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

**Potencial antioxidante e composição química de genótipos de amendoim
adaptados ao ambiente semiárido**

Fernanda Francetto Juliano

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

**Piracicaba
2017**

Fernanda Francetto Juliano
Bacharela em Ciências dos Alimentos

**Potencial antioxidante e composição química de genótipos de amendoim adaptados
ao ambiente semiárido**

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:
Prof. Dr. **SEVERINO MATIAS DE ALENCAR**
Co-orientadora:
Profª. Dra. **LIZIANE MARIA DE LIMA**

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

Piracicaba
2017

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

Juliano, Fernanda Francetto

Potencial antioxidante e composição química de genótipos de amendoim adaptados ao ambiente semiárido / Fernanda Francetto Juliano.
- - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - -
Piracicaba, 2017.

105 p.

Dissertação (Mestrado) - - USP / Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”.

1. Espécies reativas de oxigênio 2. Compostos bioativos 3. Estresse hídrico 4. Espectrometria de massas de alta resolução 5. *Arachis hypogaea*
L. I. Título

À minha família, pelo apoio e confiança.

AGRADECIMENTOS

À Deus pela saúde e força para superar as dificuldades.

Aos meus pais Edison e Marlene e à minha irmã, Gabriela, família querida que nunca deixou de acreditar em mim, sempre me apoiou e nunca mediu esforços para me ajudar.

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” em especial ao Departamento de Agroindústria Alimentos e Nutrição, pela oportunidade da realização deste trabalho e por me acolherem durante esse período.

Ao meu orientador Prof. Dr. Severino Matias de Alencar pela confiança depositada em mim, pela experiência, ensinamentos e oportunidades oferecidas, que me permitiram evoluir profissionalmente.

À minha co-orientadora Dra. Liziane Maria de Lima e à pesquisadora Dra. Roseane Cavalcanti dos Santos por todo o apoio oferecido e conhecimento compartilhado.

À professora Rosa Maria Lameula-Raventos, pela oportunidade concedida e por todos os conhecimentos e experiências que tive durante minha estadia na Universidade de Barcelona.

Aos meus amigos do laboratório de bioquímica e análise instrumental, especialmente à Adna, com quem compartilhei todas as descobertas e dificuldades e quem sempre me ajudou; à Camila, Jackeline e Anna, parceiras de trabalho e amigas, com as quais compartilhei conquistas, angústias e alegrias e à Ivani, Luciano e Heloísa que sempre me ajudaram e incentivaram.

À todos os professores do Departamento de Agroindústria Alimentos e Nutrição.

Aos meus colegas de trabalho e amigos do Campus de Torribera e Farmácia da Universidade de Barcelona, pessoas com as quais compartilhei experiências e alegrias que levarei para o resto da vida. Em especial ao José Fernando, por todos os ensinamentos compartilhados.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pela concessão de bolsa e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo auxílio financeiro.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão das bolsas e auxílio financeiro (nº 2015/02986-6, nº 2016/16193-0 e nº 2016/06514-4).

Ao Felipe, pela paciência, apoio e companheirismo em todos os momentos.

À todos os meus amigos, pela amizade, apoio e pelos momentos de alegrias vividos.

Aos meus avós, tios e primos, por toda a confiança e incentivo.

E a todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

MUITO OBRIGADA!

EPIÍGRAFE

“A alegria está na luta, na tentativa, no sofrimento envolvido e não na vitória propriamente dita”.

Mahatma Gandhi

SUMÁRIO

RESUMO	8
ABSTRACT	9
LISTA DE FIGURAS.....	10
LISTA DE TABELAS.....	12
1. INTRODUÇÃO	15
1.1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
1.1.1. IMPORTÂNCIA ECONÔMICA DO AMENDOIM	16
1.1.2. COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS GRÃOS DE AMENDOIM	17
1.1.3. COMPOSTOS BIOATIVOS	18
1.1.4. ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ERO) E DE NITROGÊNIO (ERN)	19
1.1.5. EFEITO DO ESTRESSE HÍDRICO NA QUALIDADE DOS GRÃOS DE AMENDOIM	20
REFERÊNCIAS	22
2. COMPOSIÇÃO LIPÍDICA, FENÓLICA E POTENCIAL ANTIOXIDANTE DE GENÓTIPOS DE AMENDOIM DESPELICULADOS CONTRASTANTES QUANTO A ADAPTAÇÃO AO AMBIENTE SEMIÁRIDO.....	27
RESUMO.....	27
ABSTRACT.....	27
2.1. INTRODUÇÃO	28
2.2. MATERIAL E MÉTODOS	29
2.2.1. RECURSOS GENÉTICOS.....	29
2.2.2. PREPARO DA AMOSTRA.....	30
2.2.3. EXTRAÇÃO DA FRAÇÃO LIPÍDICA	30
2.2.4. EXTRAÇÃO DA FRAÇÃO FENÓLICA	31
2.2.5. COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA FRAÇÃO LIPÍDICA	32
2.2.5.1. DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS POR CROMATOGRAFIA GASOSA (CG-FID)	32
2.2.5.2. DETERMINAÇÃO DO TEOR DE TOCOFERÓIS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA PERFORMANCE (HPLC-FLD)	33
2.2.6. COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA FRAÇÃO FENÓLICA	34
2.2.6.1. TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS	34
2.2.6.2. DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE COMPOSTOS FENÓLICOS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE ON-LINE PELA TÉCNICA HIFENADA DE HPLC-DAD-UV	34
2.2.6.3. AVALIAÇÃO DO PERFIL DE COMPOSTOS FENÓLICOS POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS DE ALTA RESOLUÇÃO (LC-ESI-LTQ-ORBITRAP-MS)	35
2.2.7. CAPACIDADE DE DESATIVAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO	37
2.2.7.1. SEQUESTRO DO RADICAL SUPERÓXIDO ($O_2^{\cdot-}$)	37
2.2.7.2. SEQUESTRO DO ÁCIDO HIPOCLOROSO (HOCl)	37
2.2.7.3. SEQUESTRO DO RADICAL PEROXILA ($ROO^{\cdot}$)	37
2.2.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA	38
2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	38
2.3.1. RENDIMENTO DA FRAÇÃO FENÓLICA	38
2.3.2. COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA FRAÇÃO LIPÍDICA	39
2.3.2.1. DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS POR CROMATOGRAFIA GASOSA (CG-FID)	39
2.3.2.2. DETERMINAÇÃO DO TEOR DE TOCOFERÓIS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA PERFORMANCE (HPLC-FLD)	41
2.3.3. COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA FRAÇÃO FENÓLICA	45
2.3.3.1. TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS	45
2.3.3.2. DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE COMPOSTOS FENÓLICOS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE ON-LINE PELA TÉCNICA HIFENADA DE HPLC-DAD-UV	46
2.3.3.3. AVALIAÇÃO DO PERFIL DE COMPOSTOS FENÓLICOS POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS DE ALTA RESOLUÇÃO (LC-ESI-LTQ-ORBITRAP-MS)	53
2.3.4. CAPACIDADE DE DESATIVAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO	58
2.3.4.1. SEQUESTRO DO ÁCIDO HIPOCLOROSO (HOCl) E DO RADICAL SUPERÓXIDO ($O_2^{\cdot-}$)	58

2.3.4.2. SEQUESTRO DO RADICAL PEROXIL (ROO•)	59
2.3.5. ANÁLISE DE CLUSTER E COMPONENTES PRINCIPAIS.....	60
2.3.5.1. AGRUPAMENTO DE GENÓTIPOS COM BASE NOS COMPOSTOS COM PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES	60
2.3.5.2. AGRUPAMENTO DE GENÓTIPOS COM BASE NOS ÁCIDOS GRAXOS	63
2.4. CONCLUSÃO	66
REFERÊNCIAS	66
3. CARACTERIZAÇÃO DOS POLIFENÓIS EM AMENDOIM COM PELÍCULA CONTRASTANTES QUANTO A ADAPTAÇÃO AO AMBIENTE SEMIÁRIDO POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS DE ALTA RESOLUÇÃO.....	73
RESUMO	73
ABSTRACT	73
3.1. INTRODUÇÃO	74
3.2. MATERIAL E MÉTODOS.....	75
3.2.1 RECURSOS GENÉTICOS	75
3.2.2. EXTRAÇÃO DE POLIFENÓIS	76
3.2.3. COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS	77
3.2.4. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	78
3.2.5. AVALIAÇÃO DO PERFIL DE COMPOSTOS FENÓLICOS POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS DE ALTA RESOLUÇÃO (LC-ESI-LTQ-ORBITRAP-MS)	78
3.2.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA	79
3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	80
3.3.1. COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	80
3.3.2. IDENTIFICAÇÃO DE POLIFENÓIS POR ESPECTROMETRIA DE MASSA DE ALTA RESOLUÇÃO (LC-ESI-LTQ-ORBITRAP-MS/ MS)	81
3.3.2.1. ÁCIDOS HIDROXIBENZÓICOS E DERIVADOS	82
3.3.2.2. ÁCIDOS HIDROXICINÂMICOS E DERIVADOS	83
3.3.2.3. FLAVANOIS E DERIVADOS	84
3.3.2.4. FLAVONOIS E DERIVADOS	84
3.3.2.5. FLAVANONAS	85
3.3.3. ANÁLISE DE CLUSTER E COMPONENTES PRINCIPAIS.....	89
3.3.3.1. AGRUPAMENTO DE GENÓTIPOS COM BASE NOS ÁCIDOS FENÓLICOS	89
3.3.3.2. AGRUPAMENTO DE GENÓTIPOS COM BASE NOS FLAVONOIDES	91
3.4. CONCLUSÃO	95
REFERÊNCIAS	95
4. CONCLUSÃO	101
5. GERENCIAMENTO DOS RESÍDUOS QUÍMICOS GERADOS NO PROJETO.....	103
APÊNDICES	105

RESUMO

Potencial antioxidante e composição química de genótipos de amendoim adaptados ao ambiente semiárido

O amendoim (*Arachis hypogaea* L.) é um grão muito apreciado em todo o mundo, sendo cultivado em vários países desenvolvidos e em desenvolvimento. A planta é uma oleaginosa com alto valor nutricional e rica em compostos bioativos, cultivada largamente em zonas de clima semiárido, onde prevalece a seca, que pode afetar a produção e a composição dos grãos. O objetivo deste trabalho foi avaliar a composição química, atividade antioxidante, compostos fenólicos, tocoferóis e ácidos graxos de genótipos de amendoim contrastantes quanto à adaptação a ambientes com limitação hídrica, bem como definir quais atributos são capazes de caracterizar esses genótipos. Os genótipos utilizados foram oriundos do programa de melhoramento genético de amendoim da Embrapa Algodão (Campina Grande – PB), os quais são adaptados ao estresse hídrico. Foram analisados grãos com e sem película, uma vez que seu consumo pode ocorrer de ambas as formas. Para os grãos sem a película a caracterização da fração oleosa foi realizada por meio da identificação e quantificação dos ácidos graxos e tocoferóis, enquanto que a avaliação química da fração fenólica foi feita por espectrometria de massas de alta resolução (LC-ESI-LTQ-Orbitrap-MS). A atividade antioxidante foi determinada por meio da desativação de espécies reativas de oxigênio (superóxido, ácido hipocloroso e peroxila) e do método *on-line* (HPLC-ABTS). Os resultados da caracterização da fração oleosa e fenólica dos grãos despelculados foram ainda avaliados por análise multivariada para se definir quais atributos eram capazes de caracterizar os diferentes genótipos de amendoim. Para os grãos com a película foi realizada a caracterização química dos polifenóis por LC-ESI-LTQ-Orbitrap-MS, e a avaliação da atividade antioxidante pelo sequestro dos radicais livres DPPH e ABTS, além da análise multivariada dos resultados. De maneira geral, os genótipos tolerantes à seca foram os que apresentaram maior capacidade antioxidante. Os genótipos de amendoim avaliados apresentaram de 36 a 58% de ácidos graxos monoinsaturados em sua constituição, e relação oleico/linoleico mais elevada para os genótipos rasteiros. Foram também encontradas quantidades significativas de tocoferóis nos materiais analisados. O ácido *p*-cumárico, ácido cafeico e a rutina foram identificados e quantificados por cromatografia líquida de alta resolução. Foram identificados, por meio da técnica de espectrometria de massas de alta resolução, 26 compostos fenólicos nos genótipos de amendoim despelculados. Os grãos com película apresentaram perfil fenólico mais complexo, sendo identificados 58 compostos pertencentes a cinco classes distintas. Os isômeros do ácido coumárico foram os principais polifenóis, seguidos pela isorhamnetina-3-O-rutinosídeo e os isômeros de ácido cumárico. De acordo com os resultados obtidos e a literatura, foram identificados 9 compostos nunca relatados em amendoim. As variáveis analisadas neste estudo mostraram ser possível o agrupamento dos genótipos de amendoim contrastantes quanto à adaptação aos ambientes com restrição hídrica.

Palavras-chave: Espécies reativas de oxigênio; Compostos bioativos; Estresse hídrico; Espectrometria de massas de alta resolução; *Arachis hypogaea* L.

ABSTRACT

Potential antioxidant and chemical composition of peanut genotypes adapted to semiarid environment

Peanuts (*Arachis hypogaea* L.) are a widely appreciated grains throughout the world and it has been grown both in developed and developing countries. The plant is an oleaginous with high nutritional value and rich in bioactive compounds that has been cultivated in semi-arid zones – where drought prevails and it affects grain yield and composition. Thus, the aim of this work was in evaluating the chemical composition, antioxidant activity, phenolic compounds, tocopherols and fatty acids of contrasting peanut genotypes in relation to the adaptation to water limitation environments, as well as defining which attributes are able to characterize these genotypes. The adapted peanuts to water stress used here came from the breeding program of Embrapa Algodão (Campina Grande - PB). Grains with and without skin were analyzed, since their consumption can occur in both forms. In relation to the grains without the skin, the characterization of the oily fraction was made through the identification and quantification of the fatty acids and tocoferols, whereas the chemical evaluation of the phenolic fraction was performed by high-resolution mass spectrometry (LC-ESI-LTQ-Orbitrap-MS). The antioxidant activity was determined by reactive oxygen species deactivation (superoxide, hypochlorous acid and peroxy) and on-line method (HPLC-ABTS). The results obtained through characterization of the oily and phenolic fraction of the grains without skin were further evaluated by multivariate analysis to determine which attributes were able to characterize the different peanut genotypes. In relation to the grains with skin, it was made the chemical characterization of the polyphenols by LC-ESI-LTQ-Orbitrap-MS and the evaluation of the antioxidant activity by the sequestration of the radicals DPPH and ABTS; besides, it was made the multivariate analysis of the results. In general, the samples tolerant to drought were the ones that presented greater antioxidant capacity than the others. The evaluated peanut genotypes presented 36 to 58% of monounsaturated fatty acids in relation to the total lipids in its constitution and showed oleic/linoleic ratio classified in normal and mid-oleic, which is a higher ratio for non-drought tolerant genotypes. Significant amounts of tocopherols were also found in the analyzed materials. *p*-coumaric acid, caffeic acid and rutin were identified and quantified by high-performance liquid chromatography. Twenty-six phenolic compounds were also identified in peanuts without skin using the high-resolution mass spectrometry technique. The peanuts with skin showed a more complex phenolic characteristic by being identified 58 compounds belonging to five different classes. The isomers of coumaric acid were the major polyphenols, followed by isorhamnetin-3-O-rutinoside and the isomers of coumaric acid. According to the results obtained and the literature, it is been identified 9 new compounds which were never found in peanuts. The variables analyzed in this study showed that it is possible to group contrasting genotypes peanuts as to drought tolerance.

Keywords: Reactive oxygen species; Bioactive compounds; Water stress; Mass spectrometry high resolution; *Arachis hypogaea* L.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Aspecto dos grãos dos genótipos de amendoim estudados.	30
Figura 2. Fluxograma do processo de obtenção da fração lipídica.	31
Figura 3. Fluxograma do processo de obtenção da fração fenólica.	32
Figura 4. Esquema da instrumentação para análise simultânea de compostos fenólicos e atividade antioxidante <i>on-line</i> pela técnica hifenada de HPLC-DAD-UV.	35
Figura 5. Cromatogramas dos ácidos graxos das amostras BR1 e LViPE-06, acrescidas do padrão interno C13:0.	41
Figura 6. Cromatogramas dos tocoferóis quantificados pela técnica de HPLC-FLD para as amostras BR1 e LViPE-06.	44
Figura 7. Cromatogramas das sete amostras de amendoim testadas e sua atividade antioxidante detectadas a 320 nm e 350 nm (BR1 e Tatu) e 734 nm (pico negativo) respectivamente.	52
Figura 8. Dendrograma obtido pelo método de agrupamento hierárquico UPGMA, a partir da matriz gerada com compostos com atividade antioxidante de sete genótipos de amendoim. Coeficiente de correlação cofonético: 0,98.	60
Figura 9. Dispersão gráfica, em relação a dois eixos que representam os dois primeiros componentes principais (CP1 e CP2), obtidos a partir dos compostos com atividade antioxidante dos grãos de amendoim.	62
Figura 10. Dendrograma obtido pelo método de agrupamento hierárquico UPGMA, a partir da matriz gerada com ácidos graxos de sete genótipos de amendoim. Coeficiente de correlação cofonético: 0,84. Linha pontilhada índice de similaridade genética de 90% ($p \leq 0.01$).	63
Figura 11. Dispersão gráfica, em relação a dois eixos que representam os dois primeiros componentes principais (CP1 e CP2), obtidos a partir dos ácidos graxos dos grãos de amendoim.	64
Figura 12. Aspecto visual dos genótipos de amendoim avaliados.	76
Figura 13. Fluxograma do processo de obtenção da fração fenólica.	77
Figura 14. Dendrograma obtido pelo método de agrupamento hierárquico UPGMA, a partir da matriz gerada com ácidos fenólicos dos genótipos de amendoim. Coeficiente de correlação cofonético: 0,87. Linha pontilhada índice de similaridade genética de 70% ($p \leq 0.01$).	89
Figura 15. Dispersão gráfica, em relação a dois eixos que representam os dois primeiros componentes principais (CP1 e CP2), obtidos a partir de ácidos fenólicos de grãos de amendoim.	90

Figura 16. Dendrograma obtido pelo método de agrupamento hierárquico UPGMA, a partir da matriz gerada com flavonoides de sete genótipos de amendoim. Coeficiente de correlação cofonético: 0,87. Linha pontilhada índice de similaridade genética de 70% ($p \leq 0.01$).....	92
Figura 17. Dispersão gráfica, em relação a dois eixos que representam os dois primeiros componentes principais (CP1 e CP2), obtidos a partir dos flavonoides dos grãos de amendoim.	93
Figura 18. Comitê de Ética Ambiental na Pesquisa.....	105

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Descritores agronômicos dos genótipos de amendoim utilizados no estudo	29
Tabela 2. Porcentagens de rendimento (massa) do extrato fenólico liofilizado, obtidos no processo de extração (valores médios, $\pm$ DP, n=3).....	38
Tabela 3. Composição dos ácidos graxos em g.100g ⁻¹ de amostra dos sete genótipos de amendoim (valores médios, $\pm$ DP, n=3).....	40
Tabela 4. Composição dos tocoferóis em mg.100g ⁻¹ de óleo em genótipos de amendoim (valores médios, $\pm$ DP, n=3).....	42
Tabela 5. Curvas analíticas ($y = ax - b$) para determinação de tocoferóis por HPLC.....	44
Tabela 6. Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) na determinação de tocoferóis por HPLC	45
Tabela 7. Teor de compostos fenólicos totais em mg.g ⁻¹ (valores médios, $\pm$ DP, n=3) dos extratos dos sete genótipos de amendoim testados.....	46
Tabela 8. Compostos fenólicos em μ g de composto.g ⁻¹ de extrato de amendoim e atividade antioxidante <i>on-line</i> em μ g de Trolox.g ⁻¹ de extrato de amendoim por HPLC-DAD-UV (valores médios, $\pm$ DP, n=3) dos sete genótipos de amendoim.....	48
Tabela 9. Curvas analíticas ($y = ax - b$) para determinação de tocoferóis por HPLC.....	53
Tabela 10. Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) na determinação de compostos fenólicos por HPLC	53
Tabela 11. Compostos identificados em amendoim contrastantes quanto à tolerância ao estresse hídrico por LC-ESI-LTQ-Orbitrap-MS/MS	57
Tabela 12. Sequestro do ácido hipocloroso em μ g.mL ⁻¹ (valores médios, $\pm$ DP, n=3) dos extratos dos sete genótipos de amendoim testados.....	58
Tabela 13. Sequestro do radical peroxil em μ mol de Trolox.g ⁻¹ (valores médios, $\pm$ DP, n=3) dos extratos dos sete genótipos de amendoim.	59
Tabela 14. Elementos de variância obtidos a partir de componentes principais com base na matriz formada pelos compostos com atividade antioxidante em grãos de amendoim.	61
Tabela 15. Contribuição relativa dos compostos com atividade antioxidante para a divergência genética dos sete genótipos de amendoim.....	63
Tabela 16. Elementos de variância obtidos a partir de componentes principais com base na matriz formada pelos ácidos graxos em grãos de amendoim.	64
Tabela 17. Contribuição relativa dos ácidos graxos para a divergência genética dos sete genótipos de amendoim.....	65

Tabela 18. Descritores agrônômicos dos genótipos de amendoim utilizados no estudo.	75
Tabela 19. Compostos fenólicos totais (mg GAE.100g ⁻¹) e atividade antioxidante (μmol TE.g ⁻¹) dos genótipos de amendoim (valores médios, ± DP, n=3).	81
Tabela 20. Compostos identificados e quantificados (μg Catechin.g ⁻¹) em genótipos de amendoim contrastantes quanto à tolerância ao estresse hídrico por LC-ESI-LTQ-Orbitrap-MS/MS (valores médios, ± DP, n=3).....	86
Tabela 21. Elementos de variância obtidos a partir de componentes principais com base na matriz formada por ácidos fenólicos em grãos de amendoim.	90
Tabela 22. A contribuição relativa dos ácidos fenólicos para a divergência genética de sete genótipos de amendoim.....	91
Tabela 23. Elementos de variância obtidos a partir de componentes principais com base na matriz formada por flavonoides em grãos de amendoim.	92
Tabela 24. Contribuição relativa dos flavonoides para a divergência genética dos sete genótipos de amendoim.....	94

1. INTRODUÇÃO

O amendoim (*Arachis hypogaea* L.) é uma oleaginosa muito apreciada e de elevada importância econômica, sendo cultivada tanto em países desenvolvidos quanto em desenvolvimento. A produção mundial nos anos de 2015/16 foi de 39,5 milhões de toneladas, sendo que o consumo médio de grãos em 2014 foi de 5,43 kg por pessoa (INC, 2017).

Em vários países produtores, o amendoim é cultivado em regiões semiáridas, as quais estão frequentemente sujeitas a veranicos, que corresponde a um lapso de chuvas durante o crescimento e desenvolvimento da cultura (ANINBON et al., 2016). Relatos de perda de produção, contaminações por aflatoxina e redução no teor de compostos fenólicos das sementes tem sido reportados (ANINBON et al., 2016; SANTOS et al., 2012; GIRDTHAI et al., 2010).

A despeito do amendoim ser largamente reportado como uma oleaginosa de ampla adaptação a ambientes secos, a irregularidade de chuvas durante a estação de cultivo é considerada um grande problema na produção da cultura. A Embrapa coordena um programa de melhoramento do amendoim, focalizando em ambientes com restrição hídrica, objetivando o desenvolvimento de cultivares precoces, produtivas e adaptadas ao semiárido (SANTOS; FREIRE; LIMA, 2013).

Os grãos de amendoim são de elevado valor alimentar e nutritivo. Contém proteínas de boa qualidade, ácidos graxos essenciais, fibras, vitaminas e outros componentes secundários que contribuem para elevar o seu valor alimentar (ARYA; SALVE; CHAUHAN, 2016). Também apresenta compostos bioativos com propriedades antioxidantes como o α -tocoferol, esteróis e compostos fenólicos como flavonoides, que auxiliam na estabilidade oxidativa dos ácidos graxos presentes no amendoim (FRANCISCO; RESURRECCION, 2008; LOU et al., 2004; NEPOTE; GROSSO; GUZMAN, 2002; SHIN et al., 2009).

Embora certo nível de espécies reativas de oxigênio (ERO) e espécies reativas de nitrogênio (ERN) estejam envolvidas na regulação de processos fisiológicos (CERQUEIRA; DE MEDEIROS; AUGUSTO, 2007), em altas concentrações as ERO e ERN podem danificar macromoléculas celulares, incluindo DNA, RNA, proteínas e lipídios, podendo levar à morte celular subsequente (COSTA SILVA; CERCHIARO; HONÓRIO, 2011; HAYASHI; CORTOPASSI, 2015), causar aterosclerose e promover doenças neurodegenerativas. Sendo assim, o efeito dos antioxidantes é importante para a eliminação de radicais livres em excesso (SHAHIDI; AMBIGAIPALAN, 2015).

Tendo em vista os benefícios que o consumo de alimentos ricos em compostos com atividade antioxidante promove à saúde (SHAHIDI; AMBIGAIPALAN, 2015), o potencial destes e demais nutrientes presentes no amendoim (BOLLING; MCKAY; BLUMBERG, 2010), surge a necessidade de se avaliar a composição química de genótipos de amendoim adaptados ao semiárido, principalmente por meio da sua caracterização polifenólica e determinação da atividade antioxidante contra espécies reativas de oxigênio.

Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a composição química de grãos de diferentes genótipos de amendoim e, avaliar a capacidade de desativação de espécies reativas de oxigênio, compostos fenólicos, tocoferóis e ácidos graxos, bem como definir quais atributos são capazes de caracterizá-los quanto a adaptação ao ambiente semiárido.

1.1. Revisão bibliográfica

1.1.1. Importância econômica do amendoim

O gênero *Arachis* pertence à família Fabaceae, possui 80 espécies descritas, incluindo o amendoim cultivado (*A. hypogaea* L.), e é distribuído desde o sopé das montanhas dos Andes, na Bolívia, até o Rio La Plata no Uruguai (KRAPOVICKAS; GREGORY, 1994). Essa larga distribuição, faz com que as espécies sejam adaptadas a uma grande variedade de habitats.

A planta é classificada como dicotiledônea, e dentre as várias espécies conhecidas desta família, as de maior importância são as pertencentes ao gênero *Arachis* (TASSO JUNIOR; MARQUES; NOGUEIRA, 2004). Suas sementes são produzidas abaixo do solo, seu fruto é uma vagem ou legume e o número de sementes por fruto depende do grupo botânico, mas pode variar até seis.

O amendoim é um alimento de sabor muito agradável e é apreciado em todo o mundo, sendo comercializado para atender ao mercado de alimentos e de óleo. Os principais produtores mundiais são China, Índia, Argentina e Estados Unidos (USDA, 2017). No Brasil, a produção anual se situa em torno de 400.000 ton, oriunda das regiões Sudeste, Sul, Centro-Oeste e Nordeste (IBGE, 2016). A região Sudeste detém mais de 90% da produção nacional, seguida pelas regiões Centro-Oeste e Nordeste. O estado de São Paulo é o que mais produz esse tipo de grão, sendo responsável por cerca de 80% da produção nacional.

No Brasil, o cultivo do amendoim é feito em duas épocas: a primeira, nomeada de safra das águas, que representa 75% do volume total produzido no país e corresponde aos

plantios realizados nos meses de outubro/novembro nas regiões Sudeste e Sul; a segunda, nomeada safra da seca, que representa 25% do volume total produzido, com plantios realizados a partir de março, nas regiões Sudeste e Nordeste (SANTOS; FREIRE; LIMA, 2013).

1.1.2. Composição química dos grãos de amendoim

Além de apresentar sabor e cheiro agradáveis, o grão do amendoim é muito nutritivo, contendo quantidades razoáveis de proteínas, ácidos graxos insaturados, fibras, vitaminas e outros componentes secundários que contribuem para elevar o seu valor alimentar. O teor de óleo varia entre 40% a 52% (SANTOS, FREIRE, LIMA, 2013), sendo 50% desse total representado por ácidos graxos monoinsaturados; contém também os 20 aminoácidos em quantidades variáveis, além de ser uma excelente fonte de vitamina E (ARYA; SALVE; CHAUHAN, 2016).

Cerca de 80% do óleo de amendoim é constituído por dois ácidos graxos insaturados, o ácido oleico, monoinsaturado, e o ácido linoleico, poli-insaturado. Os demais, 20% do total, inclui ácidos graxos saturados como o ácido palmítico, esteárico, araquídico, eicosanóico, ácido behênico e lignocérico (KAVERA; NADAF; HANCHINAL, 2014).

O óleo de amendoim contém mais ácido oleico e menos linoleico em relação ao óleo de soja, por exemplo, o que implica em menos ligações insaturadas. Essa relação oleico/linoleico (O/L) no óleo de amendoim o torna menos susceptível à oxidação do que o óleo de soja (WANG et al., 2012). A proporção O/L encontrada para esse óleo está associada a uma maior vida de prateleira e maior resistência à rancificação (SINGKHAM et al., 2010).

O amendoim ainda é rico em compostos que atuam como antioxidantes, substâncias capazes de estender a vida útil de uma grande variedade de alimentos e que também atuam na prevenção contra os radicais livres. É fonte de compostos fenólicos, tais como estilbenos, flavonoides e ácidos fenólicos. Dentre os ácidos fenólicos, os já identificados em grãos de amendoim são o cafeico, sinápico, ferúlico e cumárico, sendo o *p*-cumárico o ácido fenólico predominante. Em relação aos estilbenos, o *trans*-resveratrol é o composto majoritário, enquanto que dentre os flavonoides, os isoflavonoides biochanina A, daidzeína e genisteína foram os principais compostos encontrados (IBERN-GÓMEZ et al., 2000; ISANGA; ZHANG, 2007; MATTILA; HELLSTRÖM, 2007; NANTZ et al., 2006; SALES; RESURRECCION, 2010; YANG; LIU; HALIM, 2009).

O amendoim é também uma excelente fonte de tocoferóis, antioxidantes naturais lipossolúveis, que agem como sequestradores de radicais livres e, consequentemente, atuam na proteção do óleo, retardando a oxidação lipídica (MARTÍN; NEPOTE; GROSSO, 2016). O tocoferol, assim como outras moléculas, pode variar em quantidade entre as diferentes cultivares. Shin et al. (2009) verificaram que o α -tocoferol e o γ -tocoferol foram predominantes nas cultivares do tipo Runner normal, médio e alto oleico e, segundo Camargo et al. (2012), o armazenamento promove um decréscimo moderado nos teores de tocoferóis nos grãos.

1.1.3. Compostos bioativos

As substâncias que apresentam ação biológica, metabólica ou fisiológica específica, são denominadas compostos bioativos. Como exemplo dessas substâncias, tem-se os compostos fenólicos, ácidos graxos, aminoácidos essenciais e fibras (COSTA; JORGE, 2011).

Os ácidos graxos insaturados como o ômega-6 e ômega-3 são conhecidos por apresentar efeito hipocolesterolêmico, ou seja, reduzem a concentração de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) no sangue, sendo que os ácidos graxos ômega-3 têm sido apontados como capazes de diminuir as taxas de triglicerídeos plasmáticos. Estudos indicam que um acréscimo na ingestão de ácidos graxos do tipo ômega-3 podem promover uma diminuição na pressão arterial, sendo então associado a um menor risco de desenvolvimento de doença cardiovascular (PIMENTEL; FRANCKI; GOLLÜCKE, 2005).

Os óleos vegetais, como o óleo de amendoim, podem conter, além dos ácidos graxos essenciais, outros compostos com propriedades bioativas em quantidades significativas, como os tocoferóis, fitosteróis, compostos fenólicos, entre outros (ETTINGER, 2010). Esses compostos contribuem para a prevenção de doenças cardiovasculares por meio de diferentes mecanismos, os quais podem estar relacionados à atividade antioxidante apresentada por essas moléculas, que atuam na proteção das biomoléculas frente a ação dos radicais livres (ARRANZ et al., 2008).

Os tocoferóis e tocotrienóis são reconhecidos por sua eficiente inibição da oxidação lipídica em alimentos e sistemas biológicos, e também por sua atividade antioxidante. A atuação dos tocoferóis e tocotrienóis se deve, sobretudo, à sua capacidade de doar hidrogênios fenólicos aos radicais livres lipídicos (EITENMILLER e LEE, 2004), retardando assim, a oxidação. Segundo Arranz et al. (2008), o tocoferol é o principal composto responsável pela atividade antioxidante presente no óleo de amendoim.

Os compostos fenólicos compõem outro importante grupo de bioativos, normalmente encontrados em plantas ou produtos alimentares, que possuem ação antioxidante devido à capacidade de transferir elétron e/ou átomos de hidrogênio aos radicais livres, bem como pela capacidade de se ligar a íons metálicos potencialmente pró-oxidantes, resultando em um radical estável (CRAFT et al., 2012). Estes compostos podem ser segmentados em dois grupos: o grupo dos flavonoides, que contém os compostos que apresentam estrutura química descrita como C6-C3-C6; e o grupo dos não flavonoides, que contém os compostos que possuem estrutura química C6-C1 (exemplo, ácido gálico), C6-C3 (exemplo, ácido coumárico) ou C6-C2-C6 (exemplo, resveratrol) (BALASUNDRAM; SUNDRAM; SAMMAN, 2006; HUBER; HOFFMANN-RIBANI; RODRIGUEZ-AMAYA, 2009; MARTINS et al., 2011).

1.1.4. Espécies reativas de oxigênio (ERO) e de nitrogênio (ERN)

Os radicais livres são produzidos naturalmente ou por alguma disfunção biológica, uma vez que a oxidação é parte fundamental da vida aeróbica e do metabolismo celular. Esses radicais livres apresentam elétron desemparelhado, que se encontra centrado nos átomos de oxigênio ou nitrogênio, e são denominados ERO ou ERN, respectivamente (PIETTA, 2000; VISIOLI; KEANEY; HALLIWELL, 2000).

ROS e RNS em níveis fisiológicos baixos atuam como mensageiros de sinalização, intermediando as diversas respostas biológicas que incluem a expressão do gene, proliferação celular, angiogênese, imunidade inata, morte celular e senescência. Por outro lado, o aumento dos níveis destas espécies reativas de vida curta, exerce efeitos deletérios, causando danos oxidativos em macromoléculas e interrompendo o balanço redução-oxidação (redox) celular (DOWLING; SIMMONS, 2009). Em geral, os danos são prejudiciais e não são facilmente reversíveis (WINTERBOURN, 2015).

Nas células animais, o desequilíbrio nos níveis de ERO/ERN é geralmente considerado um fator de risco para o início e progressão de doenças como aterosclerose, diabetes, doenças neurodegenerativas e câncer. Se os efeitos das ERO/ERN serão benéficas ou não, isso dependerá do lugar, tipo e quantidade dessas espécies geradas e do sistema antioxidante do organismo (CIRCU; AW, 2010).

Os grupos de ERO incluem tanto radicais de oxigênio (radical superóxido - $O_2^{\bullet-}$, radical hidroxila - $HO^{\bullet}$), como derivados não-radicalares (peróxido de hidrogênio H_2O_2 , por exemplo). Já as ERN incluem os radicais como o óxido nítrico ($NO^{\bullet}$) e o dióxido de

nitrogênio ($\text{NO}_2^\bullet$), assim como grupos não radiculares como o peroxinitrito (ONOO^-) (CALAS-BLANCHARD; CATANANTE; NOGUER, 2014).

Além dos efeitos das ERO na saúde humana, existe também a ocorrência dessas espécies em alimentos, devido à natureza biológica dos mesmos. A ocorrência das ERO em alimentos está relacionada com a iniciação da oxidação. Essas espécies reagem com lipídeos, proteínas, açúcares e vitaminas, produzindo compostos voláteis indesejáveis, degradando ácidos graxos essenciais e aminoácidos, modificando a funcionalidade das macromoléculas pela formação de dímeros e trímeros oxidados. Também, causam perda da aceitação dos alimentos por parte dos consumidores (WETTASINGHE; SHAHIDI, 2000). Desta forma, os antioxidantes possuem uma aplicação importante em produtos alimentares, onde são utilizados como conservantes a fim de prolongar o prazo de validade e manter a qualidade do alimento (CRAFT et al., 2012).

1.1.5. Efeito do estresse hídrico na qualidade dos grãos de amendoim

A água é um dos principais elementos de manutenção das propriedades celulares e bioquímicas das plantas. A supressão hídrica tem efeito diferenciado no ciclo das culturas, podendo levar a perdas expressivas na produção, dependendo da fase de crescimento e período de escassez. Em plantas de ciclo curto, os efeitos são mais rápidos, desencadeados pela ativação ou supressão de genes, que engatilham alterações bioquímicas e fisiológicas, as quais se expressarão no fenótipo das plantas, em função do nível de tolerância (KATAM et al., 2016; FAROOQ et al, 2009). Em nível celular, tais processos são conseguidos através do acúmulo de solutos orgânicos de baixo peso molecular no citosol, como exemplo tem-se moléculas de açúcares solúveis, prolina e aminoácidos livres (PEREIRA et al, 2016; NEPOMUCENO et al., 2001).

A falta de água promove aumento da respiração nas plantas e produção excessiva de ROS, causando danos oxidativos às proteínas, lipídios e ao DNA (APEL; HIRT, 2004). Além de redução no crescimento, o estresse hídrico leva a perda na produção, redução no tamanho dos grãos e na qualidade nutricional do alimento (PEREIRA et al, 2016; SONGSRI et al, 2008). A limitação hídrica também promove um aumento na infecção de *Aspergillus flavus*, levando a contaminação das sementes por aflatoxinas (DORNER et al., 1989; GIRDTHAI et al., 2010) devido à diminuição da atividade da água, que cria rachaduras na parede de vagens, permitindo assim, a penetração do fungo (SUDHAKAR et al., 2007).

Oleaginosas herbáceas são uma importante fonte de nutrientes tanto na alimentação humana como animal, apresentando em sua constituição óleo, fibras, minerais e proteínas. O manejo dessas culturas se dá em climas diferenciados que, em função de sua adaptação, possibilita melhorias na produção e na qualidade alimentar dos frutos gerados (DARYANTO; WANG, 2017).

O amendoim é uma oleaginosa largamente conhecida pela adaptação a ambientes de clima tropical e semiárido. Grande parte da produção mundial de amendoim ocorre em regiões semiáridas de todo o mundo, por meio de cultivares dos tipos botânicos mais comercialmente conhecidos, Virginia (subspecie hypogaea), Valencia e Spanish, ambos de porte ereto e da subspecie fastigiata (SANTOS, FREIRE, LIMA, 2013).

Cultivares do tipo Virginia também são conhecidas como rasteiras (Runner). Possuem grãos grandes, duas sementes por vagem, elevado teor de óleo e ciclo acima de 120 dias (SILVA et al, 2016; SANTOS, FREIRE, LIMA, 2013). Cultivares do tipo Spanish possuem baixo teor de óleo e ciclo curto, geralmente abaixo de 100 dias. Têm baixa aceitação no mercado brasileiro devido as sementes serem pequenas e apenas duas por vagem, no entanto, possuem larga adaptação a ambientes de clima semiárido. Cultivares do tipo Valencia são as de maior aceitação no mercado brasileiro de alimento. Possuem sementes vermelhas, de tamanho médio, e vagens contendo entre 4 a 6 grãos, teor médio de óleo, entre 44% a 48% e ciclo abaixo de 110 dias. As cultivares desse tipo botânico apresentam larga adaptação a ambientes de clima temperado e semiárido (SANTOS et al, 2012).

Relatos na literatura demonstram que a supressão hídrica afeta a composição lipídica dos grãos de amendoim. Dwivedy et al (1966) avaliaram o efeito do estresse hídrico sobre os teores de óleo, ácidos graxos e proteínas em grãos de amendoim do tipo ereto submetidas à seca no meio do ciclo da cultura, impostas entre 40 e 80 dias após a semeadura, e no fim do ciclo da cultura, impostas a partir de 80 dias após a semeadura até a colheita, e verificaram que a seca no meio do ciclo não afetou significativamente o teor de óleo, proteína e ácidos graxos, no entanto observaram redução significativa nos teores de óleo e nos ácidos graxos linoleico e behênico, enquanto que os teores de ácido esteárico e ácido oleico foram aumentados nos grãos expostos à seca no fim do ciclo da cultura. Hashim et al (1993) submeteram a cultivar rasteira Florunner a déficit hídrico de 30 dias em diferentes períodos de desenvolvimento da planta e verificaram que além de redução na composição de ácidos graxos, os teores de tocoferóis α e γ também foram significativamente afetados, independente do período do ciclo em que foi aplicado o estresse hídrico na planta.

O teor de compostos fenólicos na planta é outro fator afetado pelo estresse hídrico. Aninbon et al (2016) aplicaram exposição a seca de aproximadamente 25 dias no fim do ciclo de cultivo em genótipos de amendoim com diferentes índices de tolerância à seca e observaram um aumento no teor de compostos fenólicos em folhas e hastes de amendoim, no entanto, relataram que a seca promoveu uma redução no teor de compostos fenólicos dos grãos com película estudados (ANINBON et al., 2016).

REFERÊNCIAS

- ANINBON, C. et al. 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.
- APEL, K.; HIRT, H. Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress and signal transduction. **Annual Review of Plant Biology**, v. 55, p. 373–399, 2004.
- ARRANZ, S. et al. Comparison between free radical scavenging capacity and oxidative stability of nut oils. **Food Chemistry**, v. 110, n. 4, p. 985–990, 2008.
- ARYA, S. S.; SALVE, A. R.; CHAUHAN, S. Peanuts as functional food: a review. **Journal of Food Science and Technology**, v. 53, n. 1, p. 31–41, 2016.
- BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. **Food Chemistry**, v. 99, n. 1, p. 191–203, 2006.
- BOLLING, B. W.; MCKAY, D. L.; BLUMBERG, J. B. The phytochemical composition and antioxidant actions of tree nuts. **Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition**, v. 19, n. 1, p. 117–123, 2010.
- CALAS-BLANCHARD, C.; CATANANTE, G.; NOGUER, T. Electrochemical Sensor and Biosensor Strategies for ROS/RNS Detection in Biological Systems. **Electroanalysis**, v. 26, n. 6, p. 1277–1286, 2014.
- CAMARGO, A. C. et al. Gamma radiation induced oxidation and tocopherols decrease in in-shell, peeled and blanched peanuts. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, n. 3, p. 2827–2845, 2012.
- CERQUEIRA, F. M.; DE MEDEIROS, M. H. G.; AUGUSTO, O. Antioxidantes dietéticos: Controvérsias e perspectivas. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 441–449, 2007.
- CIRCU, M. L.; AW, T. Y. Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 48, n. 6, p. 749–762, 2010.

- COSTA, T.; JORGE, N. Compostos Bioativos Benéficos Presentes em Castanhas e Nozes Beneficial Bioactive Compounds Present in Nuts and Walnuts. **Ciência Biológica e da Saúde**, v. 13, n. 3, p. 195–203, 2011.
- COSTA SILVA, D.; CERCHIARO, G.; HONÓRIO, K. M. Relações patofisiológicas entre estresse oxidativo e arteriosclerose. **Química Nova**, v. 34, n. 2, p. 300–305, 2011.
- CRAFT, B. D. et al. Phenol-Based Antioxidants and the In Vitro Methods Used for Their Assessment. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 11, n. 2, p. 148–173, 2012.
- DARYANTO, S.; WANG, L. Global Synthesis of Drought Effects on Food Legume Production. **PLoS ONE**, v. 10, n. 6, p. 1–10, 2017.
- DORNER, J. W. et al. Interrelationship of kernel water activity , soil temperature , maturity , and phytoalexin production in preharvest aflatoxin contamination of drought-stressed peanuts. **Mycopathologia**, v. 105, n. 1, p. 117–128, 1989.
- DOWLING, D. K.; SIMMONS, L. W. Reactive oxygen species as universal constraints in life-history evolution. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 276, n. 1663, p. 1737–1745, 2009.
- DWIVEDI, S. L. et al. Effect of drought on oil , fatty acids and protein contents of groundnut (*Arachis hypogaea* L .) seeds. **Field Crops Research**, v. 48, p. 125–133, 1996.
- EITENMILLER, R.; LEE, J. **Vitamin E Food Chemistry, Composition, and Analysis**. New York, Marcel Dekker, 2004, 135p.
- ETTINGER, S. **Macronutrientes: carboidratos, proteínas e lipídeos**. In: Mahan LK, Escott-Stump S. Alimentos, nutrição & dietoterapia. São Paulo: Roca; 2010. 1354p.
- FAROOQ, M. et al. Review article Plant drought stress: effects , mechanisms and management. **Agronomy for Sustainable Development**, v. 29, p. 185–212, 2009.
- FRANCISCO, M. L. D. L.; RESURRECCION, A. V. A. Functional Components in Peanuts. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 48, n. 8, p. 715–746, 2008.
- GIRDTHAI, T. et al. Associations between physiological traits for drought tolerance and aflatoxin contamination in peanut genotypes under terminal drought. **Plant Breeding**, v. 129, n. 6, p. 693–699, 2010.
- HASHIM, I. B. et al. Fatty Acid Composition and Tocopherol Content of Drought Stressed Florunner Peanuts. **Peanut Science**, v. 20, p. 21–24, 1993.
- HAYASHI, G.; CORTOPASSI, G. Oxidative stress in inherited mitochondrial diseases. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 88, p. 10–17, 2015.

- HUBER, L. S.; HOFFMANN-RIBANI, R.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Quantitative variation in Brazilian vegetable sources of flavonols and flavones. **Food Chemistry**, v. 113, n. 4, p. 1278–1282, 2009.
- IBERN-GÓMEZ, M. et al. Resveratrol and piceid levels in natural and blended peanut butters. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 12, p. 6352–6354, 2000.
- IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Produção Agrícola. Disponível em: < ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Agricola/Fasciculo_Indicadores_IBGE/estProdAgr_201601.pdf >. Acesso em: 11 Fev. 2016
- INC. International Nut and Dried Fruit Council. Global Statistical Review 2015 2016. Disponível em: < <http://www.nutfruit.org/wp-content/uploads/2016/05/Global-Statistical-Review-2015-2016.pdf> >. Acesso em: 20 Abr. 2017.
- ISANGA, J.; ZHANG, G.-N. Biologically Active Components and Nutraceuticals in Peanuts and Related Products: Review. **Food Reviews International**, v. 23, n. 2, p. 123–140, 2007.
- KATAM, R. et al. Comparative leaf proteomics of drought-tolerant and -susceptible peanut in response to water stress. **Journal of Proteomics**, v. 143, p. 209–226, 2016.
- KAVERA; NADAF, H. L.; HANCHINAL, R. R. Near infrared reflectance spectroscopy (NIRS) for large scale screening of fatty acid profile in peanut (*Arachis hypogaea* L.). **Legume Research**, v. 37, n. 3, p. 272–280, 2014.
- KRAPOVICKAS, A.; GREGORY, W. C. **Taxonomía del género Arachis (Leguminosae)**. Bonplandia, v. 8, p. 1-186, 1994.
- LOU, H. et al. Polyphenols from peanut skins and their free radical-scavenging effects. **Phytochemistry**, v. 65, n. 16, p. 2391–2399, 2004.
- MARTÍN, M. P.; NEPOTE, V.; GROSSO, N. R. Chemical, sensory, and microbiological stability of stored raw peanuts packaged in polypropylene ventilated bags and high barrier plastic bags. **LWT - Food Science and Technology**, v. 68, p. 174–182, 2016.
- MARTINS, S. et al. Bioactive phenolic compounds: Production and extraction by solid-state fermentation. A review. **Biotechnology Advances**, v. 29, n. 3, p. 365–373, 2011.
- MATTILA, P.; HELLSTRÖM, J. Phenolic acids in potatoes, vegetables, and some of their products. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 20, n. 3–4, p. 152–160, 2007.
- NANTZ, M. P. et al. Immunity and antioxidant capacity in humans is enhanced by consumption of a dried, encapsulated fruit and vegetable juice concentrate. **The Journal of nutrition**, v. 136, n. 10, p. 2606–10, 2006.
- NEPOMUCENO, A. L. et al. Tolerância à seca em plantas: Mecanismos fisiológicos e moleculares. **Biociência, Ciência & Desenvolvimento**, v. 04, n. 23, p. 12-18, 2001.

- NEPOTE, V.; GROSSO, N. R.; GUZMAN, C. A. Extraction of antioxidant components from peanut skins. **Grasas y Aceites**, v. 53, n. 4, p. 391–395, 2002.
- PEREIRA, W. J. DE L. et al. Assessment of drought tolerance of peanut cultivars based on physiological and yield traits in a semiarid environment. **Agricultural Water Management**, v. 166, p. 70–76, 2016.
- PIETTA, P. G. Flavonoids as antioxidants. **Journal of Natural Products**, v. 63, n. 7, p. 1035–1042, 2000.
- PIMENTEL, C.V.M.B.; FRANCKI, V.M.; GOLLÜCKE, A.P.B. Alimentos funcionais: introdução às principais substâncias bioativas em alimentos. São Paulo: Varela; 2005.
- 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, n. 3, p. 795–803, 2010.
- SANTOS, R. C. et al. Produtividade de grãos e óleo de genótipos de amendoim para o mercado oleoquímico. **Revista Ciencia Agronomica**, v. 43, n. 1, p. 72–77, 2012.
- SANTOS, R.C.; FREIRE, R.M.M.; LIMA, L.M. **O agronegócio do amendoim no Brasil**. EMBRAPA. 2ª ed. Brasília, DF. 2013. 585p.
- 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.
- SHIN, E. C. et al. Commercial runner peanut cultivars in the united states: Tocopherol composition. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 21, p. 10289–10295, 2009.
- SILVA, R. A. S. et al. Assessment of genetic divergence in runner peanut genotypes grown in the Brazilian Northeast environments. **African Journal of Agricultural Research**, v. 11, n. 16, p. 1456–1462, 2016.
- SINGKHAM, N. et al. Estimation of Heritability by Parent-offspring Regression for High-oleic Acid in Peanut. **Asian Journal of Plant Sciences**, v. 9, n. 6, p. 358–363, 1 jun. 2010.
- SONGSRI, P. et al. Root distribution of drought-resistant peanut genotypes in response to drought. **Journal of Agronomy and Crop Science**, v. 194, p. 92–103, 2008.
- SUDHAKAR, P. et al. Relationship of drought tolerance traits with aflatoxin contamination in groundnut. **Indian journal of plant physiology**, v. 12, n. 3, p. 261–265, 2007.

- TASSO JUNIOR, L. C.; MARQUES, M. O.; NOGUEIRA, G. A. **A cultura do amendoim**. Jaboticabal: UNESP, 2004. 220 p. - United States Department of Agriculture. Foreign Agricultural Service. Disponível em: <<http://apps.fas.usda.gov/psdonline/psdreport.aspx?hidReportRetrievalName=BVS&hidReportRetrievalID=918&hidReportRetrievalTemplateID=1#ancor>>. Acesso em: 08 Jul. 2017.
- VISIOLI, F.; KEANEY, J.; HALLIWELL, B. Antioxidants and cardiovascular disease; panaceas or tonics for tired sheep? **Cardiovascular Research**, v. 47, n. 3, p. 409, 2000.
- WANG, M. L. et al. Screening of the USDA peanut germplasm for oil content and fatty acid composition. **Biomass and Bioenergy**, v. 39, p. 336–343, 2012.
- WETTASINGHE, M.; SHAHIDI, F. Scavenging of reactive-oxygen species and DPPH free radicals by extracts of borage and evening primrose meals. **Food Chemistry**, v. 70, p. 17–26, 2000.
- WINTERBOURN, C. C. Are free radicals involved in thiol-based redox signaling? **Free Radical Biology and Medicine**, v. 80, p. 164–170, 2015.
- YANG, J.; LIU, R. H.; HALIM, L. Antioxidant and antiproliferative activities of common edible nut seeds. **LWT - Food Science and Technology**, v. 42, n. 1, p. 1–8, 2009.

2. COMPOSIÇÃO LIPÍDICA, FENÓLICA E POTENCIAL ANTIOXIDANTE DE GENÓTIPOS DE AMENDOIM DESPELICULADOS CONTRASTANTES QUANTO A ADAPTAÇÃO AO AMBIENTE SEMIÁRIDO

RESUMO

O amendoim é uma oleaginosa que possui alto valor nutritivo, além de apresentar compostos bioativos com propriedades antioxidantes. O objetivo deste trabalho foi avaliar o perfil de ácidos graxos e o teor de tocoferóis presentes no óleo, e o perfil de compostos fenólicos e a atividade antioxidante de grãos despeliculados de sete genótipos de amendoim componentes do programa de melhoramento genético da Embrapa Algodão. Foram identificados 26 compostos fenólicos por meio da técnica de espectrometria de massas de alta resolução. O ácido *p*-cumárico, ácido cafeíco e a rutina foram quantificados pela técnica de cromatografia líquida de alta resolução. O teor total de compostos fenólicos variou de 18,66 a 28,50 mg.g⁻¹ de extrato fenólico. Os genótipos que se destacaram em relação à atividade antioxidante foram BR1, tolerante, e LGoPE-06, não tolerante ao estresse hídrico, mas, de maneira geral, os genótipos tolerantes à seca apresentaram maior capacidade antioxidante. Os teores de tocoferóis variaram de 32,23 a 69,73 mg.100g⁻¹ de óleo, destacando-se o genótipo BR1, uma cultivar que possui ampla adaptação ao ambiente semiárido e que apresentou, aproximadamente, o dobro do conteúdo total de tocoferóis em relação aos demais. Os teores de ácidos graxos monoinsaturados variaram de 36% a 58% em relação ao total de lipídeos presentes. As variáveis analisadas permitiram identificar a cultivar BR1 como o genótipo mais divergente frente aos compostos com propriedades antioxidantes e permitiu identificar que os genótipos do tipo ereto são distintos dos genótipos do tipo rasteiro de acordo com o perfil de ácidos graxos.

Palavras-chave: Espécies reativas de oxigênio; Compostos fenólicos; Ácidos graxos; Tocoferóis

ABSTRACT

Peanuts are oleaginous seeds with high nutritional power and have bioactive compounds with antioxidant properties. The aim of this study was to evaluate the characteristics of fatty acids and tocopherols present in peanut oil and the characteristics of phenolic compounds and antioxidant activity of seven peanuts genotypes components from the Embrapa Cotton breeding program. Twenty-six phenolic compounds were identified by high-resolution mass spectrometry. The *p*-coumaric acid, caffeic acid and rutin were quantified by high performance liquid chromatography. The total content of phenolic compounds ranged from 18.66 to 28.50 mg.g⁻¹ phenolic extract. The samples that stood out in relation to the antioxidant activity were BR1 and LGOPE-06, but, in general, the samples tolerant to drought presented higher levels of antioxidant capacity. The tocopherol contents ranged from 69.73 to 32.23 mg.100g⁻¹ of oil. The BR1 genotype stood out for presenting the double total content of tocopherol in relation to the others. The samples presented approximately 36 to 58% of monounsaturated fatty acids in relation to the total lipids present. The analyzed variables allowed to identify the cultivar BR1 as the genotype more divergent in relation to the compounds with antioxidant properties and they permitted identify that the erect type genotypes are different of the Runner type according with the fatty acids profile.

Keywords: Reactive oxygen species; Phenolic compounds; Fatty acids; Tocopherols

2.1. INTRODUÇÃO

O amendoim (*Arachis hypogaea* L.) é uma oleaginosa muito apreciada mundialmente e de grande importância econômica, sendo cultivada tanto em países desenvolvidos, como em países em desenvolvimento. Os grãos, além de nutritivos, contém proteínas de boa qualidade, ácidos graxos essenciais ao metabolismo humano, fibras, vitaminas e outros componentes secundários que contribuem para elevar o seu valor alimentar (ARYA; SALVE; CHAUHAN, 2016).

O α -tocoferol, os esteróis e os compostos fenólicos, como as isoflavonas e os flavonoides, são exemplos de compostos presentes no amendoim e que contribuem para a atividade de sequestro de radicais livres. Esses compostos promovem uma proteção contra a oxidação e auxiliam na estabilidade dos ácidos graxos presentes no amendoim (FRANCISCO; RESURRECCION, 2008; LOU et al., 2004; NEPOTE; GROSSO; UZMAN, 2002; SHIN et al., 2009), além de contribuir com o sistema de defesa antioxidante animal.

Vários relatos na literatura reportam sobre a riqueza dos aminoácidos e ácidos graxos nos grãos de amendoim, embora os teores variem em função dos tipos botânicos e da forma de manejo em que a lavoura é conduzida (SANTOS; FREIRE; LIMA, 2013; SANTOS et al, 2012; HASHIM et al, 1993). O óleo de amendoim, possui vários constituintes, sendo a estabilidade dependente da relação oleico/linoleico que frequentemente é maior nos genótipos do tipo rasteiro (SANTOS et al, 2012a).

A eliminação de radicais livres do óleo se traduz em uma fonte significativa de gordura de elevada qualidade. Arranz et al (2008) estudaram a relação entre a capacidade de eliminação de radicais livres e estabilidade oxidativa no óleo de diferentes de amêndoas e verificaram que o ranking de capacidade antioxidante foi expressiva no óleo de amendoim. Segundo os autores, os tocoferóis parecem ser os compostos responsáveis pela capacidade antioxidante sendo negligível a contribuição dos polifenóis.

No entanto, o amendoim é amplamente cultivado em ambientes de clima tropical e semiárido, sendo que o manejo nesse último é muito flutuante em função dos constantes veranicos que ocorrem durante o ciclo, afetando a produção e qualidade nutricional dos grãos (PEREIRA et al, 2016; ANINBON et al., 2016; SONGSRI et al, 2008).

Considerando que os grãos de amendoim e seus derivados são mundialmente consumidos nas formas *in natura* ou industrializada (SANTOS; FREIRE; LIMA, 2013), e ainda a riqueza nutricional desses produtos no aspecto alimentar (BOLLING; MCKAY; BLUMBERG, 2010), o conhecimento da composição química dos grãos é de grande

contribuição para os programas de melhoramento, uma vez que auxilia no norteamento da seleção dos genótipos mais nutritivos e com maior poder nutracêutico.

Portanto, o objetivo deste estudo foi investigar a capacidade de desativação de espécies reativas de oxigênio, compostos fenólicos, tocoferóis e ácidos graxos em grãos despêculados de amendoim, oriundos de genótipos com níveis diferenciados de tolerância à seca.

2.2. MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1. Recursos genéticos

Sete genótipos de amendoim pertencentes ao Banco Ativo de Germoplasma (BAG) da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa Algodão) foram gentilmente cedidos para esta investigação (Tabela 1; Figura 1). Grãos de cada genótipo foram cultivados em campo em Campina Grande, PB, Brasil (7° 13' 51" S, 35° 52' 54" W, 512 m) durante a estação chuvosa, entre Maio a Setembro de 2015. Após a colheita, as plantas foram secas ao ar livre, no campo, durante uma semana, para diminuir a umidade interna para 8-10%.

Tabela 1. Descritores agrônômicos dos genótipos de amendoim utilizados no estudo

Genótipos	TO	TB	HC	CG	TG	Ciclo (dias)	Óleo
BR1	Alta	V	E	Vermelha	Média	85-89	45-46
Senegal 55437	Alta	S	E	Bege	Pequena	75-80	43-44
L7 Bege	Alta	S	E	Bege	Grande	85-90	46-49
FM 424B-2	Média	Vi	R	Bege	Grande	115-125	47-48
LViPE-06	NT	Vi	R	Bege	Extra-grande	125-130	50-52
LGoPE-06	NT	Vi	R	Bege	Extra-grande	125-130	50-52
Tatu	NT	V	E	Vermelha	Média	95-100	48-49

TB= Tipo botânico; S- Spanish, V- Valência, Vi-Virgínia; HC- hábito de crescimento; E- ereto, R- Runner; CG- cor do grão; TG- tamanho do grão; TO- tolerância ao ambiente semiárido; NT – não tolerante.

Figura 1. Aspecto dos grãos dos genótipos de amendoim estudados.

2.2.2. Preparo da amostra

As películas dos grãos foram removidas manualmente e os grãos despeliculados foram armazenados a -20°C até o momento das extrações.

2.2.3. Extração da fração lipídica

A fração lipídica (óleo) foi obtida a partir dos grãos de amendoim despeliculados, por meio de uma prensa hidráulica. O óleo recolhido foi armazenado a temperatura de -20°C até o momento das análises de composição de ácidos graxos e tocoferóis. Para evitar a oxidação

do óleo, N_2 foi adicionado, a fim de promover uma atmosfera modificada no interior da embalagem. O fluxograma sumarizado do processo de obtenção do óleo de amendoim está representado na Figura 2.

Figura 2. Fluxograma do processo de obtenção da fração lipídica.

2.2.4. Extração da fração fenólica

Para a extração dos compostos fenólicos foi utilizada farinha desengordurada de grãos. Inicialmente, os grãos despeliculados foram moídos em moinho de alta velocidade (IKA A11 basic) na presença de nitrogênio líquido e, na sequência, o amendoim moído foi desengordurado com hexano na proporção de 1/10 (m/v, amostra/solvente). A amostra com o solvente extrator foi agitada vigorosamente em vortex por aproximadamente 20 segundos e posteriormente, centrifugada a 8000 x g, durante 10 min à 25°C. O procedimento foi repetido por mais duas vezes e o precipitado, denominado farinha desengordurada, foi recolhido (MIRALIAKBARI; SHAHIDI, 2008).

A fração fenólica foi preparada a partir da farinha desengordurada, na proporção 1/20 (m/v, amostra/solvente) utilizando etanol 35% por 30 minutos a 60°C, com posterior sonicação por 15 minutos. Em seguida as amostras foram centrifugadas a 7000 x g, durante 10 min a 21°C. Por fim, o sobrenadante foi recolhido, liofilizado e armazenado a -20°C, até o momento das análises. O fluxograma sumarizado do processo de obtenção do extrato fenólico de amendoim está representado na Figura 3. Todos os procedimentos de extração foram feitos em triplicata e o rendimento do extrato fenólico, após a liofilização, foi determinado.

Figura 3. Fluxograma do processo de obtenção da fração fenólica.

2.2.5. Composição química da fração lipídica

2.2.5.1. Determinação do perfil de ácidos graxos por cromatografia gasosa (CG-FID)

As amostras de óleo foram metiladas segundo método de Hartman e Lago (1973), com adaptações baseadas no método AOCS Ce 1b-89 (2003) e com adição do ácido tridecanóico como padrão interno (6 mg/mL em hexano). Os ácidos graxos foram determinados por meio de cromatógrafo (HP 5890, Série II), equipado com coluna SUPELCO 256 (100 m x 0,25 mm x 0,2 µm), acoplado a detector de ionização de chama (FID). A programação de temperatura foi 130 °C (1,0 min) a 170 °C (6,5 °C/min), 170 °C a 215 °C (2,8 °C/min), 215 °C (15 min), 215 °C a 230 °C (40 °C/min), 230 °C (6 min). As temperaturas do injetor e detector foram de 270 °C e 280 °C, respectivamente. Como gás de arraste foi utilizado hélio com uma vazão de 1,5 mL/min. Ácidos graxos de 6, 8, 10, 12, 14, 15, 16, 17, 18 (cis e trans), 20, 22 e 24 átomos de carbono, saturados e insaturados, foram quantificados em relação ao padrão interno. O teor de ácidos graxos foi calculado pela equação 1 descrita por Visentainer e Franco (2006):

Equação 1:

$$MX = \frac{AX * MP * FCT}{AP * MA * FCEA}$$

Onde:

MX = Massa do ácido graxo X em mg.mg⁻¹.

MP = Massa do padrão interno em miligramas.

MA = Massa da amostra em miligramas.

AX = Área do ácido graxo X.

AP = Área do padrão interno.

FCT = Fator de correção teórico.

FCEA = Fator de correção dos ácidos graxos esterificados.

2.2.5.2. Determinação do teor de tocoferóis por cromatografia líquida de alta performance (HPLC-FLD)

A determinação do teor de tocoferóis foi realizada de acordo com o método descrito por Hashim et al. (1993), por meio de cromatógrafo líquido (Shimadzu, SCL-10Avp) acoplado a detector de fluorescência (FLD). A fase móvel foi composta por hexano/isopropanol (99/1, v/v) com uma vazão de 1,0 mL/min. Alíquotas de 10 µL de amostras de óleo diluídas em hexano a 10% (m/v) foram injetadas em uma coluna de sílica em fase normal (250 x 4,6 mm), com tamanho de partícula de 5 µm, com exceção da amostra BR1 que foi diluída a 5% (m/v). Os comprimentos de emissão e excitação foram de 330 e 290 nm, respectivamente. A identificação e a quantificação foram feitas com base em padrões de tocoferóis autênticos (α -, β -, γ - e δ), injetados nas mesmas condições. Para a quantificação, as concentrações dos padrões injetados foram corrigidas. Uma alíquota de cada isômero, inicialmente dissolvido em hexano, foi evaporada sob nitrogênio e posteriormente ressuspensa em etanol. A solução etanólica foi avaliada quanto à absorbância em 292, 296, 298 e 298 nm para o α -, β -, γ - e δ -tocoferol, respectivamente. A concentração final foi calculada com base no coeficiente de extinção molar para soluções etanólicas (PODDA et al, 1996). A linearidade e os limites de detecção e quantificação (LD e LQ) também foram avaliados (BRASIL, 2016).

2.2.6. Composição química da fração fenólica

2.2.6.1. Teor de compostos fenólicos totais

A análise do teor de compostos fenólicos totais foi realizada de acordo com o método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu descrito por Al-Duais et al. (2009), adaptado para microvolumes. Em cada poço da microplaca foram adicionados 20 µL do extrato de amendoim diluído. Em seguida, 100 µL do reagente Folin-Ciocalteu 10% foi adicionado e, após 5 minutos, 75 µL da solução de carbonato de potássio 7,5% foram acrescentados. Após a incubação por 40 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo de luz, a absorbância foi medida em leitora de microplacas (SpectraMax M3, Molecular Devices), a 740 nm. O conteúdo total de compostos fenólicos foi expresso em equivalente ao ácido gálico, calculado por meio do ajuste da curva de calibração do padrão (20 a 120 µg/mL).

2.2.6.2. Determinação simultânea de compostos fenólicos e atividade antioxidante on-line pela técnica hifenada de HPLC-DAD-UV

O ensaio para a determinação simultânea de compostos fenólicos por HPLC, associado à atividade antioxidante pelo sequestro do radical ABTS, foi realizado utilizando o método desenvolvido por Koleva; Niederländer; Van Beek (2001), com algumas modificações (Figura 4). Uma solução estoque contendo persulfato de potássio 140 mM e ABTS 7 mM foi preparada e mantida a 25 °C no escuro, durante 16 horas, para a produção e estabilização do radical. Na sequência o radical foi diluído a uma absorbância de $0,700 \pm 0,020$, a 730 nm.

Os analitos foram primeiramente separados por HPLC em uma cromatógrafo Shimadzu equipado com uma coluna ODS-A (C-18, tamanho da coluna 4,6 x 250 mm, tamanho de partícula 5 µm), detector de diodos (SPD-M10AVp, Shimadzu Co. Kyoto, Japão) e detector UV-Vis (SPD-20AV, Shimadzu). A fase foi constituída por uma mistura de dois solventes: (A) solução de água e ácido fórmico 0,25% e (B) acetonitrila 80%, ácido fórmico 0,25% e água 19,75%. A vazão da fase móvel foi de 1,0 mL/min e o gradiente foi iniciado em 10% do solvente B, passando a 20% de B em 10 minutos, 30% de B aos 20 minutos, 50% de B aos 30 minutos, retomando novamente a 10% de B aos 38 minutos e finalizando a corrida aos 48 minutos, para ajuste das condições iniciais. Os compostos separados foram detectados primeiro em um detector de arranjo de diodos (DAD).

Imediatamente após a detecção dos compostos pelo DAD, foi feita uma reação pós coluna em linha com o radical livre ABTS, por aproximadamente 1 min. A vazão do radical ABTS foi de 0,8 mL/min e a intensidade de cor foi detectada por meio de picos negativos a 734 nm, em um detector de UV-Vis. Os resultados foram expressos em atividade antioxidante equivalente a Trolox (TEAC). A identificação foi feita pelo espectro de absorção na região ultravioleta, utilizando os recursos do detector de arranjo de diodos, pela comparação do tempo de retenção e co-cromatografia de padrões. Foram utilizados os seguintes padrões autênticos de ácidos fenólicos, estibeno e flavonoides: ácido cafeico, ácido sinápico, ácido ferúlico, *trans*-resveratrol, ácido *p*-cumárico, biochanina A, daidzeína e genisteína. A quantificação dos compostos identificados foi feita utilizando-se o método da padronização externa. Os limites de detecção e quantificação (LD e LQ) foram avaliados (BRASIL, 2016).

Figura 4. Esquema da instrumentação para análise simultânea de compostos fenólicos e atividade antioxidante *on-line* pela técnica hifenada de HPLC-DAD-UV.

2.2.6.3. Avaliação do perfil de compostos fenólicos por espectrometria de massas de alta resolução (LC-ESI-LTQ-Orbitrap-MS)

A análise por cromatografia líquida foi realizada segundo método descrito por Heras et al. (2016), utilizando um cromatógrafo Accela (Thermo Scientific, Hemel Hempstead, Reino Unido) equipado com uma bomba quaternária, um detector de arranjo de diodos (DAD) e um auto-injetor com termostato. A separação cromatográfica foi realizada em uma coluna

Atlantis 2,1 x 100 mm, 3 μ m (Waters, Milford, MA, USA). A fase móvel foi constituída por uma mistura de dois solventes: (A) solução de ácido fórmico 0,1% em água e (B) acetonitrila acidificada com ácido fórmico a 0,1%. A vazão da fase móvel foi de 350 μ L/min com volume de injeção de 10 μ L. O gradiente iniciou-se em 2% do solvente B, passando a 8% de B em 5 minutos, 20% de B aos 14 minutos, 30% de B aos 18 minutos, 100% de B aos 22 minutos, mantendo 100% até 24 minutos, retornando novamente a 2% de B aos 28 minutos e mantendo a 2% até 30 minutos. A coluna foi equilibrada por 5 minutos para as condições iniciais.

Foi utilizado espectrometro de massas de alta resolução LTQ Orbitrap Velos (Thermo Scientific, Hemel Hempstead, Reino Unido) equipado com uma fonte de ionização por eletronebulização (ESI), operando em modo negativo e resolução de 30.000 a 400 m/z. As condições de operação foram: voltagem da fonte, 4kV; gás auxiliar, 20 (unidades arbitrárias); gás de arraste, 10 (unidades arbitrárias); temperatura do capilar, 275 °C. Amostras dos extratos de amendoim foram analisadas em modo de escaneamento total com poder de resolução de 30000 a 400 m/z e os eventos MS/MS dependentes de dados foram adquiridos com um poder de resolução de 15000. Os íons mais intensos detectados durante a varredura completa dispararam a varredura dependente dos dados, que foi executada sem o uso de uma lista de íons moleculares. Os íons que não foram suficientemente intensos para uma varredura dependente de dados foram analisados posteriormente no modo MS_n com a resolução do Orbitrap também ajustada em 15000 a 400 m/z. Utilizou-se uma faixa de aquisição de 100 amu, sendo os precursores fragmentados por dissociação induzida por colisão C-trap (CID) com energia de colisão normalizada de 35 V e um tempo de ativação de 10 ms. A varredura de massas no modo FTMS (*Fourier transform mass spectrometer*) foi de 100 a 1000 m/z. Antes da análise foi realizada uma calibração externa para verificar a precisão das massas acuradas. A análise dos dados foi realizada utilizando o software XCalibur v2.0.7 (Thermo Fisher Scientific).

A identificação foi feita por comparação das massas exatas do espectro de massas MS/MS e fórmula molecular observada com aquelas disponíveis na literatura ou pela análise de padrões autênticos. Foram utilizados os seguintes padrões autênticos de ácidos fenólicos, estilbeno e flavonoides: ácido gálico, ácido 2,6-dihidroxibenzóico, ácido 2,5-dihidroxibenzóico, catequina, ácido cafeíco, epicatequina, ácido vanílico, ácido protocateíco, ácido *o*-cumárico, ácido *p*-cumárico, ácido *m*-cumárico, ácido ferúlico, rutina, ácido isoferúlico, quercetina-glucorônida, ácido sinápico e quercetina.

2.2.7. Capacidade de desativação de espécies reativas de oxigênio

2.2.7.1. Sequestro do radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$)

A análise do sequestro do superóxido foi realizada segundo método descrito por Melo et al. (2015). O radical foi gerado pelo sistema NADH/PMS e a capacidade do sequestro do radical foi determinada monitorando-se o efeito dos extratos de amendoim na redução do NBT para diformazana, induzida pelo mesmo. O monitoramento foi realizado a 560 nm durante 5 minutos, à temperatura ambiente. O meio reacional continha NADH (166 μ M), NBT (43 μ M), extratos e PMS (2,7 μ M), em um volume final de 300 μ L. As soluções de NADH, NBT e PMS foram preparadas utilizando tampão fosfato 19 mM, pH 7,4. Os resultados foram expressos em IC₅₀.

2.2.7.2. Sequestro do ácido hipocloroso (HOCl)

A capacidade de sequestro do ácido hipocloroso foi determinada pelo monitoramento do efeito dos extratos de amendoim sobre a oxidação do DHR para rodamina 123, induzida pelo ácido hipocloroso. O ácido hipocloroso foi preparado por meio do ajuste do pH de uma solução de NaOCl 1% pH 6,2, com adição da solução de H₂SO₄ 10%. O meio reacional continha tampão fosfato 100 mM, pH 7,4; extratos, DHR (5 μ M) e HOCl (5 μ M), num volume final de 300 μ L. O ensaio foi conduzido a 37 °C em uma leitora de microplacas SpectraMax® M3 (Molecular Devices), sendo a fluorescência medida no comprimento de emissão de 528 nm e de excitação de 485 nm. Os resultados foram expressos em IC₅₀ (MELO et al., 2015).

2.2.7.3. Sequestro do radical peroxila ($ROO^{\cdot}$)

Para análise do sequestro do radical peroxil foi monitorado o efeito dos extratos no decaimento da fluorescência, provocado pela oxidação da fluoresceína induzida pelo radical peroxil (ORAC). O radical foi formado pela termo decomposição do AAPH. Aliquotas de 30 μ L de padrão, controle ou extrato de amendoim foram introduzidos em microplacas de 96 poços com 60 μ L de fluoresceína (152,5 nM) e 110 μ L de AAPH (41,8 mM), sendo o volume final no poço de 200 μ L. O decaimento da fluorescência foi monitorado a cada minuto durante 2 horas utilizando os comprimentos de emissão e excitação de 528 e 485,

respectivamente, em uma leitora de microplacas SpectraMax® M3 (Molecular Devices). O Trolox foi utilizado como padrão e os resultados expressos como valor ORAC ($\mu\text{mol Trolox/mg extrato}$) (MELO et al., 2015).

2.2.8. Análise estatística

Todas as análises foram realizadas em triplicata e os resultados obtidos foram expressos em média $\pm$ desvio padrão. Após coleta dos dados, procedeu-se análise de agrupamento, por meio de métodos multivariados hierárquicos (Método do grupo de pares não ponderados com média aritmética, UPGMA) e não-hierárquicos (componente principal, CP). Para análise de UPGMA, as médias dos ácidos fenólicos e flavonoides foram utilizadas para se obter uma matriz de dissimilaridade genética por meio de distância euclidiana média. Para eliminar os efeitos não hierárquicos, estimou-se o coeficiente de correlação cofonético (SNEATH; SOKAL, 1973). Os CPs foram estimados através da transformação de dados originais em um conjunto com dimensão equivalente de dados não correlacionados. As pontuações correspondentes aos CPs foram calculadas a partir da matriz de correlação. Os dois primeiros pontos de CP foram utilizados para agrupar os genótipos em gráficos de dispersão. As análises foram realizadas usando o software GENES, versão 2013.5.1 (CRUZ, 2013)

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.3.1. Rendimento da fração fenólica

As amostras foram pesadas antes e depois do processo de liofilização, sendo o rendimento, em porcentagem de massa, mostrado na Tabela 2.

Tabela 2. Porcentagens de rendimento (massa) do extrato fenólico liofilizado, obtidos no processo de extração (valores médios, $\pm$ DP, n=3)

Genótipos de amendoim	Rendimento (%)
BR1	17,75 $\pm$ 2,51
Senegal 55437	15,22 $\pm$ 0,26
L7 Bege	11,39 $\pm$ 0,72
FM424B	11,48 $\pm$ 0,70
LViPE-06	16,57 $\pm$ 1,32
LGoPE-06	12,89 $\pm$ 0,22
Tatu	14,80 $\pm$ 0,65

DP= Desvio Padrão; n= número de repetições utilizadas.

Os extratos fenólicos apresentaram rendimento que variaram de 11% a 17%, sendo o rendimento médio apresentado, de 14,30%.

2.3.2. Composição química da fração lipídica

2.3.2.1. Determinação do perfil de ácidos graxos por cromatografia gasosa (CG-FID)

A composição de ácidos graxos dos diferentes genótipos de amendoim analisados se encontra na Tabela 3. Verificou-se que nos genótipos rasteiros LViPE-06, LGoPE-06 e FM424B foram obtidas maiores concentrações do ácido oleico (C18:1) e menores do ácido linoleico (C 18:2), com relação O/L entre 1,95 a 2,7. Esses valores conferem ao óleo maior estabilidade à rancificação, e portanto, maior vida de prateleira (SANTOS et al, 2012a; SINGKHAM et al., 2010). Esses três genótipos, embora possuam elevada capacidade de produção, não são adaptados a ambientes com restrição hídrica, sendo, portanto, indicados para manejo em áreas irrigadas ou com distribuição regular das chuvas, com lamina superior a 500 mm (SANTOS et al, 2012b).

Já os demais genótipos estudados, todos do tipo ereto, revelaram maiores valores de ácido linoleico e menores de oleico em relação aos genótipos do tipo rasteiro. Embora não se encontre na literatura relação entre a composição desses ácidos graxos com a adaptação ao ambiente semiárido, percebe-se que nos genótipos do tipo ereto há uma tendência de baixa relação O/L, sendo esses materiais mais indicados para o mercado de consumo *in natura*.

Os ácidos graxos que estão presentes em maiores quantidades nos genótipos de amendoim estudados são o ácido oleico e o ácido linoleico, e representam de 77% a 79% do total de ácidos graxos para todos os genótipos. Shin et al. (2010), avaliaram os ácidos graxos de genótipos rasteiros de amendoim classificadas como tipos normais, medianos e de alto teor de ácido oleico e também observaram que a soma desses ácidos graxos é responsável por quase 80% do total de ácidos graxos detectados.

Os grãos despeliculados de amendoim apresentaram de 36% a 58% de ácidos graxos monoinsaturados (MUFAs) em sua constituição. Também apresentaram teores de ácido oleico mais elevados em relação ao ácido linoleico, com exceção do genótipo BR1, o qual apresentou característica contrária. Rodrigues et al. (2011) avaliaram o perfil de ácidos graxos frente a diferentes genótipos de amendoim comerciais e ao processo de torra dos grãos e observaram que o ácido oleico foi o ácido graxo predominante, seguido pelo ácido linoleico e

que os MUFAs representaram cerca de 50% do total de ácidos graxos presentes nas amostras. Os autores também observaram que a torrefação do grão influencia na relação O/L, contudo, em menores proporções que a variabilidade genética e que a torra promove uma redução na porcentagem dos ácidos graxos dos grãos, afetando a qualidade nutricional do amendoim a ser consumido.

Tabela 3. Composição dos ácidos graxos em g.100g⁻¹ de amostra dos sete genótipos de amendoim (valores médios, $\pm$ DP, n=3)

Ácidos graxos	Genótipos						
	BR1	LViPE-06	Senegal 55437	Tatu	L7 Bege	LGoPE-06	FM424B
C16:0	7,35 $\pm$ 0,19	6,11 $\pm$ 0,37	8,21 $\pm$ 0,47	6,71 $\pm$ 0,24	7,16 $\pm$ 0,48	8,53 $\pm$ 0,40	10,39 $\pm$ 0,06
C18:0	1,04 $\pm$ 0,03	2,62 $\pm$ 0,12	2,65 $\pm$ 0,05	1,75 $\pm$ 0,07	1,56 $\pm$ 0,09	2,89 $\pm$ 0,13	2,24 $\pm$ 0,01
C18:1	18,12 $\pm$ 1,58	34,19 $\pm$ 1,67	25,09 $\pm$ 0,19	23,89 $\pm$ 1,44	19,94 $\pm$ 0,40	39,94 $\pm$ 0,72	44,22 $\pm$ 0,30
C18:2	22,84 $\pm$ 1,68	12,67 $\pm$ 0,63	22,54 $\pm$ 0,17	19,82 $\pm$ 0,89	19,00 $\pm$ 0,29	17,70 $\pm$ 0,55	22,63 $\pm$ 0,29
C20:0	0,30 $\pm$ 0,05	0,91 $\pm$ 0,06	0,83 $\pm$ 0,03	0,64 $\pm$ 0,04	0,50 $\pm$ 0,03	1,06 $\pm$ 0,09	1,00 $\pm$ 0,04
C20:1	0,52 $\pm$ 0,10	0,46 $\pm$ 0,03	0,43 $\pm$ 0,01	0,43 $\pm$ 0,01	0,33 $\pm$ 0,01	0,67 $\pm$ 0,04	0,79 $\pm$ 0,01
C22:0	0,79 $\pm$ 0,19	1,75 $\pm$ 0,17	1,87 $\pm$ 0,03	1,36 $\pm$ 0,14	1,01 $\pm$ 0,05	2,59 $\pm$ 0,24	2,20 $\pm$ 0,10
C24:0	0,49 $\pm$ 0,19	0,52 $\pm$ 0,06	0,59 $\pm$ 0,01	0,43 $\pm$ 0,02	0,43 $\pm$ 0,02	0,83 $\pm$ 0,08	0,94 $\pm$ 0,05
O/L	0,79 $\pm$ 0,01	2,70 $\pm$ 0,02	1,11 $\pm$ 0,01	1,20 $\pm$ 0,02	1,05 $\pm$ 0,02	2,26 $\pm$ 0,03	1,95 $\pm$ 0,01
Σ SFA	9,97 $\pm$ 0,41	11,91 $\pm$ 0,58	14,15 $\pm$ 0,60	11,01 $\pm$ 0,51	10,66 $\pm$ 0,44	15,90 $\pm$ 0,94	16,77 $\pm$ 0,26
Σ PUFA	22,84 $\pm$ 1,68	12,67 $\pm$ 0,63	22,54 $\pm$ 0,17	19,82 $\pm$ 0,89	19,00 $\pm$ 0,29	17,70 $\pm$ 0,55	22,63 $\pm$ 0,29
Σ MUFA	18,64 $\pm$ 1,68	34,65 $\pm$ 1,70	25,52 $\pm$ 0,21	24,32 $\pm$ 1,45	20,28 $\pm$ 0,40	40,61 $\pm$ 0,76	45,01 $\pm$ 0,32

DP=Desvio Padrão; n=número de repetições utilizadas; C16:0= ácido palmítico; C18:0= ácido esteárico; C18:1= ácido oleico; C18:2= ácido linoleico; C20:0= ácido eicosanóico C20:1= ácido gadolínico; C22:0= ácido behênico; C24:0= ácido lignocérico; O/L=Oleico/Linoleico; Σ SFA=soma dos ácidos graxos saturados; Σ PUFA=soma dos ácidos graxos poli-insaturados; Σ MUFA=soma dos ácidos graxos monoinsaturados.

Os genótipos rasteiros LGoPE-06, LViPE-06 e FM424B, que são mais indicados para o mercado de óleo, apresentaram teores totais de ácidos graxos monoinsaturados superiores aos genótipos do tipo ereto, que são mais indicados para o mercado de alimento. Esse resultado ressalta a qualidade do óleo de amendoim para dieta alimentar, uma vez que estudos epidemiológicos demonstraram que os ácidos monoinsaturados promovem redução dos triglicérides plasmáticos sem diminuir o HDL e também sem provocar a oxidação lipídica (CARDIOLOGIA, 2007).

Na Figura 5 estão representados os cromatogramas dos ácidos graxos de duas amostras analisadas, uma tolerante e outra não tolerante à seca (BR1 e LViPE-06, respectivamente), acrescidas do padrão interno C13:0.

Figura 5. Cromatogramas dos ácidos graxos das amostras BR1 e LViPE-06, acrescidas do padrão interno C13:0.

2.3.2.2. Determinação do teor de tocoferóis por cromatografia líquida de alta performance (HPLC-FLD)

Os quatro tipos de tocoferol foram quantificados em todas as amostras dos diferentes genótipos de amendoim, sendo o α -Tocoferol e o γ -Tocoferol predominantes em todos, representando em média 95% do total dos tocoferóis. A composição de tocoferóis se encontra na Tabela 4.

Os grãos da amostra BR1 superaram expressivamente nos teores de todos os tocoferóis, destacando-se das demais, uma vez que os tocoferóis são uma importante fonte de antioxidantes lipossolúveis, e a ingestão de α -tocoferol auxilia na prevenção de doenças provocadas pela falta de vitamina E (AZZI, 2017).

Tabela 4. Composição dos tocoferóis em mg.100g⁻¹ de óleo em genótipos de amendoim (valores médios, $\pm$ DP, n=3)

Genótipos	α -Tocoferol	β -Tocoferol	γ -Tocoferol	δ -Tocoferol	Total
BR1	27,79 $\pm$ 0,48	0,56 $\pm$ 0,01	48,96 $\pm$ 1,72	3,08 $\pm$ 0,17	80,38 $\pm$ 2,37
Senegal 55437	22,82 $\pm$ 0,45	0,38 $\pm$ 0,02	20,19 $\pm$ 0,53	0,99 $\pm$ 0,03	44,38 $\pm$ 1,00
L7Bege	13,20 $\pm$ 0,23	0,19 $\pm$ 0,01	22,99 $\pm$ 0,13	0,85 $\pm$ 0,02	37,24 $\pm$ 0,10
FM424B	16,39 $\pm$ 0,33	0,17 $\pm$ 0,00	24,99 $\pm$ 0,55	0,62 $\pm$ 0,02	42,17 $\pm$ 0,68
LViPE-06	19,81 $\pm$ 0,44	0,37 $\pm$ 0,01	20,58 $\pm$ 0,25	1,06 $\pm$ 0,01	41,82 $\pm$ 0,38
LGoPE-06	22,67 $\pm$ 0,40	0,42 $\pm$ 0,01	17,65 $\pm$ 0,21	0,76 $\pm$ 0,02	41,50 $\pm$ 0,59
Tatu	17,88 $\pm$ 0,74	0,30 $\pm$ 0,01	21,93 $\pm$ 0,43	1,14 $\pm$ 0,01	41,25 $\pm$ 1,01

DP=Desvio Padrão; n=número de repetições utilizadas; Total = soma total dos tocoferóis.

Pelo que se denota, possivelmente não há uma relação direta entre teor de tocoferol e tipo botânico, considerando-se a média obtida nesse trabalho com a cv. ereta BR1 (80,38 mg.100g⁻¹) e as dos demais materiais eretos e rasteiros usados.

Shin et al. (2009), procederam um estudo da composição de tocoferol em cultivares comerciais do tipo Runner crus e com película e encontraram valor máximo de 25,6 mg.100g⁻¹ de óleo, para a cv. Tamrun OL01, uma rasteira alto oleico. Os autores observaram predominância do α -Tocoferol e do γ -Tocoferol, sendo estes responsáveis também por 95% do teor total de tocoferóis nos grãos e relataram ainda não observar correlação entre o teor de tocoferóis e a relação O/L.

No trabalho de Jonnala; Dunford; Dashiell (2006), que estudaram a composição de tocoferóis, fitosteróis e fosfolipídeos em grãos com película de seis linhas convencionais de amendoim do tipo Runner, os autores encontraram valores médios de 32,16 mg.100g⁻¹ de óleo, enquanto que Martín; Nepote; Grosso (2016), que avaliaram a estabilidade química, sensorial e microbiológica de amendoim bruto armazenado em diferentes embalagens, encontraram valor médio para o teor total de tocoferóis de 51,39 mg.100g⁻¹ de óleo na cv. Granoleico, um genótipo rasteiro, valor este superior ao encontrado para os genótipos estudados neste trabalho, com exceção da BR1. Esses dados indicam que a película pode elevar o teor de tocoferóis nos grãos.

Os tocoferóis são compostos antioxidantes lipossolúveis essenciais sintetizados nos cloroplastos das plantas que atuam na proteção das membranas fotosintéticas contra os danos oxidativos desencadeados pela maioria dos estresses ambientais, eliminando ROS e prevenindo a peroxidação lipídica, e sua acumulação é induzida por estresses abióticos, como o estresse hídrico (ESPINOZA et al, 2013).

Espinoza et al (2013) submeteram plantas de tabaco a 20 dias de estresse hídrico e analisaram o teor de tocoferol das folhas. Os autores verificaram aumento significativo no

teor de α -tocoferol promovido pelo estresse, quando comparada às plantas controle. Loyola et al (2012) usaram 2 genótipos de tomate, um sensível e outro tolerante à seca, e após submeter as plantas ao estresse hídrico de 80%, 70%, 60% ou 50% verificaram acumulação de α -tocoferol nas folhas na ordem de 20%, para as plantas submetidas ao estresse hídrico de 50% em comparação com as plantas controle.

Embora não tenha sido encontrado algum relato associando tolerância à seca e teor de tocoferol em amendoim, supõe-se que não haja correlação significativa, baseando-se na proximidade das medias encontradas para Senegal 55437 e L7 Bege, que são largamente tolerantes ao ambiente semiárido, e as rasteiras LViPe-06, LGoPE-06 e FM424B, que são sensíveis ao estresse hídrico. Para fins seletivos desse componente em um programa de melhoramento, a melhor indicação será em função da natureza genética do indivíduo e não do grupo botânico ao qual ele pertence.

Na Figura 6 estão representados os cromatogramas gerados para determinação e quantificação de tocoferóis para 2 genótipos estudados, um tolerante (BR1) e outro não tolerante (LViPE-06) à seca.

Figura 6. Cromatogramas dos tocoferóis quantificados pela técnica de HPLC-FLD para as amostras BR1 e LViPE-06.

A linearidade do método pode ser visualizada na Tabela 5, a qual foi obtida por meio de curvas analíticas. Foi utilizada uma faixa de concentração de 5 a 30 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (n=6 pontos) para o α -tocoferol, de 0,1 a 1,6 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (n=5 pontos) para β -tocoferol, de 10 a 30 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (n=5 pontos) para γ -tocoferol e de 0,25 a 4 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (n=5 pontos) para δ -tocoferol.

Tabela 5. Curvas analíticas ($y = ax - b$) para determinação de tocoferóis por HPLC

Tocoferol	Curva analítica	R^2
α -Tocoferol	$y = 458115x - 403410$	0,9969
β -Tocoferol	$y = 502473x - 4434,4$	0,9999
γ -Tocoferol	$y = 406160x - 322246$	0,9982
δ -Tocoferol	$y = 572172x - 13518$	0,9998

y = área do pico; x = concentração ($\mu\text{g.mL}^{-1}$); R^2 = coeficiente de determinação

Pode-se verificar que para o parâmetro linearidade foi possível quantificar de forma segura todos os 4 tipos de tocoferóis, uma vez que os coeficientes de correlação (R) apresentaram valores superiores a 0,990.

Os limites de detecção e quantificação (LD e LQ) podem ser visualizados na Tabela 6. Estes resultados revelaram detectabilidade elevada do método na determinação de tocoferóis nas amostras em estudo.

Tabela 6. Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) na determinação de tocoferóis por HPLC

Tocoferol	LD ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	LQ ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)
α -Tocoferol	0,0847	0,2567
β -Tocoferol	0,0129	0,0392
γ -Tocoferol	0,1546	0,4684
δ -Tocoferol	0,0041	0,0125

2.3.3. Composição química da fração fenólica

2.3.3.1. Teor de compostos fenólicos totais

Os teores de compostos fenólicos totais dos extratos de grãos despêculados de amendoim, expressos em equivalente de ácido gálico (EAG), variaram entre 18,66 (L7 Bege) a 28,50 (BR1) mg EAG.g⁻¹. De maneira geral, com exceção desses extremos, os teores dos demais genótipos estiveram muito próximos, na faixa de 21 mg EAG.g⁻¹, independente do tipo botânico avaliado (Tabela 7). O genótipo BR1 apresentou o maior teor de compostos fenólicos totais, variando de 24% a 35% acima dos demais genótipos investigados.

Segundo a base de dados Phenol Explorer, o amendoim possui em média 406,29 mg EAG/100 g (VOS et al, 2010). No estudo sobre a atividade antioxidante de extratos fenólicos de amendoim, nozes e pistache, Rosales-Martínez et al. (2014) encontraram diferenças significativas no teor de compostos fenólicos para variedades de amendoim do tipo Virgínea e Spanish, sendo que os valores de compostos fenólicos totais variaram de 301 e 370 mg EAG.100g⁻¹ de amendoim em base seca. Estes teores estão de acordo com os encontrados neste estudo, uma vez que o rendimento médio da fração fenólica foi de 14,30% (Tabela 2).

Tabela 7. Teor de compostos fenólicos totais em mg.g^{-1} (valores médios, $\pm$ DP, $n=3$) dos extratos dos sete genótipos de amendoim testados.

Genótipos	Compostos fenólicos totais (mg.g^{-1})
BR1	$28,50 \pm 0,85$
Senegal 55437	$20,86 \pm 1,13$
L7Bege	$18,66 \pm 0,64$
FM424B	$21,38 \pm 0,75$
LViPE06	$21,60 \pm 0,91$
LGoPE-06	$20,16 \pm 0,47$
Tatu	$20,63 \pm 1,01$

DP=Desvio Padrão; n=número de repetições utilizadas.

Os compostos fenólicos apresentam papel chave no processo de defesa celular. Nas plantas possuem funções antioxidantes em resposta ao estresse abiótico, complementando os papéis desempenhados pelo sistema antioxidante enzimático, com grande potencial para reduzir a ERO e evitar o dano celular (HATIER; GOULD, 2008; AGATI; TATTINI, 2010).

Aninbon et al, (2016b) avaliaram o efeito mediano da seca sobre os teores de compostos fenólicos em grãos de diferentes genótipos de amendoim e verificaram que os teores de compostos fenólicos aumentaram em folhas de amendoim e que o conteúdo desses compostos manteve-se estável em grãos de amendoim expostos ao estresse hídrico, revelando ser interessante a seleção simultânea de genótipos tolerantes à seca e com altos teores destes compostos, uma vez que o teor de compostos fenólicos permanecerá elevado mesmo sob condições de seca.

Os compostos fenólicos são conhecidos pelo seu impacto positivo na saúde humana, uma vez que atuam como agentes sequestrantes de radicais livres e ainda como ativadores do sistema antioxidante celular intrínseco, sendo interessante o consumo de alimentos ricos nesses compostos. Sendo assim, o genótipo BR1 estudado neste trabalho merece destaque, pois apresentou teores mais elevados de compostos fenólicos totais e possui ampla tolerância à seca.

2.3.3.2. Determinação simultânea de compostos fenólicos e atividade antioxidante *on-line* pela técnica hifenada de HPLC-DAD-UV

Na Tabela 8 e Figura 7 se encontram, respectivamente, o perfil dos compostos fenólicos e cromatograma da atividade antioxidante dos sete genótipos de amendoim estudados. O ácido cafeico e o ácido *p*-cumárico foram os compostos de maior ocorrência,

podendo ser identificados em todas as amostras de amendoim, já a rutina foi identificada apenas nas amostras BR1 e Tatu.

Tabela 8. Compostos fenólicos em μg de composto. g^{-1} de extrato de amendoim e atividade antioxidante *on-line* em μg de Trolox. g^{-1} de extrato de amendoim por HPLC-DAD-UV (valores médios, $\pm$ DP, n=3) dos sete genótipos de amendoim.

Genótipos																																									
BR1			Senegal 55437			L7 Bege			FM424B			LViPE 06			LGoPE-06			Tatu																							
Pico	Conteúdo	TEAC	Pico	Conteúdo	TEAC	Pico	Conteúdo	TEAC	Pico	Conteúdo	TEAC	Pico	Conteúdo	TEAC	Pico	Conteúdo	TEAC	Pico	Conteúdo	TEAC																					
1	nd	159,48±12,95	1	nd	101,92 ± 4,01	1	nd	60,30 ± 15,37	1	nd	76,07 ± 21,79	1	nd	55,28 ± 10,93	1 (Ác. Cafeíco)	150,18 ± 1,98	nd	1 (Ác. Cafeíco)	131,94 ± 34,02	nd																					
2	nd	99,00 ± 3,45	2	nd	146,52 ± 18,89	2 (Ác. Cafeíco)	188,20 ± 27,33	nd	2 (Ác. Cafeíco)	169,22 ± 94,98	nd	2 (Ác. Cafeíco)	123,85 ± 3,90	nd	2 (p-Cumárico)	165,13 ± 3,75	nd	2	nd	38,72 ± 6,20																					
3 (Ác. Cafeíco)	222,48 ± 2,42	nd	3	nd	50,07 ± 14,52	3 (p-Cumárico)	223,72 ± 19,72	nd	3 (p-Cumárico)	94,98 ± 4,20	nd	3 (p-Cumárico)	193,24 ± 6,38	nd	3	nd	40,80 ± 11,99	3	nd	73,83 ± 27,69																					
4	nd	66,08 ± 17,78	4 (ác. Cafeíco)	305,36 ± 7,58	nd	3	nd	37,85 ± 6,34	4	nd	32,99 ± 5,18	4	nd	47,86 ± 9,93	4	nd	218,23 ± 13,61	4 (p-Cumárico)	178,72 ± 28,32	nd																					
5	nd	40,10 ± 7,49	5 (p-Cumárico)	195,30 ± 1,66	nd	4	nd	173,14 ± 33,99	5	nd	36,76 ± 1,53	5	nd	206,07 ± 8,52	5 (Rutina)			5 (Rutina)	36,77 ± 8,17	nd																					
6 (p-Cumárico)	562,33 ± 18,15	nd	6	nd	40,81 ± 8,46				6	nd	137,49 ± 6,16							6	nd	42,73 ± 13,54																					
7 (Rutina)	49,33 ± 1,65	nd	7	nd	204,16 ± 14,40													7	nd	180,76 ± 38,78																					
8	nd	145,46 ± 8,78																																							
9	nd	162,23 ± 8,35																																							

DP=Desvio Padrão; n=número de repetições utilizadas; nd= não identificados.

Alguns dos componentes encontrados nesse estudo também foram relatados na literatura. Sales e Resurreccion (2010) reportaram presença de ácido cafeíco, ácido *p*-cumárico, ácido ferúlico, *trans*-resveratrol e quercetina em cultivares de amendoim Georgia do tipo Runner despelculados. Os teores para o ácido *p*-cumárico e ácido cafeíco foram de $35,2 \pm 3,80 \mu\text{g.g}^{-1}$ e de $0,51 \pm 0,03 \mu\text{g.g}^{-1}$, respectivamente, valores estes que são inferiores aos encontrados no presente estudo ($562,33 \pm 3,90$ a $94,98 \pm 4,20 \mu\text{g.g}^{-1}$ para ácido *p*-cumárico e $123,85 \pm 3,90$ a $305,36 \pm 7,58 \mu\text{g.g}^{-1}$ para ácido cafeíco).

Apesar de o ácido *p*-cumárico e o ácido cafeíco estarem presentes em quantidades significativas nas amostras, estes compostos não apresentaram atividade antioxidante quantificável por meio da reação com o radical ABTS; característica semelhante foi apresentada pela rutina (Tabela 8 e Figura 7). O genótipo BR1 apresentou maior quantidade de compostos com capacidade de sequestrar radicais de ABTS, enquanto que no LGoPE-06, a quantidade foi menor, indicando variabilidade dessa característica em função do tipo botânico. Na atividade antioxidante total apresentada pelas amostras (TEAC) (Tabela 9), verificou-se que os valores decrescentes foram identificados nos materiais com níveis diferenciados de tolerância à seca, sendo maiores nos mais tolerantes, BR1 (672,35) e Senegal 55437 (543,88) e menores nos subsequentes, Tatu (336,04), LViPE-06 (309,21), FM424B (283,31) e LGoPE-06 (259,03). Na L7 Bege, que é uma linhagem ereta e tolerante a seca, o valor obtido (271,29 μg de Trolox/g de extrato liofilizado) pode ser consequência de efeitos genéticos, uma vez que esse genótipo foi obtido por meio de cruzamento com a Senegal 55437 e a IAC Tupã, que é sensível à seca (NOGUEIRA; SANTOS, 2000).

Figura 7. Cromatogramas das sete amostras de amendoim testadas e sua atividade antioxidante detectadas a 320 nm e 350 nm (BR1 e Tatu) e 734 nm (pico negativo) respectivamente.

A linearidade do método para quantificação dos compostos fenólicos pode ser visualizada na Tabela 9, a qual foi obtida por meio de curvas analíticas. A faixa de concentração utilizada foi de 1,25 a 20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (n=5 pontos) para o ácido *p*-cumárico, de 0,625 a 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (n=5 pontos), para o ácido cafeíco de 0,297 a 4,75 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (n=5 pontos) para rutina e de 0,625 a 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (n=5 pontos) para o Trolox.

Tabela 9. Curvas analíticas ($y = ax - b$) para determinação de tocoferóis por HPLC

Padrões	Curva analítica	R ²
Ácido <i>p</i> -cumárico	$y = 244746x + 10752$	0,9999
Ácido cafeíco	$y = 153003x + 26467$	0,9998
Rutina	$y = 59512x + 3333,1$	0,9998
Trolox	$y = 120503x + 19387$	0,9987

y = área do pico; x = concentração ($\mu\text{g.mL}^{-1}$); R^2 = coeficiente de determinação

Verifica-se que para o parâmetro linearidade foi possível quantificar todos os 3 compostos fenólicos, bem como a sua atividade antioxidante, uma vez que os coeficientes de correlação (R) apresentaram valores superiores a 0,990.

Os limites de detecção e quantificação (LD e LQ) podem ser visualizados na Tabela 10. Os resultados mostraram elevada detectabilidade na quantificação dos compostos fenólicos das amostras em estudo.

Tabela 10. Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) na determinação de compostos fenólicos por HPLC

Padrões	LD ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	LQ ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)
Ácido <i>p</i> -cumárico	0,0405	0,1227
Ácido cafeíco	0,1106	0,3351
Rutina	0,0372	0,1127
Trolox	0,1620	0,4908

2.3.3.3. Avaliação do perfil de compostos fenólicos por espectrometria de massas de alta resolução (LC-ESI-LTQ-Orbitrap-MS)

Quatro amostras de amendoim, selecionados com base na tolerância à seca e atividade antioxidante, foram submetidas à análise de espectrometria de massas de alta resolução para a identificação dos compostos fenólicos presentes, de forma a complementar os resultados obtidos pela técnica de HPLC-DAD. Os genótipos selecionados foram o Senegal 55437 e BR1, genótipos tolerantes à seca que apresentaram melhor atividade antioxidante frente ao radical hipocloroso e radical peroxil, FM424B, genótipo médio tolerante e LGoPE-06,

genótipo não tolerante à seca que apresentou melhor atividade antioxidante frente ao radical hipocloroso e radical peroxil.

A Tabela 11 apresenta os compostos identificados nos extratos dos quatro genótipos de amendoim testados. Foram identificados 26 compostos no genótipo FM424B, 25 compostos nos genótipos BR1 e Senegal 55437 e 21 compostos no genótipo LGoPE-06.

O ácido 2,6-dihidroxibenzóico, o ácido 2,5-dihidroxibenzóico, a catequina, o ácido cafeíco, o ácido vanílico, a epicatequina, o ácido *p*-cumárico, o ácido *m*-cumárico, o ácido sinápico, a rutina e o ácido *o*-cumárico foram identificados por meio da comparação dos tempos de retenção e das suas massas com os padrões autênticos. Já os demais compostos foram identificados de forma tentativa, através das massas exatas, espectros MS/MS e fórmula molecular por comparação com a literatura (CAMARGO et al., 2015; MA et al., 2014; MELO et al., 2016; QUIFER-RADA et al., 2015; REGUEIRO et al., 2014). Foram identificados compostos das classes dos ácidos hidroxibenzóicos, ácidos hidroxicinâmicos, flavanois e flavonois.

2.3.3.3.1. Ácidos hidroxibenzóicos e derivados

Seis ácidos hidroxibenzóicos foram identificados por meio da varredura dos dados em modo FTMS. O ácido 2,6-dihidroxibenzóico (m/z 153,01879; -3,542 ppm) e o ácido 2,5-dihidroxibenzóico (m/z 153,01879; -3,542 ppm), identificados e confirmados por MS², mostraram a perda característica do grupamento COO [M-H⁻ 44]⁻ (HERAS et al., 2016; QUIFER-RADA et al., 2015) quando submetidos a MS². O ácido vanílico (m/z 167,03434; -3,844 ppm), além da perda do íon [M-H⁻ 44]⁻ mostrou uma fragmentação extra, com a perda do grupo metila [M-H⁻ 15]⁻, conforme também relatado em outros trabalhos (HERAS et al., 2016; QUIFER-RADA et al., 2015).

O ácido 4-hidroxibenzóico (137,02462; -3,776 ppm) apresentou íon molecular [M-H⁻ 137]⁻ e fragmento MS/MS de 93,03 m/z . O ácido protocatechuico-O-hexosido (m/z 315,07094; -3,857 ppm) mostrou a perda intacta do açúcar [MH⁻ 162]⁻ (HERAS et al., 2016).

Também foi identificado um composto derivado do ácido gálico (m/z 331,06575; -3.987ppm), que apresentou íon molecular [M-H⁻ 331]⁻ e fragmentos de MS/MS em m/z 169, correspondente ao ácido gálico, com perda de 162 unidades, que indica a liberação de glicose [MH⁻ 162]⁻.

O ácido vanílico e o ácido 4-hidroxibenzóico já foram relatados em amendoim (MA et al., 2014; PHAN-THIEN; WRIGHT; LEE, 2014), no entanto, tanto quanto se sabe, os

demais ácidos hidroxibenzóicos e derivados identificados acima, são relatados pela primeira vez nessa oleaginosa.

Os ácidos hidróxibenzóicos são fitoquímicos conhecidos por apresentar atividade antioxidante, no entanto, suas propriedades mais interessantes estão associadas à capacidade de modificar os processos de sinalização celular que introduzem um efeito multiplicador, como a ativação da via Nrf2, um dos principais mecanismos de defesa celular contra o estresse oxidativo, resultando assim num aprimoramento de mecanismos antioxidantes endógenos (JUURLINK et al., 2014). O ácido 2,5-dihidroxibenzóico também é conhecido por inibir a formação de prostaglandinas em resposta a lipopolissacarídeos (HINZ et al., 2000), através da inibição da atividade COX, sugerindo que alimentos ricos neste ácido podem ajudar a diminuir a probabilidade de ataques cardíacos devido à formação de coágulos (JUURLINK et al., 2014).

2.3.3.3.2. Ácidos hidroxicinâmicos e derivados

Doze ácidos hidroxicinâmicos foram identificados neste trabalho. Os ácidos hidroxicinâmicos apresentam uma estrutura C6-C3 com uma ligação dupla na cadeia lateral em configuração *cis* ou *trans* (HERAS et al., 2016).

A análise de dados em modo FTMS revelou a presença do ácido cafeíco (m/z 179,03432; -3,307 ppm), ácido cumárico (m/z 163,03975; -1,947ppm) e ácido sinápico (m/z 223,06046; -3,303ppm), que apresentaram a perda característica do íon $[M-H^- 44]^-$ (HERAS et al., 2016). Foi também identificado o ácido fertárico (m/z 325,05539; -3,000 ppm) e ácido coutárico (m/z 295,04546; -2.815 ppm) que apresentaram a perda do íon $C_4H_4O_5^{2-}$ $[M-H^- 132]^-$ correspondente ao ácido tártarico.

Foi encontrado um composto derivado do ácido cafeíco (m/z 341,08664; -3.416 ppm), que apresentou o íon molecular $[M-H^- 341]^-$ e fragmentos de MS/MS em m/z 179, correspondente ao ácido cafeíco. Mostrando assim, a perda de 162 unidades, que indicam a fragmentação da molécula do açúcar $[MH^- 162]^-$.

Todos os ácidos hidroxicinâmicos relatados já foram identificados em película de amendoim (CAMARGO et al., 2015; MA et al., 2014).

2.3.3.3.3. Flavanois e derivados

Cinco flavanois foram identificados através da análise dos cromatogramas no modo FTMS, dentre eles dois isômeros de flavanois e três isômeros de flavanois glicosilados. A catequina (m/z 289,07090; -2,115 ppm) e a epicatequina (m/z 289,07090; -2,115 ppm),

isômeros que são caracterizados por apresentar íon molecular $[M-H^- 289]^-$ e fragmentação MS/MS em m/z 245, m/z 205 e m/z 179 (MELO et al., 2016; REGUEIRO et al., 2014), e três isômeros de catequina-O-hexosídeo (m/z 451,12340; -2.626 ppm), que apresentaram a perda da fração de açúcar $[M-H^- 162]^-$ no espectro de MS^2 , característica esta já relatada em outros estudos (QUIFER-RADA et al., 2015).

A catequina e a epicatequina já foram identificadas em película de amendoim (BANSODE et al., 2014; CHUKWUMAH et al., 2012; CAMARGO et al., 2015; LARRAURI et al., 2016; MA et al., 2014; SARNOSKI et al., 2012), contudo, este é o primeiro relato da catequina-O-hexosídeo em grãos despelculados de amendoim.

As catequinas são um grupo de compostos polifenólicos encontrados extensivamente nas plantas, que apresentam diversas atividades bioativas, como a ação anti-oxidante, anti-cancerígena, antimutagênica, entre outras (GADKARI; BALARAMAN, 2015), sendo interessante a ingestão de alimentos que contenham esses compostos.

2.3.3.3.4. Flavonóis e derivados

O exame dos cromatogramas no modo FTMS revelou a presença de três flavanóis em amendoim. A rutina (m/z 609,14440; -2.804 ppm) e a isorhamnetina-3-O-rutinosídeo (m/z 623,16015; -2.580 ppm) que foram caracterizados pela perda do íon $C_{12}H_{20}O_{92}^-$ $[M-H^- 308]^-$, correspondente ao rutinosídeo e a isoquercetina (m/z 463,08772; -3.583 ppm) que foi caracterizada pela perda da porção de açúcar $[M-H^- 162]^-$. Os três flavonóis identificados nestas amostras já foram também identificados em película de amendoim (BANSODE et al., 2014; LARRAURI et al., 2016).

Tabela 11. Compostos identificados em amendoim contrastantes quanto à tolerância ao estresse hídrico por LC-ESI-LTQ-Orbitrap-MS/MS

Compostos	tr (min)	Fórmula Molecular	Massa exata	[M-H] ⁻	Erro (ppm)	Fragmentos (m/z)	Genótipo
Protocatechuic acid-O-hexoside	4,49	C ₁₃ H ₁₆ O ₉	316,07822	315,07094	-3,857	153,02; 109,03	BR1; Senegal 55437; FM424B; LGoPE-06
Gallic acid derivative	4,61	C ₁₃ H ₁₆ O ₁₀	332,07303	331,06575	-3,987	169,01	Senegal 55437; FM424B; LGoPE-06
2,6-dihydroxybenzoic acid*	4,80	C ₇ H ₆ O ₄	154,02607	153,01879	-3,542	109,03; 153,02	BR1; Senegal 55437; FM424B; LGoPE-06
Catechin-O-hexoside (Isomer 1)	6,72	C ₂₁ H ₂₄ O ₁₁	452,13068	451,12340	-2,626	289,07; 245,08	BR1; Senegal 55437; FM424B
2,5-dihydroxybenzoic acid*	7,66	C ₇ H ₆ O ₄	154,02607	153,01879	-3,542	109,03; 153,02	BR1; Senegal 55437; FM424B; LGoPE-06
Catechin-O-hexoside (Isomer 2)	8,15	C ₂₁ H ₂₄ O ₁₁	452,13068	451,12340	-2,626	289,07; 245,08	BR1; Senegal 55437; FM424B; LGoPE-06
Catechin-O-hexoside (Isomer 3)	8,86	C ₂₁ H ₂₄ O ₁₁	452,13068	451,12340	-2,626	289,07; 245,08	BR1; Senegal 55437; FM424B
Coutaric acid (isomer 1)	8,95	C ₁₃ H ₁₂ O ₈	296,05274	295,04546	-1,629	163,04	BR1; Senegal 55437; FM424B; LGoPE-06
Coumaric acid derivate (isomer 1)	9,02	C ₉ H ₈ O ₃	164,04703	163,03975	-1,947	119,05; 163,04	BR1; Senegal 55437; FM424B; LGoPE-06
Catechin*	9,36	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	290,07818	289,07090	-2,115	245,08; 205,05; 179,03	BR1; Senegal 55437; FM424B
Caffeic acid*	10,19	C ₉ H ₈ O ₄	180,04160	179,03432	-3,307	135,05	BR1; Senegal 55437; FM424B; LGoPE-06
Vanillic acid*	10,36	C ₈ H ₈ O ₄	168,04162	167,03434	-3,844	123,04; 108,02	BR1; Senegal 55437; FM424B; LGoPE-06
Fertaric acid (isomer 1)	10,47	C ₁₄ H ₁₄ O ₉	326,06267	325,05539	-3,431	193,05	BR1; Senegal 55437; FM424B; LGoPE-06
Caffeic acid derivative	11,27	C ₁₅ H ₁₈ O ₉	342,09392	341,08664	-3,416	179,06	BR1; Senegal 55437; FM424B; LGoPE-06
Coumaric acid derivate (isomer 2)	11,64	C ₉ H ₈ O ₃	164,04703	163,03975	-1,947	119,05; 163,04	BR1; Senegal 55437; FM424B; LGoPE-06
Coutaric acid (isomer 2)	11,64	C ₁₃ H ₁₂ O ₈	296,05274	295,04546	-2,815	163,04	BR1; Senegal 55437; FM424B; LGoPE-06
Epicatechin*	12,02	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	290,07818	289,07090	-2,980	245,08; 205,05; 179,03	BR1; FM424B
<i>p</i> -Coumaric acid*	12,89	C ₉ H ₈ O ₃	164,04703	163,03975	-1,947	119,05	BR1; Senegal 55437; FM424B; LGoPE-06
Fertaric acid (isomer 2)	12,92	C ₁₄ H ₁₄ O ₉	326,06267	325,05539	-3,000	193,05	BR1; Senegal 55437; FM424B; LGoPE-06
<i>m</i> -Coumaric acid*	14,98	C ₉ H ₈ O ₃	164,04703	163,03975	-1,947	119,05	BR1; Senegal 55437; FM424B; LGoPE-06
Sinapic acid*	15,22	C ₁₁ H ₁₂ O ₅	224,06774	223,06046	-3,303	179,07	BR1; Senegal 55437; FM424B; LGoPE-06
Rutin*	15,45	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	610,15168	609,14440	-2,804	301,03	BR1; Senegal 55437; FM424B; LGoPE-06
4-hydroxybenzoic acid	15,61	C ₇ H ₆ O ₃	138,03190	137,02462	-3,776	93,03	BR1; Senegal 55437; FM424B; LGoPE-06
Isoquercetin	15,83	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	464,09500	463,08772	-3,583	301,03; 300,03	BR1; Senegal 55437; FM424B
<i>o</i> -Coumaric acid*	16,43	C ₉ H ₈ O ₃	164,04703	163,03975	-1,947	119,05	BR1; Senegal 55437; FM424B; LGoPE-06
Isorhamnetin-3-O-rutinoside	17,12	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₆	624,16743	623,16015	-2,580	315,05	BR1; Senegal 55437; FM424B; LGoPE-06

* identificação também foi realizada por padrões; tr= tempo de retenção.

2.3.4. Capacidade de desativação de espécies reativas de oxigênio

2.3.4.1. Sequestro do ácido hipocloroso (HOCl) e do radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$)

A Tabela 12 apresenta a capacidade de sequestro do ácido hipocloroso dos diferentes genótipos de amendoim analisados. Os resultados desse ensaio estão apresentados como EC_{50} , ou seja, a quantidade de amostra necessária para desativar 50% das espécies reativas presentes no meio reacional.

Todos os extratos dos sete genótipos de amendoim testados mostraram capacidade para sequestrar o ácido hipocloroso, no entanto, nenhuma amostra apresentou atividade para desativação do ânion superóxido.

Tabela 12. Sequestro do ácido hipocloroso em $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (valores médios, $\pm$ DP, $n=3$) dos extratos dos sete genótipos de amendoim testados.

Genótipos	Ácido hipocloroso EC_{50} ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)
BR1	$19,54 \pm 0,55$
Senegal 55437	$20,05 \pm 0,52$
L7 Bege	$21,31 \pm 2,99$
FM424B	$15,63 \pm 0,23$
LViPE-06	$19,80 \pm 0,62$
LGoPE-06	$14,06 \pm 1,36$
Tatu	$33,95 \pm 4,40$

DP=Desvio Padrão; n=número de repetições utilizadas.

A capacidade das amostras para desativar o HOCl variou de 14,06 a 33,95 $\mu\text{g/mL}$ de extrato fenólico (EC_{50}), a qual é superior a capacidade apresentada para o bagaço de uva Chenin Blanc (128 $\mu\text{g/mL}$) e semelhante a do bagaço de uva Petit Verdot (17 $\mu\text{g/mL}$) (MELO et al., 2015). Os extratos ainda apresentaram capacidade antioxidante superior à exibida para o Trolox (134 $\mu\text{g/mL}$) (RODRIGUES; MARIUTTI; MERCADANTE, 2013), para o ácido *p*-cumárico (74,25 $\mu\text{g/mL}$) e semelhante a do ácido cafeíco (17,69 $\mu\text{g/mL}$) (RODRIGUES; TOLEDO BENASSI; BRAGAGNOLO, 2014).

As amostras LGoPE-06, FM424B, BR1 e LViPE-06 demonstraram as maiores capacidades de desativação do ácido hipocloroso, pois apresentaram os menores valores de EC_{50} , já a amostra Tatu foi a que demonstrou menor capacidade de desativação dessa espécie. A atividade antioxidante exibida pelos genótipos LGoPE-06 e FM424B foram cerca do dobro da atividade antioxidante exibida pelo genótipo Tatu (Tabela 13).

Os padrões quercetina, ácido gálico e *p*-cumárico também foram testados contra a desativação do HOCl e apresentaram valores de 0,43; 5,59 e 221,64 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente.

As amostras estudadas apresentaram capacidade de sequestro do ácido hipocloroso inferiores aos padrões quercetina e ácido gálico, mas superiores ao ácido *p*-cumárico, composto fenólico presente em todas as amostras estudadas.

2.3.4.2. Sequestro do radical peroxil (ROO•)

A atividade antioxidante para o sequestro do radical peroxil dos extratos de todos os genótipos, expressos em equivalente de Trolox (TE), encontram-se na Tabela 13.

Tabela 13. Sequestro do radical peroxil em μmol de Trolox. g^{-1} (valores médios, $\pm$ DP, $n=3$) dos extratos dos sete genótipos de amendoim.

Genótipos	$\mu\text{molTE.g}^{-1}$ de extrato
BR1	794,23 $\pm$ 59,66
Senegal 55437	209,91 $\pm$ 52,29
L7Bege	186,97 $\pm$ 86,08
FM424B	365,90 $\pm$ 32,09
LViPE-06	241,75 $\pm$ 46,98
LGoPE-06	389,17 $\pm$ 15,92
Tatu	381,59 $\pm$ 39,66

DP=Desvio Padrão; n=número de repetições utilizadas.

A capacidade antioxidante das amostras para desativar o radical peroxil variou entre 186,97 e 794,23 $\mu\text{molTE.g}^{-1}$ de extrato fenólico, valores superiores aos encontrados para extratos de ervilha (5,90 e 8,35 $\mu\text{molTE.g}^{-1}$) (XU; YUAN; CHANG, 2007).

Craft et al. (2010) avaliaram o sequestro do radical peroxil de genótipos de amendoim comerciais despelculados do tipo Runner, Spanish e Gregory de diferentes safras e encontraram valores que variaram de 15,27 a 40,05 $\mu\text{molTE.g}^{-1}$ de grãos, valores estes que se aproximam dos encontrados neste estudo, uma vez que o rendimento do extrato etanólico foi de 14,30%.

O genótipo BR1 se destacou dos demais por apresentar a maior capacidade sequestrante do radical peroxil, sendo este valor cerca do dobro do valor apresentado para os genótipos LGoPE-06, Tatu e FM424B, genótipos com maior atividade antioxidante excluindo-se a BR1, entretanto, não foi observado o mesmo padrão para Senegal 55437 e L7 Bege, que também são de porte ereto e tolerantes à seca, indicando não haver correlação direta entre a atividade antioxidante frente ao radical peroxil e o tipo botânico e tolerância à seca.

Em ordem decrescente, os genótipos que apresentaram melhor capacidade de desativação do radical peroxil foram: BR1 > LGoPE-06 > Tatu > FM424B > LViPE 06 >

Senegal 55437 > L7Bege. Já os genótipos que apresentaram melhor capacidade de desativação do ácido hipocloroso foram: LGoPE-06 > FM424B > BR1 > LViPE 06 > Senegal 55437 > L7Bege > Tatu. Verifica-se que os genótipos que apresentaram as maiores atividades nos diferentes métodos não são os mesmos. Isto demonstra a importância de se avaliar as amostras frente a diferentes métodos, uma vez que os compostos presentes podem variar quantitativamente e a atuação destes frente aos diferentes radicais ser distinta.

2.3.5. Análise de Cluster e Componentes Principais

2.3.5.1. Agrupamento de genótipos com base nos compostos com propriedades antioxidantes

Com base no conjunto de dados obtidos a partir da composição lipídica, fenólica e potencial antioxidante dos grãos de amendoim, foi realizada uma análise de agrupamento pelos métodos UPGMA e CP, para classificar os genótipos quanto ao perfil antioxidante e de ácidos graxos.

Na Figura 8 se encontra o dendrograma obtido a partir da matriz gerada com os compostos com atividade antioxidante (Teor de compostos fenólicos totais; Capacidade de sequestro do radical peroxil e ácido hipocloroso; Teor de ácido *p*-cumárico, ácido cafeico e rutina e Teor de tocoferóis). Dois grupos de genótipos de amendoim foram obtidos, sendo o um constituído apenas pela BR1 e o outro pelos demais genótipos. Essa classificação está coerente com os resultados observados anteriormente, visto que a composição química da BR1 foi, no geral, distinta da maioria dos materiais avaliados.

Figura 8. Dendrograma obtido pelo método de agrupamento hierárquico UPGMA, a partir da matriz gerada com compostos com atividade antioxidante de sete genótipos de amendoim. Coeficiente de correlação cofonético: 0,98. Linha pontilhada índice de similaridade genética de 80% ($p \leq 0.01$).

A Tabela 14 mostra os autovalores, variação individual (%) e variação acumulada associada a CP, com base nos dados dos compostos com propriedades antioxidantes obtidos a partir de grãos de sete genótipos de amendoim. Os dois primeiros CPs explicaram aproximadamente 83% da variância total ($VI1 = 68,41\%$; $VI2 = 14,57\%$), permitindo que toda variância seja plotada em um plano de dispersão gráfica de nível 2D (Figura 9).

Tabela 14. Elementos de variância obtidos a partir de componentes principais com base na matriz formada pelos compostos com atividade antioxidante em grãos de amendoim.

CP	AV	VI (%)	VA (%)
1	7.52	68.41	68.41
2	1.60	14.57	82.98
3	0.86	7.90	90.89
4	0.70	6.38	97.27
5	0.21	1.98	99.25
6	0.08	0.74	100.0

CP= componente principal; AV= autovalores; VI= variância individual; VA= variância acumulada.

Com base no gráfico de dispersão (Figura 9), foram formados três grupos, que apresentam a seguinte composição: grupo 1 – formado por LGoPE-06, LViPE-06, FM424B, Senegal 55437 e L7 Bege. Em comum, esses genótipos possuem grãos de coloração clara (bege) e apenas dois grãos por vagem; grupo 2 – formado pela cv. Tatu, um material de porte ereto, com adaptação a clima tropical, e grupo 3 – que conteve apenas a cv. BR1, de ciclo precoce e larga adaptação a ambientes com restrição hídrica (SANTOS; LIMA; FREIRE, 2013; (DUARTE; MELO FILHO; SANTOS, 2013). Apesar das nuances metodológicas que definem os dois métodos, ambos identificaram a BR1 como o genótipo mais divergente, baseando-se nas variáveis adotadas.

Figura 9. Dispersão gráfica, em relação a dois eixos que representam os dois primeiros componentes principais (CP1 e CP2), obtidos a partir dos compostos com atividade antioxidante dos grãos de amendoim.

1= BR1; 2= LViPE-06; 3= Senegal 55437; 4= Tatu; 5= FM424B; 6= LGoPE-06; 7= L7 Bege.

A contribuição relativa (CR) dos compostos com atividade antioxidante para a divergência genética dos sete genótipos de amendoim é apresentada na Tabela 15. Estes valores foram estimados de acordo com o método de Singh (SINGH, 1981), que compara a contribuição relativa de cada componente com a distância total. A rutina, ácido cafeico e o teor total de tocoferóis, foram os componentes mais contributivos para a diferenciação dos genótipos. A BR1 apresentou alta concentração destes compostos, agregando valor à qualidade nutracêutica de seus grãos.

A rutina, um flavonol abundantemente encontrado em plantas, é conhecido por diversas atividades farmacológicas, dentre elas, efeito neuroprotetor, atividade anticonvulsiva, efeitos antidepressivos, anticâncer, antiagregação plaquetária, entre outros (GANESHPURKAR; SALUJA, 2017). O ácido cafeico é conhecido por apresentar, além de atividade antioxidante, atividade anti-inflamatória (WANG et al., 2013) e os tocoferóis, são relatados para prevenção de Alzheimer (MORRIS et al., 2005).

Levando em consideração a importância nutricional do amendoim, a sua composição bioativa e os benefícios que o consumo destes compostos pode trazer para o organismo, a seleção de genótipos como o BR1, que possuem tolerância à seca e altos teores de compostos que apresentam atividade antioxidante, pode ser de grande valor para agricultores e consumidores desta oleaginosa.

Tabela 15. Contribuição relativa dos compostos com atividade antioxidante para a divergência genética dos sete genótipos de amendoim.

Compostos com atividade antioxidante	CR (%)	Valores
Compostos fenólicos totais	7.82	4.32
ORAC	8.79	4.85
Ácido hipocloroso	7.94	4.39
Ácido p-cumárico	8.00	4.42
Ácido cafeico	9.19	5.08
Rutina	14.18	7.84
α -tocoferol	8.30	4.58
β -tocoferol	8.98	4.96
γ -tocoferol	8.82	4.87
δ -tocoferol	8.88	4.91
Total tocoferol	9.04	5.00

2.3.5.2. Agrupamento de genótipos com base nos ácidos graxos

Na Figura 10 encontra-se o agrupamento dos genótipos pelo método UPGMA com base nos ácidos graxos determinados nas amostras. Dois grupos foram formados, um representado por BR1, L7 Bege, Senegal 55437, Tatu e LViPE-06, e o outro por FM424B e LGoPE-06.

Figura 10. Dendrograma obtido pelo método de agrupamento hierárquico UPGMA, a partir da matriz gerada com ácidos graxos de sete genótipos de amendoim. Coeficiente de correlação cofonético: 0,84. Linha pontilhada índice de similaridade genética de 90% ($p \leq 0.01$).

A Tabela 16 mostra os autovalores, variação individual (%) e variação acumulada associada ao CP, com base nos dados dos ácidos graxos de grãos de sete genótipos de amendoim. Os dois primeiros CP explicaram aproximadamente 93% da variância total ($VI_1 = 68,41\%$; $VI_2 = 26,53\%$) e toda variância foi plotada em uma dispersão gráfica de nível 2D (Figura 11).

Tabela 16. Elementos de variância obtidos a partir de componentes principais com base na matriz formada pelos ácidos graxos em grãos de amendoim.

CP	AV	VI (%)	VA (%)
1	8.72	67.08	67.08
2	3.44	26.53	93.62
3	0.67	5.18	98.80
4	0.07	0.58	99.39
5	0.04	0.34	99.73
6	0.03	0.26	100.0

CP= componente principal; AV= autovalores; VI= variância individual; VA= variância acumulada.

Com base no gráfico de dispersão, a classificação dos genótipos foi mais definida do que a obtida via UPGMA (Figura 10), sendo formada por três grupos, o primeiro composto só por genótipos de porte ereto (BR1, L7 Bege, Senegal 55437 e Tatu), e os demais por materiais rasteiros.

Figura 11. Dispersão gráfica, em relação a dois eixos que representam os dois primeiros componentes principais (CP1 e CP2), obtidos a partir dos ácidos graxos dos grãos de amendoim.

1= BR1; 2= LViPE-06; 3= Senegal 55437; 4= Tatu; 5= FM424B; 6= LGoPE-06; 7= L7 Bege

A contribuição relativa (CR) dos ácidos graxos para a divergência genética dos sete genótipos de amendoim é exibida na Tabela 17. As maiores percentagens em relação aos ácidos graxos foram identificadas na soma de ácidos graxos saturados (Σ SA), soma de ácidos graxos monoinsaturados (Σ MUFA), ácido oleico (C18:1), ácido lignocérico (C24:0) e relação oleico/linoleico (O/L). Os genótipos LGoPE-06, FM424B foram os que apresentaram teores

mais elevados de ácidos graxos saturados, ácidos graxos monoinsaturados e ácido lignocérico, e, juntamente com o genótipo LViPE-06, foram os que apresentaram teores mais elevados de ácido oleico e relação O/L.

Tabela 17. Contribuição relativa dos ácidos graxos para a divergência genética dos sete genótipos de amendoim.

Ácidos graxos	CR (%)	Valores
C _{16:0}	6.04	4.43
C _{18:0}	7.51	5.50
C _{18:1}	8.38	6.15
C _{18:2}	7.38	5.41
C _{20:0}	7.53	5.52
C _{20:1}	6.83	5.01
C _{22:0}	7.19	5.27
C _{24:0}	8.25	6.05
Total ácidos graxos	7.61	5.58
O/L	8.16	5.98
Σ SFA	9.10	6.67
Σ PUFA	7.15	5.25
Σ MUFA	8.81	6.46

Os ácidos graxos desempenham um importante papel no metabolismo do colesterol e, portanto, podem estar associados a doenças cardiovasculares em humanos, além de desempenharem um importante papel na estabilidade dos óleos. O alto índice de ácidos graxos monoinsaturados e poli-insaturados torna os óleos mais susceptíveis às alterações oxidativas (PAUL; MITTAL; CHINNAN, 1997). A maior proporção oleico/linoleico está associada com uma maior vida de prateleira e maior resistência à rancificação (SINGKHAM et al., 2010), uma vez que um maior teor de ácido oleico e menor de linoleico implica em menos ligações insaturadas e, portanto, maior estabilidade oxidativa. Além disso, segundo as diretrizes sobre prevenção de doenças cardiovasculares da União Europeia de 2016, o consumo de ácidos graxos saturados está intimamente relacionado ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares, sendo que o risco ao desenvolvimento desta doença é reduzido em 2-3%, quando 1% da ingestão de energia a partir de ácidos graxos saturados é substituída por ácidos graxos poliinsaturados.

Os MUFAs, apesar de pouca evidência quanto à redução do risco de doenças cardiovasculares, têm um efeito favorável nos níveis de HDL-C (PIEPOLI et al., 2016).

Considerando essa amplitude de contribuição, a adoção desses genótipos para um programa de melhoramento para este fim torna-se distinta em função da finalidade nutricional que será designada ao grão.

2.3. CONCLUSÃO

Os genótipos de amendoim estudados apresentaram teores consideráveis de ácidos graxos monoinsaturados em sua constituição, e relação oleico/linoleico mais elevada para os genótipos rasteiros. Também apresentaram quantidades significativas de tocoferóis, sendo o α -tocoferol e γ -tocoferol presentes em maiores quantidades, com destaque para o genótipo BR1, que apresentou maior teor total de tocoferol. O ácido *p*-cumárico, ácido cafeico e a rutina foram os ácidos fenólicos identificados e quantificados pela técnica de HPLC-DAD. Foram também identificados 26 compostos fenólicos por meio da técnica de espectrometria de massas de alta resolução, sendo quatro deles (ácido 2,6-dihidroxibenzóico, ácido 2,5-dihidroxibenzóico, ácido protocatecuico-O-hexosídeo e catequina-O-hexosídeo) encontrados pela primeira vez em amendoim. As amostras de amendoim apresentaram capacidade para o sequestro do radical peroxil e do ácido hipocloroso, contudo, não apresentaram capacidade para desativar o radical superóxido. Foi revelada distinção de características entre os genótipos estudados. As variáveis analisadas permitiram identificar a cultivar BR1 como o genótipo mais divergente frente aos compostos com propriedades antioxidantes e permitiram identificar os genótipos do tipo ereto como diferentes dos genótipos do tipo rasteiro de acordo com o perfil de ácidos graxos apresentados.

REFERÊNCIAS

- AGATI, G.; TATTINI, M. Letters Multiple functional roles of flavonoids in photoprotection. **New Phytologist**, v. 186, p. 786–793, 2010.
- AL-DUAIS, M. et al. Antioxidant capacity and total phenolics of *Cyphostemma digitatum* before and after processing: Use of different assays. **European Food Research and Technology**, v. 228, n. 5, p. 813–821, 2009.
- ANINBON, C. et al. 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, 2016a.
- ANINBON, C. et al. Effect of mid season drought on phenolic compounds in peanut genotypes with different levels of resistance to drought. **Field Crops Research**, v. 187, p. 127–134, 2016b.
- ARRANZ, S. et al. Comparison between free radical scavenging capacity and oxidative stability of nut oils. **Food Chemistry**, v. 110, n. 4, p. 985–990, 2008.

- ARYA, S. S.; SALVE, A. R.; CHAUHAN, S. Peanuts as functional food: a review. **Journal of Food Science and Technology**, v. 53, n. 1, p. 31–41, 2016.
- AZZI, A. Molecular aspects of medicine many tocopherols, one vitamin E. **Molecular Aspects of Medicine**, v. In press, p. 1–12, 2017.
- BANSODE, R. R. et al. Bioavailability of polyphenols from peanut skin extract associated with plasma lipid lowering function. **Food Chemistry**, v. 148, p. 24–29, 2014.
- BOLLING, B. W.; MCKAY, D. L.; BLUMBERG, J. B. The phytochemical composition and antioxidant actions of tree nuts. **Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition**, v. 19, n. 1, p. 117–123, 2010.
- BRASIL. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 61 da Anvisa, de 3 de fevereiro de 2016. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos de ensaios biológicos, microbiológicos, imunológicos, de identificação, quantitativos para a determinação de impurezas, ensaios limite para o controle de impurezas, ensaios quantitativos para a determinação de insumos farmacêuticos em amostras de matérias-primas ou de medicamentos em todas as suas fases de produção, e dá outras providências. Órgão emissor: ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em: <http://www.inmetro.gov.br/barreirastecnicas/pontofocal/textos/regulamentos/BRA_666.pdf>. Acesso em 18 de Agosto de 2017.
- CAMARGO, A. C. et al. 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.
- CARDIOLOGIA, S. B. DE. IV Diretriz brasileira sobre dislipidemias e prevenção da aterosclerose. Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 88, n. SUPL.1, p. 2–19, 2007.
- CHUKWUMAH, Y. et al. Profiling of bioactive compounds in cultivars of Runner and Valencia peanut market-types using liquid chromatography/AtolerânciaI mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 132, n. 1, p. 525–531, 2012.
- CRAFT, B. D. et al. Antioxidant properties of extracts obtained from raw, dry-roasted, and oil-roasted US peanuts of commercial importance. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 65, n. 3, p. 311–318, 2010.
- CRUZ, C. D. GENES - a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. **Acta Scientiarum**, v. 35, n. 3, p. 271–276, 2013.
- DUARTE, E. A. A.; MELO FILHO, P. DE A.; SANTOS, R. C. Características agronômicas e índice de colheita de diferentes genótipos de amendoim submetidos a estresse hídrico.

- Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 17, n. 8, p. 843–847, 2013.
- ESPINOZA, A. et al. Engineered drought-induced biosynthesis of α -tocopherol alleviates stress-induced leaf damage in tobacco. **Journal of Plant Physiology**, v. 170, n. 14, p. 1285–1294, 2013.
- FRANCISCO, M. L. D. L.; RESURRECCION, A. V. A. Functional components in peanuts. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 48, n. 8, p. 715–746, 2008.
- GADKARI, P. V.; BALARAMAN, M. Catechins: Sources, extraction and encapsulation: A review. **Food and Bioproducts Processing**, v. 93, p. 122–138, 2015.
- GANESHPURKAR, A.; SALUJA, A. K. The pharmacological potential of rutin. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 25, p. 149–164, 2017.
- HARTMAN, L.; LAGO, B.C.A. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. **Laboratory Practice**, v.22, p.475-477, 1973.
- HASHIM, I. B. et al. Fatty acid composition and tocopherol content of drought stressed florunner peanuts. **Peanut Science**, v. 20, p. 21–24, 1993.
- HATIER, J. H.; GOULD, K. S. Foliar anthocyanins as modulators of stress signals Possible. **Journal of Theoretical Biology journal**, v. 253, p. 625–627, 2008.
- HERAS, R. M. LAS et al. Polyphenolic profile of persimmon leaves by high resolution mass spectrometry (LC-ESI-LTQ-Orbitrap-MS). **Journal of Functional Foods**, v. 23, p. 370–377, 2016.
- HINZ, B. et al. Salicylate metabolites inhibit cyclooxygenase-2-dependent prostaglandin e2 synthesis in murine macrophages. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 274, n. 1, p. 197–202, 2000.
- JONNALA, R. S.; DUNFORD, N. T.; DASHIELL, K. E. Tocopherol, phytosterol and phospholipid compositions of new high oleic peanut cultivars. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 19, n. 6–7, p. 601–605, 2006.
- JUURLINK, B. H. J. et al. Hydroxybenzoic acid isomers and the cardiovascular system. **Nutrition Journal**, v. 13, n. 63, p. 1–10, 2014.
- KATAM, R. et al. Comparative leaf proteomics of drought-tolerant and -susceptible peanut in response to water stress. **Journal of Proteomics**, v. 143, p. 209–226, 2016.
- KAVERA; NADAF, H. L.; HANCHINAL, R. R. Near infrared reflectance spectroscopy (NIRS) for large scale screening of fatty acid profile in peanut (*Arachis hypogaea* L.). **Legume Research**, v. 37, n. 3, p. 272–280, 2014.
- KOLEVA, I. I.; NIEDERLÄNDER, H. A. G.; VAN BEEK, T. A. Application of ABTS radical cation for selective on-line detection of radical scavengers in HPLC eluates.

Analytical Chemistry, v. 73, n. 14, p. 3373–3381, 2001.

LARRAURI, M. et al. 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.

LOU, H. et al. Polyphenols from peanut skins and their free radical-scavenging effects. **Phytochemistry**, v. 65, n. 16, p. 2391–2399, 2004.

LOYOLA, J. et al. Plastidic isoprenoid biosynthesis in tomato : physiological and molecular analysis in genotypes resistant and sensitive to drought stress. **Plant biology**, v. 14, p. 149–156, 2012.

MA, Y. et al. Separation and characterization of soluble esterified and glycoside-bound phenolic compounds in dry-blanching peanut skins by liquid chromatography – electrospray ionization mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1356, p. 64–81, 2014.

MARTÍN, M. P.; NEPOTE, V.; GROSSO, N. R. Chemical, sensory, and microbiological stability of stored raw peanuts packaged in polypropylene ventilated bags and high barrier plastic bags. **LWT - Food Science and Technology**, v. 68, p. 174–182, 2016.

MELO, P. S. et al. 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.

MELO, P. S. et al. Antioxidative and prooxidative effects in food lipids and synergism with α -tocopherol of açai seed extracts and grape rachis extracts. **Food Chemistry**, v. 213, p. 440–449, 2016.

MIRALIKBARI, H.; SHAHIDI, F. Lipid class compositions, tocopherols and sterols of tree nut oils extracted with different solvents. **Journal of Food Lipids**, v. 15, n. 1, p. 81–96, 2008.

MORRIS, M. C. et al. Relation of the tocopherol forms to incident Alzheimer disease and to cognitive change 1 – 3. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 81, p. 508–514, 2005.

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

NOGUEIRA, R. J. M. C.; SANTOS, R. C. Alterações fisiológicas no amendoim submetido ao estresse hídrico. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 4, n. 1, p. 41–45, 2000.

PODDA, M. et al. Simultaneous determination of tissue tocopherols , tocotrienols , ubiquinol, and ubiquinones. **Journal of lipid research**, v. 37, p. 893–901, 1996.

- PAUL, S.; MITTAL, G.S.; CHINNAN, M.S. Regulating the use of degraded oil/fat in Deep-fat/oil food frying. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 31, n. 7, p. 635-662, 1997.
- PEREIRA, W. J. DE L. et al. Assessment of drought tolerance of peanut cultivars based on physiological and yield traits in a semiarid environment. **Agricultural Water Management**, v. 166, p. 70–76, 2016.
- PHAN-THIEN, K. Y.; WRIGHT, G. C.; LEE, N. A. Peanut antioxidants: Part 2. Quantitation of free and matrix-bound phytochemicals in five selected genotypes with diverse antioxidant capacity by high performance liquid chromatography (HPLC). **LWT - Food Science and Technology**, v. 57, n. 1, p. 312–319, 2014.
- PIEPOLI, M. F. et al. 2016 European Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice. The sixth joint task force of the European Society of Cardiology. **European Heart Journal**, v. 37, p. 2315–2381, 2016.
- QUIFER-RADA, P. et al. A comprehensive characterisation of beer polyphenols by high resolution mass spectrometry (LC-ESI-LTQ-Orbitrap-MS). **Food Chemistry**, v. 169, p. 336–343, 2015.
- REGUEIRO, J. et al. Comprehensive identification of walnut polyphenols by liquid chromatography coupled to linear ion trap-Orbitrap mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 152, p. 340–348, 2014.
- RODRIGUES, A. C. et al. The effect of genotype and roasting on the fatty acid composition of peanuts. **Food Research International**, v. 44, n. 1, p. 187–192, 2011.
- RODRIGUES, E.; MARIUTTI, L. R. B.; MERCADANTE, A. Z. Carotenoids and phenolic compounds from *Solanum sessiliflorum*, an unexploited amazonian fruit, and their scavenging capacities against reactive oxygen and nitrogen species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 12, p. 3022–3029, 2013.
- RODRIGUES, N. P.; TOLEDO BENASSI, M.; 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.
- ROSALES-MARTÍNEZ, P. et al. Comparison between antioxidant activities of phenolic extracts from mexican peanuts, peanuts skins, nuts and pistachios. **Journal of the Mexican Chemical Society**, v. 58, n. 2, p. 185–193, 2014.
- 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, n. 3, p. 795–803, 2010.

- SANTOS, R.C.; FREIRE, R.M.M.; LIMA, L.M. **O agronegócio do amendoim no Brasil**. EMBRAPA. 2ª ed. Brasília, DF. 2013. 585p.
- SANTOS, R. C. et al. Produtividade de grãos e óleo de genótipos de amendoim para o mercado oleoquímico. **Revista Ciencia Agronomica**, v. 43, n. 1, p. 72–77, 2012a.
- SANTOS, R. C. et al. Stability and adaptability of runner peanut genotypes. *Pesquisa Agropecuária Brasileira (Online)* , v. 47, n. 8, p. 1118-1124, 2012b.
- SARNOSKI, P. J. et al. Separation and characterisation of proanthocyanidins in Virginia type peanut skins by LC-MSn. **Food Chemistry**, v. 131, n. 3, p. 927–939, 2012.
- SHIN, E. C. et al. Commercial runner peanut cultivars in the united states: Tocopherol composition. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 21, p. 10289–10295, 2009.
- SHIN, E. C. et al. Chemometric approach to fatty acid profiles in Runner-type peanut cultivars by principal component analysis (PCA). **Food Chemistry**, v. 119, n. 3, p. 1262–1270, 2010.
- SINGH, D. The relative importance of characters affecting genetic divergence. **Indian Journal Genetics & Plant Breeding**, v.41, p. 237-245. 1981
- SINGKHAM, N. et al. Estimation of heritability by parent-offspring regression for high-oleic acid in peanut. **Asian Journal of Plant Sciences**, v. 9, n. 6, p. 358–363, 1 jun. 2010.
- SNEATH, P.H.A.; SOKAL, R.R. Numerical taxonomy. W.H. & Freeman, San Francisco. 1973.
- SONGSRI, P. et al. Root distribution of drought-resistant peanut genotypes in response to drought. **Journal of Agronomy and Crop Science**, v. 194, p. 92–103, 2008.
- VISENTAINER, J.V.; FRANCO, M.R.B. (2006). Ácidos graxos em óleos e gorduras: Identificação e quantificação. São Paulo: Varela, 2006. 120p.
- VOS, F. et al. Phenol-Explorer: an online comprehensive database on polyphenol contents in foods. **Database**, v. 2010, p. 1–9, 2010
- WANG, P. et al. Experimental and Toxicologic Pathology Mechanism of acute lung injury due to phosgene exposition and its protection by caffeic acid phenethyl ester in the rat. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 65, n. 3, p. 311–318, 2013.
- XU, B. J.; YUAN, S. H.; CHANG, S. K. C. Comparative analyses of phenolic composition, antioxidant capacity, and color of cool season legumes and other selected food legumes. **Journal of Food Science**, v. 72, n. 2, 2007.

3. CARACTERIZAÇÃO DOS POLIFENÓIS EM AMENDOIM COM PELÍCULA CONTRASTANTES QUANTO A ADAPTAÇÃO AO AMBIENTE SEMIÁRIDO POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS DE ALTA RESOLUÇÃO

RESUMO

O amendoim (*Arachis hypogaea* L.) é altamente apreciado e apresenta importância econômica em todo o mundo. O consumo deste grão é encorajado pelo conteúdo de polifenóis, como estilbenos, flavonoides e ácidos fenólicos, que são conhecidos por seus efeitos benéficos à saúde. O cultivo de amendoim tem sido explorado em regiões secas, onde ocorre estresse hídrico nas etapas de produção, no entanto, os genótipos de amendoim produzidos atualmente não estão adaptados para essas situações climáticas, o que promove perda do conteúdo de compostos fenólicos. Assim, o objetivo deste estudo foi identificar polifenóis por meio da técnica de espectrometria de massas de alta resolução (LC-ESI-LTQ-Orbitrap-MS/MS) em grãos com película, de genótipos de amendoim contrastantes quanto a tolerância à seca. Cinquenta e oito polifenóis, incluindo ácidos hidroxibenzóicos, ácidos hidroxicinâmicos, flavanóis, flavonóis e flavanonas foram identificados e quantificados utilizando dados de massas de alta precisão e confirmados por experimentos de MS². A análise de massas de alta resolução revelou também a presença de nove compostos fenólicos nunca antes relatados em amendoim, até onde se tem conhecimento. A avaliação dos polifenóis identificados e quantificados, por meio de análise multivariada, levou à distinção dos diferentes genótipos de amendoim.

Palavras-chave: Estresse hídrico; Atividade antioxidante; Ácidos fenólicos; Flavonoides

ABSTRACT

Peanuts (*Arachis hypogaea* L.) are highly appreciated and have an economic importance all around the world. The consumption of this grain is encouraged by the polyphenols content, such as stilbenes, flavonoids and phenolic acids, which are well known for their benefic health effects. Nowadays, the peanuts cultivation has been explored in dry regions, where water stress occurs in the production stages; however, it is known that the currently production of peanuts are not adapted to these climatic situations, and consequently, losing the phenolic compounds content. Thus, the aim of this study was identify the full range of polyphenols found in seven contrasting genotypes peanuts as to drought tolerance developed by Embrapa, in Brazil, by high-resolution mass spectrometry (LC-ESI-LTQ-Orbitrap-MS/MS). Fifty-eight polyphenols including, hydroxybenzoic acids, hydroxycinnamic acids, flavanols, flavonols and flavanones, were identified and quantified using high mass accuracy data and confirmed by MS² experiments. Furthermore, the high-resolution MS analysis revealed the presence of nine phenolic compounds that have never been reported in peanuts before, to the best of our knowledge. The evaluation of the polyphenols identified and quantified by multivariate analysis led to the features distinction among peanuts according to the different genotypes.

Keywords: Water stress; Antioxidant activity; Phenolic acids; Flavonoids

3.1. INTRODUÇÃO

O amendoim é um grão altamente apreciado mundialmente, cultivado em mais de 100 países, sendo a quarta oleaginosa mais produzida no mundo. China, Índia, Nigéria e Estados Unidos são os maiores produtores de amendoim, contribuindo com mais de 50% da produção mundial. Na América do Sul, Argentina e Brasil são os principais produtores, contribuindo com 2,65% e 0,92% da produção mundial, respectivamente, no ano de 2014 (FAOSTAT, 2017).

O cultivo do amendoim no Brasil se concentra na região Sudeste, porém também se encontra nas regiões Centro Oeste, Sul e Nordeste, em menor escala (IBGE, 2017). Independentemente do ambiente, o manejo do amendoim se depara com frequentes veranicos que ocorrem em períodos indeterminados durante o ciclo da cultura. A maioria das cultivares comerciais são sensíveis a problemas de restrição hídrica, que afeta diretamente a produção (SANTOS et al., 2010). Além disso, a indisponibilidade de água, especialmente na fase de maturação dos grãos altera a qualidade dos frutos e também o conteúdo de compostos fenólicos em grãos (ANINBON et al., 2016).

Os grãos de amendoim possuem alto valor nutricional devido as proteínas, ácidos graxos, fibras, vitaminas e minerais que o constituem (ARYA; SALVE; CHAUHAN, 2016). São também fontes de compostos fenólicos, tais como estilbenos, flavonoides e ácidos fenólicos, os quais são conhecidos por apresentarem atividade antioxidante (ISANGA; ZHANG, 2007). A classe dos ácidos fenólicos nessa oleaginosa é representada pelo caféico, sinápico, ferúlico e cumárico (MATTILA; HELLSTRÖM, 2007), sendo o *p*-cumárico o ácido fenólico predominante (TALCOTT et al., 2005). A classe dos estilbenos é representada pelo trans-resveratrol, enquanto que dentre os flavonoides, tem-se os isoflavonoides biochanina A, daidzeína e genisteína (CHUKWUMAH et al., 2009).

Embora alguns compostos fenólicos em amendoim tenham sido relatados e confirmados por LC-MS, como trans-resveratrol, trans-piceid, ácido *p*-cumárico, ácido cafeico e ácido ferúlico (SALES; RESURRECCION, 2010), é importante uma caracterização abrangente do perfil fenólico dos genótipos de modo a indicá-los, posteriormente em programas de melhoramento visando melhoria alimentar dos grãos. A espectrometria de massa de alta resolução (LC-ESI-LTQ-Orbitrap-MS/MS) é uma metodologia interessante, porque fornece informações de peso e fórmula molecular, além de análise de massa em duas etapas (MS/MS) e em vários estágios (MSⁿ), fornecendo informações estruturais das

moléculas. Essa técnica analítica pode auxiliar a elucidação estrutural de compostos desconhecidos em amostras complexas (QUIFER-RADA et al., 2015).

Desta forma, o objetivo deste estudo foi identificar e quantificar os polifenóis de grãos de amendoim com película, utilizando sete genótipos contrastantes quanto à tolerância à seca, por meio da técnica de espectrometria de massa de alta resolução (LC-ESI-LTQ-Orbitrap-MS/MS).

3.2. MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Recursos genéticos

Sete genótipos de amendoim pertencentes ao Banco Ativo de Germoplasma (BAG) da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa Algodão) foram gentilmente cedidos para esta investigação (Tabela 18; Figura 12). Grãos de cada genótipo foram cultivados em campo em Campina Grande, PB, Brasil (7° 13' 51" S, 35° 52' 54" W, 512 m) durante a estação chuvosa, entre Maio a Setembro de 2015. Após a colheita, as plantas foram secas ao ar livre, no campo, durante uma semana, para diminuir a umidade interna para 8-10%.

Tabela 18. Descritores agrônômicos dos genótipos de amendoim utilizados no estudo.

Genótipos	TO	TB	H	CG	TG	Ciclo (dias)	Óleo (%)
BR1	Alta	V	E	Vermelha	Média	85-89	45-46
Senegal 55437	Alta	S	E	Bege	Pequena	75-80	43-44
Senegal 57422	Alta	S	E	Bege	Grande	95-110	45-46
FM 424B	Média	Vi	R	Bege	Grande	115-125	47-48
LViPE-06	NT	Vi	R	Bege	Extra-grande	125-130	50-52
LGoPE-06	NT	Vi	R	Bege	Extra-grande	125-130	50-52
M407.M424B	NT	V	E	Bege	Média	90-110	47-48

TB= Tipo botânico (S-Spanish, V- Valência, Vi-Virgínia); HC- hábito de crescimento; E- ereto, R-Runner; CG- cor do grão; TG= tamanho do grão; TO- tolerância à seca, NT- não tolerante.

Figura 12. Aspecto visual dos genótipos de amendoim avaliados.

3.2.2. Extração de polifenóis

A extração dos polifenóis foi realizada em refrigeração com gelo e sob luz com filtro UV, para evitar a oxidação dos analitos. As amostras foram extraídas em triplicata, seguindo o procedimento descrito por Regueiro et al. (2014), com modificações. Primeiramente os grãos foram trituradas sob refrigeração. Em seguida, 0,5 g de amendoim homogeneizado foi agitado em vórtice, durante 4 minutos, com 4 mL de acetona 60%. Na sequência o material foi sonificado durante 5 minutos sobre um banho de gelo e, então, centrifugado a 4000 x g, durante 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi coletado e o procedimento de extração foi repetido mais duas vezes. Posteriormente, os sobrenadantes foram combinados e desengordurados

duas vezes com 4 mL de éter de petróleo. A fase aquosa, constituída de acetona, foi separada por centrifugação nas mesmas condições e evaporada utilizando um evaporador a vácuo (miVac DNA concentrator, Genevac LTD, Inglaterra). O resíduo foi recolhido num balão volumétrico de 5 mL e completado com água ultra pura contendo 0,1% de ácido fórmico. O extrato foi filtrado usando um filtro de PTFE de 0,20 μm em um frasco âmbar de 2 mL e armazenado a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o momento das análises. O fluxograma sumarizado do processo de obtenção da fração fenólica de amendoim está representado na Figura 13.

Figura 13. Fluxograma do processo de obtenção da fração fenólica.

3.2.3. Compostos fenólicos totais

Para análise de compostos fenólicos totais, as amostras de amendoim foram analisadas em triplicata. Alíquotas de 20 μL dos extratos foram misturados com 188 μL de água ultra pura numa placa de 96 poços (nunc^{TM}, Roskilde, Dinamarca). Posteriormente foram adicionados 12 μL de reagente Folin-Ciocalteu e 30 μL de solução de carbonato de sódio (200 g/L). O meio reacional foi incubado durante 1 h no escuro a temperatura ambiente. Após o período de reação, a absorbância foi medida a 765 nm em espectrofotômetro Spectrum UV/VIS Thermo Multiskan Spectrum (Vantaa, Finlândia). Os resultados foram expressos como mg de equivalentes de ácido gálico (GAE)/100 g (VALLVERDÚ-QUERALT et al., 2011).

3.2.4. Atividade antioxidante

A atividade antioxidante nos extratos de amendoim foi avaliada utilizando os ensaios de sequestro dos radicais DDPH (2,2-diphenyl-1-(2,4,6-trinitrophenyl)hydrazyl) (ODRIOZOLA-SERRANO; SOLIVA-FORTUNY; MARTÍN-BELLOSO, 2008) e ABTS (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman- 2-carboxylic acid) (MINOGGIO et al., 2003), seguindo as modificações descritas por Vallverdú-Queralt et al. (2011).

Para o ensaio de DDPH foram adicionados 250 µL de DPPH diluído em metanol (0,025 g/L) em placas de 96 poços, contendo 5 µL de Trolox, metanol ou extrato de amendoim. Posteriormente, as soluções foram misturadas vigorosamente e mantidas ao abrigo da luz durante 30 min. Para o ensaio ABTS, foram misturados 245 µL de solução ABTS⁺⁺ com 5 µL de Trolox, metanol ou extrato de amendoim. Na sequência, as soluções foram homogeneizadas vigorosamente e mantidas ao abrigo da luz durante 1 h. A absorção das amostras foi medida em uma leitora de microplacas UV/VIS (Thermo Multiskan Spectrum) a 515 nm e 734 nm, respectivamente. Para ambos os métodos, cada amostra foi analisada em triplicata e os resultados foram expressos como equivalente de mmol Trolox (TE)/100 g de amostra.

3.2.5. Avaliação do perfil de compostos fenólicos por espectrometria de massas de alta resolução (LC-ESI-LTQ-Orbitrap-MS)

Um espectrômetro de massas de alta resolução LTQ Orbitrap Velos (Thermo Scientific, Hemel Hempstead, Reino Unido) equipado com uma fonte de ionização por eletronebulização (ESI), operando em modo de íon negativo e resolução de 30000 a 400 m/z foi utilizado. Amostras de amendoim foram analisadas em modo “*full scan*” com um poder de resolução de 30000 a 400 m/z e eventos MS/MS dependentes de dados adquiridos com um poder de resolução de 15000. Os íons mais intensos detectados durante a varredura completa propiciaram a varredura dos dados, que foi executada sem o uso de uma lista de íons moleculares. Os íons que não foram suficientemente intensos para uma varredura foram analisados posteriormente no modo MS_n com a resolução do Orbitrap, também ajustada em 15000 a 400 m/z. As condições de operação utilizadas foram: voltagem da fonte, 4kV; gás auxiliar, 20 (unidades arbitrárias); gás de arraste, 10 (unidades arbitrárias); temperatura do capilar, 275°C. Utilizou-se uma largura de isolamento de 100 amu e os precursores foram fragmentados por dissociação induzida por colisão C-trap (CID) com energia de colisão

normalizada de 35 V e um tempo de ativação de 10 ms. A varredura de massas no modo FTMS (*Fourier transform mass spectrometer*) foi de 100 a 1000 m/z. Antes da análise foi realizada uma calibração externa para verificar a precisão das massas acuradas. A análise dos dados foi realizada utilizando o software XCalibur v2.0.7 (Thermo Fisher Scientific).

A análise por cromatografia líquida foi realizada segundo método descrito por Heras et al. (2016), em um cromatógrafo Accela (Thermo Scientific, Hemel Hempstead, Reino Unido) equipado com uma bomba quaternária, um detector de arranjo de diodos (DAD) e um amostrador com termostato. A separação cromatográfica foi realizada em uma coluna Atlantis 2,1 x 100 mm, 3 μ m (Waters, Milford, MA, USA). A fase móvel foi constituída por uma mistura de dois solventes: (A) solução de ácido fórmico em água 0,1% e (B) acetonitrila acidificada com ácido fórmico a 0,1%. A vazão da fase móvel foi de 350 μ L/min com volume de injeção de 10 μ L. O gradiente iniciou-se em 2% do solvente B passando a 8% de B em 5 minutos, 20% de B aos 14 minutos, 30% de B aos 18 minutos, 100% de B aos 22 minutos, mantendo 100% até 24 minutos, retornando novamente a 2% de B aos 28 minutos e mantendo a 2% até 30 minutos. A coluna foi equilibrada por 5 minutos para as condições iniciais.

A identificação dos compostos foi feita por comparação das massas exatas do espectro de massas MS/MS e fórmula molecular observada com aquelas disponíveis na literatura (identificação tentativa) ou pela análise de padrões autênticos. Foram utilizados os seguintes padrões autênticos de ácidos fenólicos, estibeno e flavonoides: ácido gálico, ácido 2,6-dihidroxibenzóico, ácido 2,5-dihidroxibenzóico, catequina, ácido cafeíco, epicatequina, ácido vanílico, ácido protocateíco, ácido *o*-cumárico, ácido *p*-cumárico, ácido *m*-cumárico, ácido ferúlico, rutina, ácido isoferúlico, quercetina-glucorônida, ácido sinápico, quercetina, resveratrol e piceid. Os compostos foram quantificados utilizando uma curva de calibração de catequina e expressos em equivalentes de catequina.

3.2.6. Análise estatística

As análises foram realizadas em triplicata e os resultados obtidos foram expressos em média $\pm$ desvio padrão. Os dados obtidos para compostos fenólicos e atividade antioxidante foram submetidos à ANOVA pelo teste F ($p < 0,05$) e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Os dados obtidos para polifenóis foram submetidos à análise multivariada. Para a análise de agrupamentos, foram adotados métodos hierárquicos (Método do grupo de pares não ponderados com média aritmética, UPGMA) e métodos não-hierárquicos (componente

principal, CP). Para análise de UPGMA, as médias dos ácidos fenólicos e flavonoides foram utilizadas para obter uma matriz de dissimilaridade genética por meio de distância euclidiana média. Para eliminar os efeitos não hierárquicos, estimou-se o coeficiente de correlação cofonético (SNEATH; SOKAL, 1973).

Os CPs foram estimados através da transformação de dados originais em um conjunto com dimensão equivalente de dados não correlacionados. As pontuações correspondentes aos CPs foram calculadas a partir da matriz de correlação. Os dois primeiros pontos de CP foram utilizados para agrupar os genótipos em gráficos de dispersão. A análises foram realizadas usando o software GENES, versão 2013.5.1 (CRUZ, 2013).

3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1. Compostos fenólicos totais e atividade antioxidante

O conteúdo fenólico total e a atividade antioxidante dos genótipos de amendoim avaliados estão apresentados na Tabela 19. O conteúdo total fenólico variou de $187,00 \pm 15,61$ a $323,47 \pm 23,12$ mg GAE/100g. Estes resultados estão de acordo com os encontrados por Aninbon et al. (2016), para diferentes genótipos de amendoim tolerantes à seca, cujos valores variaram de 70 a 220 mg/100 g. Rosales-Martínez et al. (2014) avaliaram grãos crus e torrados de amendoim dos tipos botânicos Virgínia e Spanish e encontraram teores de 301 a 370 mg GAE/100 g para amendoim cru. Os genótipos de amendoim estudados, quando comparados a outras oleaginosas (amêndoa, castanha-do-Pará e castanha de caju), mostraram valores semelhantes de compostos fenólicos totais, porém maiores do que a macadâmia (156 e 126 mg/100g) e inferiores ao apresentado em nozes (1556 e 1576 mg/100g) (BOLLING et al., 2011).

O valor total da atividade antioxidante pelo método de DPPH variou de $4,65 \pm 0,42$ a $22,57 \pm 1,58$ $\mu\text{mol TE/g}$. Esses resultados estão de acordo com os resultados relatados por Attree; Du; Xu, (2015), nos quais a atividade antioxidante pelo método de DPPH variou de 10,76 a 28,86 $\mu\text{mol TE/g}$ para grãos crus de amendoim vermelho e preto. No entanto, o valor da atividade antioxidante pelo método ABTS⁺⁺ para os genótipos de amendoim adaptados ao estresse hídrico, variou entre $28,37 \pm 1,90$ a $41,41 \pm 1,17$ $\mu\text{mol TE/g}$, sendo esses valores superiores aos relatados para outras cultivares de amendoim. Camargo et al. (2012), estudando o efeito da irradiação gama em amendoim relataram uma variação de 13,50 a 16,97 $\mu\text{mol TE/g}$ para amendoim do tipo Runner, sem tratamento, e Craft et al. (2010) encontraram

uma variação de 2.97 a 13.99 $\mu\text{mol TE/g}$ de amendoim em seus estudos, para amendoim do tipo Runner, Virginia e Spanish.

Com base na classificação geral das médias mostradas na Tabela 19, os valores mais elevados para esses três componentes foram encontrados nos genótipos Senegal 55437 e FM424B, um tolerante e outro de tolerância média à seca (Tabela 18). Estes resultados são bastante relevantes, porque na África, o Senegal 55437 é um genótipo do tipo precoce muito conhecido e utilizado pelos produtores em ambiente semiárido. A sua principal via de consumo é *in natura*, uma vez que o Senegal 55437 é de baixo teor de óleo (DUARTE; MELO FILHO; SANTOS, 2013; SANTOS et al., 2010).

Tabela 19. Compostos fenólicos totais (mg GAE.100g^{-1}) e atividade antioxidante ($\mu\text{mol TE.g}^{-1}$) dos genótipos de amendoim (valores médios, $\pm$ DP, $n=3$).

Genótipos	Compostos fenólicos totais (mg GAE.100g^{-1})	Sequestro do radical ABTS ($\mu\text{mol TE.g}^{-1}$)	Sequestro do radical DPPH ($\mu\text{mol TE.g}^{-1}$)
BR1	207,74 $\pm$ 8,67 d	34,82 $\pm$ 1,91 b	9,42 $\pm$ 0,73 e
Senegal 57422	278,22 $\pm$ 25,58 b	37,42 $\pm$ 3,11 ab	15,33 $\pm$ 1,06 c
Senegal 55437	274,27 $\pm$ 24,33 b	40,73 $\pm$ 3,32 a	19,01 $\pm$ 1,71 b
FM424B	323,47 $\pm$ 23,12 a	41,41 $\pm$ 1,17 a	22,57 $\pm$ 1,58 a
LViPE-06	254,88 $\pm$ 24,29 bc	34,17 $\pm$ 3,00 b	13,37 $\pm$ 0,85 cd
LGoPE-06	221,47 $\pm$ 21,37 cd	32,54 $\pm$ 3,12 bc	12,50 $\pm$ 0,86 d
M407.M424B	187,00 $\pm$ 15,61 d	28,37 $\pm$ 1,90 c	4,65 $\pm$ 0,42 f

DP=Desvio Padrão; n=número de repetições utilizadas; GAE=Equivalente de ácido gálico; TE= Equivalente de Trolox. Diferentes letras na coluna representam diferença estatística a 5%.

3.3.2. Identificação de polifenóis por espectrometria de massa de alta resolução (LC-ESI-LTQ-Orbitrap-MS/ MS)

Os extratos de amendoim foram analisados por LC-ESI-LTQ-Orbitrap-MS/MS a fim de realizar uma caracterização abrangente do perfil de polifenóis. Os compostos foram tentativamente identificados através das massas exatas, espectros MS/MS e fórmula molecular por comparação com a literatura (CAMARGO et al., 2015; MA et al., 2014; MELO et al., 2016; QUIFER-RADA et al., 2015; REGUEIRO et al., 2014). Ácido gálico, ácido 2,6-dihidroxibenzóico, ácido 2,5-dihidroxibenzóico, catequina, ácido cafeico, epicatequina, ácido vanílico, ácido protocatecuico, ácido *o*-cumárico, ácido ferúlico, ácido *p*-cumárico, rutina, ácido isoferulico, quercetina-glucurônida, ácido sinápico, ácido *m*-cumárico e quercetina, foram confirmados por análise de padrões.

Um total de 58 compostos fenólicos foram identificados nos genótipos de amendoim estudados (Tabela 20), dentre eles: ácidos hidroxibenzóicos, ácidos hidroxicinâmicos, flavanois, flavonois e flavanonas. O ácido coutárico (isômero 1) (m/z 289) foi o principal composto fenólico identificado em todas as amostras ($236,3 \pm 11$, a $75,4 \pm 6,0$ μg de catequina/g) seguido do ácido coutárico (isômero 2), isorhamnetin-3-O-rutinoside e os isômeros de ácido cumárico. O ácido cumárico foi relatado como mediador anti-obesidade (SEO et al., 2015). Não se tem relatos sobre as propriedades biológicas do ácido coutárico e isorhamnetina-3-O-rutinoside, no entanto, sabe-se que a isorhamnetina na forma aglicona possui efeitos antitumorais (MANU et al., 2015) e que o ácido coutárico é um dos principais compostos fenólicos constituintes do vinho (MAIER et al., 2006), cujos benefícios à saúde já estão amplamente descritos (APOSTOLIDOU et al., 2015; HIGGINS; LLANOS, 2015; LEIKERT et al., 2002; VINSON; TEUFEL; WU, 2001).

3.3.2.1. Ácidos hidroxibenzóicos e derivados

Sete ácidos hidroxibenzóicos foram identificados por meio da varredura dos cromatogramas em modo FTMS (*Fourier transform mass spectrometer*) (Tabela 20). Os ácidos hidroxibenzóicos possuem uma estrutura química C6-C1 e quando submetidos a MS^2 apresentam uma perda característica do grupamento COO $[\text{M}-\text{H}^- 44]^-$ (HERAS et al., 2016; QUIFER-RADA et al., 2015).

O ácido gálico (m/z 169,01432; 0,435 ppm), o ácido 2,6-dihidroxibenzóico (m/z 153,01947; 0,249 ppm), o ácido 2,5-dihidroxibenzóico (m/z 153,01947: 0,249 ppm); o ácido protocatecuico (m/z 153,01950; 1,098 ppm), o ácido vanílico (m/z 167,03507; 0,527 ppm), identificados e confirmados por MS^2 , mostraram a perda característica do grupamento COO $[\text{M}-\text{H}^- 44]^-$ quando submetidos a MS^2 . Sendo que, o ácido vanílico mostrou uma fragmentação extra, perdendo o grupo metilo $[\text{M}-\text{H}^- 15]^-$, fragmentação essa já relatada em outros trabalhos (HERAS et al., 2016; QUIFER-RADA et al., 2015). O ácido protocatechuico-O-hexosido (m/z 315,07230; 0,459 ppm) e galoilglicose (m/z 331,0664; 0,272 ppm) também foram identificados e confirmados pela técnica de MS^2 , os quais mostraram a perda intacta do açúcar $[\text{MH}^- 162]^-$, característica esta também já relatada por Heras et al. (2016).

O ácido gálico, o ácido vanílico e o ácido protocatecuico já foram identificados na película do amendoim (CAMARGO et al., 2015; LARRAURI et al., 2016; MA et al., 2014;

PHAN-THIEN; WRIGHT; LEE, 2014), contudo, os demais ácidos hidroxibenzóicos e derivados identificados, nunca foram relatados antes na literatura.

3.3.2.2. Ácidos hidroxicinâmicos e derivados

Vinte e três ácidos hidroxicinâmicos foram identificados neste trabalho (Tabela 20). Os ácidos hidroxicinâmicos apresentam uma estrutura C6-C3 com uma ligação dupla na cadeia lateral em configuração *cis* ou *trans* e quando submetidos à fragmentação MS², possuem como característica a perda do grupamento COO [M-H⁻ 44]⁻ (HERAS et al., 2016).

A análise dos dados e o exame dos cromatogramas no modo FTMS revelaram a presença de ácido cafeíco (m/z 179,03516; 0,436 ppm), ácido cumárico (m/z 163,04021; 0,507 ppm), ácido ferúlico (m/z 193 05102; 0,507 ppm) e ácido sinápico (m/z 223,06136; 0,732 ppm), que apresentaram a perda de COO [M-H⁻ 44]⁻ no espectro de MS². Também foi encontrado o ácido fertárico (m/z 325.0552; 0,046 ppm), ácido coutárico (m/z 295,04669; 0,373 ppm) e ácido caftárico (m/z 311,04124; 0,209 ppm) que apresentaram a perda do íon C₄H₄O₅²⁻ [M-H⁻ 132]⁻ correspondente ao ácido tartárico. O ácido chicórico identificado (m/z 473,07321; 0,594 ppm) apresentou a perda do íon C₉H₆O₃₂⁻ [M-H⁻ 162]⁻. O ácido cumárico-O-hexosídeo (m/z 325,09337; 0,389 ppm) um derivado de ácido hidroxicinâmico que mostrou a perda intacta do açúcar [M-H⁻ 162]⁻, foi também encontrado.

Grande parte dos ácidos hidroxicinâmicos relatados já foram identificados em amendoim (CAMARGO et al., 2015; MA et al., 2014), porém segundo o que se tem conhecimento, é a primeira vez que o ácido cumárico-O-hexosídeo é identificado.

Os ácidos hidroxicinâmicos e derivados são metabolitos secundários que desempenham diversos papéis na fisiologia e atividades das plantas, sendo correlacionados com a síntese de proteínas, alelopatia e fotossíntese. Nos animais, estão relacionados a inibição de transtornos cardiovasculares, câncer e distúrbios neurológicos, como doenças de Alzheimer e Parkinson, além de apresentarem atividade antígeno-tóxica (FERGUSON; ZHU; HARRIS, 2005; ROBBINS, 2003; RUIZ et al., 2015). O ácido cumárico é conhecido por apresentar atividade antioxidante, atuando no sequestro de ERO, e também atua na diminuição da peroxidação de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e redução do risco de câncer de estômago (KILIÇ; YEŞİLOĞLU, 2013), mostrando-se interessante a presença desses compostos no amendoim.

3.3.2.3. Flavanois e derivados

Treze flavanois foram encontrados por meio da análise dos cromatogramas no modo FTMS (Tabela 20), dentre eles: a catequina (m/z 289,07235; 0,583 ppm) e a epicatequina (m/z 289,07210; 0,410 ppm), que são caracterizados por apresentar o mesmo íon molecular $[M-H^- 289]^-$ e fragmentação MS/MS em m/z 245, m/z 205 e m/z 179 (REGUEIRO et al., 2014). Três isômeros de catequina-O-hexosideo (m/z 451, 12477; 0,477 ppm), uma forma glicosilada de flavanol, também foram identificadas e apresentaram a perda da fração de açúcar $[M-H^- 162]^-$ no espectro de MS², conforme já relatado por Quifer-Rada et al. (2015). A forma polimérica dos flavanois foi representada por dois isômeros de dímeros de procianidina do tipo A (m/z 575,12005; 0,958 ppm), três isômeros de dímeros de procianidinas do tipo B (m/z 577,13592; 0,919 ppm) e um trímero de procianidina do tipo B (m/z 865,19890; 0,419 ppm) que compartilham a mesma característica, a perda do íon $C_{15}H_{12}O_6^-$ $[M-H^- 288]^-$, que corresponde a uma molécula de catequina. A procianidina C₂ trímera (m/z 865, 1986, 0,096 ppm) também foi identificada e caracterizada pela perda de uma molécula de catequina ionizada $[M-H^- 290]^-$.

Grande parte dos flavanois descritos já foram identificados em amendoim (BANSODE et al., 2014; CAMARGO et al., 2015; LARRAURI et al., 2016; MA et al., 2014; SARNOSKI et al., 2012), contudo, esta é a primeira vez que a catequina-O-hexosidea, um flavanol glicosilado, é identificada nessa oleaginosa.

Os flavanois são uma classe de compostos fenólicos conhecidos por exercer benefícios à saúde. Diversas pesquisas relacionam a ingestão de alimentos contendo flavanois com a uma diminuição do risco de doenças cardiovasculares (HEISS; KEEN; KELM, 2010; RULL et al., 2015; SCHROETER et al., 2010), sendo as procianidinas, compostos pertencentes à classe dos flavanois, relacionadas a uma redução na incidência de doença coronariana (KHAN et al., 2015)

3.3.2.4. Flavonois e derivados

Treze flavonois foram encontrados nas amostras de amendoim (Tabela 20). A isorhamnetina-3-O-rutinosideo e a rutina foram identificados como predominantes nestas nas amostras. A varredura e o exame dos cromatogramas no modo FTMS revelaram a presença de quercetina (m/z 301,03574; 0,213 ppm), que apresentou íon molecular $[M-H^- 301]^-$ e fragmentos de MS/MS em m/z 179, m/z 151 e m/z 107. A isorhamnetina (m/z 315,05144;

0,203 ppm) e rhamnazina (m/z 329,06682; 0,438 ppm) foram identificadas pela perda de um grupamento metila $[M-H^{-15}]^{-}$ do íon molecular. Além disso, a rhamnazina ainda apresentou uma fragmentação extra de outro grupamento metila $[M-H^{-15}]^{-}$.

Foram identificados também flavonóis glicosilados, como a astragalina (m/z 447,0932; 0,035 ppm), a isorhamnetina-glucósida (m/z 477,10403; 0,379 ppm), a isoquercetina (m/z 463,08891; 1,535 ppm) e a quercetina-O-glicosilada (m/z 463,08884; 1,384 ppm) que foram caracterizados pela perda da porção do açúcar $[M-H^{-162}]^{-}$; A rutina (m/z 609, 14716; 1,727 ppm) e o isorhamnetin-3-O-rutinosídeo (m/z 623,16221; 0,725 ppm) foram caracterizados pela perda do íon $C_{12}H_{20}O_9^{2-}$ $[M-H^{-308}]^{-}$, correspondente ao rutinosídeo; a quercetina-glucuronídeo (m/z 477,06787; 0,852 ppm) foi caracterizada pela perda do glucuronídeo $C_6H_8O_6^{2-}$ $[M-H^{-176}]^{-}$.

A maioria dos flavonóis encontrados nestas amostras já foram identificados em amendoim (BANSODE et al., 2014; CHUKWUMAH et al., 2012; CAMARGO et al., 2015; LARRAURI et al., 2016), no entanto, pela primeira vez, a rhamnazina, um composto conhecido por apresentar atividade anticancerígena (YU et al., 2015) e a astragalina, um composto com propriedades anti-inflamatórias (KIM; KIM, 2011), são descritos em amendoim, enaltecendo assim, a qualidade nutracêutica do grão.

3.3.2.5. Flavanonas

Dois derivados de flavanonas foram encontrados por meio da varredura dos cromatogramas no modo FTMS (Tabela 20). As flavanonas são geralmente glicosiladas por um dissacarídeo na posição C7, produzindo flavanonas glicosiladas quando fragmentadas (HERAS et al., 2016). A eriocitrina (m/z 595,1673; 0,767 ppm) e a maniflavanona (m/z 589,09989; 0,706 ppm) foram identificadas e confirmadas por análise de MS². A eriocitrina apresenta o íon molecular $[M-H^{-595}]^{-}$ e os fragmentos MS/MS em m/z 451,12 e m/z 289,07 (SU et al., 2010) e a maniflavanona apresenta o íon molecular $[M-H^{-589}]^{-}$ e fragmentos de MS/MS em m/z 463, correspondente a $C_{24}H_{15}O_{10}^{-}$, com a perda de 126 unidades. A maniflavanona já foi relatada em amendoim (CAMARGO et al., 2015; SARNOSKI et al., 2012). A eriocitrina, segundo se tem conhecimento, ainda não havia sido encontrada em amendoim, e conforme relatos da literatura, essa flavanona é conhecida por apresentar propriedades antialérgicas (MCKEY; BLUMBERG, 2006), ampliando a gama de nutrientes biativos presentes no grão de amendoim.

Tabela 20. Compostos identificados e quantificados ($\mu\text{g Catechin.g}^{-1}$) em genótipos de amendoim contrastantes quanto à tolerância ao estresse hídrico por LC-ESI-LTQ-Orbitrap-MS/MS (valores médios, $\pm$ DP, n=3).

Compostos	tr (min)	Fórmula molecular	Massa exata	[M-H] ⁻	Erro (ppm)	Fragmentos (m/z)	BR1	Senegal 55437	Senegal 57422	FM424B	LViPE-06	LGoPE-06	M407.M424B
Galic acid*	3,18	C ₇ H ₆ O ₅	170,0216	169,01432	0,435	125,02	0,49 $\pm$ 0,01	0,46 $\pm$ 0,01	nd	0,46 $\pm$ 0,01	nd	0,436 $\pm$ 0,004	nd
Protocatechuic acid-O-hexoside	6,21	C ₁₃ H ₁₆ O ₉	316,07958	315,07230	0,459	153,02; 109,03	3 $\pm$ 0,3	6,2 $\pm$ 0,5	6,3 $\pm$ 0,6	4,3 $\pm$ 0,2	6,9 $\pm$ 0,3	3,89 $\pm$ 0,01	3,7 $\pm$ 0,2
Galloylglucose	6,45	C ₁₃ H ₁₆ O ₁₀	332,0734	331,0664	0,272	169,01; 125,02	1,1 $\pm$ 0,1	1,1 $\pm$ 0,1	0,49 $\pm$ 0,04	0,6 $\pm$ 0,1	0,533 $\pm$ 0,005	0,53 $\pm$ 0,03	0,90 $\pm$ 0,04
2,6-dihydroxybenzoic acid*	6,74	C ₇ H ₆ O ₄	154,02675	153,01947	0,249	109,03	2,6 $\pm$ 0,2	1 $\pm$ 0,1	1,2 $\pm$ 0,1	1,41 $\pm$ 0,02	0,9 $\pm$ 0,1	1,44 $\pm$ 0,04	1,878 $\pm$ 0,004
Procyanidin trimer C2 (isomer 1)	6,74	C ₄₅ H ₃₈ O ₁₈	866,2059	865,19862	0,096	695,14; 575,12; 739,17; 287,06; 407,08; 289,07	0,56 $\pm$ 0,02	0,9 $\pm$ 0,04	0,5 $\pm$ 0,01	0,446 $\pm$ 0,003	0,5 $\pm$ 0,04	0,446 $\pm$ 0,004	nd
Catechin-O-hexoside (isomer 1)	8,40	C ₂₁ H ₂₄ O ₁₁	452,13205	451,12477	0,477	289,07; 245,08	2,5 $\pm$ 0,2	1,6 $\pm$ 0,1	0,53 $\pm$ 0,02	0,8583 $\pm$ 0,0003	nd	0,45 $\pm$ 0,01	1,18 $\pm$ 0,05
Caffeic acid (isomer 1)	8,78	C ₉ H ₈ O ₄	180,04244	179,03516	0,436	135,05	1,8 $\pm$ 0,2	1,7 $\pm$ 0,1	0,8 $\pm$ 0,1	0,76 $\pm$ 0,03	0,65 $\pm$ 0,04	0,6 $\pm$ 0,1	0,98 $\pm$ 0,02
Caftaric acid (isomer 1)	8,78	C ₁₃ H ₁₂ O ₉	312,04852	311,04124	0,209	149,01; 179,04; 135,05	8,6 $\pm$ 0,8	7,2 $\pm$ 0,1	2,2 $\pm$ 0,2	2,3 $\pm$ 0,2	1,5 $\pm$ 0,2	1,63 $\pm$ 0,01	2,7 $\pm$ 0,1
Catechin-O-hexoside (isomer 2)	9,46	C ₂₁ H ₂₄ O ₁₁	452,13195	451,12477	0,477	289,07; 245,08	3,1 $\pm$ 0,3	2,78 $\pm$ 0,02	0,7 $\pm$ 0,1	2,52 $\pm$ 0,02	0,45 $\pm$ 0,01	0,45 $\pm$ 0,01	1,70 $\pm$ 0,02
2,5-dihydroxybenzoic acid*	9,68	C ₇ H ₆ O ₄	154,02675	153,01947	0,249	109,03	0,52 $\pm$ 0,01	0,59 $\pm$ 0,02	0,6 $\pm$ 0,1	1 $\pm$ 0,02	0,74 $\pm$ 0,03	0,61 $\pm$ 0,02	0,58 $\pm$ 0,01
Procyanidin dimer type B (isomer 1)	10,12	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂	578,1432	577,13592	0,919	425,09; 451,10; 289,07	1,7 $\pm$ 0,1	10,7 $\pm$ 0,5	4,7 $\pm$ 0,4	2,9 $\pm$ 0,1	2,3 $\pm$ 0,1	1,9 $\pm$ 0,2	2,06 $\pm$ 0,1
Catechin-O-hexoside (isomer 3)	10,38	C ₂₁ H ₂₄ O ₁₁	452,13204	451,12477	0,477	289,07; 245,08	6 $\pm$ 0,4	8,6 $\pm$ 0,8	0,87 $\pm$ 0,02	4,4 $\pm$ 0,1	0,58 $\pm$ 0,02	0,54 $\pm$ 0,02	2,5 $\pm$ 0,1
Coumaric acid derivate (isomer 1)	10,86	C ₉ H ₈ O ₃	164,04772	163,04021	0,507	119,05	19,9 $\pm$ 1,2	10,6 $\pm$ 0,8	6 $\pm$ 0,4	7,3 $\pm$ 0,5	7,7 $\pm$ 0,2	7,3 $\pm$ 0,1	16,0 $\pm$ 0,2
Coutaric acid (isomer 1)	10,88	C ₁₃ H ₁₂ O ₈	296,05397	295,04669	0,373	163,04	236,3 $\pm$ 11,3	132,9 $\pm$ 8,9	75,4 $\pm$ 6	90,9 $\pm$ 7	84 $\pm$ 5,3	92,5 $\pm$ 0,5	140,1 $\pm$ 2,4
(+)-Catechin*	11,03	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	290,07963	289,07235	0,583	245,08; 205,05; 179,04	5,7 $\pm$ 0,2	14,3 $\pm$ 0,5	4 $\pm$ 0,4	3,1 $\pm$ 0,3	1,3 $\pm$ 0,1	0,81 $\pm$ 0,03	9,0 $\pm$ 0,4
Caftaric acid (isomer 2)	11,24	C ₁₃ H ₁₂ O ₉	312,04843	311,04124	0,209	149,01; 179,04; 135,05	3,8 $\pm$ 0,1	1,7 $\pm$ 0,1	1,3 $\pm$ 0,1	1,2 $\pm$ 0,1	1,5 $\pm$ 0,1	1,52 $\pm$ 0,03	1,19 $\pm$ 0,05
Procyanidin trimer C2 (isomer 2)	11,51	C ₄₅ H ₃₈ O ₁₈	866,20632	865,19862	0,096	695,14; 575,12; 739,17; 287,06; 407,08; 289,07	0,49 $\pm$ 0,01	0,6 $\pm$ 0,04	0,56 $\pm$ 0,04	nd	0,51 $\pm$ 0,05	0,47 $\pm$ 0,03	nd
Caffeic acid* (isomer 2)	11,74	C ₉ H ₈ O ₄	180,04243	179,03516	0,436	135,05	1,03 $\pm$ 0,04	0,68 $\pm$ 0,03	0,59 $\pm$ 0,04	0,81 $\pm$ 0,03	0,7 $\pm$ 0,002	0,62 $\pm$ 0,05	0,66 $\pm$ 0,01
Fertaric acid (isomer 1)	11,95	C ₁₄ H ₁₄ O ₉	326,0638	325,05652	0,046	193,05	22,6 $\pm$ 1,7	22,5 $\pm$ 1	7,6 $\pm$ 0,8	12,8 $\pm$ 1,2	6,6 $\pm$ 0,2	10,6 $\pm$ 0,1	15,4 $\pm$ 0,4
Ferulic acid (isomer 1)	11,97	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	194,0583	193,05102	0,507	149,06	2 $\pm$ 0,2	1,9 $\pm$ 0,1	0,9 $\pm$ 0,1	1,2 $\pm$ 0,1	0,9 $\pm$ 0,1	1,1 $\pm$ 0,03	1,9 $\pm$ 0,1
Procyanidin dimer type B (isomer 2)	11,98	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂	578,14344	577,13592	0,919	425,09; 451,10; 289,07	0,98 $\pm$ 0,01	3,2 $\pm$ 0,3	2,4 $\pm$ 0,2	1,25 $\pm$ 0,02	0,93 $\pm$ 0,02	0,78 $\pm$ 0,02	1,387 $\pm$ 0,005
Sinapic acid (isomer 1)	12,35	C ₁₁ H ₁₂ O ₅	224,06878	223,06136	0,732	179,07	0,7 $\pm$ 0,1	0,61 $\pm$ 0,03	0,5 $\pm$ 0	0,45 $\pm$ 0,01	0,67 $\pm$ 0,05	0,6 $\pm$ 0,1	0,607 $\pm$ 0,003
Eriocitrin	13,03	C ₂₇ H ₃₂ O ₁₅	596,17458	595,16730	0,767	451,12; 289,07	1,1 $\pm$ 0,1	1,6 $\pm$ 0,1	0,5 $\pm$ 0	1,09 $\pm$ 0,04	nd	nd	0,809 $\pm$ 0,005

Epicatechin*	13,06	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	290,07938	289,07210	0,410	245,08; 205,05; 179,04	6,8 ± 0,5	7,7 ± 0,4	2,1 ± 0,2	1,67 ± 0,01	0,56 ± 0,04	0,57 ± 0,03	3,1 ± 0,1
Coumaric acid derivate (isomer 2)	13,30	C ₉ H ₈ O ₃	164,04767	163,04021	0,507	119,05	22,9 ± 2,2	11,7 ± 0,9	6,1 ± 0,5	6,3 ± 0,5	13 ± 0,5	10,1 ± 0,4	9,9 ± 0,1
Coutaric acid (isomer 2)	13,30	C ₁₃ H ₁₂ O ₈	296,05384	295,04669	0,373	163,04	93,6 ± 8,8	46,4 ± 3,1	24,2 ± 1,9	25,2 ± 1,9	53,8 ± 4	40,9 ± 1,7	34 ± 2,7
Vanillic acid*	13,44	C ₈ H ₈ O ₄	168,04235	167,03507	0,527	123,05; 108,02	0,76 ± 0,01	0,79 ± 0,04	0,98 ± 0,02	1,4 ± 0,1	0,9 ± 0,1	0,925 ± 0,004	0,6 ± 0
Protocatechuic acid*	13,59	C ₇ H ₆ O ₄	154,02678	153,01950	1,098	109,03; 135,01	0,48 ± 0,01	0,471 ± 0,001	0,47 ± 0,01	0,62 ± 0,04	0,44 ± 0,01	nd	0,5 ± 0,1
Ferulic acid (isomer 2)	14,34	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	194,05817	193,05102	0,507	149,06	1,5 ± 0,1	1,1 ± 0,1	0,6 ± 0,1	0,84 ± 0,04	1,4 ± 0,1	1,2 ± 0,1	0,93 ± 0,01
Fertaric acid (isomer 2)	14,34	C ₁₄ H ₁₄ O ₉	326,06415	325,05652	0,046	193,05	7,4 ± 0,5	5,6 ± 0,2	2,1 ± 0,1	3,4 ± 0,3	6,2 ± 0,3	5,9 ± 0,3	2,97 ± 0,01
Sinapic acid (isomer 2)	14,46	C ₁₁ H ₁₂ O ₅	224,06864	223,06136	0,732	179,07	1 ± 0,1	1,28 ± 0,03	0,6 ± 0,1	0,76 ± 0,03	1,5 ± 0,1	1,47 ± 0,01	1,28 ± 0,02
p-coumaric acid*	14,64	C ₉ H ₈ O ₃	164,04749	163,04021	0,507	119,05	18,8 ± 1,6	2,3 ± 0,2	1,55 ± 0,02	7,2 ± 0,5	3 ± 0,1	5,5 ± 0,3	3,9 ± 0,1
Procyanidin trimer type B	15,10	C ₄₅ H ₃₈ O ₁₈	866,20618	865,19890	0,419	695,14; 577,14; 739,17 449,09; 289,07; 285,04; 539,10; 447,07; 407,08; 435,07; 423,07;	0,5 ± 0,1	1,1 ± 0,1	0,69 ± 0,01	0,62 ± 0,02	0,6 ± 0,1	0,49 ± 0,03	0,48 ± 0,02
Procyanidin dimer type A (isomer 1)	15,59	C ₃₀ H ₂₄ O ₁₂	576,12742	575,12005	0,958	287,06	18,6 ± 1,2	44,01 ± 0,03	28,7 ± 2,4	25,4 ± 0,2	13,2 ± 1	6 ± 0,5	24,6 ± 0,5
Coumaric acid-O-hexoside	15,63	C ₁₅ H ₁₈ O ₈	326,10065	325,09337	0,389	163,04	0,62 ± 0,02	0,434 ± 0,002	nd	nd	0,48 ± 0,03	0,46 ± 0,01	nd
Ferulic acid* (isomer 3)	15,87	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	194,05816	193,05102	0,507	149,06	1,4 ± 0,1	0,612 ± 0,002	0,479 ± 0,002	1,23 ± 0,02	0,61 ± 0,04	0,9 ± 0,1	0,6 ± 0,02
Isorhamnetin-glucoside (isomer 1)	16,00	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₂	478,11162	477,10403	0,379	315,05; 300,03; 247,06; 271,06	0,75 ± 0,04	0,477 ± 0,003	0,54 ± 0,02	0,453 ± 0,003	nd	nd	nd
m-coumaric acid*	16,14	C ₉ H ₈ O ₃	164,04756	163,04021	0,507	119,05	6,1 ± 0,4	15,5 ± 0,8	1,9 ± 0,2	7,2 ± 0,3	17,7 ± 1,6	13,3 ± 0,3	4,9 ± 0,2
Rutin*	16,49	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	610,15444	609,14716	1,727	301,04	16,7 ± 1,2	5,7 ± 0,1	1,5 ± 0,1	3,4 ± 0,1	2,2 ± 0,1	1,59 ± 0,03	21,2 ± 0,1
Isorhamnetin-glucoside (isomer 2)	16,59	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₂	478,11131	477,10403	0,379	315,05; 300,03; 247,06; 271,06	nd	0,504 ± 0,003	0,65 ± 0,03	0,447 ± 0,004	nd	nd	nd
Isoquercetin (isomer 1)	16,74	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	464,09619	463,08891	1,535	301,04; 300,03	2,1 ± 0,2	0,51 ± 0,01	0,47 ± 0,01	nd	0,55 ± 0,01	0,48 ± 0,03	4,6 ± 0,3
Procyanidin dimer type B (isomer 3)	16,81	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂	578,14356	577,13592	0,919	425,09; 451,10; 289,07	0,81 ± 0,05	1,4 ± 0,1	0,9 ± 0,1	0,684 ± 0,004	0,5 ± 0,02	0,48 ± 0,02	0,87 ± 0,02
Isoferulic acid*	16,82	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	194,05822	193,05102	0,507	149,06	0,53 ± 0,01	2,2 ± 0,2	0,54 ± 0,03	1,79 ± 0,01	3,8 ± 0,2	3,7 ± 0,2	0,717 ± 0,001
Isoquercetin (isomer 2)	16,97	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	464,0962	463,08891	1,535	301,04; 300,03	3 ± 0,3	0,551 ± 0,004	0,64 ± 0,02	0,6 ± 0,03	0,62 ± 0,03	0,5 ± 0,03	7,2 ± 0,3
Chicoric acid (isomer 1)	17,01	C ₂₂ H ₁₈ O ₁₂	474,08062	473,07321	0,594	311,04; 293,03; 179,04; 149,01	3,4 ± 0,2	4,1 ± 0,2	1,4 ± 0,1	1,12 ± 0,03	4,3 ± 0,1	3,5 ± 0,1	0,953 ± 0,003
Quercetin-glucuronide*	17,04	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₃	478,07515	477,06787	0,852	301,04	1,1 ± 0,1	0,8 ± 0,1	0,71 ± 0,05	0,78 ± 0,01	3,6 ± 0,3	nd	1,07 ± 0,05
Sinapic acid* (isomer 3)	17,06	C ₁₁ H ₁₂ O ₅	224,06864	223,06136	0,732	179,07 449,09; 289,07; 285,04; 539,10; 447,07; 407,08; 435,07; 423,07;	0,45 ± 0,01	0,48 ± 0,01	0,44 ± 0,01	1,119 ± 0,002	0,65 ± 0,05	0,83 ± 0,04	0,474 ± 0,002
Procyanidin dimer type A (isomer 2)	17,18	C ₃₀ H ₂₄ O ₁₂	576,12733	575,12005	0,958	287,06	8,3 ± 0,3	18,5 ± 1,5	11,5 ± 0,5	10,5 ± 0,2	6,9 ± 0,9	1,35 ± 0,03	9,5 ± 0,3
o-coumaric acid*	17,30	C ₉ H ₈ O ₃	164,04762	163,04021	0,507	119,05	3,2 ± 0,3	1,59 ± 0,04	1,2 ± 0,1	1,6 ± 0,1	1,2 ± 0,1	1,4 ± 0,1	1,37 ± 0,01

Isorhamnetin-3-O-rutinoside	17,75	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₆	624,16949	623,16221	0,725	315,05	38,4 ± 3,6	9,1 ± 0,2	4,5 ± 0,1	6,9 ± 0,2	7,7 ± 0,4	8,5 ± 0,1	32,7 ± 1,4
Astragalin	18,11	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	448,10048	447,09320	0,035	284,03; 285,04	0,61 ± 0,02	0,61 ± 0,01	0,54 ± 0,02	0,83 ± 0,04	0,5 ± 0,02	0,48 ± 0,02	0,8 ± 0,03
Quercetin (isomer 1)	19,05	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	302,04302	301,03574	0,213	179,00; 151,00; 107,01	1,2 ± 0,1	0,53 ± 0,03	0,6 ± 0,1	0,623 ± 0,005	0,48 ± 0,04	0,45 ± 0,01	0,858 ± 0,005
Quercetin-O-glucoside	19,11	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	464,09612	463,08884	1,384	301,04	0,53 ± 0,01	nd	0,44 ± 0,01	0,43 ± 0,01	nd	nd	nd
Chicoric acid (isomer 2)	19,25	C ₂₂ H ₁₈ O ₁₂	474,08049	473,07321	0,594	311,04; 293,03; 179,04; 149,01 463,07; 285,04; 421,06; 445,06; 303,05	1,8 ± 0,1	2,9 ± 0,2	1,1 ± 0,1	0,97 ± 0,04	4,4 ± 1	4 ± 0,1	0,89 ± 0,03
Manniflavanone	19,75	C ₃₀ H ₂₂ O ₁₃	590,10717	589,09989	0,706		0,66 ± 0,05	0,55 ± 0,03	1 ± 0,1	0,567 ± 0,003	0,62 ± 0,03	0,48 ± 0,03	1,17 ± 0,02
Quercetin* (isomer 2)	20,49	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	302,043	301,03574	0,213	179,00; 151,00; 107,01	1,6 ± 0,1	0,8 ± 0,1	0,7 ± 0,1	0,65 ± 0,04	0,5 ± 0,1	0,54 ± 0,03	2,7 ± 0,1
Rhamnazin	20,99	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	330,0741	329,066820	0,438	314,04; 299,02	0,5 ± 0,01	0,46 ± 0,01	0,61 ± 0,02	0,47 ± 0,01	nd	0,437 ± 0,002	0,592 ± 0,002
Isorhamnetin	21,08	C ₁₆ H ₁₂ O ₇	316,05872	315,05144	0,203	300,03	0,8 ± 0,1	0,47 ± 0,01	0,47 ± 0,02	0,53 ± 0,04	0,438 ± 0,002	0,46 ± 0,01	0,67 ± 0,01

* identificação também foi realizada por padrões; nd= não detectado; DP= Desvio Padrão; n= número de repetições utilizadas.

3.3.3. Análise de Cluster e Componentes Principais

3.3.3.1. Agrupamento de genótipos com base nos ácidos fenólicos

Com base no conjunto de dados obtidos a partir de ácidos fenólicos e flavonoides nos grãos de amendoim, foi realizada uma análise de agrupamento para classificar os genótipos quanto ao perfil fenólico e possível tolerância à seca, utilizando métodos UPGMA e CP.

Na Figura 14 encontra-se o agrupamento de genótipos com base em 30 ácidos fenólicos listados na Tabela 20. Foram formados três grupos, que apresentam a seguinte composição: grupo 1 – formado por dois genótipos do tipo Runner (LGoPE e LViPE) e um ereto (Senegal 55437), todos eles com película bege; grupo 2 – formado pelo Senegal 57422, M407.M424B e FM424B; e grupo 3, que contém apenas BR1, uma cultivar brasileira desenvolvida pela Embrapa, amplamente tolerante ao estresse hídrico (DUARTE; MELO FILHO; SANTOS, 2013; SANTOS et al., 2010).

Figura 14. Dendrograma obtido pelo método de agrupamento hierárquico UPGMA, a partir da matriz gerada com ácidos fenólicos dos genótipos de amendoim. Coeficiente de correlação cofonético: 0,87. Linha pontilhada índice de similaridade genética de 70% ($p \leq 0.01$).

Na Tabela 21 são apresentados os autovalores, variação individual (%) e variação acumulada associada à CP, com base nos 30 ácidos fenólicos obtidos a partir de grãos de genótipos Spanish, Valência e Virgínia. Verificou-se que os dois primeiros CP explicaram aproximadamente 71% da variância total ($VI1 = 47,66\%$; $VI2 = 23,63\%$), indicando que a maior parte da variabilidade pode ser resumida nestes dois componentes e a classificação dos genótipos pode ser plotada no Nível 2D, conforme observado pela dispersão gráfica na Figura 15. A configuração dos grupos foi semelhante à encontrada na Figura 14, indicando que ambos os métodos de agrupamento foram adequados para estimar a diversidade de genótipos, com base nos dados de ácidos fenólicos.

Tabela 21. Elementos de variância obtidos a partir de componentes principais com base na matriz formada por ácidos fenólicos em grãos de amendoim.

CP	AV	VI (%)	VA (%)
1	14.30	47.66	47.66
2	7.09	23.63	71.29
3	4.09	13.62	84.92
4	2.02	6.75	91.66
5	1.46	4.85	96.52
6	1.04	3.48	100.00

CP= componente principal; AV= autovalores; VI= variância individual; VA= variância acumulada.

Figura 15. Dispersão gráfica, em relação a dois eixos que representam os dois primeiros componentes principais (CP1 e CP2), obtidos a partir de ácidos fenólicos de grãos de amendoim.

1- BR1, 2- FM424B, 3- Senegal 57422, 4- Senegal 55437, 5- M407.M424B, 6- LGoPE-06, 7- LViPE-06.

A contribuição relativa (CR) de ácidos fenólicos para a divergência genética de sete genótipos de amendoim é apresentada na Tabela 22. Estes valores foram estimados de acordo com o método de Singh (SINGH, 1981), que compara a contribuição relativa de cada componente com a distância total. O ácido gálico, o ácido ferúlico, o Galloylglucose, o ácido cumárico foram os componentes mais contributivos para a diferenciação dos genótipos e foram encontrados em alta concentração na BR1, agregando valor à qualidade nutracêutica de seus grãos. Os ácidos gálico, cumárico e ferúlico são, naturalmente, compostos fenólicos abundantes nas plantas; Os ácidos gálico e cumárico são conhecidos por apresentar atividade antioxidante, antimutagênica, anti-inflamatória e anticancerígena (GALATI; O'BRIEN, 2004; GUVEN et al., 2015); O ácido ferúlico tem papel estrutural na parede celular e é eficaz para

aliviar o tratamento cutâneo, reações inflamatórias e processo de idade da pele (PAIVA et al., 2013; KUMAR; PRUTHI, 2014). O penta-galloyl-glucose é relatado em terapia e prevenção de várias doenças humanas, incluindo câncer e diabetes (ZHANG et al., 2009).

Tabela 22. A contribuição relativa dos ácidos fenólicos para a divergência genética de sete genótipos de amendoim.

Ácidos fenólicos	CR (%)	Valor
Galic_acid	10.68	5.74
Protocatechuic_acid-O-hexoside	6.49	3.49
Galloylglucose	7.95	4.27
2,6-dihydroxybenzoic_acid	5.07	2.72
2,5-dihydroxybenzoic_acid	4.76	2.56
Vanillic_acid	4.32	2.32
Protocatechuic_acid	4.31	2.31
Caffeic_acid_(isomer_1)	7.07	3.80
Caftaric_acid_(isomer_1)	7.02	3.77
Coumaric_acid_derivate_(isomer_1)	6.04	3.25
Coutaric_acid_(isomer_1)	5.13	2.75
Caftaric_acid_(isomer_2)	5.23	2.81
Caffeic_acid_(isomer_2)	4.87	2.62
Fertaric_acid_(isomer_1)	7.00	3.76
Ferulic_acid_(isomer_1)	8.58	4.61
Sinapic_acid_(isomer_1)	4.78	2.57
Coumaric_acid_derivate_(isomer_2)	4.79	2.57
Coutaric_acid_(isomer_2)	4.94	2.65
Ferulic_acid_(isomer_2)	5.41	2.91
Fertaric_acid_(isomer_2)	5.78	3.10
Sinapic_acid_(isomer_2)	6.01	3.23
<i>p</i> -coumaric_acid	5.00	2.68
Coumaric_acid-O-hexoside	8.07	4.34
Ferulic_acid_(isomer_3)	6.50	3.49
<i>m</i> -coumaric_acid	5.96	3.20
Isoferulic_acid	7.90	4.24
Chicoric_acid_(isomer_1)	7.90	4.24
Sinapic_acid_(isomer_3)	5.95	3.20
<i>o</i> -coumaric_acid	5.17	2.78
Chicoric_acid_(isomer_2)	7.47	4.01

3.3.3.2. Agrupamento de genótipos com base nos flavonoides

Três grupos de genótipos de amendoim foram obtidos através da análise de UPGMA, com base nos dados de flavonoides (Figura 16). O Grupo 1 contém genótipos de película bege com grãos grandes e extra-grandes; O Grupo 2 agrupou BR1 e M407.M424B, sendo os dois

genótipos Valência e do tipo Runner, e o Grupo 3 apresentou o genótipo mais contrastante, o Senegal 55437, de tipo Spanish precoce, com pequenos grãos (Tabela 18).

Figura 16. Dendrograma obtido pelo método de agrupamento hierárquico UPGMA, a partir da matriz gerada com flavonoides de sete genótipos de amendoim. Coeficiente de correlação cofonético: 0,87. Linha pontilhada índice de similaridade genética de 85% ($p \leq 0.01$).

A Tabela 23 mostra os autovalores, variação individual (%) e variação acumulada associada à CPs, com base em flavonóides obtidos a partir de grãos de sete genótipos de amendoim. Os dois primeiros CPs explicaram aproximadamente 70,13% da variância total ($CV1 = 38,26\%$; $CV2 = 31,87\%$) e toda variância foi plotada em uma dispersão gráfica de nível 2D (Figura 17).

Tabela 23. Elementos de variância obtidos a partir de componentes principais com base na matriz formada por flavonoides em grãos de amendoim.

CP	AV	VI (%)	VA (%)
1	10.71	38.26	38.26
2	8.87	31.87	70.13
3	3.30	11.78	81.79
4	2.44	8.73	90.45
5	1.51	5.41	95.86
6	1.16	4.14	100.00

CP= componente principal; AV= autovalores; VI= variância individual; VA= variância acumulada.

Com base no gráfico de dispersão, a classificação dos genótipos do Grupo 1 foi mais precisa do que os observados na Figura 16, uma vez que, LViPE-06 e LGoPE-06, que apresentam grãos extra-grandes, foram agrupados separadamente de FM424B e Senegal 57422, que apresentam grãos grandes. Os grupos 2 e 3 apresentaram a mesma composição encontrada na Figura 16. Apesar da diferença apresentada nos métodos adotados, as análises

de agrupamento com base nos dados de flavonoides foram bem sucedidas para identificar o genótipo mais contrastante, Senegal 55437, um genótipo africano com ampla adaptação ao ambiente seco (DUARTE; MELO FILHO; SANTOS, 2013; SANTOS et al., 2010, SANTOS et al., 2012).

Figura 17. Dispersão gráfica, em relação a dois eixos que representam os dois primeiros componentes principais (CP1 e CP2), obtidos a partir dos flavonoides dos grãos de amendoim.

1= BR1; 2= FM424B; 3= Senegal 57422; 4= Senegal 55437; 5= M407.M424B; 6= LGoPE-06; 7= LViPE-06.

A contribuição relativa (CR) dos flavonoides para a divergência genética dos sete genótipos de amendoim é exibida na Tabela 24. As maiores percentagens em relação aos flavonoides totais foram identificadas na quercetina-O-glucosídea, catequina-O-hexosídea (isômero 2), isorhamnetin-glucosídea (isômero 2), procyanidina trimera do tipo C2 (isômero 2), que foram mais representados nos genótipos BR1, Senegal 55437 e Senegal 57422.

Tabela 24. Contribuição relativa dos flavonoides para a divergência genética dos sete genótipos de amendoim.

Flavonoides	CR (%)	Valores
Procyanidin trimer C2 (isomer_1)	3.59	2.16
Catechin-O-hexoside (isomer_1)	4.66	2.80
Catechin-O-hexoside (isomer_2)	8.00	4.81
Procyanidin_dimer_type_B (isomer_1)	5.31	3.20
Catechin-O-hexoside (isomer_3)	6.25	3.76
(+)-Catechin	5.21	3.14
Procyanidin trimer C2 (isomer_2)	7.89	4.75
Procyanidin_dimer_type_B (isomer_2)	5.72	3.44
Epicatechin	6.95	4.18
Procyanidin_trimer_type_B	5.11	3.08
Procyanidin_dimer_type_A (isomer_1)	4.30	2.59
Procyanidin_dimer_type_B (isomer_3)	4.77	2.87
Procyanidin_dimer_type_A (isomer_2)	3.82	2.30
Isorhamnetin-glucoside (isomer_1)	7.23	4.36
Rutin	7.06	4.25
Isorhamnetin-glucoside (isomer_2)	8.48	5.11
Isoquercetin (isomer_1)	5.20	3.13
Isoquercetin (isomer_2)	5.92	3.56
Quercetin-glucuronide	4.20	2.53
Isorhamnetin-3-O-rutinoside	7.12	4.29
Astragalin	6.57	3.96
Quercetin (isomer_1)	5.64	3.40
Quercetin-O-glucoside	9.57	5.76
Quercetin (isomer_2)	5.91	3.56
Rhamnazin	4.72	2.84
Isorhamnetin	5.65	3.40
Eriocitrin	5.72	3.44
Manniflavanone	5.55	3.34

Os flavonoides possuem uma ampla capacidade antioxidante para proteger as plantas contra o estresse abiótico, eliminando as espécies reativas de oxigênio, e sua acumulação é induzida rapidamente por esses estresses, principalmente o estresse hídrico (BENEŠOVÁ et al., 2012; CASTELLARIN et al., 2007). Wang et al. (2016) relataram duas enzimas relacionadas com a biossíntese de flavonoides (isomerase de chalcona (CHI) e di-hidroflavonol-4-redutase) envolvidas no metabolismo secundário em resposta à seca. No trigo, Aldesuquy e Ghanem, (2015) descobriram que o estresse causado pela seca aumentou significativamente a quantidade de fenóis e flavonóides totais em folhas de bandeira de cultivares durante o enchimento do grão. Neste trabalho, encontrou-se vários isômeros de procianidina, que estavam presentes em alta concentrações nos genótipos BR1, Senegal 55437 e Senegal 57422, todos eles com ampla tolerância à seca, sugerindo que as procianidinas

podem promover uma maior proteção ao amendoim contra situação de estresse hídrico, contudo, até o momento, não foi encontrada nenhuma correlação entre procianidinas e tolerância à seca em amendoim. Levando em consideração que o amendoim é uma fonte de proteína para vários consumidores de países subdesenvolvidos, e também que as procianidinas têm o papel principal no sistema de defesa de células animais, a seleção de genótipos que agregam esses dois traços pode ser de grande valor para agricultores e consumidores desta oleaginosa. Assim, estudos adicionais com estes componentes podem ser estimulados.

3.4. CONCLUSÃO

Os genótipos de amendoim estudados apresentaram um perfil fenólico diversificado, sendo identificados 58 compostos fenólicos em amendoim com película, sendo nove compostos inéditos: rhamnazina, astragalina, 2,6-dihidroxibenzóico, 2,5-dihidroxibenzóico, ácido protocatecuico-O-hexosido, galloylglucose, ácido cumárico-O-hexosideo, catequina-O-hexosideo e eriocitrina. Os isômeros de ácido coutárico se destacaram como os principais compostos fenólicos em todos os genótipos de amendoim. Os genótipos Senegal 55437 e FM424B, um tolerante e outro médio tolerante ao ambiente semiárido, apresentaram maior valor para compostos fenólicos totais e capacidade antioxidante. Foi revelada distinção de características entre os genótipos estudados. Os genótipos BR1, Senegal 55437 e Senegal 57422, amplamente tolerantes ao ambiente semiárido, apresentaram altas concentrações dos vários isômeros de procianidinas. O genótipo BR1, apresentou ainda alta concentração de ácido gálico, ácido ferúlico, galoilglucose e ácido cumárico, compostos conhecidos por suas atividades bioativas.

REFERÊNCIAS

- ALDESUQUY, H.; GHANEM, H. Exogenous Salicylic Acid and Trehalose Ameliorate Short Term Drought Stress in Wheat Cultivars by Up-regulating Membrane Characteristics and Antioxidant Defense System. **Journal of Horticulture**, v. 2, n. 2, 2015.
- ANINBON, C. et al. 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.

AOCS Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society. 5a.ed. AOCS: Champaign, 2003.

APOSTOLIDOU, C. et al. Cardiovascular risk and benefits from antioxidant dietary intervention with red wine in asymptomatic hypercholesterolemics. **Clinical Nutrition ESPEN**, v. 10, n. 6, p. e224–e233, 2015.

ARYA, S. S.; SALVE, A. R.; CHAUHAN, S. Peanuts as functional food: a review. **Journal of Food Science and Technology**, v. 53, n. 1, p. 31–41, 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.

BANSODE, R. R. et al. Bioavailability of polyphenols from peanut skin extract associated with plasma lipid lowering function. **Food Chemistry**, v. 148, p. 24–29, 2014.

BENEŠOVÁ, M. et al. The physiology and proteomics of drought tolerance in Maize: Early stomatal closure as a cause of lower tolerance to short-term dehydration? **PLoS ONE**, v. 7, n. 6, 2012.

BOLLING, B. W. et al. 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, n. 2, p. 244–275, 2011.

CAMARGO, A. C. et al. Gamma radiation induced oxidation and tocopherols decrease in in-shell, peeled and blanched peanuts. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, n. 3, p. 2827–2845, 2012.

CAMARGO, A. C. et al. 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.

CASTELLARIN, S. D. et al. Water deficits accelerate ripening and induce changes in gene expression regulating flavonoid biosynthesis in grape berries. **Planta**, v. 227, n. 1, p. 101–112, 2007.

CHUKWUMAH, Y. et al. Profiling of bioactive compounds in cultivars of Runner and Valencia peanut market-types using liquid chromatography/APCI mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 132, n. 1, p. 525–531, 2012.

CHUKWUMAH, Y. C. et al. Effect of frequency and duration of ultrasonication on the extraction efficiency of selected isoflavones and trans-resveratrol from peanuts (*Arachis hypogaea*). **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 16, n. 2, p. 293–299, 2009.

- CRAFT, B. D. et al. Antioxidant Properties of Extracts Obtained from Raw, Dry-roasted, and Oil-roasted US Peanuts of Commercial Importance. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 65, n. 3, p. 311–318, 2010.
- CRUZ, C. D. GENES - a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. **Acta Scientiarum**, v. 35, n. 3, p. 271-276, 2013.
- DUARTE, E. A. A.; MELO FILHO, P. DE A.; SANTOS, R. C. Características agronômicas e índice de colheita de diferentes genótipos de amendoim submetidos a estresse hídrico. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 17, n. 8, p. 843–847, 2013.
- FAOSTAT. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Disponível em: <<http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/S>>. Acesso em 8 de Julho de 2017.
- FERGUSON, L. R.; ZHU, S.; HARRIS, P. J. Antioxidant and antigenotoxic effects of plant cell wall hydroxycinnamic acids in cultured HT-29 cells. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 450, p. 585–593, 2005.
- GALATI, G.; O'BRIEN, P. J. Potential toxicity of flavonoids and other dietary phenolics: Significance for their chemopreventive and anticancer properties. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 37, n. 3, p. 287–303, 2004.
- GUVEN, M. et al. Neuroprotective effect of p-coumaric acid in rat model of embolic cerebral ischemia. **Iranian Journal of Basic Medical Sciences**, v. 18, n. 4, p. 356–363, 2015.
- HEISS, C.; KEEN, C. L.; KELM, M. Flavanols and cardiovascular disease prevention. **European Heart Journal**, v. 31, p. 2583–2592, 2010.
- HERAS, R. M. LAS et al. Polyphenolic profile of persimmon leaves by high resolution mass spectrometry (LC-ESI-LTQ-Orbitrap-MS). **Journal of Functional Foods**, v. 23, p. 370–377, 2016.
- HIGGINS, L. M.; LLANOS, E. A healthy indulgence? Wine consumers and the health benefits of wine. **Wine Economics and Policy**, v. 4, n. 1, p. 3–11, 2015.
- IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Produção agrícola. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/defaulttab.shtm>>. Acesso em 16 de Agosto de 2017.
- ISANGA, J.; ZHANG, G.-N. Biologically Active Components and Nutraceuticals in Peanuts and Related Products: Review. **Food Reviews International**, v. 23, n. 2, p. 123–140, 2007.
- KHAN, N. Q. et al. Regulation of vascular endothelial function by red wine procyanidins: implications for cardiovascular health. **Tetrahedron**, v. 71, n. 20, p. 3059–3065, 2015.

- KILIÇ, I.; YEŞİLOĞLU, Y. Spectroscopic studies on the antioxidant activity of p-coumaric acid. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 155, p. 719–724, 2013.
- KIM, M. S.; KIM, S. H. Inhibitory effect of astragalin on expression of lipopolysaccharide-induced inflammatory mediators through NF- κ B in macrophages. **Archives of Pharmacal Research**, v. 34, n. 12, p. 2101–2107, 2011.
- KUMAR, N.; PRUTHI, V. Potential applications of ferulic acid from natural sources. **Biotechnology Reports**, v. 4, p. 86–93, 2014.
- LARRAURI, M. et al. 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.
- LEIKERT, J. F. et al. Red wine polyphenols enhance endothelial nitric oxide synthase expression and subsequent nitric oxide release from endothelial cells. **Circulation**, v. 106, n. 13, p. 1614–1617, 2002.
- MA, Y. et al. Separation and Characterization of Soluble Esterified and Glycoside-Bound Phenolic Compounds in Dry-Blanched Peanut Skins by Liquid Chromatography – Electrospray Ionization Mass Spectrometry. v. 1356, p. 64–81, 2014.
- MAIER, T. et al. Isolation of hydroxycinnamoyltartaric acids from grape pomace by high-speed counter-current chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1128, n. 1–2, p. 61–67, 2006.
- MANU, K. A. et al. Isorhamnetin augments the anti-tumor effect of capecitabine through the negative regulation of Nf-kappaB signaling cascade in gastric cancer. **Cancer Letters**, v. 363, n. 1, p. 28–36, 2015.
- MATTILA, P.; HELLSTRÖM, J. Phenolic acids in potatoes, vegetables, and some of their products. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 20, n. 3–4, p. 152–160, 2007.
- MCKAY, D.L.; BLUMBERG, J.B. A Review of the Bioactivity and Potential Health Benefits of Peppermint Tea (*Mentha piperita* L.). **Phytotherapy Research**, v. 20, p. 619–633. 2006.
- MELO, P. S. et al. Antioxidative and prooxidative effects in food lipids and synergism with α -tocopherol of açai seed extracts and grape rachis extracts. **Food Chemistry**, v. 213, p. 440–449, 2016.
- MINOGGIO, M. et al. Polyphenol pattern and antioxidant activity of different tomato lines and cultivars. **Annals of Nutrition and Metabolism**, v. 47, n. 2, p. 64–69, 2003.

- ODRIOZOLA-SERRANO, I.; SOLIVA-FORTUNY, R.; MARTÍN-BELLOSO, O. Effect of minimal processing on bioactive compounds and color attributes of fresh-cut tomatoes. **LWT - Food Science and Technology**, v. 41, n. 2, p. 217–226, 2008.
- PAIVA, L. B. et al. Ferulic acid and derivatives: Molecules with potential application in the pharmaceutical field. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 49, n. 3, p. 395–411, 2013.
- PHAN-THIEN, K. Y.; WRIGHT, G. C.; LEE, N. A. Peanut antioxidants: Part 2. Quantitation of free and matrix-bound phytochemicals in five selected genotypes with diverse antioxidant capacity by high performance liquid chromatography (HPLC). **LWT - Food Science and Technology**, v. 57, n. 1, p. 312–319, 2014.
- QUIFER-RADA, P. et al. A comprehensive characterisation of beer polyphenols by high resolution mass spectrometry (LC-ESI-LTQ-Orbitrap-MS). **Food Chemistry**, v. 169, p. 336–343, 2015.
- REGUEIRO, J. et al. Comprehensive identification of walnut polyphenols by liquid chromatography coupled to linear ion trap-Orbitrap mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 152, p. 340–348, 2014.
- ROBBINS, R. J. Phenolic Acids in Foods: An Overview of Analytical Methodology. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 2866–2887, 2003.
- ROSALES-MARTÍNEZ, P. et al. Comparison between antioxidant activities of phenolic extracts from mexican peanuts, peanuts skins, nuts and pistachios. **Journal of the Mexican Chemical Society**, v. 58, n. 2, p. 185–193, 2014.
- RUIZ, A. et al. Hydroxycinnamic acids and flavonols in native edible berries of South Patagonia. **Food Chemistry**, v. 167, p. 84–90, 2015.
- RULL, G. et al. Effects of high flavanol dark chocolate on cardiovascular function and platelet aggregation. **Vascular Pharmacology**, v. 71, p. 70–78, 2015. 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, n. 3, p. 795–803, 2010.
- SANTOS, R. C. et al. Produtividade de linhagens avançadas de amendoim em condições de sequeiro no Nordeste brasileiro. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 14, n. 6, p. 589–593, 2010.
- SANTOS, R. C. et al. Produtividade de grãos e óleo de genótipos de amendoim para o mercado oleoquímico. **Revista Ciencia Agronomica**, v. 43, n. 1, p. 72–77, 2012.

- SARNOSKI, P. J. et al. Separation and characterisation of proanthocyanidins in Virginia type peanut skins by LC-MSn. **Food Chemistry**, v. 131, n. 3, p. 927–939, 2012.
- SCHROETER, H. et al. Molecular Aspects of Medicine Recommending flavanols and procyanidins for cardiovascular health: Current knowledge and future needs. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 31, n. 6, p. 546–557, 2010.
- SEO, C. R. et al. Aqueous extracts of hulled barley containing coumaric acid and ferulic acid inhibit adipogenesis in vitro and obesity in vivo. **Journal of Functional Foods**, v. 12, p. 208–218, 2015.
- SINGH, D. The relative importance of characters affecting genetic divergence. **Indian Journal Genetics & Plant Breeding**, v.41, p. 237-245. 1981.
- SNEATH, P.H.A.; SOKAL, R.R. Numerical Taxonomy. W.H. & Freeman, San Francisco. 1973.
- SU, Z. H. et al. Online identification of the antioxidant constituents of traditional Chinese medicine formula Chaihu-Shu-Gan-San by LC-LTQ-Orbitrap mass spectrometry and microplate spectrophotometer. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 53, n. 3, p. 454–461, 2010.
- TALCOTT, S. T. et al. Polyphenolic content and sensory properties of normal and high oleic acid peanuts. **Food Chemistry**, v. 90, n. 3, p. 379–388, 2005.
- VALLVERDÚ-QUERALT, A. et al. Changes in phenolic profile and antioxidant activity during production of diced tomatoes. **Food Chemistry**, v. 126, n. 4, p. 1700–1707, 2011.
- VINSON, J. A.; TEUFEL, K.; WU, N. Red wine, dealcoholized red wine, and especially grape juice, inhibit atherosclerosis in a hamster model. **Atherosclerosis**, v. 156, n. 1, p. 67–72, 2001.
- WANG, F. et al. The Antirrhinum AmDEL gene enhances flavonoids accumulation and salt and drought tolerance in transgenic Arabidopsis. **Planta**, v. 244, n. 1, p. 59–73, 2016.
- YU, Y. et al. Rhamnazin, a novel inhibitor of VEGFR2 signaling with potent antiangiogenic activity and antitumor efficacy. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 458, n. 4, p. 913–919, 2015.
- ZHANG, J. et al. Anti-cancer, anti-diabetic and other pharmacologic and biological activities of penta-galloyl-glucose. **Pharmaceutical Research**, v. 26, n. 9, p. 2066–2080, 2009.

4. CONCLUSÃO

Os genótipos de amendoim estudados apresentaram teores consideráveis de ácidos graxos monoinsaturados em sua constituição, e relação oleico/linoleico mais elevada para os genótipos rasteiros; também apresentaram quantidades significativas de tocoferóis, sendo o α -Tocoferol e γ -Tocoferol os isômeros presentes em maiores quantidades, com destaque para o genótipo BR1, que apresentou maior teor de tocoferol.

O ácido *p*-cumárico, ácido caféico e a rutina foram os ácidos fenólicos identificados e quantificados pela técnica de HPLC-DAD. Vinte e seis compostos fenólicos foram identificados por meio da técnica de espectrometria de massas de alta resolução, em amendoim despelculado.

As amostras de amendoim estudadas foram eficientes no sequestro do radical peroxil e do ácido hipocloroso, contudo, não apresentaram capacidade de sequestro do radical superóxido. As amostras BR1 e LGoPE-06 se destacaram quanto a atividade antioxidante frente a espécies reativas de oxigênio.

Foi revelada distinção de características entre os genótipos estudados sem a película. As variáveis analisadas permitiram identificar a cultivar BR1 como o genótipo mais divergente frente aos compostos com propriedades antioxidantes e segregaram os genótipos do tipo ereto dos genótipos do tipo rasteiro de acordo com o perfil de ácidos graxos apresentados.

Os genótipos Senegal 55437, do tipo precoce, conhecido e utilizado pelos produtores em ambiente semiárido e com ampla tolerância à seca, e FM424B, genótipo médio tolerante à seca, apresentaram os maiores valores para compostos fenólicos totais e capacidade antioxidante frente a radicais sintéticos, quando testados com a película.

Foi encontrado um perfil fenólico diversificado para genótipos de amendoim com película, sendo identificados 58 compostos fenólicos nas amostras, pertencentes a cinco classes de compostos. Os isômeros de ácido coumárico foram os compostos que se destacaram como os principais polifenóis em todos os genótipos avaliados, seguidos por isorhamnetin-3-O-rutinoside e os isômeros de ácido cumárico.

Os compostos fenólicos rhamnazina, astragalina, 2,6-dihidroxibenzóico, 2,5-dihidroxibenzóico, ácido protocatecuico-O-hexosido, galoilglicose, ácido cumárico-O-hexosideo, catequina-O-hexosideo e eriocitrina, até onde se tem conhecimento, foram identificados pela primeira vez em amendoim.

Foi revelada distinção de características entre os genótipos estudados quando testados com a película. Os genótipos BR1, Senegal 55437 e Senegal 57422, todos eles com ampla tolerância ao ambiente semiárido, apresentaram altas concentrações dos vários isômeros de procianidinas. O genótipo BR1, apresentou ainda alta concentração de ácido gálico, ácido ferúlico, galoilglicose e ácido cumárico, compostos conhecidos por suas propriedades bioativas.

5. GERENCIAMENTO DOS RESÍDUOS QUÍMICOS GERADOS NO PROJETO

A destinação dos resíduos gerados neste estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética Ambiental na Pesquisa da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, da Universidade de São Paulo (ESALQ/USP) (APÊNDICE A).

Assim, todos os resíduos gerados nas análises químicas foram armazenados no entreposto do Departamento Agroindústria, Alimentos e Nutrição da ESALQ/USP e posteriormente, foram destinados a tratamento adequado no Laboratório de Gerenciamento de Resíduos Químicos (ESALQ/USP) e/ou enviados para incineração.

APÊNDICES

APÊNDICE A.

COMISSÃO DE ÉTICA AMBIENTAL NA PESQUISA – ESALQ/USP

PARECER

Declaro que o Projeto Intitulado: "Potencial antioxidante e composição química de cultivares de amendoim adaptadas a 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.

Figura 18. Comitê de Ética Ambiental na Pesquisa