes agem de forma a inibir a oxidação, retardando o aparecimento ou o progresso de doenças, como as neurodegenerativas e cardiovasculares, e também, a peroxidação lipídica em alimentos, resultado da ação de espécies reativas de oxigênio (EROs) produzidas durante o processo oxidativo, sobre as quais atuam os compostos fenólicos a fim de sequestrar ou desativar (Gülçin, 2012). Por isso, o estudo da atividade de sequestro *in vitro* dessas espécies possui maior relevância biológica quando comparado ao estudo do sequestro de radicais não biológicos como o DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) e ABTS (2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico). Várias espécies vegetais já têm sido consagradas como fontes de compostos capazes de sequestrar espécies reativas de oxigênio, a saber, cactos (Avila-Nava et al., 2014), café (Rodrigues et al., 2014), alecrim (Sueishi et al., 2018), canela (Tulini et al., 2017), frutas e suas diferentes partes (Chisté et al., 2012; Ribeiro et al., 2014; Berto et al., 2015; Infante et al., 2016), própolis (Francisco et al., 2018), folhas para preparo de infusões (Guo et al., 2017) além de resíduos da agroindústria (Melo et al., 2015; Tremocoldi et al., 2018).

O amendoim (*Arachis hypogaea* L.) é considerado fonte de compostos fenólicos que possuem atividade antioxidante, entretanto, o teor total desses compostos é afetado pela disponibilidade hídrica durante o seu cultivo (Aninbon et al., 2016). Durante o estresse hídrico, as plantas agem de forma a evitar a desidratação, para isso, acumulam solutos como compostos orgânicos de baixa massa molar (Hare et al., 1998), o que também pode acontecer com os compostos fenólicos (Varela et al., 2016).

Poucos são os estudos relacionados à atividade antioxidante em genótipos de amendoim com tolerância à seca. Assim, o objetivo desse capítulo foi avaliar a composição fenólica e a atividade antioxidante, quanto ao sequestro de espécies reativas de oxigênio, em genótipos de amendoim contrastantes quanto à tolerância à seca.

3.2 Material e Métodos

3.2.1 Obtenção das amostras

Plantas de amendoim foram cultivadas em campo na cidade de Campina Grande, PB, Brasil (7° 13' 51" S, 35° 52' 54" W, 512 m) durante o período de chuva, entre Maio a Setembro de 2015. Após a colheita, os frutos foram submetidos à secagem no campo até atingir umidade interna de 8 a 10%. As características de cada um dos 14 genótipos de amendoim estão descritas na Tabela 16.

Sementes dos 14 genótipos, tolerantes e susceptíveis à seca, pertencentes ao Banco Ativo de Germoplasma (BAG) da Embrapa, Campina Grande-PB (Figura 11) foram transferidas para o Laboratório de Bioquímica e Análise Instrumental, pertencente ao Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição da ESALQ-USP, Piracicaba-SP.

Tabela 16 - Características dos 14 genótipos de amendoim pertencentes ao Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Algodão, Campina Grande-PB.

Grupo Botânico	Genótipos	Crescimento	Tamanho Semente	Ciclo (dias)	Tolerância à seca	Óleo (%)
Spanish	Senegal 55437	Ereto	Pequena	75-80	Sim	43-44
	L7 Bege		Grande	85-90		46-49
	Senegal 57422		Média	85-90		44-45
	L50		Média	85-90		47-48
Virgínia	LViPE-06	Rasteiro	Extragrande	125-130	Não	50-52
	LGoPE 06		Extragrande	125-130		50-52
	FM407B		Grande	110-115		48-49
	M.407.424B		Grande	110-115		47-48
	FM424B		Grande	115-125	Média	47-48
	Florunner		Grande	120-125	Não	51-52
Valência	BR1	Ereto	Média	85-89	Sim	45-46
	Tatu		Média	95-100	Não	48-49
	Porto Alegre		Média	118-120	Não	47-48
	BRS 151 L7		Grande	85-89	Sim	46-47

Figura 11 - Quatorze genótipos de amendoins pertencentes ao Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Algodão, Campina Grande-PB, usados para análises de compostos fenólicos e atividade antioxidante.

3.2.2 Preparo das amostras e extração

As películas foram separadas manualmente dos cotilédones e ambos mantidos a -20°C até o momento das extrações. Inicialmente, cotilédones e películas foram triturados em moinho (IKA A11 basic); em seguida os cotilédones foram desengordurados com hexano. Para obtenção dos extratos, foi utilizado para os cotilédones o solvente etanol/água a 35% (v/v) e temperatura a 60°C em banho termostaticado e para as películas, o solvente etanol/água 60% (v/v) e temperatura a 40°C. As amostras foram incubadas por 30 minutos em banho-maria e em seguida 15 minutos sob sonicação (UltraCleaner 1400A, Unique, Indaiatuba, SP, Brasil). Após esse procedimento, os extratos foram centrifugados a 7000 x g, por 10 minutos a 21°C. Na sequência, o etanol foi removido em rotavapor (Buchi Rotavapor R-215, Switzerland), os extratos aquosos foram liofilizados e o rendimento das extrações calculado. As amostras foram armazenadas a -20°C até as análises. Todos os extratos foram obtidos em triplicatas.

3.2.3 Compostos fenólicos totais

O teor de compostos fenólicos totais foi determinado conforme descrito por Melo et al. (2015), com base nos conceitos de Singleton et al. (1999). Uma alíquota de 20 µL de extrato devidamente diluído ou padrão, juntamente com 100 µL da solução de Folin-Ciocalteu 10%, foram adicionados em poços de microplacas de 96 poços. Decorridos 5 minutos foram acrescentados 75 µL de solução de Na₂CO₃ 7,5% em água. Após agitação e decorrido o tempo de 40 minutos de incubação, as leituras das absorbâncias foram realizadas em leitor de microplacas (SpectraMax M3, Molecular Devices, LLC, Sunnyvale, CA, USA) à 740nm. A curva de calibração foi construída utilizando como padrão o ácido gálico e os resultados foram expressos em equivalentes ao ácido gálico (µg AG/mg extrato).

3.2.4 Sequestro do radical peroxila (ROO[•])

A análise do sequestro do radical peroxila foi realizada de acordo com o método descrito por Melo et al. (2015). Uma alíquota de 30 µL de extrato, padrão ou controle (tampão fosfato 75mM, pH 7,4) foram adicionados nos poços da microplaca opaca e preta, de 96 poços. Na sequência, foi adicionada uma alíquota de 60 µL da solução de fluoresceína 508 nM, preparada em tampão fosfato de potássio 75mM,

pH 7,4) e, por último, foi adicionado o volume de 110 µL da solução de AAPH 76mM, preparada no mesmo tampão. A reação ocorreu a 37°C e as leituras da fluorescência foram realizadas, a cada minuto durante 120 minutos, em leitor de microplacas com Ex./Em. de 485nm/528nm. A curva de calibração foi construída utilizando como padrão o Trolox e os resultados foram expressos em equivalentes ao Trolox (µmol Trolox/g extrato).

3.2.5 Sequestro do radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$)

A atividade de sequestro do radical superóxido foi determinada de acordo com o método descrito por Melo et al. (2015), com modificações. O radical superóxido foi gerado por meio do sistema NADH/PMS (dinucleotídeo de nicotinamida e adenina/metossulfato de fenazina) e o seu sequestro foi monitorado pela redução do NBT (nitroazul de tetrazólio) sob ação do radical para formar o composto diformazana, detectado a 560nm. As reações foram conduzidas a 25°C e continham os seguintes reagentes, extratos ou padrão: 100 µL extrato ou padrão (5 concentrações) diluídos em solução de DMSO/água 50% (v/v) ou controle (solvente diluente); 100 µL da solução NADH 498 µM; 50 µL da solução NBT 645µM e 50 µL da solução PMS 16,2µM preparados em tampão fosfato 19 mM pH 7,4. As leituras de absorbância foram realizadas a cada minuto durante 5 minutos em leitor de microplacas a 560nm. Os resultados foram expressos em % de inibição para os extratos dos cotilédones à concentração de 50 µg/mL, e em IC_{50} (µg/mL) para os extratos das películas. O padrão utilizado foi o ácido gálico.

3.2.6 Sequestro do ácido hipocloroso (HOCl)

O sequestro do ácido hipocloroso foi determinado pelo método descrito por Melo et al. (2015), com modificações. O ácido hipocloroso foi preparado ajustando-se o pH para 6,2 a partir de uma solução 1% (m/v) de NaOCl com uma solução 10% de H_2SO_4 . A concentração do HOCl foi determinada em espectrofotômetro, a 235nm, utilizando o coeficiente de absorção molar de $100 M^{-1}cm^{-1}$. A atividade sequestrante do HOCl foi determinada com o monitoramento da oxidação do DHR 123 (dihidrorodamina) a rodamina 123. A reação foi conduzida a 37°C contendo os seguintes reagentes, extratos ou padrão: 100 µL de tampão fosfato 100 mM pH7,4; 100 µL extrato ou padrão (5 concentrações) diluídos em tampão fosfato ou

etanol/água 50% (v/v) ou controle (solvente diluente); 50 μ L da solução DHR123 7,5 μ M e 50 μ L da solução 30 μ M, preparados em tampão fosfato 100 mM pH7,4. As leituras da fluorescência foram determinadas em leitor de microplacas (Em. 528nm, Ex. 485nm) imediatamente após a introdução da placa no equipamento. Os resultados foram expressos em IC₅₀ (μ g/mL) e o padrão utilizado foi a quercetina.

3.2.7 Sequestro do peróxido de hidrogênio (H₂O₂)

O sequestro do peróxido de hidrogênio foi determinado de acordo com o método descrito por Chisté et al. (2011), com modificações. A atividade sequestrante do H₂O₂ foi determinada pelo monitoramento da oxidação da lucigenina. A reação foi conduzida a 25°C contendo os seguintes reagentes: extratos ou padrão: 100 μ L de tampão tris-HCl 50mM pH 7,4; 50 μ L extrato ou padrão (5 concentrações) diluídos em tampão fosfato ou etanol/água 4,5% ou controle (solvente diluente); 50 μ L da solução de lucigenina 4 mM e 50 μ L de H₂O₂ 5%, preparados em tampão tris-HCl 50 mM pH 7,4. As leituras de quimiluminescência foram determinadas em leitor de microplacas após 5 minutos de incubação. Os resultados foram expressos em IC₂₅ (μ g/mL), para os extratos dos cotilédones e em IC₅₀ (μ g/mL), para os extratos das películas. O padrão utilizado foi o ácido ascórbico.

3.2.8 Sequestro do radical hidroxila (*OH)

O sequestro do radical hidroxila pelos extratos dos amendoins foi determinado de acordo com Mariutti et al. (2014). A atividade sequestrante do *OH foi monitorada pelo aumento da luminescência resultante da oxidação do luminol. O meio reacional conteve os seguintes reagentes: 50 μ L de tampão carbonato 0,5 M pH 10; 50 μ L de extrato ou padrão (5 concentrações) ou controle (solvente diluente); 50 μ L da solução 100 μ M de luminol preparada em tampão carbonato 0,5 M pH 10; 50 μ L da solução FeCl₂-EDTA (125 e 500 μ M) preparada em água ultrapura e 50 μ L da solução 17,5mM em água ultrapura. As leituras de luminescência foram determinadas em leitor de microplacas após 5 minutos de incubação da reação à 37°C. Os resultados foram expressos em IC₅₀ (μ g/mL) e o padrão utilizado foi o ácido gálico.

3.2.9 Quantificação dos compostos fenólicos por cromatografia líquida de alta eficiência

A quantificação dos compostos fenólicos foi realizada utilizando o cromatógrafo líquido de alta eficiência (SCL-10AVp, Shimadzu, Japan) acoplado ao detector de arranjo de diodos (DAD) (SPD-M 10AVp, Shimadzu, Japan). Uma alíquota de 30 µL de cada extrato, previamente diluídos e filtrados em unidade filtrante (Millex PTFE e PVDF 0,22 µm de poro), foi injetada em coluna de fase reversa C18 (250 x 4,6mm x 5,0 µm; Agilent). A fase móvel consistiu em Fase A (água/ácido fórmico 99,75/0,25 v/v) e Fase B (acetonitrila/água/ácido fórmico 80/19,75/0,25 v/v/v) cujo gradiente de separação iniciou com 10% da fase B aumentando para 20% em 10 minutos; 30% em 20 minutos; 50% em 30 minutos e diminuindo para 10% em 38 minutos. O fluxo foi de 1 mL/min e a coluna foi mantida a 30°C durante toda a corrida. Os cromatogramas foram analisados no software Class-VP e os compostos fenólicos foram identificados pela comparação do espectro de absorção e tempo de retenção de padrões autênticos provenientes da Sigma-Aldrich e Extrasynthese. A quantificação foi realizada pelo método da padronização externa, com curvas de calibração construídas com pelo menos 5 pontos de concentração de cada um dos padrões autênticos: ácido protocatecuico (0,15 a 5,0 µg/mL), ácido *p*-cumárico (1,25 a 20 µg/mL), ácido cafeico (0,62 a 10 µg/mL), (+)-catequina (1,25 a 10 µg/mL), procianidina A2 (3,12 a 50 µg/mL), quercetina (0,019 a 5 µg/mL), quercetina-3-β-D-glucosídeo (0,62 a 10 µg/mL), rutina (0,15 a 2,5 µg/mL), canferol-3-glucosídeo (0,12 a 2 µg/mL).

Os parâmetros de validação, limites de detecção/quantificação e linearidade foram utilizados para avaliação do método cromatográfico.

3.2.10 Análise estatística

Os dados foram expressos por meio da média ($n=3$) $\pm$ desvio padrão pela análise da variância simples (ANOVA). Para a comparação entre as médias, foi aplicado o teste de Tukey a 5% de probabilidade. A análise de agrupamento foi realizada por meio do método multivariado não hierárquico (componente principal). As análises foram realizadas utilizando o software GENES, versão 2013.5.1 (Cruz, 2013).

3.3 Resultados e Discussão

O rendimento da extração dos compostos com atividade antioxidante dos cotilédones foi superior ao das películas, na maioria dos genótipos, com exceção para os genótipos L7 Bege, FM424B e Florunner, em que o rendimento dos compostos das películas (11,84; 12,58 e 9,23%, respectivamente) mostrou uma ligeira tendência de aumento em relação aos respectivos cotilédones (11,39; 11,48 e 8,54%, respectivamente) (Figura 12).

O maior rendimento do extrato obtido a partir dos cotilédones foi observado para o genótipo BR1 (17,65%), o qual também apresentou o menor rendimento para o extrato obtido a partir das películas (5,48%). O menor rendimento dos cotilédones foi com o genótipo Florunner (8,54%), enquanto que o genótipo Senegal 57422 foi o que apresentou o maior rendimento dos extratos de películas (14,61%) (Figura 12).

Figura 12 - Rendimento (%) das extrações para os cotilédones e películas de 14 genótipos de amendoins.

De acordo com Lee et al. (2016), em um estudo com ginseng, o principal fator que influenciou o rendimento dos extratos foi o grau de hidratação do etanol, sendo que uma correlação positiva e forte ($r=0,90$) foi observada entre o teor de compostos fenólicos totais e o rendimento da extração. Outros estudos com matrizes diferentes, como cascas de tangerina e cacau, apontaram uma correlação moderada do rendimento de extrato com o teor de compostos fenólicos, nos valores de 0,63 e

0,51, de acordo com Nipornram et al. (2018), e Valadez-Carmona et al. (2018), respectivamente.

Como esperado, as películas dos amendoins apresentaram teores de compostos fenólicos superiores aos dos cotilédones, com destaque para o genótipo FM407B (30 vezes maior) (Tabela 17). De acordo com Attree et al. (2015), a película pode representar de 2 a 7% do peso total do amendoim, enquanto que o cotilédone pode chegar a mais de 90%. Entretanto, mesmo contribuindo com menos de 7% do total do peso, as películas são responsáveis por mais de 90% do total de compostos fenólicos do amendoim, mostrando claramente uma concentração destes compostos nesta parte do amendoim.

Nos extratos dos cotilédones, o teor total de compostos fenólicos variou de 18,56 a 28,72 mg AG/g extrato, referentes aos genótipos BRS 151L7 e BR1, respectivamente, ambos tolerantes à seca e pertencentes ao mesmo grupo botânico (Valência). Tais valores são significativamente diferentes ($p < 0,05$), sendo que o teor de 28,72 mg AG/g extrato é diferente de todos os demais genótipos. Em relação ao genótipo que apresentou o menor teor de compostos fenólicos (18,56 mg AG/g extrato), esse não diferiu do L7 Bege (18,82 mg AG/g extrato), que também é tolerante à seca, porém pertencente ao grupo botânico Spanish (Tabela 17).

Tabela 17 - Fenólicos totais em extratos dos cotilédones e películas de 14 genótipos do BAG de amendoim da Embrapa Algodão, Campina Grande-PB.

Genótipo*	Fenólicos Totais (mg AG/g extrato) **	
	Cotilédone	Película
Senegal 55437 (TS)	21,03±1,23 ^b	612,87±5,91 ^b
L7 Bege (TS)	18,82±0,30 ^d	555,84±18,17 ^c
Senegal 57422 (TS)	22,29±0,62 ^b	608,21±55,39 ^b
L50 (TS)	19,87±0,69 ^c	555,89±26,02 ^c
LViPE-06 (SS)	21,77±0,80 ^b	467,57±47,67 ^d
LGoPE-06 (SS)	20,33±0,40 ^c	506,89±15,41 ^d
FM407B (SS)	20,00±0,14 ^c	673,67±52,64 ^a
M407.424B (SS)	21,43±0,58 ^b	552,83±24,99 ^c
FM424B (MTS)	21,55±0,77 ^b	538,14±12,72 ^c
Florunner (SS)	21,42±1,41 ^b	512,30±3,87 ^d
BR1 (TS)	28,72±0,90 ^a	545,62±6,84 ^c
Tatu (SS)	20,80±0,88 ^b	568,70±3,84 ^c
Porto Alegre (SS)	20,38±0,48 ^c	558,54±26,72 ^c
BRS 151L7 (TS)	18,56±0,72 ^d	538,33±5,95 ^c

*TS: tolerante à seca; SS: susceptível à seca; MTS: médio tolerante à seca;

**Médias ± desvio padrão. Letras diferentes na coluna diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p<0,05$).

O teor total de compostos fenólicos nas películas variou de 467,57 a 673,67 mg AG/g extrato, nos genótipos LViPE-06 e FM407B, respectivamente, ambos susceptíveis à seca e pertencentes ao grupo botânico Virgínia. O maior teor de fenólicos (673,67 mg AG/g) diferiu significativamente de todos os demais valores, sendo que os genótipos com as menores concentrações são susceptíveis à seca: LViPE-06 (467,57 mg AG/g extrato), LGoPE-06 (506,89 mg AG/g extrato) e Florunner (512,30 mg AG/g extrato).

A atividade antioxidante nas películas dos amendoins pode ser relacionada ao conteúdo de compostos fenólicos, os quais atuam por meio de mecanismos de redução-oxidação e podem agir como doadores de hidrogênio e sequestradores de radicais hidroxila (Yen et al., 2005).

As Tabelas 18 e 19 apresentam os valores da atividade antioxidante medida pelo sequestro de espécies reativas do oxigênio para os extratos dos cotilédones e películas, respectivamente.

Tabela 18 - Sequestro de espécies reativas de oxigênio de extratos obtidos a partir dos cotilédones de 14 genótipos de amendoins do BAG da Embrapa Algodão, Campina Grande-PB.

Genótipo*	O ₂ ^{•-} (% inibição a 50 µg/mL)	H ₂ O ₂ (IC ₂₅ µg/mL)	HOCl (IC ₅₀ µg/mL)	•OH (IC ₅₀ µg/mL)	ROO [•] (µmol Trolox/g)
Senegal 55437 (TS)	4,36±0,79 ^h	443,23±5,57 ^f	19,11±0,57 ^c	2,76±0,14 ^d	242,77±12,87 ^e
L7 Bege (TS)	18,47±0,25 ^d	505,32±4,23 ^e	18,71±0,10 ^c	5,02±0,17 ^c	296,09±1,80 ^d
Senegal 57422 (TS)	24,49±1,91 ^b	397,13±15,09 ^f	15,38±0,19 ^d	5,79±0,43 ^b	246,30±28,41 ^e
L50 (TS)	5,96±0,82 ^h	777,65±32,98 ^c	24,24±4,96 ^b	5,45±0,44 ^b	163,97±3,22 ^g
LViPE-06 (SS)	19,98±1,33 ^c	228,32±15,08 ^h	17,30±0,61 ^c	4,82±0,17 ^c	354,60±32,17 ^c
LGoPE-06 (SS)	8,46±1,15 ^g	656,18±19,98 ^d	13,90±1,24 ^d	5,03±0,29 ^c	325,44±0,52 ^d
FM407B (SS)	15,39±0,95 ^e	870,23±23,34 ^a	11,09±0,73 ^e	4,36±0,32 ^c	160,37±26,54 ^g
M407.424B (SS)	13,66±0,80 ^f	760,11±12,53 ^c	16,03±0,65 ^d	3,93±0,40 ^c	279,57±21,62 ^e
FM424B (MTS)	21,43±0,21 ^c	631,92±46,76 ^d	15,59±0,76 ^d	4,58±0,46 ^c	241,88±25,16 ^e
Florunner (SS)	17,90±0,83 ^d	802,06±42,28 ^c	16,50±0,48 ^d	6,86±0,77 ^a	249,97±9,29 ^e
BR1 (TS)	28,65±0,18 ^a	304,61±28,50 ^g	18,44±0,46 ^c	4,69±0,15 ^c	738,97±6,89 ^a
Tatu (SS)	21,04±3,08 ^c	430,76±36,16 ^f	33,63±2,10 ^a	4,42±0,06 ^c	401,49±22,24 ^b
Porto Alegre (SS)	7,57±0,14 ^g	820,01±16,95 ^b	20,16±1,57 ^c	6,70±0,69 ^a	205,20±28,74 ^f
BRS 151L7 (TS)	12,68±0,83 ^f	771,94±13,44 ^c	21,22±0,01 ^c	4,15±0,67 ^c	234,08±20,92 ^e
Ácido gálico	85,59	-	-	0,04	-
Ácido ascórbico	-	92,26	-	-	-
Quercetina	-	-	0,23	-	-

*TS: tolerante à seca; SS: susceptível à seca; MTS: médio tolerante à seca;

**Médias ± desvio padrão. Letras diferentes na coluna diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey (p<0,05).

A atividade antioxidante dos cotilédones, no que se diz respeito ao sequestro do radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), não foi possível ser medida na forma de IC_{50} , pois foi houve queda da porcentagem de inibição dos extratos acima da concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$ (BR1 e Senegal 57422) e de 100 $\mu\text{g/mL}$ (demais genótipos), como pode ser observado na Figura 13, em comparação ao padrão ácido gálico, que apresentou comportamento crescente da porcentagem de inibição com o aumento da concentração.

A maior porcentagem de inibição à 50 $\mu\text{g/mL}$ foi alcançada pelo extrato do genótipo BR1 (28,65%) e os menores valores foram referentes aos extratos dos genótipos L50 (5,96%) e Senegal 55437 (4,36%), sendo que os 3 genótipos possuem características de tolerância à seca. Exceto para os genótipos BR1 e Senegal 57422, para todos os demais houve um incremento na porcentagem de inibição do radical superóxido nas concentrações dos extratos até 100 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 15).

A atividade antioxidante dos extratos dos cotilédones, medida pelo sequestro do peróxido de hidrogênio, foi expressa em IC_{25} , pois o IC_{50} não foi possível de ser calculado para a maior parte dos genótipos, já que não atingiram valores maiores que 50% da porcentagem de inibição na maior concentração do extrato analisada (2000 $\mu\text{g/mL}$). O extrato do cotilédone que teve o melhor desempenho no sequestro dessa espécie foi do genótipo LViPE-06, que mostrou o valor de IC_{25} de 228,32 $\mu\text{g/mL}$, aproximadamente 4 vezes menor que o do genótipo FM407B (870,23 $\mu\text{g/mL}$), que teve o pior desempenho no sequestro do peróxido de hidrogênio. Ambos os genótipos são considerados susceptíveis à seca e pertencem ao mesmo grupo botânico, Virgínia. Dentre os genótipos tolerantes à seca, o extrato que apresentou o melhor resultado foi do genótipo BR1, cujo valor do IC_{25} foi de 304,61 $\mu\text{g/mL}$ (Tabela 18).

Figura 13 - Porcentagem de inibição do $O_2^{\bullet-}$ pela ação dos extratos dos cotilédones comparado à ação do ácido gálico, um efetivo sequestrador do radical livre.

O extrato do genótipo FM407B se destacou dos demais quanto ao sequestro do HOCl, com um IC₅₀ de 11,09 µg/mL. Sequencialmente se destacaram os genótipos LGoPE-06, Senegal 57422, FM424B, M407.424B e Florunner, cujos valores de IC₅₀ variaram de 13,90 a 16,50 µg/mL, porém não diferiram significativamente. Desses, apenas o genótipo Senegal 57422 possui tolerância à seca, sendo os demais, inclusive o FM407B, susceptíveis à seca e pertencem ao grupo botânico Virgínia, portanto um grupo de destaque para o sequestro do ácido hipocloroso. Mahatma et al. (2016) verificaram que os genótipos que compõem o grupo Virgínia apresentaram os melhores resultados de atividade antioxidante pelo sequestro do radical ABTS, entre outras características, quando comparados aos dos genótipos do grupo Spanish. O extrato do cotilédone que apresentou a menor capacidade do sequestro do ácido hipocloroso foi o genótipo Tatu (IC₅₀ igual a 33,63 µg/mL) (Tabela 18).

Quanto ao sequestro do radical $\cdot\text{OH}$, o menor valor de IC₅₀ foi o do genótipo Senegal 55437 (2,76 µg/mL), o qual diferiu significativamente de todos os demais. Tal genótipo é tolerante à seca e pertencente ao grupo Spanish. Os menores desempenhos para o sequestro do radical hidroxila pertenceram aos extratos dos genótipos Florunner (IC₅₀ 6,86 µg/mL) e Porto Alegre (IC₅₀ 6,70 µg/mL), este último também tolerante à seca, porém pertencente ao grupo Valência (Tabela 18).

Em relação ao sequestro do radical ROO $\cdot$, o extrato que apresentou a maior atividade em equivalência ao padrão Trolox foi o extrato do genótipo BR1 (738,97 µmol Trolox/g). Esse valor foi significativamente diferente dos demais e aproximadamente 4,5 vezes maior do que o menor valor encontrado, referente ao extrato do genótipo FM407B (160,37 µmol Trolox/g), o qual também foi igual ao extrato do genótipo L50 (163,97 µmol Trolox/g) (Tabela 18).

Diante dos resultados do sequestro de espécies reativas do oxigênio, observou-se que o extrato do genótipo BR1 apresentou os melhores resultados no sequestro do radical superóxido, peróxido de hidrogênio e radical peroxila e resultados intermediários para o sequestro do ácido hipocloroso e radical hidroxila (Tabela 18). Tais resultados podem estar relacionados ao teor de compostos fenólicos nesse genótipo, que também foi superior quando comparado ao teor dos demais extratos, conforme apresentado na Tabela 17.

A configuração das hidroxilas no anel B dos flavonoides é a mais significativa no aumento da eficiência do sequestro de espécies reativas de oxigênio comparada

às substituições nos anéis A e C, que resultam em pouco impacto nas taxas de eliminação do radical superóxido, por exemplo. A atividade antioxidante *in vitro* pode ser aumentada pela polimerização de monômeros de flavonoides, como ocorre em proantocianidinas, cujos polímeros de catequinas possuem uma excelente atividade antioxidante *in vitro* devido ao grande número de grupos hidroxilas em suas estruturas moleculares. Além disso, a atividade antioxidante de proantocinidinas depende do tamanho da cadeia oligomérica e do tipo da espécie reativa que reagem (Procházková et al., 2011). De fato, isso foi observado nos resultados do sequestro das espécies reativas do oxigênio dos extratos das películas (Tabela 19) em comparação com os valores dos extratos dos cotilédones (Tabela 18).

No sequestro do $O_2^{\bullet-}$, o extrato da película do genótipo Senegal 55437, tolerante à seca, apresentou o menor valor do IC_{50} (12,23 $\mu\text{g/mL}$), enquanto que o extrato da película do genótipo LViPE-06, susceptível à seca, apresentou o pior desempenho no sequestro da espécie reativa, com IC_{50} igual a 32,89 $\mu\text{g/mL}$ (Tabela 19). Esses resultados foram melhores quando comparados com extratos de outras matrizes como casca de *Quararibea cordata*, um fruto amazônico (IC_{50} 385 $\mu\text{g/mL}$; Berto et al., 2015) e casca de araçá-vermelho (IC_{50} 83 $\mu\text{g/mL}$; Ribeiro et al., 2014).

Quanto ao sequestro do H_2O_2 , os extratos das películas que se destacaram foram os dos genótipos BR1 e Tatu, cujos valores do IC_{50} foram de 25,89 e 24,63 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Os genótipos LViPE-06, LGoPE-06 e Florunner, susceptíveis à seca, mostraram os menores desempenhos no sequestro do peróxido de hidrogênio (Tabela 19). Assim como para o sequestro do radical superóxido, os extratos das películas de todos os genótipos de amendoins se mostraram excelentes sequestradores do peróxido de hidrogênio, quando comparado com os resultados obtidos com 18 frutas (Vissotto et al., 2013), no qual os melhores resultados foram atribuídos às polpas de limão (143 $\mu\text{g/mL}$) e açaí (259 $\mu\text{g/mL}$). As concentrações dos extratos para o cálculo do IC_{50} no sequestro do H_2O_2 foram maiores, quando comparadas às concentrações para a obtenção dos valores do IC_{50} das demais espécies reativas, sendo que esse efeito também foi observado por Ribeiro et al. (2014).

Tabela 19 - Sequestro de espécies reativas de oxigênio de extratos obtidos a partir das películas de 14 genótipos de amendoins do BAG da Embrapa Algodão, Campina Grande-PB.

Genótipo*	IC ₅₀ (μg/mL)**				μmol Trolox/g**
	O ₂ • ⁻	H ₂ O ₂	HOCl	•OH	ROO•
Senegal 55437 (TS)	12,23±0,49 ^h	38,96±1,93 ^b	1,68±0,16 ^c	0,050±0,011 ^e	5151,17±3,76 ^a
L7 Bege (TS)	17,95±1,52 ^e	38,66±1,34 ^b	1,67±0,09 ^c	0,060±0,001 ^e	4542,50±313,92 ^b
Senegal 57422 (TS)	19,48±0,94 ^d	31,79±2,15 ^c	2,12±0,19 ^b	0,067±0,003 ^d	4072,05±44,26 ^c
L50 (TS)	16,31±0,43 ^f	37,76±2,91 ^b	1,88±0,02 ^c	0,077±0,005 ^c	4371,66±11,63 ^b
LViPE-06 (SS)	32,89±2,24 ^a	40,14±1,92 ^a	2,45±0,19 ^a	0,104±0,018 ^a	3108,93±237,57 ^f
LGoPE-06 (SS)	27,99±0,87 ^b	42,84±2,08 ^a	2,00±0,08 ^b	0,103±0,024 ^a	3166,66±118,59 ^f
FM407B (SS)	14,40±0,16 ^g	38,23±2,14 ^b	1,81±0,11 ^c	0,064±0,004 ^d	4906,55±94,01 ^a
M407.424B (SS)	16,26±1,40 ^f	29,07±0,93 ^c	2,17±0,08 ^b	0,056±0,002 ^e	5093,12±171,13 ^a
FM424B (MTS)	16,52±0,86 ^f	36,46±2,19 ^b	2,01±0,19 ^b	0,071±0,007 ^c	4465,02±219,20 ^b
Florunner (SS)	21,10±0,36 ^d	42,18±0,17 ^a	1,73±0,09 ^c	0,095±0,002 ^b	3754,35±64,26 ^d
BR1 (TS)	17,83±1,13 ^e	25,89±2,75 ^d	2,08±0,04 ^b	0,077±0,002 ^c	4666,06±125,27 ^b
Tatu (SS)	14,41±0,25 ^g	24,63±1,90 ^d	1,70±0,01 ^c	0,073±0,001 ^c	5230,78±65,56 ^a
Porto Alegre (SS)	23,64±1,08 ^c	38,58±0,11 ^b	2,27±0,27 ^a	0,089±0,005 ^b	3444,22±35,54 ^e
BRS 151L7 (TS)	15,39±0,84 ^f	37,44±0,97 ^b	1,74±0,04 ^c	0,065±0,001 ^d	4604,19±225,37 ^b
Ácido gálico	11,16	-	-	0,042	-
Ácido ascórbico	-	229,04	-	-	-
Quercetina	-	-	0,23	-	-

*TS: tolerante à seca; SS: susceptível à seca; MTS: médio tolerante à seca;

**Médias ± desvio padrão. Letras diferentes na coluna diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey (p<0,05).

No sequestro do HOCl (Tabela 19), os extratos das películas que apresentaram os melhores desempenhos foram os genótipos Senegal 55437, L7 Bege, L50, FM 407B, Florunner, Tatu e BRS 151L7, sendo quatro genótipos tolerantes à seca e três deles pertencentes ao grupo botânico Spanish. Os valores do IC₅₀ mais elevados, que indicam menor eficiência no sequestro do ácido hipocloroso, pertenceram aos extratos dos genótipos LViPE-06 e Porto Alegre, ambos susceptíveis à seca. Em comparação com extratos de própolis e seus resíduos, proveniente do Sul do Brasil, os extratos das películas de amendoins podem ser considerados excelentes fontes de sequestradores do HOCl, pois o IC₅₀ encontrado para os extratos de própolis e seus resíduos foram de 13,25 e 17,60 µg/mL, respectivamente, conforme o estudo de Francisco et al. (2018).

Em relação ao sequestro do radical $\cdot\text{OH}$, que está entre as espécies reativas mais prejudiciais, os valores de IC₅₀ da maioria dos extratos das películas ficaram abaixo da concentração de 0,1 µg/mL. Os extratos mais eficientes no sequestro do $\cdot\text{OH}$ foram dos genótipos Senegal 55437, L7 Bege e M407.424B, sendo os dois primeiros genótipos tolerantes à seca e pertencentes ao grupo Spanish. Os extratos que apresentaram os maiores valores do IC₅₀, e, portanto, considerados menos eficientes, foram os pertencentes aos genótipos LViPE-06 e LGoPE-06, ambos susceptíveis à seca e do grupo Virgínia (Tabela 19). Os melhores resultados foram semelhantes aos encontrados para a fração acetato de etila de extrato de folhas de *Wagatea spicata*, uma planta medicinal (IC₅₀ igual a 0,05 µg/mL), de acordo com Samak et al. (2009). Porém, foram mais eficientes que extratos de películas de amendoins tipo Runner, da Argentina, cujos valores encontrados de IC₅₀ foram de 15,37 µg/mL para extratos de películas do amendoim torrado e 9,58 µg/mL para extratos de películas do amendoim blanchado, de acordo com Larrauri et al. (2016).

Os extratos de películas que tiveram os melhores resultados no sequestro do ROO $\cdot$ foram os genótipos Senegal 55437, FM 407B, M407. 424B e Tatu, todos susceptíveis à seca. Os genótipos que apresentaram as menores atividades foram LViPE-06 e LGoPE-06. Os extratos com os maiores valores para o sequestro do radical peroxila são comparáveis ao valor obtido para o ácido ascórbico (5.400 µmol Trolox/g) e superiores aos valores obtidos para o extrato hidrofílico do murici (300 µmol Trolox/g), de acordo com o estudo realizado por Mariutti et al. (2014).

Com o objetivo de verificar qualquer similaridade ou dissimilaridade entre as variáveis avaliadas (teor de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante pelo sequestro de espécies reativas do oxigênio) e os diferentes genótipos de amendoins, especialmente no que se refere à tolerância e susceptibilidade à seca foi realizada a análise de componentes principais.

A Tabela 20 apresenta os autovalores, percentuais de variância isolada e acumulada das variáveis canônicas associadas aos componentes principais, com base no teor de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante dos extratos dos cotilédones e das películas dos 14 genótipos de amendoins estudados.

Tabela 20 - Elementos de variância obtidos a partir da matriz formada pelas variáveis analisadas para os extratos obtidos dos cotilédones e películas dos amendoins.

Componente Principal (CP)	Cotilédone			Película		
	Autovalor	Variância (%)	Variância acumulada (%)	Autovalor	Variância (%)	Variância acumulada (%)
1	104,44	57,77	57,77	42,02	72,61	72,61
2	47,26	26,14	83,92	8,39	14,49	87,11
3	12,43	6,87	90,79	3,59	6,22	93,33
4	9,85	5,45	96,24	2,39	4,14	97,47
5	4,67	2,58	98,82	1	1,73	99,21
6	2,11	1,17	100,00	0,46	0,79	100,00

Conforme os valores apresentados na Tabela 20, os componentes principais 1 e 2 (CP1 e CP2) expressaram aproximadamente 83,9 e 87,1% da variabilidade total dos dados para os extratos dos cotilédones e películas, respectivamente, o que é considerado suficiente para representar todas as variáveis. O CP1 para os cotilédones foi responsável por 57,77% da variância enquanto que para os extratos da película, a variância do CP1 foi de 72,61%. Dessa forma, a classificação dos genótipos dos amendoins pôde ser representada em um plano de dispersão bidimensional (Figura 14).

Figura 14 - Dispersões gráficas em relação aos eixos que representam os componentes principais CP1 (eixo x) e CP2 (eixo y), obtidos a partir dos resultados das variáveis para os extratos dos cotilédones (dispersão superior) e películas (dispersão inferior).

Com base no gráfico de dispersão obtido para os dados dos extratos dos cotilédones dos amendoins, houve a formação de cinco grupos, sendo que os genótipos BR1, LViPE-06 e Senegal 55437 compuseram isoladamente os grupos 1,

4 e 5, respectivamente. O grupo 3 foi caracterizado pelos genótipos Senegal 57422, Tatu e L7 Bege e o grupo 2 foi formado pelos demais genótipos: Florunner, BRS 151L7, M407.424B, FM407B, Porto Alegre, FM424B, L50 e LGoPE-06. Para as variáveis analisadas, não houve um grupo em que foi composto apenas dos genótipos tolerantes ou susceptíveis à seca, entretanto, o grupo 2 reuniu o maior número de genótipos pertencentes ao grupo botânico Virgínia e que possuem a característica de serem susceptíveis ao estresse hídrico. O genótipo BR1, que possui ciclo precoce e grande adaptação a ambientes com restrição hídrica, compôs isoladamente o grupo 1. Tal distanciamento dos demais genótipos foi devido aos melhores resultados referentes ao sequestro do radical superóxido, peróxido de hidrogênio e radical peroxila, sendo que essas variáveis apresentaram maior contribuição relativa dos componentes principais, baseada no critério de Sing (1981), para a classificação dos genótipos de amendoim, conforme apresentado na Tabela 21.

No gráfico de dispersão obtido dos dados dos extratos das películas, os quatorze genótipos de amendoins foram divididos em quatro grupos sendo o grupo 1 o que reuniu o maior número dos genótipos (BRS 151L7, FM407B, L7 Bege, FM424B, Senegal 55437 e L50). O grupo 2 foi composto pelos genótipos BR1, Tatu e M407.424B, o grupo 3 pelos genótipos Senegal 57422, Florunner e Porto Alegre e, o grupo 4 foi formado por 2 genótipos, LViPE-06 e LGoPE-06. Da mesma forma como observado na dispersão dos dados dos resultados dos cotilédones, não houve um agrupamento em que pertencessem todos os genótipos tolerantes à seca ou todos os pertencentes ao mesmo grupo botânico. O grupo 4, formado pelos genótipos LViPE-06 e LGoPE-06, se distanciaram dos demais e foram os que apresentaram os menores desempenhos no sequestro do radical superóxido, do peróxido de hidrogênio, radical peroxila e radical hidroxila. Tais variáveis apresentaram maior contribuição relativa dos componentes principais, baseada no critério de Sing (1981), para a classificação dos genótipos de amendoim, conforme apresentado na Tabela 21, no que diz respeito à análise dos extratos das películas. Os genótipos que compuseram o grupo 2 possuem como característica comum películas de coloração vermelha.

Tabela 21 - Contribuição relativa dos componentes das variáveis (fenólicos totais e sequestro de espécies reativas do oxigênio) para classificação dos genótipos de amendoim.

Variáveis	Cotilédone		Película	
	Contribuição relativa (%)	Valor	Contribuição relativa (%)	Valor
Fenólicos Totais	3,02	994,71	2,99	315,86
O ₂ ^{•-}	17,92	5898,17	42,61	4488,26
H ₂ O ₂	34,4	11319,3	15,14	1595,51
HOCl	6,13	2019,17	4,05	427,04
ROO [•]	33	10858,25	22,16	2334,62
•OH	5,5	1810,52	13,02	1371,43

A respeito da identificação e quantificação de compostos fenólicos nos extratos dos cotilédones e películas, utilizando a análise por HPLC-DAD, foi possível encontrar dois ácidos fenólicos (ácido caféico e ácido *p*-cumárico) e um flavonoide (rutina) nos extratos dos cotilédones (Tabela 22), sendo que a rutina foi quantificável apenas nos genótipos Senegal 55437 e M407.424B. Quanto ao ácido caféico, o teor variou de 0,14 a 0,33 mg/g de extrato, sendo o maior valor pertencente ao do genótipo Senegal 55437, tolerante à seca do grupo botânico Spanish. O teor do ácido *p*-cumárico variou de 0,12 a 0,55 mg/g de extrato, sendo esse último valor pertencente ao extrato do genótipo BR1, tolerante à seca do grupo botânico Valência. O menor teor do ácido *p*-cumárico (0,19 mg/g de extrato), encontrado no genótipo Senegal 55437, foi equivalente a 0,028 mg/g do cotilédone, semelhante ao valor encontrado para o genótipo de amendoim D147-p8-6F (0,024 mg/g de amostra), no estudo realizado por Phan-Thien et al. (2014).

Tabela 22 - Quantificação de compostos fenólicos identificados por HPLC-DAD em extratos dos cotilédones de 14 genótipos de amendoins do BAG da Embrapa Algodão, Campina Grande-PB.

Genótipos*	Compostos fenólicos (mg/g)**		
	Ác. caféico	Ác. <i>p</i> -cumárico	Rutina
Senegal 55437 (TS)	0,33±0,01	0,19±0,00	0,06±0,00
L7 Bege (TS)	0,20±0,03	0,22±0,02	nd
Senegal 57422 (TS)	0,21±0,01	0,10±0,00	nd
L50 (TS)	0,17±0,02	0,18±0,01	nd
LViPE-06 (SS)	0,13±0,00	0,19±0,00	nd
LGoPE-06 (SS)	0,16±0,00	0,16±0,00	nd
FM407B (SS)	0,19±0,01	0,24±0,01	nd
M407.424B (SS)	0,14±0,01	0,27±0,02	0,05±0,00
FM424B (MTS)	0,18±0,01	0,12±0,00	nd
Florunner (SS)	0,21±0,01	0,16±0,00	nd
BR1 (TS)	0,24±0,00	0,55±0,02	nd
Tatu (SS)	0,14±0,04	0,18±0,03	nd
Porto Alegre (SS)	0,26±0,03	0,17±0,01	nd
BRS 151L7 (TS)	0,14±0,00	0,19±0,01	nd
Parâmetros de validação ***			
LD (µg/mL)	0,09	0,04	0,01
LQ (µg/mL)	0,27	0,12	0,02
R ²	0,99	0,99	0,99

*TS: tolerante à seca; SS: susceptível à seca; MTS: médio tolerante à seca;

**Média ($n=3$)±desvio padrão;

***LD=limite de detecção; LQ=limite de quantificação; R²=coeficiente de determinação (linearidade).

A Tabela 23 apresenta sete compostos fenólicos identificados e quantificados nos extratos das películas em quatorze genótipos de amendoins, sendo um ácido fenólico (ácido protocatecuico) e seis flavonoides ((+)-catequina, procianidina A2, quercetina, rutina, quercetina-3-β-D-glicosídeo e canferol-3-glicosídeo).

Tabela 23 - Quantificação de compostos fenólicos identificados por HPLC-DAD em extratos das películas de 14 genótipos de amendoins do BAG da Embrapa Algodão, Campina Grande-PB.

Genótipos*	Compostos fenólicos (mg/g extrato)**						
	Ác. Protocat.	(+)-Cat.	Proc. A2	Quercetina	Rutina	Querc-3-β-D-gluc	Canf-3-gluc
Senegal 55437 (TS)	0,21±0,01	3,33±0,33	6,15±0,84	0,08±0,01	0,10±0,00	nd	nd
L7 Bege (TS)	0,18±0,01	2,41±0,19	7,93±0,31	0,09±0,01	0,05±0,00	nd	nd
Senegal 57422 (TS)	0,23±0,01	0,59±0,08	2,42±0,76	0,02±0,01	0,08±0,00	nd	0,04±0,00
L50 (TS)	0,22±0,03	0,79±0,05	2,62±0,13	0,04±0,00	0,05±0,00	nd	nd
LViPE-06 (SS)	0,09±0,01	nd	nd	0,04±0,00	0,04±0,01	nd	nd
LGoPE-06 (SS)	0,06±0,01	nd	nd	0,04±0,00	0,04±0,01	nd	nd
FM407B (SS)	0,21±0,00	1,44±0,04	5,37±0,70	0,10±0,00	0,06±0,01	nd	nd
M407.424B (SS)	0,67±0,03	0,96±0,03	3,89±0,24	0,76±0,03	0,40±0,03	1,02±0,05	0,10±0,00
FM424B (MTS)	0,21±0,00	nd	1,26±0,48	0,05±0,00	0,18±0,01	nd	nd
Florunner (SS)	0,25±0,03	nd	1,30±0,27	0,02±0,00	0,17±0,01	nd	nd
BR1 (TS)	0,69±0,08	1,61±0,20	3,70±0,72	0,58±0,01	0,44±0,02	0,82±0,05	0,06±0,01
Tatu (SS)	0,83±0,05	1,63±0,12	4,66±0,38	0,78±0,05	0,44±0,06	1,33±0,19	0,10±0,01
Porto Alegre (SS)	0,23±0,01	nd	nd	0,04±0,00	0,07±0,01	nd	nd
BRS 151L7 (TS)	0,22±0,00	3,13±0,17	4,43±0,40	0,09±0,00	0,05±0,00	nd	nd
Parâmetros de validação***							
LD (µg/mL)	0,01	0,03	0,23	0,01	0,008	0,04	0,01
LQ µg/mL)	0,04	0,09	0,71	0,04	0,024	0,11	0,04
R ²	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99

*TS: tolerante à seca; SS: susceptível à seca; MTS: médio tolerante à seca;

Média (n=3)±desvio padrão; *LD=limite de detecção; LQ=limite de quantificação; R²=coeficiente de determinação (linearidade).

O ácido protocatecuico, quercetina e rutina foram detectados e quantificados em todos os extratos de películas. Somente os extratos de 3 genótipos, M407.424B, BR1 e Tatu, é que foi possível detectar e quantificar todos os 7 compostos (Tabela 23). A característica comum desses genótipos é de possuir película de coloração vermelha, o que provavelmente define a presença desses compostos e sugere que a cor vermelha é determinante para essa característica.

O composto que se apresentou em maior quantidade, comparado aos demais, foi a procianidina A2 cujo teor entre os genótipos variou de 1,26 a 7,93 mg/g de extrato, sendo que o maior teor foi observado no genótipo L7 Bege, tolerante à seca. Os extratos nos quais a procianidina A2 não foi detectada são de genótipos susceptíveis à seca (LViPE-06, LGoPE-06 e Porto Alegre), porém, pela técnica LC-ESI-QTOF-MS, oligômero de procianidinas do tipo A foram detectadas no genótipo LViPE-06 (Tabela 14).

O segundo composto em maior concentração nos extratos foi a (+)-catequina que variou de 0,59 a 3,33 mg/g de extrato, sendo que a maior concentração foi encontrada no extrato da película do genótipo Senegal 55437 seguida pelos genótipos BRS 151L7 e L7 Bege, todos tolerantes à seca. De qualquer forma, o menor teor também pertenceu a um genótipo tolerante à seca, Senegal 57422.

A concentração da quercetina-3- β -glicosídeo variou de 0,82 a 1,33 mg/g, e esteve presente apenas nos extratos de películas de coloração vermelha.

O ácido protocatecuico se mostrou em maior e menor concentração nos extratos dos genótipos Tatu e LGoPE-06, respectivamente. Os outros dois genótipos que possuem a película vermelha (BR1 e M407.424B) também apresentaram concentrações mais elevadas desse composto, em comparação aos demais extratos. O mesmo comportamento ocorreu com o composto quercetina nos genótipos Tatu, M407.424B e BR1.

O canferol-3-glicosídeo foi detectado e quantificado nos extratos das películas vermelhas e em mais dois outros extratos, os dos genótipos Senegal 57422 e LViPE-06 de coloração bege.

Ficou evidente que o teor de determinados compostos fenólicos possui relação com a coloração da película. Chukwumah et al. (2009) concluíram que a coloração vermelha da película do amendoim está fortemente correlacionada com o teor total de polifenóis, mas não no teor total de flavonoides. Além disso,

determinaram que os extratos de coloração vermelha apresentaram forte correlação com a atividade antioxidante medida pelo sequestro do radical ABTS.

3.4 Conclusão

A composição fenólica e o sequestro de EROs dos extratos de quatorze genótipos de amendoins foram distintos entre cotilédones e películas, sendo que as películas foram as mais efetivas na atividade antioxidante e apresentaram o maior teor de compostos fenólicos. O conjunto de análises, entretanto, não permitiu diferenciar os genótipos tolerantes dos susceptíveis à seca, por isso não podem ser utilizados como indicadores de tolerância ao estresse hídrico. O extrato do cotilédone do BR1, genótipo conhecido por ampla tolerância a seca, se destacou no conteúdo fenólico e no melhor desempenho da atividade sequestrante de espécies reativas do oxigênio. Em relação às películas, os genótipos LViPE-06 e LGoPE-06 tiveram o menor conteúdo fenólico e menor desempenho na atividade antioxidante, sendo ambos genótipos susceptíveis ao estresse hídrico.

Referências

ANDRADE, T.J.A.S., ARAÚJO, B.Q.; CITÓ, A.M.G.L.; SILVA, J.; SAFFI, J.; RICHTER, M.F.; FERRAZ, A.B.F. Antioxidant properties and chemical composition of technical Cashew Nut Shell Liquid (tCNSL). **Food Chemistry**, v. 126, p. 1044-1048, 2011.

ANINBON, C.; JOGLOY, S.; VORASOOT, N.; PATANOTHAI, A.; NUCHADOMRONG, S.; SENAWONG, T. Effect of end of season water deficit on phenolic compounds in peanut genotypes with different levels of resistance to drought. **Food Chemistry**, v. 196, p. 123-129.

ATTREE, R.; DU, B.; XU, B. Distribution of phenolic compounds in seed coat and cotyledon, and their contribution to antioxidant capacities of red and black seed coat peanuts (*Arachis hypogaea* L.). **Industrial Crops and Products**, v. 67, p. 448-456, 2015.

AVILA-NAVA, A.; CALDORÓN-OLIVER, M.; MEDINA-CAMPOS, O.N.; ZOU, T.; GU, L.; TORRES, N.; TOVAR, A.R.; PEDRAZA-CHAVERRI, J. Extract of cactus (*Opuntia ficus indica*) caldodes scavenges reactive oxygen species *in vitro* and enhances plasma antioxidant capacity in humans. **Journal of Functional Foods**, v. 10, p. 13-24, 2014.

BERTO, A.; RIBEIRO, A.B.; SOUZA, N.E.; FERNANDES, E.; CHISTÉ, R.C. Bioactive compounds and scavenging capacity of pulp, peel and seed extracts of Amazonian fruit *Quararibea cardata* against ROS and RNS. **Food Research International**, v. 77, p. 236-243, 2015.

CHISTÉ, R.C.; FREITAS, M.; MERCADANTE, A.Z.; FERNANDES, E. The potential of extracts of *Caryocar villosum* pulp to scavenge reactive oxygen and nitrogen species. **Food Chemistry**, v. 135, p. 1740-1749, 2012.

CHISTÉ, R. C.; MERCADANTE, A. Z.; GOMES, A.; FERNANDES, E.; DA COSTA LIMA, J. L. F.; BRAGAGNOLO, N. In vitro scavenging capacity of annatto seed extracts against reactive oxygen and nitrogen species. **Food Chemistry**, v. 127, p. 419-426, 2011.

CHUKWUMAH, Y.; WALKER, L.T.; VERGHESE, M. Peanut skin color: a biomarker for total polyphenolic content and antioxidative capacities of peanut cultivars. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 10, p. 4941-4952, 2009.

CRUZ, C.D. GENES – a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. **Acta Scientiarum**, v. 35, p. 271-276, 2013.

FRANCISCO, L.; PINTO, D.; ROSSETO, H.; TOLEDO, L.; SANTOS, R.; TOBALDINI-VALÉRIO, F.; SVIDZINSKI, T.; BRUSCHI, M.; SARMENTO, B.; OLIVEIRA, M.B.P.P.; RODRIGUES, F. Evaluation of radical scavenging activity, intestinal cell viability and antifungal activity of Brazilian propolis by-products. **Food Research International**, v. 105, p. 537-547, 2018.

GOMES, A.; FERNANDES, E.; SILVA, A.M.S.; SANTOS, C.M.M.; PINTO, D.C.G.A.; CAVALEIRO, J.A.S.; LIMA, J.L. 2-Styrylchromones: Novel strong scavengers of reactive oxygen and nitrogen species. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 15, p. 6027–6036, 2007.

GÜLÇİN, I.; ELMASTAS, M.; ABOUL-ENEIS, H. Antioxidant activity of clove oil – A powerful antioxidant source. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 5, p. 489-499, 2012.

GUO, Y.-J.; SUN, L.-Q.; YU, B.-Y.; QI, J. An integrated antioxidant activity fingerprint for commercial teas based on their capacities to scavenge reactive oxygen species. **Food Chemistry**, v. 237, p. 645-653, 2017.

HARE, P.D.; CRESS, W.A.; STADEN, J.V. Dissecting the roles of osmolyte accumulation during stress. **Plant Cell Environment**, v. 21, p. 535-553, 1998.

INFANTE, J.; ROSALEN, P. L.; LAZARINI, J. G.; FRANCHIN, M.; DE ALENCAR, S. M. Antioxidant and anti-inflammatory activities of unexplored Brazilian native fruits. **PloS one**, v. 11, 2016.

LARRAURI, M.; ZUNINO, M.P.; ZYGADLO, J.A.; GROSSO, N.R.; NEPOTE, V. Chemical characterization and antioxidant properties of fractions separated from extract of peanut skin derived from different industrial processes. **Industrial Crops and Products**, v. 94, p. 964-971, 2016.

LEE, J.W.; MO, E.J.; CHOI, J.E.; JO, Y.H.; JANG, H.; JEONG, J.Y.; JIN, Q.; CHUNG, H.N.; HWANG, B.Y.; LEE, M.K. Effect of Korean Red Ginseng extraction conditions on antioxidant activity, extraction yield, and ginsenoside Rg1 and phenolic content: optimization using response surface methodology. **Journal of Ginseng Research**, v. 40, p. 229-236, 2016.

MAGALHÃES, L.M.; SANTOS, M.; SEGUNDO, M.A.; REIS, S.; LIMA, J.L.F.C. Flow injection based methods for fast screening of antioxidante capacity. **Talanta**, v. 77, p. 1559-1566, 2009.

MAHATMA, M.K.; THAWAIT, L.K.; BISHI, S.K.; KHATEDIYA, N.; RATHNAKUMAR, A.L.; LALWANI, H.B.; MISRA, J.B. Nutritional composition and antioxidant activity of Spanish and Virginia groundnuts (*Arachis hypogaea* L.): a comparative study. **Journal of Food Science and Technology**, v. 53, p. 2279-2286, 2016.

MARIUTTI, L.R.B.; RODRIGUES, E.; CHISTÉ, R.C.; FERNANDES, E.; MERCADANTE, A.Z. The Amazonian fruit *Byrsonima crassifolia* effectively scavenges reactive oxygen and nitrogen species and protects human erythrocytes against oxidative damage. **Food Research International**, v. 64, p. 618-625, 2014.

MELO, P.S.; MASSARIOLI, A.; DENNY, C.; DOS SANTOS, L.F.; FRANCHIN, M.; PEREIRA, G.E.; VIEIRA, T.M.F.S.; ROSALEN, P.L.; ALENCAR, S.M. Winery by-products: Extraction optimization, phenolic composition and cytotoxic evaluation to act as a new source of scavenging of reactive oxygen species. **Food Chemistry**, v. 181, p. 160-169, 2015.

NIPORNAM, S.; TOCHAMPA, W.; RATTANATRAIWONG, P.; SINGANUSONG, R. Optimization of low power ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from mandarin (*Citrus reticulata* Blanco cv. Sainampueng) peel. **Food Chemistry**, v. 241, p. 338-345, 2018.

PHAN-THIEN, K.Y.; WRIGHT, G.C.; TILLMAN, B.L.; LEE, N.A. Peanut antioxidants: Part 1. Genotypic variation and genotype-by-environment interaction in antioxidant capacity of raw kernels. **LWT-Food Science and Technology**, v. 57, p. 306-311, 2014.

PROCHÁZKOVÁ, D.; BOUŠOVÁ, I.; WILHELMOVÁ, N. Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. **Fitoterapia**, v. 82, p. 513-523, 2011.

RIBEIRO, A.B.; CHISTÉ, R.C.; FREITAS, M.; SILVA, A.F.; VISENTAINER, J.V.; FERNANDES, E. *Psidium cattleianum* fruit extracts are eficiente *in vitro* scavengers of physiologically relevant reactive oxygen and nitrogen species. **Food Chemistry**, v. 165, p. 140-148, 2014.

RODRIGUES, N.P.; BENASSI, M.T.; BRAGAGNOLO, N. Scavenging capacity of coffee brews against oxygen and nitrogen reactive species and the correlation with bioactive compounds by multivariate analysis. **Food Research International**, v. 61, p. 228-235, 2014.

SAMAKI, G.; SHENOY, R.P.; MANJUNATHA, S.M.; VINAYAK, K.S. Superoxide and hydroxyl radical scavenging actions of botanical extracts of *Wagatea spicata*. **Food Chemistry**, v. 115, p. 631-634, 2009.

SINGLETON, V.L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R.M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. **Methods in Enzymology**, v. 299, p. 152-178, 1999.

SUEISHI, Y.; SUE, M.; MASAMOTO, H. Seasonal variations of oxygen radical scavenging ability in rosemary leaf extract. **Food Chemistry**, v. 245, p. 270-274, 2018.

TREMOCOLDI, M. A.; ROSALEN, P. L.; FRANCHIN, M.; MASSARIOLI, A. P.; DENNY, C.; DAIUTO, É. R.; ... & DE ALENCAR, S. M. Exploration of avocado by-products as natural sources of bioactive compounds. **PloS one**, v. 13, 2018.

TULINI, F.L.; SOUZA, V.B.; THOMAZINI, M.; SILVA, M.P.; MASSARIOLI, A.P.; ALENCAR, S.M.; PALLONE, E.M.J.A.; GENOVESE, M.I.; FAVARO-TRINDADE, C.S. Evaluation of the release profile, stability and antioxidant activity of a proanthocyanidin-rich cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*) extract co-encapsulated with α -tocopherol by spray chilling. **Food Research International**, v. 95, p. 117-124, 2017.

VALADEZ-CARMONA, L.; ORTIZ-MORENO, A.; CEBALLOS-REYES, G.; MENDIOLA, J.A.; IBÁÑEZ, E. Valorization of cacao pod husk through supercritical fluid extraction of phenolic compounds. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 131, p. 99-105, 2018.

VARELA, M.C.; ARSLAN, I.; REGINATO, M.A.; CENZANO, A.M.; LUNA, M.V. Phenolic compounds as indicators of drought resistance in shrubs from Patagonian shrublands (Argentina). **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 104, p. 81-91, 2016.

YEN, W-J; CHANG, L-W; DUH, P-D. Antioxidant activity seed testa and its antioxidative component, ethyl protocathechuate. **LWT-Food Science and Technology**, v. 38 (3), p. 193-200, 2005.

4 ACESSIBILIDADE DE COMPOSTOS FENÓLICOS DO AMENDOIM PELO MÉTODO DE DIGESTÃO SIMULADA *IN VITRO*

Resumo

Este estudo teve como objetivo investigar as mudanças na composição fenólica e atividade antioxidante do amendoim, genótipo BR1, durante a digestão simulada *in vitro*. Os estudos sobre a acessibilidade dos compostos fenólicos em amendoim são raros, sendo esta a primeira vez em que se relata o comportamento do ácido *p*-cumárico e dos derivados do *p*-cumaroil nessa matriz durante a digestão simulada. Os resultados mostraram que o teor de compostos fenólicos totais aumentou após a digestão, enquanto que a atividade antioxidante na fase intestinal (96,52 $\mu\text{mol Trolox/g}$), avaliada pelo sequestro do radical peroxila, foi estatisticamente igual à do extrato (84,77 $\mu\text{mol Trolox/g}$). O ácido *p*-cumárico e os derivados do *p*-cumaroil foram identificados na amostra não digerida do amendoim e nas alíquotas de cada uma das fases da digestão simulada *in vitro*. A acessibilidade variou de 7 a 370% entre os 7 compostos fenólicos majoritários avaliados. O ácido *p*-cumárico foi um dos compostos majoritários identificados, sendo que o seu teor após a digestão (252,86 $\mu\text{g/g}$) foi maior quando comparado ao do extrato da amostra de amendoim não digerida (68,55 $\mu\text{g/g}$).

Palavras-chave: *Arachis hypogaea* L.; Digestão gastrointestinal; Metabólitos secundários; Ácido *p*-cumárico.

Abstract

This study investigated the changes in phenolic composition and antioxidant activity of the BR1 peanut genotype following *in vitro* simulated digestion. Studies on the accessibility of phenolic compounds found in peanuts are scarce in the literature. This is the first report on the behavior of *p*-coumaric acid and *p*-coumaroyl derivatives in such a matrix during simulated digestion. The results showed that the total phenolic content increased after digestion and that the antioxidant activity in the intestinal phase (96.52 $\mu\text{mol Trolox/g}$), determined by peroxyl radical scavenging, was not statistically different from that of the extract (84.77 $\mu\text{mol Trolox/g}$). The compounds *p*-coumaric acid and *p*-coumaroyl derivatives were identified in the extracts and aliquots from the digestion phases. The accessibility of the seven phenolic compounds ranged from 7% to 370%. *p*-coumaric acid was one of the major compounds identified, whose content after digestion (252.86 $\mu\text{g/g}$) was higher than that of the undigested peanut extract (68.55 $\mu\text{g/g}$).

Key-words: *Arachis hypogaea* L.; Gastrointestinal digestion; Secondary metabolites; *p*-coumaric acid.

4.1 Introdução

Os compostos fenólicos são metabólitos secundários de plantas cuja função está relacionada à defesa. Nos alimentos, possuem efeitos no amargor, adstringência, cor, *flavor*, odor e na estabilidade oxidativa (Pandey et al., 2009). Porém, é devido às atividades bioativas, tais como a antioxidante, anti-inflamatória e antimicrobiana, que esses compostos são extensivamente estudados.

Pertencente à família das leguminosas, o amendoim (*Arachis hypogaea* L.), além do seu alto valor nutritivo conferido pelo teor de proteínas e lipídeos, também é considerado fonte de compostos fenólicos, sendo que a maior concentração deles se localiza no tegumento, ou película (Bodoira et al., 2017).

A determinação da bioatividade de compostos em alimentos provenientes de uma extração e medida por métodos *in vitro* não é suficiente para predizer o real efeito *in vivo* desses compostos, sendo que os metabólitos que atingem a corrente sanguínea podem diferir das substâncias nativas em termos de atividade biológica. Assim, o real efeito ou a eficácia dos compostos designados bioativos podem ser assegurados pela determinação da biodisponibilidade dessas substâncias (Carbonell-Capella et al., 2014).

A biodisponibilidade é o termo usado para descrever a quantidade de um composto ingerido que atinge o sistema circulatório e desempenha sua função no organismo. Por sua vez, a biodisponibilidade depende da bioacessibilidade, que se refere à quantidade ou a fração do que é liberado da matriz alimentar no trato gastrointestinal para a absorção (Heaney, 2001; Manach et al., 2004)

Atualmente, a bioacessibilidade é comumente avaliada por meio da digestão *in vitro*. No presente estudo, porém, o termo utilizado para avaliar a fração digerida foi “acessibilidade”, como utilizado por Campoli et al. (2018), por não ter sido avaliada a influência da fermentação colônica, que ocorre pela ação de microrganismos da flora intestinal.

O ácido cumárico, um ácido hidroxicinâmico, possui três isômeros, ácido *o*-cumárico, ácido *m*-cumárico e ácido *p*-cumárico, sendo este último o isômero mais abundante na natureza (Cha et al., 2018). O amendoim é considerado fonte desse ácido hidroxicinâmico e assim, tal alimento pode contribuir com benefícios à saúde devido ao potencial antioxidante do ácido *p*-cumárico (Talcott et al., 2005).

Os efeitos benéficos da administração do ácido *p*-cumárico já foram descritos em alguns estudos que incluem, efeito hepatoprotetor e o seu potencial uso para

prevenção de doenças associadas à produção de EROs (Cha et al., 2018), potencial terapêutico no tratamento do diabetes tipo 2 (Abdel-Moneim et al., 2018), proteção contra doenças do coração (Prince & Roy, 2013) e atenuação de vias de sinalização relacionadas à angiogênese (Kong et al., 2013).

Apesar do grande número de trabalhos sobre a composição fenólica do amendoim bem como suas atividades biológicas, são escassos os que propõem avaliar o efeito da digestão sobre esses compostos, bem como os reflexos nas suas atividades biológicas. Assim sendo, o objetivo desse trabalho foi determinar a acessibilidade do ácido *p*-cumárico e derivados do *p*-cumaroil presentes no amendoim por meio do uso do método da digestão simulada *in vitro*.

4.2 Material e Métodos

4.2.1 Amostra

O genótipo de amendoim BR1, de ciclo precoce e larga adaptação a ambientes com restrição hídrica, foi transferido da Embrapa Algodão, Campina Grande-PB para o Laboratório de Bioquímica e Análise Instrumental pertencente ao Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição da ESALQ-USP, Piracicaba-SP. A amostra foi mantida sob refrigeração (8°C) até o momento das análises.

4.2.2 Preparo do extrato

O extrato fenólico, preparado para comparação com o resultado das alíquotas da digestão *in vitro*, foi obtido utilizando o amendoim com a película de acordo com o procedimento descrito por Regueiro et al. (2014), com modificações. O total de 0,5 g da amostra moída foi homogeneizado com 4 mL da solução de acetona/água (60/40 v/v) e levado à extração em banho de ultrassom durante 5 minutos. Na sequência, a mistura foi centrifugada a 4000 x g por 10 minutos/4°C, o sobrenadante coletado e o procedimento repetido por mais 2 vezes. Os sobrenadantes foram reunidos e armazenados à temperatura de -20°C até o momento das análises. O procedimento da extração foi realizado em triplicata.

4.2.3 Digestão gastrointestinal *in vitro*

A digestão gastrointestinal *in vitro* do amendoim consistiu em 3 fases: oral, gástrica e intestinal, utilizando os fluidos sintéticos salivar (SSF), gástrico (SGF) e

intestinal (SIF), respectivamente, preparados conforme descrito por Minekus et al. (2014). O método da digestão foi realizado de acordo com Rodrigues et al. (2016), com modificações.

Inicialmente, o amendoim com a película foi moído em moinho (IKA A11 basic) com nitrogênio líquido, a fim de evitar o aquecimento da amostra. Para a fase oral, 5 g da amostra em tubos tipo falcon de 50 mL foram misturados com 5 mL do SSF contendo 0,325 g/L de α -amilase. A mistura foi incubada a 37°C em banho termostatzado durante 2 minutos, com agitação de 100 rpm, e transferida para o banho de gelo a fim de cessar a reação. Na sequência, foram adicionados 10 mL do SGF contendo 26,4 g/L de pepsina, o pH ajustado para 3,0 utilizando HCl 1 M, e a mistura foi incubada a 37°C durante 2 horas, com agitação de 100 rpm. Após esse tempo, os tubos foram colocados em banho de gelo para cessar a reação. Para a fase intestinal, 20 mL do SIF contendo 20,0 g/L de pancreatina e 11,25 g/L de sais de bile foram adicionados à mistura e o pH foi ajustado para 7,0 com NaOH 1 M. Finalmente, a mistura foi incubada a 37°C durante 2 horas, com agitação a 100 rpm. Para cada uma das fases, dois controles foram submetidos às mesmas condições, sendo um controle contendo a amostra com os fluidos digestivos sem as enzimas e o outro contendo apenas os fluidos digestivos com as enzimas. Imediatamente ao término da incubação de cada uma das fases (oral, gástrica e intestinal), os tubos das misturas foram centrifugados a 10000 x g por 5 minutos/4°C e os sobrenadantes (fração acessível) foram recolhidos e armazenados à -20°C até o momento das análises. O procedimento da digestão para as 3 fases foi realizado em triplicata.

A acessibilidade *in vitro* (%) foi calculada de acordo com a equação 4, em que a concentração de cada composto na fração acessível é dividida pela concentração no extrato da amostra não digerida.

$$\text{Acessibilidade } in vitro (\%) = \frac{C_{\text{fração acessível}}}{C_{\text{extrato amostra não digerida}}} \times 100 \quad (4)$$

4.2.4 Compostos fenólicos totais

O teor de compostos fenólicos totais foi determinado de acordo com Melo et al. (2015), com base nos conceitos de Singleton et al. (1999). O total de 20 μ L de extrato e alíquotas das fases da digestão, devidamente diluídas, ou padrão,

juntamente com 100 µL da solução de Folin-Ciocalteu 10%, foram adicionados em poços de microplacas de 96 poços. Decorridos 5 minutos foram acrescentados 75 µL de solução de Na₂CO₃ 7,5% em água. Após agitação e decorrido o tempo de 40 minutos, as leituras das absorbâncias foram realizadas em leitor de microplacas (SpectraMax M3, Molecular Devices, LLC, Sunnyvale, CA, USA) à 740nm. A curva de calibração foi construída utilizando como padrão o ácido gálico e os resultados foram expressos em equivalentes ao ácido gálico (mg AG/g amostra).

4.2.5 Sequestro do radical peroxila (ROO[•])

O sequestro do radical peroxila foi analisado conforme descrito por Melo et al. (2015). O total de 30 µL de extrato e alíquotas das fases da digestão, padrão ou controle (tampão fosfato 75 mM, pH 7,4) foram adicionados nos poços da microplaca opaca e preta, de 96 poços. Na sequência foi adicionada a alíquota de 60 µL da solução de fluoresceína 508 nM, preparada em tampão fosfato de potássio e, por último, foi adicionado o volume de 110 µL da solução de AAPH 76 mM, também preparada utilizando o mesmo tampão fosfato de potássio. A reação foi incubada a 37°C e as leituras da fluorescência foram realizadas a cada minuto durante 120 minutos, em leitor de microplacas com Ex./Em. de 485 nm/528 nm. A curva de calibração foi construída utilizando como padrão o Trolox e os resultados foram expressos em equivalentes ao padrão Trolox (µmol Trolox/g amostra).

4.2.6 Quantificação de compostos fenólicos por cromatografia líquida de alta eficiência (LC-DAD)

A quantificação dos compostos fenólicos do extrato e das alíquotas das fases da digestão foi realizada utilizando o cromatógrafo líquido de alta eficiência (SCL-10AVp, Shimadzu, Japan) acoplado ao detector de arranjo de diodos (DAD) (SPD-M 10AVp, Shimadzu, Japan). O volume de 30 µL de cada um dos extratos e alíquotas da digestão, previamente diluídos e filtrados (Millex PTFE e PVDF 0,22µm de poro), foi injetado em coluna de fase reversa C18 (250 x 4,6 mm x 5,0 µm; Agilent). A fase móvel consistiu em Fase A (água/ácido fórmico 99,75/0,25 v/v) e Fase B (acetonitrila/água/ácido fórmico 80/19,75/0,25 v/v/v) cujo gradiente de separação iniciou com 10% da fase B aumentando para 20% em 10 minutos; 30% em 20 minutos; 50% em 30 minutos e diminuindo para 10% em 38 minutos. O fluxo foi de 1

mL/min e a coluna foi mantida a 30°C durante toda a corrida. Os cromatogramas foram analisados no software Class-VP e os compostos majoritários foram analisados no comprimento de onda de 310 nm (absorção máxima do ácido *p*-cumárico). Os resultados foram expressos em equivalentes ao ácido *p*-cumárico (μg ácido *p*-cumárico/g amostra).

4.2.7 Caracterização fenólica por espectrometria de massas de alta resolução (LC-ESI-QTOF-MS)

As análises foram conduzidas em sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, Shimadzu) equipado com bombas LC-30AD, autoinjeter SIL-30AC, forno CTO-20A e controlador CBM-20A. A separação cromatográfica ocorreu em coluna Phenomenex Luna C18 (4,6 x 250 mm x 5 μm). A fase móvel consistiu em Fase A (água:ácido Fórmico 99,75:0,25 v/v) e Fase B (acetonitrila:água:ácido fórmico 80:19,75:0,25 v/v/v) cujo gradiente de separação iniciou com 10% da fase B aumentando para 20% em 10 minutos; 30% em 20 minutos; 50% em 30 minutos e diminuindo para 10% em 38 minutos. O fluxo foi de 1 mL/min e a coluna foi mantida a 30°C durante toda a corrida.

A análise de alta resolução ocorreu em espectrômetro de massas q-TOF MAXIS 3G – Bruker Daltonics (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) equipado com uma fonte de ionização por eletronebulização, em modo negativo (ESI-), nas seguintes condições: intervalo de m/z 100-2000; resolução 30.000; voltagem da fonte de 4,5 KV, respectivamente; gás secante a 8L/min e o gás nebulização na pressão de 29 psi e temperatura do capilar em 200°C. A identificação dos compostos fenólicos foi realizada no software Bruker Compass DataAnalysis 4.3 por comparação das massas exatas e dos espectros de massas MS/MS disponíveis na literatura.

4.2.8 Análise estatística

Os dados foram expressos por meio da média ($n=3$) $\pm$ desvio padrão pela análise da variância simples (ANOVA). Para a comparação entre as médias, foi aplicado o teste de Tukey a 5% de probabilidade utilizando o *software* SAS (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

4.3 Resultados e Discussão

O teor total de compostos fenólicos foi diferente na amostra não digerida e nas frações após a digestão ($p < 0,05$). Como apresentado na Figura 15, houve um aumento (aproximadamente 94%) do teor total de compostos fenólicos na fase intestinal (4.030,18 $\mu\text{g AG/g}$) comparado ao teor encontrado no extrato da amostra não digerida (2.074,06 $\mu\text{g AG/g}$). Esse comportamento também foi observado por Huang et al. (2017), no estudo da bioacessibilidade de compostos fenólicos em sementes de *Prinsepia utilis* Royle, no qual observou-se um aumento de 30% no teor de compostos fenólicos na fase intestinal, comparado ao teor da amostra não digerida.

Chandrasekara e Shahidi (2012) observaram que o teor de compostos fenólicos também aumentou para os grãos de milhete (milho-miúdo) na fase intestinal comparada ao extrato da amostra não digerida, chegando a ser aproximadamente 14 vezes maior para uma determinada cultivar. Na fase gástrica, os mesmos autores observaram um aumento que variou de 2 a 3 vezes o valor correspondente ao extrato da amostra não digerida. No presente estudo, o aumento observado na fase gástrica em relação à amostra não digerida foi de 151,04 $\mu\text{g AG/g}$, aproximadamente 7,5%. Apenas na fase oral o teor de compostos fenólicos foi menor (1.073,32 $\mu\text{g AG/g}$) quando comparado com o extrato da amostra não digerida.

Figura 15 - Teor total de compostos fenólicos dos extratos, antes e após a digestão simulada *in vitro* das sementes de amendoim (genótipo BR1).

É possível sugerir que o aumento no teor de compostos fenólicos a partir da fase gástrica é a liberação desses compostos que estariam ligados a proteínas (Chandrasekara e Shahidi, 2012). Além disso, o reagente Folin-Ciocalteu possui reatividade com outras substâncias não fenólicas (Everette et al., 2010), o que poderia aumentar o resultado do teor total de compostos fenólicos no decorrer das fases da digestão.

A atividade antioxidante avaliada pelo método do sequestro do ROO[•] da amostra de amendoim antes e após a digestão variou de 31,77 a 96,52 $\mu\text{mol Trolox/g}$. O menor e o maior valor pertenceram às alíquotas das fases oral e intestinal, respectivamente, porém o valor da atividade antioxidante na fase intestinal não diferiu estatisticamente da fase gástrica (81,79 $\mu\text{mol Trolox/g}$) e do extrato da amostra de amendoim antes da digestão (84,77 $\mu\text{mol Trolox/g}$) (Figura 16), ou seja, a atividade antioxidante do amendoim se conservou após a digestão.

Figura 16 - Atividade antioxidante (ORAC) dos extratos, antes e após a digestão simulada *in vitro* das sementes de amendoim (genótipo BR1).

Comportamentos distintos da atividade antioxidante (método ORAC) foram observados por Jara-Palacios et al. (2018) em resíduos de uva. O valor da atividade antioxidante aumentou significativamente nas fases da digestão (gástrica e intestinal) para os extratos de semente e haste, enquanto que para os extratos do bagaço e casca a atividade antioxidante diminuiu após a digestão, em comparação com o extrato da amostra não digerida. Já no estudo com várias cultivares de

milhete, todas as alíquotas da fase intestinal apresentaram aumento significativo no valor ORAC, comparado com a fase gástrica e extrato aquoso da amostra não digerida (Chandrasekara e Shahidi, 2012).

Dentre os sete compostos majoritários na amostra não digerida do amendoim e nas alíquotas de cada uma das fases da digestão simulada *in vitro* (Figura 17), seis foram identificados pela técnica LC-ESI-QTOF-MS, sendo eles o ácido *p*-cumárico e os derivados do *p*-cumaroil (ácido *p*-cumaroil-tartárico, ácido di-*p*-cumaroil-tartárico, ácido *p*-cumaroil-sinapoil-tartárico e ácido *p*-cumaroil-feruloil-tartárico) (Tabela 24).

Os picos 1 e 2 foram tentativamente identificados como isômeros do ácido *p*-cumaroil-tartárico, porém não foram especificados os isômeros *cis*- e *trans*-. A separação cromatográfica de extratos de folhas de amendoim do estudo que utilizou condições parecidas às do presente trabalho mostrou que o isômero *trans*- teve o tempo de retenção menor (7,5 min.) comparado ao isômero *cis*- (8,0 min), além disso, o primeiro isômero apresentou área maior comparada à do segundo isômero (Sullivan, 2014).

O pico 3 foi identificado como ácido *p*-cumárico, cuja identidade foi confirmada com o padrão analítico autêntico.

O pico 4 não foi identificado, porém, de acordo com seus fragmentos de massa (Tabela 24), fica evidente que é um composto derivado do *p*-cumaroil, assim como os compostos referentes aos picos 5, 6 e 7, que foram identificados por tentativa como sendo o ácido di-*p*-cumaroil-tartárico, ácido *p*-cumaroil-sinapoil-tartárico e ácido *p*-cumaroil-feruloil-tartárico, respectivamente (Tabela 24).

Os sete compostos majoritários, inclusive o ácido *p*-cumárico, foram detectados em todas as fases da digestão simulada *in vitro* e no extrato. A Tabela 24 também apresenta a quantificação de cada um dos compostos majoritários detectados, em equivalentes ao ácido *p*-cumárico.

Figura 17 - Cromatogramas obtidos por LC-DAD dos compostos majoritários detectados à 310 nm e identificados pela técnica de LC-ESI-QTOF-MS dos extratos, antes e após a digestão simulada *in vitro* do amendoim: (1) isômero do ácido *p*-cumaroil tartárico, (2) isômero do ácido *p*-cumaroil tartárico, (3) ácido *p*-cumárico, (4) não identificado, (5) ácido di-*p*-cumaroil-tartárico, (6) ácido *p*-cumaroil-sinapoil-tartárico e (7) ácido *p*-cumaroil-feruloil-tartárico.

Tabela 24 - Identificação por tentativa por LC-ESI-QTOF-MS e quantificação por LC-DAD dos compostos fenólicos majoritários do extrato do amendoim não digerido e nas alíquotas após a digestão simulada *in vitro*.

Pico	Composto	TR (min)	[M-H] ⁻ m/z	Fragmentos do [M-H] ⁻ m/z	Concentração (µg eq. ác. <i>p</i> -cumárico/g amostra)**			
					Extrato	Oral	Gástrica	Intestinal
1	Ácido <i>p</i> -cumaroil-tartárico (isômero)	13,2	295,0494	163,0416 [<i>p</i> -cumárico-H] ⁻ 119,0510 [<i>p</i> -cumárico-H-CO ₂] ⁻ 149,0109 [tartárico-H] ⁻	681,42±47,06 ^a	253,44±12,97 ^c	348,14±17,86 ^b	757,51±41,41 ^a
2	Ácido <i>p</i> -cumaroil-tartárico (isômero)	16,5	295,0482	163,0415 [<i>p</i> -cumárico-H] ⁻ 119,0514 [<i>p</i> -cumárico-H-CO ₂] ⁻ 149,0109 [tartárico-H] ⁻	150,21±7,27 ^a	15,91±0,89 ^d	50,63±6,76 ^c	115,50±4,72 ^b
3	Ácido <i>p</i> -cumárico	19,4	163,0403	119,0511 [tartárico-H] ⁻	68,55±5,84 ^b	230,47±10,66 ^a	42,16±7,42 ^c	252,86±12,48 ^a
4	n.i.*	18,8	603,1395	457,1015 [M-H- <i>p</i> -cumaroil] ⁻ 119,0513 [<i>p</i> -cumárico-H-CO ₂] ⁻ 163,0414 [<i>p</i> -cumárico-H] ⁻	67,97±5,57 ^a	7,89±1,19 ^c	19,76±1,89 ^b	71,21±2,03 ^a
5	Ácido di- <i>p</i> -cumaroil-tartárico	29,3	441,0861	295,0482 [<i>p</i> -cumaroil-tartárico-H] ⁻ 277,0373 [M-H- <i>p</i> -cumaroil-H ₂ O] ⁻ 163,0413 [<i>p</i> -cumárico-H] ⁻ 119,0512 [<i>p</i> -cumárico-H-CO ₂] ⁻	362,96±24,96 ^a	3,49±0,61 ^d	20,07±2,90 ^c	108,83±2,55 ^b
6	Ácido <i>p</i> -cumaroil-sinapoil-tartárico	29,7	501,1071	277,0375 [M-H-sinapoil-H ₂ O-H] ⁻ 337,0588 [M-H- <i>p</i> -cumaroil-H ₂ O] ⁻ 203,0360 [M-H-sinapoil-H ₂ O-74-(C ₂ H ₂ O ₃)] ⁻ 149,0254 [tartárico-H] ⁻ 223,0633 [sinápico-H] ⁻	66,99±5,54 ^a	1,75±0,18 ^c	6,11±0,47 ^c	17,34±0,24 ^b
7	Ácido <i>p</i> -cumaroil-feruloil-tartárico	30,1	471,0970	277,0373 [M-H-feruloil-H ₂ O-H] ⁻ 203,0366 [M-H-feruloil-H ₂ O-74-(C ₂ H ₂ O ₃)] ⁻ 307,0489 [M-H- <i>p</i> -cumaroil-H ₂ O] ⁻ 119,0510 [<i>p</i> -cumárico-H-CO ₂] ⁻ 193,0539 [ferulico-H] ⁻	35,30±6,92 ^a	0,76±0,12 ^b	2,87±0,26 ^b	2,33±0,94 ^b

*n.i.=não identificado;

***Média±desvio padrão, *n*=3. Valores seguidos por letras diferentes na mesma linha são significativamente diferentes (*p*<0,05).

De modo geral, assim como observado nas análises do teor total de compostos fenólicos e na atividade antioxidante medida pelo método ORAC, o ácido *p*-cumárico e os derivados do *p*-cumaroil no extrato e nas alíquotas das fases da digestão tiveram aumento da fase gástrica para a fase intestinal, exceto para o ácido *p*-cumaroil-feruloil-tartárico, em que não houve diferença estatística da fase gástrica (2,87 µg/g) comparada à fase intestinal (2,33 µg/g)

A concentração de todos os compostos majoritários no extrato obtido da amostra não digerida variou de 35,30 a 681,42 µg/g amostra. Para o primeiro isômero do ácido *p*-cumaroil-tartárico e o composto referente ao pico 4, não houve diferença estatística nas concentrações da amostra não digerida e na alíquota da fase intestinal sendo que a acessibilidade para esses compostos foi maior que 100% (Figura 18).

Figura 18 - Acessibilidade (%) dos ácidos fenólicos no amendoim, genótipo BR1. n.i = não identificado.

Em relação aos compostos referentes aos picos 2, 5, 6 e 7, os teores foram maiores na amostra não digerida comparados aos da fase intestinal. As concentrações do composto 2 no extrato/fase intestinal foram de 150,21/115,50 µg/g; do composto 5 foram de 362,96/108,83 µg/g; do composto 6 foram de 66,99/17,34 µg/g e do composto 7 foram de 35,30/2,33 µg/g. Com base nesses valores, a acessibilidade dos referidos compostos foi de aproximadamente 77, 30, 26 e 7%, respectivamente (Figura 18). De acordo com Zhang et al. (2017), para alguns ácidos fenólicos a baixa concentração encontrada na fase intestinal, comparada ao extrato da amostra não digerida, é devido a ocorrência de degradação pela ação da pancreatina e sais de bile.

O ácido *p*-cumárico, diferente dos demais compostos, se mostrou em maior concentração na alíquota da fase intestinal (252,86 µg/g), comparada ao extrato (68,55 µg/g) e, portanto, a acessibilidade *in vitro* para esse composto atingiu 370% (Figura 18). A maior concentração encontrada para esse ácido fenólico na fase intestinal pode estar associada à liberação desse composto a partir de estruturas mais complexas presentes na matriz do amendoim, como observado para o ácido elágico no extrato de romã (Mosele et al., 2015). Por outro lado e, de acordo com Jara-Palacios et al. (2018), alguns compostos fenólicos podem ser altamente estáveis o que indicaria alta bioacessibilidade e um alto potencial à biodisponibilidade.

Os ácidos hidroxicinâmicos, grupo do qual pertence o ácido *p*-cumárico, são absorvidos do trato gastrointestinal para a corrente sanguínea na forma de conjugados glucoronídeos e de sulfatos (Nardini et al., 2009). Os benefícios do ácido *p*-cumárico têm sido comprovados e estes incluem atividade contra radicais livres (Rice-Evans, 1996), atividade antitumoral (Bouzaiene et al., 2015), potencial terapêutico no tratamento do diabetes tipo 2 (Abdel-Moneim et al., 2018), entre outros.

Li et al. (2017) mostraram que os flavonoides que continham a fração *p*-cumaroil em suas estruturas exibiram atividade antioxidante e atividade citoprotetora superiores às daquelas dos compostos que não continham tal fração na estrutura química.

Dessa forma, o amendoim pode ser considerado um alimento funcional com base em sua composição em ácidos fenólicos, cuja alta acessibilidade, em sua

maioria, pode também estar relacionada à alta biodisponibilidade, crucial para o desempenho, de fato, de suas propriedades biológicas no organismo.

4.4 Conclusão

A digestão simulada *in vitro* proporcionou o aumento do conteúdo total de compostos fenólicos do amendoim, genótipo BR1, e manteve o potencial do sequestro do radical peroxila na alíquota da fase intestinal. Todos os 7 compostos majoritários presentes no extrato, que compreenderam o ácido *p*-cumárico e derivados do *p*-cumaroil, foram detectados após a digestão simulada, sendo então considerados acessíveis para absorção.

Referências

ABDEL-MONEIM, A.; EL-TWAB, S.M.A.; YOUSEF, A.I.; REHEIM, E.S.A.; ASHOUR, M.B. Modulation of hyperglycemia and dyslipidemia in experimental type 2 diabetes by gallic acid and *p*-coumaric acid: The role of adipocytokines and PPAR γ . **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 105, p. 1091-1097, 2018.

BODOIRA, R.; ROSSI, Y.; MONTENEGRO, M.; MAESTRI, D.; VELEZ, A. Extraction of antioxidant polyphenolic compounds from peanut skin using water-ethanol at high pressure and temperature conditions. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 128, p. 57-65, 2017.

BOUZAIENE, S.K.; KAVACIC, J.H.; CHEKIR-GHEDIRA, L.; GHEDIRA, K.; LUIS, J. The effects of caffeic, coumaric and ferulic acids on proliferation, superoxide production, adhesion and migration of human tumor cells *in vitro*. **European Journal of Pharmacology**, v. 766, p. 99-105, 2015.

CAMPOLI, S.S.; ROJAS, M.L.; AMARAL, J.E.P.G.; CANIATTI-BRAZACA, S.G.; AUGUSTO, P.E.D. Ultrasound processing of guava juice: Effect on structure, physical properties and lycopene *in vitro* accessibility. **Food Chemistry**, v. 268, p. 594-601, 2018.

CARBONELL-CAPELLA, J.M.; BUNIOWSKA, M.; BARBA, F.J.; ESTEVE, M.J.; FRÍGOLA, A. Analytical Methods for Determining Bioavailability and Bioaccessibility of Bioactive Compounds from Fruits and Vegetables: A Review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 13, p. 155-171, 2014.

CHA, H.; LEE, S.; LEE, J.H.; PARK, J.W. Protective effects of p-coumaric acid against acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice. **Food and Chemical Toxicology**, v. 121, p. 131-139, 2018.

CHANDRASEKARA, A.; SHAHIDI, F. Bioaccessibility and antioxidant potential of millet grain phenolics as affected by simulated in vitro digestion and microbial fermentation. **Journal of Functional Foods**, v. 4, p. 226-237, 2012.

EVERETE, J.D.; BRYANT, Q.M.; GREEN, A.M.; ABBEY, Y.A.; WANGILA, G.W.; WALKER, R.B. Thorough Study of Reactivity of Various Compound Classes toward the Folin–Ciocalteu Reagent. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 8139-8144, 2010.

HEANEY, R.P. Factors influencing the measurement of bioavailability, taking calcium as a model. **The Journal of Nutrition**, v. 131, p. 1344S-1348S, 2001.

HUANG, S.; MA, Y.; ZHANG, C.; CAI, S.; PANG, M. Bioaccessibility and antioxidant activity of phenolics in native and fermented *Prinsepia utilis* Royle seed during a simulated gastrointestinal digestion in vitro. **Journal of Functional Foods**, v. 37, p. 354-362, 2017.

JARA-PALACIOS, M.J.; GONÇALVES, S.; HERNANZ, D.; HEREDIA, F.J.; ROMANO, A.. Effects of *in vitro* gastrointestinal digestion on phenolic compounds and antioxidant activity of different white winemaking byproducts extracts. **Food Research International**, v. 109, p. 433-439, 2018.

KONG, C.S.; JEONG, C..H.; CHOI, J.S.; KIM, K.J.; JEONG, J.W. Antiangiogenic effects of p-coumaric acid in human endothelial cells. **Phytotherapy Research**, v. 27, p. 317-323, 2013.

LI, X.; TIAN, Y.; WANG, T.; LIN, Q.; FENG, X.; JIANG, Q.; LIU, Y. CHEN, D. Role of the *p*-coumaroyl moiety in the antioxidant and cytoprotective effects of flavonoid glycosides: comparison of astragalin and tiliroside. **Molecules**, v. 22, p. 1-11, 2017.

MANACH, C.; SCALBERT, A.; MORAND, C.; RÉMÉSY, C.; JIMÉNEZ, L. Polyphenols: food sources and bioavailability. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 79, p. 727-747, 2004.

MELO, P.S.; MASSARIOLI, A.; DENNY, C.; DOS SANTOS, L.F.; FRANCHIN, M.; PEREIRA, G.E.; VIEIRA, T.M.F.S.; ROSALEN, P.L.; ALENCAR, S.M. Winery by-products: Extraction optimization, phenolic composition and cytotoxic evaluation to act as a new source of scavenging of reactive oxygen species. **Food Chemistry**, v. 181, p. 160-169, 2015.

MINEKUS, M.; ALMINGER, M.; ALVITO, P.; BALLANCE, S.; BOHN, T.; BOURLIEU, C.; CARRIÈRE, F. et al. A standardised static *in vitro* digestion method suitable for food – an international consensus. **Food & Function**, v. 5, p. 1113-1124, 2014.

MOSELE, J.I.; MACIA, A.; ROMERO, M-P.; MOTILVA, M-J.; RUBIÓ, L. Application of *in vitro* gastrointestinal digestion and colonic fermentation models to pomegranate products (juice, pulp and peel extract) to study the stability and catabolism of phenolic compounds. **Journal of Functional Foods**, v. 14, p. 529-540, 2015.

NARDINI, M.; FORTE, M.; VRHOVSEK, U.; MATTIVI, F.; VIOLA, R.; SCACCINI, C. White wine phenolics are absorbed and extensively metabolized in humans. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 2711-2718, 2009.

PANDEY, K.B.; RIZVI, S.I. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2, p. 270-278, 2009.

PRINCE, P.S.M.; ROY, A.J. *p*-Coumaric acid attenuates apoptosis in isoproterenol-induced myocardial infarcted rats by inhibiting oxidative stress. **International Journal of Cardiology**, v. 168, p. 3259-3266, 2013.

REGUEIRO, J.; Sánchez-González, C.; Vallverdú-Queralt, A.; Simál-Gándara, J.; Lamuela-Raventós, R.; Izquierdo-Pulido, M. Comprehensive identification of walnut polyphenols by liquid chromatography coupled to linear ion trap–Orbitrap mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 152, p. 340-348, 2014.

RICE-EVANS, C.A.; MILLER, N.J.; PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 20, p. 933-956, 1996.

RODRIGUES, D.B.R.; MARIUTTI, L.R.B.; MERCADANTE, A.Z. Na *in vitro* digestion method adapted for carotenoids and carotenoid esters: moving forward towards standardization. **Food & Function**, v. 7, p. 4992-5001, 2016

SINGLETON, V.L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R.M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. **Methods in Enzymology**, v. 299, p. 152-178, 1999.

SULIVAN, M.L. Perennial peanut (*Arachis glabrata* Benth.) leaves contain hydroxycinnamoyl-CoA:tartaric acid hydroxycinnamoyl transferase activity and accumulate hydroxycinnamoyl-tartaric acid esters. **Planta**, v. 239, p. 1091-1100, 2014.

TALCOTT, S.T.; PASSERETTI, S.; DUNCAN, C.E.; GORBET, D.W. Polyphenolic content and sensory properties of normal and high oleic acid peanuts. **Food Chemistry**, v. 90, p. 379-388, 2005.

ZHANG, B.; DENG, Z.; TANG, Y.; CHEN, P.X.; LIU, R.; RAMDATH, D.D.; LIU, Q.; HERNANDEZ, M.; TSAO, R. Bioaccessibility, *in vitro* antioxidant and anti-inflammatory activities of phenolics in cooked green lentil (*Lens culinaris*). **Journal of Functional Foods**, v. 32, p. 248-255, 2017.

CONCLUSÕES/CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante do grande número de trabalhos sobre extração de compostos fenólicos de diferentes matrizes, com variadas combinações de condições de extração, a metodologia de superfície de resposta foi uma ferramenta importante para o estabelecimento das melhores condições de extração de compostos fenólicos de duas diferentes partes do amendoim, cotilédones e películas.

Quanto à determinação do teor de compostos fenólicos e sequestro de ERO's, as películas apresentaram desempenho superior ao dos cotilédones, sendo sua composição fenólica majoritária de procianidinas tipo A.

O cotilédone do genótipo BR1, de tolerância ao estresse hídrico, apresentou maior teor de compostos fenólicos e melhor desempenho no sequestro de 3 espécies reativas (radical superóxido, radical peroxila e peróxido de hidrogênio) em relação aos demais extratos de cotilédones. Os extratos das películas dos genótipos LViPE-06 e LGoPE-06, susceptíveis ao estresse hídrico, apresentaram o menor conteúdo de compostos fenólicos totais e menor desempenho no sequestro das espécies reativas do oxigênio.

O estudo da acessibilidade de compostos fenólicos do amendoim, genótipo BR1, revelou que a grande parte de seus componentes majoritários são acessíveis após o processo de digestão *in vitro* simulada.

O presente estudo trouxe novas informações sobre a bioatividade de alguns genótipos de amendoim que ainda não haviam sido estudados no contexto abordado neste estudo. Os dados obtidos corroboram com os dados da literatura, nos quais definem o amendoim como um alimento funcional, que possui, além das suas propriedades nutricionais básicas, compostos fenólicos que atuam positivamente no organismo e produzem efeitos no metabolismo e nos processos fisiológicos, beneficiando a saúde. Isto é um estímulo para aumentar o consumo usual dessa oleaginosa.

5 PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA AMBIENTAL NA PESQUISA – ESALQ/USP

O presente projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética Ambiental na Pesquisa (CEAP) – ESALQ/USP conforme os princípios éticos ambientais adotados das leis e decretos complementares (APÊNDICE A).

APÊNDICES**Apêndice A**1506
BVS**COMISSÃO DE ÉTICA AMBIENTAL NA PESQUISA – ESALQ/USP****PARECER**

Declaro que o Projeto Intitulado: "Prospecção química e sua relação na desativação de espécies reativas do oxigênio e nitrogênio de cultivares de amendoim adaptadas e ambientes semiáridos", de responsabilidade do Prof. Severino Matias de Alencar (LAN), está de acordo com os Princípios éticos ambientais adotados das leis e decretos complementares (Lei 6.894/80, Lei 7.803/89, Lei 9.985/00, Lei 9.974/00, Decreto 99.556/90, Decreto 4.340/02, Instrução Normativa 169/2008, ABNT/NBR 10004:2004, Resolução ANVISA RDC 306/2004, Resolução 358/05) acrescida dos dispositivos e alterações, bem como os demais decretos e instruções normativas relativas aos assuntos ambientais pertinentes.

Piracicaba, 23 de setembro de 2015.

Prof. Dr. Claudio Lima de Aguiar
Presidente – CEAP
ESALQ/USP

Este parecer exclui demais aspectos éticos que envolvam a utilização de animais de laboratório ou seres humanos, os quais são de competência das Comissões de Ética em Pesquisa com Animais e de Seres Humanos, respectivamente.