



Inês Santos Nunes

Mestre em Biologia Celular e Biotecnologia

Identificação de compostos bioactivos envolvidos na sinalização entre raízes e fungos micorrízicos

Dissertação para obtenção do Grau de Doutor em Química,
especialidade em Química Orgânica

Orientador: Professora Doutora Elvira Maria M. Gaspar, FCT-UNL
Co-orientador: Professor Doutor Higuinaldo Chaves das Neves

Júri:

Presidente: Prof. Doutora Elvira Júlia Conceição Matias Coimbra
Arguente(s): Prof. Doutor José Manuel Gonçalves Barroso
Prof. Doutor Abel José de Sousa Costa Vieira

Vogais: Prof. Doutora Ana Cristina da Silva Figueiredo
Prof. Doutora Sílvia Maria da Rocha Simões Carriço
Prof. Doutor António Pedro de Macedo Coimbra Mano

 FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Outubro 2014

Identificação de Compostos Bioactivos envolvidos na sinalização entre raízes e fungos micorrízicos

Copyright © Inês Santos Nunes, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objectivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Se alguma coisa tiver que dar errado, ela dará.

Edward A. Murphy

Agradecimentos

Desejo em primeiro lugar agradecer à Professora Doutora Elvira Gaspar pela orientação, ajuda e apoio dada no trabalho realizado e na revisão desta tese. Mas acima de tudo, pela sua amizade e honestidade. Por me ter orientado tanto a nível científico como pessoal.

Ao Professor Doutor Higuinaldo das Neves, pela co-orientação desta tese, apoio e amizade.

À Professora Doutora Ana Cristina Figueiredo, pelo seu interesse, amizade, grande disponibilidade e preocupação.

Ao Professor Abel Vieira, presidente da Comissão de Acompanhamento deste Doutoramento, pelo interesse demonstrado e disponibilidade.

Ao Tenente-Coronel Novais Henrique e ao Engenheiro Rogério Rosa da Associação de Produtores de Batata Doce de Aljezur, pelo interesse demonstrado em colaborar neste trabalho científico.

À instituição de acolhimento, a Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa (FCT-UNL).

À instituição responsável pelo financiamento da Bolsa de Doutoramento, a Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT).

Ao José Santana, Mariana Mateus e outros colegas que passaram pelo laboratório, pelo companheirismo, apoio e ajuda no trabalho realizado.

Aos meus amigos e companheiros desta caminhada académica, Marta Mendes e Jorge Faria, por mais uma etapa que acabamos juntos, cheia de queixumes partilhados pelas coisas que não corriam bem, mas de apoio mútuo e sempre com uma dose do nosso bom humor.

À Inês de Sena, à Inês Silva, à Ana Margarida Rodrigues, à Rita Catarino e ao Bruno Ribeiro pelo apoio e pelos momentos de convívio sempre divertidos.

À Ana Fulgêncio, à Ana Frade, à Marisa Ferreira, à Inês Queda, amigas sempre presentes nos momentos bons e menos bons, que me ajudam a rir e a descontrair quando eu mais preciso e que demonstraram um interesse constante pelo número de páginas escritas.

À Luzia e ao Victor, pelo apoio, preocupação, incentivo e amizade.

Ao Ricardo, porque apesar de algumas pedras no nosso caminho, crescemos juntos todos os dias e porque algumas coisas se tornam mais fáceis de superar quando somos dois. Obrigada pelo carinho, incentivo e partilha de sonhos.

À minha mãe, por ter brincado muito comigo quando era criança, por me ter incentivado a ler desde cedo, por me ter educado através de bons e por vezes maus exemplos, pela sua bondade, preocupação excessiva, pelo apoio, por ter estado sempre presente e me ter incentivado a fazer aquilo que gosto.

Ao meu pai, pelo seu exemplo de trabalho e honestidade, por ter recebido dele o espírito sonhador, pela preocupação não demonstrada e por ter acreditado sempre em mim sem nunca me o dizer.

À minha irmã Joana, pela partilha de todos os momentos e pelo apoio, “porque enquanto umas coisas mudam, outras coisas, sejam em que tempo forem, serão sempre iguais”.

À minha avó Rosa, por me ter dado a conhecer o cheiro dos Pinheiros e dos Eucaliptos, e as plantas dos jardins de Lisboa, pelo carinho e pela preocupação e por me ter ajudado a finalizar a escrita deste trabalho.

Resumo

A batata doce é a raiz tuberosa adventícia da planta dicotiledónea *Ipomoea batatas* (L.) Lam. (syn. *Batatas edulis*), pertencente à família das Convolvulaceae. Esta planta é uma importante cultura agrícola, tanto pela área geográfica que ocupa, como pelo rendimento da sua produção. Mundialmente, a batata doce é considerada a sexta cultura agrícola alimentar mais importante. Para além das suas características nutritivas, a batata doce é considerada como um alimento funcional, devido a ter na sua composição compostos bioactivos. Em Portugal, na região de Aljezur realiza-se o cultivo de batata doce da variedade Lira. Devido às suas características distintivas, ao seu cultivo tradicional e à região específica onde é cultivada, a batata doce de Aljezur é uma cultura de Indicação Geográfica Protegida (IPG).

As micorrizas são associações benéficas entre raízes de plantas e fungos micorrízicos. A maior parte das plantas agrícolas e hortícolas vivem em simbiose com fungos endomicorrízicos. A associação simbiótica aumenta a absorção, em condições de baixa disponibilidade, de vários nutrientes minerais, tais como o fósforo, por parte das plantas hospedeiras, levando ao melhoramento do seu crescimento, sendo uma alternativa aos fertilizantes. A batata doce cresce usualmente em solos com baixa disponibilidade em fósforo e é colonizada por fungos endomicorrízicos, verificando-se um aumento de rendimento em relação à produção de raízes tuberosas. Tornou-se importante compreender de que forma ocorre a interacção entre o fungo e a planta, através da identificação dos compostos químicos bioactivos envolvidos na sinalização entre os dois organismos. O primeiro evento desta interacção é causado pelos compostos que são produzidos constitutivamente pelas raízes hospedeiras. A análise das bases químicas do “diálogo” entre os dois parceiros é uma pesquisa que continua em aberto.

Neste trabalho, para o estudo destes compostos de interesse, implementaram-se pela primeira vez culturas *in vitro* da batata doce de Aljezur, micropropagação e raízes transgénicas, e culturas monoxénicas de fungos do género *Glomus*. Verificou-se um maior crescimento da batata doce *in vitro* no meio MS (Murashige & Skoog, 1962) sem fitoreguladores. No meio mínimo MSR (modified Strullu Romand) para além de se ter verificado o crescimento de raízes, observou-se a mudança de cor das folhas dos explantes para roxo. As raízes transgénicas de batata doce produziram-se a partir da raiz tuberosa através da inoculação com *Agrobacterium rhizogenes* e demonstraram ter um crescimento vigoroso. Duas espécies de *Glomus*, *Glomus intraradices* e *Glomus clarum*, foram inoculados em caixas de Petri contendo raízes transgénicas de batata doce e de cenoura. Observou-se que não houve crescimento das hifas dos fungos na presença de raízes transgénicas de batata doce, ao contrário do que aconteceu para as raízes transgénicas de cenoura, em que se observou a formação de esporos. Os compostos presentes nos exsudados das raízes transgénicas de batata doce e de cenoura, crescidas nos meios líquidos MS e SH, foram extraídos através de extracção

líquido-líquido e também por micro-extracção em fase sólida em *headspace* (HS-SPME). A análise foi realizada recorrendo à cromatografia gasosa associada à espectrometria de massa (GC-MS). Verificou-se a presença de 2-metil-1-butanol nos extractos relativos ao meio MSR para as raízes transgénicas das duas espécies. Identificou-se ainda a presença de outros dois compostos de interesse, o ácido benzóico e ácido fenilacetaldeído, nos extractos das raízes transgénicas de batata doce, facto que pode estar relacionado com a resistência desta planta e com o não crescimento dos fungos endomicorrízicos *in vitro*.

A ingestão da batata doce faz-se essencialmente depois de confeccionada, evidenciando um aroma característico. Para o aroma da batata doce contribui a presença de compostos derivados do furano produzidos através da reacção de Maillard. Alguns destes compostos estão associados a uma potencial toxicidade. Apesar de ser conhecida a presença de furfurais no aroma, o teor destes compostos na batata doce nunca foi estudado, não se sabendo a quantidade ingerida pelos consumidores. No presente trabalho, realizou-se o estudo dos compostos de Maillard presentes na batata doce de Aljezur, usando como técnica de preparação de amostra a extracção em fase sólida, SPME, *headspace* (HS) e imersão directa (DI); efectuou-se o estudo qualitativo e quantitativo dos compostos da batata doce confeccionada de três maneiras diferentes: assada, cozida e no micro-ondas. A análise realizou-se por cromatografia gasosa associada ao detector de ionização de chama (GC-FID) e ao espectrómetro de massa (GC-MS). Identificou-se a presença de 2-furaldeído, 2-acetilfurano, benzaldeído, 5-metilfurfural, fenilacetaldeído e álcool furfurílico no aroma da batata doce. Pela primeira vez, observou-se que a batata doce depois de confeccionada apresenta na sua composição 2-furaldeído, 5-metilfurfural, álcool furfurílico e 5-hidroximetilfurfural (5-HMF). Verificou-se que a presença destes compostos é qualitativa e quantitativamente diferente nos diferentes métodos de confecção culinária utilizados.

Palavras chave: *Ipomoea batatas*, batata doce de Aljezur, reacção de Maillard, micorrizas, exudados.

Abstract

The sweet potato is the tuberous root of *Ipomoea batatas* (L.) Lam. (syn. *Batatas edulis*), which belongs to the family of Convolvulacea. This root is an important crop, due both to its yield of production and the geographical territory its production extends to. It is considered the sixth most important food crop worldwide. Alongside its nutritive value, sweet potato is also considered a functional food source, due to the presence of bioactive compounds. Lira is a variety of sweet potato cultivated in Aljezur, Portugal. This variety is considered a product of Protected Geographical Indication (PGI) due to its distinctive features, longstanding tradition of cultivation and specific region of production.

Mycorrhiza are beneficial associations between plant roots and mycorrhizal fungi. Most agricultural and horticultural plants live in symbiosis with mycorrhizal fungi. The symbiotic association increases the absorption of several nutrients by the plant host, such as phosphorus, in conditions of low availability, leading to improvement in its growth and acting as an alternative to fertilizers. Sweet potato usually grows in soils with low phosphorus availability and is colonized by mycorrhizal fungi, which induces a yield increase of tuberous roots. It has become important to understand how the fungus-plant interactions occur, through the identification of bioactive chemical compounds involved in signaling between these two organisms. The first event is caused by the compounds which are produced constitutively by the host roots. The search for the chemical bases of dialogue between both organisms is still ongoing.

To study these compounds, we implemented for the first time *in vitro* cultures of Aljezur's sweet potato, micropropagation and hairy roots, as well as monoxenic cultures of fungi of the genus *Glomus*. The sweet potato cultivated *in vitro* in MS (Murashige & Skoog 1962) medium without growth regulators yielded the highest growth. With the MSR (modified Strullu Romand) medium, we observed root growth as well as a purple discoloration within the leaves. Hairy roots of sweet potato were produced from the tuberous root by inoculation with *Agrobacterium rhizogenes* and showed vigorous growth. Two species of *Glomus*, *Glomus intraradices* and *Glomus clarum*, were inoculated in Petri dishes containing hairy roots of sweet potato and carrot. It was observed that there was no growth of fungal hyphae in the presence of sweet potato hairy roots, contrasting to what happened to carrot roots' hairy roots, where spore formation was observed. The compounds present in the exudates of hairy roots of carrots and sweet potatoes, grown on MS and SH liquid media, were extracted by liquid-liquid extraction and solid-phase microextraction in *headspace* (HS-SPME). The analyses were performed using gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS). The presence of 2-methyl-1-butanol was found in both sweet potato and carrot hairy root exudates of MSR medium extracts. Benzoic acid and phenylacetic acid, were also identified in sweet potato hairy root exudates, which might be related to the plant's resistance and the absent growth of mycorrhizal fungi *in vitro*.

The consumption of sweet potato is essentially undertaken after cooking, which allows the enhancement of a characteristic aroma. The presence of furan compounds produced by the Maillard reaction contributes to the sweet potato's flavor. Some of these compounds have a potential toxicological risk. Although furfurals are known to be an integral component of the sweet potato's aroma, the contents of these compounds, as well as the specific amounts ingested by consumers, have never been studied. In this PhD Thesis, Maillard compounds present in Aljezur's sweet potato were studied, using solid-phase microextraction, SPME, *headspace* (HS) and direct immersion (DI); a qualitative and quantitative study was conducted on several sweet potato's compounds, prepared in three different culinary ways: baked, boiled and microwaved. The analyses were performed by gas chromatography coupled with flame ionization detection (GC-FID) and mass spectrometry (GC-MS). 2-Furaldehyde, 2-acetylfuran, benzaldehyde, 5-metilfurfural, phenylacetaldehyde and furfuryl alcohol were identified in sweet potato's aroma. To our knowledge, the presence of 2-furaldehyde, 5-metilfurfural, furfuryl alcohol and 5-hydroxymethylfurfural (5-HMF) was documented for the first time as part of sweet potato's constituents after cooking. It was found that the contents of these compounds vary qualitatively and quantitatively, depending on the method of cooking.

Keywords: *Ipomoea batatas*, Aljezur sweet potato, Maillard reaction, mycorrhiza, exudates.

Índice

Agradecimentos.....	V
Resumo.....	VII
Abstract.....	IX
1. Introdução.....	1
1.1. Objectivos.....	1
1.2. A batata doce (<i>Ipomoea batatas</i> (L.) Lam.).....	2
1.2.1. História.....	4
1.2.2. Produção e Distribuição geográfica.....	4
1.2.3. Utilização e processamento.....	7
1.2.4. A batata doce como alimento funcional.....	8
1.2.4.1. Componente nutricional.....	9
1.2.4.2. Compostos Fenólicos.....	9
1.2.4.2.1. Antocianinas.....	10
1.2.4.2.2. Ácidos fenólicos.....	12
1.2.4.3. Carotenoides.....	13
1.2.4.4. Resinas glicosídicas.....	14
1.3. A batata doce de Aljezur.....	17
1.3.1. A história e a tradição.....	17
1.3.2. Produto de Indicação Geográfica Protegida.....	18
1.3.3. O cultivo tradicional.....	20
1.4. Micorrizas.....	21
1.4.1. Fungos micorrízicos na agricultura.....	24
1.4.2. Papel dos fungos micorrízicos na cultura de batata-doce.....	28
1.5. Compostos bioactivos envolvidos na sinalização química da interacção micorrízica.....	29
1.5.1. Exsudados de raízes.....	30
1.5.1.1. CO ₂ e compostos voláteis.....	32
1.5.1.2. Fitorreguladores.....	32
1.5.1.3. Compostos fenólicos - Flavonóides.....	35
1.5.1.4. Ácidos gordos.....	36
1.5.1.5. Estrigolactonas.....	37

1.5.2.	Exsudados de fungos micorrízicos	39
1.5.2.1.	Factores Myc	39
1.5.2.2.	Fitorreguladores.....	40
1.5.2.3.	Ergosterol	41
1.6.	O aroma da batata doce	41
1.6.1.	A reacção de Maillard.....	43
1.6.1.1.	Diagrama de Hodge	45
1.6.1.2.	O papel da reacção de Maillard na qualidade dos alimentos	46
1.7.	Métodos analíticos	47
1.7.1.	Isolamento e análise de compostos envolvidos na sinalização entre raízes e fungos micorrízicos	47
1.7.2.	Isolamento e análise dos compostos voláteis do aroma da batata doce.....	48
1.8.	Abordagem às metodologias	49
1.8.1.	Cultura de raízes e fungos endomicorrízicos <i>in vitro</i>	49
1.8.1.1.	Raízes transgénicas	50
1.8.1.2.	Importância do meio de cultura nas culturas <i>in vitro</i>	53
1.8.2.	Métodos analíticos	55
1.8.2.1.	Colunas cromatográficas de líquidos iónicos	55
1.8.2.2.	Microextracção em fase sólida (SPME)	57
1.8.2.3.	Extracção líquido-líquido (LLE)	59
2.	Materiais e Métodos	61
2.1.	Material vegetal	61
2.2.	Batata doce em hidroponia	61
2.2.1.	Análise da componente volátil das plantas de batata doce em hidroponia.....	61
2.2.1.1.	Condições cromatográficas	61
2.3.	Culturas <i>in vitro</i>	62
2.3.1.	Meios de cultura	62
2.3.2.	Raízes excisadas de batata doce	63
2.3.2.1.	Preparação do Material Vegetal	63
2.3.2.2.	Condições de cultura	63

2.3.3.	Micropropagação	63
2.3.3.1.	Preparação do Material Vegetal	63
2.3.3.2.	Condições de cultura	63
2.3.4.	Raízes transgénicas	64
2.3.4.1.	Preparação de <i>Agrobacterium rhizogenes</i>	64
2.3.4.2.	Preparação do Material Vegetal	64
2.3.4.3.	Infecção do material vegetal com <i>Agrobacterium rhizogenes</i>	64
2.3.5.	Inoculação de fungos endomicorrízicos em raízes transgénicas de batata doce e cenoura.....	65
2.4.	Extracção de exsudados das raízes transgénicas de batata doce	66
2.4.1.	Extracção líquido-líquido (LLE)	67
2.4.2.	Microextracção em fase sólida – SPME	67
2.4.3.	Condições cromatográficas.....	68
2.5.	Análise de compostos da reacção de Maillard	68
2.5.1.	Solventes e padrões utilizados	68
2.5.2.	Extracção dos compostos de Maillard presentes na batata doce de Aljezur.....	68
2.5.3.	Condições cromatográficas.....	69
2.5.4.	Desenvolvimento do método analítico	70
3.	Resultados e Discussão	73
3.1.	Desenvolvimento de culturas <i>in vitro</i>	73
3.1.1.	Propagação vegetativa <i>in vitro</i> de batata doce de Aljezur.....	73
3.1.2.	Crescimento <i>in vitro</i> de raízes excisadas de batata doce.....	75
3.1.3.	Voláteis da parte aérea e dos tubérculos da batata doce	76
3.1.4.	Crescimento <i>in vitro</i> de raízes transgénicas de batata doce	78
3.1.5.	Inoculação de fungos endomicorrízicos em raízes transgénicas de batata doce.....	80
3.2.	Extracção e identificação de compostos bioactivos presentes nos exsudados das raízes de batata doce	82
3.3.	Composição química do aroma da batata doce de Aljezur em função do método de confecção culinária	90

3.3.1.	Análise qualitativa e quantitativa dos compostos de Maillard presentes na batata doce de Aljezur.....	90
3.3.1.1.	Influência da temperatura no aroma da batata doce	95
3.3.1.2.	Toxicidade e metabolismo dos compostos derivados da reacção de Maillard.....	99
3.3.2.	Separação cromatográfica dos compostos de Maillard	100
3.3.2.1.	Colunas cromatográficas de líquidos iónicos	101
3.3.2.2.	Aplicação à matriz real: batata doce.....	106
3.3.2.2.1.	Análise por HS e DI-SPME-GC-FID.....	106
3.3.2.2.2.	Análise por HS e DI-SPME-GC-MS	109
3.3.3.	Microextração em fase sólida (SPME)	109
3.3.3.1.	Desenvolvimento e validação do método analítico.....	110
3.3.3.1.1.	Linearidade	110
3.3.3.1.2.	Sensibilidade	111
3.3.3.1.3.	Precisão.....	111
3.3.3.1.4.	Efeito de matriz.....	113
4.	Conclusões e perspectivas futuras	115
5.	Bibliografia	117

Índice de Figuras

Figura 1.1. Estrutura química da antocianidina peonidina	10
Figura 1.2. Estrutura das antocianinas isoladas da batata doce de polpa roxa. Cianidina: R1=OH; peonidina: R1 = OCH ₃ ; R ₂ ,R ₃ = H, ácido p-hidroxibenzoico, ácido cafeico, ácido p-coumárico e ácido ferúlico (adaptado de Tian, <i>et al.</i> , 2009).....	11
Figura 1.3. Estrutura de alguns ácidos clorogénicos isolados da batata doce. Ácido quinico: R ₃ ,R ₄ ,R ₅ =H; 5-cafeoilquinico: R ₃ ,R ₄ =H, R ₅ =ácido cafeico; 3,5-dicafeoilquinico: R ₄ =H, R ₃ ,R ₅ =ácido cafeico, 4,5-dicafeoilquinico: R ₃ =H, R ₄ ,R ₅ =ácido cafeico, 3-feruloilquinico: R ₄ ,R ₅ =H; R ₃ =ácido ferúlico. (Adaptado de Dini, <i>et al.</i> , 2006)	13
Figura 1.4. Estrutura química do β-caroteno.....	13
Figura 1.5. Exemplo da estrutura de resinas glicosídicas presentes na batata doce. Batatinosido II: R ₁ ,R ₂ ,R ₄ =H, R ₃ = <i>n</i> -decanoil; batatinosido III: R ₁ = <i>n</i> -dodecanoil, R ₂ ,R ₃ ,R ₄ =H (adaptado de Escalante-Sanchez & Pereda-Miranda, 2007)	16
Figura 1.6. Estrutura química das resinas glicosídicas presentes na batata doce, batatina I e II. Batatina I: R ₁ = <i>trans</i> -cinamoilo, Batatina II: R ₁ =H, R ₁ = <i>trans</i> -cinamoilo (adaptado de Escalante-Sanchez & Pereda-Miranda, 2007).	16
Figura 1.7. Logótipo da Batata doce de Aljezur.....	17
Figura 1.8. Mapa representativo da área geográfica de produção, preparação e acondicionamento de batata doce de Aljezur.	19
Figura 1.9. Aspecto exterior das raízes tuberculosas de Batata doce de Aljezur.....	20
Figura 1.10. Ilustração da estrutura de colonização das raízes nas interacções ectomicorrízicas (azul) e nas interacções endomicorrízicas (rosa) (Adaptado de Bonfante & Genre, 2010)	22
Figura 1.11. Representação da estrutura química das hormonas vegetais ácido 3-indole-acético (IAA), ácido 3-indole-butírico (IBA), ácido fenilacético (PAA) e ácido 4-cloro-indole-acético (4-Cl-IAA).....	33
Figura 1.12. Representação da estrutura química do ácido abscísico..	34
Figura 1.13. Representação da estrutura química de alguns flavonóides envolvidos na estimulação do crescimento de hifas de fungos micorrízicos.....	35
Figura 1.14. Estrutura química de ácidos gordos presentes nos exsudados de raízes e que influenciam o crescimento das hifas de fungos micorrízicos.....	36
Figura 1.15. Estrutura química das estrigolactonas naturais e da estrigolactona sintética GR24.....	37
Figura 1.16. Proposta das estruturas químicas dos principais factores de micorrização exsudados pelos fungos endomicorrízicos, Myc-LOCs (lipoquitooligossacarídeos) (adaptado de Maillet, <i>et al.</i> , 2011)	40
Figura 1.17. Representação da estrutura química do ergosterol.	41
Figura 1.18. Diagrama de Hodge (adaptado de Zhang, <i>et al.</i> , 2009).	46
Figura 1.19. Representação de um dispositivo de extracção de SPME.....	58

Figura 2.1. Procedimento para implementação de co-culturas de raízes transgênicas com fungos endomicorrízicos.....	66
Figura 2.2. Diagrama das extracções realizadas aos meios líquidos MSR e SH de crescimento das raízes transgênicas de batata doce e cenoura.....	67
Figura 3.1. Raízes tuberculosas de batata doce de Aljezur em água para crescimento da parte aérea e raízes.....	73
Figura 3.2. Explantes de batata doce em meio MS (Murashige & Skoog 1962) com fitorreguladores (0,5mg/L BAP e 0,1mg/L IBA) (A1 e B1) e meio MS sem fitorreguladores (B1 e B2)	74
Figura 3.3. Explantes de batata doce em meio MSR (modified Strullu Romand)	75
Figura 3.4. Raízes transgênicas da batata doce de Aljezur, variedade Lira. A e B – Formação das primeiras raízes a partir dos discos da raiz tuberculosa da batata doce. C – Primeiras raízes seccionadas dos discos da raiz tuberculosa de batata doce e crescidas em meio SH sólido. E – Pormenor à lupa dos pêlos radiculares das raízes transgênicas de batata doce. D – Raízes transgênicas de batata doce em meio SH líquido.....	79
Figura 3.5. Imagem em microscopia de inversão das raízes transgênicas de cenoura (<i>Daucus carota</i>) inoculadas com <i>Glomus clarum</i> (A1 e A2) e <i>Glomus intraradices</i> (B1 e B2).....	81
Figura 3.6. Co-cultura de raízes transgênicas de cenoura (A) e de batata doce (B) com fungo o <i>Glomus clarum</i>	82
Figura 3.7. Estrutura química do composto 2-metil-1-butanol.....	83
Figura 3.8. 2-Metil-1-butanol identificado nos exsudados de raízes transgênicas de batata doce e cenoura crescidas no meio de cultura MSR.....	84
Figura 3.9. Espectro de massa do composto 2-metil-1-butanol.....	85
Figura 3.10. Estruturas químicas do ácido benzóico e do ácido fenilacético.....	85
Figura 3.11. Ácidos benzóico e 2-fenilacético identificados nos exsudados de raízes transgênicas de batata doce (crescidas nos meios de cultura MSR e SH)	86
Figura 3.12. Espectro de massa do ácido benzóico metilado.....	87
Figura 3.13. Espectro de massa do ácido fenilacético metilado.....	88
Figura 3.14. Estruturas químicas dos compostos voláteis com possível interesse biológico detectados por HS-SPME.....	90
Figura 3.15. Ilustração representativa das estruturas químicas dos compostos de Maillard analisados por HS/DI-SPME-GC-FID. HS – <i>headspace</i> ; DI – imersão directa.....	92
Figura 3.16. Quantidade de compostos de Maillard libertados (A) ($\mu\text{g/Kg}$) e presentes (B) (mg/Kg) nas amostras de batata doce de Aljezur cozinhadas pelos três métodos diferentes.....	93
Figura 3.17. Representação da via de síntese dos compostos de Maillard formados durante a confecção da batata doce.....	98
Figura 3.18. Separação dos compostos de Maillard. Coluna cromatográfica: SupelcoWax (30mx0,25mm i.d.x 0,2 μm). Compostos: 1. Piridina, 2. 3-Furaldeído, 3. 2-Furaldeído, 4. 2-Acetilfurano, 5. Benzaldeído, 6. 5-metilfurfural, 7. 3-Acetil-2,5-dimetilfurano, 8. Fenilacetaldeído, 9. Álcool furfurílico. (Temperatura do forno: de 50 a 240°C a 4°C/min, 20min a 240°C; Gás de arrastamento: Hidrogénio	

[fluxo=1 mL/min]; Modo injeção: split 1/25; Injector: 240°C; Detector: 240°C).
.....100

Figura 3.19. Separação da mistura de compostos de Maillard nas diferentes colunas cromatográficas de líquidos iônicos. A - SLB-IL59; B - SLB-IL76; C - SLB-IL111. 1. Piridina, 2. 3-Furaldeído, 3. 2-Furaldeído, 4. 2-Acetilfurano, 5. Benzaldeído, 6. 5-Metilfurfural, 7. 3-Acetil-2,5-dimetilfurano, 8. Fenilacetaldeído, 9. Álcool furfurílico. (Temperatura do forno: de 50 a 240°C a 4°C/min, 20min a 240°C; Gás de arrastamento: Hidrogénio [fluxo=1 mL/min]; Modo de injeção: split 1/25; Injector: 240 °C; Detector: 240 °C).....102

Figura 3.20. Análise do 5-Hidroximetilfurfural (5-HMF) na coluna cromatográfica Wax (A) (10. 5-HMF - 42,005 min) e na coluna cromatográfica de líquidos iônicos IL-76 (B). (Temperatura do forno: de 50 a 240°C a 4°C/min, 20min a 240°C; Gás de arrastamento: Hidrogénio [fluxo=1 mL/min]; Modo injeção: split 1/25; Injector: 240°C; Detector: 240°C).....105

Figura 3.21. HS-SPME-GC-FID na coluna Wax (1) e IL-76 (2) da batata doce de Aljezur sujeita a diferentes métodos de confecção A-batata crua, B-batata assada, C-batata cozida, D-batata confeccionada no micro-ondas. Compostos: 3. 2-Furaldeído, 4. 2-Acetilfurano, 5. Benzaldeído, 6. 5-Metilfurfural, 8. Fenilacetaldeído, 9. Álcool furfurílico (Colunas: SupelcoWax 30mx0,25mm i.d.x 0,2µm df; (SLB-IL-76 30mx0,25mm i.d.x 0,2µm df; Temperatura do forno: de 50 a 240°C a 4°C/min, 20min a 240°C; Gás de arrastamento: Hidrogénio [fluxo=1 mL/min]; Modo injeção: splitless; Injector: 240 °C; Detector: 240 °C).....107

Figura 3.22. DI-SPME-GC-FID coluna Wax (1) e IL-76 (2) da batata doce de Aljezur sujeitas a diferentes métodos de confecção: A-batata crua, B-batata assada, C-Batata cozida, D-batata confeccionada no micro-ondas. Compostos: 3. 2-Furaldeído, 6. 5-Metilfurfural, 9. Álcool furfurílico, 10. 5-Hidroximetilfurfural. Colunas: SupelcoWax 30mx0,25mm i.d.x 0,2µm df; SLB-IL-76 30mx0,25mm i.d.x 0,2µm df. Temperatura do forno: de 50 a 240°C a 4°C/min, 20min a 240°C; Gás de arrastamento: Hidrogénio [fluxo=1 mL/min]; Modo injeção: splitless; Injector: 240 °C; Detector: 240 °C.....108

Índice de tabelas

Tabela 1.1. Características principais das colunas de líquidos iônicos SLB™-IL utilizadas neste trabalho.....	56
Tabela 2.1. Composição dos meios de cultura utilizados nas culturas <i>in vitro</i>	62
Tabela 3.1. Composição percentual relativa dos componentes voláteis isolados da parte aérea e das raízes tuberculosas de batata doce de Aljezur, da variedade Lira. v - vestigial (<0,05%); IR – índices de retenção relativos aos n-alcenos C ₈ -C ₂₅ na coluna DB1; * - identificação baseada apenas no espectro de massa.....	77
Tabela 3.2. Análise qualitativa por HS/DI-SPME-GC-FID dos compostos de Maillard presentes na batata doce de Aljezur sujeita a diferentes métodos de confecção (assada, cozida e cozinhada em micro-ondas). HS – <i>headspace</i> ; DI – imersão directa; (+) - presença; (-) – ausência.	92
Tabela 3.3. Quantidade de compostos de Maillard libertados (µg/Kg) e presentes (mg/Kg) nas amostras de batata doce assada, cozida e cozinhada no micro-ondas. LOD – limite de detecção; LOQ – limite de quantificação.....	95
Tabela 3.4. Tempos de retenção (min.) dos compostos analisados em diferentes colunas cromatográficas (Temperatura do forno: de 50 a 240°C a 4°C/min, 20min a 240°C; Gás de arrastamento: Hidrogénio [fluxo=1 mL/min]; Modo split 1/25; Injector: 240 °C; Detector: 240 °C).	103
Tabela 3.5. Parâmetros analíticos do método HS-SPME-GC-FID, para a análise dos compostos de Maillard na batata doce cozinhada. LOD – Limite de detecção; LOQ – Limite de quantificação.	112
Tabela 3.6. Parâmetros analíticos do método DI-SPME-GC-FID para a análise dos compostos de Maillard na batata doce cozinhada. LOD – Limite de detecção; LOQ – Limite de quantificação.	112
Tabela 3.7. Recuperações obtidas pelo método DI-SPME-GC-FID utilizado na análise de batata doce de Aljezur cozinhada através de três métodos diferentes.....	113

Abreviaturas

°C - Graus Celsius

°C/min - Graus Celsius por minuto

µg/L - Micrograma por litro

4-Cl-IAA - Ácido 4-cloro-indole-acético

5-HMF - 5-Hidroximetilfurfural

ABA - Ácido abscísico

AEDA - Análise por diluição do extracto do aroma (*aroma extract dilution analysis*)

Amu - Unidade de massa atómica (*Atomic mass unit*)

AS - Ácido salicílico

BA - Benziladenina

BAP - Benzilaminopurina

CHS - Chalcona sintase

CIP - International Potato Center

Cm - Unidade de comprimento, centímetro

CoA - Acetil coenzima A

d.f. - Espessura de filme (*film thickness*)

d.i. - Diâmetro interno

DI - Imersão directa

DI-SPME - Microextração em fase sólida por imersão directa

DNA - Ácido desoxirribonucleico (*Deoxyribonucleic acid*)

DNPH - 2,4-Dinitrofenilhidrazina (DNPH)

DVB/CAR/PDMS - Divinilbenzeno/carboxeno/polidimetilsiloxano

ERM - Micélio extrarradicular

eV - Electrão-volt

FAO - Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura (*Food and Agriculture Organization of United Nations*)

FAOSTAT - Divisão estatística da organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura

FID - Detector de ionização de chama

g - Grama

g/L - Grama por litro

GC - Cromatografia gasosa

GC-MS - Cromatografia Gasosa associada a Espectrometria de Massa

GC-MS/MS - Cromatografia Gasosa associada a Espectrometria de Massa em tandem

GC-O - Olfatometria acoplada à cromatografia gasosa

GR24 - Estrigolactona sintética

h - Hora

HPLC - Cromatografia líquida de alta eficiência
HPLC-MS - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência associada a Espectrometria de massa
HS - Espaço à cabeça (*headspace*)
HS-SPME - Microextração em fase sólida por *headspace*
IAA - Ácido 3-indole-acético
IBA - Ácido 3-indole-butírico
IL - Líquido iónico (*ionic liquid*)
IPAC - Instituto Português da Acreditação
IPG - Indicação geográfica protegida
IR - Índice de retenção
IR - Índice de retenção
IRM - Micélio intrarradicular
IST - Metodologia do padrão interno (*internal standard methodology*)
Kg - Quilograma
L - Litro
LC - Cromatografia Líquida
LC-MS - Cromatografia Líquida associada a Espectrometria de Massa
LC-MS/MS - Cromatografia Líquida associada a Espectrometria de Massa em tandem
LD₅₀ – Dose letal, 50%
LLE - Extração líquido-líquido (*liquid-liquid extraction*)
M - Molar
m - Unidade de comprimento, metro
Meio M - Meio de cultura mínimo
mg - Miligrama
mg/L - Miligrama por litro
Mha – Milhões de hectares
min - Unidade de tempo, minuto
mL - Unidade de volume, mililitro
MM - Massa molecular
mM - Milimolar
mm - Unidade de comprimento, Milímetro
mmHg - Milímetro de mercúrio
MS - Espectrometria de massa
MS - Meio de cultura Murashige & Skoog (1962)
MSR - Modified Strullu Romand
Mt - Milhões de toneladas
Myc - Factor de micorrização

NaOH - Hidróxido de sódio
Nod - Factor de nodulação
ONU - Organização das Nações Unidas
ORFs - *Open reading frames*
PAA - Ácido fenilacético
PAL - Fenilalanina amonia liase
PDMS - Polidimetilsiloxano
PEG - Polietileno glicol
PTFE - Politetrafluoretileno
r.p.m - Rotações por minuto
Ri - *Root inducing*
rol - *Root locus*
RP-HPLC - Cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa
RT - Tempo de retenção (Retention time)
s - Unidade de tempo, segundo
SAR - Sistema de resistência adquirida
SH - Meio de cultura Schenk & Hildebrandt (1972)
SLB - Supelco low bleed
SPE - Extração em fase sólida (solid phase extraction)
SPME - Microextração em fase sólida (solid phase microextraction)
t - Toneladas
TIC - corrente iónica total
UNICEF - *Children's Rights & Emergency Relief Organization*
UV - Radiação ultra-violeta
v - Vestigial
v/v - Volume por volume
VAD - Deficiência em vitamina A (*Vitamin A deficiency*)
W - Watts
WHO - Organização Mundial de Saúde (*World Health Organization*)
 μL - Unidade de volume, microlitro
 μm - Unidade de comprimento, micrómetro

1. Introdução

1.1. Objectivos

A batata doce (*Ipomoea batatas*) é uma importante cultura agrícola, sendo considerada um alimento funcional, devido a incluir na sua composição moléculas bioactivas com propriedades medicinais e terapêuticas.

As micorrizas arbusculares representam a mais comum simbiose existente nas plantas, formando-se na maior parte das culturas agrícolas, melhorando a absorção de água e nutrientes minerais. Alguns estudos demonstram o aumento do rendimento da cultura agrícola de batata doce através desta simbiose. A utilização de fungos endomicorrízicos na agricultura poderá vir a ser um modo ambientalmente sustentável de nutrição das plantas, sendo por isso importante compreender a interacção entre o fungo e a planta, identificando os compostos químicos bioactivos envolvidos na sinalização entre estes dois organismos. Estas moléculas naturais estimulam a formação de micorrizas, pelo que poderão vir a ser utilizadas na agricultura promovendo a eficiência da simbiose e contribuindo assim para o desenvolvimento de sistemas agrícolas sustentáveis.

Tendo em conta que a raiz tuberosa da planta utilizada neste estudo faz parte da alimentação diária das populações de muitos países do mundo, este trabalho teve também como objectivo o estudo das características aromáticas deste alimento. A batata doce é essencialmente consumida depois de cozinhada, adquirindo aromas característicos e dominantes, resultantes da ocorrência de reacções de Maillard que levam à produção de compostos voláteis e semi-voláteis característicos. No entanto, alguns destes compostos apresentam uma potencial toxicidade. Tratando-se a batata doce de um alimento funcional, tornou-se importante estudar e identificar os compostos que se encontram presentes na batata doce crua e cozinhada e avaliar as quantidades em que são ingeridos pelos consumidores.

Neste contexto, pretendeu-se com este trabalho:

a) Implementar culturas *in vitro* de batata doce de Aljezur (propagação vegetativa *in vitro*, raízes excisadas e raízes transgénicas) para o estudo da sinalização química entre fungo e planta.

b) Implementar culturas monoxénicas de fungos endomicorrízicos do género *Glomus* em raízes transgénicas de batata doce.

c) Realizar a extracção dos compostos bioactivos através de extracção líquido-líquido clássica e microextracção em fase sólida (HS-SPME) de modo a compreender de que modo diferentes meios de cultura, SH (Schenk & Hildebrandt 1972) e MSR (modified Strullu Romand), influenciam a composição química dos exsudados das raízes transgénicas.

d) Identificar os compostos voláteis bioactivos existentes nos exsudados das raízes, que se encontram pouco estudados e estão potencialmente envolvidos nas interacções entre a planta e o fungo simbiote.

e) Compreender de que modo os diferentes métodos de confecção alimentar influenciam a síntese (aparecimento) de novos compostos do aroma; para tal, procedeu-se à identificação e quantificação dos compostos libertados no aroma da batata doce, em particular os derivados das reacções de Maillard, confeccionada de três modos diferentes (assada na coloche, cozida e cozinhada em micro-ondas). No método analítico foi utilizada pela primeira vez para esta matriz (batata doce) como preparação de amostra a microextração em fase sólida em *headspace* (HS-SPME).

f) Identificar e quantificar, pela primeira vez, os compostos derivados da reacção de Maillard que permanecem na batata doce depois de confeccionada, utilizando-se para tal como método de preparação de amostra a microextração em fase sólida por imersão directa (DI-SPME), de modo a poder avaliar-se o consumo (ingestão) dos compostos com uma potencial toxicidade.

1.2. A batata doce (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.)

A batata doce é a raiz adventícia da planta dicotiledónea *Ipomoea batatas* (L.) Lam. (syn. *Batatas edulis*), pertencente à família das Convolvulacea (Srisuwan, *et al.*, 2006), que por tuberculização se torna carnuda. Existem cerca de 50 géneros e mais de 1000 espécies nesta família, no entanto, só a *I. batatas* possui raízes tuberculosas ricas em amido, bastante nutritivas e energéticas, com um sabor doce, sendo por isso considerada uma importante cultura agrícola de interesse comercial (Chel-Guerrero, *et al.*, 2011; Woolfe, 1992).

Actualmente, a batata doce é também muito valorizada pela suas folhas e caules, que são uma fonte concentrada de vitaminas, minerais essenciais e proteínas. A parte aérea da planta é por isso cada vez mais consumida como uma hortaliça (Woolfe, 1992) ou como uma fonte proteica na alimentação de gado (Van An, *et al.*, 2003). Estudos recentes sugerem que os animais alimentados nos campos de batata doce, com níveis proteicos elevados, produzem menos gás metano do que quando alimentados com outra ração, contribuindo potencialmente para uma redução importante das emissões nocivas a nível global (CIP, 2010).

Esta planta foi pela primeira vez descrita em 1753 por Lineu como sendo *Convolvulus batatas*. No entanto, em 1791 Lamarck classificou esta espécie como sendo do género *Ipomoea*, com base na forma do estigma e da superfície dos seus grãos de pólen. O seu nome foi, por este motivo, alterado para *Ipomoea batatas* (L.) Lam (Huamán, 1999). Apesar de ser denominada vulgarmente por batata, esta planta não se encontra relacionada taxonomicamente com a batata comum. Ao contrário da batata comum, que se trata de um tubérculo (caule de armazenamento), a batata doce é uma raiz tuberculosa (raiz de armazenamento). Embora tenha também semelhanças com o inhame, as duas plantas não são da mesma família (CIP, 2010).

As raízes tuberculosas têm duas propriedades ou papéis biológicos: armazenam carbono, numa forma que pode ser mobilizada quando necessário e comportam-se como propágulos, sendo capazes de brotar, permitindo a cultura por propagação vegetativa, dando origem a novas plantas. As raízes tuberculosas apresentam uma quantidade de nutrientes suficiente para suportar as necessidades da planta antes desta ser capaz crescer independentemente (Shewry, 2003). O sistema radicular é constituído ainda por raízes fibrosas que absorvem nutrientes e água, e servem de suporte à planta.

A espécie *I.batatas* inclui plantas que são variáveis na morfologia das suas raízes e da parte aérea, o que leva à existência de diferentes variedades (Huamán, 1999). A raiz tuberculosa comestível pode possuir uma forma que varia entre o longo e o afilado, oval ou redonda, elíptica, obovada, oblonga ou mesmo uma forma irregular. A cor da pele varia entre o branco, amarelo, laranja, laranja acastanhada, rosa, avermelhado ou arroxeadado. Pensa-se que a intensidade da cor da pele dependa muitas vezes das condições ambientais onde a planta é cultivada (Woolfe, 1992; Huaman, 1999). A superfície da pele é usualmente suave mas algumas variedades demonstram ter alguns defeitos, como pele de corcodilo, veios proeminentes, constrições horizontais e sulcos longitudinais (Huaman, 1992). A cor da polpa pode variar entre o branco, creme pálido, amarelo ou laranja. Algumas variedades podem apresentar também pigmentação vermelha ou púrpura, com pontos dispersos, anéis pigmentados ou, em alguns casos, ao longo de toda a polpa da raiz (Woolfe, 1992; Huamán, 1999). Relativamente à parte folhosa desta espécie, a forma geral das folhas de batata-doce pode ser arredondada, reniforme (em forma de rim) cordada (em forma de coração), triangular, rastiforme (trilobular e em forma de lança com dois lobos basais divergentes), lobuladas e quase divididas. A cor das folhas pode variar entre o verde-amarelada, verde ou roxa e a pigmentação pode dar-se em parte ou em todo o limbo foliar. Algumas variedades podem apresentar folhas jovens roxas e folhas maduras verdes. O tamanho da folha e o grau de pilosidade varia também de acordo com a variedade e as condições ambientais. Os tricomas são glandulares e, geralmente, são mais numerosos na superfície abaxial da folha. As nervuras da folha podem ser verdes ou totalmente pigmentadas com antocianinas, o que por vezes se torna uma característica essencial à diferenciação entre variedades. Em relação ao caule, este é cilíndrico e o seu comprimento depende do habitat de crescimento e da disponibilidade de água no solo. A cor do caule é normalmente verde ou de cor roxa (pigmentação por antocianinas) (Huamán, 1999). As variedades de batata doce diferem na sua capacidade de darem flor. Nas condições normais, em alguns campos, algumas variedades não florescem, outras produzem algumas flores e algumas produzem flores abundantemente. A flor é bissexual, possuindo androceu e gineceu. O cálice é constituído por 5 sépalas, 2 exteriores e 3 interiores. A corola consiste em 5 pétalas, que se encontram fundidas criando uma espécie de funil, são de cor lilas ou arroxeadas. Algumas variedades apresentam flores brancas (Huaman, 1992).

1.2.1. História

Pensa-se que a batata doce é nativa da região tropical da América do Sul, e que foi domesticada há pelo menos 5000 anos. Com base na análise das características morfológicas da planta e das espécies selvagens do mesmo género, é provável que o centro geográfico da sua origem se encontre entre a península de Yucatan no México e o leito do rio Orinoco na Venezuela (Srisuwan, *et al.*, 2006; Chel-Guerrero, *et al.*, 2011). Recentemente, a utilização de marcadores moleculares revelou a existência de uma grande diversidade de parentes selvagens nesta região, levando a crer que a América Central será o centro de origem e diversidade desta espécie (Srisuwan, *et al.*, 2006). Um estudo, com base na morfologia, citologia, e evidências genéticas, revelou que uma espécie de *Ipomoea*, identificada como *I. trifida* (HBK) G.Don, poderá ser considerada como sendo o ancestral da batata doce. Esta hipótese é ainda mais consistente com a existência de compatibilidade reprodutiva com a batata doce, originando híbridos F1 férteis (Nishiyama & Teramura, 1962).

A batata doce foi introduzida na Europa a partir das Índias ocidentais, denominação atribuída ao continente Americano na época dos Descobrimentos, depois da primeira viagem de Cristovão Colombo em 1492. No século XVI, os exploradores portugueses levaram a batata doce para África, Índia, sudeste da Ásia. A partir deste século a batata doce passou a ser cultivada em Portugal e Espanha, onde se tornou um alimento diário muito antes da popularização da batata comum (*Solanum tuberosum* L.) no século XVIII no resto da Europa (Escalante-Sanchez & Pereda-Miranda, 2007). Pensa-se que a transferência directa da planta tenha sido feita pela primeira vez pelos galeões comerciais espanhóis do México para as Filipinas. No entanto, alguns estudos recentes sugerem que a introdução da batata doce na Oceânia poderá ter ocorrido na pré-histórica a partir da Mesoamerica através de dispersão natural (Srisuwan, *et al.*, 2006).

Actualmente a batata doce é cultivada em várias partes do Mundo, tendo sido e continuando a ser responsável pela subsistência de muitas populações e como recurso ao cultivo de outras culturas agrícolas. No Japão, por exemplo, foi cultivada como recurso aos campos de arroz, depois de uma catástrofe natural os ter destruído. No início de 1960, foi o alimento responsável pela sobrevivência de milhões de pessoas na China. Na década de 1990, no Uganda, foi a cultura que substituiu a cultura de mandioca, quando um vírus a devastou (CIP, 2010).

1.2.2. Produção e Distribuição geográfica

A batata doce é uma importante cultura agrícola, tanto pela área geográfica que ocupa como pelo rendimento da sua produção. Esta cultura é bastante produtiva, de fácil crescimento e apresenta poucos problemas no campo quando comparada com outras espécies agrícolas alimentares de importância comercial. Embora seja adaptável a vários climas agrários, apresentando muitas vezes uma produtividade elevada num período de tempo pequeno (Zuraida, 2003), o rendimento desta cultura não deixa de ser dependente das diferentes condições do solo e do clima (Van An, *et al.*,

2003). Tendo em conta a sua produtividade, a batata-doce pode representar uma maior produção de energia comestível por hectare por dia do que qualquer outra cultura (Hijmans, *et al.*, 2000).

Relativamente à sua distribuição geográfica, a batata doce encontra-se distribuída pelas regiões tropicais, subtropicais e temperadas do Mundo (Srisuwan, *et al.*, 2006), verificando-se que o seu crescimento pode ocorrer até altitudes de 2500m acima do nível do mar (CIP, 2010). Embora seja originária das regiões tropicais e subtropicais, actualmente, a maior parte da batata doce cresce nas zonas temperadas, sendo de 70% a área ocupada por esta cultura entre as latitudes de 20°N e 40°N (Hijmans, *et al.*, 2000).

Apesar de ser uma planta herbácea e perene, a batata doce, é cultivada anualmente ou várias vezes durante o mesmo ano, através de propagação vegetativa por estaca, que consiste na plantação das suas raízes tuberculosas ou dos seus caules. O modo de crescimento é semelhante ao crescimento de uma vinha, que se expande rapidamente horizontalmente no chão. Nos climas quentes e tropicais a batata doce é cultivada ao longo do ano. A colheita é realizada normalmente 4 meses depois da plantação e pode prolongar-se por vários meses. Nas regiões temperadas, tendo em conta a pouca resistência da batata doce à geada, a colheita tem que ser realizada antes do começo do Inverno e por isso a cultura é anual (Peters, 2006). Geralmente, estes dois sistemas de cultivo (sazonal vs todo ano) têm associados diferentes problemas. Por exemplo, as doenças associadas a fungos patogénicos são proeminentes nas áreas em que a produção é sazonal, enquanto que as pestes por insectos ocorrem principalmente nas áreas em que o cultivo se realiza durante todo o ano (Hijmans, *et al.*, 2000). Uma das maiores ameaças da cultura de batata doce em algumas regiões é o gorgulho da batata doce (*sweetpotato weevil*), que pode causar perdas de 60% e de 100% em períodos de seca (CIP, 2010).

Mundialmente, a batata doce é considerada a sexta cultura agrícola alimentar mais importante, depois do arroz, trigo, batata comum, milho e mandioca (CIP, 2010), sendo cultivada em mais de 100 países (Kays, *et al.*, 2005). Mais de 103 milhões de toneladas de batata doce são produzidas globalmente por ano, segundo o FAOSTAT (2012) (FAO, 2013). Segundo dados da Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO) para o ano de 2002, a batata doce é a quinta cultura agrícola produzida em países em desenvolvimento (Kays, *et al.*, 2005), registando-se uma concentração notável de batata doce no leste Africano, em países como o Uganda, Ruanda, Burundi e Quênia (Huaccho & Hijmans, 2000).

Apesar de ser originária da América Latina, o continente asiático é actualmente o maior produtor mundial de batata doce, representando 78% da área global de cultivo de batata doce (Huaccho & Hijmans, 2000). A China encontra-se no topo da lista de produtores de batata doce no Mundo (CIP, 2010). Segundo dados da Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura, registou-se em 2004 neste país uma produção de 113,6Mt, que representou, nesse mesmo ano, 88,9% da produção mundial (Srisuwan, *et al.*, 2006; FAO, 2013). Apesar da produção ter vindo a decrescer, em 2012 a produção foi ainda de 73,3 Mt (FAO, 2013). O Vietname, a Indonésia, a Índia e as Filipinas são também países importantes produtores de batata doce na Ásia. Existe também uma

elevada produção *per capita* em países como a Papua Nova Guiné, As Ilhas Cook e Tonga, onde a batata doce tem um importante papel na dieta das populações (Huaccho & Hijmans, 2000).

Em África houve um crescimento de área cultivada de batata doce (Huaccho e Hijmans 2000), sendo de 2,9Mha em 2002 segundo o FAOSTAT (2002) (FAO, 2013) e dez anos depois de 3,4Mha (FAO, 2013), particularmente junto à densa bacia povoada do Lago Victória, em países como o Burundi, Ruanda, Uganda e República Democrática do Congo, principalmente na última década do século XX (Hijmans, *et al.*, 2000; FAO, 2013). O aumento demográfico será possivelmente a principal razão para a crescente importância desta cultura na região (Hijmans, *et al.*, 2000). O cultivo de batata doce é feito em áreas com secas frequentes, onde os cereais têm uma produtividade pequena (produtividade marginal) e os agricultores procuram aumentar a biodiversidade de plantas cultivadas, na tentativa de combater estes eventos de *stress*. A cultura de batata doce tem várias vantagens no contexto dos sistemas agrícolas em África: é um alimento possível de produzir num período de tempo relativamente curto e são alcançados bons rendimentos em condições de cultura sub-óptimas, em campos marginais, com solos pobres e abastecimento de água limitado (Hijmans, *et al.*, 2000, Oswald, *et al.*, 2009). Na área da África ocidental, a cultura de batata doce serve como complemento aos períodos de menor produção de mandioca e inhame (Thiele, *et al.*, 2009).

Em alguns países, como o Quênia, o Ruanda e o Uganda onde existe um padrão de chuvas bimodal, a batata doce contribuiu para a subsistência alimentar das famílias, estando disponível 11 meses do ano, e possui também uma importância económica e monetária, visto que as batatas são vendidas frescas em muitos mercados locais (Oswald, *et al.*, 2009; Thiele, *et al.*, 2009).

No entanto, a produtividade desta cultura em África está dependente das técnicas agronómicas utilizadas, que são por vezes inapropriadas. O acesso a fertilizantes e a pesticidas é limitado e não se realiza uma monitorização e controlo relativamente a vírus ou pragas de insectos que podem pôr em risco as culturas. No entanto, no Uganda e Quênia ocidental, por exemplo, em que a cultura de batata doce começa a ter uma orientação comercial, começam também a existir este tipo de preocupações (Oswald, *et al.*, 2009).

No continente de origem da batata doce, poderia pensar-se que o México, antiga colónia hispânica em que o consumo deste alimento se realiza há mais de três séculos, seria o maior produtor de batata doce (60000t) (Escalante-Sanchez, *et al.*, 2008). No entanto, o principal país produtor de batata doce no continente Americano são os Estados Unidos da América (1,2Mt segundo FAOSTAT de 2012) (FAO, 2013), seguido do Brasil e da Argentina. Outros países como o Peru, Cuba e o Uruguai também são produtores de batata doce em quantidades significativas (FAO, 2013).

Na Europa os únicos países produtores de batata doce são a Grécia, Portugal, Itália e Espanha. No total a produção anual é de cerca de 57900t, encontrando-se a maior produção e área de cultivo na Península Ibérica (FAO, 2013). Em Portugal, tanto a produção como a área de cultivo têm vindo a aumentar nos últimos anos.

Apesar do grande aumento demográfico mundial dos últimos anos, a produção mundial de batata doce tem vindo a diminuir, segundo o FASTAT de 136Mt em 2002 para 103Mt em 2012, nos últimos dez anos (FAO, 2013). Em oposição, a produção de arroz, por exemplo, tem crescido com o

aumento da população (Kays, 2006). Pensa-se que este decréscimo do cultivo de batata doce não se deverá a problemas no crescimento da cultura, mas que esteja relacionado com o pouco consumo *per capita* em alguns países desenvolvidos que por sua vez bloqueiam o aumento da produção (Kays, 2006).

1.2.3. Utilização e processamento

A ingestão de batata doce crua pode produzir flatulência, diarreia, sendo mesmo considerada um laxante natural, devido ao seu elevado teor em resinas glicosídicas (Escalante-Sanchez, *et al.*, 2008). Além disso, o amido presente nas raízes cruas é muito resistente à hidrólise por parte da amilase, e a existência de inibidores da tripsina diminuem também a digestibilidade das proteínas. A cozedura da batata leva ao aumento da hidrólise do amido e reduz os inibidores de tripsina levando a uma melhor digestibilidade da batata doce (Dominguez, 1992). Estas raízes tuberculosas são por isso consumidas essencialmente depois de cozinhadas (cozidas, assadas ou fritas). Contudo, são também processadas em amido, farinha ou purés na confecção de produtos alimentares secundários. As papas para bebés com uma base de batata doce são eleitas em muitos países como a primeira comida sólida para as crianças (Woolfe, 1992).

A batata doce não é utilizada apenas para consumo humano, mas também crua para a produção de álcool e na alimentação animal (Van An, *et al.*, 2003; Srisuwan, *et al.*, 2006). Na China, por exemplo, 40% da produção é usada para o consumo humano e usos industriais, sendo a restante produção utilizada na alimentação do gado (Woolfe, 1992). O papel da batata doce na China tem vindo a sofrer alterações, tendo passado de um alimento de consumo diário para uma matéria prima na indústria de produção de alimentos processados, como noodles, amido ou álcool através da secagem e desidratação das raízes (Woolfe, 1992). Nas regiões mais ricas da China, tornou-se por isso um alimento suplementar e um snack. No entanto, continua a ser um alimento utilizado tradicionalmente na alimentação das populações dos distritos mais pobres e regiões montanhosas rurais (Huaccho & Hijmans, 2000) onde a densidade demográfica é elevada e a terra irrigável é escassa. Nos países africanos, principalmente nos centros urbanos, a batata doce também é vista como o “alimento do homem pobre”, e por isso é processada noutros produtos alimentares ou utilizada em substituição da farinha de trigo na produção de biscoitos e pão, para que haja um aumento do seu consumo (FAO, 2010). Nas zonas rurais a batata doce é essencialmente consumida cozida ou assada e muitas vezes é seca (raízes desidratadas), como forma de preservação da batata doce para uso doméstico durante a época baixa (Kidmose, *et al.*, 2007; Bengtsson, *et al.*, 2008).

Em contraste com a China, no México, a batata-doce é sobretudo utilizada na alimentação humana sendo consumida diariamente em vários pratos doces e salgados. Cozinhada em calda de açúcar, por exemplo, é consumida acompanhada com leite ao pequeno almoço (Escalante-Sanchez, *et al.*, 2008). A grande diversidade de variedades mexicanas, que leva à existência de raízes tuberculosas com diferentes cores e sabores, levou a que a batata doce tenha sido redescoberta pela

cozinha contemporânea deste país. Este alimento tem assim um papel importante na dieta base dos mexicanos, mas também como um futuro ingrediente culinário gourmet (Escalante-Sanchez, *et al.*, 2008).

Nos Estados Unidos da América, apesar de ser preferencialmente processada noutros produtos alimentares, a batata doce é também consumida, essencialmente assada (Wang e Kays, 2001). No entanto, houve um decréscimo de consumo de batata doce, essencialmente devido ao aroma e sabor dominantes que apresenta depois de cozinhada (Huaccho & Hijmans 2000). Os consumidores Norte Americanos vêem a batata doce como um ingrediente difícil de incluir diariamente nas suas refeições devido ao sabor e aroma dominantes, que consideram limitar o seu uso na culinária, diminuindo a flexibilidade de utilização em diferentes pratos (Sun, *et al.*, 1994; Wang & Kays, 2001; Wang & Kays, 2003).

O decréscimo da produção mundial anteriormente referido, deve-se essencialmente à perda de popularidade da batata doce nos países industrializados e zonas urbanas, onde é considerada muitas vezes um alimento indicativo de pobreza e pouco flexível na culinária.

1.2.4. A batata doce como alimento funcional

Um alimento funcional é aquele que, para além de fornecer a nutrição básica, tem atributos adicionais com um efeito positivo directo na saúde e bem estar do ser humano. A batata doce é uma importante fonte de hidratos de carbono e outros nutrientes benéficos para a saúde e possui uma quantidade significativa de compostos químicos bioactivos, que lhe atribui um poder antioxidante maior do que outros vegetais da dieta típica ocidental (Guan, *et al.*, 2006). As diferentes variedades de batata doce, por exemplo, devem as suas cores características (amarela intensa, laranja e roxa) a antocianinas e carotenoides que possuem propriedades benéficas para a manutenção e promoção da saúde humana (Teow, *et al.*, 2007).

Na China, a população utiliza a batata doce como planta medicinal há centenas de anos (Yin & Kong, 2008). Na medicina tradicional chinesa, as raízes tuberculosas da *Ipomoea batatas* são utilizadas para promover a produção de fluidos corporais, a homeostasia e a apocnose (Yin, *et al.*, 2008) e a infusão das suas folhas para tratar ou prevenir diabetes (Li, *et al.*, 2012) tratar patologias na boca e tumores da garganta (Escalante-Sanchez & Pereda-Miranda, 2007). No México, os curandeiros tradicionais utilizam a infusão das folhas para reduzir a temperatura do corpo (febres), tratar doenças do coração, disenteria, diarreia, problemas de estômago, infecções gastrointestinais e doenças provocadas por parasitas (Escalante-Sanchez & Pereda-Miranda, 2007).

Actualmente é sabido que, o extracto de batata doce exhibe uma forte acção antioxidante (Oki, *et al.*, 2002; Cevallos-Casals & Cisneros-Zevallos, 2003) e possui actividade antimutagénica (Yoshimoto, *et al.*, 1999; Yoshimoto, *et al.*, 2001), reduz significativamente a pressão sanguínea e a lesão hepática produzida por tetracloreto de carbono, apresentando também actividades anti-

inflamatórias, anti-microbianas e possui efeitos protectores contra radiação UV (Guan, *et al.*, 2006). Para além disso, foi ainda identificado um efeito anti-hiperglicémico (antidiabético) em ratos através da retardação da actividade da maltase (Matsui, *et al.*, 2002).

1.2.4.1. Componente nutricional

As raízes tuberculosas da batata doce são uma fonte de vitamina C, vitamina B, vitamina E, niacina (vitamina B3), riboflavina (vitamina B2), tiamina (vitamina B1), fosforo, cálcio, potássio, ferro e zinco (Dominguez, 1992; Zuraida, 2003; CIP, 2010), apresentam um baixo conteúdo em proteínas, gordura e fibras e um baixo índice glicémico comparativamente à batata comum. A batata doce possui um elevado teor em hidratos de carbono (80-90%) indicativo do seu principal e potencial valor como fonte energética (Dominguez, 1992), sendo a forma predominante o amido. O amido presente na batata doce é considerado como tendo efeitos fisiológicos e benefícios para a saúde similares aos das fibras, prevenindo contra o cancro do colon, aumentando a tolerância à glucose e sensibilidade à insulina, diminuindo a concentração de colesterol e triglicéridos no plasma, aumentando a saciedade e possivelmente reduzindo o armazenamento de gorduras (Olubobokun, *et al.*, 2013). Apesar do baixo teor em proteínas, as raízes tuberculosas de batata doce possuem como proteína maioritária, a sporamina, que constitui 80% do conteúdo total. A sporamina é uma proteína de armazenamento, que tem como principal papel acumular azoto, enxofre e carbono, nutrientes importantes para a sobrevivência em condições adversas e para o crescimento de novas plantas a partir das raízes tuberculosas (Shewry, 2003). Esta proteína de armazenamento é também um inibidor da tripsina e apresenta capacidade antioxidante *in vitro* (Houa, *et al.*, 2005). A parte folhosa da planta possui um baixo conteúdo em hidratos de carbono mas um conteúdo elevado em fibras e proteínas, tendo também um elevado valor vitamínico e sendo ricas também em cálcio, ferro e zinco (Dominguez, 1992; Islam 2006).

1.2.4.2. Compostos Fenólicos

Os compostos fenólicos são um grande grupo de metabolitos secundários distribuídos de forma ubíqua no reino vegetal, que se encontram divididos em dois subgrupos: flavonoides e ácidos fenólicos. Os flavonoides constituem o grupo mais importante de compostos fenólicos presentes nos alimentos, constituído por cerca de 4000 compostos identificados em plantas aromáticas, e que inclui antocianinas, proantocianinas, flavonóis e catequinas. Os ácidos fenólicos, por outro lado, compreendem os ácidos hidroxicinâmicos (ex. conjugados do ácido cafeico e ácido ferulico, ácido sinápico) e ácidos hidroxibenzoicos (ex. gentísico ou *p*-anisico) (El Far & Taie, 2009; Carvalho, 2010).

A batata doce possui uma grande diversidade de compostos fenólicos em vários tecidos, como as suas flores, folhas, caules, raízes não tuberculosas e raízes tuberculosas (Carvalho, 2010). Tanto as folhas batata doce como as raízes tuberculosas possuem um grande conteúdo em ácidos

fenólicos e flavonoides, maioritariamente antocianinas, que possuem um potencial valor medicinal significativo no combate a algumas doenças humanas e podem também ser utilizados como corantes naturais (Carvalho, 2010).

1.2.4.2.1. Antocianinas

As antocianinas, compostos fenólicos do grupo dos flavonoides, são pigmentos hidrossolúveis que ocorrem naturalmente nos vegetais, frutos e flores responsáveis pelas suas cores vermelha, púrpura e azul (Miyazaki, *et al.*, 2008). As antocianidinas (Figura 1.1.) são as estruturas químicas básicas das antocianinas. As antocianidinas consistem num anel aromático ligado a um anel heterocíclico que contém oxigénio, que também se encontra ligado através de uma ligação carbono-carbono a um terceiro anel aromático. Quando as antocianidinas se encontram na sua forma glicosídica, ligadas a uma molécula de açúcar, são denominadas por antocianinas (Castañeda-Ovando, *et al.*, 2008). Pelo menos mais de 600 tipos de antocianinas foram isoladas da natureza derivadas das antocianidinas, cianidina, delphinidina, malvidina, peonidina, pelargonidina e petunidina, em maior quantidade em frutos e vegetais (Tian, *et al.*, 2005).

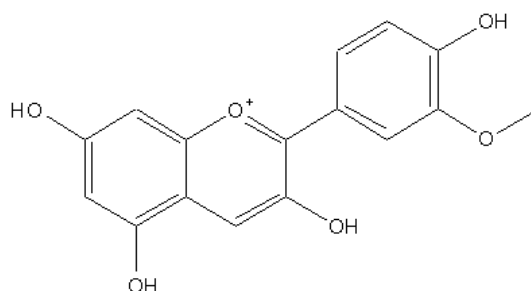


Figura 1.1. Estrutura química da antocianidina peonidina.

Relativamente ao papel das antocianinas nas plantas, estes compostos protegem as folhas de vários stresses, como a luz intensa e a contaminação por metais pesados, desempenham um papel na entomofilia nas flores, e inibem o ataque por parte de organismos patogénicos e predadores de sementes (Mano, *et al.*, 2007). A sua função nas raízes tuberculosas ainda não é claro, mas pensa-se que será semelhante ao seu papel nas sementes (ex. protecção contra organismos patogénicos e predadores) aumentando a sua preservação e a vantagem reprodutiva, visto que as raízes tuberculosas possuem de igual modo um papel reprodutor (Mano, *et al.*, 2007).

As antocianinas são poderosos antioxidantes e possuem uma boa biodisponibilidade, ou seja, são facilmente absorvidos a partir do tracto digestivo para a corrente sanguínea. A aplicação de antocianinas como corantes alimentares naturais em alternativa aos corantes sintéticos, muitas vezes prejudiciais à saúde, não aumenta apenas o valor e bom aspecto dos alimentos como lhes pode atribuir propriedades nutracêuticas (El Far & Taie, 2009; Carvalho, 2010).

Tendo em conta que se verificou que a capacidade antioxidante das raízes tuberculosas varia entre as diferentes variedades de batata doce, pensa-se que esta esteja relacionada com a pigmentação da sua polpa, que pode variar entre o branco e o vermelho, com um menor e maior conteúdo em antocianinas respectivamente (Teow, *et al.*, 2007).

Uma variedade de polpa vermelha cultivada na região dos Andes, no Peru, revelou ter uma maior actividade antioxidante e conteúdo fenólico do que a baga de mirtilo, uma fruta com um elevado teor em antioxidantes (Cevallos-Casals & Cisneros-Zevallos, 2003; Teow, *et al.*, 2007). As raízes tuberculosas da batata doce com polpa roxa da variedade “Ayamurasaki”, uma variedade desenvolvida no Japão e muito estudada pelo seu elevado conteúdo em antocianinas, acumula antocianinas mono e diaciladas em grandes quantidades (Tian, *et al.*, 2005; Mano, *et al.*, 2007), verificando-se que o seu extracto tem uma maior actividade antioxidante que extractos de repolho vermelho ou milho roxo (Rumbaoa, *et al.*, 2009). Da polpa desta variedade de batata doce foram extraídas e identificadas as antocianinas cianidina e peonidina e os seus derivados acilados com ácidos fenólicos como o cafeico, ferulico e ácidos hidroxibenzoicos (Figura 1.2.) (Tian, *et al.*, 2005; Rumbaoa, *et al.*, 2009).

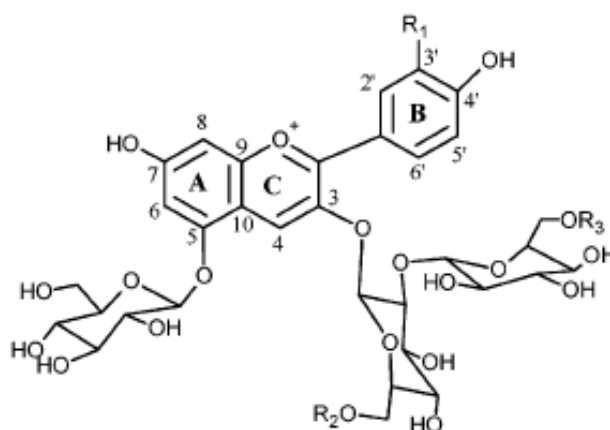


Figura 1.2. Estrutura das antocianinas isoladas da batata doce de polpa roxa. Cianidina: R₁=OH; peonidina: R₁ = OCH₃; R₂,R₃ = H, ácido p-hidroxibenzoico, ácido cafeico, ácido p-coumárico e ácido ferúlico (adaptado de Tian, *et al.*, 2009).

As variedades de batata doce com folhas verdes, como é o caso das variedades que se podem encontrar em Portugal (ex. Lira), apresentam quantidades pouco significativas ou mesmo inexistentes de antocianinas neste tecido. No entanto, se as plantas forem expostas a uma certa quantidade de luz durante um determinado período, as folhas apresentam uma cor avermelhada encontrando-se no seu extracto a antocianina delfinidina-3-glucosido (Carvalho, *et al.*, 2010).

Para além do poder antioxidante, as antocianinas apresentam outras actividades biológicas, como a actividade anti trombótica, a actividade antimutagénica, actuam na prevenção e melhoramento da carcinogénese (inibição do crescimento de células cancerígenas), no melhoramento das funções visuais, possuem um potencial anti-hipertensivo, actuam na redução de

lesões hepáticas, no tratamento da obesidade, hiperglicemia e asma, e no melhoramento da função endotelial (Konczak-Islam, *et al.*, 2003; Miyazaki, *et al.*, 2008; El Far & Taie, 2009).

1.2.4.2.2. Ácidos fenólicos

Em adição às antocianinas, a batata doce é abundante noutros compostos fenólicos como os ácidos fenólicos (ex. ácido cafeico e derivados) que possuem uma elevada actividade antioxidante e outras actividades biológicas benéficas para a saúde humana (Takenaka, *et al.*, 2006; Padda & Picha, 2008). Tanto as raízes tuberculosas como as folhas de batata doce demonstraram ser excelentes fontes naturais destes compotos bioactivos com actividades anticancerígenas, antidiabéticas, antihipertensas, antimutagénicas, anti-replicação de vírus (ex. HIV-1), e antibacterianas (Li, *et al.*, 2012).

O ácido clorogénico e os seus derivados são ácidos fenólicos presentes em grande quantidade na raiz tuberosa da batata doce. São uma ampla família de esteres formados entre o ácido quinico e um a quatro resíduos de ácidos trans cinâmicos, como o ácido cafeico, *p*-cumárico e ferúlico (Figura 1.3.). Estes ácidos têm revelado interessantes propriedades como a actividade antiviral (anti-HIV), a inibição de absorção de glucose *in vitro*, a modificação de secreção de hormona intestinal e tolerância à glucose em humanos (Dini, *et al.*, 2006; Zheng & Clifford, 2008). Estudos realizados a uma variedade de batata doce dos Estados Unidos revelaram a presença de ácido clorogénico e isoclorogénico, sendo compostos fenólicos maioritários dessa mesma variedade (Teow, *et al.*, 2007). Numa variedade chinesa foram encontrados derivados do ácido clorogénico como, o ácido 5-cafeoilquinico, o ácido 3,5-dicafeoilquinico e o ácido 4,5-dicafeoilquinico, e ainda pequenas quantidades de ácidos feruloilquinicos. Pensa-se que o perfil de derivados do ácido clorogénico varie com a origem da batata doce (Zheng & Clifford, 2008).

O ácido clorogénico também se encontra nas folhas de batata doce, embora se tenha registado num estudo com uma batata doce portuguesa, que o ácido sinápico é o composto fenólico maioritário. Foram identificados também em quantidades significativas os ácidos hidroxibenzóicos, nomeadamente os ácidos *p*-anísico e gentísico. Assim como no caso das antocianinas, a exposição à luz durante um longo período leva ao aumento da concentração destes ácidos fenólicos nas folhas (Carvalho, *et al.*, 2010).

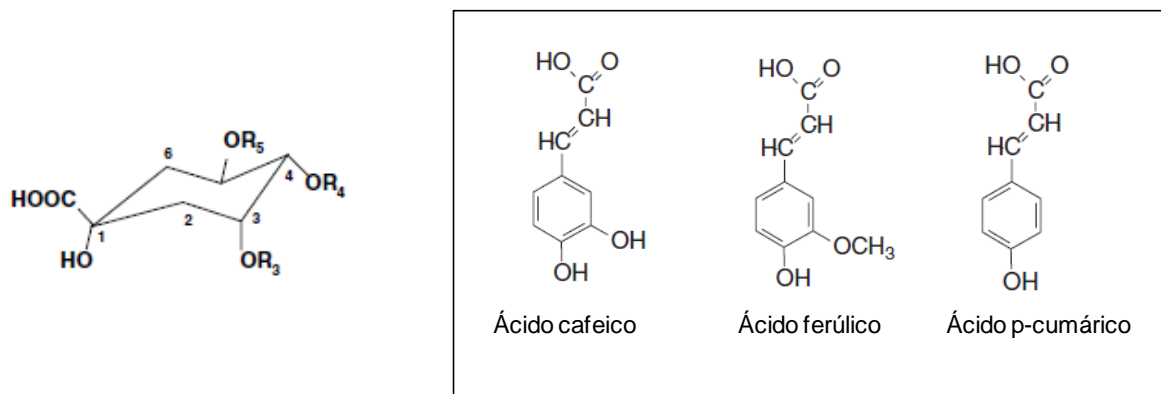


Figura 1.3. Estrutura de alguns ácidos clorogénicos isolados da batata doce. Ácido quínico: R3,R4,R5=H; 5-cafeoilquínico: R3,R4=H, R5=ácido cafeico; 3,5-dicafeoilquínico: R4=H, R3,R5=ácido cafeico, 4,5-dicafeoilquínico: R3=H, R4,R5=ácido cafeico, 3-feruloilquínico: R4,R5=H; R3=ácido ferúlico. (Adaptado de Dini, *et al.*, 2006).

1.2.4.3. Carotenóides

Os carotenóides são moléculas lipossolúveis, responsáveis pela cor de alguns alimentos (Castañeda-Ovando, *et al.*, 2009). A maioria são tetraterpenos compostos por oito unidades de isoprenos, como o β -caroteno (Figura 1.4.) (Liaaen-Jensen, 2004). Este composto é responsável essencialmente pela cor das variedades de batata doce com polpas amarela e cor de laranja (Kidmose, *et al.*, 2007). Algumas variedades de batata doce são mais ricas em pro-vitamina A do que o arroz, devido ao seu elevado conteúdo em β -caroteno, precursor desta vitamina no corpo humano depois da sua absorção (Dominguez, 1992; Zuraida, 2003; CIP, 2010).

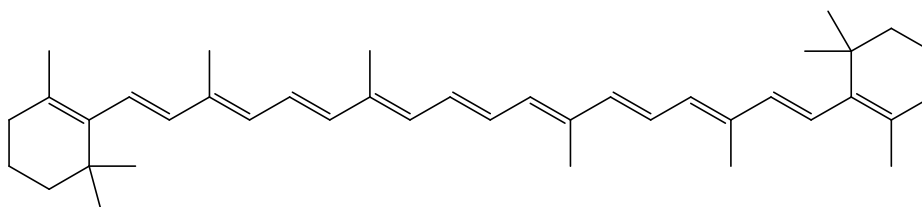


Figura 1.4. Estrutura química do β -caroteno

Em muitos países em desenvolvimento, a maior contribuição para a absorção de vitamina A tem origem nos carotenóides contidos nos alimentos vegetais, que contribuem para cerca de 82% do total de vitamina A absorvida, visto que a contribuição da carne e do peixe é de menor importância, porque estes alimentos são bastante dispendiosos e/ou não se encontram acessíveis à maior parte da população (Kidmose, *et al.*, 2006; Kidmose, *et al.*, 2007). A deficiência de vitamina A (VAD) é galopante na África Subsaariana, principalmente nas zonas rurais, sendo um dos maiores problemas de saúde nos países em desenvolvimento. Esta deficiência vitamínica afecta milhões de crianças com menos de 5 anos de idade, contribuindo para elevados índices de cegueira, nanismo, diarreia, de

doenças respiratórias, da diminuição da capacidade cognitiva (diminuição do QI) e de deficiência imunitária (Kidmose, *et al.*, 2007; CIP, 2010), esta última, associada à diminuição da capacidade destas crianças de lutarem contra doenças bastante presentes nestes países como a malária, sarampo, pneumonia e a SIDA (CIP, 2011). Esta má-nutrição leva ainda à morte prematura de crianças, grávidas e mulheres lactantes e aumenta significativamente os riscos para a mãe e para a criança durante o parto (CIP, 2011). Segundo dados de algumas organizações humanitárias internacionais (WHO/UNICEF), pelo menos 254 milhões de crianças em idade pré-escolar, em todo o mundo, sofrem de deficiência clínica e subclínica de vitamina A (VAD) (Kidmose, *et al.*, 2006; Kidmose, *et al.*, 2007).

Várias estratégias de intervenção para combater a deficiência em vitamina A têm sido promovidas nos países em desenvolvimento, como a fortificação de alimentos, utilização de suplementos, tentativa da diversificação da dieta e utilização de culturas agrícolas ricas nesta vitamina (Bengtsson, *et al.*, 2008). Verificou-se que somente 125g de batata doce fresca da maior parte das variedades com polpa laranja contêm β -caroteno suficiente para providenciar a dose diária de vitamina A de que necessita uma criança em idade pré-escolar (CIP, 2010). A batata doce de polpa amarela, que possui um maior conteúdo em β -caroteno que a cenoura, pode fornecer a um adulto a dose diária recomendada de vitamina A se consumidas três a seis porções/fatias (slices) de batata doce (Escalante-Sanchez, *et al.*, 2008).

Em 1999, investigadores do CIP (*International Potato Center*) identificaram um pequeno número de batata doces de polpa laranja em África com elevado teor em β -caroteno, que consideraram como sendo uma variedade biofortificada (CIP, 2003; Bengtsson, *et al.*, 2008). Esta variedade foi vista como tendo potencial na prevenção e combate à deficiência de vitamina A e foi colocada à prova dos consumidores africanos. Um estudo Sul Africano revelou a sua eficácia em crianças em idade escolar, que a consomem cozida ou em puré (Bengtsson, *et al.*, 2008).

No entanto, apesar dos efeitos benéficos que estas variedades de batata doce apresentam, no continente Africano a batata doce de polpa branca, com um conteúdo em carotenoides reduzido, é a preferida pelos consumidores. A estratégia de redução da prevalência da deficiência de vitamina A nesta região passa, não só, pela introdução de batata doce de polpa laranja e amarela, mas também por informar as populações sobre os benefícios para a saúde destas variedades, tentando que se tornem cada vez acessíveis e sejam preferidas pelos consumidores e produtores em detrimento da batata doce de polpa branca (Kidmose, *et al.*, 2007).

1.2.4.4. Resinas glicosídicas

As resinas glicosídicas encontram-se presentes unicamente na família das convolvuláceas, e a sua diversidade química tem um potencial elevado em aplicações terapêuticas (Escalante-Sanchez, *et al.*, 2008, Pereda-Miranda, *et al.*, 2010). Vários estudos remetem para a presença destes metabolitos secundários na batata doce (Escalante-Sanchez & Pereda-Miranda, 2007; Escalante-Sanchez, *et al.*, 2008). Algumas resinas glicosídicas demonstraram ter propriedades antifúngicas,

antibacterianas, citotóxicas, e alelopáticas (inibição do crescimento de outras plantas) (Yin, *et al.*, 2009).

As resinas glicosídicas são derivados glicosídicos dos ácidos gordos mono- e di-hidroxilados em C-14 e C-16, são por isso conhecidas por glicolípidos ou lipo-oligosacarídeos. Estes metabolitos anfipáticos, com estruturas químicas pouco comuns, são constituídos por moléculas hidrofobas (agliconas de ácidos gordos) e por moléculas hidrofílicas (um açúcar). A parte hidrofílica é composta por um heteropolissacarídeo, constituído por até seis resíduos de quatro monossacarídeos diferentes. As unidades de açúcares já encontradas nesses metabolitos são D-glucose e epímeros de pentoses (L-ramnose, D-fucose, D-quinovose e D-xylose) na sua forma de piranose (um átomo de oxigénio no anel). A ligação O-glicosídica é o único tipo de conexão entre os resíduos de monossacarídeos, e entre eles com a aglicona. A complexidade destas estruturas resulta da posição das ligações. Entre os substituintes éster que mais frequentemente se encontram ligados aos núcleos de oligosacarídeos estão os ácidos alifáticos de cadeia pequena (acético, propiónico, *n*-butírico, isobutírico, metilbutírico, 3-metilbutírico etc.), ácidos gordos saturados com diferentes tamanhos de cadeias (*n*-hexanóico ou capríco, *n*-octanóico (octa) ou caprílico, *n*-decanóico ou cáprico, *n*-dodecanóico ou láurico, *n*-hexadecanóico ou palmítico, etc.) e ácidos araquídicos. Estes núcleos encontram-se ligados a uma aglicona, parte hidrofoba da resina glicosídica, frequentemente ácido jalapínico ou ácido (11*S*)-hidroxihexadecanóico, que se encontram dispostos de modo a formar um anel de macrolactona, abrangendo sempre duas ou mais unidades de sacarídeos (Yin, *et al.*, 2009; Pereda-Miranda, *et al.*, 2010).

No seu conjunto, um grande número de compostos afins às resinas glicosídicas têm sido identificados na família Convolvulaceae bem como um número notável em cada espécie (Yin, *et al.*, 2009; Pereda-Miranda, *et al.*, 2010).

Um dos primeiros estudos relativos à verificação da presença de resinas glicosídicas na batata doce foi realizado no Japão, em que se identificaram cinco estruturas diferentes, uma tetrassacarídica e as restantes pentassacarídicas de ácido jalapínico, no extracto de raízes tuberculosas de uma variedade brasileira (Simon) e por isso nomeadas por simoninas (Escalante-Sanchez & Pereda-Miranda, 2007).

Dois estudos realizados com extractos da variedade de batata doce Picadito de origem Mexicana, de polpa e pele branca, permitiram a identificação de cinco lipo-oligosacarídeos de ácido jalapínico, aos quais foi dado o nome de batatinosidos; estes são constituídos por um resíduo esterificado, composto por uma cadeia longa de um ácido gordo, ácido *n*-decanóico ou *n*-dodecanóico (Figura 1.5.) (Escalante-Sanchez, *et al.*, 2008). No segundo estudo foram isolados dois dímeros do tipo éster de pentassacarídeos acilados, aos quais foram dados os nomes de batatina I e batatina II, constituídos por duas unidades monoméricas pentassacarídicas de batatinosidos (Figura 1.6.) (Escalante-Sanchez & Pereda-Miranda, 2007).

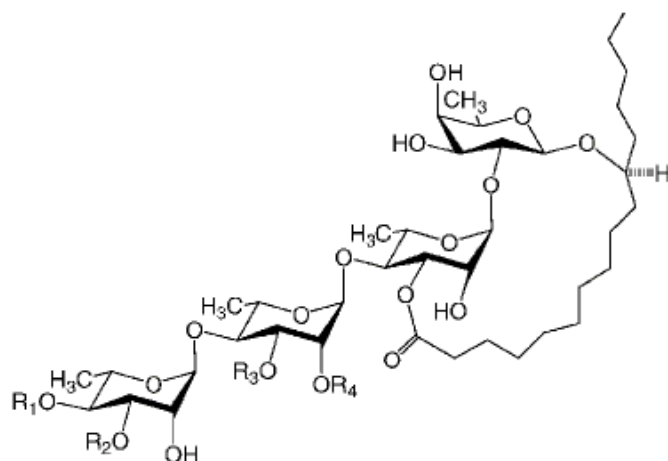


Figura 1.5. Exemplo da estrutura de resinas glicosídicas presentes na batata doce. Batatinosido II: R1,R2,R4=H, R3=*n*-decanoil; batatinosido III: R1=*n*-dodecanoil, R2,R3,R4=H. (adaptado de Escalante-Sanchez & Pereda-Miranda, 2007)

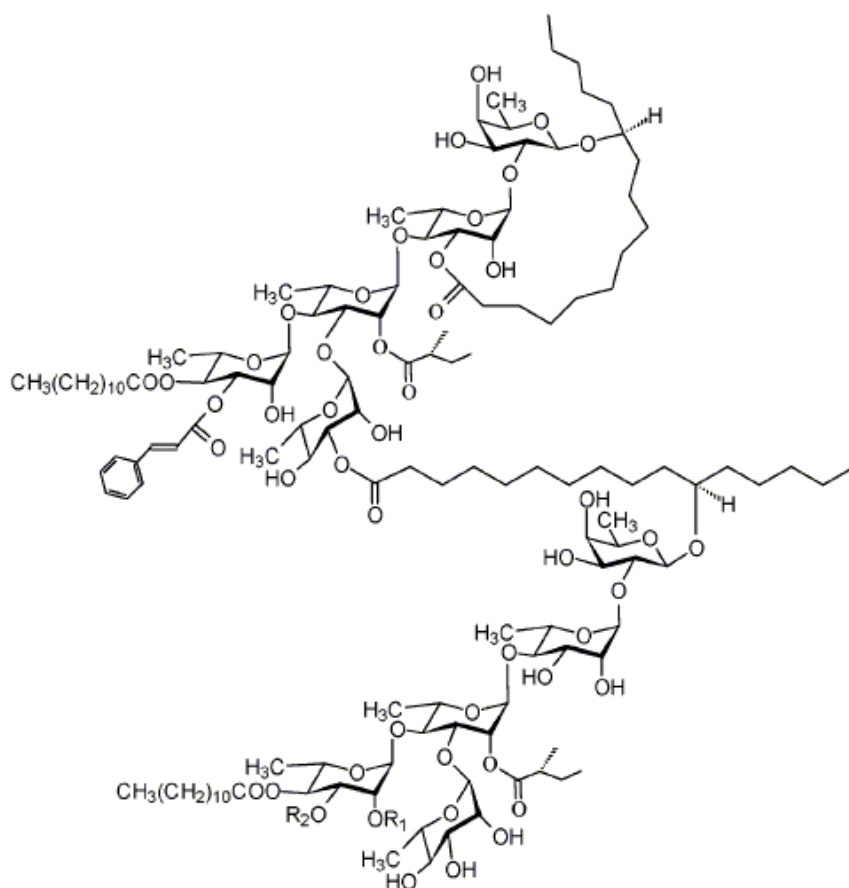


Figura 1.6. Estrutura química das resinas glicosídicas presentes na batata doce, batatina I e II. Batatina I: R1=*trans*-cinamoilo, Batatina II: R1=H, R2=*trans*-cinamoilo (adaptado de Escalante-Sanchez & Pereda-Miranda, 2007).

1.3. A batata doce de Aljezur

A batata doce de Aljezur é uma variedade classificada pela União Europeia, como Produto de Indicação Geográfica Protegida (IPG) (Figura 1.7.). Para este reconhecimento contribuiu o associativismo de cerca de 60 agricultores, produtores desta batata doce nos municípios de Aljezur e Odemira, que fundaram em 1997 a Associação de Produtores de Batata Doce de Aljezur. Actualmente, estima-se que sejam cultivados cerca de 400 hectares nesta região, sendo colhidas 20 toneladas de batata doce por hectare anualmente. A batata doce de Aljezur é comercializada essencialmente na região do Algarve.



Figura 1.7. Logótipo da Batata doce de Aljezur

1.3.1. A história e a tradição

O cultivo e a história da batata doce no concelho de Aljezur é reveladora de uma forte tradição desta cultura agrícola na região e nos hábitos alimentares da população. A utilização da batata doce neste concelho encontra-se tão enraizada que é associada a uma lenda da região, que se mistura com a história da tomada de Aljezur aos mouros no reinado de Afonso III em 1249, pelo Mestre da Ordem de Santiago. Reza a lenda que os Cavaleiros de Santiago, antes de cada importante batalha utilizavam como complemento alimentar uma poção elaborada a partir de batata doce que lhes dava vigor e força e que por isso lhes permitiu conquistar com rapidez o castelo de Aljezur. Apesar do lapso cronológico, visto que a batata doce só seria introduzida na Europa séculos mais tarde, esta lenda demonstra a importância dada pela população desta região a este alimento (Associação de Produtores de Batata Doce de Aljezur, 2008; EU, 2008).

Em meados do século XX, a batata doce tinha uma considerável importância na alimentação das populações rurais de alguns concelhos da região do Algarve, chegando a constituir 50%, e por vezes mais, dos alimentos consumidos diariamente durante um longo período do ano, que se estendia

geralmente de Outubro a Março. Em pequenas povoações, onde os recursos dos trabalhadores rurais eram escassos, era frequente que praticamente todas as refeições fossem constituídas exclusivamente por batata doce, que substituía muitas vezes o pão. Tendo em conta também que a confecção da batata doce é muito simples e barata (não necessita de nenhum aditivo, tempero ou condimento, basta um tacho, água e lenha, que estão ao alcance de qualquer família) a batata doce é, desde sempre, conhecida na região de Aljezur como o "pão dos pobres" (Associação de Produtores de Batata Doce de Aljezur, 2008; EU, 2008).

A batata doce de Aljezur é consumida "suada", cozida com casca ao vapor, assada com casca no forno, como sobremesa ou como acompanhamento, nos guisados e nas "sopas de batata", mas também frita, cortada em rodela. A tradição da batata doce em Aljezur é facilmente demonstrada pelos inúmeros pratos típicos da gastronomia regional, como a sopa de feijão com batata doce, a feijoada de batata doce, o lombo de peixe recheado com batata doce e coentros, etc. A batata doce é também preparada sob a forma de um puré que é utilizado como recheio para pastéis, na preparação da torta de batata doce e como aditivo para a massa do pão, permitindo que o pão se mantenha macio por mais tempo. A parte aérea da planta é também utilizada na alimentação humana, para a elaboração do designado "esparregado". A fracção de batata de menor calibre é aproveitada para alimentação de suínos. Anualmente entre os meses de Outubro/Novembro a Associação de Produtores de Batata Doce de Aljezur organiza o Festival da Batata Doce e dos Perceves, onde é possível provar os variados pratos tradicionais de batata doce acima referidos, e que tem como objectivo a promoção dos dois produtos da terra, a batata doce de Aljezur e os perceves (Associação de Produtores de Batata Doce de Aljezur, 2008; EU, 2008).

1.3.2. Produto de Indicação Geográfica Protegida

A Batata doce de Aljezur possui características específicas e é produzida numa determinada área geográfica através de um processo de cultivo tradicional, tendo sido classificada como produto de Indicação Geográfica Protegida (EU, 2008). A área geográfica de produção fica situada na costa sudoeste na zona mais ocidental do Algarve e Alentejo, a norte do cabo de S. Vicente, delimitada a norte pelos concelhos de Sines e Santiago do Cacém, a Este pelas freguesias interiores do concelho de Odemira e pelos concelhos de Monchique e Lagos, a Sul pelo concelho de Vila do Bispo e a Oeste pelo oceano Atlântico (Figura 1.8.). As várzeas de Aljezur, Odeceixe e charneca do Rogil representam a área de maior cultivo da batata doce de Aljezur. Esta região é referida muitas vezes por quem a conhece, como a "terra da batata doce" (Associação de Produtores de Batata Doce de Aljezur, 2008; EU, 2008).

A batata doce de Aljezur pertence à variedade Lira (Figura 1.9.). Esta batata tem uma forma periforme alongada, a epiderme é de cor púrpura ou castanha-avermelhada e a polpa é amarela. O seu calibre pode variar entre os 8,5 cm x 4,0 cm e os 16,5 cm x 7,1 cm e o seu peso entre os 50g e os 450g. As características organolépticas mais representativas e que distinguem a batata doce de

Aljezur de outra, são o seu sabor adocicado característico, a sua textura menos fibrosa e o sabor semelhante ao da castanha quando consumida crua. Um painel de provadores avaliou o aspecto em cru, o aroma, a textura e o sabor desta batata doce, atribuindo uma nota de 4 valores a todos estes parâmetros (1=Mau, 5=Ótimo). Em relação à batata doce cozinhada, a primeira preferência deste painel foi para a batata assada, a segunda para a cozida e a terceira para a frita (Associação de Produtores de Batata Doce de Aljezur, 2008; EU, 2008).

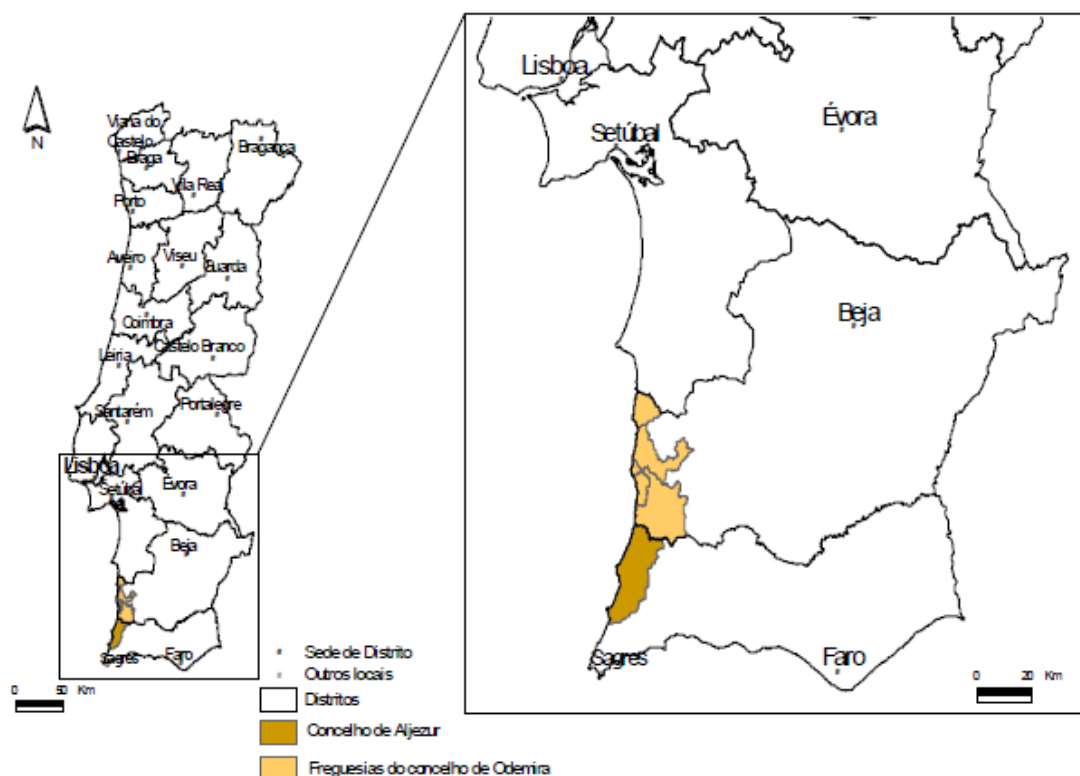


Figura 1.8. Mapa representativo da área geográfica de produção, preparação e acondicionamento de batata doce de Aljezur.

Todas estas características são resultado não só da componente genética desta variedade, mas também das condições edafo-climáticas da zona de cultivo, do modo de cultura tradicional e do armazenamento. Em toda a área geográfica de produção da Batata doce de Aljezur, o tipo predominante de solos são os Podzois com surraipa de areias ou arenitos (Pz) e Podzois sem surraipa de areias ou arenitos (Ap). Estes solos são na sua maioria constituídos por uma camada superficial, pouco espessa (30 – 50 cm), de textura arenosa, seguindo-se uma camada compacta. Este tipo de solo permite que as raízes reduzam o seu tamanho e engrossem, sendo o habitat perfeito para o cultivo desta planta e para a obtenção de bons calibres. O clima da região dada a sua localização a sudoeste da Europa e sua proximidade com o mar caracteriza-se por ter elevadas temperaturas, pela ausência de geadas e por amplitudes térmicas muito baixas. Em Aljezur, no período em que a cultura é praticada (Março a Outubro / Novembro), não se verifica a ocorrência de

geadas e a temperatura média do ar varia entre os 14° C e os 20,5°C. Estas condições são bastante específicas desta área geográfica, podendo observar-se que áreas vizinhas apresentam tipos de solo e um clima significativamente diferente (Associação de Produtores de Batata Doce de Aljezur, 2008; EU, 2008).



Figura 1.9. Aspecto exterior das raízes tuberculosas de Batata doce de Aljezur

1.3.3. O cultivo tradicional

A preparação da cultura de batata doce em Aljezur começa em Fevereiro com a instalação do viveiro. Neste processo são colocadas em cultura raízes tuberculosas de batata doce seleccionadas da colheita anterior. Por rebentação estas produzem vegetação aérea de onde se retira uma porção de caule, vulgarmente designado por “poda”, sendo estas podas plantadas no local de cultura (propagação vegetativa por estaca). Em média cada 15kg de raízes tuberculosas em viveiro podem produzir cerca de 3 mil podas três meses depois. Na preparação do terreno é realizada uma fertilização orgânica, maioritariamente com estrume, com origem na pecuária da região. Por vezes são necessárias fertilizações químicas para a correcção dos níveis de fósforo. A planta é bastante resistente e não necessita de grandes quantidades de água, com excepção de alguns terrenos de menor capacidade hídrica, não se procede, na maioria dos casos a regas (Associação de Produtores de Batata Doce de Aljezur, 2008; EU, 2008).

Relativamente a problemas fitossanitários, os ataques esporádicos de aranha vermelho e alguns fungos são raros e por norma não levam à realização de tratamentos químicos na cultura, uma vez que não representam perda económica representativa para os agricultores. Numa primeira fase da cultura realiza-se um controlo manual de plantas infestantes (Associação de Produtores de Batata Doce de Aljezur, 2008; EU, 2008).

A colheita da batata doce realiza-se normalmente entre meados de Setembro a meados de Novembro, quando as raízes atingem a maturação e não existe excesso de humidade no solo. Estes

factores são determinantes para a qualidade final do produto. Uma colheita precoce ou tardia prejudica o sabor, apresentação e conservação do produto. O armazenamento da batata doce é feito em local arejado e fresco, com temperaturas médias de 13/14°C (Associação de Produtores de Batata Doce de Aljezur, 2008; EU, 2008).

Embora se considere que esta cultura apresenta bons rendimentos, cerca de 30% da produção anual não é comercializada por ter um baixo calibre.

1.4. Micorrizas

As micorrizas são associações benéficas entre raízes de plantas e fungos especializados. Esta simbiose é caracterizada essencialmente pela troca bidireccional de macro e micronutrientes do solo, absorvidos pelo fungo, por hidratos de carbono (10% a 20% compostos fotossintetizados), fornecidos ao fungo pela planta hospedeira (Gadkar, *et al.*, 2001; Sebastiana, *et al.*, 2009; Cwala, *et al.*, 2010). Os fungos micorrízicos são considerados importantes componentes dos ecossistemas terrestres que colonizam as raízes das plantas e penetram o solo envolvente, estendendo a zona das raízes e o sistema radicular através do seu micélio extraradicular ramificado (Akhtar & Siddiqui, 2008), levando à maior absorção de água e nutrientes e beneficiando o estabelecimento, crescimento e reprodução da planta (Cwala, *et al.*, 2010), melhorando a qualidade do solo e aumentando a resistência da planta a stresses ambientais (Wang & Shi, 2008). Estes microorganismos têm também um papel importante na biodiversidade vegetal e variabilidade do ecossistema (Wang & Shi, 2008; Azul, *et al.*, 2008), mediando a coexistência de diferentes espécies e influenciando a competição entre estas (Oliveira, *et al.*, 2006).

A classificação das micorrizas reflete a existência de diferentes características anatómicas, que permitem distinguir duas categorias principais: as ectomicorrizas e as endomicorrizas (Figura 1.10.) (Bonfante & Genre, 2010). As espécies de fungos que formam com as raízes da planta ectomicorrizas incluem aquelas que revestem a superfície da raiz por um manto de micélio e só penetram a raiz intercelularmente, enquanto que as espécies que formam as endomicorrizas são caracterizadas pela penetração das hifas do fungo endomicorrízico nas raízes da planta inter e intracelularmente sem a formação de um manto fúngico exterior (Azul, *et al.*, 2008). Os fungos endomicorrízicos são ainda caracterizados pela presença de estruturas denominadas por arbúsculos que se formam nas células corticais da raiz, e que são o local principal de transferência de nutrientes entre os dois parceiros simbióticos (Gianinazzi-Pearson, 1996; Gadkar, *et al.*, 2001; Akhtar & Siddiqui, 2008; Gutjahr, *et al.*, 2008). Devido à existência destas estruturas, os fungos endomicorrízicos são muitas vezes denominados por fungos arbusculares.

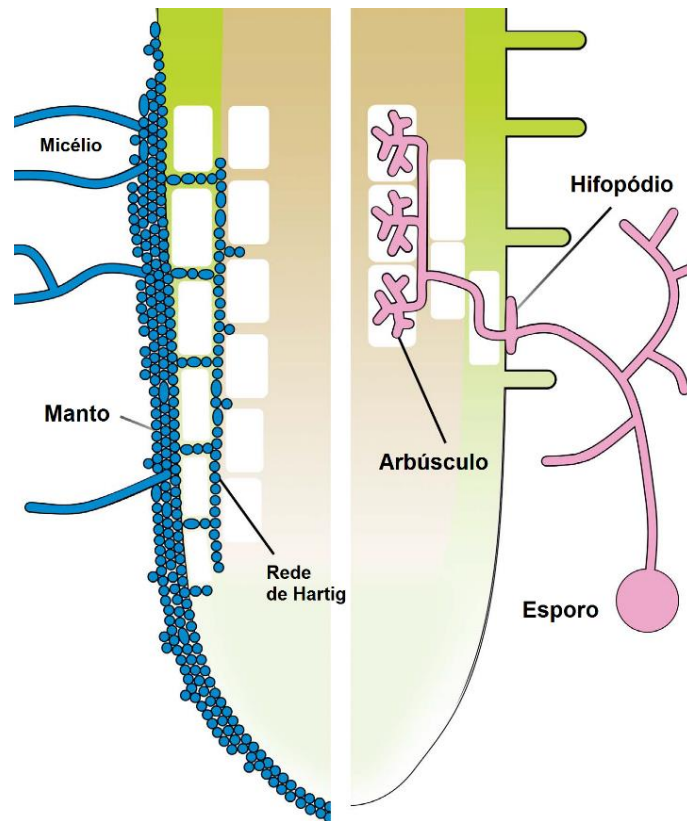


Figura 1.10. Ilustração da estrutura de colonização das raízes nas interações ectomicorrízicas (azul) e nas interações endomicorrízicas (rosa). (Adaptado de Bonfante & Genre, 2010).

As ectomicorrizas são características dos ecossistemas florestais (angiospérmicas lenhosas e gimnospérmicas das famílias Pinaceae, Fagaceae, Dipterocarpaceae e Caesalpinoideae) e possuem uma função indispensável na absorção de nutrientes por parte das árvores, estimando-se que mais de 95% das raízes nestes ecossistemas formem ectomicorrizas. Esta simbiose é ainda essencial na protecção do sistema de raízes do ataque de patógenos e na resistência a condições abióticas adversas do solo como o stress hídrico (Gianinazzi-Pearson, 1996; Sebastiana, *et al.*, 2009). Além disso, os fungos ectomicorrízicos parecem estar envolvidos no desenvolvimento das raízes de algumas árvores. O crescimento das raízes de pinheiro (*Pinus spp.*), por exemplo, é regulado por fungos ectomicorrízicos. A sua presença no sistema de raízes estimula a formação de raízes laterais e suprime o alongamento de pêlos radiculares (Niemi, *et al.*, 2002).

As endomicorrizas são simbioses extremamente comuns nos ecossistemas terrestres, associadas a cerca de 80% das famílias de plantas em todo o mundo, incluindo as de interesse agrícola. Este tipo de associação pode encontrar-se nos mais diversos habitats desde desertos a florestas tropicais, em altitudes e latitudes elevadas e em ecossistemas aquáticos, sendo a sua distribuição considerada, por isso, global (Guerrieri, *et al.*, 2004; Chabaud, *et al.*, 2006; Brito, *et al.*, 2007; Wang & Shi, 2008; Akhtar & Siddiqui, 2008). Pensa-se que as endomicorrizas tenham tido

origem há cerca de 400 milhões de anos (St-Arnaud, *et al.*, 1996; Gadkar, *et al.*, 2001; Azul, *et al.*, 2008).

A evolução da simbiose micorrizica é bastante complexa. A mesma espécie de fungo micorrizico pode estar associado a diferentes hospedeiros, tendo características estruturais e funcionais diferentes e plantas individuais podem ser colonizadas por diferentes espécies de fungos. Existe ainda a possibilidade de fungos ectomicorrizicos e endomicorrizicos estabelecerem ligações entre diferentes plantas da mesma espécie ou de diferentes espécies através das suas hifas, permitindo a transferência de nutrientes e de carbono entre plantas hospedeiras (Azul, *et al.*, 2008). Em relação à especificidade entre as plantas e os fungos micorrizicos, os fungos endomicorrizicos possuem uma grande gama de hospedeiros, fazendo com que as parcerias existentes entre a maioria dos fungos arbusculares e as plantas herbáceas não sejam específicas, enquanto que os fungos ectomicorrizicos e as árvores revelam algum grau de especificidade (Azul, *et al.*, 2008).

A associação entre fungos endomicorrizicos e plantas vasculares foi observada em aproximadamente 1000 géneros e cerca de 300 mil espécies de plantas. Só algumas famílias, como as Cyperaceae, Brassicaceae, Caryophyllaceae, Juncaceae, Chenopodiaceae e Amaranthaceae, são consideradas como não formando ou formando raramente este tipo de simbiose (Wang & Shi, 2008). Os fungos endomicorrizicos pertencem ao filo Glomeromycota, que inclui 4 famílias e 12 géneros, sendo e os géneros mais comuns o *Acaulospora*, *Gigaspora*, *Glomus* e *Scutellospora*. No entanto, só cerca de 200 espécies de fungos endomicorrizicos foram descritos (Wang & Shi, 2008).

Ao contrário dos fungos ectomicorrizicos, que podem viver independentemente das raízes das plantas, os fungos endomicorrizicos são microorganismos biotróficos obrigatórios e dependem da planta hospedeira para o fornecimento de energia (Neumann, *et al.*, 2009; Bonfante & Genre, 2010) não podendo completar o seu ciclo de vida sem a presença desta (Gadkar, *et al.*, 2001). Os fungos arbusculares podem usar um número diferente de propágulos para colonizar novas raízes. Estes propágulos consistem em componentes da fase extraradicular, micélio e esporos. As hifas do micélio crescem ao longo e entre os segmentos de raízes formando novos pontos de infecção. Os esporos desenvolvem-se a partir do micélio extraradicular e também são altamente infecciosos. No interior das raízes infectadas também podem existir componentes da fase intraradicular que são componentes de infecção, como as vesículas, intumescimentos terminais das hifas que ocorrem no interior da raiz (Klironomos & Hart, 2002). Apesar da manipulação deste tipo de fungos não ser simples, várias espécies de fungos endomicorrizicos do género *Glomus* e *Gigaspora* são comumente utilizados (ex. *G. intraradices*, *G. caledonium*, *G. versiforme*, *Gigaspora rosea*, *Gi. Margarita*, *Gi. gigantea*, etc.) em laboratório, utilizando-se inoculo preparado a partir da germinação de esporos ou de raízes micorrizadas (Chabaud, *et al.*, 2006).

A simbiose entre o fungo endomicorrizico e a planta começa quando a hifa entra em contacto com raiz hospedeira. Este passo é seguido pela indução de um apressório, seguindo-se a penetração da hifa de infecção no córtex parenquimatoso da raiz, onde a proliferação inter e intracelular do micélio é intensa. O desenvolvimento do fungo culmina na diferenciação de um haustório intracelular, conhecido como arbúsculo. Os arbúsculos são estruturas efémeras, que sofrem senescência depois

terem alcançado o seu desenvolvimento total, que ocorre dias após a infecção. O desenvolvimento dos fungos endomicorrízicos continua no sistema de raízes, espalhando-se para novas raízes emergentes. Neste sentido, a colonização pelo fungo ocorre concomitantemente em raízes diferentes de uma maneira não sincronizada (Gianinazzi-Pearson, 1996). A rápida e precoce colonização é um bom princípio de efectividade da simbiose micorrízica. Por outro lado, a relação a longo termo entre os simbioses, sendo também uma prova de efectividade desta interacção, permite a manutenção das redes de hifas, que favorecem a resistência da planta a vários stresses, melhorando e promovendo o seu crescimento (O'Keefe & Sylvia, 1993).

1.4.1. Fungos micorrízicos na agricultura

A maior parte das plantas agrícolas e hortícolas vivem em simbiose com fungos endomicorrízicos. Com o aumento do custo dos fertilizantes inorgânicos e os riscos ambientais e de saúde pública associados aos pesticidas, os fungos endomicorrízicos têm recebido bastante atenção e parecem ser uma alternativa mais adequada e ambientalmente aceitável, visto que se tem vindo a considerar essencial a existência de uma comunidade biológica do solo activa e diversificada no aumento da sustentabilidade dos sistemas agrícolas (Ryan & Graham, 2002; Akhtar & Siddiqui, 2008). Os fungos endomicorrízicos são provavelmente os fungos mais abundantes nos solos agrícolas, correspondendo a entre 5 a 50% da biomassa dos microorganismos presentes no solo (Ryan & Graham, 2002), colonizando as raízes das plantas através de colonização natural e por vezes artificial, realizada pelo Homem (Cwala, *et al.*, 2010). A simbiose endomicorrízica ocorre em importantes culturas agrícolas como o milho (*Zea mays*), o trigo (*Triticum aestivum*) e o arroz (*Oryza sativa*) (Gutjahr, *et al.*, 2008).

A associação simbiótica das plantas com os fungos endomicorrízicos ou arbusculares aumenta a absorção, em condições de baixa disponibilidade, de vários nutrientes minerais por parte das plantas hospedeiras, levando ao melhoramento do seu crescimento. A aquisição de nutrientes a partir do fungo envolve a transferência destes numa primeira fase entre o solo e o micélio extraradicular (ERM) do fungo e numa segunda fase entre o micélio intraradicular do fungo (IRM) e as células do cortex da raiz (Cruz, *et al.*, 2007). À colonização das plantas pelos fungos endomicorrízicos está também associada a produção de substâncias que promovem o crescimento da planta, o aumento da fotossíntese, o aumento da tolerância à seca e salinidade (melhoramento do ajustamento osmótico), a mudanças de pH e a promoção de interacções sinérgicas com outros microorganismos benéficos (Ryan & Graham, 2002; Paiva, *et al.*, 2003; Bi, *et al.*, 2004; Akhtar & Siddiqui, 2008; Cwala, *et al.*, 2010). Para além disso, esta simbiose pode proteger as raízes das culturas agrícolas de certos patógenos (nemátodes, fungos, bactérias) e pestes (Ryan & Graham, 2002; Guerrieri, *et al.*, 2004; Akhtar & Siddiqui, 2008; Cwala, *et al.*, 2010) e promover a resistência a metais pesados e outros compostos tóxicos presentes no solo (Azul, *et al.*, 2008; Akond, *et al.*, 2008), podendo ainda melhorar a adaptação das plantas após transplante (Brito, *et al.*, 2007).

A importância atribuída à simbiose micorrízica na absorção de nutrientes e água resulta essencialmente da existência de uma rede densa e extensa de micélio que se espalha pelo solo aumentando o volume de solo explorado pelas raízes. A rede de hifas extraradiculares medeia o estabelecimento de novas ligações micorrízicas e interage com herbívoros, comunidades bacterianas e muitos outros organismos do solo (Finlay, 2008; Azul, *et al.*, 2008), contribuindo ainda para a agregação e estabilidade estrutural de alguns tipos de solo (Ryan & Graham, 2002). O tamanho dos poros do solo varia, e como resultado, o acesso aos nutrientes e água é em parte dependente do raio das estruturas de absorção de nutrientes. A estimativa do raio das raízes, dos pelos radiculares e das hifas dos fungos micorrízicos é necessária para avaliar como é que as estruturas exploram os poros do solo (O'Keefe & Sylvia, 1992). Estudos recentes indicam que a extensão do micélio dos fungos endomicorrízicos no solo é determinante para a performance da planta em casos de stress hídrico, visto que as hifas, com diâmetro entre 1 a 20 μm , têm acesso a finos poros do solo que permanecem cheios de solução do solo (fase aquosa do solo), mesmo em períodos de baixa humidade do substracto (Neumann, *et al.*, 2009).

Um dos mais importantes papéis do micélio extraradicular é a absorção e translocação de nutrientes que não se encontram biodisponíveis às raízes das plantas, como o fósforo numa situação de stress edáfico. O fósforo é um macronutriente essencial para o crescimento, desenvolvimento e reprodução das plantas e é absorvido do solo quase exclusivamente na forma de aniões de fosfato solúveis (Mosse, 1973; Harikumar & Potty, 2007). A disponibilidade de fósforo no solo é muitas vezes insuficiente para o crescimento máximo de uma cultura sendo em muitas regiões do Mundo um factor limitante na produção agrícola. Para aumentar a nutrição das plantas, a abordagem convencional baseia-se na aplicação nos solos de grandes quantidades de fertilizantes contendo fósforo. Estima-se que cerca de 36,78 milhões de toneladas de fertilizantes de fósforo (P_2O_5) são aplicados mundialmente todos os anos (International Fertilizer Industry Association 2006) (Harikumar & Potty, 2007). No entanto, para além da eficiência na utilização de fósforo aplicado ser geralmente muito baixa, variando de 10 a 30%, a utilização convencional de fertilizantes é grandemente limitada nas regiões sub-desenvolvidas devido ao seu custo (Antunes, *et al.*, 2007; Harikumar & Potty, 2007). Pensa-se que uma utilização eficiente da simbiose micorrízica poderá substituir efectivamente as aplicações de fosforo de mais de 222kg de P_2O_5 /ha (Douds Jr., *et al.*, 2005).

A fixação de fósforo nos solos, que diminui a sua biodisponibilidade, é maioritariamente causada pela forte adsorção de H_2PO_4 a hidróxidos de alumínio (Al) e ferro (Fe), que faz com que grandes proporções deste nutriente se encontrem em formas indisponíveis para plantas (Harikumar & Potty, 2007). Os fungos endomicorrízicos são considerados microorganismos solubilizantes de fosfato, aumentando a sua biodisponibilidade para as plantas, permitindo que as raízes micorrizadas adquiram a capacidade de utilizar fontes de fosforo inorgânico do solo que não se encontram disponíveis (Antunes, *et al.*, 2007; Harikumar & Potty, 2007). Pensa-se ainda que o papel dos fungos endomicorrízicos seja o de aumentar a disponibilidade de fósforo através da retenção de Fe e Al nas hifas, evitando o seu contacto com o H_2PO_4 (Harikumar & Potty, 2007). Para além disso as hifas de

raízes micorrizadas estão distribuídas no solo de forma a potenciar a capacidade de absorção de fósforo por parte das raízes (Mosse, 1973; O'Keefe & Sylvia, 1992).

Um estudo coloca a hipótese de que a formação de micorrizas leve à promoção da expressão do gene que leva à produção da fosfatase ácida e da exsudação desta enzima pelas plantas micorrizadas, acelerando a mineralização de fósforo orgânico presente na rizosfera que resulta no aumento da absorção deste nutriente pelas hifas extraradiculares e raízes. Em solos com deficiências nutritivas em fósforo, as plantas segregam para a rizosfera a fosfatase ácida, presente em muitas plantas crescidas em solos com deficiência em fósforo. Nas plantas que não formam micorrizas, como por exemplo o *Lupinus albus*, a exsudação da fosfatase ácida para o solo é tida como uma parte importante nas estratégias de aquisição de fósforo das plantas não micorrizadas. O estudo referido propõe um novo mecanismo em que o parceiro fúngico activa o sistema de adaptação da planta aos níveis baixos de fósforo melhorando a eficiência da absorção de fósforo. No entanto, o mecanismo molecular envolvido continua por clarificar (O'Keefe & Sylvia, 1992; Ezawa, *et al.*, 2005).

Espécies diferentes de fungos endomicorrízicos podem produzir diferentes quantidades de micélio e por isso possuem diferentes eficiências na captação de fosfato. Para além disso, pensa-se que as espécies de fungos endomicorrízicos possam diferir em relação ao metabolismo de fosfato no micélio extraradicular e demonstrar diferenças espaciais na sua absorção. Estas diferenças na absorção de fosfato, o tamanho do micélio e a sua arquitectura podem contribuir para o crescimento diferencial e coexistência de diferentes plantas (Oliveira, *et al.*, 2006; Harikumar & Potty, 2007).

O efeito dos fungos micorrízicos na absorção de nutrientes, no entanto, parece estar inversamente relacionada com a sua disponibilidade (Azul, *et al.*, 2008). A maior parte dos estudos que testam a relação entre a disponibilidade de fósforo e a colonização micorrizica sugerem que o aumento da disponibilidade de fósforo no solo, assim como no tecido das plantas leva ao decréscimo da colonização (Menge, *et al.*, 1978; Douds Jr., *et al.*, 1998; Douds Jr., *et al.*, 2005; Harikumar & Potty, 2007; Ortas, 2012). A grande concentração de fosfato nas plantas parece fazer com que estas fiquem imunes à infecção. Experiências com plântulas transplantadas com teor diferente em fósforo confirmaram que a incapacidade de infecção é um resultado do metabolismo da planta ou estrutura transformada e não um efeito directo de fosfato no fungo (Mosse, 1973). A adição de azoto, fertilizantes completos e fertilizantes bacterianos também reduzem a infecção micorrizica no campo (Mosse, 1973). Muitas plantas absorvem mais fosfato e crescem melhor quando inoculadas com fungos endomicorrízicos em solos contendo menos fosfato disponível. São exemplo disso a cebola, o milho, o morango, a soja, o trigo, a videira (Mosse, 1973), o tomate, a pimenta, a beringela, a melancia, o pimento, o pepino e o feijão verde (Ortas, 2012).

Os fungos micorrízicos aumentam a absorção de outros nutrientes para além do fósforo, como o zinco (Zn), o cobre (Cu), o molibdénio (Mo), o cobalto (Co) e o azoto (Mosse, 1973; Ryan & Graham 2002; Douds Jr., *et al.*, 2005; Akond, *et al.*, 2008; Lambers, *et al.*, 2009). A grande capacidade de absorção de azoto por parte dos fungos endomicorrízicos foi confirmada usando sistemas modelo *in vitro* (Cruz, *et al.*, 2007).

A actividade agrícola provoca alterações químicas, físicas e da componente biológica ao nível do solo, interferindo deste modo na formação e desempenho dos fungos endomicorrízicos de um determinado local. Em solo sujeito a mobilização tem-se observado que a taxa de colonização micorrízica das plantas é menor, uma vez que a mobilização provoca a ruptura do micélio extrarradicular, fazendo com que o estabelecimento de novas colonizações dependa de formas de inóculo de crescimento mais lento (esporos e fragmentos de raiz colonizados). Em solos não perturbados o aumento da colonização por fungos arbusculares encontra-se associada a uma vantagem comparativa das plantas desde os estados iniciais da cultura (Brito, *et al.*, 2007). É necessário por isso que sejam utilizadas práticas de cultura que aumentem a actividade dos fungos endomicorrízicos indigenos como a reduzida preparação do solo, a rotação de culturas, a utilização de culturas de cobertura e a gestão da quantidade de fosforo (Douds & Johnson, 2003). A redução da preparação do solo, por exemplo, permite que a rede de micélio extradicular se mantenha intacta, o que promove a rápida colonização de uma nova cultura e aumenta o inicio da temporada mediada pela captação de fosforo pelas micorrizas (Douds Jr., *et al.*, 2005).

Tendo em conta a natureza biotrófica obrigatória dos fungos endomicorrízicos, a dificuldade de produção de inóculo impõe uma limitação maior na manipulação da simbiose na agricultura. Usualmente, são utilizadas raízes micorrizadas, sempre misturadas com meio de crescimento contendo hifas e esporos, para inocular novas plantas. No entanto, verifica-se que este tipo de inóculo pode conter contaminantes. Outros métodos como a cultura aeropónica (Hung & Sylvia, 1988) e encapsulação em alginato de fragmentos de raízes foram desenvolvidos de modo a aumentar a qualidade e segurança do inóculo. Estes fungos podem ser crescidos ainda com plantas hospedeiras em culturas de pote contendo solo, areia, ou argila expandida, em hidroponia e cultura de órgãos (Sylvia & Jarstfer, 1992). No entanto, a produção de propágulos em condições assépticas continua a ser o modo mais promissor para produzir grandes quantidades de inóculo de qualidade, livre de patógenos para posterior introdução em campos de cultura (Sylvia & Jarstfer, 1992; St-Arnaud, *et al.*, 1996). O objectivo último dos estudos em laboratório e em estufa é estender a utilização dos fungos endomicorrízicos aos campos agrícolas e a um nível comercial (Singh, 2002).

Os fungos endomicorrízicos têm um grande potencial na sua utilização como biofertilizantes na agricultura, floricultura, horticultura e silvicultura. No entanto, apesar do custo dos fertilizantes químicos ter aumentado e da observação do desaparecimento das reservas de fósforo no mundo, o progresso no uso de fungos endomicorrízicos simbióticos na produção de plantas tem sido lento. Embora as causas da baixa performance sejam diversas, as condições para a expressão efectiva das micorrizas é ainda pobremente conhecida, levando à inconsistência da resposta à inoculação com fungos endomicorrízicos por parte das plantas de interesse (Herrera-Peraza, 2011). Existem dois modos principais para assegurar os benefícios da associação com fungos micorrízicos na produção das culturas: a inoculação com um fungo micorrízico eficiente e previamente seleccionado e a promoção da actividade de fungos micorrízicos existentes no campo de cultivo através de práticas de cultura adequadas (Douds Jr., *et al.*, 2005).

1.4.2. Papel dos fungos micorrízicos na cultura de batata-doce

A batata doce é uma importante cultura agrícola, visto que tanto as suas raízes tuberculosas como as suas folhas são importantes alimentos em vários países do mundo. Esta cultura cresce usualmente em solos com baixo teor em fósforo (Mulongoy, *et al.*, 1988). Nestas condições, a batata doce é usualmente colonizada por fungos endomicorrízicos. Os efeitos da inoculação com fungos endomicorrízicos é mais evidente quando as plantas produzem raízes de armazenamento (O'Keefe & Sylvia, 1993). Relativamente à batata doce verifica-se que o aumento de rendimento em relação à produção de raízes tuberculosas está grandemente relacionado com a colonização por parte de fungos endomicorrízicos (Negeve & Roncadori, 1985; Paula, *et al.*, 1992; O'Keefe & Sylvia, 1993; Gai, *et al.*, 2004; Gai, *et al.*, 2005; Gai, *et al.*, 2006).

Um estudo demonstrou que depois de 8 semanas de inoculação de plântulas de batata doce com *Glomus intraradices* em condições de campo, o peso seco dos caules, das raízes tuberculosas e o seu peso fresco, assim como a absorção de fósforo pela planta aumentaram significativamente. O aumento da densidade das hifas extraradiculares e intraradiculares e a mudança da distribuição do padrão do fungo depois da inoculação pode ser a razão principal para o crescimento e melhoramento da batata doce (Gai, *et al.*, 2005). Uma experiência realizada em solos ácidos, com batata doce inoculada com *Gigaspora margarita*, revelou que a simbiose micorrízica pode melhorar o desenvolvimento da raiz e o crescimento do caule nas plantas de batata doce crescidas neste tipo de solo, indicando assim o papel da simbiose micorrízica no alívio do stress edáfico desta planta (Yano & Takaki, 2005).

Geralmente a inoculação micorrízica resulta num aumento da biomassa da batata doce, no entanto, diferentes espécies de fungos endomicorrízicos podem ter diferentes eficiências. Gai e colaboradores verificaram que as espécies *Acaulospora morowea* e *Scutellospora gilmorei* tiveram pouco efeito no aumento da biomassa, e as espécies do género *Glomus* demonstraram maiores efeitos do que outro género de fungos endomicorrízicos, sendo os mais eficientes na promoção do aumento da biomassa desta cultura (Gai, *et al.*, 2006). Dentro deste género verificou-se ainda a existência de espécies mais eficientes que outras, existindo assim uma evidência crescente de que os mecanismos para o estabelecimento da micorriza funcional podem diferir entre espécies e géneros, apesar de se assumir que todas as espécies de fungos arbusculares têm a mesma função (Mulongoy, *et al.*, 1988; Gai, *et al.*, 2006). Hung e Sylvia verificaram que a batata doce industrial inoculada com *Glomus deserticola* apresentou cerca de 50% de raízes colonizadas, enquanto que a colonização com *Glomus etunicatum* e *Glomus intraradices* foi de 45% e 20% respectivamente (Hung & Sylvia, 1988). Para além disso, duas espécies de inóculo, como por exemplo, *Glomus etunicatum* e *Glomus mosseae*, demonstraram ter uma maior eficiência a promover a biomassa da batata doce se inoculados juntos, do que uma espécie sozinha (Gai, *et al.*, 2006). Uma explicação para este resultado pode estar relacionada com a existência de uma função complementar dos nichos ecológicos ou pelo desempenho de diferentes funções das duas espécies. Pensa-se ainda que a

inoculação com dois fungos pode melhorar a compatibilidade total da planta com o fungo. Por esta razão, o inóculo comercial é constituído usualmente por dois ou mais fungos (Gai, *et al.*, 2006).

O aumento da biomassa das plantas de batata doce parece estar relacionado com o aumento do conteúdo em fósforo nas raízes tuberculosas (O'Keefe & Sylvia, 1993; Gai, *et al.*, 2006). A maior parte dos isolados de fungos endomicorrizicos aumentam grandemente a concentração de fosforo nas raízes tuberculosas, e as espécies do género *Glomus* demonstraram ter efeitos positivos na concentração de fósforo nos caules (Gai, *et al.*, 2006).

Os diferentes cultivares de batata doce diferem na sua capacidade para se associarem aos fungos micorrizicos (Mulongoy, *et al.*, 1988). A ausência de resposta à infecção micorrízica pode ser causada pela pobre compatibilidade simbiótica ou inefectividade entre o fungo micorrízico e a batata doce (Mulongoy, *et al.*, 1988). Várias publicações referem a variação da colonização por fungos endomicorrízicos dependendo do genótipo da batata doce (Harikumar & Potty, 2002; Harikumar & Potty, 2007). No entanto, a batata doce parece ser um bom candidato para a produção de inóculo de fungos arbusculares em cultura aeropónica (Hung & Sylvia, 1988).

1.5. Compostos bioactivos envolvidos na sinalização química da interacção micorrízica

Na rizosfera as plantas interagem com um grande número de microorganismos. Em interacções favoráveis, como com as micorrizicas arbusculares e nas simbioses fixadoras de azoto (*Rhizobium*), é necessário existir um “diálogo” progressivo estabelecido entre os dois organismos que interagem para fazer a escolha apropriada do parceiro. Esta comunicação bidirecional consiste no intercâmbio de sinais químicos transmitidos por ambos os potenciais simbiontes. Depois da percepção das moléculas sinalizadoras, uma via de transdução de sinal é induzida, conduzindo à activação do programa genético e de desenvolvimento adequado em ambos os parceiros (Rosu, *et al.*, 2007; Navazio & Mariani, 2008). Esta compatibilidade implica que a selectividade e os processos de reconhecimento em plantas discriminem entre microorganismos benéficos e prejudiciais e que estes determinantes genéticos essenciais para o estabelecimento de fungos endomicorrízicos sejam comuns a uma parte extensa do reino vegetal (Gianinazzi-Pearson, 1996).

O primeiro passo no desenvolvimento da simbiose micorrízica corresponde a um “diálogo” molecular antes do contacto entre o fungo e a planta que permite o reconhecimento dos dois organismos (Gianinazzi-Pearson, 1996; Gadkar, *et al.*, 2001; Gutjahr, *et al.*, 2008). O primeiro evento de interacção é causado pelos compostos que são produzidos constitutivamente pelas raízes hospedeiras. Pensa-se que estes compostos sinal não são induzidos por um sinal transmitido pelo fungo porque estes se encontram presentes nos exsudados dos sistemas de raízes que nunca foram expostas a fungos endomicorrizicos (Nagahashi & Douds Jr., 2000). A análise das bases químicas e genéticas do diálogo entre os dois parceiros é uma pesquisa que continua em aberto, tendo em conta

a característica biotrófica do fungo simbiótico, a sua condição multicelular e a variabilidade (Rosu, *et al.*, 2007; Lambers, *et al.*, 2009).

1.5.1. Exsudados de raízes

Em adição aos seus papéis clássicos em que fornece um apoio mecânico e permite a absorção de água e nutrientes, as raízes também se especializaram na sua capacidade de sintetizar, acumular, e segregar uma grande diversidade de compostos. Os compostos químicos segregados pelas raízes das plantas para o solo são referidos como exsudados das raízes (Walker, *et al.*, 2003).

Algumas das mais complexas interações químicas, físicas e biológicas que ocorrem nas plantas terrestres são aquelas que acontecem entre as raízes e o ambiente do solo que as envolve (rizosfera) (Bais, *et al.*, 2006). A passagem da maioria dos exsudados para a rizosfera é feita por difusão passiva como resultado do gradiente de concentração elevado que existe entre o citoplasma e a solução do solo (Kuzyakov & Jones, 2006). Através da exsudação de uma grande variedade de compostos, as raízes regulam a comunidade microbiana do solo na sua vizinhança, controlam a herbivoria, estimulam a associação a simbioses benéficas, alteram as propriedades químicas e físicas do solo e inibem o crescimento das espécies de plantas competidoras (Walker, *et al.*, 2003).

As raízes das plantas exsudam uma enorme gama de compostos com valor potencial para a rizosfera. Os exsudados das raízes encontram-se divididos em duas classes de compostos: compostos de baixo peso molecular, como aminoácidos, ácidos orgânicos, açúcares, compostos fenólicos e outros metabolitos secundários que contribuem para a diversidade dos exsudados das raízes, e exsudados de alto peso molecular, como a mucilagem (polissacáridos) e proteínas, que são menos diversas mas que fazem parte de uma grande porção dos exsudados das raízes (Flores, *et al.*, 1999; Bais, *et al.*, 2006; Steinkellner, *et al.*, 2007).

O efeito da rizosfera, descrito pela primeira vez por Hiltner em 1904, assume que muitos microorganismos são atraídos pelos nutrientes exsudados pelas raízes das plantas. Hiltner observou que o número e actividade dos microorganismos aumentava junto às raízes. As raízes iniciavam uma comunicação com os microorganismos do solo através da produção de sinais que eram reconhecidos por estes, que em seguida produziam sinais para se iniciar a colonização (Bais, *et al.*, 2006).

A sinalização química entre as raízes das plantas e outros organismos do solo, incluindo as raízes das plantas vizinhas, baseia-se sempre nos compostos químicos exsudados pelas raízes. Os mesmos sinais químicos podem provocar respostas diferentes, podendo repelir um organismo enquanto que atraem outro, ou pode ocorrer a atracção de dois organismos muito diferentes com diferentes consequências para as plantas (Bais, *et al.*, 2006). Os fungos endomicorrizicos reconhecem a presença de um hospedeiro compatível através dos exsudados das raízes, um processo semelhante ao que acontece para as bactérias do género *Rhizobium* (Bais, *et al.*, 2006; Bonfante & Genre, 2010).

Muitos estudos têm sido conduzidos para determinar a influência dos exsudados das raízes na colonização por parte dos fungos endomicorrízicos. Em geral, os exsudados não melhoram a germinação dos esporos, mas estimulam o crescimento dos fungos e a taxa de colonização (Bécard & Piché, 1989). A germinação dos esporos geralmente não requer a presença de uma raiz hospedeira (fase não simbiótica) ou de condições específicas. Os esporos da maioria das espécies de fungos endomicorrízicos podem germinar *in vitro*, no entanto, o subsequente desenvolvimento das hifas é limitado. O crescimento da hifa continua num período de tempo relativamente pequeno e cessa antes do esgotamento total das reservas dos esporos, ficando dependente da presença, mas sem contacto físico de um hospedeiro adequado (Bécard & Piché, 1989; Gadkar, *et al.*, 2001; Fortin, *et al.*, 2002). As hifas alongam 20 vezes mais devagar na ausência de raízes hospedeiras do que na sua presença (Bécard & Piché, 1989). Se o micélio do fungo não contactar com as raízes do hospedeiro ou se o sinal do hospedeiro não for reconhecido pelo fungo, o crescimento das hifas pára depois de alguns dias (Eskandari & Danesh, 2010). O primeiro fenómeno de reconhecimento do fungo e de resposta aos exsudados das raízes é desta forma, o crescimento e indução da ramificação das hifas. Esta resposta pode ocorrer antes das 36h depois da inoculação da planta hospedeira (Gianinazzi-Pearson, 1996; Bais, *et al.*, 2006; Steinkellner, *et al.*, 2007). O factor de ramificação está presente nos exsudados das raízes de todas as plantas micotróficas, mas ausente naquelas que não são consideradas hospedeiras (Gianinazzi-Pearson, 1996; Bais, *et al.*, 2006). Apesar do grande crescimento micelar, na presença das raízes, as hifas não parecem exibir sempre um “crescimento direcional” até se encontrarem muito perto do hospedeiro (St-Arnaud, *et al.*, 1996). Assim que o mutualismo é reconhecido, a raiz e a hifa do fungo crescem em direcção um ao outro estabelecendo contacto físico (iniciação) com a formação do apressório na superfície da raiz (Gianinazzi-Pearson, 1996; Gadkar, *et al.*, 2001; Sebastiana, *et al.*, 2009). Os exsudados das raízes têm ainda um papel importante na diferenciação do micélio extrarradicular dos fungos endomicorrízicos nas primeiras fases da formação da simbiose (Akiyama, *et al.*, 2005), e é possível que estas substâncias sinal influenciem a arquitectura do micélio também nas fases posteriores da associação fungo-planta (Neumann, *et al.*, 2009).

A produção e qualidade dos exsudados das raízes, em relação aos seus efeitos estimulantes no crescimento dos fungos endomicorrízicos é directamente afectado pela nutrição em fósforo da planta hospedeira. Os exsudados produzidos pelas plantas com uma quantidade de fósforo adequada são menos estimulantes para os fungos endomicorrízicos do que os exsudados produzidos em condições de stress edáfico, o que é consistente com a grande percentagem de quantidade de raízes colonizadas por fungos arbusculares em solos com pouco fósforo (Nagahashi & Douds Jr., 2000; Bais, *et al.*, 2006). É sugerido ainda que a deficiência em fósforo aumenta a permeabilidade da membrana das raízes, que resulta num aumento da perda de metabolitos e desta maneira um aumento das infecções por parte do fungo (Graham, *et al.*, 1981).

O fraccionamento dos exsudados das raízes sugere que existem diferentes classes químicas de compostos de ramificação que vão desde os hidrófilos aos hidrófobos, parecendo evidente que os

exsudados das raízes possuem mais do que um tipo de compostos que pode estimular a ramificação das hifas dos fungos arbusculares (Nagahashi & Douds Jr., 2000).

1.5.1.1. CO₂ e compostos voláteis

A planta hospedeira pode estimular o crescimento das hifas através de diferentes tipos de moléculas sinal em vários pontos durante a colonização por parte do fungo. Pensa-se que algumas destas moléculas possam ser compostos voláteis (Lei, *et al.*, 1991; Gadkar, *et al.*, 2001).

Foi demonstrado primeiro com *Gigaspora rosea*, e depois confirmado com outras espécies de *Gigaspora*, que a fase pré-simbiótica necessita da presença simultânea de exsudados de raízes e CO₂. Verificou-se que o CO₂ parece estimular o crescimento das hifas de alguns fungos endomicorrizicos *in vitro* (Becard & Piche, 1989; Gadkar, *et al.*, 2001). Becard e Piché (1989) sugeriram que *Gigaspora rosea* era capaz de fixar CO₂ como sendo uma fonte mineral de carbono (Becard & Piche, 1989). Outro estudo *in vitro* com ¹⁴CO₂ marcado radioativamente e espectroscopia de NMR confirmou a fixação às escuras de CO₂ durante a germinação de esporos de *Glomus intraradices* (Lei, *et al.*, 1991; Fortin, *et al.*, 2002). Assim, a possibilidade de um papel duplo de CO₂ na biologia das endomicorrizas tanto como um estimulante da germinação e uma fonte de carbono não pode ser excluída (Gadkar, *et al.*, 2001).

Gemma e Koske (1988) propuseram a implicação de outros voláteis com origem nas raízes durante a fase pré-simbiótica do crescimento do fungo. A quimioatracção dos tubos germinantes de *Gigaspora gigantea* é observada quando é usado um conjunto de plantas *in vitro* em que as hifas de fungo são cultivadas aeroponicamente (Bécard & Piché, 1989; Fortin, *et al.*, 2002). No entanto, esta hipótese encontra-se pouco estudada.

1.5.1.2. Fitorreguladores

Os fitorreguladores são conhecidos por desempenharem um papel nos diferentes processos de desenvolvimento das plantas. Estes compostos possuem uma grande variedade estrutural e encontram-se em pequenas quantidades, regulando quase todos os aspectos da vida da planta, incluindo o crescimento e desenvolvimento e a resposta a stresses abióticos e bióticos (Lu, *et al.*, 2010). Pouco é sabido sobre a função dos fitorreguladores durante o processo de colonização micorrízica; no entanto, existe a evidência que estes estão envolvidos nos eventos de sinalização entre os fungos arbusculares e ectomicorrízicos e as plantas hospedeiras, sendo também possíveis intervenientes na regulação da simbiose (Kaldorf & Ludwig-Muller, 2000; Herrera-Medina, *et al.*, 2007).

O papel dos fitorreguladores na colonização micorrízica sempre foi um foco de atenção dos investigadores desde a descoberta das auxinas (Gogala, 1991). As auxinas são uma classe de fitorreguladores presentes em todas as plantas, que estão associados a muitos processos de

crescimento e desenvolvimento da planta, incluindo o alongamento do caule, a iniciação e crescimento da raiz, divisão celular, biossíntese de etileno, vascularização dos tecidos, diferenciação de tecidos, dominância apical, desenvolvimento de frutos e das flores, fototropismo e geotropismo (Ribnicky, *et al.*, 1998; Reinecke, 1999; Campanella, *et al.*, 2004; Lu, *et al.*, 2010). As auxinas que ocorrem naturalmente nas plantas incluem o ácido 3-indole-acético (IAA), ácido 3-indole-butírico (IBA), ácido fenilacético (uma auxina fraca) e ácido 4-cloro-indole-acético (4-Cl-IAA) (Figura 1.12.) (Nordstrom, *et al.*, 1991; Reinecke, 1999).

A auxina IAA foi o primeiro fitorregulador a ser usado no enraizamento de caules. Mais tarde, foi descoberto um segundo fitorregulador, o IBA, que também promove o enraizamento sendo mais eficaz do que o ácido 3-indole-acético, possuindo uma grande actividade no crescimento de raízes adventícias. Este facto é atribuído à maior estabilidade deste fitorregulador em solução e nos tecidos das plantas do que o IAA (Nordstrom, *et al.*, 1991; Epstein & Ludwig-Muller, 1993; Ludwig-Muller, *et al.*, 2005). Para além disso, o IAA e o IBA (Figura 1.11.) podem ser interconvertidos, verificando-se que o IBA pode actuar como precursor do IAA (Minorsky, 2005).

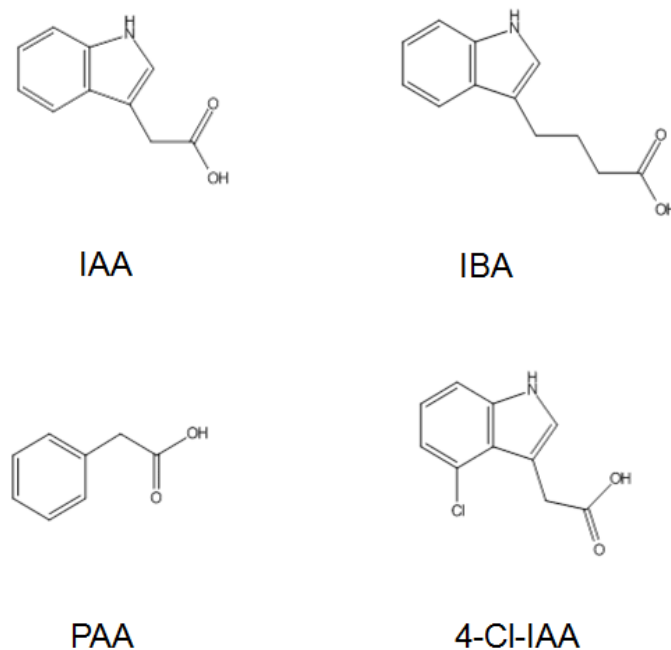


Figura 1.11. Representação da estrutura química dos fitorreguladores ácido 3-indole-acético (IAA), ácido 3-indole-butírico (IBA), ácido fenilacético (PAA) e ácido 4-cloro-indole-acético (4-Cl-IAA).

Um estudo verificou que as auxinas podem afectar o crescimento dos fungos endomicorrízicos directamente. O IAA em concentrações micromolar tem um efeito inibidor na proliferação de hifas intraradiculares de *Glomus fistulosum* (10 μ M reduz a proliferação das hifas para quase zero), enquanto que 10 μ M de IBA não é inibidor do seu crescimento. Estes resultados suportam a hipótese de que o fitorregulador IBA é um factor de alguma forma envolvido positivamente e importante na

colonização das raízes pelos fungos endomicorrízicos (Kaldorf & Ludwig-Muller, 2000). Um estudo refere a actividade aumentada da IBA sintetase durante os primeiros estádios da colonização por fungos arbusculares, levando ao aumento da biossíntese do IBA nas raízes (Kaldorf & Ludwig-Muller, 2000). Embora o papel do IBA durante a formação da simbiose seja ainda especulativo, pensa-se que antes ou mesmo depois do início da colonização, a produção de IBA na planta aumenta de modo a promover a produção de um grande número de raízes laterais, que serão mais facilmente colonizáveis pelo fungo de modo a aumentar as taxas de infecção. Coloca-se a hipótese de que o aumento desta hormona possa ser induzida pelo fungo (Kaldorf & Ludwig-Muller, 2000).

Alguns estudos referem a alteração das concentrações de outro fitorregulador nas plantas micorrizadas, o ácido abscísico (ABA) (Figura 1.12.). O ABA regula a resposta da planta a vários stresses abióticos, como a seca, o sal e o frio. Tendo em conta que alguns destes stresses são aliviados pela presença de fungos arbusculares nas plantas, sugere-se que o mecanismo das plantas micorrízicas em relação ao alívio de um determinado stress possa ser mediado por este fitorregulador. O aumento das concentrações de ABA foi demonstrado nas plantas micorrizadas e verificou-se que um mecanismo activo da biossíntese de ABA pelas plantas é necessário para assegurar o desenvolvimento micorrizico apropriado (Herrera-Medina, *et al.*, 2007). Herrera-Medina e os seus colaboradores demonstraram que as plantas de tomate mutantes para a biossíntese de ABA são menos susceptíveis à infecção com *Glomus intraradices* do que as plantas selvagens, verificando que a adição de ABA exógeno aumenta a susceptibilidade do tipo selvagem ao fungo arbuscular. Concluindo-se desta forma, que o ABA endógeno é necessário para o estabelecimento dos fungos arbusculares, e que o ABA aplicado exogenamente pode modular a taxa de colonização no tomate, promovendo o crescimento dos fungos arbusculares. Este estudo sugere ainda que o ABA é necessário para o processo de formação de arbúsculos (Herrera-Medina, *et al.*, 2007). Nas raízes das plantas mutantes, os parâmetros de frequência e intensidade de colonização das raízes e a abundância de arbúsculos foi reduzida para aproximadamente 70% a 80% comparando com as plantas selvagens, estes resultados podem significar que o ABA é necessário para a penetração da planta e para a sua dispersão no córtex da raiz (Herrera-Medina, *et al.*, 2007).

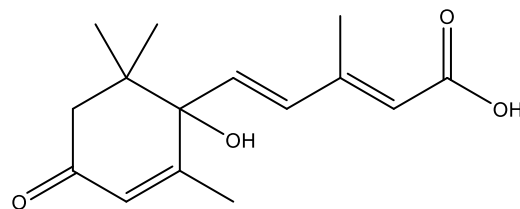


Figura 1.12. Representação da estrutura química do ácido abscísico.

1.5.1.3. Compostos fenólicos - Flavonóides

Os flavonóides podem ser encontrados em diferentes grupos de plantas e o seu papel como compostos de sinalização durante o estabelecimento das micorrizas arbusculares é questionável (Steinkellner, *et al.*, 2007). Embora se tenha verificado que estimulam o crescimento dos fungos endomicorrízicos, como é o caso por exemplo, da quercitina (Becard, *et al.*, 1992), o campferol e a morina (Chabot, *et al.*, 1992) e da apigenina (Scervino, *et al.*, 2006); estes compostos fenólicos (Figura 1.13.) foram colocados de parte como sendo candidatos a factores de ramificação porque os exudados das raízes de milho mutante, deficientes na chalcona sintase, demonstraram ter uma actividade comparável com os exudados das raízes do tipo selvagem (Akiyama, *et al.*, 2005; Bais, *et al.*, 2006). Além disso, experiências *in vitro* e *in vivo* demonstraram que na formação micorrízica, o normal desenvolvimento e crescimento dos fungos simbióticos, pode ser obtido na ausência de flavonoides, não sendo estes essenciais na interacção fungo-planta (Fortin, *et al.*, 2002; Gianinazzi-Pearson, 1996). No entanto, existem várias indicações que revelam que nas fases finais da associação micorrízica, quando os fungos arbusculares se encontram bem estabelecidos, as mudanças na composição flavonóide da planta tem um efeito regulador (Steinkellner, *et al.*, 2007).

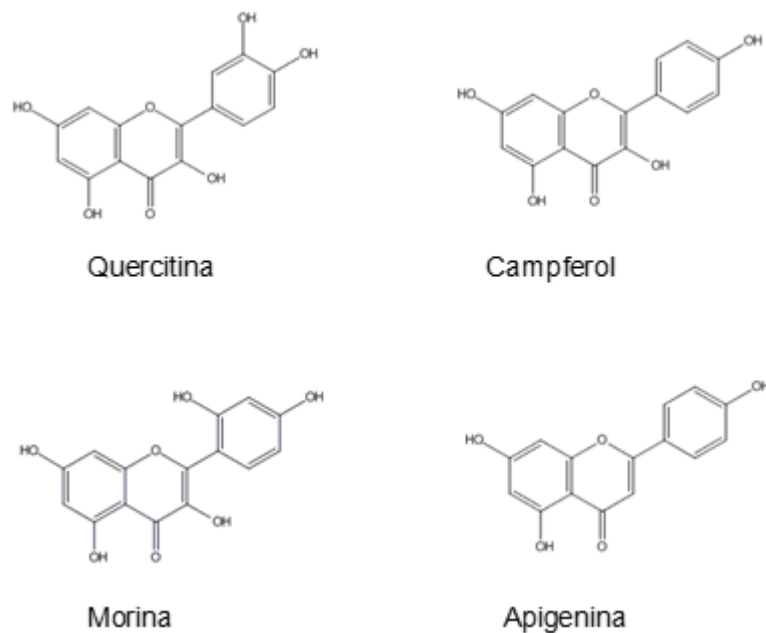


Figura 1.13. Representação da estrutura química de alguns flavonóides envolvidos na estimulação do crescimento de hifas de fungos micorrízicos.

1.5.1.4. Ácidos gordos

A análise da composição do solo em ácidos gordos é útil para o estudo do estado e das mudanças das comunidades microbianas do solo, entre elas as simbioses micorrízicas (Laczko, *et al.*, 2003). Os ésteres metílicos dos ácidos gordos são reconhecidos como sendo biomarcadores das raízes endomicorrizadas (Grigera, *et al.*, 2007). A presença de lípidos nos exsudados das raízes já foi demonstrada, mas pouca atenção foi prestada sobre os possíveis efeitos biológicos deste grupo de compostos. Alguns fungos ectomicorrízicos demonstraram ter reagido aos óleos vegetais e a alguns ácidos gordos puros pelo aumento da sua taxa de crescimento (Fries, *et al.*, 1985). Um estudo refere a presença de vários ácidos gordos na fracção lipídica dos exsudados de raízes de pinheiro e o seu efeito no crescimento de três fungos ectomicorrízicos (*Laccaria amethystina*, *Laccaria bicolor* e *Leccinum aurantiancum*). Os exsudados de *Pinus* demonstraram ter como compostos dominantes o ácido palmítico, esteárico, oleico e linoleico (Figura 1.14.). Foi também observado que a quantidade de lípidos exsudada foi maior do que a quantidade presente nos tecidos das raízes (Fries, *et al.*, 1985). Outro estudo refere que o crescimento de várias ectomicorrizas é estimulado depois da adição de ácido palmítico ou esteárico (Laczko, *et al.*, 2003). Laczko e colaboradores colocaram ainda a hipótese de que a planta produz quantidades aumentadas de lípidos neutros contendo ácidos gordos saturados em resposta ao fungo e que o fungo absorve estes ácidos gordos nos sítios de contacto iniciais e os transporta para o micélio extrarradicular, de modo a promover o crescimento do micélio (Laczko, *et al.*, 2003).

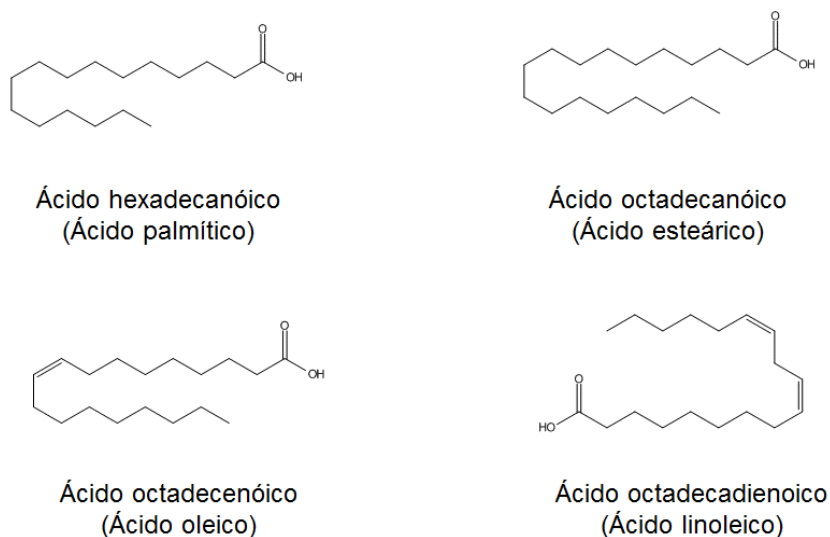


Figura 1.14. Estrutura química de ácidos gordos presentes nos exsudados de raízes e que influenciam o crescimento das hifas de fungos micorrízicos.

1.5.1.5. Estrigolactonas

A primeira descrição da estrutura das estrigolactonas data dos anos 1960 (Walter, *et al.*, 2010). Estes compostos foram descritos como sendo lactonas sesquiterpênicas, primeiramente identificadas como sendo estimulantes da germinação de sementes das plantas parasitas da família Orobanchaceae, como a *Striga*, *Orobanche* e *Phelipanche* spp. (Akiyama, *et al.*, 2005; Steinkellner, *et al.*, 2007; Walter, *et al.*, 2010). Recentemente, as estrigolactonas foram reconhecidas como factores de ramificação das hifas de fungos arbusculares (Akiyama, *et al.*, 2005; Bais, *et al.*, 2006; Steinkellner, *et al.*, 2007; Walter, *et al.*, 2010; Ruyter-Spira, *et al.*, 2011). Estes compostos foram descritos pela primeira vez como desempenhando este papel em 2005 por Akiyama e colaboradores, que identificaram estrigolactonas nos exsudados de raízes da planta hospedeira *Lotus japonicus* (Akiyama, *et al.*, 2005; Walter, *et al.*, 2010). A estrigolactona isolada do exsudado de *L. japonicus* é derivada do estrigol, (+)-5-desoxi-estrigol (Akiyama, *et al.*, 2005). Além disso, pensa-se que as estrigolactonas não estão só envolvidas na ramificação das hifas dos fungos arbusculares mas também actuam como sinais no crescimento direcional destes fungos através das raízes (intercelularmente); no entanto, ainda não existem dados que o comprovem (Akiyama, *et al.*, 2005; Steinkellner, *et al.*, 2007).

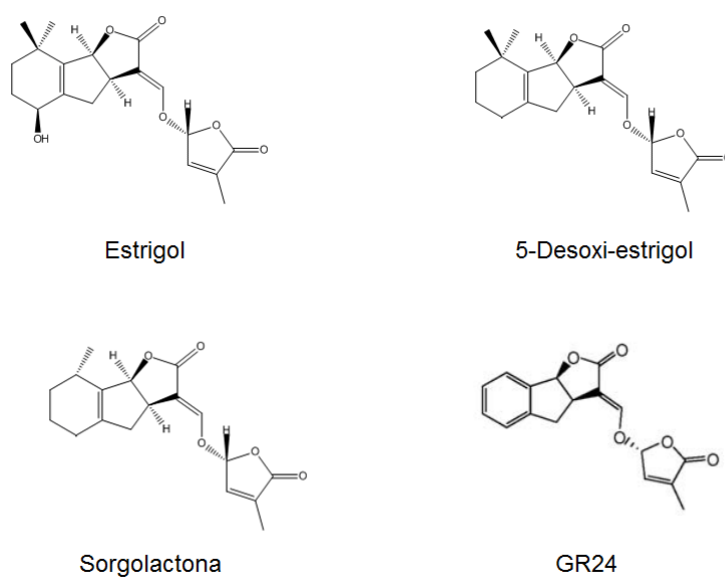


Figura 1.15. Estrutura química das estrigolactonas naturais e da estrigolactona sintética GR24.

As estrigolactonas estão presentes nos exsudados de plantas de diversas famílias, incluindo as monocotiledóneas sorgo, milho e milho miúdo e das dicotiledóneas algodão, ervilhas, trevo vermelho (Akiyama, *et al.*, 2005) e também são encontradas em exsudados de raízes de plantas não hospedeiras (Steinkellner, *et al.*, 2007). Foram isoladas cinco estrigolactonas naturais. A sorgolactona foi a terceira estrigolactona natural a ser isolada dos exsudados de raízes de sorgo e também se observou ser bastante activa no crescimento e ramificação dos fungos endomicorrizicos. O estrigol foi isolado de uma cultura aséptica de raízes de planta *Menispermum dauricum*, uma planta chinesa medicinal, que também induz a ramificação das hifas. A estrigolactona sintética, GR24 demonstrou ser menos activa que as estrigolactonas naturais (Akiyama, *et al.*, 2005). Na Figura 1.15. pode observar-se a estrutura química das diferentes estrigolactonas naturais e sintéticas mencionadas.

A partir do momento em que as plantas são micorrizadas, a produção de estrigolactonas é reduzida (López-Ráez, *et al.*, 2011) e como consequência a colonização posterior por fungos arbusculares é reduzida comparando com as plantas não micorrizadas. Os níveis alterados de estrigolactonas nos exsudados das raízes das plantas micorrizadas faz desta forma com que a colonização seguinte por fungos seja afectada. Para além disso, observou-se que os exsudados das raízes micorrizadas de sorgum e milho induzem a baixa germinação de sementes *Striga* do que os exsudados das plantas não micorrizadas (Steinkellner, *et al.*, 2007).

Em condições de baixas quantidades de nutrientes, essencialmente fósforo e azoto, as plantas produzem mais estrigolactonas, aumentando a atracção em relação aos fungos micorrizicos, mas por outro lado aumentando o risco de crescimento de ervas daninhas (Lambers, *et al.*, 2009; López-Ráez, *et al.*, 2011).

As estrigolactonas foram classificadas como sendo uma nova classe de hormonas vegetais, visto que em adição ao seu papel como moléculas sinalizadoras na rizosfera, também estão associadas à regulação da arquitectura dos caules da planta inibindo a sua ramificação lateral (Bonfante & Genre, 2010; Walter, *et al.*, 2010; López-Ráez, *et al.*, 2011). Como é esperado de uma hormona vegetal, as estrigolactonas têm funções reguladoras adicionais e podem interagir com outras hormonas vegetais. Nas raízes, as estrigolactonas podem estar envolvidas no controlo da formação de pêlos radiculares (Walter, *et al.*, 2010). Este efeito directo no desenvolvimento das plantas é considerado como sendo a função principal desta classe de moléculas, que são de facto produzidas por muitas taxa de plantas, incluindo aquelas que não se associam a fungos micorrizicos (Bonfante & Genre, 2010).

Pouco se sabe sobre a via biossintética das estrigolactonas nas plantas devido às suas concentrações extremamente baixas (Akiyama *et al.*, 2005; Walter, *et al.*, 2010). O quanto as estrigolactonas são essenciais para o estabelecimento da simbiose micorrizica tem sido frequentemente discutido, mas a sua indispensabilidade nunca foi provada (Walter, *et al.*, 2010).

1.5.2. Exsudados de fungos micorrízicos

Os fungos endomicorrízicos exsudam também compostos químicos durante o seu crescimento pré-simbiótico. Um “diálogo” molecular precede a colonização das raízes, fazendo com que os parceiros estejam informados da sua proximidade recíproca. No entanto, as moléculas fúngicas bioactivas responsáveis por este fenómeno ainda não foram identificadas, mas pensa-se que sejam parcialmente lipofílicas e sugere-se que tenham um esqueleto de quitina. Estes sinais difusos, sempre referidos como factores *Myc*, factores de micorrização, são conhecidos como sendo precentidos pela planta, da mesma forma que os exsudados das raízes são precentidos pelo fungo, com ausência de contacto físico entre os dois parceiros (Bonfante & Genre 2010; Maillet, *et al.*, 2011). Os fitorreguladores também se encontram presentes nos exsudados dos fungos micorrízicos e têm sobretudo um papel no crescimento das raízes de modo a potenciar o aumento dos locais de infecção.

1.5.2.1. Factores *Myc*

A descoberta da estrutura dos sinais *Myc* é importante para a compreensão da evolução das endossimbioses nas raízes das plantas e para o estudo da parte molecular e celular destas interacções. Estes compostos são uma mistura de lipoquitooligossacarídeos sulfatados e não sulfatados que têm semelhanças estruturais com os factores Nod, factores de nodulação, das bactérias do género *Rhizobium*. Tanto os sinais simbióticos Nod como *Myc* são constituídos por um esqueleto de quitina oligossacarídico, que é composto por quatro ou cinco resíduos de glucosamina, *N*-acilado no resíduo de glucosamina na extremidade não redutora (Figura 1.16.) A presença destes compostos foi identificada nos exsudados do fungo *Glomus intraradices* (Maillet, *et al.*, 2011).

As experiências com *Myc* sintéticos revelaram que estes aumentam a formação de micorrizas arbusculares, provavelmente estimulando tanto a ramificação das raízes como a densidade de infecção (Maillet, *et al.*, 2011). Desta forma, os factores *Myc* podem ser considerados não são só sinais simbióticos que estimulam a formação micorrízica mas também reguladores de crescimento das raízes hospedeiras. Isto sugere que a simbiose com fungos arbusculares, no decorrer da evolução, seleccionou os sinais do fungo que podem modificar o desenvolvimento da raiz, facilitando a posterior infecção simbiótica (Maillet, *et al.*, 2011). Embora os potenciais factores *Myc* dos fungos arbusculares estejam correntemente em investigação, na base das potenciais semelhanças com o factor *Nod*, a biossíntese de moléculas similares parece não ocorrer nos fungos ectomicorrízicos (Bonfante & Genre, 2010).

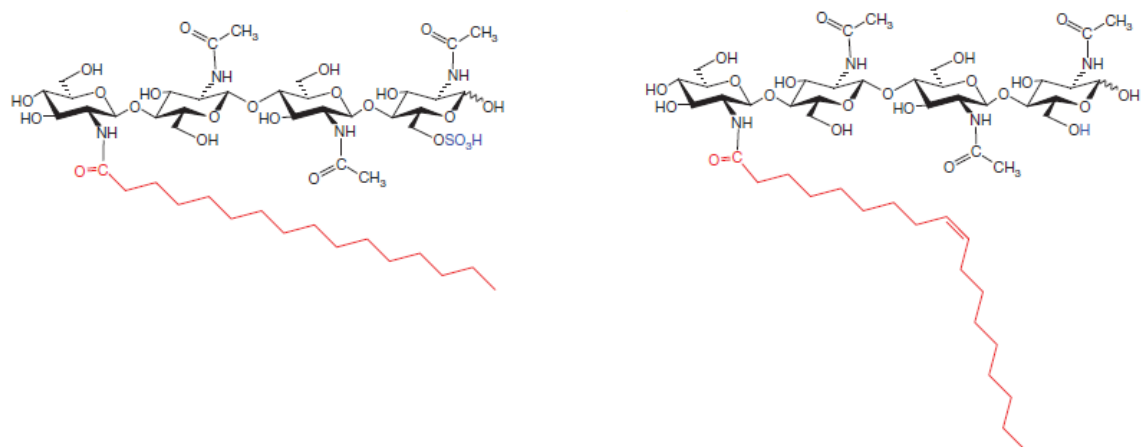


Figura 1.16. Proposta das estruturas químicas dos principais factores de micorrização exsudados pelos fungos endomicorrizicos, Myc-LOCs (lipoquitooligosacárideos) (adaptado de Maillet, *et al.*, 2011)

1.5.2.2. Fitorreguladores

De forma semelhante aos exsudados das raízes, pensa-se que os fungos micorrízicos também exsudem para a rizosfera fitorreguladores. Na simbiose ectomicorrízica vários exemplos são conhecidos em que o IAA é produzido pelo parceiro fúngico, podendo resultar no aumento das raízes laterais e subsequentemente na estimulação da formação da simbiose. Em adição, foi sugerido que o IAA e citocininas, libertadas pelo fungo podem também contribuir para o aumento do crescimento da planta (Kaldorf & Ludwig-Muller, 2000; Niemi, *et al.*, 2002). A inoculação com estirpes específicas de fungos são importantes no enraizamento de algumas plantas *in vitro* e *in vivo*, mimetizando o papel das auxinas nas plantas (Niemi, *et al.*, 2002).

O ABA também foi encontrado nos exsudados de fungos micorrízicos. O aumento das concentrações de ABA foi demonstrado nas plantas micorrizadas e quantidades mais elevadas de ABA foram encontradas nas hifas do fungo do que nas raízes. Estes resultados indicam que o aumento de ABA detectado nas raízes micorrizadas pode ser, pelo menos em parte, o resultado da síntese deste fitorregulador pelos fungos arbusculares (Herrera-Medina, *et al.*, 2007). Um estudo verificou a biossíntese de ABA por parte das hifas do fungo *Glomus intraradices* e que esta levava ao aumento da biossíntese de IBA por parte da planta hospedeira (Kaldorf & Ludwig-Muller, 2000).

1.5.2.3. Ergosterol

Em contraste com as hormonas vegetais, o esteroide ergosterol (Figura 1.17.) é específico para fungos e não ocorre em plantas, sendo muitas vezes um marcador do conteúdo em fungo em amostras biológicas, incluindo raízes ectomicorrizadas e micélio extrarradicular (Laczko, *et al.*, 2003) e pensa-se que esteja também envolvido no estabelecimento da simbiose mutualista com as plantas.

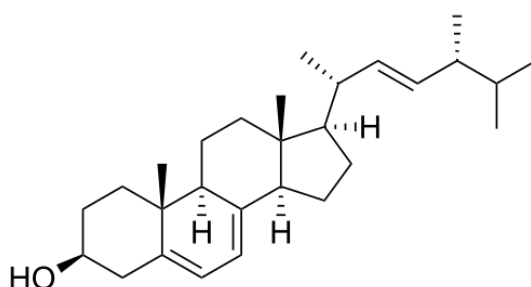


Figura 1.17. Representação da estrutura química do ergosterol.

O ergosterol é o esteróide principal da maior parte dos fungos, com um papel essencial na estabilização da membrana. Para além dos fungos micorrízicos, o ergosterol ocorre também em muitos fungos patógenos de plantas. A partir de um estudo com estes fungos colocou-se a hipótese de que as plantas possuem receptores de ergosterol para a detecção de fungos invasores. No entanto, continua por explicar como estão os sistemas de percepção das plantas para estes componentes fúngicos conectados com a patogénese e simbiose (Granado, *et al.*, 1995).

1.6. O aroma da batata doce

O sabor e o aroma da batata doce formam-se predominantemente durante a confecção deste alimento. É sabido que a confecção culinária altera substancialmente o sabor e aroma característico do alimento cru. Esta alteração ocorre em função de variáveis como o aquecimento (temperatura, duração e método) e a composição química inicial do produto (Kays & Wang, 2000).

O sabor é derivado da sensação obtida através do contacto dos compostos solúveis em água com os quimiorreceptores orais. Das quatro sensações de paladar, a doce é a dominante na batata doce cozinhada. Esta doçura é derivada dos açúcares presentes na raiz crua (principalmente sacarose, glucose e frutose) e maltose que é formada a partir da hidrólise do amido durante o processo de confecção alimentar (Kays & Wang, 2000; Wang & Kays, 2003; Kays, 2006). Muitos dos alimentos que consumimos habitualmente apresentam um sabor e aroma pouco dominantes e

apresentam conteúdos de açúcares muito baixos, por exemplo arroz <1%, milho e batata branca 2% *versus* 8% a 40% de açúcares na batata doce (Wang & Kays, 2003; Kays, 2006).

Para além da doçura característica, a batata doce emite um aroma muito agradável e intenso quando cozinhada. O aroma é considerado como tendo um papel predominante em relação ao sabor. Isto deve-se em parte ao maior número de receptores odoríferos que possuímos e à sua capacidade na discriminação entre odores. A singularidade de muitas substâncias voláteis constituintes do aroma parece depender da sua capacidade para estimularem o órgão olfativo (Kays & Wang, 2000). Os constituintes voláteis contribuem desta forma para a percepção sensorial total (palato e odor) (Purcell, *et al.*, 1980) e permitem a existência de uma grande diversidade de aromas nos alimentos.

Os componentes voláteis emitidos pela batata doce quando cozinhada podem ter duas origens: (1) – o aumento da volatilidade dos compostos presentes nas raízes tuberculosas que coincide com o aumento da temperatura durante a confecção, (2) - reacções químicas que ocorrem durante a confecção alimentar, das quais resulta a síntese de novos produtos (Wang & Kays, 2001). A reacção de Maillard, a degradação de Strecker (passo reaccional intermédio da reacção de Maillard), e a caramelização são os mecanismos reaccionais mais comuns na síntese induzida termicamente dos compostos voláteis da batata doce (Nakamura, *et al.*, 2013) que contribuem para o aroma, a caramelo e doce, deste alimento (Wang & Kays, 2003).

Os produtos de reacção de Maillard responsáveis por este aroma característico são derivados do furano (Lee & Shibamoto, 2002), tendo sido os primeiros compostos heterocíclicos identificados resultantes desta reacção. Verificou-se que alguns dos compostos apresentam toxicidade (ex. 2-furaldeído e o 5-hidroximetilfurfural) (Khan, *et al.*, 1995). O conteúdo de 5-hidroximetilfurfural (5-HMF) nos alimentos tem sido estudado por vários grupos de investigadores, tendo sido encontradas baixas concentrações em carne e produtos à base de carne (abaixo de 0,9mg/kg), concentrações variadas em pão (acima de 410mg/kg) e café (5 a 420mg/L) e concentrações mais elevadas em frutos secos e sumos feitos com fruta seca (25 a 2900 mg/kg) e em produtos com caramelo (110 a 9500 mg/kg). Com base em estatísticas de consumo, verifica-se que o pão e o café são os que mais contribuem para a exposição ao HMF, visto que são consumidos diariamente pela população (Murkovic & Pichler, 2006). A relevância toxicológica do 5-HMF encontra-se ainda pouco estudada em detalhe. Em concentrações elevadas, o que se pensa não ser relevante em nutrição e na sua utilização como um ingrediente para conferir aroma, o HMF é citotóxico e causa irritação nos olhos, no tracto respiratório superior, na pele e nas membranas mucosas (Adams, *et al.*, 1997; Murkovic & Pichler, 2006). Janzowski e colaboradores (Janzowski, *et al.*, 2000) concluíram com base numa absorção estimada de 30 a 60 mg (0,5-1 mg/kg de peso corporal) que os resultados *in vitro* não indicavam um risco para a saúde. Outras publicações, por outro lado, indicam que o HMF para além de mutagénico pode ser transformado pelas sulfotransferases humanas e de ratos em 5-sulfoximetil-2-furfural (SMF) e que este composto também demonstrou ser mutagénico (Murkovic & Pichler, 2006; Friedman, 2005).

O 2-furaldeído foi identificado e quantificado em bebidas não alcoólicas 4mg/L; bebidas alcoólicas (10mg/L), gelados (13mg/kg), rebuçados (12mg/kg), alimentos assados (17mg/kg), gelatinas e pudins (0,8mg/kg), pastilha elástica (45mg/kg) e xaropes (30mg/L) (Cary, *et al.*, 2000).

Pensa-se que o consumo diário total por pessoa de 2-furaldeído e dos seus precursores (álcool furfurílico e ésteres furfurílicos), através de alimentos em que estes ocorrem naturalmente, seja de aproximadamente de 0,3 mg/kg/dia (Adams, *et al.*, 1997). Apesar de não existirem muitas referências quanto à toxicidade do composto, um estudo indicou que tanto o 2-furaldeído como o 5-metilfurfural não apresentaram actividade mutagénica para *Salmonella typhimurium*, mas que danificaram o DNA, levando à sua quebra na presença de Cu^{2+} (Khan, *et al.*, 1995; Yamashita, *et al.*, 1998; Janzowski, *et al.*, 2000). É referido também que apesar dos resultados da actividade mutagénica do 2-furaldeído em bactérias ser relativamente negativo, este composto é claramente genotóxico *in vitro* em células de mamíferos, produzindo aberrações cromossómicas e mutações genéticas (Irwin, 1990). No entanto, alguns estudos com ratos *in vivo* e *in vitro* referem que o 2-furaldeído não actua directamente no DNA, fazendo com que a exposição a 2-furaldeído tenham pouco potencial genotóxico (Adams, *et al.*, 1997). Por outro lado, estudos *in vivo* em ratinhos revelaram que a exposição oral crónica ao furaldeído aumenta a incidência de cancro nos ductos biliares, tumores malignos e benignos no fígado (Irwin, 1990). Tumores benignos e malignos foram observados em ratos e ratinhos depois da exposição oral a 60 e 50mg/kg do seu peso corporal, respectivamente, durante 103 semanas (Cary, *et al.*, 2000). Os dados relativos à toxicidade aguda deste composto em animais são variáveis; no entanto, é sabido que o 2-furaldeído é tóxico por inalação e por via oral (LD_{50} cerca de 120mg/kg de peso corporal), sendo a irritação do tracto respiratório e as lesões pulmonares consistentemente observadas depois de uma exposição única e repetida (Irwin, 1990).

Outro composto resultante da reacção de Maillard com aroma a caramelo é o maltol (3-Hidroxi-2-metil-4H-piran-4-ona). Alguns aldeídos resultantes da degradação de Strecker, como o fenilacetaldéído e o benzaldéído, são também importantes componentes da constituição volátil da batata doce depois de cozinhada (Wang & Kays, 2003).

Pensa-se que a produção destes voláteis esteja associada à doçura da variedade, ou seja, uma variedade com um maior conteúdo em açúcares, é aquela que produz uma maior quantidade de produtos/compostos de Maillard (Wang & Kays, 2003). A doçura e o aroma típicos da batata doce podem divergir de variedade para variedade (Wang & Kays, 2003; Kays, 2006). No entanto, outros factores para além dos genéticos, como por exemplo as condições de cultura, a realização de cura e as condições de armazenamento, podem modelar estas duas propriedades (Purcell, *et al.*, 1980; Wang & Kays, 2001).

1.6.1. A reacção de Maillard

Em 1912, um cientista francês, Louis-Camille Maillard (1878-1936) publicou um artigo descrevendo a reacção entre aminoácidos e açúcares redutores, com o aquecimento da mistura de reacção, que resultava na cor caramelo (“browning”) desta mistura (Zhang, *et al.*, 2009). A reacção que Maillard observou consiste na glicosilação não enzimática de aminoácidos ou proteínas (Hidalgo & Zamora, 2000) que ocorre através da interacção entre um grupo amina de péptidos ou proteínas e

um grupo carbonilo de açúcares redutores ou outros hidratos de carbono (Lee & Shibamoto, 2002). Maillard escreveu um protocolo original envolvendo a reacção química entre aminoácidos e açúcares, descrevendo detalhes sobre o mecanismo desta reacção, que viriam mais tarde a ser confirmados: a formação de CO₂ a partir dos grupos carboxilo dos aminoácidos, a desidratação de açúcares com a formação de ligações duplas e por vezes estruturas cíclicas, a formação de pigmentos castanhos, que pensava serem substâncias policíclicas azotadas, o grau de reactividade dos aminoácidos e dos açúcares (a alanina mais reactiva que os outros aminoácidos, pentoses mais reactivas que as hexoses, monossacáridos mais reactivos que os dissacáridos); e a possibilidade desta reacção ocorrer a 37°C. Esta reacção, que ficou conhecida pelo nome do cientista que pela primeira vez a descreveu, foi enumerada em 7 artigos científicos entre 1912 e 1917, mas foi ignorada durante 24 anos (Finot, 2005; Zhang, *et al.*, 2009).

Genericamente, a reacção de Maillard é uma reacção entre aminas, aminoácidos, péptidos ou proteínas e açúcares redutores (ex. monossacaridos: glucose e frutose; dissacáridos: maltose, lactose) ou vitamina C (Friedman 1996) que ocorre por aquecimento dos alimentos e é denominada muitas vezes por reacção de “browning” (acastanhamento) não enzimático. O acastanhamento dos alimentos pode também acontecer através de uma via enzimática, em que ocorre a oxidação de fenóis, através de oxidases polifenólicas e peroxidases, este está associado à degradação dos alimentos e ao seu processamento a baixas temperaturas, em condições em que a actividade enzimática não é comprometida (Shibamoto & Bjeldanes, 2009; Krishnan, *et al.*, 2010). No entanto, verificou-se que a reacção de Maillard também se encontra presente e pode ser responsável pela degradação dos alimentos durante o seu armazenamento à temperatura ambiente (Lee & Shibamoto, 2002; Friedman, 2005; Somoza, 2005). Produtos da reacção de Maillard foram encontrados nas sementes de rabanete (*Raphanus sativum* L.) e cevada (*Hordeum* sp.) com cerca de 1500 anos (Kays & Wang, 2000). Além disso, esta reacção complexa não ocorre só em alimentos mas também em papel, têxteis, indústrias biofarmacêuticas (Zhang, *et al.*, 2009) e *in vivo*, no corpo humano, onde os compostos de Maillard são formados a partir de hidratos de carbono e proteínas endógenos (Somoza, 2005).

Para além da temperatura, que ao aumentar faz com que a velocidade da reacção aumente, a reacção de Maillard pode ser influenciada por outros factores como a natureza dos reagentes (ex. composição química do alimento cru), a combinação temperatura-tempo durante o armazenamento, o pH, a actividade da água nos alimentos, a presença de oxigénio e metais e a presença de inibidores da reacção, como o dióxido sulfúrico. A manipulação destas variáveis pode levar a um balanço diferente das várias vias reaccionais e dos produtos resultantes; no entanto, esta reacção é notoriamente difícil de controlar (Martins, *et al.*, 2001).

1.6.1.1. Diagrama de Hodge

Desde o seu reconhecimento que o trabalho de investigação realizado em torno da reacção de Maillard se focou essencialmente nos alimentos e em sistemas modelo. Estes sistemas modelo permitiram a descoberta de muitos produtos e vias reaccionais desta reacção e consistem no estudo de reacções envolvendo açúcares redutores e aminoácidos, da degradação térmica dos produtos, da degradação térmica de açúcares, das reacções de pirólise de aminoácidos e dipéptidos (Lee & Shibamoto, 2002). O esquema básico da reacção de Maillard, utilizado ainda hoje, foi publicado por John Hodge em 1953 (Hodge, 1953). Este esquema é um sumário simples e elementar, mas consolidado, dos mecanismos da reacção. Estudos mais recentes estabeleceram que existem outros mecanismos importantes, que não foram tidos em conta no esquema simplista de Hodge (Ames, 1998; Martins, *et al.*, 2001).

Segundo o diagrama de Hodge (Figura 1.18.), a fase inicial da reacção de Maillard envolve a condensação de um grupo carbonilo. Por exemplo, a partir de um açúcar redutor como a glucose (aldose) e um grupo amina livre, normalmente o grupo amina de resíduos de lisina em proteínas, forma-se um produto condensado (Martins, *et al.*, 2001). Esta reacção de glicosilação não enzimática resulta na formação de uma base Schiff instável (aldimina) que espontaneamente se rearranja para formar uma mais estável, 1-amino-1-desoxi-2-cetose (cetoamina), que é também conhecida como produto Amadori, nome atribuído pelo cientista italiano Mario Amadori (Zhang, *et al.*, 2009). Os produtos Amadori são degradados através de várias reacções químicas, levando à formação de furfurais, reductonas e produtos fragmentados (compostos carbonilo e hidroxicarbonilo). Todos estes compostos podem também ser formados directamente de reacções de degradação dos açúcares (caramelização), isto é, sem a intervenção de um composto amina. No entanto, Hodge considerou que o grupo amina reage como um catalisador, sendo a reacção descrita inicialmente mais rápida, em que mais produtos intermediários se formam do que aqueles resultantes da degradação de açúcares (Hidalgo & Zamora, 2000; Somoza, 2005; Boekel, 2006; Zhang, *et al.*, 2009). A degradação dos produtos de Amadori está dependente do pH do sistema. Por exemplo, a pH igual ou inferior a 7, estes sofrem 1,2-enolização e ocorre a formação de 2-furaldeído (quando se encontram envolvidas pentoses) ou hidroximetilfurfural (HMF) (quando estão envolvidas hexoses). A um pH superior a 7 pensa-se que a degradação de compostos de Amadori ocorre maioritariamente por 2,3-enolização, em que reductonas, como o 4-hidroxi-5-metil-2,3-dihidrofurano-3-ona, e uma variedade de produtos de cisão, incluindo o acetol, o piruvaldeído e o diacetilo se formam. Todos estes compostos são altamente reactivos e participam nas reacções seguintes (Martins, *et al.*, 2001). Os produtos de cisão α -dicarbonilo, por exemplo, a butanediona, o glioxal, o metilglioxal, formados na degradação dos produtos Amadori, são capazes de reagir com aminoácidos através da degradação de Strecker, em que ocorre a desaminação e descarboxilação dos aminoácidos, para originar aldeídos Strecker (ex. 3-metilbutanal da leucina, metional da metionina). Estes aldeídos sofrem condensação originando pirazinas, tiofenos e furanos.

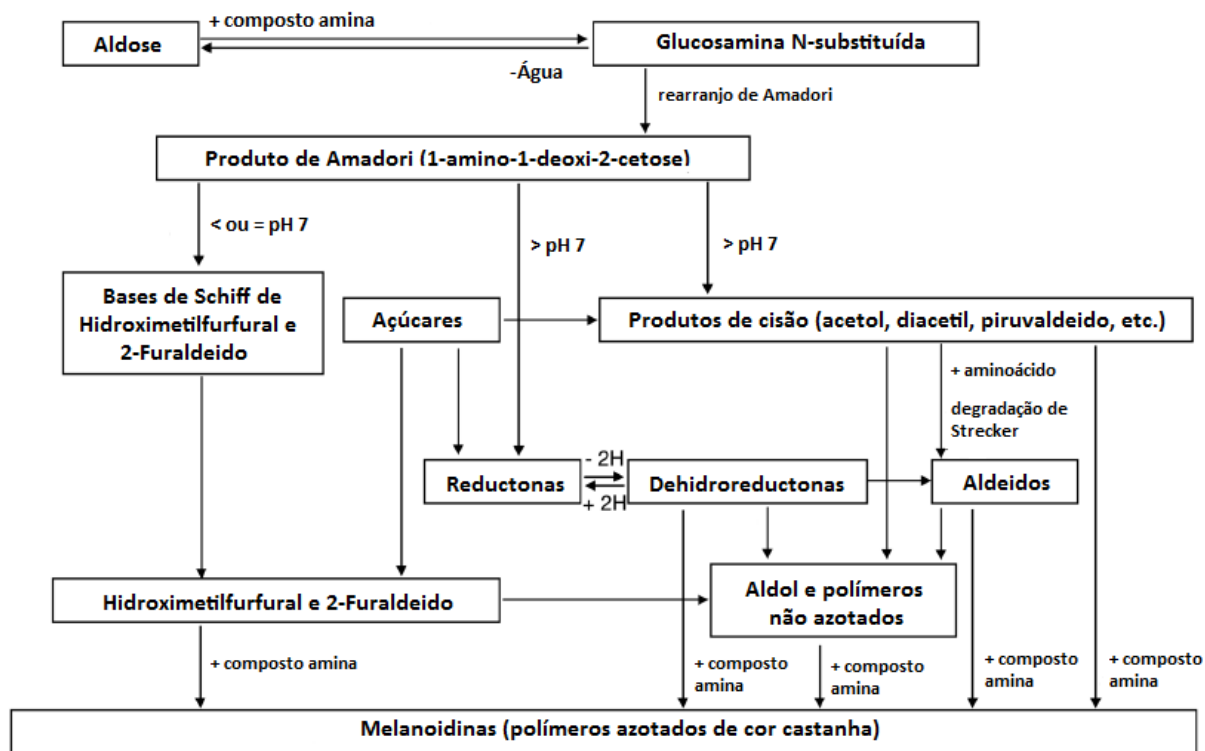


Figura 1.18. Diagrama de Hodge (adaptado de Zhang, *et al.*, 2009).

Os aldeídos de Strecker e as pirazinas contribuem para o aroma dos alimentos aquecidos (Martins, *et al.*, 2001; Boekel, 2006; Zhang, *et al.*, 2009). Em adição, os fragmentos dicarbonilo podem actuar como precursores de acrilamida, aminas heterocíclicas (Tuohy, *et al.*, 2006). Na fase final da reacção de Maillard formam-se a maior parte dos compostos responsáveis pela cor dos produtos cozinhados. Nesta fase dá-se a condensação de aldol resultante dos furfurais, reductonas e aldeídos. Ao mesmo tempo, as reacções destes mesmos intermediários com compostos amina levam à formação de produtos finais da reacção, conhecidos na ciência alimentar como melanoidinas. Hodge definiu as melanoidinas como “polímeros azotados e acastanhados” (Hodge, 1953; Hidalgo & Zamora, 2000; Martins, *et al.*, 2001; Zhang, *et al.*, 2009).

1.6.1.2. O papel da reacção de Maillard na qualidade dos alimentos

Tendo em conta que todos os alimentos possuem proteínas e hidratos de carbono, os produtos das reacções de Maillard estão presentes diariamente na dieta humana em quantidades consideráveis. É por isso importante estudar os mecanismos e os produtos desta reacção e os seus efeitos nas propriedades organolépticas, na aparência, na qualidade nutricional e na segurança alimentar (Friedman, 1996). Os produtos resultantes das reacções de Maillard fornecem

características aos alimentos, associadas à sua qualidade e segurança, que são bastante relevantes na escolha dos consumidores (Somoza, 2005): a formação de cor ou perda de cor, a formação de aromas ou desaparecimento de aromas, a produção de compostos com actividade antioxidante, a redução do valor nutritivo e a formação de compostos potencialmente tóxicos (Ames, 1998). Estas duas últimas possibilidades podem colocar em causa a qualidade e segurança alimentares (Friedman, 1996, Lee & Shibamoto, 2002).

Como referido anteriormente, a reacção de Maillard consiste na modificação química envolvendo proteínas e hidratos de carbono, resultando na formação de proteínas glicosiladas. Tais reacções podem afectar adversamente o valor nutritivo dos alimentos (Friedman, 1996) levando à modificação química irreversível de alguns aminoácidos, à degradação de aminoácidos essenciais na dieta (lisina e triptofano), a um decréscimo na digestibilidade proteica (Martins, *et al.*, 2001; Tessier & Birlouez-Aragon, 2010) e à inibição de enzimas proteolíticas e glicolíticas (Friedman, 1996; Martins, *et al.*, 2001; Friedman, 2005). No entanto, para além do decréscimo da digestibilidade proteica, o tratamento pelo calor dos alimentos pode levar à destruição de nutrientes como vitaminas, compostos fenólicos e ácidos gordos polinsaturados (Tessier & Birlouez-Aragon, 2010). A vitamina C (ácido ascórbico), por exemplo, pode reagir com grupos amina livres no lugar de açúcares redutores, o que leva à sua perda. Outros nutrientes importantes como alguns metais (cobre, zinco, ferro) podem formar complexos com produtos das reacções de Maillard (produtos Amadori e melanoidinas) (Zhang, *et al.*, 2009). Para além da degradação de micronutrientes, a perda de água com o concomitante aumento da densidade calórica é outra consequência das reacções de Maillard no valor nutritivo dos alimentos (Pouillart, *et al.*, 2008).

Para além da alteração do valor nutritivo dos alimentos, os compostos químicos resultantes da reacção de Maillard possuem actividades fisiológicas e biológicas que têm recebido muita atenção nas últimas décadas (Irwin, 1990; Lee & Shibamoto, 2002; Tuohy, *et al.*, 2006; Zhang, *et al.*, 2009) visto que na mesma reacção podem originar-se compostos com propriedades carcinogénicas, mutagénicas e alergénicas (ex. imidazoles, metilglioxal, furfurais, etc.) e ao mesmo tempo compostos com propriedades antimutagénicas, antioxidantes, antimicrobianas, e antialergénicas (ex. melanoidinas) (Friedman, 2005).

1.7. Métodos analíticos

1.7.1. Isolamento e análise de compostos envolvidos na sinalização entre raízes e fungos micorrizicos

Os compostos bioactivos envolvidos na interacção simbiótica encontram-se presentes em pequenas quantidades dificultando o seu isolamento e análise. Para além disso, muitas substâncias interferentes e impurezas podem fazer parte dos exsudados, sendo por isso necessária a sua preparação e purificação prévia.

A extracção de fitoquímicos dos exsudados das raízes faz-se essencialmente através de extracção líquido-líquido envolvendo a extracção específica, utilizando diferentes solventes orgânicos. A diferente partição dos exsudados das raízes resulta no isolamento de várias classes de compostos químicos (Bais, *et al.*, 2006).

Os fitorreguladores são possivelmente os compostos de interesse para a simbiose micorrízica mais estudados, devido à sua presença e importância no desenvolvimento das plantas, existindo por isso um maior número de métodos descritos para o seu isolamento e análise. Usualmente as hormonas vegetais, são extraídas através de métodos como a extracção líquido-líquido (LLE), extracção em fase sólida (SPE) e cromatografia em coluna (Ek, *et al.*, 1983; Dunlap & Guinn, 1989; Lu, *et al.*, 2010). Outros processos como a microextracção em fase sólida (SPME), microextracção em fase líquida e microextracção líquido-líquido (DLLME) foram propostas com sucesso e desenvolvidas para a extracção de hormonas vegetais (Lu, *et al.*, 2010). A análise das diferentes hormonas vegetais já foi descrita envolvendo a cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS) (Birkemeyer, *et al.*, 2003; Barkawi, *et al.*, 2008) (com derivatização prévia do extracto, pentafluorobenzilação, metilação, trimetilsililação (Rolcik *et al.* 2005)), cromatografia de alta resolução (HPLC) (Dobrev, *et al.*, 2005; Stoll, *et al.*, 2006), electroforese capilar (Liu, *et al.*, 2002), cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa (LC-MS) (Durgbanshi, *et al.*, 2005; Pan, *et al.*, 2008; Lu, *et al.*, 2008) e a utilização de imunoensaios (Wodzicki, *et al.*, 1987; Kaldorf & Ludwig-Muller, 2000; Rolcik *et al.* 2005, Lu, *et al.*, 2010).

A extracção dos factores de ramificação presentes nos exudados das raízes, como as estrigolactonas, tem sido efectuada através de extracção líquido-líquido à água de crescimento de raízes com o solvente acetato de etilo e a análise realizada por HPLC (Akiyama *et al.* 2005). Mais recentemente, a análise de estrigolactonas foi realizada por LC-MS/MS (López-Ráez, *et al.*, 2011).

1.7.2. Isolamento e análise dos compostos voláteis do aroma da batata doce

O estudo do aroma da batata doce, principalmente depois de cozinhada, tem tido como objectivo principal a distinção de variedades e clones, visando o melhoramento e a selecção de uma variedade que seja mais aceite pelo consumidor relativamente a esta característica (Horvat, *et al.*, 1991; Kays, *et al.*, 1998; Kays & Wang, 2002; Wang & Kays, 2003; Kays, 2006).

A análise do aroma de alimentos é um processo bem estabelecido, desde o trabalho pioneiro de Powers e Keith (1968) aplicando análise discriminante dos aromas do café e do amendoim (Wang & Kays, 2003). Visto que o aroma característico de um determinado alimento deriva de um pequeno número de voláteis ou, por vezes, de um composto apenas, pensa-se que a correlação dos voláteis constituintes com a análise sensorial é essencial para determinar quais os odores activos determinantes. É por isso usual que os estudos realizados em alimentos cozinhados, incluindo a batata doce, utilizem a olfatometria acoplada à cromatografia gasosa (GC-O) na identificação e determinação da importância de alguns odores (Kays, *et al.*, 1998; Wang, *et al.*, 1998; Wang & Kays, 2000; Wang & Kays, 2001; Wang & Kays, 2003; Kays, 2006; Yang, *et al.*, 2008a; Yang, *et al.*, 2008b).

Um dos métodos utilizados para compreender a contribuição individual de cada composto volátil é o AEDA (AEDA – aroma extract dilution analysis). Este método permite estimar a contribuição relativa de cada composto para a globalidade do aroma, através da análise cromatográfica de diluições em série do extracto do aroma, sendo a presença de cada composto/odor avaliada por um técnico através da *sniffing port* (GC-O). Numa determinada diluição do extracto um dado composto pode deixar de ser sentido pelo técnico como constituinte do odor total, sendo este considerado menos activo/contributivo que outro composto sentido para a mesma diluição (Wang & Kays, 2000; Kays, 2006). Os estudos já realizados ao aroma da batata doce cozinhada foram também realizados através da análise por GC-MS e GC-IST (internal standard methodology), tendo sido possível a identificação e quantificação dos compostos voláteis constituintes do aroma (Kays, 2006).

A recolha dos voláteis foi realizada depois da confecção da batata doce utilizando essencialmente técnicas de purga e captura (Tenax) ou destilação por arrastamento de vapor; no entanto, verificou-se que estas não eram as mais indicadas na quantificação. Outra técnica descrita por Sun *et al.* (1993) utilizou uma montagem em que o forno onde a batata foi cozinhada se encontrava ligado a uma coluna de vidro contendo um solvente arrefecido com gelo para a captura dos voláteis. Foi utilizado um gás de arrastamento (hélio) de modo a transportar os voláteis do forno para a coluna. Ao solvente de captura foi adicionado um padrão interno para posterior quantificação. A amostra de voláteis recolhida foi depois concentrada num evaporador rotativo e sob corrente de azoto purificado de modo a poder ser cromatografável (Sun, *et al.*, 1993).

1.8. Abordagem às metodologias

1.8.1. Cultura de raízes e fungos endomicorrizicos *in vitro*

O estabelecimento de culturas de raízes *in vitro* pode influenciar grandemente o entendimento da simbiose micorrizica (Fortin, *et al.*, 2002), incluindo o desenvolvimento da micorriza, o metabolismo do carbono, a absorção de nutrientes, a morfologia da fase extraradicular, o mecanismo de sinalização/reconhecimento (Bécard & Piché, 1989; Nagahashi & Douds, 2000), e a interacção com patógenos da planta (Douds Jr., 2002).

Em todos os métodos actuais de cultivo de fungos endomicorrizicos, a presença de uma planta hospedeira é indispensável, devido à já referida natureza biotrófica obrigatória destes microorganismos. Muitos métodos foram desenvolvidos, incluindo o clássico sistema com solo, sistemas de hidro e aeroponia e a recente cultura *in vitro* de raízes em cultura monoxénica (Gadkar, *et al.*, 2001). A cultura de raízes tem vantagens óbvias em relação aos sistemas tradicionais, permitindo a produção de propágulos livres de contaminantes (Kandula, *et al.*, 2006).

A tecnologia de culturas monoxénicas é uma ferramenta importante para o estabelecimento experimental das associações micorrizicas. A cultura de raízes foi pela primeira vez desenvolvida por White (1943) (Fortin, *et al.*, 2002). Estes autores utilizaram raízes excisadas crescidas num meio sintético mineral suplementado com vitaminas e uma fonte de carbono. No entanto, o crescimento

abundante de raízes foi registado em poucas espécies (Fortin, *et al.*, 2002). Um pequeno mas crescente número de publicações descrevem o estabelecimento com sucesso das associações com fungos micorrízicos usando um pequeno número de espécies de fungos arbusculares (Fortin, *et al.*, 2002; Bi, *et al.*, 2004).

A colonização de fungos micorrízicos em condições *in vitro* foi pela primeira vez descrita no princípio dos anos 1960 (Mosse, 1962), quando a presença de *Pseudomonas* foi considerada necessária para assegurar a colonização. Pelos anos 1970, a simbiose livre de bactéria foi conseguida (St-Arnaud, *et al.*, 1996). No trabalho pioneiro de Mosse e Hepper (1975) usando culturas de raízes de *Lycopersicon esculentum* Mill. (tomate) e *Trifolium pratense* L. (trevo vermelho) para o estabelecimento de micorrizas *in vitro* com *Glomus mosseae*, estes autores demonstraram pela primeira vez que os esporos de fungos endomicorrizicos podem ser usados com sucesso para colonizar raízes excisadas crescidas num meio de cultura com base mineral. St-Arnaud, *et al.*, 1996). Mais tarde, Strullu and Romand (1986, 1987) demonstraram que é também possível reestabelecer micorrizas em raízes excisadas de *Fragaria x Ananassa* Duchesne (morango), *Allium cepa* L. (cebola) e tomate, usando a fase intraradicular (vesículas e porções de raízes micorrizadas) de várias espécies de *Glomus* como inóculo (Fortin, *et al.*, 2002).

Vários sistemas utilizando raízes excisadas de várias espécies hospedeiras assim como diferentes tipos de formulações de meio foram desenvolvidos para cultivar fungos endomicorrizicos monoxenicamente (Pawlowska, *et al.*, 1999). Um número crescente de espécies de fungos foi cultivada monoxenicamente: *Acaulospora rehmsii* (Dalpé & Declerck, 2002), *Gigaspora rosea*, *Gigaspora margarita*, *Gigaspora gigantea*, *Glomus etunicatum*, *Glomus intraradices*, *Glomus versiforme*, *Glomus caledonium*, *Glomus fasciculatum* e *Glomus macrocarpum*, *Glomus proliferum*, *Glomus deserticola* e *Glomus fistulosum* (Pawlowska, *et al.*, 1999; Bi, *et al.*, 2004; Kandula, *et al.*, 2006). No entanto, menos de 5% das espécies de fungos arbusculares conhecidas são cultivadas com sucesso através deste processo, limitando o conhecimento da biologia dos fungos arbusculares (Pawlowska, *et al.*, 1999).

A utilização de culturas de raízes com o intuito de estudar as questões relacionadas com as relações bioquímicas, genéticas e fisiológicas entre os fungos endomicorrizicos e os seus hospedeiros é suportado pelo facto de estes tecidos demonstrarem possuir as mesmas características micorrízicas das raízes *in vivo* onde estas estruturas se desenvolvem (Fortin, *et al.*, 2002).

1.8.1.1. Raízes transgénicas

As raízes transgénicas são caracterizadas por apresentarem elevada taxa de crescimento como as culturas celulares e células não organizadas (*calli*), mantendo um fenótipo estável como uma raiz não transformada (Tone, *et al.*, 1997), e possuírem uma elevada estabilidade genética, considerada uma vantagem na cultura de órgãos (Giri & Narasu, 2000; Giri, *et al.*, 2001; Choi, *et al.*, 2004). Muitos estudos usando diferentes raízes transformadas demonstraram uma estabilidade genética e bioquímica de mais de 10 anos (Lanoue, *et al.*, 2004) não produzindo quiméras ou variações

somaclonais como as respectivas culturas celulares (Saxena, *et al.*, 2007). A cultura de raízes transgênicas possui por isso um grande potencial para o estudo e cultivo de fungos arbusculares que não podem ser cultivados axenicamente em meio sintético na ausência de um hospedeiro (Nuutila, *et al.*, 1995) sendo uma alternativa às culturas de raízes excisadas.

Desde os princípios dos anos 80, que as raízes transgênicas ou *hairy roots* são utilizadas como um sistema experimental no estudo do metabolismo das raízes (Robins, 1998) e vistas como uma alternativa às culturas de suspensões celulares na produção de compostos químicos em larga escala (Lanoue, *et al.*, 2004). Além disso, são uma opção à colheita destrutiva de espécies em que as raízes acumulam metabolitos de elevado interesse económico (Guillon, *et al.*, 2006). As *hairy roots* são também consideradas um bom sistema no estudo da biologia das raízes, na formação de raízes secundárias e pêlos radiculares e da interacção da raiz com patógenos e organismos simbiotes (Kuzovkina, *et al.*, 2004; Figueiredo, *et al.*, 2006).

As raízes transgênicas formam-se a partir de uma transformação genética natural das plantas pela infecção da bactéria gram-negativa existente no solo, *Agrobacterium rhizogenes* Conn.. A bactéria do solo *Agrobacterium rhizogenes* é responsável pelo síndrome *hairy root*, que se baseia no crescimento activo de raízes ramificadas em plantas dicotiledoneas devido à transferência de uma porção do plasmídeo de DNA (Ri T-DNA) para o genoma da planta (Giri & Narasu, 2000; Bourgaud, *et al.*, 2001; Kuzovkina, *et al.*, 2004; Hu & Du, 2006; Srivastava & Srivastava, 2007). Na natureza estas raízes favorecem a estabilidade da planta no solo e aumentam a superfície de absorção das raízes. Geralmente este fenómeno favorece um crescimento mais activo e pode ser vantajoso para a planta (Kuzovkina, *et al.*, 2004).

Quando a bactéria infecta a planta o T-DNA entre as regiões TR e TL do plasmídeo Ri da bactéria, indutor da formação de raízes, é transferido e integrado no genoma nuclear da planta hospedeira. Este T-DNA possui um conjunto de genes responsáveis pela produção de enzimas que controlam a biossíntese de auxinas e citocininas. O novo balanço hormonal induz a formação de uma proliferação de raízes, denominadas por *hairy roots*, que emergem do local da infecção. O fenótipo das *hairy roots* é caracterizado por um crescimento rápido, independente de hormonas, com ausência de geotropismo e geneticamente estável. Estas raízes têm a capacidade de crescer *in vitro*, na ausência da bactéria estabilizadora, e geralmente crescem melhor que as raízes não transformadas da mesma espécie, apresentando uma grande incidência de raízes secundárias laterais ao contrário das raízes não transformadas (Shen, *et al.*, 1988; Nuutila, *et al.*, 1995; Tone, *et al.*, 1997; Guillon, *et al.*, 2006; Hu & Du, 2006; Fortin, *et al.*, 2002). As ORFs (*open reading frames*) 10, 11 e 12 (*rol* (root locus) A, *rol* B e *rol* C, respectivamente), constituintes da região plasmídeo, são consideradas essenciais para a formação das *hairy roots* (White, *et al.*, 1985). O gene *rol* B tem um importante papel na indução das *hairy roots*, enquanto que o *rol* A e o *rol* C e as outras ORFs actuam sinergisticamente para promover a indução de raízes (Zdravkovic-Korac, *et al.*, 2004). Foi referido que os genes *rol* do Ri T-DNA induzem um número de mudanças relativamente à sensibilidade a fito-hormonas e ao metabolismo das fito-hormonas (Ishizaki, *et al.*, 2002). Diferentes estudos sugerem

que os tumores de *hairy roots* resultam do aumento da sensibilidade das células transformadas aos níveis endógenos de auxinas (Gelvin, 1990).

Mais de 450 espécies de diferentes géneros e famílias (Juglandaceae, Lamiaceae, Moraceae, Ranunculaceae, Solanaceae, Asteraceae, Cucurbitaceae, Plumbaginaceae, Apocynaceae, Asclepiadaceae e Apiaceae) são conhecidas como sendo susceptíveis à infecção com esta bactéria. As opinas, produzidas pelos tecidos das plantas infectadas, actuam como um substrato nutritivo para a bactéria na rizosfera (Hamill & Lidgett, 1997; Srivastava & Srivastava, 2007). Baseado nos tipos de opinas produzidas, as estirpes de *A. rhizogenes* podem ser separadas em cinco linhas: octopinas, agropinas, nopalinas, manopinas e cucumopinas (Hu & Du, 2006). As estirpes agropina são as estirpes mais utilizadas devido a sua forte capacidade de indução (Hu & Du, 2006). A escolha da estirpe de *A. rhizogenes* é conhecida por influenciar a frequência de transformação, a capacidade de crescimento, a morfologia, e a qualidade e quantidade de produção de metabolitos secundários (Lourenço, *et al.*, 1999; Fu, *et al.*, 2005). No estabelecimento de *hairy roots* podem utilizar-se diferentes tipos de material vegetal, como folhas, hipocótilos ou protoplastos. O material é ferido e inoculado com *A. rhizogenes*. Usualmente dois ou três dias depois, o explante é transferido para um meio de cultura com antibióticos como a cefotaxima, carbencilina, vancomicina, ampicilina ou tetraciclina de modo a eliminar a bactéria (Hu & Du, 2006).

As espécies *Daucus carota* L. (cenoura) e *Convolvulus sepium* L. (bindweed) estão entre as primeiras a serem transformadas laboratorialmente com *Agrobacterium rhizogenes* Conn.. A cultura *in vitro* de fungos micorrízicos arbusculares e raízes transgénicas começou a ser estudada por vários grupos de investigação e a primeira cultura de raízes transgénicas a ser colonizada por fungos endomicorrizicos foi realizada por Mugnier e Mosse (Mugnier & Mosse, 1987). Estes autores conseguiram com sucesso colonizar as raízes transgénicas de *Convolvulus sepium* usando esporos de *Glomus mosseae*, mas como aconteceu anteriormente com as raízes não transformadas (raízes excisadas) desta espécie, a esporolação não ocorreu (Mugnier & Mosse, 1987; Pawlowska, *et al.*, 1999; Fortin, *et al.*, 2002). Outras raízes transgénicas, como as de cenoura, beterraba e cebola foram utilizadas nestes estudos (Bécard & Piche, 1989; Nuutila, *et al.*, 1995). A primeira esporolação *in vitro* de um fungo endomicorrizico foi conseguida por Becard e Fortin (Becard & Fortin, 1988) e usando raízes transgénicas de cenoura colonizadas com *Glomus intraradices* (Fortin, *et al.*, 2002).

O cocultivo das raízes transgénicas de certas plantas e os fungos micorrízicos permite traçar o ciclo do estabelecimento e desenvolvimento das micorrizas em condições estéreis, desde a germinação do esporo à subsequente formação de contactos entre as hifas e as raízes, a sua penetração nas raízes das células e a formação de vesículas intraradiculares (Kuzovkina, *et al.*, 2004). O ciclo de vida de um fungo endomicorrizico cultivado em raízes transgénicas termina na formação de esporos maduros; o seu número depende da espécie de fungo. Por exemplo, a espécie *Glomus caledonium* forma cerca de 300 esporos por caixa de Petri, enquanto que o *Glomus intraradices* cerca de 80000 (depois de 3 a 4 meses de cultivo) (Kuzovkina, *et al.*, 2004; Kandula, *et al.*, 2006). Os esporos produzidos *in vitro* podem ser utilizados para inocular novas raízes (Fortin, *et al.*, 2002). Em alguns casos, a esporolação dos fungos endomicorrizicos permite a utilização de

sistemas de larga escala de produção axénica de inóculo através de culturas em bioreactores (Flores, *et al.*, 1999).

A aplicação de esporos maduros esterelizados e fragmentos de raízes micorrizadas é de específico interesse prático devido à possível produção em grande escala de inóculo de fungo de qualidade, livre de contaminações por parte de fungos e bactérias. Este inóculo é especialmente importante quando utilizado para a adaptação de plantas estereis produzidas por transformação genética e propagação microclonal ao campo de cultivo. A introdução de inóculo micorrizico estéril antes da transplatação destas plantas para o solo pode eliminar a fertilização do solo devido ao contacto natural estabelecido entre a planta e a microflora natural (Fortin, *et al.*, 2002; Kuzovkina, *et al.*, 2004).

A primeira cultura contínua de raízes transgénicas com fungos endomicorrizicos *in vitro*, foi desenvolvida por Strullu e Romand (1986) e é usada actualmente numa grande gama de espécies de *Glomus* e *Gigaspora* (*Gigaspora margarita*, *G. gigantea*, *Glomus fasciculatum*, *G. intraradices*, *G. versiforme* e *G. caledonium*) (Fortin, *et al.*, 2002; Eskandari & Danesh, 2010). As culturas contínuas são obtidas através da transferência de raízes micorrizadas para meio fresco com ou sem esporos (St-Arnaud, *et al.*, 1996). Depois desta transferência, a simbiose preexistente continua a proliferar (Fortin, *et al.*, 2002).

Apesar da natureza artificial do sistema de culturas *in vitro*, existem várias razões legítimas para se continuarem a usar no estudo dos fungos endomicorrizicos. O fungo forma estruturas típicas de colonização (ex. apressório, arbúsculo e vesículas) e produz micélio extraradicular e esporos. A produção de esporos, morfológicamente e estruturalmente semelhantes aqueles produzidos nas culturas de pote, e estruturas intraradiculares capazes de iniciar novas simbioses micorrizicas seguida de subcultura indica que o fungo é capaz de finalizar o seu ciclo de vida. Pode ser assim assumido que os mecanismos que controlam os passos iniciais da colonização *in vitro* refletem aquilo que ocorre *in vivo* (Fortin, *et al.*, 2002), possibilitando o estudo dos aspectos moleculares e também bioquímicos da simbiose micorrizica arbuscular.

1.8.1.2. Importância do meio de cultura nas culturas *in vitro*

Os componentes do meio de cultura de culturas *in vitro* em condições axénicas controlam a fisiologia da planta hospedeira e conseqüentemente influenciam as relações entre o fungo e a planta, influenciando a colonização das plantas pelos fungos endomicorrizicos (Bressan, 2002). Os fungos endomicorrizicos foram estabelecidos pela primeira vez por Jensen (1942), num meio inorgânico communmente usado em estudos de nodulação, este meio não possuía azoto e continha 265mg de fósforo (as CaHPO_4 e K_2HPO_4)/L (Mosse & Phillips, 1971).

Segundo a literatura, e como já foi referido anteriormente, as espécies de plantas e os níveis disponíveis de fósforo no solo determinam a resposta das plantas aos fungos endomicorrizicos. O fósforo adicionado ao solo aumenta o tamanho das plantas, mas decresce a infecção micorrizica em

50% e a produção de esporos em 80% em relação directa com a quantidade de fertilizante adicionado (Mosse, 1973; Bressan, 2002). De igual modo, a concentração de fósforo no meio de cultura tem influência na micorrização (Mosse, 1973). No entanto, verificou-se que a adição de pequenas quantidades de fósforo ao meio agarificado melhoram a germinação dos esporos e do crescimento do tubo germinativo dos fungos endomicorrízicos. Para além disso, alguns estudos sugerem que o controlo da colonização micorrizica está ligada à presença de fósforo no tecido do hospedeiro e não no meio de cultura (Bressan, 2002).

A concentração de azoto também tem uma importância relevante na colonização das raízes. Uma concentração acima dos 2mM inibe o crescimento dos tubos germinativos dos esporos. Concentrações entre 1 e 2 mM permitem o desenvolvimento dos tubos germinativos mas estes não se ligam à superfície das raízes. No entanto, quando o meio de cultura contém menos de 0,2mM de azoto, o fungo demonstra algum crescimento direccionado para a raiz e a fixação da hifa à superfície da raiz é observada (Bressan, 2002).

A concentração de açúcar no meio de cultura também afecta a colonização da raiz por parte do fungo. Uma baixa concentração de sacarose (4g/L) aumenta o crescimento do tubo germinativo enquanto que uma concentração maior que 20g/L deste açúcar leva a que o crescimento das hifas cesse e que não haja fixação destas à superfície da raiz (Bressan, 2002).

As culturas de raízes transgénicas e fungos micorrízicos *in vitro* com o objectivo de produção de esporos começou por isso a ser realizada pela redução de concentração de certos nutrientes no meio de cultura evitando a inibição micorrizica, mas não afectando o crescimento e desenvolvimento das raízes (Fortin, *et al.*, 2002). O meio M (Becard & Fortin, 1988), por exemplo, é um meio de cultura modificado do meio White inicialmente desenvolvido para as culturas de raízes de tomate. A composição em macronutrientes do meio White é consideravelmente mais baixa que a do meio MS (Murashige & Skoog, 1962) e B5 (Gamborg, *et al.*, 1968), usado vulgarmente na cultura de plantas *in vitro* (Bécard & Piché, 1992). No entanto, este meio diluído é adequado para o crescimento das raízes. A composição do meio M é ainda mais pobre e foi desenvolvida depois de realizados ensaios que compararam os efeitos de diferentes concentrações de elementos na formação micorrízica (Becard & Fortin, 1988). Um meio similar ao meio M é o meio MSR (Modified Strullu-Romand) (Declerck, *et al.*, 1996). Este é também um meio de cultura modificado, que foi desenvolvido para otimizar o crescimento da fase intraradicual do fungo *in vitro*. A composição de macronutrientes do meio MSR é similar à do meio M. As diferenças entre os dois meios de cultura ocorre na concentração dos oligoelementos e vitaminas (Fortin, *et al.*, 2002; Eskandari & Danesh, 2010).

Um estudo com vista a uma produção mais efectiva de esporos e que teve em conta a importância da constituição do meio de cultura na colonização micorrízica, descreve um método que consiste na compartimentalização da caixa de petri onde se desenvolve a cultura monoxénica (St-Arnaud, *et al.*, 1996; Douds Jr., 2002, Singh, 2002). Uma metade da caixa é suplementada com sacarose onde são colocadas as raízes transgénicas micorrizadas e a outra metade da caixa não é suplementada com o açúcar. A colonização do compartimento sem raízes pelo micélio do fungo ocorre geralmente entre as seis e as oito semanas depois da inoculação das raízes micorrizadas no

compartimento proximal. O micélio começa a crescer vigorosamente, formando uma frente de hifas visível e que coloniza inteiramente este compartimento, levando à formação de esporos, que coincide com um abrandamento considerável do crescimento das raízes e o seu acastanhamento. Os efeitos estimulantes envolvidos na densidade de esporos e hifas no compartimento distal estão associados possivelmente à ausência de sacarose (St-Arnaud, *et al.*, 1996). Este método parece ser interessante para a produção de esporos, visto que permite a produção de um maior número destas estruturas do que os métodos que não envolvem a compartimentalização do meio de cultura (St-Arnaud, *et al.*, 1996).

1.8.2. Métodos analíticos

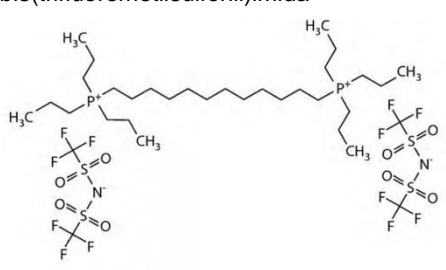
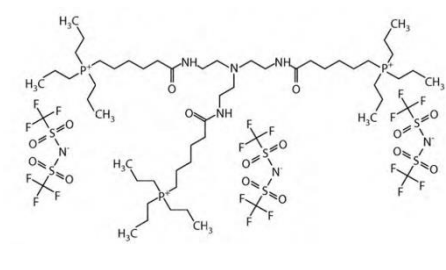
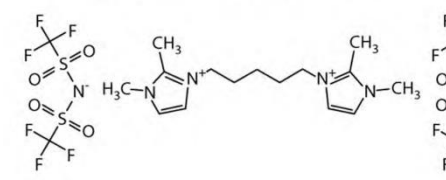
1.8.2.1. Colunas cromatográficas de líquidos iónicos

Os líquidos iónicos representam uma classe de solventes orgânicos não moleculares que são líquidos a temperaturas relativamente baixas (ponto de fusão < 100°C), e são usualmente compostos por um catião orgânico contendo N ou P (ex. imidazólio, piridínio, grupo amónio quaternário e grupo fosfónio quaternário) e por um anião de natureza orgânica (ex. trifluorometilsulfonato [CF₃SO₃]⁻, bis[(trifluorometil)sulfonyl]imida [(CF₃SO₂)₂N], trifluoroetanoato [CF₃CO₂]⁻) ou inorgânica (ex. Cl⁻, Br⁻, [BF₄]⁻, [PF₆]⁻). Teoricamente, as combinações disponíveis entre aniões e catiões podem dar origem a 1018 tipos diferentes de líquidos iónicos (Poole & Poole, 2010; Ragonese, *et al.*, 2012; Tan, *et al.*, 2012). Os líquidos iónicos têm sido largamente empregues em vários campos da química, como na síntese, catálise, indústria química e química analítica (Ragonese, *et al.*, 2012; Tan, *et al.*, 2012). As propriedades específicas destes solventes orgânicos não moleculares, como a baixa volatilidade (pressão de vapor desprezível), elevada estabilidade térmica e excelente selectividade relativamente a classes químicas específicas e boa capacidade de cobertura sobre a parede interior de capilares de sílica fundida, fez com esta classe de compostos fosse considerada como adequada às fases estacionárias de GC, bem como para o revestimento de fibras de microextração em fase sólida (SPME) (Qi & Armstrong, 2007; Ragonese, *et al.*, 2011; Ragonese, *et al.*, 2012; Tan, *et al.*, 2012). As fases estacionárias de líquidos iónicos diferem fisicamente e quimicamente das outras fases estacionárias, porque são mais pequenas comparadas com as grandes fases poliméricas de polisiloxano e polietilenoglicol e não possuem grupos hidroxilo activos. Pensa-se que estas características permitam com que possuam uma grande estabilidade mesmo na presença de humidade ou de oxigénio (Sigma-Aldrich, 2013).

Pacholec e Poole foram os primeiros a avaliar os sais orgânicos líquidos como fases estacionárias no princípio dos anos 1980s. As colunas demonstraram ter uma boa selectividade para grupos funcionais polares e com ligações hidrogénio, mas tinham uma baixa eficiência para analitos não polares e uma temperatura de degradação relativamente baixa. Nos finais dos anos noventa, o grupo do Prof. Daniel W. Armstrong estudou a dualidade da natureza dos líquidos iónicos como fases estacionárias para cromatografia gasosa e as fases estacionárias de líquidos iónicos com base imidazólica demonstraram ter uma maior eficiência confirmando as diferentes selectividades obtidas

tanto para solutos polares como apolares (Sanchez-Prado, *et al.*, 2012; Tan, *et al.*, 2012). Além disso, as investigações preliminares sobre a estabilidade dos líquidos iônicos relativamente à natureza do catião revelou que os catiões com base imidazólica exibem grandes estabilidades térmicas (Ragonese, *et al.*, 2012). Outra classe de fases estacionárias que têm merecido muita atenção são as fases estacionárias com base fosfônio, desenvolvidas pela primeira vez por Poole e colaboradores, e avaliadas como fases estacionárias para GC, demonstrando grande estabilidade térmica (Ragonese, *et al.*, 2012).

Tabela 1.1. Características principais das colunas de líquidos iônicos SLB™-IL utilizadas neste trabalho.

Líquido iónico	Temp. máxima (°C)	Observações
<p>IL-59 1,12-Di(tripropilfosfonio)dodecane bis(trifluorometilsulfonyl)imida</p> 	300	Considerada semelhante às colunas de polietilenoglicol (PEG) – (designadas comercialmente por WAX)
<p>IL-76 Tri(tripropilfosfoniohexanamido)trietilamina bis(trifluorometilsulfonyl)imida</p> 	270	Coluna de polaridade elevada. Diferenças de selectividade mesmo quando comparada com colunas com os mesmos valores de polaridade.
<p>IL-111 1,5-Di(2,3-dimetilimidazolio)pentano bis(trifluorometilsulfonyl)imida</p> 	270	Coluna de líquidos iónicos extremamente polar

Desde 2008, várias colunas cromatográficas contendo várias fases estacionárias de líquidos iónicos com diferentes polaridades foram introduzidas no mercado pela Supelco Sigma Aldrich Inc (Tabela 1.1.). As colunas são comercializadas com o nome SLBTM-IL seguidas pelos números de 59 a 111. A polaridade destas colunas, determinada através da classificação de McReynolds, aumenta com o aumento do número da coluna, sendo a SLBTM-IL59 embora polar, a coluna menos polar de líquidos iónicos (com uma polaridade semelhante a uma coluna de polietilenoglicol, PEG) e a SLBTM-IL111 a mais polar.

A coluna IL-59 é também utilizada na análise de compostos apolares, visto que um estudo verificou que os índices de retenção obtidos usando n-alcanos, eram similares aos das fases estacionárias apolares (Ragonese, *et al.*, 2011). A capacidade selectiva desta fase estacionária é explicada pela dualidade da natureza dos líquidos iónicos, já acima referida, que confere às fases estacionárias polares a capacidade de separarem não só moléculas polares mas também de se poderem comportar como fases estacionárias apolares na separação de moléculas apolares (Tan, *et al.*, 2012). Relativamente à coluna IL-111, esta é considerada como extremamente polar, sendo esta polaridade maior do que a coluna cromatográfica TCEP (1,2,3-tris(2-cianoetoxi)propano), uma fase estacionária com polaridade elevada (Sanchez-Prado, *et al.*, 2012).

1.8.2.2. Microextração em fase sólida (SPME)

A microextração em fase sólida, SPME (solid-phase microextraction), é uma técnica de extração relativamente recente e parece ser uma alternativa válida aos métodos tradicionais para a preparação de amostra e na extração de compostos orgânicos, porque é um método em que o tempo de extração é curto e não necessita da utilização de solventes. Este método desenvolvido por Arthur e Pawliszyn em 1990 (Arthur & Pawliszyn, 1990) consiste numa fibra de sílica fundida, revestida por uma fase estacionária polimérica que pode ser introduzida numa amostra gasosa ou líquida (Górecki & Pawliszyn, 1997). A extração de uma matriz aquosa com a fibra de SPME directamente exposta é usualmente utilizada para a extração de compostos semivoláteis (Eisert & Pawliszyn, 1997). A amostragem na SPME pode ser feita ainda do *headspace* sobre amostras líquidas ou sólidas (Górecki & Pawliszyn, 1997).

Devido à sua fragilidade a fibra de SPME encontra-se montada numa espécie de seringa para a sua protecção (Xie, *et al.*, 2007) (Fig 1.19.). A fase estacionária constituinte da fibra pode ser um líquido com grande viscosidade (por exemplo, polidimetilsiloxano, PDMS) ou um sólido poroso (Górecki & Pawliszyn, 1997). Este método de extração encontra-se dependente da composição química das fibras. A maior parte das fases de SPME para GC adsorvem solutos de uma maneira relacionada com o seu comportamento como fases estacionárias de GC: as fases polares, como aquelas que contêm poliéteres ou acrilatos vão aumentar adsorção dos constituintes polares e discriminam as moléculas não polares. As camadas adsorptivas constituídas por carbono activo, por

exemplo, retêm sobretudo componentes voláteis, mais fortemente do que as fases constituídas por de dimetilsilicones não polares (Hinshaw, 2003).

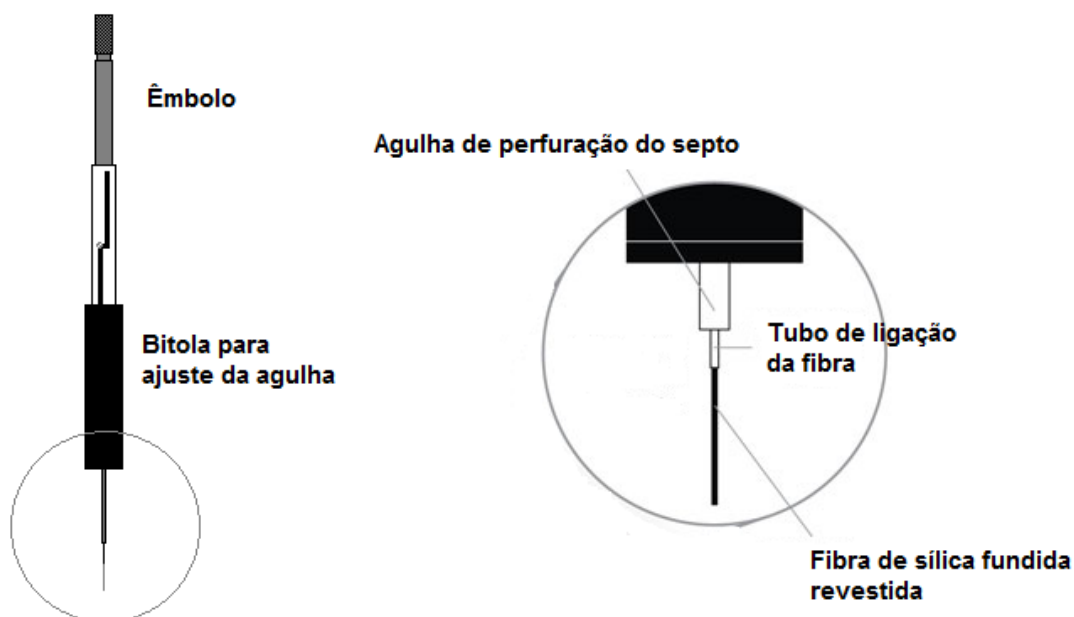


Figura 1.19. Representação de um dispositivo de extração de SPME.

O método de microextração em fase sólida baseia-se no princípio de partição (Zhang & Pawliszyn, 1993), envolvendo dois processos: a partição dos analitos entre o revestimento da fibra e a amostra até ser atingido o equilíbrio no sistema e a desadsorção através de temperatura dos analitos no cromatografo gasoso (Arthur & Pawliszyn, 1990; Zhang & Pawliszyn, 1993; Ibáñez, *et al.*, 1998; Giordano, *et al.*, 2003). A quantidade extraída sobre estas condições é dependente do coeficiente de partição entre a amostra e o revestimento (Górecki & Pawliszyn, 1997). A partição entre a amostra e o revestimento da fibra é comandado pelo coeficiente de partição, que também pode ser denominado por constante de distribuição. Num sistema de duas fases (amostra e revestimento da fibra) em equilíbrio, a quantidade inicial do analito presente na amostra é distribuída entre a amostra e o revestimento da fibra de SPME. No caso das amostras líquidas o balanço de massas é aplicado só ao sistema sem *headspace* (Górecki & Pawliszyn, 1997). No caso de um sistema de três fases (amostra líquida-*headspace*-revestimento da fibra) a presença de um *headspace* gasoso sobre a amostra faz com que o soluto sofra partição para o *headspace* em competição com o processo de extração da SPME (Hinshaw, 2003).

A alteração de certas condições podem otimizar este tipo de extração, por exemplo: a agitação das amostras durante a adsorção pode reduzir os tempos de extração visto que aumenta a difusão dos analitos para o revestimento das fibras. Na SPME por *headspace*, a transferência de massa da fase aquosa para o *headspace* pode ser feita mais rapidamente pela agitação da fase

aquosa (King, *et al.*, 2003; Hinshaw, 2003). A adição de sal ou ajuste do pH também podem alterar os rendimentos da SPME. A adição de sal aumenta a eficiência da extracção para alguns analitos, especialmente compostos polares e voláteis, no entanto, não é necessário para analitos com constantes de distribuição elevadas. Os compostos ácidos e os básicos são extraídos de forma mais efectiva em condições ácidas ou alcalinas, respectivamente. Uma combinação de sal com modificação do pH aumenta sempre a extracção de analitos do *headspace* (King, *et al.*, 2003). A temperatura é outro dos factores que podem alterar o rendimento deste método, no entanto, visto que o passo de desadsorção é exotérmico, o aumento da temperatura pode levar à redução da constante de distribuição, tendo isto em conta, uma temperatura óptima tem que ser identificada (King, *et al.*, 2003).

Embora, inicialmente este método tenha sido usado em associação com GC, a sua utilização foi alargada para a LC e a cromatografia de fluido supercrítica (Górecki & Pawliszyn, 1997; Hinshaw, 2003). A SPME permite a quantificação de um número alargado de moléculas com limites de detecção baixos e uma boa linearidade ao longo de uma gama dinâmica de concentrações (Boutou & Chatonnet, 2007), e tem sido utilizada em muitas aplicações como na análise de agentes químicos na área farmacêutica, pesticidas em alimentos, poluentes ambientais em amostras de água, amins alifáticas voláteis no ar e herbicidas em amostras aquosas (Hinshaw, 2003, Cavalli, *et al.*, 2004). Esta técnica tem sido também muito utilizada na análise de aromas de alimentos, como frutos (Song, *et al.*, 1997; Ibáñez, *et al.*, 1998), café (Yang & Peppard, 1994), sumo de fruta (Rega, *et al.*, 2003), vinho (Bonino, *et al.*, 2003), azeite (Cavalli, *et al.*, 2004), chá (Wang, *et al.*, 2008), queijo (Frank, *et al.*, 2004), leite (Mounchili, *et al.*, 2005) e na análise e quantificação de compostos resultantes da reacção de Maillard, nomeadamente furfurais em várias matrizes alimentares (Giordano, *et al.*, 2003; Gaspar & Lopes, 2009).

Embora a SPME seja um método de extracção mais amigável ao ambiente, apresentando tempos de extracção muito curtos, tem também algumas desvantagens, este processo continua a ser monetariamente dispendioso e as fibras possuem um tempo de vida limitado (Lu, *et al.*, 2010).

1.8.2.3. Extracção líquido-líquido (LLE)

A extracção líquido-líquido (LLE), ou a extracção por solvente, é uma das mais antigas e utilizadas técnicas na preparação de amostra para a análise qualitativa e quantitativa, particularmente para a extracção de compostos orgânicos de matrizes aquosas. Esta técnica baseia-se na solubilidade relativa dos analitos e envolve a distribuição dos componentes da amostra entre duas fases líquidas imiscíveis. Na sua forma mais clássica consiste na utilização de uma ampola de decantação e realiza-se através da agitação da mistura e a posterior separação das duas fases líquidas. O procedimento é realizado manualmente recorrendo desta forma a passos repetitivos de separação de fases (Pawliszyn, 2002).

Este método extracção trata-se de um processo moroso e rotineiro de grande consumo de solventes orgânicos tóxicos e de produção de grandes quantidades de resíduos orgânicos. Além disso, devido à baixa seletividade da LLE, pode ser necessário realizar um passo adicional de limpeza e/ou concentração do extracto antes da análise instrumental, sobretudo para a determinação de compostos presentes em baixas concentrações (Lu, *et al.*, 2010).

2. Materiais e Métodos

2.1. Material vegetal

Nos vários ensaios realizados utilizou-se a batata doce (*Ipomoea batatas*) da variedade Lira, cultivada na região de Aljezur (Indicação Geográfica Protegida) (European Union, 2008) e fornecida pela Associação de Produtores de Batata Doce de Aljezur.

2.2. Batata doce em hidroponia

Colocaram-se 6 batatas doces da variedade Lira a crescer em água da torneira em gobelés de 2500 mL. A água da torneira foi trocada todas as semanas, e algumas das águas guardadas em frascos de vidro e congeladas. Este procedimento que coincidiu com o crescimento e senescência da planta decorreu ao longo de 2 meses.

2.2.1. Análise da componente volátil das plantas de batata doce em hidroponia

Os compostos voláteis foram isolados da parte aérea da planta e da raiz tuberosa, por hidrodestilação, efectuada durante 3h num aparelho do tipo Clevenger. A componente volátil foi isolada com uma velocidade de destilação de 3 mL/min e, sempre que necessário, concentrada, à temperatura ambiente, num evaporador rotativo (Rotary Evaporator RE-51 Water Bath BM-51 Yamato), sendo, posteriormente concentrada a um volume mínimo em vial, sob fluxo de azoto. As amostras da componente volátil foram armazenadas a -20°C até análise.

2.2.1.1. Condições cromatográficas

Na análise por GC-MS utilizou-se um Autosystem XL equipado com uma coluna de sílica fundida DB-1 (30mx0,25mm d.i., d.f. 0,25µm; J & W Scientific Inc.) ligado a um Perkin-Elmer Turbomass (versão de programa 4.1). A temperatura do forno foi programada de 45°C a 175°C, com incrementos de 3°C/min, e subsequentemente a 15°C/min até 300°C. A temperatura foi mantida durante 10 min quando atingidos os 300°C. A linha de transferência foi programada para a temperatura de 280°C e a fonte iónica para uma temperatura de 220°C. O injector encontrava-se programado para a temperatura de 290°C. Como gás de arrastamento foi utilizado o hélio, ajustado para uma velocidade linear de 30cm/s, sendo a relação de repartição de fluxo, 1:40, a energia de ionização, 70eV, a corrente de ionização, 60µA; gama de massas, 40-300 amu e o tempo de varrimento de 1s.

A identidade dos compostos foi determinada por comparação dos seus índices de retenção e espectros de massa, com os de padrões comerciais e compostos de referência presentes em óleos existentes no laboratório e por comparação com uma biblioteca de espectros de massa existente no laboratório do Centro de Biotecnologia Vegetal da Faculdade de Ciências de Universidade de Lisboa.

2.3. Culturas *in vitro*

2.3.1. Meios de cultura

Foram utilizados quatro meios de cultura, com diferentes composições, no desenvolvimento das culturas *in vitro* deste trabalho (Tabela 2.1.). O meio SH (Schenk & Hildebrandt 1972), o meio MS (Murashige & Skoog 1962) e o meio White (Said & Murashige, 1979) foram adquiridos à Duchefa Biochemie B.V., e preparados a partir de soluções stock. O meio MSR (modified Strullu Romand) (Cranenbrouck *et al.* 2005) foi preparado no laboratório segundo Cranenbrouck *et al.* (2005).

Tabela 2.1.- Composição dos meios de cultura utilizados nas culturas *in vitro*

Composição	Concentração (mg.l ⁻¹)			
	SH	MS	White	MSR
Macronutrientes				
CaCl ₂	151,00	332,02	-	-
Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	-	-	208,47	359
KNO ₃	2500,00	1900,00	80,00	76
MgSO ₄	195,05	180,54	351,60	(MgSO ₄ .7H ₂ O) 739
(NH ₄)H ₂ PO ₄	300,00	-	-	-
NH ₄ NO ₃	1650,00	-	-	-
KCl	-	-	65,00	65
KH ₂ PO ₄	-	170,00	-	4,1
NaH ₂ PO ₄	-	-	16,80	-
Micronutrientes				
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,10	0,025	-	-
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,20	0,025	0,001	0,022
FeSO ₄ .7H ₂ O	-	-	3,47	-
FeNaEDTA	19,80	36,70	-	8,00
H ₃ BO ₃	5,00	6,20	1,50	0,555
KI	1,00	0,83	0,75	-
MnSO ₄ .H ₂ O	10,00	16,90	5,31	0,558
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,10	0,25	-	0,002
Na ₂ SO ₄	-	-	200	-
MoO ₃	-	-	0,0001	-
ZnSO ₄ .7H ₂ O	1,00	8,60	2,67	0,084
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ .4H ₂ O	-	-	-	0,034
Vitaminas				
Mio-inositol	1000,00	100,00	100,00	-
Glicina	-	2,00	2,00	-
Pantotenato Ca	-	-	-	0,900
Biotina	-	-	-	0,0009
Ácido nicotínico	5,00	0,50	0,50	1
Piridoxina HCl	0,50	0,50	0,50	0,9
Tiamina HCl	5,00	0,10	0,10	1
Cianocobalamina	-	-	-	0,4
Sacarose	30000	30000	20000	10000
pH	5,7	5,7	5,7	5,5

O pH dos meios SH, MS e White foram ajustados a 5,7 e o do meio MSR a 5,5 antes da esterilização. Ao meio sólido foi adicionado 8g/L de agar ou 5g/L de *Phytigel* de acordo com o meio gelificante utilizado. A esterilização dos meios realizou-se por autoclavagem, a 120°C durante 25min.

2.3.2. Raízes excisadas de batata doce

2.3.2.1. Preparação do Material Vegetal

As raízes de batata doce crescidas em água da torneira a partir da raiz tuberculosa em hidroponia, foram cortadas com um bisturi estéril, colocadas em água com detergente e deixadas nesta solução durante 2min. Em seguida, colocaram-se as raízes excisadas numa solução aquosa de etanol (96%) onde permaneceram durante o mesmo tempo. Por fim as raízes foram mergulhadas numa solução aquosa de lixívia concentrada, durante 5min. Em ambiente estéril as raízes foram passadas por água destilada esterilizada antes de colocadas em meio de cultura.

2.3.2.2. Condições de cultura

As raízes excisadas de batata doce foram mantidas em Erlenmeyers com 100 mL meio White líquido e em placas de Petri com meio White sólido, em escuridão permanente, a 24°C, sob agitação (em meio líquido), numa agitadora orbital Pilot-Shake RC-6-U (Adolf Kühner AG, Suíça) a 80r.p.m..

2.3.3. Micropropagação

2.3.3.1. Preparação do Material Vegetal

Cortaram-se 2 ramos da planta de batata doce em crescimento em água. As folhas foram depois retiradas e dividiram-se os caules em pedaços mais pequenos (4-5 cm) tendo em conta a localização das gemas axilares. Estes foram em seguida lavados com detergente e água da torneira e colocados numa solução aquosa de lixívia (70%) durante cerca de 30 min. Na câmara de fluxo laminar estes pedaços de caule foram passados por água estéril e com o auxílio de um bisturi cortadas as suas extremidades.

2.3.3.2. Condições de cultura

Após o processo de esterilização, colocaram-se os explantes em tubos com meio MS sólido com os fitoreguladores BAP (0,5mg/L) e IBA (0,1mg/L), previamente preparado. Depois de 2 repicagens em tubos, os explantes foram passados para contentores (8 explantes por contentor) contendo meio MS com fitoreguladores (BAP e IBA), meio MS e meio MSR. Foram também colocados explantes em

cerca de 100mL meio líquido MS num erlenmeyer de 500mL. As culturas foram mantidas a 24°C, sob condições de iluminação de luz branca com lâmpadas Philips TLD 36W/84, sob fotoperíodo de 16h de luz. As repicagens foram realizadas uma vez por mês.

2.3.4. Raízes transgênicas

2.3.4.1. Preparação de *Agrobacterium rhizogenes*

Duas estirpes de *Agrobacterium rhizogenes* (A4 e Biovar) foram inoculadas em duas caixas de Petri com 30ml de meio MYB sólido (1g de agar estéril por 30mL) cada. Cerca de 10µL de cada estirpe foi colocada sobre o meio de cultura e realizou-se o seu espalhamento com uma ansa de inoculação. As estirpes encontravam-se congeladas a -80°C e a sua inoculação foi realizada antes do seu descongelamento completo. As duas caixas de Petri foram colocadas numa câmara de cultura a 28°C durante dois dias, o período suficiente para atingir a fase exponencial do crescimento da *Agrobacterium*.

Passados dois dias, com o auxílio de uma ansa de inoculação realizou-se a passagem das duas estirpes (A4 pRiA4::70GUS e Biovar) das respectivas caixas de Petri para dois erlenmeyers estéreis com 20 mL de meio de cultura MYB líquido, sendo recolhidas as partes mais jovens das colónias de cada uma das estirpes. Os dois erlenmeyers foram colocados em agitação numa câmara de cultura (28°C a 90rpm) durante uma noite. No dia seguinte foi realizada a diluição das duas culturas crescidas durante a noite em meio SH líquido (diluição de 1:10), visto ser este o meio de cultura utilizado no crescimento das raízes transgênicas. As soluções diluídas foram utilizadas na infecção do material vegetal.

2.3.4.2. Preparação do Material Vegetal

Realizou-se a desinfecção do material vegetal, passando as raízes tuberculosas de batata doce com pele por água da torneira corrente e detergente. Em seguida, colocou-se a batata doce num recipiente com água da torneira e lixívia durante 30 min. Em ambiente estéril a batata doce foi retirada do recipiente e passada várias vezes por água estéril.

2.3.4.3. Infecção do material vegetal com *Agrobacterium rhizogenes*

Em ambiente estéril, realizou-se o corte transversal da raiz tuberculosa de batata doce com um bisturi estéril em pedaços cilíndricos que foram cortados em seguida em pedaços mais pequenos (3-4cm). Com o objectivo de assegurar a esterilidade do material vegetal, depois de retirada a pele, mergulhou-se o pedaço/explante em álcool e este foi passado à chama. Com o auxílio do bisturi

cortaram-se as partes flamejadas. Assegurada a sua esterilização, estes pedaços de batata foram cortados em pedaços de cerca de 5 mm de espessura longitudinalmente e transversalmente de forma a abranger o córtex e o cilindro vascular. Os vários pedaços foram feridos com o bisturi previamente molhado nas soluções diluídas das estirpes de *Agrobacterium* e foram colocados em meio SH sólido.

Dois dias após a infecção do material vegetal, este foi repicado para meio SH sólido suplementado com os antibióticos carbenicilina (150mg/L) e cefotaxima (150mg/L), de modo a eliminar gradualmente a presença de *Agrobacterium*. Com o objectivo de limpar o excesso de bactéria visível no material vegetal, os pedaços infectados foram passados previamente por papel de filtro estéril. No caso da estirpe Biovar, foi necessária a lavagem do material vegetal infectado com água estéril e antibiótico diluído em água. As repicagens realizaram-se uma vez por semana, no entanto, o tempo entre repicagens foi reduzido quando se verificou um maior crescimento bacteriano.

Após o crescimento das primeiras raízes transgénicas, procedeu-se ao seu corte em ambiente estéril e à sua passagem para meio SH sólido e líquido, em erlenmeyers de 250 mL e 500 mL, com 100mL e 200mL de meio de cultura respectivamente. As culturas de raízes transgénicas foram mantidas em meio em escuridão permanente, a 24°C, sob agitação (em meio líquido), numa agitadora orbital Pilot-Shake RC-6-U (Adolf Kühner AG, Suíça) a 80r.p.m., e sujeitas a subculturas periódicas, com intervalos de 3 semanas. Mais tarde, o meio de cultura MSR (Strullu Romand Modifié) também foi utilizado para o crescimento de raízes transgénicas de batata doce.

2.3.5. Inoculação de fungos endomicorrízicos em raízes transgénicas de batata doce e cenoura

Os fungos *Glomus clarum* (*Rhizophagus clarus* (T.H. Nicolson & N.C. Schenck) C. Walker & A. Schübler, nrMUCL:46238) e *Glomus intraradices* (*Rhizophagus intraradices* (N.C. Schenck & G.S. Sm.) C. Walker & Schuessler), foram adquiridos à *Glomeromycota In vitro Collection* (GINCO) da Micoteca da Universidade Católica de Louvain (BCCMTM/MUCL - Bélgica). Estas espécies de fungos endomicorrízicos foram disponibilizados em vials de 2mL contendo esporos e hifas embebidos em meio de cultura (Figura 2.1.). A quantidade de esporos é variável de acordo com a espécie, no entanto, os esporos disponibilizados permitiram a iniciação de 3 a 5 novas culturas *in vitro*. As raízes transgénicas de cenoura (*Daucus carota*) foram também adquiridas à GINCO e disponibilizadas em caixas de Petri em meio MSR sólido.

Três raízes transgénicas de batata doce com cerca de 4-6 cm (com cerca de 6 raízes secundárias), brancas, saudáveis, com cerca de 2 a 3 semanas de cultura foram colocadas numa caixa de Petri com meio de cultura MSR sólido. Removeu-se um disco do vial com uma ansa de inoculação, assegurando que pelo menos 5 esporos foram colocados na placa de Petri (Figura 2.1.).

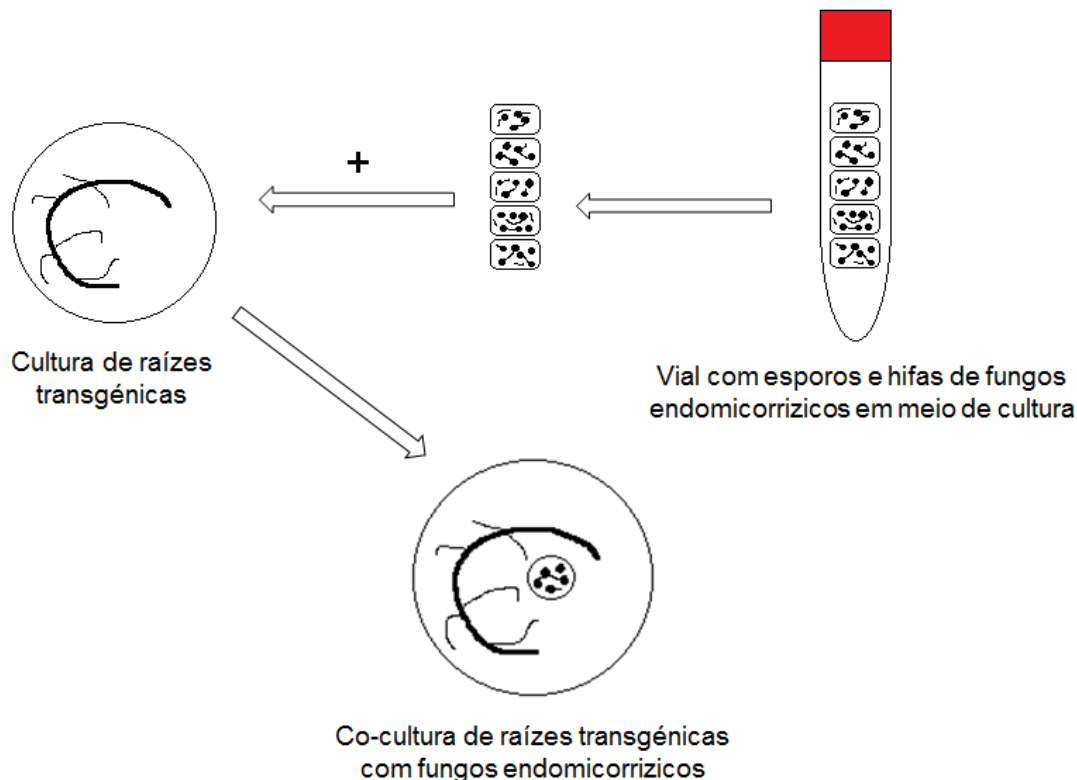


Figura 2.1. Procedimento para implementação de co-culturas de raízes transgênicas com fungos endomicorrízicos.

Colocou-se o disco na proximidade da raiz (cerca de 6mm), se possível de uma raiz secundária, de modo a favorecer a associação. A associação geralmente ocorre perto do ápice de crescimento onde a parede celular é mais fina e mais facilmente penetrável. Selou-se a placa de Petri com película aderente e incubou-se a caixa de Petri numa posição invertida no escuro a 27°C. Realizou-se o mesmo procedimento para as raízes transgênicas de cenoura.

A análise morfológica das culturas de fungos endomicorrízicos com raízes transgênicas foi realizada à lupa (Highlight 2000 Olympus Europe) e em microscópio invertido (Diaphot, Nikon, Japan).

2.4. Extracção de exsudados das raízes transgênicas de batata doce

A extracção dos exsudados das raízes transgênicas de batata doce e cenoura foi realizada ao meio de cultura SH e MSR líquido de raízes com cerca de 15 dias de crescimento (Figura 2.2.). O peso das raízes transgênicas neste momento foi de cerca de 5g para o meio de cultura SH líquido e de 1g para o meio de cultura MSR. Também foi realizada a extracção dos exsudados das raízes não transformadas, de batata doce, crescidas em água da torneira.

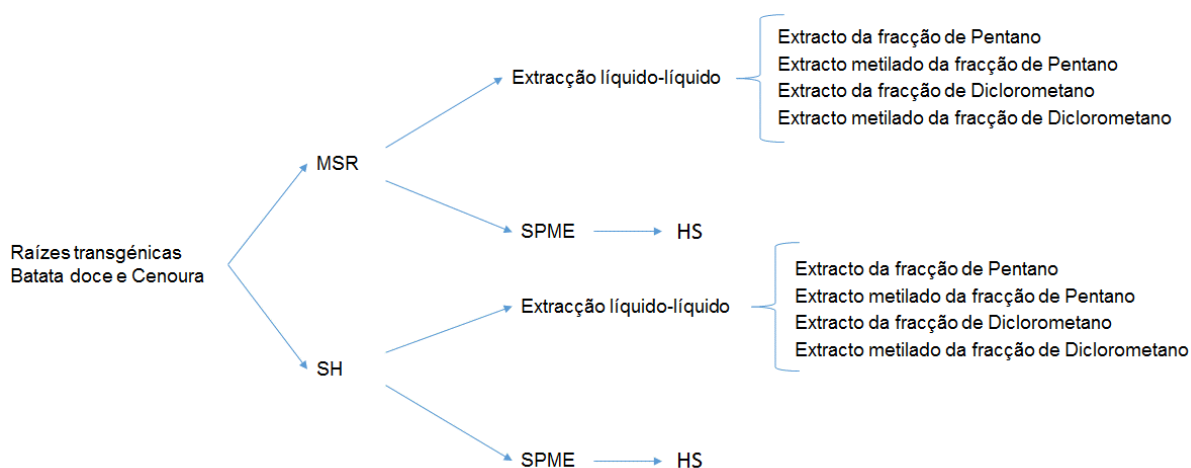


Figura 2.2. Diagrama das extracções realizadas aos meios líquidos MSR e SH de crescimento das raízes transgénicas de batata doce e cenoura.

2.4.1. Extracção líquido-líquido (LLE)

A extracção líquido-líquido realizou-se ao meio de cultura líquido SH e MSR de crescimento de raízes transgénicas de batata doce e de cenoura. Foram utilizados os solventes pentano e diclorometano na extracção (Sigma-Aldrich, $\geq 99,9\%$ de pureza).

Cada amostra (100mL) foi previamente filtrada, de modo a separar restos de raízes contidas no meio e foi submetida a extracção com 100mL de pentano e em seguida com 100mL de diclorometano. Os extractos foram concentrados, num evaporador rotativo (Rotary Evaporator R-114 Water Bath B-480 Büchi), sendo, posteriormente concentrados a um volume mínimo em vial, sob corrente de azoto. Uma parte de cada um dos extractos de cada amostra foi colocada num vial de derivatização e derivatizada por metilação com uma solução etérea de diazometano (CH_2N_2). O excesso de diazometano foi eliminado sob corrente de azoto.

2.4.2. Microextracção em fase sólida – SPME

Na extracção dos exudados das raízes transgénicas de batata doce e cenoura por SPME utilizou-se a fibra DVB/CAR/PDMS (50 μm), adquirida à Supelco (Bellefonte, PA, USA). A fibra foi inicialmente condicionada pela inserção no injector do GC-FID durante 1 hora a 260°C, de modo a remover os contaminantes e estabilizar a fase polimérica. Este processo foi repetido antes de todos os ensaios para evitar problemas de contaminação. As amostras foram previamente filtradas para evitar a existência de raízes no meio de cultura a analisar. Posteriormente foram colocados 25mL de meio num vial de 50mL, sendo este fechado com um septo de silicone com uma face de PTFE. A extracção realizou-se através de HS-SPME durante 2 horas, utilizando-se agitação magnética contínua (250rpm).

2.4.3. Condições cromatográficas

Todas as análises foram realizadas por GC-MS, sendo utilizada uma coluna capilar de sílica fundida SLBTM-5ms (Supelco; 60 m×0.25 mm d.i., espessura de filme 0.25 µm) instalada no cromatografo Agilent 6850 acoplado a um 5975C MSD. A temperatura do forno foi programada de 35°C, durante 5min, a 270°C, com incrementos de 4°C/min. A temperatura final do forno foi mantida durante 20 min. A temperatura do injector foi de 270°C, a temperatura da fonte foi programada para 250°C e a temperatura da interface para 280°C. Como gás de arrastamento foi utilizado o hélio, ajustado para um fluxo de 1,0ml/min, sendo a energia de ionização, 70eV, a corrente de ionização, 60µA; gama de massas, 35-550amu (unidade de massa atómica) e o tempo de varrimento de 0,9s. Utilizou-se o modo de injeção splitless (2 minutos) com posterior abertura de válvula com razão de split de 1/20. O modo de aquisição foi o full scan.

A identidade dos compostos foi determinada por comparação dos seus espectros de massa com a biblioteca de espectros de massa NIST, tendo em consideração a correlação espectral reversa e directa de ambos os espectros.

2.5. Análise de compostos da reacção de Maillard

2.5.1. Solventes e padrões utilizados

Os compostos padrão piridina, 3-furaldeído, 2-furaldeído, benzaldeído, 2-acetilfurano, 5-metil-2-furfural, álcool furfurílico (2-furfurilmetanol), fenilacetaldéido, 3-acetil-2,5-dimetilfurano e 5-hidroximetilfurfural e o solvente utilizado na preparação das soluções padrão, diclorometano, foram adquiridos à Sigma-Aldrich (Alemanha). Todos os solventes e padrões utilizados têm um grau de pureza superior a 99%.

2.5.2. Extracção dos compostos de Maillard presentes na batata doce de Aljezur

Tendo em consideração um estudo anterior relativo à análise de furfurais efectuada utilizando a micro-extracção em fase sólida em *headspace* e por imersão directa, HS-SPME e DI-SPME, (Gaspar e Lopes 2009) foi utilizada a fibra DVB/CAR/PDMS (50µm), adquirida à Supelco (Bellefonte, PA, USA), na extracção dos compostos de Maillard das várias amostras de batata doce. A fibra foi inicialmente condicionada, sendo para tal inserida no injector do GC-FID durante 1 hora a 260°C, de modo a remover os contaminantes e estabilizar a fase polimérica. Este processo foi repetido antes de todos os ensaios para evitar problemas de contaminação.

A batata doce foi confeccionada de três modos diferentes: assada numa coloche (45min – 200°C), cozida em água a ferver (20min - +/-100°C), e cozinhada num micro-ondas (Kunft, 700W) (10min - 700W). Amostras de batata doce crua também foram analisadas.

Na análise por HS-SPME (*headspace*), 1Kg de cada uma das amostras de batata doce, confeccionada pelos diferentes métodos, foi colocado em pedaços com dimensões semelhantes num erlenmeyer de 2000mL. O erlenmeyer foi fechado com um adaptador de vidro roscado e esmerilado e um septo de silicone com uma face de PTFE (politetrafluoretileno). No procedimento para DI-SPME (imersão directa), 50g de batata doce proveniente de cada um dos métodos de confecção e 50g de batata crua foram colocados em erlenmeyers de 200mL com 100mL de água ultrapura (Mili-Q) e uma barra magnética para agitação contínua (500 rpm) durante cerca de 2h. No caso da batata crua, esta foi anteriormente picada com auxílio de uma picadora, de modo a obter uma mistura mais homogénea. As fracções aquosas obtidas foram depois filtradas com uma gaze. Para a análise do extracto, 50 mL das amostras foram colocados num vial de 50mL. O vial foi fechado com um septo de silicone com uma face de PTFE (politetrafluoretileno).

Tanto no estudo por HS-SPME como por DI-SPME foram realizadas cerca de 8 análises de amostras diferentes para cada método de confecção culinária, de modo a verificar e confirmar a repetibilidade e reprodutibilidade dos resultados.

Nos dois tipos de análise das amostras de batata doce, bem como nos ensaios para estudo da quantificação utilizando soluções padrão, a agulha do holder foi inserida através do septo e a fibra exposta ao espaço de cabeça (*headspace*, HS-SPME) ou imersa directamente na amostra (DI-SPME). Nos dois casos a extracção foi de 2 horas, utilizando-se agitação magnética contínua (250 rpm) no caso da análise da amostra por imersão directa. Após a extracção, a fibra foi recolhida para dentro da agulha do holder, removida do frasco e imediatamente introduzida no injector do cromatógrafo gasoso, GC-FID ou GC-MS, durante 10 min a 240°C para desadsorção térmica dos analitos. Entre cada extracção a fibra foi condicionada durante 10 min a 260°C no injector e foi realizado um branco da fibra.

2.5.3. Condições cromatográficas

Com o objectivo de verificar qual a coluna de líquidos iónicos que melhor se adequaria à separação dos compostos em análise, uma solução da mistura dos vários padrões, de concentração 0,1µl/mL, foi injectada em três colunas de líquidos iónicos com diferentes polaridades, SLBTMIL59 (Supelco; 30 m×0.25 mm d.i., d.f. 0.2 µm), SLBTMIL76 (Supelco; 30 m×0.25 mm d.i., d.f. 0.2 µm), SLBTMIL111 (Supelco; 30 m×0.25 mm d.i., d.f. 0.2 µm). As duas primeiras colunas foram instaladas no cromatógrafo Agilent (Santa Clara, CA, USA) modelo 4890D, equipado com um injector split/splitless e dois detectores de ionização de chama (FID) e a terceira no cromatografo Focus Series Thermo Finnigan.

A análise por micro-extracção em fase sólida associada à cromatografia gasosa com detecção por ionização de chama, SPME-GC-FID, das diferentes amostras de batata doce realizou-se no cromatógrafo Agilent (Santa Clara, CA, USA), modelo 4890D, equipado com um injector split/splitless e dois detectores de ionização de chama (FID). A separação dos compostos de Maillard foi realizada

simultaneamente usando duas colunas cromatográficas diferentes: coluna SupelcoWAXTM10 (Supelco, Bellefonte, USA; 30m x 0.25mm d.i., d.f. 0.25 µm), composta por uma fase estacionária de polietilenoglicol e a coluna de líquidos iónicos SLBTMIL76 (Supelco; 30 m x 0.25 mm d.i., d.f. 0.2 µm), composta por uma fase estacionária de Tri(tripropilfosfoniohexanamido)trietilamina bis(trifluorometilsulfonil)imida. Tanto para a avaliação do comportamento das colunas de líquidos iónicos (IL) como na análise das amostras (reais) de batata doce por HS-SPME-FID e DI-SPME-GC-FID, a temperatura do forno foi programada de 50°C a 240°C, com incrementos de 4°C/min. Nos dois casos a temperatura final do forno foi mantida durante 10 min. Foi utilizado o hidrogénio, como gás de arrastamento, ajustado para um fluxo de 1,2mL/min, a uma pressão de 10psi. O injector e os detectores encontravam-se programados para a temperatura de 240°C. Na injeção de padrões, o injector foi utilizado no modo split numa razão 1/25 e na análise das amostras de batata doce foi utilizado no modo splitless (2min). As análises por cromatografia gasosa associada à espectrometria de massa, GC-MS, foram realizadas em condições cromatográficas idênticas. Para HS-SPME-GC-MS foi utilizada uma coluna capilar de sílica fundida SLBTM-5ms (Supelco; 60 m x 0.25 mm d.i., d.f. 0.25 µm) instalada no cromatografo Agilent 6850 associado a um 5975C MSD. A temperatura da fonte iónica foi 250°C e a temperatura da interface 280°C. Como gás de arrastamento foi utilizado o hélio, ajustado para um fluxo de 1,0mL/min, sendo a energia de ionização, 70eV; a corrente de ionização, 60 µA; gama de massas, 35-550 amu (unidade de massa atómica) e o tempo de varrimento de 0,9s. Na análise por DI-SPME-GC-MS foi utilizada uma coluna capilar de sílica fundida ZB-WAX (Phenomex) (Macclesfield, UK), (60m x 0.32mm d.i., d.f. 0.50µm) instalada no cromatografo TRACE GC associado a um TRACE MS (Finnigan) de quadrupolo. Usou-se o modo de impacto electrónico positivo 70 eV. A interface foi mantida a 220°C e a fonte iónica do espectrómetro de massa a 250 °C. O varrimento de massas usado foi de 40 a 460 amu. O modo de aquisição foi o *full scan* para estes dois últimos aparelhos cromatográficos.

A identidade dos compostos foi determinada por comparação dos seus tempos de retenção e espectros de massa com os de padrões comerciais, obtidos nas mesmas condições analíticas, e ainda por comparação com os espectros de massa constantes da biblioteca de espectros NIST.

2.5.4. Desenvolvimento do método analítico

No desenvolvimento do método analítico, a linearidade da resposta para HS-SPME-GC-FID foi estudada utilizando-se soluções padrão com uma concentração de 0,116 mg/mL para 2-furaldeído, 0,104 mg/mL para benzaldeído, 0,11 mg/mL para 5-metilfurfural, 0,103 mg/ml para fenilacetaldéido, 0,113 mg/ml para álcool furfurílico, 0,109 mg/ml para 2-acetilfurano. Colocaram-se diferentes quantidades destas soluções padrão num erlenmeyer de 2L: 1,16mg, 2,32mg, 4,64mg, 9,28mg, 11,6mg, 13,92mg de 2-furaldeído, de 1,04mg, 2,08mg, 3,12mg, 4,16mg de benzaldeído, 1,107mg, 2,214mg, 3,321mg, 4,428mg de 5-metilfurfural, 1,027mg, 2,054mg, 3,081mg, 4,108mg, 5,135mg de

fenilacetaldeído, 1,132mg, 2,264mg, 3,396mg e 4,528mg de álcool furfurílico e 1,09mg, 2,18mg, 3,27mg e 4,36mg para 2-acetilfurano.

Para DI-SPME-GC-FID a linearidade da resposta foi estudada usando as seguintes quantidades de soluções padrão colocadas num vial de 50mL com 50mL de água Mili-Q: 0,58mg, 1,16mg, 1,45mg de concentração 1,16mg/ml de 2-furaldeído, 2,9mg, 5,8mg, 11,6mg e 14,5mg de concentração 5,8mg/ml da solução padrão 2-furaldeído; 1,107mg, 5,535mg, 11,07mg e 22,14mg de concentração 5,535mg/ml de 5-metilfurfural; 1,132mg, 2,264mg, 3,396mg, 4,528mg de álcool furfurílico e 6mg, 11mg, 20mg, 41mg e 80mg de 5-hidroximetilfurfural.

Na avaliação do efeito de matriz, efectuada através de estudos de recuperação, foram realizadas fortificações com duas soluções de concentrações diferentes de cada um dos compostos para cada um dos métodos de confecção culinária, tendo em conta os teores encontrados.

3. Resultados e Discussão

3.1. Desenvolvimento de culturas *in vitro*

Tendo em conta a capacidade da raiz tuberculosa de batata doce de originar caules e raízes, colocou-se a batata doce em água da torneira como referido no ponto 2.3. dos Materiais e Métodos (Figura 3.1.). A parte aérea resultante foi utilizada para o estudo de micropropagação, enquanto que as raízes para o crescimento *in vitro* de raízes excisadas. Visto que tanto a parte aérea como a raiz tuberculosa são estudadas em relação à sua importância ecológica, foram extraídos os seus voláteis.

A partir da raiz tuberculosa deu-se início ao crescimento de raízes transgênicas.



Figura 3.1. Raízes tuberculosas de batata doce de Aljezur em água para crescimento da parte aérea e raízes.

3.1.1. Propagação vegetativa *in vitro* de batata doce de Aljezur

O desenvolvimento das culturas de batata doce de Aljezur *in vitro* reproduz a propagação vegetativa tradicionalmente realizada nos campos agrícolas. A cultura de tecidos é uma das mais importantes aplicações da biotecnologia moderna na horticultura. As técnicas de micropropagação *in vitro* permitem a rápida produção de elevada qualidade, livre de doenças e material vegetal uniforme em períodos de tempo curtos (El Far & Ashoub, 2003; El Far, 2007; Kapoor, *et al.*, 2008) e as plântulas resultantes *in vitro* podem ser transplantadas para condições *in vivo* para pequenos vasos ou directamente para camas de campo (Lizarraga, *et al.*, 1992). Algumas publicações referem a micropropagação de diferentes variedades de batata doce em diferentes condições de cultura, todas elas mantidas em meio suplementado com fitoreguladores (Jarret & Gawel, 1991; Golmirzaie & Toledo, 1998; El Far, 2007; Alam, *et al.*, 2010).

A propagação vegetativa de plântulas de batata doce de Aljezur realizou-se em primeiro lugar em meio de cultura MS (Murashige & Skoog 1962) com fitoreguladores (0,5mg/L BAP e 0,1mg/L IBA) e em seguida em meio de cultura MS sem fitoreguladores. Observou-se que tanto num caso como no outro, houve crescimento vigoroso da parte aérea das plântulas, verificando-se no entanto, que o crescimento foi maior no meio sem a adição de fitoreguladores. Relativamente ao enraizamento, nos

dois casos não se verificou dificuldade de enraizamento dos explantes. No meio com fitoreguladores observou-se a formação de estruturas calosas e engrossamento das raízes, ao contrário do que se verificou no meio sem fitoreguladores em que as raízes se apresentaram mais finas e houve formação de raízes secundárias (Figura 3.2.).

Apesar de o agar ser o agente de suporte mais utilizado na biotecnologia vegetal, é um agente gelificante convencional que possui algumas desvantagens como um baixo coeficiente de difusão de oxigênio, impossibilitando uma maior circulação dos nutrientes no meio, sendo por vezes um material difícil de manipular aquando da extracção química de compostos presentes nos exudados de raízes. Foi realizada por isso uma segunda experiência em que se colocaram os explantes em meio MS líquido. No entanto, não se verificou a formação de raízes e houve vitrificação ou hiperidricidade das culturas. Este fenómeno consiste numa malformação fisiológica que resulta na excessiva hidratação, baixa lignificação do material vegetal (Kapoor, *et al.*, 2008) e é um problema associado frequentemente às culturas líquidas, em condições de submersão (Ilan, *et al.*, 1995). A literatura refere no entanto que o meio líquido demonstra ter vantagens para um crescimento mais vigoroso quando usado com o arejamento e técnicas de suporte apropriadas (Adelberg, *et al.*, 1997) e utilização de fitoreguladores como as giberelinas (Lizarraga, *et al.*, 1992).

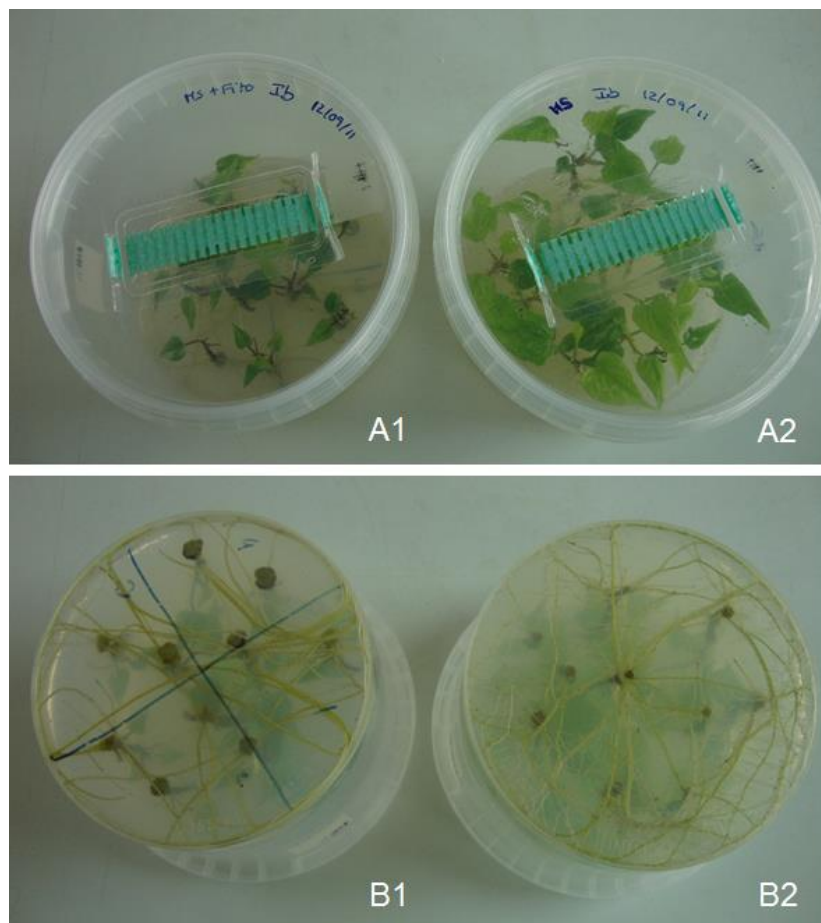


Figura 3.2. Explantes de batata doce em meio MS (Murashige & Skoog 1962) com fitoreguladores (0,5mg/L BAP e 0,1mg/L IBA) (A1 e B1) e meio MS sem fitoreguladores (B1 e B2).

Numa terceira fase realizou-se a propagação vegetativa de rebentos de batata doce em meio MSR (modified Strullu Romand), um meio de cultura menos rico nutritivamente e com menos sacarose (10g/L) do que o meio de cultura MS. Observou-se, como era expectável, um crescimento menos vigoroso dos explantes, devido à baixa concentração de fósforo e azoto, mas apesar de mais pequenas, observou-se a formação de raízes. Verificou-se também que se formaram algumas folhas de cor arroxeadada, o que pode indicar a maior produção de antocianinas presentes na batata doce como resposta ao stress nutricional (Figura 3.3.).

Embora no presente trabalho não tenha sido possível a inoculação dos explantes com fungos micorrízicos, devido à pequena quantidade de fungos que se conseguiu produzir *in vitro*, implementou-se pela primeira vez um processo/metodologia de propagação vegetativa *in vitro* da batata doce de Aljezur, da variedade Lira, que pode vir a ser utilizada na conservação e preservação deste germoplasma vegetal e na possível transplantação para o campo de cultura, permitindo a existência de material vegetal permanentemente disponível para plantação.

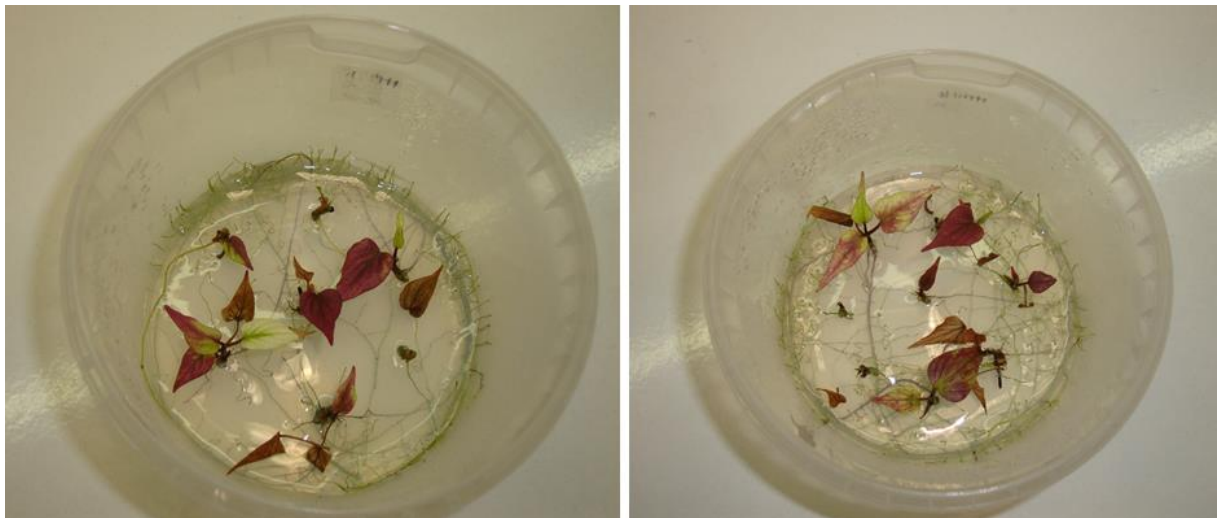


Figura 3.3. Explantes de batata doce em meio MSR (modified Strullu Romand).

3.1.2. Crescimento *in vitro* de raízes excisadas de batata doce

A cultura de raízes excisadas *in vitro* fez-se em meio de cultura White sem fitoreguladores, em analogia com o referido na literatura para a cultura de outras espécies de plantas como o tomate (Said & Murashige, 1979). No entanto, para além dos elevados níveis de contaminação das culturas, o crescimento das raízes excisadas foi praticamente nulo.

3.1.3. Voláteis da parte aérea e dos tubérculos da batata doce

Um dos maiores problemas da cultura da batata doce no Mundo é o gorgulho da batata doce (*Cylas* spp.). Embora não existam registos desta espécie de insecto na Europa, as intercepções desta peste devem ser consideradas devido às importações mundiais de batata doce. O desenvolvimento de variedades resistentes a insectos é visto como um componente viável na manipulação desta e de outras pestes. A análise qualitativa e quantitativa dos voláteis da planta hospedeira (raiz tuberculosa e parte aérea) é uma das abordagens para o sucesso da identificação da resistência nas fontes de germoplasma vegetal (Korada, *et al.*, 2010)

Como já foi referido anteriormente neste trabalho, raramente se detectam problemas fitossanitários na batata doce de Aljezur. De modo a compreender o potencial de resistência desta variedade portuguesa, a composição volátil foi estudada através da fracção resultante da extracção por hidrodestilação (único método de extracção do óleo essencial) das partes aéreas e raízes tuberculosas.

A análise realizada por HRGC-MS demonstrou a existência de diferentes perfis químicos de compostos voláteis das partes aéreas e das raízes tuberculosas, com diferenças qualitativas e quantitativas (Tabela 3.1.). Os sesquiterpenos são os compostos maioritários das partes aéreas (β -cariofileno e germacreno-D), enquanto que os ácidos gordos são os compostos maioritários da componente volátil das raízes, de armazenamento, sendo o ácido hexadecanóico o componente maioritário. O α -Humuleno e o trans- β -farneseno são compostos bioactivos presentes nas duas partes da planta. Verificou-se que o trans-2-nonenal se encontra presente nas raízes tuberculosas, em quantidades vestigiais. Estes compostos foram descritos como repelentes de insectos, tendo o trans-2-nonenal acção insecticida (Wang & Kays, 2002). Por outro lado o monoterpeno nerol foi identificado na composição das raízes tuberculosas. Este composto foi anteriormente descrito na literatura (Wang & Kays, 2002) como um composto atractivo dos insectos. Este estudo preliminar pode contribuir para elucidar o papel dos compostos voláteis da batata doce de Aljezur, na resistência desta variedade contra pestes.

Tabela 3.1. Composição percentual relativa dos componentes voláteis isolados da parte aérea e das raízes tuberculosas de batata doce de Aljezur, da variedade Lira. v - vestigial (<0,05%); IR – índices de retenção relativos aos n-alcenos C₈-C₂₅ na coluna DB1; * - identificação baseada apenas no espectro de massa.

Compostos	IR	Parte aérea	Raízes tuberculosas				
Benzaldeído	927	-	v	α-Humuleno	1447	3,47	0,37
1-Octeno-3-ol	961	-	v	<i>trans</i> -β-Farneseno	1455	1,09	v
Ácido hexanoico	999	-	v	n-Dodecanol	1468	-	1,19
2-Pentil furano	973	-	v	γ-Muroleno	1469	-	v
β-Mirceno	975	-	v	Germacreno D	1474	28,75	0,82
Fenilacetaldéido	1002	-	v	Biciclosesquifelandreno*	1476	0,19	-
2,6,6-Trimetil ciclohexanona	1003	-	v	β-Selineno	1476	-	v
Limoneno	1009	-	v	Valenceno	1484	-	v
Nonanal	1073	v	v	Biclogermacreno	1487	10,23	-
Linalool	1074	-	v	β-Bisaboleno	1495	0,13	-
Geijereno	1121	v	-	β-Curcumeno	1500	0,21	-
2- <i>trans</i> -Nonenal	1124	-	v	δ-Cadineno	1505	0,6	v
n-Nonanol	1151	-	v	<i>trans</i> -γ-Bisaboleno*	1501	0,08	-
α-Terpineol	1159	-	v	Germacreno B	1533	0,73	v
Mirtenol	1168	-	v	<i>trans</i> -Nerolidol	1549	v	-
Decanal	1180	-	v	Ácido dodecanoico	1551	-	v
Nerol	1206	-	v	Óxido de β-Cariofileno	1561	0,19	-
2-Undecanona	1271	-	v	Viridiflorol	1569	0,03	-
Carvacrol	1286	-	v	Anidrooplopanona	1576	v	-
2, <i>trans</i> -4, <i>trans</i> -Decadienal	1286	-	v	<i>trans</i> -epi-Cubenol	1600	v	-
Mirtenil acetate	1290	-	v	<i>trans</i> -Murolol	1616	0,14	-
<i>cis</i> -β-Damascenona	1323	-	v	α-Cadinol	1626	0,27	-
<i>trans</i> -2-Undecenal	1323	-	v	n-Tetradecanol	1659	-	0,24
Ácido decanoico	1350	-	v	Pentadecanal	1688	-	v
δ-Elemeno	1332	0,88	v	Heptadecano	1700	v	-
α-Cubebano	1345	0,13	-	Sulfeto de menta*	1705	v	-
Ciclosativeno	1363	v	-	Ácido tetradecanoico	1734	-	0,17
<i>trans</i> -β-Damascenona	1356	-	v	Octil salicilato	1743	-	v
α-Copaeno	1375	1,9	v	Hexadecanol	1821	v	5,84
β-Elemeno	1388	2,47	v	Ácido hexadecanoico	1908	v	42,69
2-Pentadecanona	1390	-	v	Isopropil palmitato	2064	-	0,5
Cipereno*	1390	0,37	v	n-Octadecanol	2071	0,05	0,31
β-Funebreno	1404	0,37	v	Ácido 9,12-octadecadienoico	2125	-	6,1
β-Cariofileno	1414	37,5	5,38	Fitol acetato 2	2243	0,74	v
β-Copaeno	1426	0,65	-	Tricosano	2300	-	0,99
γ-Elemeno	1430	0,24	-	Tetracosano	2400	-	0,30
<i>trans</i> -α-Bergamoteno	1434	0,14	-	Pentacosano	2500	-	5,48
Geranil acetona	1434	-	v				

3.1.4. Crescimento *in vitro* de raízes transgênicas de batata doce

A cultura de raízes transgênicas possui, como foi anteriormente referido, um grande potencial para o estudo das interações entre os fungos arbusculares e planta hospedeira, podendo ser também um modelo para o estudo dos exudados das raízes. Além disso, podem servir de hospedeiro ao cultivo destes fungos (Nuutila, *et al.*, 1995).

O desenvolvimento de raízes transgênicas de batata doce de Aljezur da variedade Lira foi pela primeira vez realizada neste trabalho. Apesar de se terem utilizado duas estirpes de *Agrobacterium rhizogenes*, A4 e Biovar, e destas terem uma eficiência de infecção semelhante, optou-se por se realizar os ensaios seguintes apenas com a estirpe A4 visto que a contaminação pela bactéria Biovar se revelou difícil de eliminar. Estudos anteriores referem-se a estirpes do tipo agropina como sendo as que traduzem uma maior resposta no desenvolvimento de raízes transgênicas (Otani, *et al.*, 1993; Chandran & Potty, 2008; Chandran & Potty, 2011).

Neste estudo utilizaram-se discos da raiz tuberosa da batata doce como material vegetal a inocular. Segundo a literatura, somente um estudo refere a utilização da raiz tuberosa (Mugnier, 1988), sendo usualmente utilizados cotilédones de batata doce, pecíolos de folhas expandidos, folhas, plantas *in vitro*, hipocótilos e caules (Nishiyama & Yamakawa, 2004; Araujo, *et al.*, 2006; Chandran & Potty, 2008; Chandran & Potty, 2011).

As primeiras raízes transgênicas de batata doce formadas foram observadas cerca de 12 dias depois da infecção com *A. rhizogenes*, estando de acordo com estudos anteriores para a mesma estirpe e planta (Chandran & Potty, 2008). Observou-se que as raízes transgênicas de batata doce colocadas em meio de cultura SH possuem um crescimento vigoroso, são finas e amarelas, ramificadas e com vários pêlos radiculares, apresentando um crescimento geotrópico negativo (Figura 3.4.).

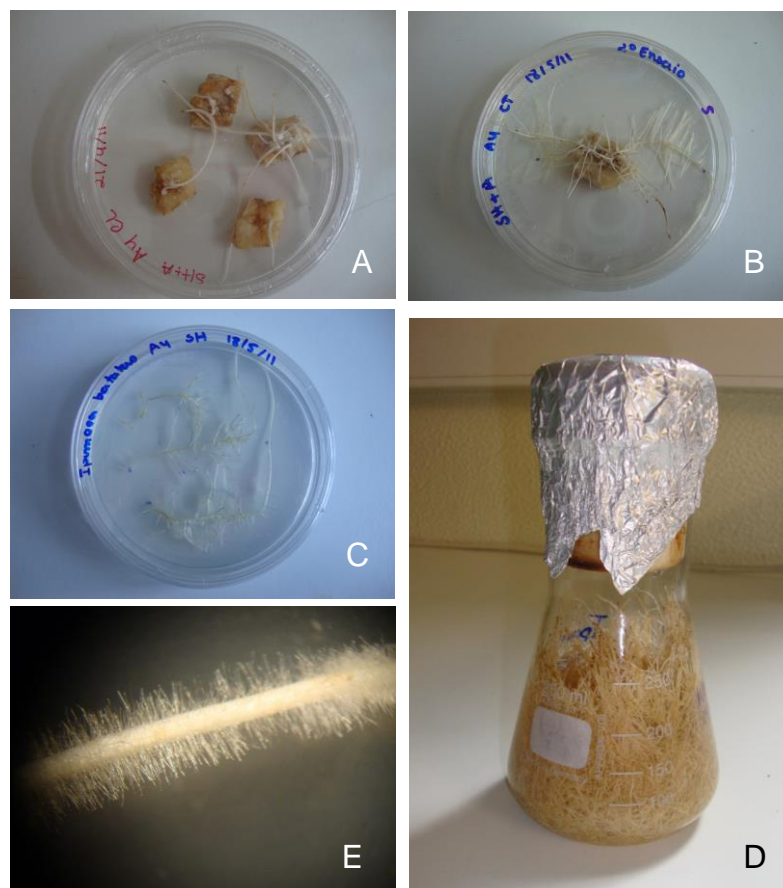


Figura 3.4. Raízes transgênicas da batata doce de Aljezur, variedade Lira. A e B – Formação das primeiras raízes a partir dos discos da raiz tuberculosa da batata doce. C – Primeiras raízes seccionadas dos discos da raiz tuberculosa de batata doce e crescidas em meio SH sólido. E – Pormenor à lupa dos pêlos radiculares das raízes transgênicas de batata doce. D – Raízes transgênicas de batata doce em meio SH líquido.

As raízes transgênicas de batata doce crescidas em meio MSR apresentaram um crescimento lento, uma maior grossura e não se verificou a presença de pêlos radiculares. O crescimento lento e o envelhecimento mais rápido destas raízes, que se identifica pela mudança de cor das mesmas, as raízes amarelas tornam-se acastanhadas, deve-se à disponibilidade reduzida de nutrientes e sacarose. Estes resultados observaram-se tanto para as raízes transgênicas cultivadas em meio líquido como em meio sólido.

As raízes transgênicas de cenoura, adquiridas à *Glomeromycota In vitro Collection* (GINCO) da Micoteca da Universidade Católica de Louvain (Bélgica - BCCM/MUCL), foram também colocadas em meio SH, demonstrando um rápido crescimento e ramificação, e apresentando uma cor semelhante às raízes de batata doce, mas uma maior espessura. No meio MSR líquido observou-se que depois de várias repicagens estas raízes deixam de apresentar ramificação, tornando-se mais finas e de cor acastanhada.

3.1.5. Inoculação de fungos endomicorrízicos em raízes transgênicas de batata doce

A inoculação de fungos endomicorrízicos *Glomus intraradices* e *Glomus clarum* realizou-se através da colocação de hifas e esporos destes fungos em placas de Petri com raízes transgênicas jovens de batata doce e de cenoura (*Daucus carota*) em meio MSR sólido, visto que este é o meio de cultura geralmente utilizado na produção de fungos endomicorrízicos. As raízes transgênicas de cenoura serviram de controlo, visto que estas são usualmente utilizadas no cultivo *in vitro* destes fungos micorrízicos. Segundo o que se encontra referido, os fungos arbusculares do género *Glomus* estão associados a uma micorrização mais eficiente e a um maior aumento da biomassa da batata doce (Gai, *et al.*, 2006). Além disso, o fungo *Glomus intraradices* é uma espécie que se encontra presente nos solos portugueses (Oliveira, *et al.*, 2005). Observou-se que passadas 2 semanas não houve crescimento das hifas do fungo *Glomus intraradices* e as hifas do fungo *Glomus clarum* apresentaram crescimento em algumas placas de Petri. No entanto, o crescimento observado cessou e não se observou infecção da raiz por parte das hifas do fungo *G.clarum*. Colocou-se a hipótese de que o agente gelificante do meio de cultura não fosse o adequado ao crescimento dos fungos, substituindo-se o agar por *Phytigel*, mas esta mudança não se revelou vantajosa, não se verificando diferenças para o estudo realizado com agar.

Em relação à inoculação destes fungos nas placas de Petri com raízes transgênicas de cenoura verificou-se que tanto em agar como em *Phytigel* ocorreu crescimento das hifas, verificando-se crescimento de micélio extraradicular, formação de novos esporos passado 1 mês e acastanhamento das raízes (Figura 3.5 e 3.6.). Este acastanhamento das raízes deve-se à presença de um ácido dicarboxílico, denominado por micorradicina, que se acumula nas raízes colonizadas por fungos arbusculares. Em raízes fortemente colonizadas por *Glomus intraradices* e *Glomus mosseae*, as concentrações deste composto são sempre suficientemente altas para se observar a coloração a olho nu (Walter, *et al.*, 2010). Os esporos formam-se e sofrem maturação com o decorrer do crescimento do micélio, passando de translúcidos para esbranquiçados, amarelos e acastanhados uns meses depois. No entanto, através da observação microscópica não se observou a formação de arbúsculos e vesículas. Pensa-se que a não formação destas estruturas esteja associada à adição de sacarose ao meio de cultura que banha a interface fungo-planta e que pode modificar a bioquímica levando à escassez de arbúsculos e vesículas (Fortin, *et al.*, 2002). A cultura contínua destes fungos em raízes transgênicas de cenoura foi de difícil realização, observando-se uma diminuição da produção de esporos com o aumento de repicagens, sendo por isso impossível ter uma quantidade de fungo suficiente para a extracção dos seus exsudados. Os estudos aos exsudados destes fungos utilizam cerca de 40 milhões de esporos germinados (Maillet, *et al.*, 2011).

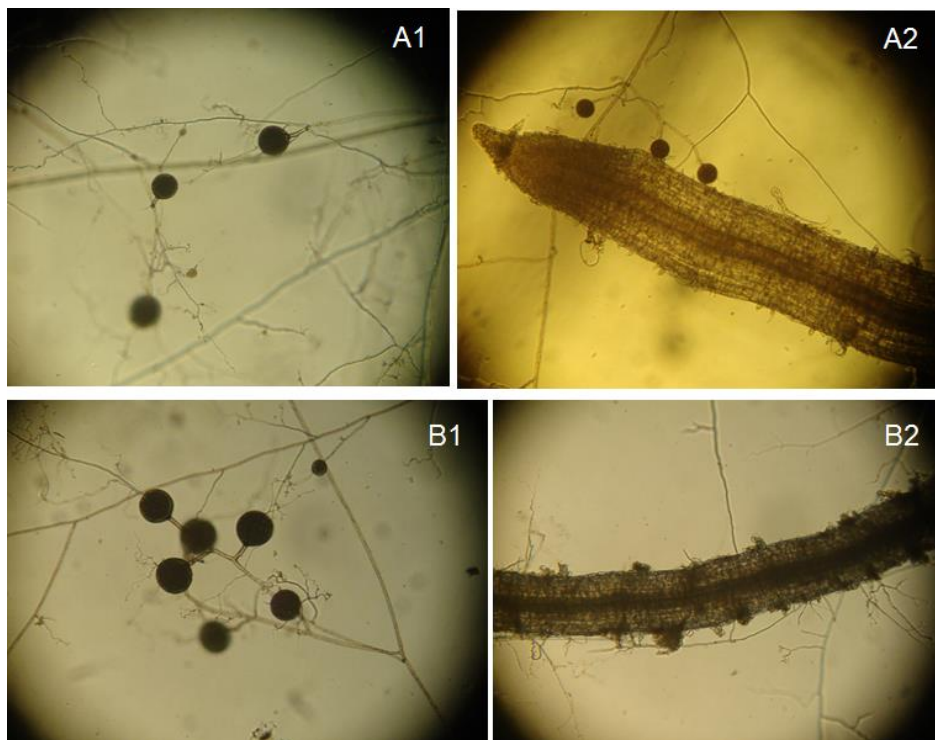


Figura 3.5. Imagem em microscopia de inversão das raízes transgênicas de cenoura (*Daucus carota*) inoculadas com *Glomus clarum* (A1 e A2) e *Glomus intraradices* (B1 e B2).

A ausência de resposta à infecção micorrízica por parte das raízes transgênicas de batata doce, neste estudo pode ser causada pela pobre compatibilidade simbiótica entre os fungos micorrízicos utilizados e a batata doce. O facto da batata doce tolerar níveis de fósforo tão baixos como 0,003 ppm nas soluções de solo, ou seja, da mesma forma concentrações muito baixas de fósforo no meio de cultura, também pode explicar o facto da batata doce não responder à inoculação com fungos micorrízicos (Mulongoy, *et al.*, 1988). Como foi referido anteriormente neste trabalho, diferentes cultivares de batata doce diferem na sua capacidade para se associarem aos fungos micorrízicos. Não é conhecida a associação destas espécies de fungos micorrízicos à batata doce de Aljezur *in vivo* e pela primeira vez neste trabalho, tentou-se inocular raízes desta variedade *in vitro* (Mulongoy, *et al.*, 1988). Além disso, só foi encontrada uma referência relativa à inoculação *in vitro* de raízes transgênicas de batata doce por fungos micorrízicos (*Glomus microcarpum*) (Pratap & Potty, 2009).

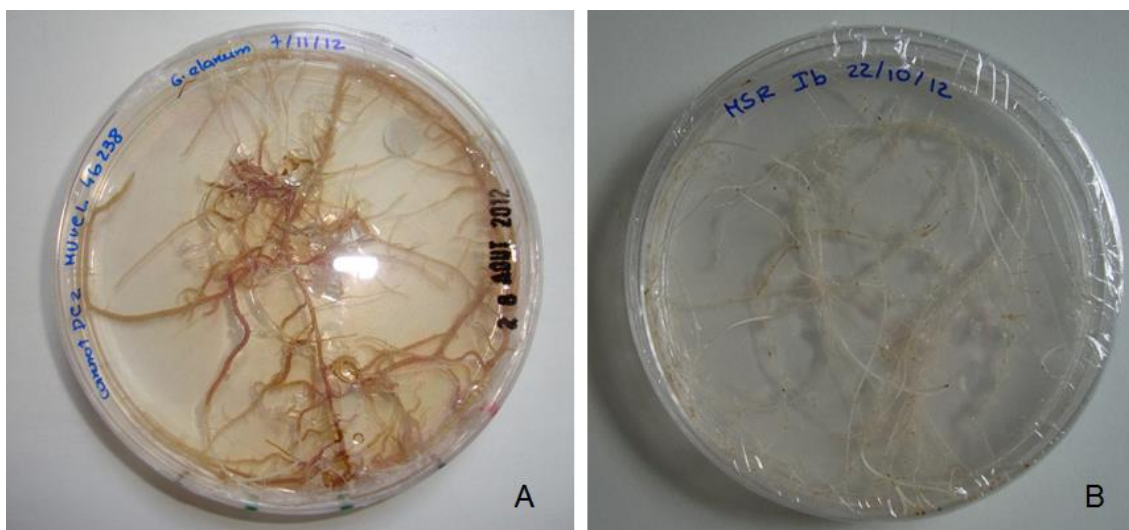


Figura 3.6. Co-cultura de raízes transgênicas de cenoura (A) e de batata doce (B) com fungo o *Glomus clarum*.

3.2. Extracção e identificação de compostos bioactivos presentes nos exsudados das raízes de batata doce

A rizosfera representa uma fonte dinâmica de interações entre as raízes e microorganismos benéficos do solo e patogênicos, invertebrados, e sistemas de raízes de plantas competidoras. No entanto, porque as raízes das plantas estão no subsolo, muitos destes fenómenos de interacção em que as raízes se encontram envolvidas estão ainda por revelar. Em particular, o papel dos sinais químicos em mediar as interações só está recentemente a ser entendido (Bais, *et al.*, 2006). Os compostos bioactivos presentes nos exsudados das raízes são por isso importantes na compreensão da interacção entre as plantas e os microorganismos presentes no solo, entre eles os fungos micorrízicos. Como já foi referido, o primeiro evento da interacção micorrízica é causado pelos compostos que são produzidos constitutivamente pelas raízes hospedeiras (Nagahashi & Douds Jr., 2000). O seu conhecimento pode vir a ser importante para a sua utilização como estimulantes das simbioses micorrízicas na agricultura.

Neste trabalho, procedeu-se à extracção dos compostos dos exsudados das raízes transgênicas de batata doce crescidas em meio MSR e meio SH, durante 15 dias. Escolheu-se este tempo de crescimento uma vez que a literatura refere que as raízes transgênicas com cerca de 13 dias se assemelham ao sistema de raízes *in vivo*, ou seja, verifica-se a existência de uma raiz principal vigorosa, uma zona de alongamento, e desenvolvimento radicular lateral, verificando-se que estas são colonizadas por fungos micorrízicos mais rapidamente do que raízes com 9 dias (Fortin, *et al.*, 2002).

Através da extracção líquido-líquido e utilizando também HS-SPME como preparação de amostra realizada aos meios MSR líquido e SH líquido sem raízes, verificou-se que os dois meios de cultura apresentam na sua composição vários compostos orgânicos. Esta análise serviu de controlo para o estudo dos exsudados das raízes. Para além disso, em todos os extractos verificou-se a

presença de possíveis contaminantes, como por exemplo alguns ácidos gordos e ftalatos. Estes últimos foram, na maior parte das análises realizadas, os componentes maioritários. Este facto dificulta a análise dos compostos de interesse, que na sua maioria estão presentes em concentrações extremamente pequenas. Os contaminantes do meio de cultura podem ter origem no material de laboratório utilizado, nas soluções de nutrientes ou mesmo na água destilada utilizada.

Relativamente aos diferentes extractos dos exsudados das raízes transgénicas da batata doce obtidos a partir da extracção líquido-líquido, observou-se que os perfis cromatográficos para os dois meios de cultura são muito semelhantes. No entanto, verificou-se a presença do composto volátil 2-metil-1-butanol nos exsudados das raízes de batata doce crescidas em meio MSR líquido, não se observando a presença deste composto nos exsudados de raízes crescidas no meio de cultura mais nutritivo (identificação realizada com base na comparação com o espectro do composto da biblioteca NIST, tendo em consideração a correlação espectral reversa e directa de ambos os espectros). O mesmo resultado foi obtido para os exsudados de raízes transgénicas de cenoura (Figuras 3.7., 3.8., 3.9.). Apesar de ser um composto volátil, na extracção por HS-SPME não se registou a sua presença. O 2-metil-1-butanol é um composto produzido por bactérias (Kiviranta, *et al.*, 1998; Wheatley, 2002; Farag, *et al.*, 2006; Cann & Liao, 2008), fungos (Gallois, *et al.*, 1990; Sunesson, *et al.*, 1995; Wheatley, 2002) e pelas raízes de plantas (Mazza & Cottrell, 1999). O 2-metil-1-butanol é considerado um produto minoritário encontrado na cerveja, vinho e outras bebidas fermentadas; isto é devido à presença de várias enzimas piruvato descarboxilase encontradas nas leveduras, *Saccharomyces cerevisiae*, usadas para fermentar estas bebidas alcoólicas (Cann & Liao 2008). O metabolismo deste composto encontra-se bem estudado nas bactérias, tendo importância industrial. O 2-metil-1-butanol é produzido através da conversão enzimática do aminoácido de cadeia ramificada, isoleucina através da via metabólica de Ehrlich. O metabolismo envolve a acção de uma transaminase, uma descarboxilase e uma álcool desidrogenase. Em *Bacillus* é um produto de degradação deste aminoácido (Farag, *et al.*, 2006). Segundo a literatura, este metabolito encontra-se ligado à interacção entre bactérias e fungos no solo, não se tendo encontrado nenhuma referência relativa ao papel deste composto nas raízes das plantas. Um estudo anterior verificou que o 2-metil-1-butanol produzido pelas bactérias do solo demonstrou ser efectivo na inibição do crescimento de fungos basidiomicetos em concentrações abaixo dos ppm (Squire & Ritz, 2000; Wheatley, 2002). Por outro lado, outras publicações referem que algumas bactérias do solo promovem através dos seus compostos orgânicos voláteis a simbiose micorrízica, por exemplo na estimulação da germinação e crescimento das hifas do fungo *Glomus mossae*, mas ainda não é conhecida a identidade destes compostos (Wheatley, 2002).

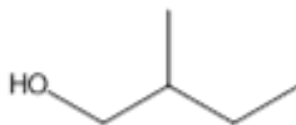


Figura 3.7. Estrutura química do composto 2-metil-1-butanol.

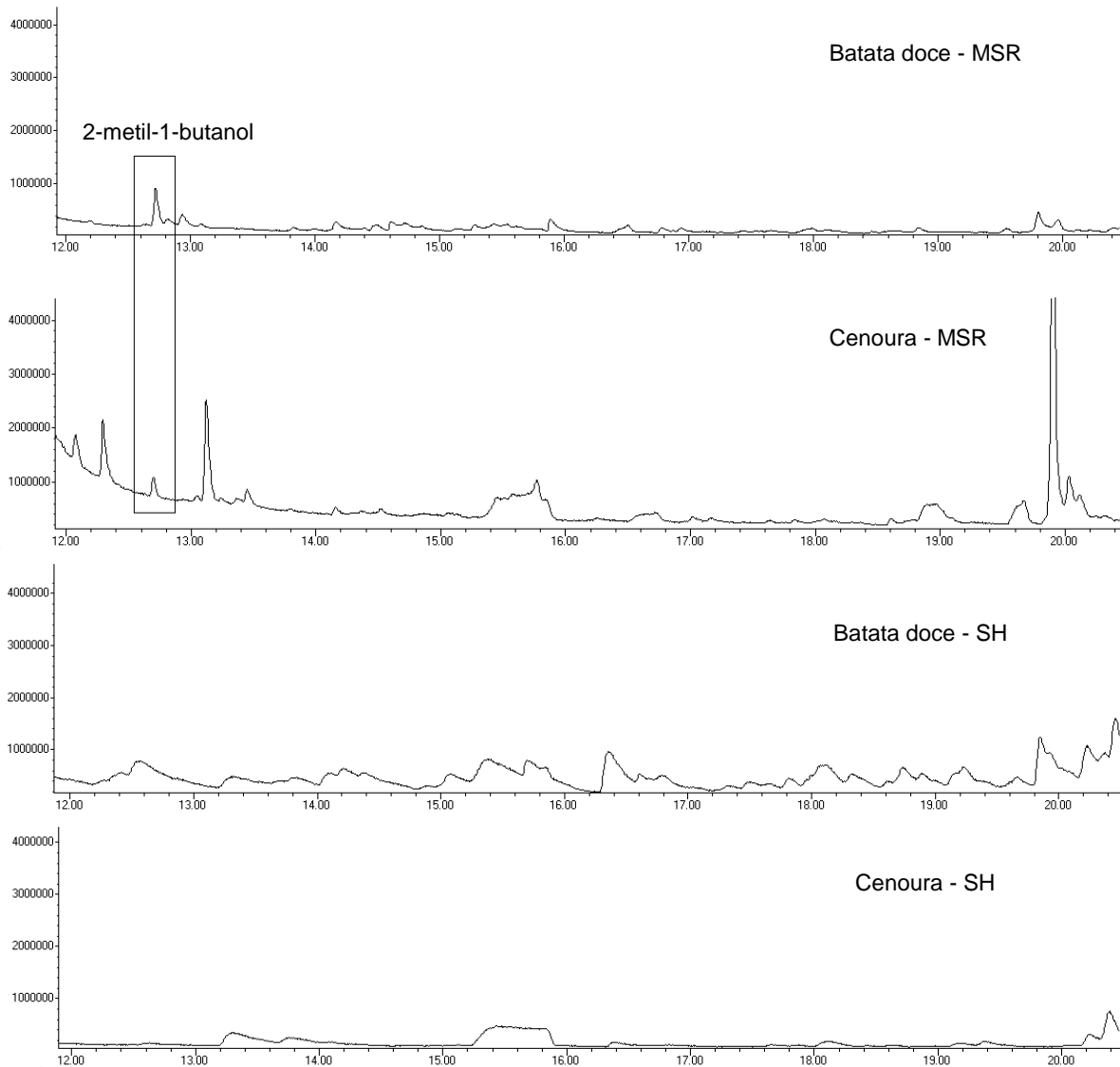


Figura 3.8. 2-Metil-1-butanol identificado nos exsudados de raízes transgênicas de batata doce e cenoura crescidas no meio de cultura MSR.

Como já foi referido, a produção e qualidade dos exsudados das raízes, em relação aos seus efeitos estimulatórios no crescimento dos fungos endomicorrízicos, é directamente afectado pela nutrição em fósforo da planta hospedeira. Pensa-se que os exsudados produzidos pelas raízes expostas a uma menor quantidade de fósforo são mais estimulantes para os fungos endomicorrízicos (Nagahashi & Douds Jr., 2000; Bais, *et al.*, 2006) sendo necessário por isso um meio mínimo semelhante ao meio MSR para que ocorra o crescimento das hifas e se efective a colonização. Tendo em conta que se verifica a produção do composto volátil 2-metil-1-butanol somente nas raízes crescidas em meio de cultura MSR e que este se encontra envolvido em interações que ocorrem no solo, este poderá ser um composto volátil de interesse. Serão necessários mais estudos para elucidar o efeito deste composto nos fungos endomicorrízicos. Outro aspecto a ter em conta no futuro é o

estudo da quiralidade do composto 2-metil-1-butanol, e esclarecer se a batata doce e a cenoura envolvem os mesmos estereoisómeros na sua actividade.

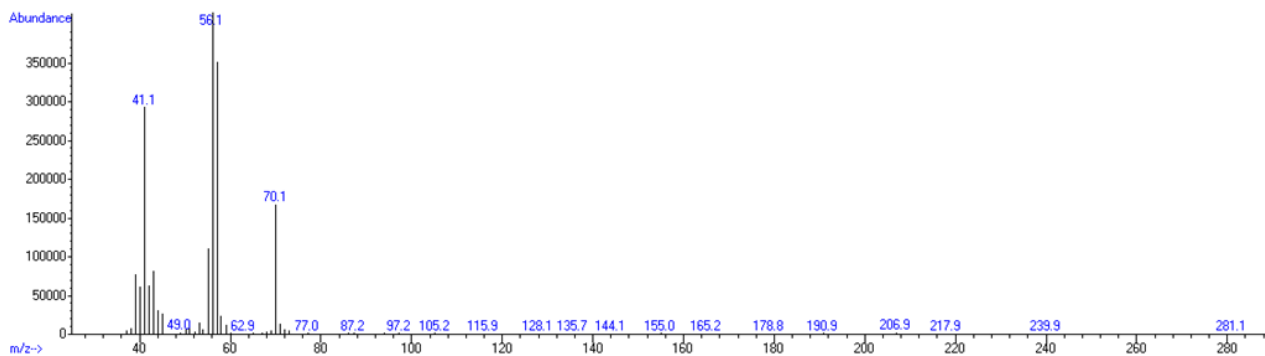


Figura 3.9. Espectro de massa do composto 2-metil-1-butanol.

Em relação às duas espécies de raízes transgênicas estudadas, verificou-se a presença de dois ácidos fenilcarboxílicos, o ácido benzóico e o ácido 2-fenilacético, no extracto de diclorometano (após metilação) do exsudado das raízes transgênicas de batata doce crescidas nos dois meios de cultura (Figuras 3.10., 3.11., 3.12. e 3.13.), não tendo sido detectados nos exsudados das raízes transgênicas de cenoura (identificação realizada com base na comparação com o espectro do composto da biblioteca NIST, tendo em consideração a correlação espectral reversa e directa de ambos os espectros). Estes dois compostos foram também identificados no extracto aquoso das raízes não transformadas de batata doce mantidas e crescidas em água da torneira.

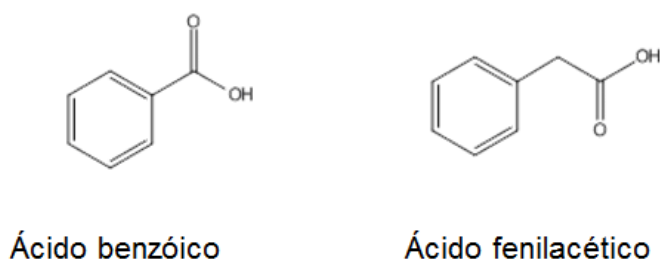


Figura 3.10. Estruturas químicas do ácido benzóico e do ácido fenilacético.

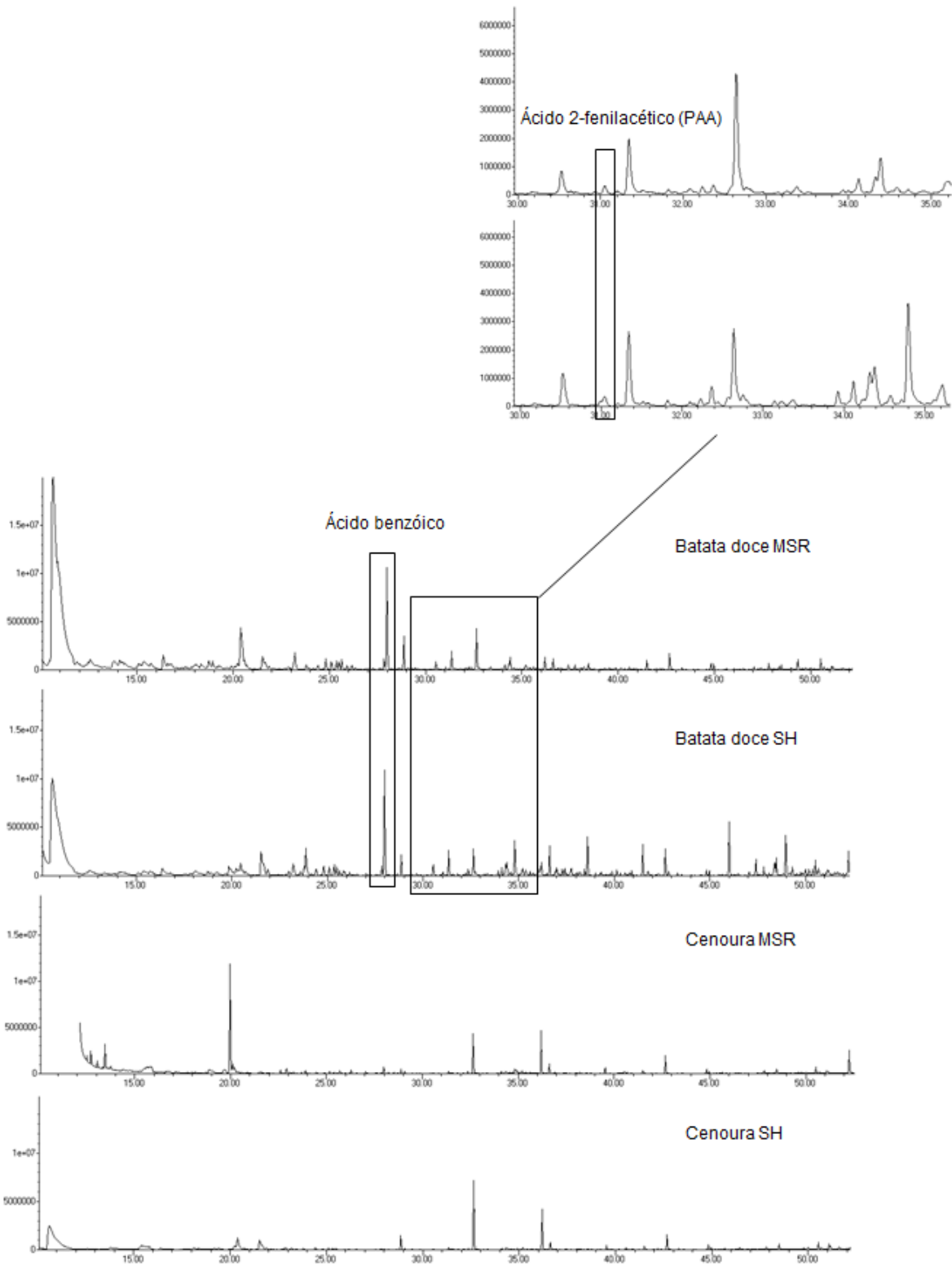


Figura 3.11. Ácidos benzóico e 2-fenilacético identificados nos exsudados de raízes transgênicas de batata doce (crescidas nos meios de cultura MSR e SH líquidos).

Segundo a literatura, as raízes das plantas exsudam vários tipos de compostos orgânicos para a rizosfera, em várias condições, podendo alguns destes compostos ser capazes de inibir o crescimento de outras raízes e outros organismos presentes no solo (Lee, *et al.*, 2006), apresentando fitotoxicidade, actividade antimicrobiana, nematicida ou insecticida. O ácido benzóico e o ácido fenilacético foram encontrados nos exsudados de raízes de alface (*Lactuca sativa* L.), e são os compostos maioritários, juntamente com o ácido 3-hidroxihidrocinâmico e o ácido hidrocinâmico que se acumulam durante o cultivo prolongado desta planta em hidroponia (Lee, *et al.*, 2006). O ácido benzóico e alguns derivados, como o ácido p-hidroxibenzóico foram também identificados nos exsudados de raízes de pepino e apresentaram um efeito tóxico no crescimento da alface (Lee, *et al.*, 2006). O ácido benzóico foi ainda identificado como composto maioritário presente nos solos de crescimento de várias coníferas (Lee, *et al.*, 2006) e os dois ácidos na solução nutritiva da cultura hidropónica de tomate (Yu & Matsui, 1993).

O ácido benzóico é um precursor biossintético do ácido salicílico (ácido 2-hidroxibenzóico), que é considerado um dos sinais endógenos envolvidos na activação de numerosas respostas de defesa das plantas (Bojórquez-Pereznieta, *et al.*, 2013). O ácido salicílico é responsável pela indução do sistema de resistência adquirida (SAR) das plantas contra fungos patogénicos, bactérias e vírus. O ácido cinâmico e o ácido benzóico, derivados da fenilalanina, são compostos intermediários na via biossintética do ácido salicílico. A fenilalanina é convertida a ácido cinâmico pela fenilalanina amoníase (PAL) e a chalcona sintase (CHS) é responsável pela conversão de ácido cinâmico em flavonóides. Pensa-se que um decréscimo no nível de ácido benzóico pode resultar no bloqueamento parcial da via que leva à produção do ácido salicílico, sendo compensada por um aumento da produção de flavonóides. Esta hipótese sugere que possa existir um mecanismo através do qual ocorra a supressão dos mecanismos de defesa da planta aquando da interacção com um organismo simbiótico (Hammad, *et al.*, 2003). No entanto, o ácido benzóico parece não estar exclusivamente associado ao sistema de resistência adquirida (SAR), observando-se uma exsudação constitutiva em ausência do patogéneo (Lanoue, *et al.*, 2010). O ácido benzóico apresentou actividade antifúngica em relação aos fungos *Fusarium solani* e *Macrophomina phaseolina* (Amal, 2009) e é conhecido como induzindo a tolerância ao patogéneo *Phytophthora cinnamomi* em plantas de *Banksia attenuate* (Lanoue, *et al.*, 2010).

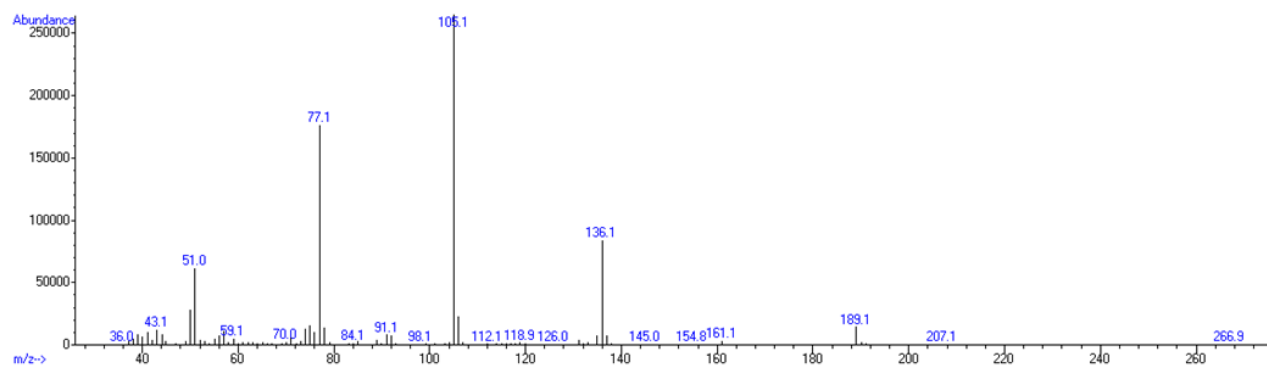


Figura 3.12. Espectro de massa do ácido benzóico metilado.

O ácido fenilacético também é um composto derivado da fenilalanina. Embora também possa ser biossintetizado por bactérias, é predominantemente sintetizado nas plantas e exibe uma actividade do tipo auxínico desempenhando um papel semelhante às auxinas na regulação do crescimento das plantas, contribuindo para o alongamento celular (Hammad, *et al.*, 2003). No entanto, é conhecido pela sua actividade fraca como fitoregulador, sendo considerado um metabolito secundário derivado da fenilalanina com efeitos antimicrobianos, inibindo o crescimento de bactérias gram negativas e gram positivas (Somers, *et al.*, 2005) e demonstrando ter actividade antifúngica (Slininger, *et al.*, 2004). Um estudo demonstra a eficácia *in vivo* do ácido fenilacético para o controlo de *Phytophthora capsici* não só inibindo a germinação dos zoosporos e o crescimento micelar, como evitando a sua dispersão nas plantas de pimento, sendo anteriormente verificado a sua eficiência contra *Gibberella pulicaris* (Hwang *et al.* 2001). Este estudo refere ainda a maior eficiência deste ácido do que a de um fungicida sintético no combate a esta espécie de *Phytophthora* (Hwang, *et al.*, 2001). *Cladosporium herbarum* é outra espécie de fungo afectada pela actividade antifúngica do ácido fenilacético (Anaya, *et al.*, 1992). É referido ainda na literatura o efeito tóxico *in vitro* do ácido fenilacético, produzido por três espécies de bactérias, contra o nemátodo do pinheiro *Bursaphelenchus xylophilus* (Hwang, *et al.*, 2001). Pensa-se que o ácido fenilacético possa estar envolvido em mecanismos de defesa dos organismos, sendo uma forma de resistência e sobrevivência destes no seu ambiente natural (Somers, *et al.*, 2005).

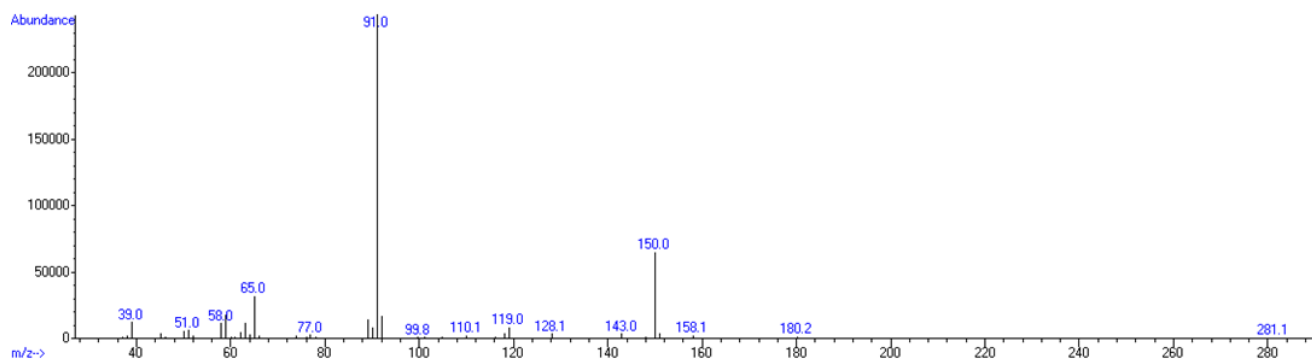


Figura 3.13. Espectro de massa do ácido fenilacético metilado.

Em relação à actividade dos compostos fenilcarboxílicos exsudados pelas raízes das plantas na simbiose micorrízica, poucos estudos relacionam os efeitos destes compostos sobre os fungos micorrízicos. Um estudo refere a inibição do crescimento de dois fungos ectomicorrízicos associados ao abeto, *Cenococcum graniforme* e *Laccaria laccata*, pela solução do solo (Pellissier, 1993). O ácido benzóico foi identificado como forte inibidor do crescimento de diferentes espécies de fungos ectomicorrízicos do género *Boletus* em meio sintético (Olsen, *et al.*, 1971). O extracto aquoso da planta *Artemisia princeps* var. *orientalis* revelou possuir na sua constituição o ácido benzóico. Neste mesmo estudo verificou-se que este extracto inibia a colonização micorrízica em *Plantago asiatica* e na planta *Oenothera odorata* (Yun & Choi, 2002). A concentração dos compostos alelopáticos pode

influenciar o efeito destes nos fungos micorrízicos. O ácido cafeico produz um efeito estimulante na colonização das hifas micorrízicas a uma concentração de $5 \times 10^{-5} \text{M}$, mas produz um efeito inibidor a 5×10^{-4} e $5 \times 10^{-3} \text{M}$. Enquanto que a inibição das hifas micorrízicas pelo ácido cumárico é proporcional à sua concentração. Outro estudo verificou que o ácido ferúlico levou à inibição da colonização micorrízica de espargos por *Glomus fasciculatum*, e que é dependente da concentração (Yun & Choi, 2002). Por outro lado, o ácido p-hidroxibenzoico aumenta significativamente a colonização por parte das raízes de *Glomus intraradices* relativamente ao controlo, quando aplicado numa concentração de 0,25mM. A uma concentração mais elevada (1,0mM) foi observado um decréscimo significativo na colonização das raízes de todas as plantas tratadas (Fries, *et al.*, 1997). Segundo a literatura, este composto acumula-se nas raízes transgênicas de cenoura (*Daucus carota*) (Sircar, *et al.*, 2007).

Tendo em conta a natureza e as actividades antifúngicas destes dois ácidos fenilcarboxílicos, pode colocar-se a hipótese de que a não micorrização das raízes transgênicas de batata doce por parte dos dois fungos do género *Glomus*, observada neste trabalho, poderá estar associada à exsudação constitutiva destes dois compostos para o meio de cultura. No entanto, será necessário o estudo do efeito destes dois compostos na colonização de outra planta por parte destes fungos. Para além disso, a batata doce é uma cultura reconhecida como sendo muito competitiva em relação a algumas plantas infestantes (Peterson & Harrison Jr., 1991; Reinhardt, *et al.*, 1993; Chon & Boo, 2005). Vários compostos constituintes dos tecidos da batata doce, como alguns ácidos gordos, ácido clorogénico e cafeico são compostos químicos alelopáticos que se encontram bem descritos na bibliografia (Reinhardt, *et al.*, 1993). A batata doce de Aljezur, estudada no presente trabalho, como referido anteriormente, não apresenta problemas fitossanitários no campo de cultura. Tendo em conta que a resistência da planta, através dos exsudados das raízes, é baseada na capacidade das espécies de plantas de sintetizar metabolitos com actividade biológica nas raízes e de exsudar estes compostos para a rizosfera de uma maneira constitutiva ou pela presença de microorganismos do solo (Lanoue, *et al.*, 2010). Pode então colocar-se a hipótese desta resistência poder estar relacionada com a exsudação destes dois compostos, ácido benzoico e ácido fenilacético, por parte das raízes. No entanto, será necessária uma análise posterior relativamente ao efeito destes compostos nos fungos patogénicos existentes nos solos da região onde esta variedade é cultivada.

Visto que as raízes transgênicas de batata doce de Aljezur possuem um crescimento vigoroso, sendo fáceis de manter, podem tornar-se um bom modelo biotecnológico em estudos de alelopatia e na produção de alguns compostos importantes para a agricultura e com possível interesse económico, tais como o ácido benzoico e o ácido fenilacético.

Na análise por HS-SPME-GC-MS dos exsudados das raízes transgênicas de batata doce crescidas nos dois meios de cultura, não se verificaram diferenças relativamente aos compostos voláteis extraídos, no respeitante aos dois meios de cultura. Observou-se que as duas espécies de raízes transgênicas exsudaram para o meio compostos com possível interesse biológico como 1,8-cineole (eucaliptol), o isopropil palmitato (1-metiletil éster do ácido tetradecanóico) e o isopropil miristato (1-metiletil éster do ácido tetradecanóico) (Figura 3.14.).

Verificou-se ainda que as raízes transgênicas de cenoura exsudam para o meio o composto carotol, composto identificado pela primeira vez no óleo essencial da planta *Daucus carota* (identificação realizada com base na comparação com o espectro do composto da biblioteca NIST, tendo em consideração a correlação espectral reversa e directa de ambos os espectros).

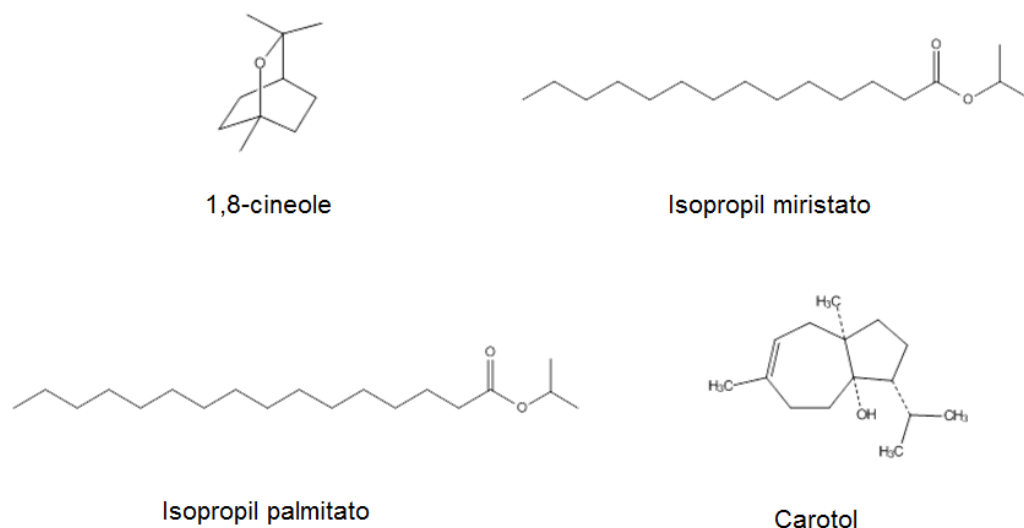


Figura 3.14. Estruturas químicas dos compostos voláteis com possível interesse biológico detectados por HS-SPME.

3.3. Composição química do aroma da batata doce de Aljezur em função do método de confecção culinária

3.3.1. Análise qualitativa e quantitativa dos compostos de Maillard presentes na batata doce de Aljezur

Na análise do aroma da batata doce da variedade Lira (batata doce de Aljezur), realizada por HS-SPME-GC-FID e DI-SPME-GC-FID observou-se que existem diferenças qualitativas e quantitativas entre os diferentes métodos de confecção relativamente aos compostos de Maillard em análise (Figura 3.15. e Tabela 3.2.). Os três processos de confecção utilizados neste estudo representam o modo como a batata doce é cozinhada em Portugal. Nos EUA a maior parte dos estudos existentes referem-se à batata doce assada, a forma mais comum de consumo por parte da população norte americana, e somente um trabalho refere o efeito destes três métodos de confecção no aroma da batata doce (Wang & Kays, 2001).

Em relação aos compostos libertados para o *headspace* pela batata doce confeccionada, verificou-se que a amostra de batata doce assada liberta os compostos 2-acetilfurano e 5-metilfurfural, não tendo havido a detecção destes dois compostos por HS-SPME na batata doce de Aljezur cozida e cozinhada no micro-ondas, nas condições de análise utilizadas. O 2-acetilfurano já

foi associado essencialmente ao aroma da batata doce assada (Nakamura, *et al.*, 2013), havendo contudo um estudo que refere a sua presença em amostras cozinhadas por micro-ondas e também nas amostras cozidas, embora em pequenas e em quantidades vestigiais (Wang & Kays, 2001); o mesmo estudo refere uma presença análoga para o composto 5-metilfurfural (Wang & Kays, 2001).

Para todas as amostras de batata doce de Aljezur, assada, cozida e confeccionada em micro-ondas, não foi detectada a presença de piridina, 3-furaldeído e 3-acetil-2,5-dimetilfurano, ao contrário do descrito para amostras de batata doce de variedades e clones cultivadas nos Estados Unidos da América (Jewel, Centennial, etc.) cozinhadas (Kays, *et al.*, 1998; Kays & Wang, 2000; Wang & Kays, 2000; Wang & Kays, 2001; Wang & Kays, 2003), que referem a presença de piridina e 3-furaldeído em quantidades significativas. A ausência destes compostos na batata doce de Aljezur é concordante com a característica associada a esta variedade (Lira), a qual é reconhecida por ter um aroma distintivo de outras variedades de batatas doce.

A análise por HS-SPME-GC-FID da batata doce de Aljezur permitiu também a identificação dos aldeídos fenilacetaldéido e benzaldéido em cada uma das amostras confeccionadas através dos três processos diferentes. O fenilacetaldéido possui um aroma perfumado e doce e o benzaldéido um cheiro forte a amêndoa. Estes dois compostos são considerados importantes componentes do aroma da batata doce e formam-se via reacção de Maillard, a partir da degradação de Strecker do aminoácido fenilalanina (Wang & Kays 2000; Wang & Kays, 2003; Nakamura, *et al.*, 2013).

Relativamente ao composto 5-hidroxiacetilfurfural, 5-HMF, a sua presença foi detectada através da análise por DI-SPME-GC-FID, não sendo possível a sua detecção quando se utilizou *headspace*. Este resultado pode estar associado à baixa volatilidade deste composto (temperatura de ebulição de 115°C/1 mmHg). Muitas vezes, a análise de 5-HMF tem sido realizada por cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa (RP-HPLC), utilizando como eluente metanol:água e detecção por UV a 280nm (Murkovic & Pichler, 2006; RuWán-Henares, *et al.*, 2008) ou tendo como eluente uma solução aquosa de acetonitrilo ácida (90:10, v/v) e na detecção UV um comprimento de onda de 285nm (Durmaz & Gökmen, 2010), também por HPLC utilizando derivatização em pré-coluna com 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) (Lo Coco, *et al.*, 1996), e ainda utilizando a extracção líquido-líquido e a extracção em fase sólida (SPE) na preparação de amostra do composto, seguida de processo de derivatização (sililação) e posterior análise por GC-MS (Teixidó, *et al.*, 2006). A análise de 5-HMF por DI-SPME-GC-FID/TOF-MS em matrizes alimentares, sem recurso à derivatização do composto (Gaspar & Lopes, 2009) foi já efectuada no laboratório. Um único estudo refere a presença do 5-HMF no aroma batata doce assada, variedade Jewel (EUA). A preparação de amostra foi realizada através da captura dos voláteis num sistema fechado e com auxílio de um solvente (diclorometano), método descrito anteriormente no ponto 1.6.1.da Introdução deste trabalho, sendo a análise realizada por GC-MS (Sun, *et al.*, 1993). A análise por DI-SPME-GC-FID realizada à batata doce de Aljezur permitiu também a identificação de 2-furaldeído, 5-metilfurfural e álcool furfúrico nas amostras sujeitas aos três métodos de confecção culinários (Figura 3.15. e Tabela 3.2.). Com excepção do composto 5-metilfurfural, estes compostos, encontram-se presentes na batata doce crua. Como já foi

referido, as reacções de Maillard podem também ocorrer durante o armazenamento dos alimentos, sendo por isso um resultado compreensível.

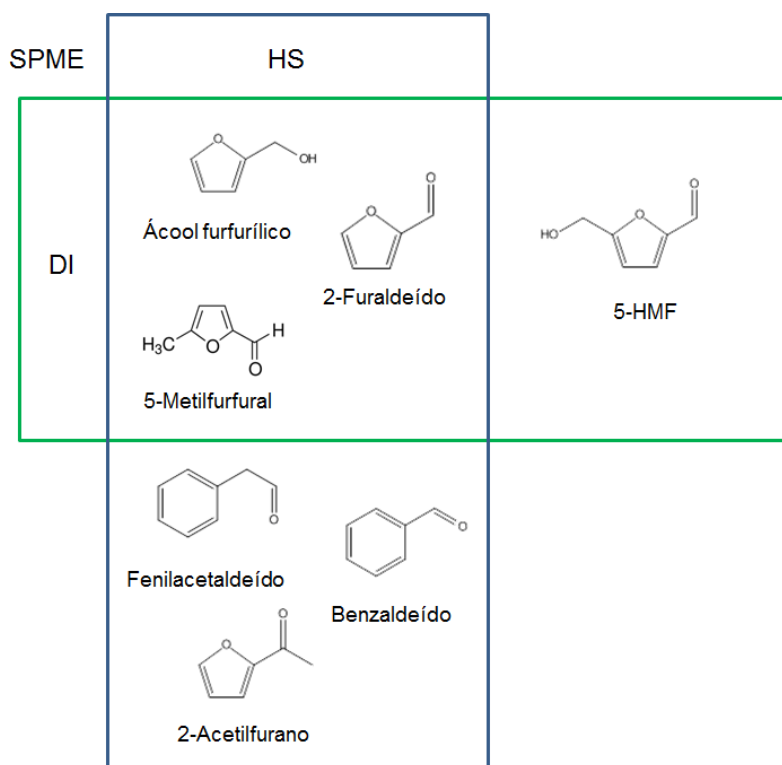
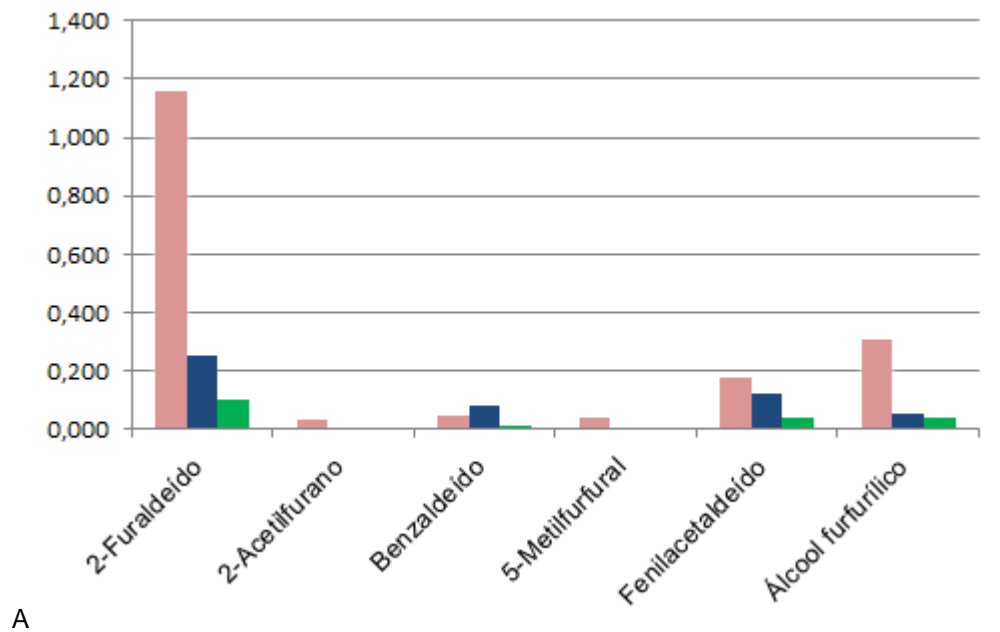


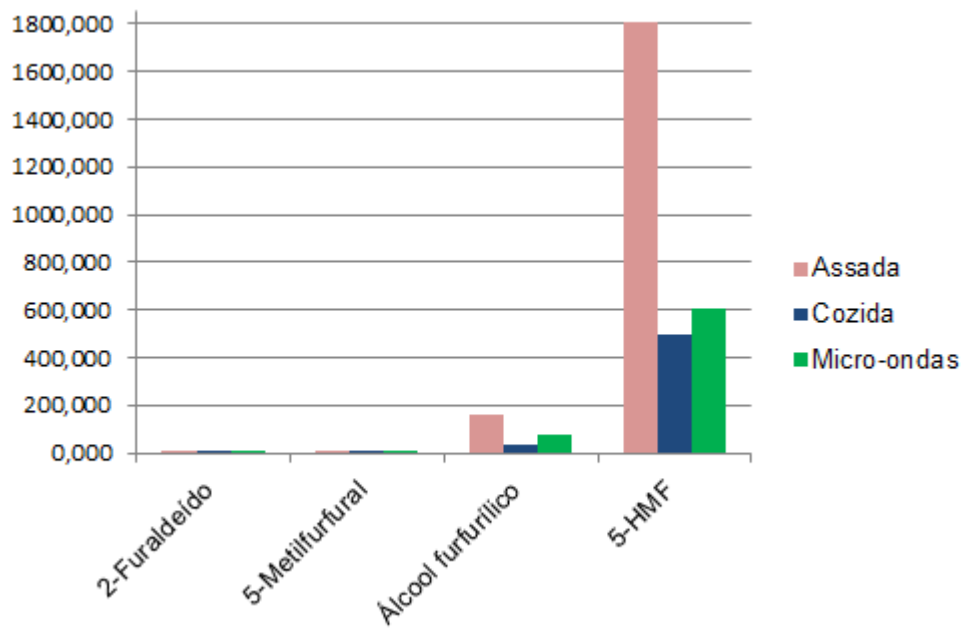
Figura 3.15. Ilustração representativa das estruturas químicas dos compostos de Maillard analisados por HS/DI-SPME-GC-FID. HS – *headspace*; DI – imersão directa

Tabela 3.2. Análise qualitativa por HS/DI-SPME-GC-FID dos compostos de Maillard presentes na batata doce de Aljezur sujeita a diferentes métodos de confeção (assada, cozida e cozinhada em micro-ondas). HS – *headspace*; DI – imersão directa; (+) - presença; (-) – ausência.

Preparação de Amostra	SPME	Método de confeção alimentar							
		Crua		Assada		Cozida		Micro-ondas	
		HS	DI	HS	DI	HS	DI	HS	DI
1. Piridina		-	-	-	-	-	-	-	-
2. 3-Furaldeído		-	-	-	-	-	-	-	-
3. 2-Furaldeído		-	+	+	+	+	+	+	+
4. 2-Acetilfurano		-	-	+	-	-	-	-	-
5. Benzaldeído		-	-	+	-	+	-	+	-
6. 5-Metilfurfural		-	-	+	+	-	+	-	+
7. 3-Acetil-2,5-dimetilfurano		-	-	-	-	-	-	-	-
8. Fenilacetaldeído		-	-	+	-	+	-	+	-
9. Álcool furfurílico		-	+	+	+	+	+	+	+
10. 5-Hidroxiacetilfurfural		-	+	-	+	-	+	-	+



A



B

Figura 3.16. Quantidade de compostos de Maillard libertados (A) ($\mu\text{g/Kg}$) e presentes (B) (mg/Kg) nas amostras de batata doce de Aljezur cozinhadas pelos três métodos diferentes.

Em relação às quantidades destes compostos observou-se que, com excepção do benzaldeído, presente em maior quantidade nas amostras de batata doce cozida, todos os outros compostos em estudo são libertados em maior quantidade pelas amostras de batata doce assada. A diferença em relação aos outros dois métodos de confecção é mais acentuada para os compostos 2-furaldeído e álcool furfurílico. Verificou-se ainda que as amostras de batata doce cozinhadas no micro-ondas libertam uma menor quantidade de compostos de Maillard (Figura 3.16. e Tabela 3.3.). Estes resultados estão de acordo com o observado em estudos anteriores para variedades dos EUA (Kays & Wang, 2000; Wang & Kays, 2001).

No respeitante à análise por DI-SPME, observou-se que as amostras de batata doce assada apresentaram um maior conteúdo em furfurais, nomeadamente em 2-furaldeído, 5-metilfurfural, álcool furfurílico e 5-HMF do que as amostras de batata doce sujeitas aos outros dois métodos de confecção. Verificou-se ainda que as amostras cozinhadas através de micro-ondas apresentam uma maior quantidade de todos os furfurais identificados do que as amostras de batata doce cozidas. Relativamente às quantidades destes compostos na batata crua, estas são mais pequenas que as quantidades detectadas quando se aplica um método de confecção e encontram-se abaixo do limite de quantificação do método analítico.

A partir deste estudo observou-se também que a quantidade de furfurais que permanecem na batata doce de Aljezur depois de cozinhada é maior do que a quantidade encontrada no aroma da batata doce, ou seja, a maior parte dos compostos produzidos pela reacção de Maillard durante a confecção são ingeridos pelos consumidores de batata doce, o que levanta a questão da segurança alimentar deste alimento tendo em conta a toxicidade *in vitro* (Irwin, 1990; Khan, *et al.*, 1995; Adams, *et al.*, 1997; Yamashita, *et al.*, 1998; Janzowski, *et al.*, 2000) atribuída a estes compostos.

Para todos os métodos de confecção utilizados e de entre todos os compostos, o composto 5-hidroximetilfurfural apresentou os teores mais elevados. A maior quantidade registou-se na batata assada, sendo de 1,8g de 5-HMF para quilograma de batata doce, Tabela 3.3.. A permanência de grande quantidade deste composto na batata doce em relação aos outros compostos pode dever-se à sua baixa volatilidade, que faz com que não faça parte ou a sua presença seja registada em pouca quantidade no aroma. Relativamente à legislação deste composto, o Codex Alimentarius da Organização Mundial de Saúde e a União Europeia estabelecem um limite máximo deste composto somente para o mel (40mg/kg) e para o sumo de maçã (50mg/kg), sendo estes valores indicadores de deterioração e de tratamento térmico destes dois alimentos (Teixidó, *et al.*, 2006; Gaspar & Lopes, 2009).

Tabela 3.3. Quantidade de compostos de Maillard libertados ($\mu\text{g/Kg}$) e presentes (mg/Kg) nas amostras de batata doce assada, cozida e cozinhada no micro-ondas. LOD – limite de detecção; LOQ – limite de quantificação.

Preparação de Amostra	Método de confecção						
	Assada		Cozida		Micro-ondas		
	SPME	HS	DI	HS	DI	HS	DI
2-Furaldeído		1,162	10,565	0,253 (<LOQ)	0,980 (<LOD)	0,105 (<LOD)	2,968 (<LOQ)
2-Acetilfurano		0,031 (<LOD)	-	-	-	-	-
Benzaldeído		0,051 (<LOD)	-	0,082 (<LOD)	-	0,014 (<LOD)	-
5-Metilfurfural		0,041 (<LOQ)	0,894	-	0,051 (<LOD)	-	0,186 (<LOQ)
Fenilacetaldeído		0,175 (<LOQ)	-	0,126 (<LOQ)	-	0,044 (<LOQ)	-
Álcool furfurílico		0,307	159,635	0,057 (<LOQ)	35,114 (<LOQ)	0,044 (<LOQ)	78,683
5-HMF		-	1802,45	-	499,77	-	605,802
		$\mu\text{g/Kg}$	mg/Kg	$\mu\text{g/Kg}$	mg/Kg	$\mu\text{g/Kg}$	mg/Kg

As diferenças qualitativas e quantitativas observadas contribuem e explicam o aroma diferente da batata doce cozinhada pelos três métodos distintos. Enquanto que a batata assada possui um forte aroma doce a caramelo, atribuível à maior quantidade de furfurais, a batata cozida tem um aroma bastante distinto, mas pouco pronunciado, e a batata cozinhada através de micro-ondas não apresenta um aroma a caramelo intenso mas um leve aroma doce. Estas diferenças, estão possivelmente relacionadas com o modo como o calor penetra na batata doce e essencialmente com as diferentes temperaturas utilizadas em cada método (Wang & Kays, 2001).

3.3.1.1. Influência da temperatura no aroma da batata doce

As diferentes quantidades de compostos derivados da reacção de Maillard obtidas neste estudo, na batata doce cozinhada na coloche e na batata doce cozinhada no micro-ondas, atribuem-se ao modo como o calor se difunde neste alimento. O modo como o calor se difunde na batata doce e as diferentes temperaturas influenciam o funcionamento do sistema enzimático de amilases, essencial para a hidrólise do amido, presente em grande quantidade na batata doce, que leva à formação do açúcar maltose. Este açúcar, que actua na reacção de Maillard como um agente reductor, devido à possibilidade de formação de um grupo aldeído na sua estrutura química, é o principal precursor dos compostos de Maillard na batata doce, principalmente dos compostos derivados do furano (Purcell, *et al.*, 1980), como o 2-furaldeído, álcool furfurílico, 5-metilfurfural, 2-acetilfurano e 5-hidroximetilfurfural

(Wang & Kays, 2000). A reacção de hidrólise do amido envolve duas enzimas, a α -amilase (1,4- α -D-glucano glucohidrolase) e a β -amilase (1,4- α -D-glucano maltohidrolase). A α -amilase actua nas ligações α -(1,4)-glucosídicas entre as moléculas de glucose internas da amilose e amilopectina constituintes do amido (Myrback & Neumuller, 1950), produzindo dextrinas e pequenas quantidades de açúcares redutores, incluindo a maltose. A β -amilase reage com o final não reduzido da estrutura química das dextrinas hidrolisadas de forma incompleta, produzindo maltose e dextrinas de baixo peso molecular (Kays & Wang, 2000). Um estudo indica que este sistema enzimático também se encontra activo à temperatura ambiente, quando a batata doce se encontra armazenada, podendo assim explicar-se a existência de pequenas quantidades de furfurais na batata crua no presente estudo (Morrison, *et al.*, 1993).

Na confecção numa colchoche ou num forno, o calor é transferido por condução e convecção e a temperatura aumenta gradualmente do exterior para o interior do alimento, existindo ao mesmo tempo zonas de hidrólise e zonas em que as amilases não se encontram no seu pico de actividade, visto que as temperaturas óptimas, de 70°C a 75°C para a α -amilase e de 50°C a 55°C para a β -amilase, ainda não foram alcançadas. Um estudo que testou diferentes temperaturas de confecção alimentar de batata doce num forno refere que a concentração de maltose aumenta a partir dos 50°C, atingindo o seu máximo a uma temperatura de 80-85°C. Uma temperatura superior a 85°C leva a uma diminuição do conteúdo em maltose, o que indica uma menor actividade das duas enzimas acima deste valor de temperatura (Sun, *et al.*, 1994; Kays & Wang, 2000). Desta forma, a hidrólise do amido, com a conseqüente formação de maltose, ocorre até ao centro da batata doce de forma progressiva e durante um longo período de tempo. Relativamente à confecção através do micro-ondas, este é um método cada vez mais utilizado nos países desenvolvidos, de modo a reduzir o tempo de confecção em relação aos outros métodos culinários. Num micro-ondas os alimentos são processados através de ondas eletromagnéticas que os penetram, causando agitação e atrito e, assim, o calor (Wang & Kays, 2001). Desta forma, o calor é gerado em toda a amostra de forma simultânea e o aquecimento ocorre rapidamente em toda a raiz num período de tempo muito curto (Sun, *et al.*, 1994; Kays & Wang, 2000; Wang & Kays, 2001). Um estudo verificou que o pré-tratamento com micro-ondas e a posterior colocação da batata doce num forno de convecção levou à redução da maltose em 80%, o que pode indicar o efeito do micro-ondas na inactividade das amilases envolvidas na hidrólise do amido (Sun, *et al.*, 1994). Pensa-se assim que a utilização do micro-ondas na confecção se assemelhe à utilização de um forno previamente aquecido em que o forno se encontra a uma temperatura elevada, levando à desnaturação enzimática e à redução do rendimento da reacção de hidrólise. Uma menor quantidade de maltose representa uma quantidade inferior de açúcares envolvidos na posterior reacção de Maillard, dando origem por isso a uma menor quantidade de furfurais na batata doce confeccionada por micro-ondas do que na confeccionada na colchoche (Figura 3.17.).

Em relação às diferenças observadas para a batata doce cozida em relação à batata doce assada, o modo de penetração do calor neste alimento está relacionado com água em ebulição. A elevada condutividade térmica da água contribui para a inactivação das amilases, fazendo com que a

quantidade de maltose seja menor (Kays & Wang, 2000; Wang & Kays, 2001). Além disso, pensa-se que pode ocorrer a perda de açúcares por lixiviação quando a batata doce é aquecida na solução aquosa (Kays & Wang, 2000).

Para além das circunstâncias propícias à formação de maltose, açúcar precursor dos compostos furfurais, como foi anteriormente referido, observou-se que outras condições têm que estar presentes para que posteriormente ocorra a reacção de Maillard, entre elas a temperatura máxima atingida no momento da confecção. Pensa-se que as condições ideais para que a reacção de Maillard ocorra são temperaturas acima dos 100°C. As temperaturas elevadas atingidas na colchoche, utilizada no presente estudo, de cerca de 200°C, são satisfatórias para que ocorra para além da reacção de Maillard, a reacção de caramelização (Wang & Kays, 2001), tendo em conta que é sabido que a maltose e outros açúcares como a frutose, glucose e sacarose não sofrem degradação a temperaturas de cozedura entre 25 e 95°C (Sun, *et al.*, 1994). A temperatura no micro-ondas é muito inferior à que é atingida na colchoche, cerca de 100°C, sendo a reacção de Maillard mais lenta e não ocorrendo caramelização dos açúcares (Kays & Wang, 2000; Wang & Kays, 2001). Relativamente à batata doce cozida, as amostras foram também sujeitas à temperatura máxima de 100°C, sendo também neste caso a temperatura baixa para que se forme um aroma semelhante ao da batata assada (Wang & Kays, 2001).

Outro factor importante parece ser a quantidade de água dos alimentos. Pensa-se que a reacção de Maillard ocorra de uma melhor forma em áreas do produto que foram largamente desidratadas, em que a actividade da água é mais baixa (0,60 a 0,80) (Wang & Kays, 2001), o que acontece quando a batata doce é exposta a temperaturas elevadas na colchoche, mas não quando a batata é cozinhada num micro-ondas, em que a actividade da água à superfície é de 1 (Kays & Wang, 2000; Wang & Kays, 2001).

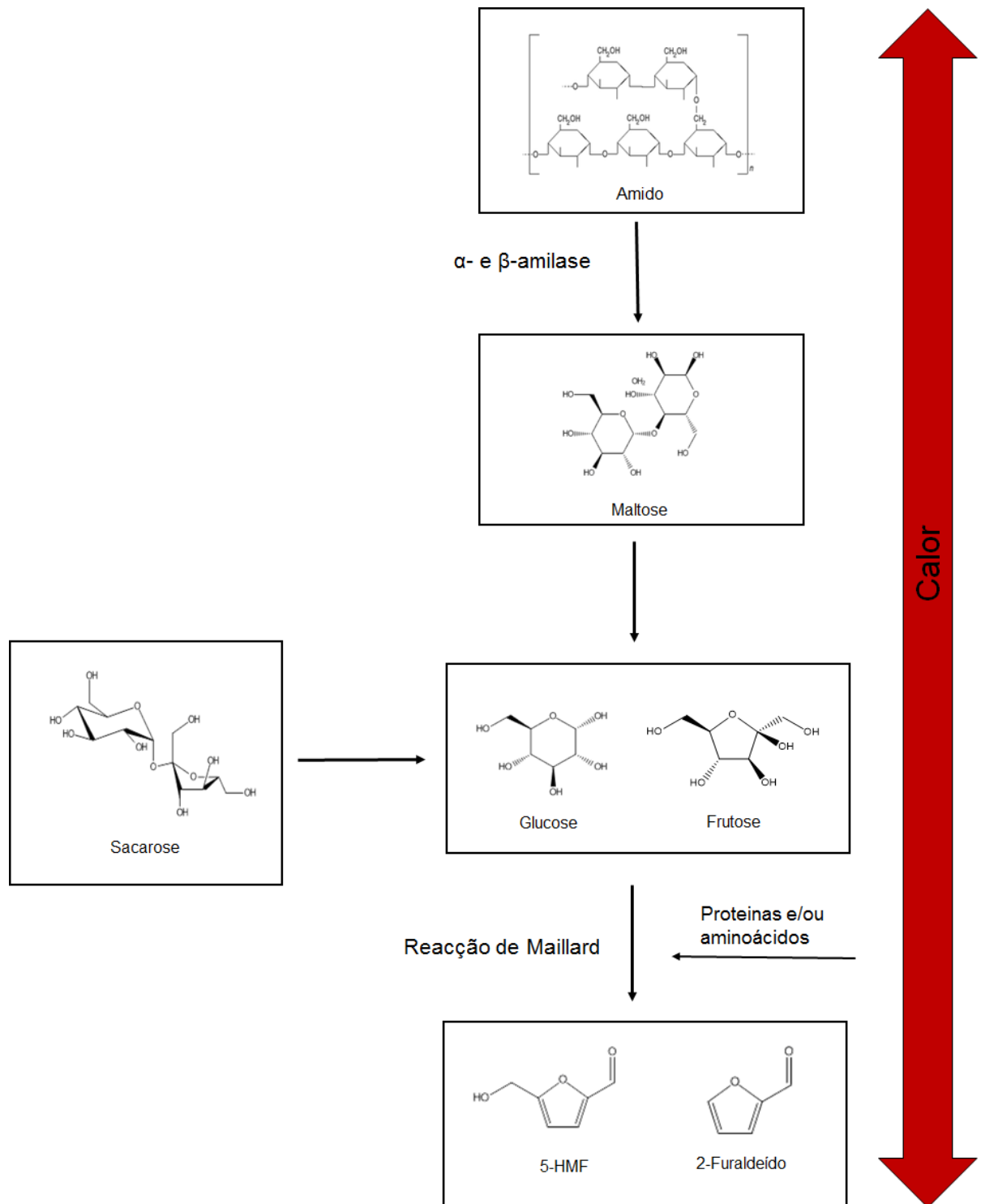


Figura 3.17. Representação da via de síntese dos compostos de Maillard formados durante a confecção da batata doce.

3.3.1.2. Toxicidade e metabolismo dos compostos derivados da reacção de Maillard

Relativamente ao 2-furaldeído, 5-metilfurfural e álcool furfurílico, ainda não foram estabelecidos e não se encontram referenciados limites legais em relação à sua presença em alimentos. No presente estudo, observou-se que o álcool furfurílico se encontra em maior quantidade relativamente aos outros dois compostos, tanto na batata doce assada (159,635 mg/kg) como na batata doce cozinhada no micro-ondas (78,683 mg/kg). Relativamente à sua presença em outros alimentos, um estudo refere que se encontra em grande concentração no leite aquecido (230mg/Kg) e no café (90-881mg/Kg) (Adams, *et al.*, 1997). Não existe referência na literatura relativamente à sua toxicidade, no entanto é sabido que este composto é um precursor do 2-furaldeído, sendo convertido rapidamente *in vivo* neste composto (Adams, *et al.*, 1997). É por isso provável que o álcool furfurílico existente na batata doce de Aljezur seja convertido em 2-furaldeído aquando do consumo deste alimento. Observou-se ainda que o composto 5-metilfurfural é o composto que permanece em menor quantidade na batata doce assada (0,894mg/kg).

Tendo em conta a permanência destes compostos na batata doce depois de confeccionada e a sua potencial toxicidade, é necessário compreender o metabolismo destes compostos *in vivo*. Em relação ao metabolismo do 5-HMF, um estudo em ratinhos, verificou que este composto demonstrou ser completamente metabolizado em ácido 5-hidroximetil-2-furoico e N-(5-hidroximetil-2-furoil)glicina (Murkovic & Pichler, 2006). Em sujeitos alimentados com sumo de ameixa seca e ameixas secas com cerca de 497mg e 67mg de HMF, respectivamente, foram detectados na sua urina quatro metabolitos do 5-HMF. Estes foram identificados, usando HPLC-MS-MS, como sendo N-(5-hidroximetil-2-furoil)glicina, ácido 5-hidroximetil-2-furoico, (ácido 5-carboxílico-2-furoilo)glicina, (ácido 5-carboxílico-2-furoilo)aminometano (Prior, *et al.*, 2006). Estudos realizados com HMF marcado radioactivamente demonstraram que a maior parte da radioactividade é acumulada nos rins e na bexiga, observando-se baixas concentrações no fígado (Murkovic & Pichler, 2006), indicando que o HMF parece ser assim metabolizado rapidamente em conjugados de glicina e outros metabolitos que são excretados pela urina (Prior, *et al.*, 2006). Relativamente ao composto 2-furaldeído, este exhibe um tempo de semi-vida pequeno no plasma e é eficientemente metabolizado *in vivo*. Os estudos *in vivo* com ratos, ratinhos ou humanos levam a crer que o 2-furaldeído não é genotóxico e carcinogénico devido à sua rápida conversão metabólica, ao contrário do que se verifica nos estudos *in vitro*. Tanto em animais como em humanos, o 2-furaldeído é metabolizado primeiramente por oxidação do aldeído. A oxidação do furfural leva à produção de ácido furóico, que é conjugado com glicina (2-furoilglicina) e excretado ou condensado com acetil coenzima A (CoA) para formar o metabolito ácido furanacrílico. A 2-furoilglicina é o metabolito maioritário presente na urina (80%); outros metabolitos em menor quantidade incluem o ácido furóico, ácido furanacrílico (Cary, *et al.*, 2000). Nem o composto 2-furaldeído, nem nenhum dos seus precursores (álcool furfurílico) são detectados na urina (Adams, *et al.*, 1997; Cary, *et al.*, 2000).

3.3.2. Separação cromatográfica dos compostos de Maillard

Para a análise e identificação dos compostos de Maillard presentes na batata doce de Aljezur, utilizou-se uma coluna SupelcoWAX 10 ($t_{max}=280^{\circ}C$), cuja fase estacionária é polietilenoglicol. Esta coluna tem sido utilizada na separação de compostos voláteis polares, na análise de aromas, fragâncias e de matrizes alimentares (Poole, *et al.*, 2000). A escolha desta coluna cromatográfica deveu-se essencialmente ao tipo de matriz em análise e à preparação de amostra utilizada (SPME). A literatura indica que amostras derivadas de matrizes ricas em água são maioritariamente analisadas utilizando uma coluna de polietilenoglicol (WAX) (Santana, *et al.*, 2013). Acresce que, na análise por imersão directa (DI-SPME), a fibra de SPME se encontra directamente exposta à água, e que a batata doce liberta água sob a forma de vapor quando é cozinhada, sendo plausível a existência de vestígios de água nas amostras sujeitas a análise por HS-SPME; por tal, considerou-se ser esta a coluna mais adequada a este estudo (Gaspar & Lopes, 2009; Santana, *et al.*, 2013). Para além deste facto, a separação de alguns compostos derivados da reacção de Maillard, os furfurais (2-furaldeído, 5-metilfurfural e 5-hidroximetilfurfural), presentes em matrizes alimentares aquosas, foi anteriormente realizada no laboratório utilizando esta coluna (Gaspar & Lopes, 2009). No presente estudo verificou-se que a mistura dos compostos de Maillard presentes na batata doce foi eficazmente separada na coluna WAX em cerca de 20 min (Figura 3.18.) nas condições cromatográficas apresentadas no ponto 2.2.3 dos Materiais e Métodos deste trabalho.

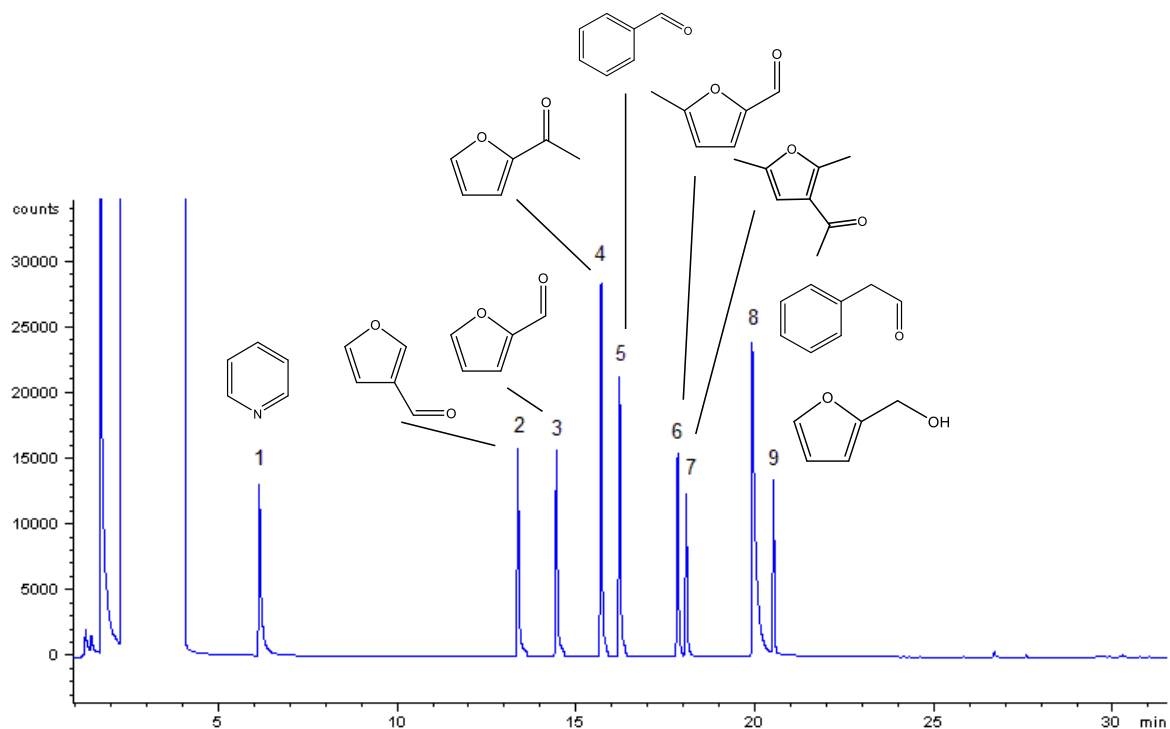


Figura 3.18. Separação dos compostos de Maillard. Coluna cromatográfica: SupelcoWax (30mx0,25mm i.d.x 0,2 μ m). Compostos: 1. Piridina, 2. 3-Furaldeído, 3. 2-Furaldeído, 4. 2-Acetilfurano, 5. Benzaldeído, 6. 5-metilfurfural, 7. 3-Acetil-2,5-dimetilfurano, 8. Fenilacetaldéido, 9. Álcool furfurílico. (Temperatura do forno: de 50 a 240 $^{\circ}C$ a 4 $^{\circ}C/min$, 20min a 240 $^{\circ}C$; Gás de arrastamento: Hidrogénio [fluxo=1 mL/min]; Modo injeção: split 1/25; Injector: 240 $^{\circ}C$; Detector: 240 $^{\circ}C$).

3.3.2.1. Colunas cromatográficas de líquidos iônicos

Tendo em conta que as colunas cromatográficas de líquidos iônicos são a mais recente inovação no âmbito das fases estacionárias para cromatografia, bem como a existência de um protocolo de colaboração entre o Laboratório e a Sigma-Aldrich que visou a experimentação e avaliação destas colunas, estudou-se a selectividade e a eficiência das colunas SLBTM-IL59, SLBTM-IL76 e SLBTM-IL111 relativamente aos compostos de Maillard presentes na nossa matriz (batata doce). Observou-se que as colunas de líquidos iônicos testadas apresentam uma selectividade diferente em relação aos compostos analisados. Relativamente à coluna de líquidos iônicos menos polar, IL-59, e à coluna com elevada polaridade, IL-111, observou-se que não ocorre a separação total da mistura de compostos (Figura 3.19.).

Na análise realizada com a coluna IL-59, verificou-se a co-eluição dos compostos 2-furaldeído, álcool furfurílico, benzaldeído e 2-acetilfurano, assim como do composto 5-metilfurfural com o composto 3-acetil-2,5-dimetilfurano. Na análise com a coluna IL-111, observou-se que o composto 2-furaldeído e benzaldeído sofreram co-eluição, assim como os compostos 3-acetil-2,5-dimetilfurano, 2-acetilfurano e álcool furfurílico. No entanto, relativamente à forma dos picos, a coluna IL-111 apresentou uma melhor resolução. A coluna IL-76 revelou ser a mais eficiente na separação da mistura de compostos de Maillard analisados (Figura 3.19.).

Em relação à ordem de eluição dos compostos, observou-se que tanto na coluna WAX como nas colunas de líquidos iônicos, a ordem de eluição dos três primeiros compostos é a mesma (piridina, 3-furaldeído, 2-furaldeído), sendo a eluição mais rápida no caso da coluna IL-76. Comparando as colunas IL-59 e IL-76, a ordem de eluição é semelhante, com excepção do álcool furfurílico. Embora a coluna de IL-59 seja considerada semelhante, relativamente à sua polaridade, à coluna WAX (Ragonese, *et al.*, 2011), observou-se que a ordem de eluição dos compostos é diferente - o álcool furfurílico, por exemplo, é mais rapidamente eluído na coluna IL-59 do que na coluna de polietilenoglicol, em que é o último composto a ser eluído. Verificou-se também que a coluna WAX apresentou uma melhor resolução da mistura de compostos em relação à coluna de líquidos iônicos. A coluna de líquidos iônicos mais polar, IL-111, é a que mais se diferencia da coluna WAX relativamente à ordem de eluição dos compostos (Tabela 3.19.).

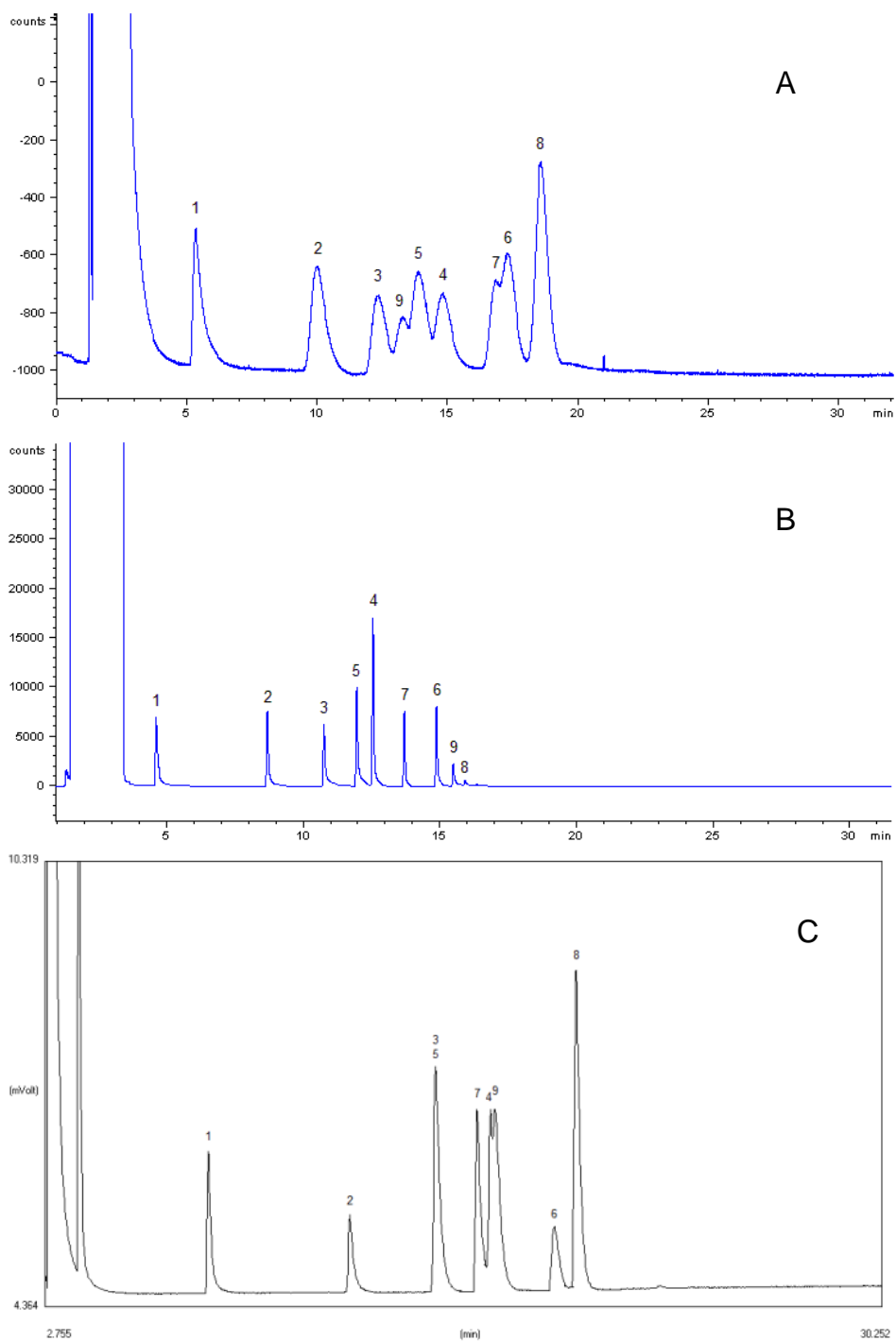


Figura 3.19. Separação da mistura de compostos de Maillard nas diferentes colunas cromatográficas de líquidos iônicos. A - SLB-IL59; B - SLB-IL76; C - SLB-IL111. 1. Piridina, 2. 3-Furaldeído, 3. 2-Furaldeído, 4. 2-Acetilfurano, 5. Benzaldeído, 6. 5-Metilfurfural, 7. 3-Acetil-2,5-dimetilfurano, 8. Fenilacetaldeído, 9. Álcool furfurílico. (Temperatura do forno: de 50 a 240°C a 4°C/min, 20min a 240°C; Gás de arrastamento: Hidrogénio [fluxo=1 mL/min]; Modo de injeção: split 1/25; Injetor: 240 °C; Detector: 240 °C).

Tabela 3.4. Tempos de retenção (min.) dos compostos analisados em diferentes colunas cromatográficas (Temperatura do forno: de 50 a 240°C a 4°C/min, 20min a 240°C; Gás de arrastamento: Hidrogénio [fluxo=1 mL/min]; Modo split 1/25; Injector: 240 °C; Detector: 240 °C).

Compostos	Colunas cromatográficas			
	WAX	IL-59	IL-76	IL-111
1. Piridina	6,172	8,903	4,583	8,093
2. 3-Furaldeído	13,418	13,883	8,674	12,672
3. 2-Furaldeído	14,504	16,190	10,763	15,433
4. 2-Acetilfurano	15,743	18,583	12,597	17,370
5. Benzaldeído	16,249	17,747	11,930	15,490
6. 5-Metilfurfural	17,883	20,913	14,872	19,255
7. 3-Acetil-2,5-dimetilfurano	18,110	20,357	13,736	16,848
8. Fenilacetaldeído	19,942	21,730	16,368	20,102
9. Álcool furfúrico	20,562	16,917	15,354	17,555

A diferença na selectividade e eluição dos compostos em análise, comparando a coluna WAX e as colunas de líquidos iónicos, e as colunas de líquidos iónicos entre si, pode ser explicada pela diferente composição das fases estacionárias, que conferem tipos diferentes de interacções moleculares. Enquanto a maioria das fases estacionárias convencionais, onde se inclui a coluna cromatográfica WAX, são caracterizadas por um tipo dominante de interacção (forças de dispersão, dipolo-dipolo, ligações hidrogénio, etc.), as fases estacionárias de líquidos iónicos possuem a capacidade de participar com mais de um tipo de interacção, fazendo com estas colunas cromatográficas possam demonstrar selectividades elevadas mesmo para grupos funcionais diferentes (Ragonese, *et al.*, 2012). A bipolaridade característica destas fases estacionárias, já anteriormente referida neste trabalho, é também uma consequência desta capacidade. As interacções de dispersão (nas fases estacionárias de líquidos iónicos) levam à separação de moléculas não polares. As interacções do tipo dipolar, as ligações de hidrogénio, e as interacções iónicas (atração mútua electrostática de partículas carregadas) estão envolvidas na selectividade de moléculas polares (Anderson, *et al.*, 2006; Han & Row, 2010). A ligação única entre os catiões e aniões, constituintes dos líquidos iónicos, parece ser responsável pela possibilidade de existência de uma multiplicidade de interacções (Anderson, *et al.*, 2006). Segundo a literatura, o anião tem um grande impacto na solubilização e selectividade das fases estacionárias de líquidos iónicos e consequentemente na eficiência das separações cromatográficas e na bipolaridade dos líquidos iónicos (Armstrong, *et al.*, 1999; Anderson & Armstrong, 2003; Anderson, *et al.*, 2006; Tan, *et al.*, 2012; Sanchez-Prado, *et al.*, 2012). A natureza do anião determina ainda a extensão do *tailing* que é observado nestas fases estacionárias (Anderson & Armstrong, 2003). O efeito do catião é menor, podendo influenciar a capacidade dos líquidos iónicos para interagir através de electrões não ligantes

e electrões π (Sanchez-Prado, *et al.*, 2012). As diferentes combinações entre anião e catiões têm por isso um efeito diferente na retenção e selectividade cromatográficas (Anderson, *et al.*, 2006).

No presente trabalho, a composição das fases estacionárias de líquidos iónicos utilizadas é a mesma relativamente ao anião constituinte (bis(trifluorometilsulfonyl)imida), diferindo no catião que é de base fosfónica para duas das três colunas, IL-59 (1,12-Di-(tripropilfosfonio)dodecano) e IL-76 (Tri-(tripropilfosfoniohexanamido)triethylamina) e de base imidazólica para a coluna IL-111 (1,5-Di-(2,3-dimetilimidazolio)pentano). Desta forma, as diferenças observadas devem ser explicadas tendo por base as interacções moleculares entre os catiões e os compostos em análise. Em relação às colunas de líquidos iónicos de base fosfónica a coluna IL-59 possui um catião apolar, enquanto que a coluna IL-76 apresenta um catião com uma estrutura polar. Tendo em conta o carácter apolar do catião da fase estacionária IL-59, as interacções moleculares com os compostos em análise são praticamente inexistentes, sendo provável que a retenção destes compostos na fase seja determinada pelo anião, através de interacções dipolo-dipolo com as moléculas de bis(trifluorometilsulfonyl)imida. Tendo em conta a estrutura química do catião polar da fase IL-76 e dos compostos polares analisados, possivelmente terão ocorrido interacções do tipo dipolo-dipolo, que permitiram uma maior solubilidade dos compostos nesta fase estacionária. A maior solubilidade permitiu assim uma melhor separação e resolução cromatográfica nesta coluna, IL-76, do que na coluna menos polar. Para além disso, as diferenças de retenção do álcool furfúrico relativamente às duas colunas deve-se essencialmente à possível formação de pontes de hidrogénio entre o grupo $-OH$ do álcool e os grupos $-NH$ do catião mais polar, constituinte da fase estacionária IL-76. Da mesma forma, a maior retenção do álcool furfúrico na coluna WAX pode ser explicada pela sua maior solubilidade nesta fase estacionária em relação aos outros compostos, devido à interacção polar forte entre os grupos $-OH$ da fase de polietilenoglicol e o grupo $-OH$ do álcool furfúrico. Pode colocar-se a hipótese de que a pior separação e resolução observadas na fase IL-59 em relação à outra coluna de base fosfónica e à coluna WAX, se deva à dualidade de comportamento desta fase estacionária, que faz com que seja também selectiva para moléculas apolares. Relativamente à coluna IL-111, de base imidazólica e mais polar do que as outras três colunas, as interacções dipolo-dipolo entre as moléculas em estudo e a estrutura química do catião permitiram uma melhor resolução cromatográfica do que a coluna IL-59, mas como anteriormente referido, uma pior separação do que a coluna IL-76 e WAX.

Pode concluir-se que embora todas as colunas de líquidos iónicos testadas tenham um carácter polar, a estrutura química do catião é determinante para a eficiência da fase estacionária na separação cromatográfica desta mistura de compostos em particular.

Em relação à análise do composto 5-HMF (5-Hidroximetilfurfural), verificou-se que este é cromatografável na coluna Wax, como já observado em estudos anteriores (Gaspar & Lopes, 2009) e nas colunas de líquidos iônicos IL-111 e IL-59. No entanto, na coluna IL-76 não se observou a eluição deste composto nas condições cromatográficas referidas (Figura 3.20.). Apesar desta condicionante, a coluna de líquidos iônicos IL-76 foi a escolhida para o desenvolvimento deste estudo, visto ser a mais eficiente na separação dos restantes compostos.

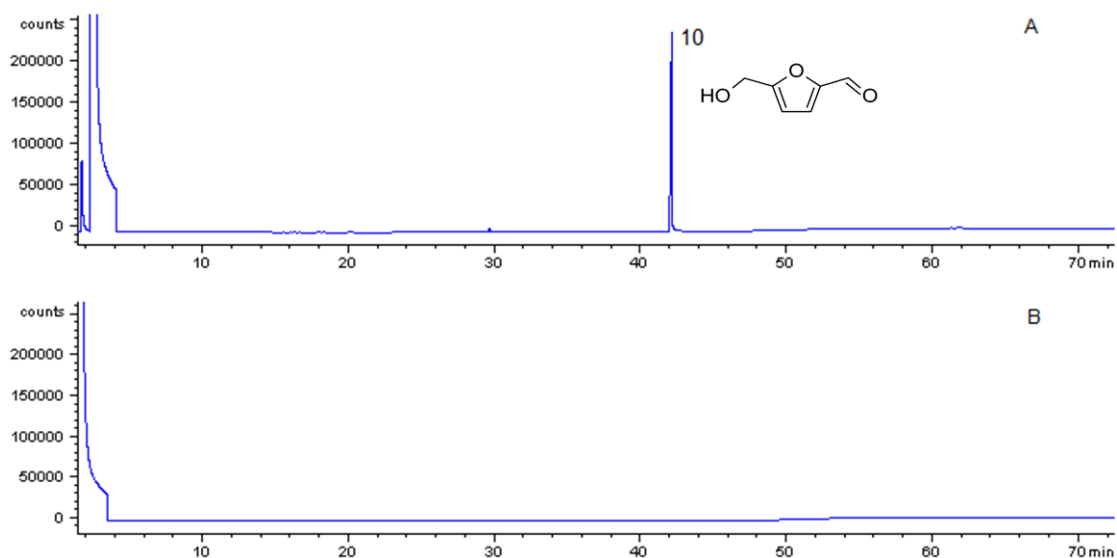


Figura 3.20. Análise do 5-Hidroximetilfurfural (5-HMF) na coluna cromatográfica Wax (A) (10. 5-HMF - 42,005 min) e na coluna cromatográfica de líquidos iônicos IL-76 (B). (Temperatura do forno: de 50 a 240°C a 4°C/min, 20min a 240°C; Gás de arrastamento: Hidrogénio [fluxo=1 mL/min]; Modo injeção: split 1/25; Injetor: 240°C; Detector: 240°C).

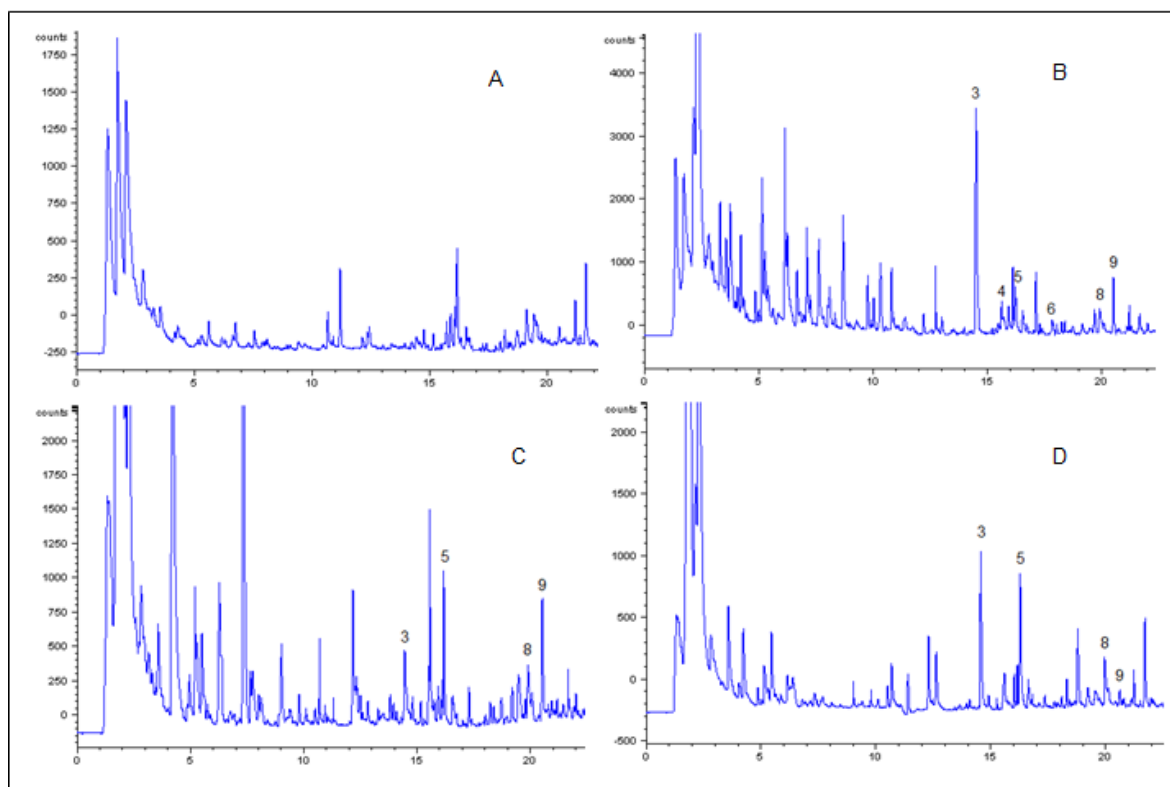
3.3.2.2. Aplicação à matriz real: batata doce

3.3.2.2.1. Análise por HS e DI-SPME-GC-FID

A separação cromatográfica dos compostos de Maillard foi assim efectuada em duas colunas, Wax e IL-76, aquando da análise por HS-SPME-GC-FID e DI-SPME-GC-FID da batata doce confeccionada pelos diferentes métodos culinários e pode ser observada nas Figura 3.21. e 3.22.. Embora os compostos de Maillard sejam considerados como sendo os responsáveis pelo característico aroma da batata doce depois da sua confecção culinária, verificou-se que não são os compostos maioritários, e que o aroma da batata doce é uma fracção complexa quando sujeita a análise por HS-SPME-GC-FID. Visto que o objectivo deste estudo se centrou na identificação dos compostos resultantes da reacção de Maillard, com destaque para os furfurais, a identificação dos outros compostos voláteis presentes na fracção não será aqui descrita, nem discutida. Alguns destes compostos encontram-se na batata doce crua e a sua libertação é potenciada e favorecida pelo aquecimento do alimento, contribuindo assim, também, para o perfil aromático da batata doce depois de confeccionada.

Verificou-se que a coluna cromatográfica de polietilenoglicol (WAX) permitiu a separação de um maior número de compostos na análise da matriz real, do que a coluna de líquidos iónicos utilizada (IL-76), sendo apenas possível identificar por HS-SPME os compostos 2-furaldeído e benzaldeído nas amostras de batata doce cozidas ou confeccionadas no micro-ondas. No caso das análises por DI-SPME o único composto que não é cromatografável por esta coluna é o 5-hidroximetilfurfural. Este resultado pode indicar uma menor adequação da coluna de líquidos iónicos para os compostos em estudo. Os resultados qualitativos e quantitativos apresentados são desta forma os relativos às análises realizadas na coluna cromatográfica WAX.

1



2

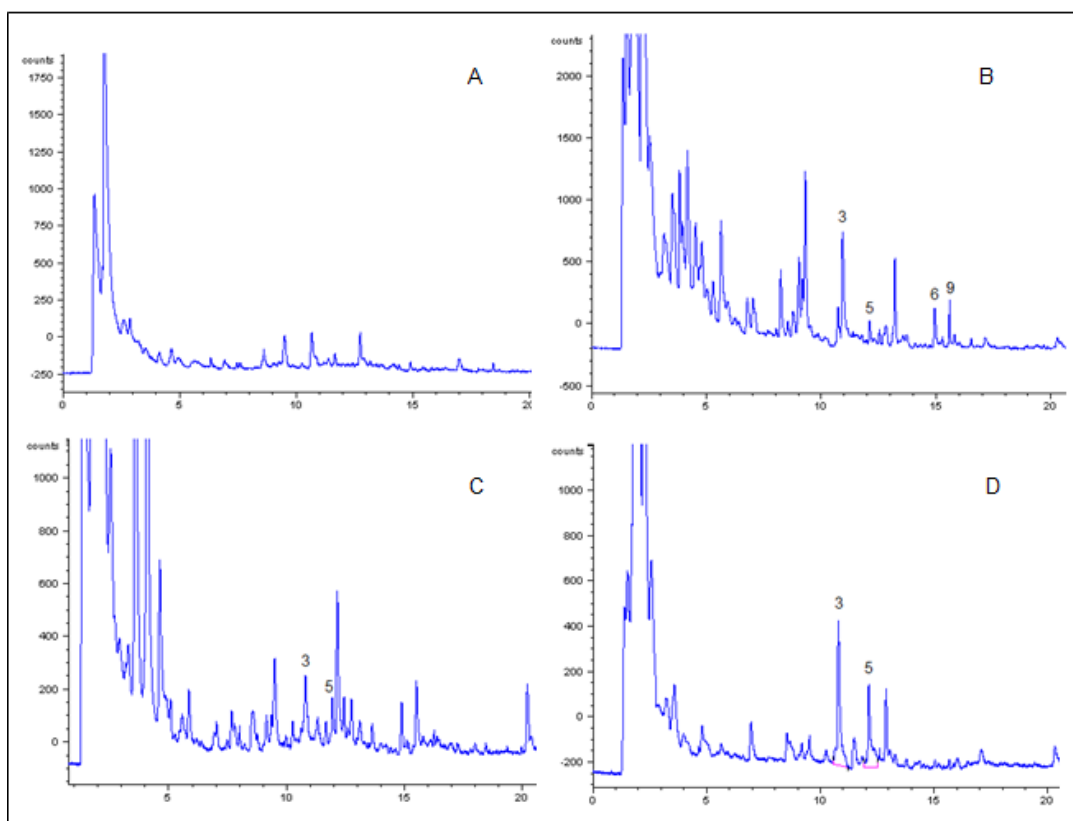
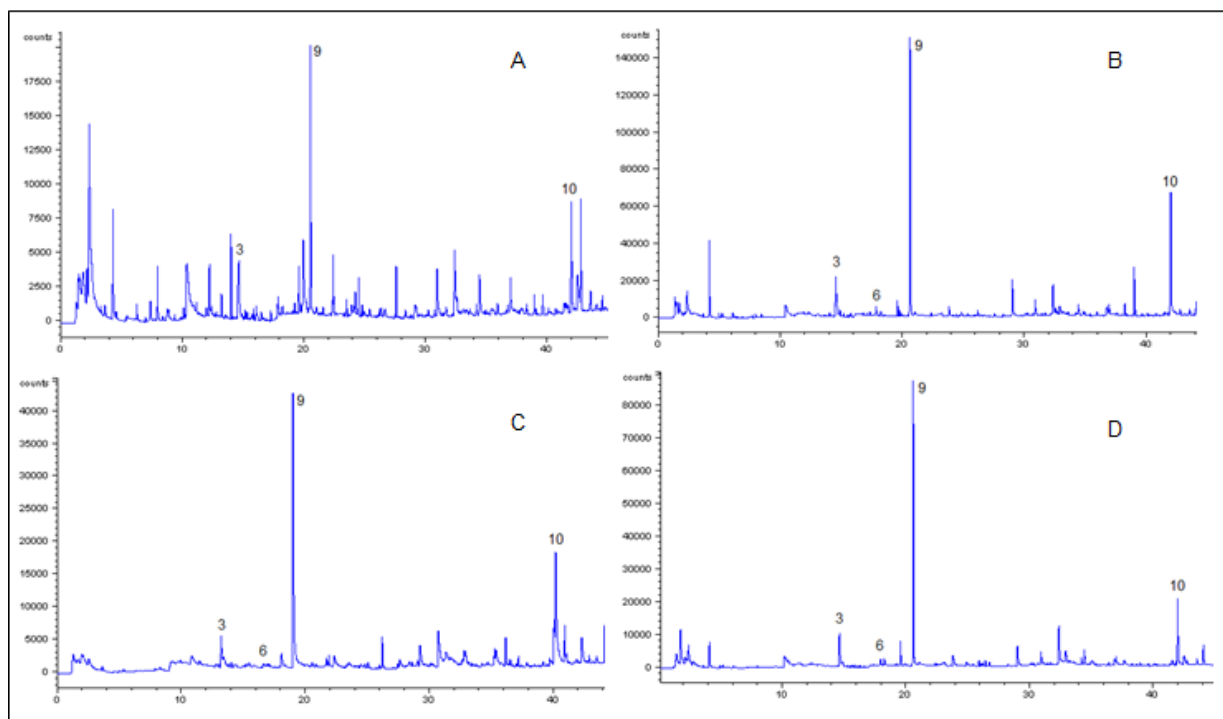


Figura 3.21. HS-SPME-GC-FID na coluna Wax (1) e IL-76 (2) da batata doce de Aljezur sujeita a diferentes métodos de confeção: A-batata crua, B-batata assada, C-batata cozida, D-batata confeccionada no microondas. Compostos: 3. 2-Furaldeído, 4. 2-Acetilfurano, 5. Benzaldeído, 6. 5-Metilfurfural, 8. Fenilacetaldéído, 9. Álcool furfurílico (Colunas: SupelcoWax 30mx0,25mm i.d.x 0,2µm df; (SLB-IL-76 30mx0,25mm i.d.x 0,2µm df; Temperatura do forno: de 50 a 240°C a 4°C/min, 20min a 240°C; Gás de arrastamento: Hidrogénio [fluxo=1 mL/min]; Modo injeção: splitless; Injector: 240 °C; Detector: 240 °C).

1



2

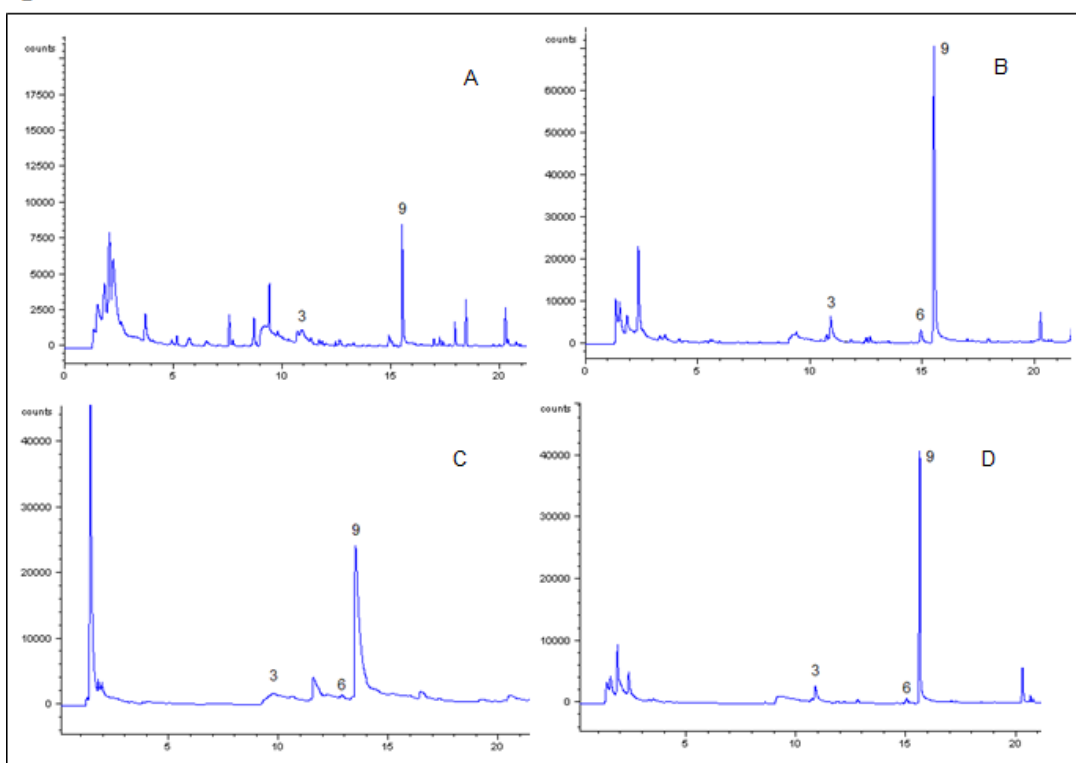


Figura 3.22. DI-SPME-GC-FID coluna Wax (1) e IL-76 (2) da batata doce de Aljezur sujeitas a diferentes métodos de confecção: A-batata crua, B-batata assada, C-batata cozida, D-batata confeccionada no micro-ondas. Compostos: 3. 2-Furaldeído, 6. 5-Metilfurfural, 9. Álcool furfurílico, 10. 5-Hidroximetilfurfural. Colunas: SupelcoWax 30mx0,25mm i.d.x 0,2 μ m df; SLB-IL-76 30mx0,25mm i.d.x 0,2 μ m df. Temperatura do forno: de 50 a 240°C a 4°C/min, 20min a 240°C; Gás de arrastamento: Hidrogénio [fluxo=1 mL/min]; Modo injeção: splitless; Injector: 240 °C; Detector: 240 °C).

3.3.2.2.2. Análise por HS e DI-SPME-GC-MS

Para a confirmação da identidade dos compostos, foram comparados os tempos de retenção com os obtidos utilizando as respectivas soluções padrão, tendo-se igualmente realizado a análise das diferentes amostras por HS-SPME-GC-MS e DI-SPME-GC-MS para obtenção e comparação dos espectros de massa dos compostos. Devido a limitações instrumentais, a análise por HS-SPME-GC-MS foi efectuada numa coluna SLB-5ms. Esta fase estacionária apolar, constituída por um polímero de silfenileno equivalente às colunas de poli(5%difenil/95% dimetil siloxano) é sobretudo utilizada na análise de compostos apolares, como por exemplo pesticidas, herbicidas e semivoláteis. A ordem de eluição dos compostos em análise nesta coluna cromatográfica tem por base as suas temperaturas de ebulição, o que se verificou para os compostos polares em estudo neste trabalho. Ao contrário do que acontece nas outras fases estacionárias que foram utilizadas, a composição química desta coluna cromatográfica faz com que ocorram forças de Van der Waals, mais fracas que as forças dipolo-dipolo e ligações de hidrogénio, entre si e os compostos analisados.

Para além dos compostos já identificados por HS-SPME-GC-FID utilizando as colunas anteriormente referidas (WAX e IL-76), foi possível identificar um outro derivado do furano, o composto 2-pentilfurano (identificação realizada com base na comparação com o espectro do composto da biblioteca NIST, tendo em consideração a correlação espectral reversa e directa de ambos os espectros). Observou-se que este composto é libertado pelas amostras de batata doce de Aljezur cozinhadas através dos três métodos: cozida, assada e micro-ondas.

Um estudo anterior relativo à variedade norte americana, Jewel, refere a presença de 2-pentilfurano na batata doce assada e, em pequenas concentrações, na batata doce cozinhada por micro-ondas, não sendo no entanto detectado nas amostras de batata doce cozida (Wang & Kays, 2001), ao contrário do que se observou no presente estudo com a batata de Aljezur. O 2-pentilfurano está associado a um aroma floral (Nakamura, *et al.*, 2013), e ao contrário dos outros compostos derivados do furano visados neste trabalho, é um produto resultante da degradação de ácidos gordos durante a confecção da batata doce (Wang & Kays, 2003), não sendo um derivado da reacção de Maillard.

Em relação à análise efectuada por DI-SPME-GC-MS, verificou-se a presença de 5-metilfurfural na amostra de batata doce crua, a qual não tinha sido observada por DI-SPME-GC-FID. Este resultado deve-se muito provavelmente à maior sensibilidade da espectrometria de massa (MS) em relação à detecção por chama (FID).

3.3.3. Microextração em fase sólida (SPME)

No presente trabalho analisaram-se os compostos de Maillard presentes na batata doce de Aljezur após a confecção culinária utilizando a microextração em fase sólida em *headspace* (HS-SPME), e utilizando igualmente a imersão directa (DI-SPME), de modo a efectuar-se, pela primeira

vez, o estudo da existência/permanência destes compostos na batata doce depois de cozinhada, podendo assim avaliar-se os teores que são ingeridos. Como referido no ponto 1.6.1. da Introdução, os compostos do aroma da batata doce foram anteriormente descritos, mas utilizando apenas a técnica de *headspace* (Sun, *et al.*, 1993; Kays, *et al.*, 1998; Wang & Kays, 2000; Wang & Kays, 2001; Wang & Kays, 2003).

A análise por HS-SPME e DI-SPME das amostras de batata doce realizou-se utilizando-se a fibra DVB/CAR/PDMS, como já referido no ponto 2.2.2. dos Materiais e Métodos deste trabalho. A escolha da fibra teve em conta os resultados obtidos em estudos anteriores, em matrizes alimentares, na análise de furfurais, 2-Furaldeído e 5-Metilfurfural por HS-SPME (Giordano, *et al.*, 2003) e na análise de 2-Furaldeído, 5-Metilfurfural e 5-Hidroximetilfurfural usando DI-SPME (Gaspar & Lopes, 2009). Relativamente ao tempo de exposição da fibra, foi tido em consideração o modelo dinâmico para o método de preparação de amostra com SPME proposto por Ai e colaboradores (Ai, 1997a; Ai, 1997b), em que a quantidade de analito adsorvido pela fibra, a partir da amostra em análise, é proporcional à concentração inicial do analito na amostra, se a agitação e o tempo de amostragem for mantido constante entre as amostras da mesma matriz analisada. Visto que frequentemente o equilíbrio não é alcançado ou é alcançado em períodos de tempo muito longos, esta abordagem alternativa permite a quantificação sob condições de não-equilíbrio que faz com que tempos de extracção mais curtos possam ser desenvolvidos e utilizados. Em estudos anteriores a análise de compostos de Maillard por SPME teve como tempo de extracção 40 min para HS-SPME (Giordano, *et al.*, 2003) e 2h para DI-SPME (Gaspar & Lopes, 2009). Neste estudo utilizou-se por isso um tempo de extracção de 2h tanto para o estudo em imersão directa (DI-SPME) como para análise em *headspace* da fibra (HS-SPME) de modo a poderem-se comparar os resultados das duas análises.

3.3.3.1. Desenvolvimento e validação do método analítico

De modo a avaliar as diferenças quantitativas dos compostos de Maillard entre os três métodos de confecção alimentar realizou-se a sua quantificação com base nos parâmetros de qualidade da metodologia analítica, tais como os limites de detecção (LODs) e limites de quantificação (LOQs), linearidade, precisão e recuperação, nas condições anteriormente optimizadas para HS-SPME-GC-FID e DI-SPME-GC-FID.

3.3.3.1.1. Linearidade

A linearidade de resposta para HS-SPME-GC-FID e DI-SPME-GC-FID foi estudada usando soluções padrão de concentrações indicadas no ponto 2.2.4..

A variação de concentrações, as equações de calibração e os coeficientes de correlação (R^2) obtidos encontram-se apresentados nas tabelas 3.5. e 3.6.. Observou-se uma boa linearidade no intervalo de concentrações estudado com valores de R^2 entre 0,9849 e 0,9972 para a análise por HS-SPME-GC-FID, e entre 0,9910 e 0,9996 para análise por DI-SPME-GC-FID, demonstrando-se assim a

relação proporcional entre a quantidade extraída pela SPME e a concentração inicial dos compostos de Maillard nas amostras.

3.3.3.1.2. Sensibilidade

O limite de detecção (LOD) e o limite de quantificação (LOQ) foram determinados usando as linhas de regressão, obtidas a partir do sinal resultante da gama de concentrações para cada composto. O LOD é considerado como sendo o sinal mais baixo detectado pelo instrumento de análise, e pode ser determinado pela equação $LOD=yB+3,3SB$, em que yB e SB são respectivamente o sinal obtido da amostra branca (amostra isenta do composto de interesse) e o seu desvio padrão. O LOQ representa o sinal mais baixo quantificável e é igual ao sinal do branco mais 10 vezes o seu desvio-padrão ($LOD=yB+10SB$). O sinal do branco, yB pode ser obtido pela média de várias leituras de um "campo em branco", sendo o desvio padrão das várias leituras representado por SB . No presente estudo, devido às características do aparelho de análise, que não permite a medição automatizada do campo em branco, utilizou-se a intercepção da recta no eixo das ordenadas ($x=0$) como a medida de yB (sinal do branco) e a estimativa do desvio padrão absoluto, Sx/y , como uma estimativa de SB (Miller & Miller, 1988; Miller, 1991; IPAC, 2011). Tanto o LOD como o LOQ foram convertidos nas suas concentrações correspondentes através das expressões $LOD=3,3Sx/y/b$ e $LOQ=10Sx/y/b$, em que b é o declive da linha de regressão/recta de calibração ($y=bx+a$) (Miller & Miller, 1988; Miller, 1991; IPAC, 2011). Os valores de LOD e LOQ para os diferentes compostos, para HS-SPME-GC-FID e DI-SPME-GC-FID, encontram-se nas tabelas 3.5. e 3.6.. Verificou-se que para HS-SPME-GC-FID o limite de detecção do composto 2-furaldeído foi de 0,069ug/L, bastante abaixo do descrito num estudo anterior utilizando a mesma fibra de SPME para análise do mesmo composto, que foi de 15ug/L (Giordano, *et al.*, 2003).

A determinação estatística do LOD e LOQ no presente trabalho foi efectuada de acordo com o guia para a acreditação de laboratórios químicos da IPAC (IPAC, 2011).

3.3.3.1.3. Precisão

A fim de avaliar a precisão do método analítico aplicado no presente estudo, foi estimada o RSD.. A percentagem de desvio padrão relativo (RSD), variou entre 5,38 e 19,19 para a análise com HS-SPME-GC-FID e entre 14,82 e 17,48 para a análise com DI-SPME-GC-FID. Alguns estudos referem que para pequenas quantidades analisadas, como é o caso do presente estudo, um limite até 20% de RSD é aceite. A precisão deste estudo encontra-se por isso dentro dos limites aceitáveis ($RSD<20\%$) (Ribani, *et al.*, 2004). Em relação às directivas da UE 2003/78/EC, os resultados intralaboratoriais de RSD devem ser $<30\%$ para concentrações abaixo dos 20ppb, $<20\%$ para concentrações entre 20 a 50ppb e $<15\%$ para concentrações maiores (União Europeia 2003) (Katerere, *et al.*, 2008).

Tabela 3.5. Parâmetros analíticos do método HS-SPME-GC-FID, para a análise dos compostos de Maillard na batata doce cozinhada. LOD – Limite de detecção; LOQ – Limite de quantificação.

Composto	Linearidade			LOD (ug/L)	LOQ (ug/L)	Precisão (RSD %) (n=4)
	Varição de concentrações (ug/L)	Equação da recta de calibração	R2			
2-Furaldeído	0,058-0,696	$y = 116989,00x - 3462,9$	0,9948	0,069	0,210	16,10
2-Acetilfurano	0,055-0,218	$y = 217237x - 2617,9$	0,9948	0,021	0,062	29,29
Benzaldeído	0,052-0,208	$y = 330298x + 655,32$	0,9849	0,034	0,100	14,44
5-Metilfurfural	0,055-0,221	$y = 170997,00x - 1949,2$	0,9972	0,015	0,050	5,38
Fenilacetaldéido	0,051-0,257	$y = 126641x - 1830,8$	0,9902	0,055	0,170	15,77
Álcool furfurílico	0,057-0,226	$y = 214732x - 4119,7$	0,9935	0,024	0,070	19,19

Tabela 3.6. Parâmetros analíticos do método DI-SPME-GC-FID para a análise dos compostos de Maillard na batata doce cozinhada. LOD – Limite de detecção; LOQ – Limite de quantificação.

Composto	Linearidade			LOD (mg/L)	LOQ (mg/L)	Precisão (RSD %) (n=4)
	Varição de concentrações (mg/L)	Equação da recta de calibração	R2			
2-Furaldeído	0,01-5,80	$y = 20375x + 8063,3$	0,9910	0,680	2,060	15,07
5-Metilfurfural	0,11-2,21	$y = 34734x + 6485,8$	0,9996	0,069	0,211	17,48
Álcool furfurílico	22,64-90,56	$y = 5923,7x + 81213$	0,9945	8,820	26,700	14,82
5-HMF	120-1600	$y = 402,35x - 17579$	0,9991	69,870	211,740	16,54

3.3.3.1.4. Efeito de matriz

Relativamente ao estudo para avaliação do efeito de matriz, a análise por HS-SPME-GC-FID revelou que a taxa de recuperação para os diferentes compostos é muito baixa e em alguns casos não é quantificável, tendo-se registado percentagens de recuperação para o benzaldeído de 19% na batata assada e 8% na batata cozida e para o álcool furfurílico de 9% na batata cozida. Desta forma, verificou-se a existência de um efeito de matriz relativamente a todos os compostos analisados, através deste método de análise. Este pode ser devido à natureza dos compostos estudados, pouco voláteis e também à metodologia utilizada. A quantificação realizada por este método deve estar, por isso, subestimada. O efeito de matriz é bem conhecido na análise de resíduos de pesticidas em produtos alimentares (Rantakokko, *et al.*, 2004), e foi também mencionado na análise de patulina em maçã (Katerere, *et al.*, 2008). O mel evidenciou também um elevado efeito de matriz, demonstrando uma baixa taxa de recuperação, em furfurais, especialmente em relação ao 5-HMF (Gaspar & Lucena, 2009).

Na análise por DI-SPME-GC-FID, pelo contrário, as percentagens de recuperação encontram-se entre os 87% e os 127%, não se verificando efeito de matriz (Tabela 3.7.).

Tabela 3.7. Recuperações obtidas pelo método DI-SPME-GC-FID utilizado na análise de batata doce de Aljezur cozinhada através de três métodos diferentes

Composto	Recuperação (%)		
	Assada	Cozida	Micro-ondas
2-Furaldeído	89	108	127
5-Metilfurfural	87	115	87
Álcool furfurílico	89	106	99
5-HMF	90	123	85

4. Conclusões e perspectivas futuras

A batata doce é uma cultura agrícola de importância global, sendo um dos alimentos mais consumidos nos países em desenvolvimento devido ao seu modo de cultivo, à sua produtividade e às suas características nutritivas e nutraceuticas. Em relação aos países desenvolvidos, alguns consideram-no um alimento *gourmet* e outros como os EUA, por exemplo, têm vindo a reduzir o seu consumo devido principalmente às suas características organolépticas. Em Portugal, a batata doce é cada vez mais vista como um alimento saudável com bastantes utilizações na nossa cozinha mediterrânica. A batata doce de Aljezur, objecto de estudo neste trabalho, é um produto alimentar com características distintivas e reconhecidas pela União Europeia, sendo um exemplo da qualidade dos produtos agrícolas do nosso país. Para além do trabalho científico realizado, esta dissertação de Doutoramento contribui também para a divulgação deste alimento e desta variedade.

O reconhecimento de que as funções das raízes das plantas envolvem mais do que absorção de água e de nutrientes levaram à investigação deste órgão relativamente à sua interacção com os microorganismos do solo, como aquela que origina o estabelecimento de relações simbióticas com fungos micorrízicos. As raízes são reconhecidas como sendo um local de actividade metabólica única, sendo os seus exudados os principais responsáveis no desenvolvimento de micorrizas. A batata doce é uma das culturas agrícolas que se associa a fungos micorrízicos, verificando-se um aumento do crescimento da biomassa das raízes tuberculosas e a redução de aplicação de fósforo nos campos agrícolas. O desenvolvimento de culturas *in vitro* e a sua utilização para o estudo destas interacções pode contribuir para a compreensão do diálogo químico entre a planta e o fungo. O desenvolvimento de culturas de batata doce *in vitro* neste trabalho, permitiu mimetizar a propagação vegetativa *in vivo* da batata doce no campo de cultura. Este trabalho demonstrou que a batata doce se adaptou aos diferentes meios de cultura, observando-se um maior crescimento dos explantes em meio MS (Murashige & Skoog, 1962). Esta metodologia poderá futuramente permitir a produção rápida de explantes para plantação no campo de cultivo, e o estudo da simbiose micorrízica, tendo em conta que em todos os meios de cultura se verificou o enraizamento das plântulas. Relativamente à produção de raízes transgénicas de batata doce de Aljezur, observou-se uma grande facilidade na sua obtenção, concluindo-se que a raiz tuberosa é um bom material para a inoculação com *Agrobacterium rhizogenes*. Os extractos obtidos dos exudados destas raízes revelaram a existência de diferenças entre os exudados das raízes crescidas no meio com pouco fósforo e azoto (MSR (modified Strullu Romand) e o meio SH (Schenk & Hildebrandt, 1972), tendo sido identificada a presença de 2-metil-1-butanol. Este composto pode indicar o envolvimento, ainda pouco estudado, dos compostos voláteis na interacção entre o fungo e a planta. No entanto, serão necessários mais estudos relativamente à sua actividade no desenvolvimento dos fungos endomicorrízicos. Tendo em conta que este é um composto quiral, terá também muito interesse compreender se existem diferenças de bioactividade entre estereoisómeros. Por outro lado, a constatação da presença de dois

compostos com actividade antifúngica nos exsudados das raízes transgénicas de batata doce, o ácido benzóico e o ácido fenilacético, pode ser a razão pela qual as hifas dos fungos *Glomus clarum* e *Glomus intraradices* não se desenvolveram. Estes compostos foram também identificados nos exsudados das raízes crescidas em água, podendo considerar-se que a sua biossíntese se realiza também *in vivo* e que está relacionada com a reconhecida resistência desta planta em relação a fungos e patógenos do solo. Visto que as raízes transgénicas, *hairy roots*, são cada vez mais utilizadas como sistema para o estudo da produção de metabolitos secundários, devido à sua estabilidade genética e bioquímica, ao seu crescimento rápido num meio sem reguladores de crescimento, será interessante a futura implementação de mais estudos com raízes transgénicas de batata doce, considerando-se que poderá ser também um bom modelo biológico na investigação da alelopatia entre raízes e organismos do solo.

Relativamente aos compostos de Maillard presentes na batata doce de Aljezur, a análise foi efectuada por micro-extracção em fase sólida associada à cromatografia gasosa com detecção de ionização de chama e também por espectrometria de massa, HS-SPME-GC-FID/MS e DI-SPME-GC-FID/MS. Verificou-se a existência de diferenças qualitativas e quantitativas na composição química do aroma obtido nos três diferentes métodos de confecção culinária utilizados. Este estudo, pela primeira vez, demonstrou que para além de estarem presentes no aroma da batata doce, alguns dos compostos permanecem no alimento depois de confeccionado, sendo a sua quantidade maior do que a encontrada no aroma. A batata doce assada é a que maior quantidade apresenta de compostos derivados da reacção de Maillard. Este facto é devido quer às temperaturas que são atingidas, como ao modo como o calor penetra no alimento, usando este método de confecção culinária. Relativamente à potencial toxicidade dos compostos analisados, para além de existir pouca legislação respeitante ao seu consumo, verifica-se que embora os estudos toxicológicos *in vitro* refiram a existência de toxicidade, os compostos 2-furaldeído e 5-hidroximetilfurfural, são metabolizados *in vivo*, sendo excretados através da urina na forma de outros compostos. Em trabalhos futuros, seria interessante a aplicação do método de análise desenvolvido, no estudo de outras variedades de batata doce, de modo a identificar diferenças quantitativas que pudessem levar à distinção de variedades relativamente ao seu conteúdo em furfurais. Este trabalho também tornou possível o estudo do comportamento de novas colunas cromatográficas constituídas por fases estacionárias de líquidos iónicos (IL). Apesar de todas as colunas IL testadas serem polares, verificou-se que é necessário ter em conta no seu comportamento cromatográfico a dualidade da sua constituição funcional na estrutura química dos seus líquidos iónicos, tendo também em consideração a natureza química dos compostos a analisar.

5. Bibliografia

Adams, T.B., Doull, J., Goodman, J.I., Munro, I.C., Newberne, P., Portoghese, P.S., Smith, R.L., Wagner, B.M., Weil, C.S., Woods, L.A., Ford, R.A. (1997). The FEMA GRAS Assessment of Furfural Used as a Flavour Ingredient. Flavor and Extract Manufacturers Association. *Food and Chemical Toxicology*, 35, 739-751.

Adelberg, J.W., Desamero, N.V., Hale, S.A., Young, R.E. (1997). Long-term nutrient and water utilization during micropropagation of *Cattleya* on a liquid/membrane system. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 48, 1-7.

Ai, J. (1997a). Solid Phase Microextraction for Quantitative Analysis in Nonequilibrium Situations. *Analytical Chemistry*, 69, 1230-1236.

Ai, J. (1997b). *Headspace* Solid Phase Microextraction, Dynamics and Quantitative Analysis before Reaching a Partition Equilibrium. *Analytical Chemistry*, 69, 3260-3266.

Akhtar e Siddiqui 2008) Akhtar, M.S., Siddiqui, Z.A. (2008). Arbuscular mycorrhizal fungi as potential bioprotectants against plant pathogens. In A. Siddiqui *et al.* (Eds.), *Mycorrhizae: Sustainable Agriculture and Forestry* (pp. 61-97). Springer Science + Business Media B.V.. Akiyama, K., Matsuzaki, K., Hayashi, H. (2005). Plant sesquiterpenes induce hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature letters*, 435, 824-827.

Akond, M.A., Mubassara, S., Rahman, M.M., Alam, S., Khan, Z.U.M. (2008). Status of Vesicular-arbuscular (VA) Mycorrhizae in Vegetable Crop Plants of Bangladesh. *World Journal of Agricultural Sciences*, 4(6), 704-708.

Alam, I., Sharmin, S.A., Naher, M.K., Alam, M.J., Anisuzzaman, M., Alam M.F. (2010). Effect of growth regulators on meristem culture and plantlet establishment in sweet potato [*Ipomoea batatas* (L.) Lam.]. *Plant Omics Journal*, 3(2), 35-39.

Amal, A.H.H. (2009). Control of bean root-rot diseases by using resistance chemical inducers. *Alexandria Journal of Agricultural Research*, 54(1), 175-187.

Ames, J. M. (1998). Applications of the Maillard reaction in the food industry. *Food Chemistry*, 62(4), 431-439.

Anaya, A.L., Hernandez-Bautista, B.E., Jimenez-Estrada, M., Velasco-Ibarra, L. (1992). Phenylacetic acid as a phytotoxic compound of corn pollen. *Journal of Chemical Ecology*, 18(6), 897-905.

Anderson, J.L., Armstrong, D.W. (2003). High-Stability Ionic Liquids. A New Class of Stationary Phases for Gas Chromatography. *Analytical Chemistry*, 75, 4851-4858.

Anderson, J.L., Armstrong, D.W., Wei, G.-T. (2006) Ionic liquids in Analytical Chemistry. *American Chemical Society/Analytical Chemistry*, 2893-2902.

Antunes, P.M., Schneider, K., Hillis, D., Klironomos, J.N. (2007). Can the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* actively mobilize P from rock phosphates? *Pedobiologia*, 51, 281-286.

Araujo, B.S., Dec, J., Bollag, J.M., Pletsch, M. (2006). Uptake and transformation of phenol and chlorophenols by hairy root cultures of *Daucus carota*, *Ipomoea batatas* and *Solanum aviculare*. *Chemosphere*, 63, 642–651.

Armstrong, D. W., He, L., Liu, Y.-S. (1999). Examination of Ionic Liquids and Their Interaction with Molecules, When Used as Stationary Phases in Gas Chromatography. *Analytical Chemistry*, 71, 3873-3876. Arthur, C.L., Pawliszyn, J. (1990). Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. *Analytical Chemistry*, 62(19), 2145-2148.

Associação de Produtores de Batata Doce de Aljezur (2008). Batata Doce de Aljezur, Indicação Geográfica Protegida, Caderno de Especificações. *Associação de Produtores de Batata doce de Aljezur*, 1-54.

Azul, A.M., Ramos, V., Pato, A., Azenha, M., Freitas, H. (2008). Mycorrhizal types in the Mediterranean Basin: safety teaching and training. *Journal of Biological Engineering*, 42(3), 130-137.

Bais, H.P., Weir, T.L., Perry, L.G., Gilroy, S., Vivanco, J.M. (2006). The Role of Root Exudates in Rhizosphere Interactions with Plants and Other Organisms. *Annual Review of Plant Biology*, 57, 233-66.

Barkawi, L.S., Tam, Y.Y., Tillman, J.A., Pederson, B., Calio, J., Al-Amier, H., Emerick, M., Normanly, J., Cohen, J.D. (2008). A high-throughput method for the quantitative analysis of indole-3-acetic acid and other auxins from plant tissue. *Analytical Biochemistry*, 372, 177-188.

Becard, G., Douds, D.D., Pfeffer, P.E. (1992). Extensive *In vitro* Hyphal Growth of Vesicular-Arbuscular Mycorrhizal Fungi in the Presence of CO₂ and Flavonols. *Applied and Environmental Microbiology*, 58(3), 821–825.

Bécard, G., Fortin, J.A. (1988). Early events of vesicular-arbuscular mycorrhiza formation on Ri T-DNA transformed roots. *New Phytologist*, 108(2), 211–218.

Bécard, G.B., Piche, Y. (1989). Fungal Growth Stimulation by CO₂ and Root Exudates in Vesicular-Arbuscular Mycorrhizal Symbiosis. *Applied and Environmental Microbiology*, 55(9), 2320–2325.

Bengtsson, A., Namutebi, A., Larsson, A.M., Svanberg, U. (2008). Effects of various traditional processing methods on the all-trans- β -carotene content of orange-fleshed sweet potato. *Journal of Food Composition and Analysis*, 21, 134-143.

Bi, Y., Li, X., Wang, H., Christie, P. (2004). Establishment of monoxenic culture between the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus sinuosum* and Ri T-DNA-transformed carrot roots. *Plant and Soil*, 261, 239-244.

Birkemeyer, C., Kolasa, A., Kopka, J. (2003). Comprehensive chemical derivatization for gas chromatography–mass spectrometry-based multi-targeted profiling of the major phytohormones. *Journal of Chromatography A*, 993, 89-102.

Bojórquez-Pereznieto, H., Toresano-Sánchez, F., Diánez-Martínez, F., Palmero-Llamas, D., Camacho-Ferre, F. (2013). Effect of the application of jasmonic acid and benzoic acid on grafted watermelons yield under greenhouse conditions in the southeast of Spain for mitigation of stress. *Journal of Food, Agriculture & Environment*, 11(1), 349-352.

Bonfante, P., Genre, A. (2010). Mechanisms underlying beneficial plant – fungus interactions in mycorrhizal symbiosis. *Nature Communications*, 1(48), 1-11.

Bonino M., Schellino R., Rizzi C., Aigotti R., Delfini C., Baiocchi C.. Aroma compounds of an Italian wine (Ruché) by HS–SPME analysis coupled with GC–ITMS. *Food Chemistry* 80 (2003) 125–133.

Bourgaud, F., Gravot, A., Milesi, S., Gontier, E. (2001). Production of plant secondary metabolites: a historical. *Plant Science*, 161, 839-851.

Boutou, S., Chatonnet, P. (2007). Rapid *headspace* solid-phase microextraction/gas chromatographic/mass spectrometric assay for the quantitative determination of some of the main odorants causing off-flavours in wine. *Journal of Chromatography A*, 1141(1), 1-9.

Bressan, W. (2002). Factors affecting “in vitro” plant development and root colonization of sweet potato by *Glomus etunicatum* Becker&Gerd. *Brazilian Journal of Microbiology*, 33, 31-34. Brito, I., Carvalho, M. de, van Tuinen, D., Goss, M.J. (2007). Efeito da mobilização do solo nas micorrizas arbusculares de cereais de Inverno. *Revista de Ciências Agrárias*, 30(1), 48-56.

Campanella, J.J., Olajide, A.F., Magnus, V., Ludwig-Muller, J. (2004). A Novel Auxin Conjugate Hydrolase from Wheat with Substrate Specificity for Longer Side-Chain Auxin Amide Conjugates. *Plant Physiology*, 135, 2230-2240.

Cann, A.F., Liao, J.C. (2008). Production of 2-methyl-1-butanol in engineered *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 81, 89-98.

Carvalho, I.S., Cavaco, T., Carvalho, L.M., Duque, P. (2010). Effect of photoperiod on flavonoid pathway activity in sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) leaves. *Food Chemistry*, 118, 384-390.

Cary, R., Dobson, S., Gregg, N. (2000). Concise International Chemical Assessment Document 21 2-FURALDEHYDE. *World Health Organization*, 1-27.

Castañeda-Ovando, A., Pacheco-Hernández, M.L., Páez-Hernández, M.E., Rodríguez, J.A., Galán-Vida, C.A. (2009). Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chemistry*, 113, 859–871.

Cavalli, J.-F., Fernandez, X., Lizzani-Cuvelier, L., Loiseau, A.-M. (2004). Characterization of volatile compounds of French and Spanish virgin olive oils by HS-SPME: Identification of quality-freshness markers. *Food Chemistry*, 88(1), 151-157.

Cevallos-Casals, B.A., Cisneros-Zevallos, L. (2003). Stoichiometric and Kinetic Studies of Phenolic Antioxidants from Andean Purple Corn and Red-Fleshed Sweetpotato. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(11), 3313-3319.

Chabaud, M., Harrison, M., Carvalho-Niebel, F., Bécard, G., Barker, D.G. (2006). Inoculation and Growth with Mycorrhizal Fungi. Em *Medicago truncatula handbook* (pp. 1-15). The Samuel Roberts Nobel Foundation.

Chabot, S., Bel-rhlid, R., Chenevert, R., Pichê, Y. (1992). Hyphal growth promotion *in vitro* of the VA mycorrhizal fungus, *Gigaspora margarita* Becker & Hall by the activity of structurally specific flavonoid compounds under CO-enriched conditions. *New Phytologist*, 122, 461-467.

Chandran, R. P., Potty, V.P. (2008). Induction of hairy roots through the mediation of four strains of *Agrobacterium rhizogenes* on five host plants. *Indian Journal of Biotechnology*, 7, 122-128.

Chandran, R.P., Potty, V.P. (2011). Different inducer molecules and strains of *Agrobacterium rhizogenes* on Enhancing transformation frequency in host plants. *Biotechnology*, 203-208.

Chel-Guerrero, L., Cruz-Cervera, G., Betancur-Ancona, D., Solorza-Feria, J. (2011). Chemical composition, thermal and viscoelastic characterization of tuber starches growing in the Yucatan peninsula of Mexico. *Journal of Food Process Engineering*, 34(2), 363–382.

Choi, P.S., Kim, Y.D., Choi, K.M., Chung, H.J., Choi, D.W., Liu, J.R. (2004). Plant regeneration from hairy-root cultures transformed by infection with *Agrobacterium rhizogenes* in *Catharanthus roseus*. *Plant Cell Report*, 22, 828 – 831

Chon, S.-U., Boo, H.-O. (2005). Difference in Allelopathic Potential as Influenced by Root Periderm Colour of Sweet Potato (*Ipomoea batatas*). *Journal Agronomy & Crop Science*, 191, 75-80.

CIP - International potato Center – Centro Internacional de la Papa. (2010). Facts and figures about sweetpotato. Recuperado em 2008, do site <http://sweetpotatoknowledge.org/sweetpotatointroduction/Facts%20and%20Figures%20about%20Sweetpotato.pdf#>

CIP - International potato Center – Centro Internacional de la Papa. (2011). Why Invest in Vitamin A rich Sweetpotato. Recuperado em 2011, do site <http://sweetpotatoknowledge.org/adding-value/Chris%20Muhango%20-%20Sample%20brief-1.pdf>

CIP - International potato Center – Centro Internacional de la Papa. (2003). VITAA – The vitamin A for Africa partnership – paving the way the way for food-based solutions to undernutrition. Recuperado em 2003, do site <http://sweetpotatoknowledge.org/use-consumption/nutritional-information/VITAA%20The%20Vitamin%20A%20for%20Africa%20Partnership%20Paving%20the%20way%20for%20Food-Based%20Solutions%20to%20Undernutrition.pdf>

Cranenbrouck, S., Voets, L., Bivort, C., Renard, L., Strullu, D.-G., Declerck, S. (2005). Methodologies for *in vitro* Cultivation of Arbuscular Mycorrhizal Fungi with Root Organs. Em S.

Declerck, D.-G. Strullu, e A. Fortin (Eds.), *In vitro Culture of Mycorrhizas* (pp.341-375). Berlim: Springer-Verlag Heidelberg.

Cruz, C., Egsgaard, H., Trujillo, C., Ambus, P., Requena, N., Martins-Loução, M.A., Jakobsen, I. (2007). Enzymatic Evidence for the Key Role of Arginine in Nitrogen Translocation by Arbuscular Mycorrhizal Fungi. *Plant Physiology*, 144, 782-792.

Cwala, Y., Laubscher, C.P., Ndakidemi, P.A. Meyer, A.H. (2010). Mycorrhizal root colonisation and the subsequent host plant response of soil less grown tomato plants in the presence and absence of the mycorrhizal stimulant, Mycotech. *African Journal of Microbiology Research*, 4(5), 414-419.

Dalpé, Y., Declerck, S. (2002). Development of *Acaulospora rehmii* spore and hyphal swellings under root-organ culture. *Mycologia*, 94(5), 850–855.

Declerck, S., Strullu, D.G., Plenchettez, C. (1996). *In vitro* mass-production of the arbuscular mycorrhizal fungus, *Glomus versiforme*, associated with Ri T-DNA transformed carrot roots. *Mycology Research*, 100(10), 1237-1242.

Dini, I., Tenore, G.C., Dini, A. (2006). New Polyphenol Derivative in *Ipomoea batatas* Tubers and Its Antioxidant Activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(23), 8733–8737.

Dobrev, P.I., Havlíček, L., Vagner, M., Malbeck, J., Kaminek, M. (2005). Purification and determination of plant hormones auxin and abscisic acid using solid phase extraction and two-dimensional high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1075, 159-166.

Dominguez, P.L. (1992). Feeding of sweet potato in monogastrics. Em D. Machin, S. Nyvold (Eds), *Roots, tubers, plantains and bananas in animal feeding (Animal Production and Health Paper No 95)* (pp. 217–233). Roma, Itália: Food and Agriculture Organization.

Douds Jr., D.D. (2002). Increased spore production by *Glomus intraradices* in the split-plate monoxenic culture system by repeated harvest, gel replacement, and resupply of glucose to the mycorrhiza. *Mycorrhiza*, 12, 163-167.

Douds Jr., D.D., Galvez, L., Bécard, G., Kapulnik, Y. (1998). Regulation of arbuscular mycorrhizal development by plant host and fungus species in alfalfa. *New Phytologist*, 138, 27-35.

Douds Jr., D.D., Nagahashi, G., Pfeffer, P.E., Kayser, W.M., Reider, C. (2005). On-farm production and utilization of arbuscular mycorrhizal fungus inoculum. *Canadian Journal of Plant Science*, 85(1), 15-21.

Dunlap, J.R., Guinn, G. (1989). A Simple Purification of Indole-3-Acetic Acid and Abscisic Acid for GC-SIM-MS Analysis by Microfiltration of Aqueous Samples through Nylon. *Plant Physiology*, 90, 197-201.

Durgbanshi, A., Arbona, V., Pozo, O., Miersch, O., Sancho, J.V., Cadenas, A.G. (2005). Simultaneous determination of multiple phyto- hormones in plant extracts by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 53, 8437-8442.

Durmaz, G., Gökmen, V. (2010). Determination of 5-hydroxymethyl-2-furfural and 2-furfural in oils as indicators of heat pre-treatment. *Food Chemistry*, 123, 912-916.

Eisert, R., Pawliszyn, J. (1997). Automated In-Tube Solid-Phase Microextraction Coupled to High-Performance Liquid Chromatography. *Analytical Chemistry*, 69, 3140-3147.

Ek, M., Ljungquist, P.O., Stenstrom, E.A. (1983). Indole-3-acetic acid production by mycorrhizal fungi determined by gas chromatography-mass spectrometry. *New Phytologist*, 94, 401-407.

El Far, M.M.M. (2007). Optimization of growth conditions during sweetpotato micro-propagation. *African Potato Association Conference Proceedings*, 7, 204-211.

El Far, M.M.M., Ashoub, A. (2003). Biotechnology Applications for Improving Sweetpotato Production. Recuperado em 2003, do site <http://sweetpotatoknowledge.org/germplasm/research-methods/El-Riadh%20poster-2009.pdf#>

El Far, M.M.M., Taie, H.A.A. (2009). Antioxidant Activities, Total Anthocyanins, Phenolics and Flavonoids Contents of Some Sweetpotato Genotypes under Stress of Different Concentrations of Sucrose and Sorbitol. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 3(4), 3609-3616.

Epstein, E., Ludwig-Müller, J. (1993). Indole-3-butyric acid in plants: occurrence, synthesis, metabolism and transport. *Physiologia Plantarum*, 88(2), 382-389.

Escalante-Sanchez, E., Pereda-Miranda, R. (2007). Batatins I and II, Ester-Type Dimers of Acylated Pentasaccharides from the Resin Glycosides of Sweet Potato. *Journal Natural Products*, 70(6), 1029-1034.

Escalante-Sanchez, E., Rosas-Ramirez, D., Linares, E., Bye, R., Pereda-Miranda, R. (2008). Batatinosides II-VI, Acylated Lipooligosaccharides from the Resin Glycosides of Sweet Potato. *Journal Agricultural Food Chemistry*, 56(20), 9423-9428.

Eskandari, A., Danesh, Y.R. (2010). Study on life cycle of arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* using *in vitro* culturing technique. *Journal of Phytology Microbiology*, 2(6), 69-75.

European Union (2008). Publication of an application pursuant to Article 6(2) of Council Regulation (EC) No510/2006 on the protection of geographical indications and designations of origin for agricultural products and foodstuffs. *Official Journal of the European Union*, C324, 31-33.

Ezawa, T., Hayatsu, M., Saito, M. (2005). A New Hypothesis on the Strategy for Acquisition of Phosphorus in Arbuscular Mycorrhiza: Up-Regulation of Secreted Acid Phosphatase Gene in the Host Plant. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 18(10), 1046-1053.

Farag, M.A., Ryu, C.-M., Sumner, L.W., Pare, P.W. (2006). GC-MS SPME profiling of rhizobacterial volatiles reveals prospective inducers of growth promotion and induced systemic resistance in plants. *Phytochemistry*, 67, 2262-2268.

Figueiredo, A.C., Barroso, J.G., Pedro, L.G., Scheffer, J.J.C. (2006). Potentialities of Hairy root cultures for “in vitro” essential oil production. *Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology*, 2, 478-486.

Finlay, R.D. (2008). Ecological aspects of mycorrhizal symbiosis: with special emphasis on the functional diversity of interactions involving the extraradical mycelium. *Journal of Experimental Botany*, 59(5), 1115-1126.

Finot, P.-A. (2005). Historical Perspective of the Maillard Reaction in Food Science. *Annals New York Academy of Sciences*, 1043, 1-8.

Flores, H.E., Vivanco, J.M., Loyola-Vargas, Victor M. (1999). ‘Radicle’ biochemistry: the biology of root-specific metabolism. *Trends in Plant Science*, 4(6), 220-226.

Food and Agriculture Organization of the United Nations (2010). Orange-fleshed sweetpotato super foods, Sweetpotato action for security and health in Africa. Recuperado em 2010, do site [http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/wa_workshop/ECAfricaaadp/5_Orangefleshed Sweetpotato.pdf](http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/wa_workshop/ECAfricaaadp/5_Orangefleshed_Sweetpotato.pdf)

Food and Agriculture Organization of the United Nations (2013). FAOSTAT. Recuperado em 2013, do site <http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor>.

Fortin, J.A., Bécard, G., Declerck, S., Dalpé, Y., St-Arnaud, M., Coughlan, A.P., Piché, Y. (2002). Arbuscular mycorrhiza on root-organ cultures. *Canadian Journal of Botany*, 80, 1-20.

Frank, D.C., Owen, C.M., Patterson, J. (2004). Solid phase microextraction (SPME) combined with gas-chromatography and olfactometry-mass spectrometry for characterization of cheese aroma compounds. *LWT - Food Science and Technology*, 37(2), 139-154.

Friedman, M. (2005). Biological effects of Maillard browning products that may affect acrylamide safety in food. Em Friedman e Mottram (Eds.), *Chemistry and Safety of Acrylamide in Food* (pp.135-156). Springer Science+Business Media.

Friedman, M. 1996. Food Browning and its prevention: an overview. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(3), 631-653.

Fries, L.L.M., Pacovsky, R.S., Safir, G.R., Siqueira, J.O. (1997). Plant Growth and Arbuscular Mycorrhizal Fungal Colonization Affected by Exogenously applied Phenolic Compounds. *Journal of Chemical Ecology*, 23(7), 1755-1767.

Fries, N., Bardet, M., Serck-Hanssen K. (1985). Growth of ectomycorrhizal fungi stimulated by lipids from a pine root exudate. *Plant and Soil*, 86, 287-290.

Gadkar, V., David-Schwartz, R., Kunik, T., Kapulnik, Y. (2001). Arbuscular Mycorrhizal Fungal Colonization. Factors Involved in Host Recognition. *Plant Physiology*, 127, 1493–1499.

Gai, J., Feng, G., Li, X. (2005). Field distribution pattern and metabolic activity of AM fungi and their effects on *Ipomoea batatas* growth. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 16(1), 147-50.

Gai, J.P., Feng, G., Christie, P., Li., X.L. (2006). Screening of Arbuscular Mycorrhizal Fungi for Symbiotic Efficiency with Sweet Potato. *Journal of Plant Nutrition*, 29, 1085-1094.

Gai, J.-P., Feng, G., Li, X.-L. (2004). The effect of AM fungi on the growth of sweet potato. *Chinese Journal of Eco-Agriculture*, 12(1), 111-113.

Gallois, A., Gross, B., Langlois, D., Spinnler, H.-E., Brunerie, P. (1990). Influence of culture conditions on production of flavour compounds by 29 ligninolytic Basidiomycetes. *Mycological Research*, 94(4), 494-504.

Gamborg, O.L., Miller, R.A., Ojima, K. (1968). Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research*, 50(1), 151–158.

Gaspar, E.M.S.M., Lopes, J.F. (2009). Simple gas chromatographic method for furfural analysis. *Journal of Chromatography A*, 1216(14), 2762–2767.

Gaspar, E.M.S.M., Lucena, A.F.F (2009). Improved HPLC methodology for food control – furfurals and patulin as markers of quality. *Food Chemistry*, 114, 1576-1582.

Gelvin, S.B. (1990). Crown Gall Disease and Hairy Root Disease. *Plant Physiology*, 92, 281-285.

Gianinazzi-Pearson, V. (1996). Plant Cell Responses to Arbuscular Mycorrhizal Fungi: Getting to the Roots of the Symbiosis. *The Plant Cell*, 8, 1871-1883.

Giordano, L., Calabrese, R., Davoli, E., Rotilio, D. (2003). Quantitative analysis of 2-furfural and 5-methylfurfural in different Italian vinegars by *headspace* solid-phase microextraction coupled to gas chromatography–mass spectrometry using isotope dilution. *Journal of Chromatography A*, 1017(1-2), 141–149.

Giri, A., Dhingra, V., Giri, C.C., Singh, A., Ward, O.P., Narasua, M. L. (2001). Biotransformations using plant cells, organ cultures and enzyme systems: current trends and future prospects. *Biotechnology Advances*, 19, 175–199.

Giri, A., Narasu, M.L. (2000). Transgenic hairy roots: recent trends and applications. *Biotechnology Advances*, 18, 1–22.

Gogala, N. (1991). Regulation of mycorrhizal infection by hormonal factors produced by hosts and fungi. *Experientia*, 47(4), 331-340.

Golmirzaie, A., Toledo, J. (1998). *In vitro* conservation of Potato and Sweetpotato Germplasm. *CIP Program Report*, 351-356.

Górecki, T., Pawliszyn, J. (1997). Effect of Sample Volume on Quantitative Analysis by Solid-phase Microextraction Part 1. Theoretical Considerations. *Analyst*, 122, 1079-1086.

Graham, J.H., Leonard, R.T., Menge, J.A. (1981). Membrane-Mediated Decrease in Root Exudation Responsible for Phosphorus Inhibition of Vesicular-Arbuscular Mycorrhiza Formation. *Plant Physiology*, 68, 548-552.

Granado, J., Felix, G., Boller, T. (1995). Perception of Fungal Sterols in Plants - Subnanomolar Concentrations of Ergosterol Elicit Extracellular Alkalinization in Tomato Cells. *Plant Physiology*, 107, 485-490.

Grigera, M.S., Drijber, R.A., Shores-Morrow, R.H., Wienhold, B.J. (2007). Distribution of the arbuscular mycorrhizal biomarker C16:1cis11 among neutral, glyco and phospholipids extracted from soil during the reproductive growth of corn. *Soil Biology & Biochemistry*, 39, 1589–1596.

Guan, Y., Wu, T., Lin, M., Ye, J. (2006). Determination of Pharmacologically Active Ingredients in Sweet Potato (*Ipomoea batatas* L.) by Capillary Electrophoresis with Electrochemical Detection. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 54(1), 24-28.

Guerrieri, E., Lingua, G., Digilio, M.C., Massa, N., Berta, G. (2004). Do interactions between plant roots and the rhizosphere affect parasitoid behaviour? *Ecological Entomology*, 29, 753–756.

Guillon, S., Trémouillaux-Guiller, J., Pati, P.K., Rideau, M., Gantet, P. (2006). Hairy root research: recent scenario and exciting prospects. *Current Opinion in Plant Biology*, 9(9), 341-346.

Gutjahr, C., Banba, M., Croset, V., An, K., Miyao, A., An, G., Hirochika, H., Imaizumi-Anraku, H., Paszkowski, U. (2008). Arbuscular Mycorrhiza–Specific Signaling in Rice Transcends the Common Symbiosis Signaling Pathway. *The Plant Cell*, 20, 2989-3005.

Hamill, J.D., Lidgett, A.J. (1997). Hairy root cultures – opportunities and key protocols for studies in metabolic engineering. Em P.M. Doran (Ed.), *Hairy roots culture and applications* (pp. 1-22). Holanda: Harwood Academic Publishers.

Hammad, Y., Nalin, R., Marechal, J., Fiasson, K., Pepin, R., Berry A.M., Normand, P., Domenach, A.-M. (2003). A possible role for phenyl acetic acid (PAA) on *Alnus glutinosa* nodulation by *Frankia*. *Plant and Soil*, 254, 193-205.

Han, D., Row, K.H. (2010). Recent Applications of Ionic Liquids in Separation Technology. *Molecules*, 15, 2405-2426.

Harikumar, V.S., Potty, V.P. (2007). Arbuscular Mycorrhizal Inoculation and Phosphorus Mobility in Phosphorus-Fixing Sweetpotato Soils. *Malaysian Journal of Soil Science*, 11, 45-56.

Herrera-Medina, M.J., Steinkellner, S., Vierheilig, H., Bote, J.A. O., Garrido, J.M.G. (2007). Abscisic acid determines arbuscule development and functionality in the tomato arbuscular mycorrhiza. *New Phytologist*, 175, 554-564.

- Herrera-Peraza, R.A., Hamel, C., Fernández, F., Ferrer, R.L., Furrázola, E. (2011). Soil–strain compatibility: the key to effective use of arbuscular mycorrhizal inoculants? *Mycorrhiza*, 21, 183–193.
- Hidalgo, F.J., Zamora, R. (2000). The role of lipids in nonenzymatic browning. *Grasas y Aceites*, 51(1-2), 35-49.
- Hijmans R.J., Huaccho L., Zhang D.P. (2000). Global Distribution of Sweetpotato. *CIP Program Report*, 323-329.
- Hinshaw, J.V. (2003). Solid-Phase microextraction. *LC•GC Europe*, 2-5.
- Hodge, J. E. (1953). Dehydrated foods: Chemistry of browning reactions in model systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1, 928-943.
- Horvat, R.J., Arrendale, R.F., Dull, G.G., Chapman Jr., G.W., Kays, S.J. (1991). Volatile constituents and sugars of three diverse cultivars of sweet potatoes (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.). *Journal of food Science*, 56(3), 714-715.
- Houa, W.-C., Hana, C.-H., Chenb, H.-J., Wenc, C.-L., Lind, Y.-H. (2005). Storage proteins of two cultivars of sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) and their protease hydrolysates exhibited antioxidant activity *in vitro*. *Plant Science*, 168, 449-456.
- Hu, Z.-B., Du, M. 2006. Hairy root and its application in plant genetic engineering. *Journal of Integrative Plant Biology*, 48, 121–127.
- Huaccho L., Hijmans R.J. (2000). A Geo-Referenced Database of Global Sweetpotato Distribution, Production Systems and Natural Resource Management Department Working Paper No. 4. *CIP-International Potato Center*, 1-51.
- Huaman, Z. (1992). Systematic Botany and Morphology of the sweetpotato plant, Technical Information Bulletin 25. *International Potato Center (CIP)*, 1-22.
- Huamán, Z. (1999). Sweetpotato Germplasm Management (*Ipomoea batatas*) – Training manual. International Potato Center (CIP), 1-16.
- Hung, L.-L. L., Sylvia, D.M. (1988). Production of Vesicular-Arbuscular Mycorrhizal Fungus Inoculum in Aeroponic Culture. *Applied and Environmental Microbiology*, 54(2), 353–357.
- Hwang, B.K., Lim, S.W., Kim, B.S., Lee, J.Y., Moon, S.S. (2001). Isolation and In Vivo and *In vitro* Antifungal Activity of Phenylacetic Acid and Sodium Phenylacetate from *Streptomyces humidus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(8), 3739-3745.
- Ibáñez, E., López-Sebastián, S., Ramos, E., Tabera, J., Reglero, G. (1998). Analysis of volatile fruit components by *headspace* solid-phase microextraction. *Food Chemistry*, 63(2), 281-286.
- Ilan, A., Ziv, M., Halevy, A.H. (1995). Propagation and corm development of *Brodiaea* in liquid cultures. *Scientia Horticulturae*, 63, 101-112.

IPAC (2011). Guia para a acreditação de laboratórios químicos OGC002. *Instituto Português da Acreditação*, 1-12.

Irwin, R. (1990). Toxicology and carcinogenesis studies of Furfural in F344/N rats and B6C3F1 mice. *National toxicology program. Department of Health and Human Services. National Institutes of Health*, 3-199.

Ishizaki, T., Hoshino, Y., Masuda, K., Oosawa, K. (2002). Explants of Ri-transformed hairy roots of spinach can develop embryogenic calli in the absence of gibberellic acid, an essential growth regulator for induction of embryogenesis from nontransformed Roots. *Plant Science*, 163, 223- 231.

Islam, S. (2006). Sweetpotato (*Ipomoea batatas* L.) Leaf: Its Potential Effect on Human Health and Nutrition. *Journal of Food Science*, 71(2), R13–R121.

Janzowski, C., Glaab, V., Samimi, E., Schlatter, J., Eisenbrand, G. (2000). 5-Hydroxymethylfurfural: Assessment of Mutagenicity, DNA-Damaging Potential and Reactivity Towards Cellular Glutathione. *Food and Chemical Toxicology*, 38, 801-809.

Jarret, R.L., Gawel, N. (1991). Chemical and environmental growth regulation of sweetpotato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) *in vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 25, 153-159.

Kaldorf, M., Ludwig-Muller, J. (2000). AM fungi might affect the root morphology of maize by increasing indole-3-butyric acid biosynthesis. *Physiologia Plantarum*, 109, 58-67.

Kandula, J., Stewart, A., Ridgway, H.J. (2006). Monoxenic culture of the arbuscular mycorrhizal fungus *Scutellospora calospora* and Ri-TDNA transformed carrot roots. *New Zealand Plant Protection*, 59, 97-102.

Kapoor, R., Sharma, D., Bhatnagar, A.K. (2008). Arbuscular mycorrhizae in micropropagation systems and their potential applications. *Scientia Horticulturae*, 116, 227–239.

Katerere, D.R., Stockenstrom, S., Shephard, G.S. (2008). HPLC-DAD method for the determination of patulin in dried apple rings. *Food Control*, 19, 389-392.

Kays, S.J. (2006). Flavor – the key to sweetpotato consumption. *Acta Horticulturae*, 703, 97-105.

Kays, S.J., Wang, Y. (2000). Thermally Induced Flavor Compounds. *HortScience*, 35(6), 1002-1012.

Kays, S.J., Wang, Y. (2002). Sweetpotato quality: its importance, assessment and selection in breeding programs. *Acta Horticulturae*, 583, 187-193.

Kays, S.J., Wang, Y., McLaurin, W.J. (1998). Development of alternative flavour types of sweetpotato as a means of expanding consumption. *Tropical Agriculture (Trinidad)*, 75(2), 271-275.

Kays, S.J., Wang, Y., Melaurin, W.J. (2005). Chemical and geographical assessment of the sweetness of the cultivated sweetpotato clones of the world. *Journal American Society Horticultural Science*, 130(4), 591-597.

Khan, Q.A., Shamsi, F.A., Hadi, S.M. (1995). Mutagenicity of Furfural in Plasmid DNA. *Cancer Letters*, 89, 95-99.

Kidmose, U., Christensen, L.P., Agili, S.M., Thilsted, S.H. (2007). Effect of home preparation practices on the content of provitamin A carotenoids in coloured sweet potato varieties (*Ipomoea batatas* Lam.) from Kenya. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 8, 399–406.

Kidmose, U., Yang, R.-Y., Thilsted, S.H., Christensen, L.P., Brandt, K. (2006). Content of carotenoids in commonly consumed Asian vegetables and stability and extractability during frying. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19, 62–571.

King, A.J., Readman, J.W., Zhou, J.L. (2003). The application of solid-phase micro-extraction (SPME) to the analysis of polycyclicaromatic hydrocarbons (PAHs). *Environmental Geochemistry and Health*, 25, 69–75.

Kiviranta, H., Tuomainen, A., Reiman, M., Laitinen, S., Liesivuori, J., Nevalainen, A. (1998). Qualitative identification of volatile metabolites from two fungi and three bacteria species cultivated on two media. *Central European Journal of Public Health*, 6(4), 296-299.

Klironomos, J.N., Hart, M.M. (2002). Colonization of roots by arbuscular mycorrhizal fungi using different sources of inoculum. *Mycorrhiza*, 12, 181-184.

Konczak-Islam, I., Okuno, S., Yoshimoto, M., Yamakawa, O. (2003). Composition of phenolics and anthocyanins in a sweet potato cell suspension culture. *Biochemical Engineering Journal*, 14(3), 155–161.

Korada, R.R., Naskar, S.K., Prasad, A.R., Prasuna, A.L., Jyothi, K.N. (2010). Differential volatile emission from sweet potato plant: mechanism of resistance in sweet potato for weevil *Cylas formicarius* (Fab.). *Current Science*, 99(11), 1597-1601.

Krishnan, J.G., Padmaja, G., Moorthy, S.N., Suja, G., Sajeev, M.S. (2010). Effect of pre-soaking treatments on the nutritional profile and browning index of sweet potato and yam flours. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 11, 387-393.

Kuzovkina, I.N., Alterman, I.E., Karandashov, V.E. (2004). Genetically Transformed Plant Roots as a Model for Studying Specific Metabolism and Symbiotic Contacts of the Root System. *Biology Bulletin*, 31(3), 255–261.

Kuzyakov, Y., Jones, D.L. (2006). Glucose uptake by maize roots and its transformation in the rhizosphere. *Soil Biology and Biochemistry*, 38(5), 851-860.

Laczko, E., Boller, T., Wiemken, V. (2003). Lipids in roots of *Pinus sylvestris* seedlings and in mycelia of *Pisolithus tinctorius* during ectomycorrhiza formation: changes in fatty acid and sterol composition. *Plant, Cell and Environment*, 27, 27–40

Lambers, H., Mougél, C., Jaillard, B., Hinsinger, P. (2009). Plant-microbe-soil interactions in the rhizosphere: an evolutionary perspective. *Plant Soil*, 321, 83-115.

Lanoue, A., Burlat, V., Henkes, G.J., Koch, I., Schurr, U., Röse, U.S.R. (2010). De novo biosynthesis of defense root exudates in response to *Fusarium* attack in barley *New Phytologist*, 185, 577-588.

Lanoue, A., Shakourzadeh, K., Marison, I., Laberche, J., Christen, P., Sangwan-Norreel, B., Boitel-Conti, M. (2004). Occurrence of Circadian Rhythms in Hairy Root Cultures Grown Under Controlled Conditions. *Biotechnology and Bioengineering*, 88(6), 722-729.

Lee, J.G., Lee, B.Y., Lee, H.J. (2006). Accumulation of phytotoxic organic acids in reused nutrient solution during hydroponic cultivation of lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Scientia Horticulturae*, 110, 119-128.

Lee, K.-G., Shibamoto, T. (2002). Toxicology and antioxidant activities of non-enzymatic browning reaction products: review. *Food Reviews International*, 18(2-3), 151–175.

Lei, J., Becard, G., Catford, J. G., Piche, Y. (1991). Root factors stimulate P uptake and plasmalemma ATPase activity in vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus, *Gigaspora margarita*. *New Phytologist*, 118, 289-294.

Li, J.Y., Dong, G.P., Li, M.L., Liu, Z.H., Lu, Y. (2012). Efficient Counter-current chromatographic isolation and structural identification of phenolic compounds from sweet potato leaves. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 35, 1517–1527.

Liaaen-Jensen, S. (2004). Basic Carotenoid Chemistry. Em N.I. Krinsky, S.T. Mayne, H. Sies (Eds.), *Carotenoids in Health and Disease* (pp.1-30). Marcel Dekker, Inc..

Liu, B.F., Zhong, X.H., Lu, Y.T. (2002). Analysis of plant hormones in tobacco flowers by micellar electrokinetic capillary chromatography coupled with on-line large volume sample stacking. *Journal of Chromatography A*, 945, 257-265.

Lizarraga, R., Panta A., Espinoza, N., Doddas, J.H. (1992). *Tissue culture of ipomoea batatas: micropropagation and maintenance*, CIP research guide 32. Lima: International Potato Center.

Lo Coco, F., Valentini, C., Novelli, V., Ceccon, L. (1996). High-performance liquid chromatographic determination of 2-furaldehyde and 5-hydroxymethyl-2-furaldehyde in honey. *Journal of Chromatography A*, 749, 95-102.

López-Ráez, J.A., Charnikhova, T., Fernández, I., Bouwmeester, H., Pozo, M.J. (2011). Arbuscular mycorrhizal symbiosis decreases strigolactone production in tomato. *Journal of Plant Physiology*, 168(3), 294-297.

Lu, Q., Chen, L., Lu, M., Chen, G., Zhang L. (2010). Extraction and Analysis of Auxins in Plants Using Dispersive Liquid-Liquid Microextraction Followed by High-Performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detection. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 58, 2763–2770.

Lu, Q.M., Zhang, L., Chen, T.W., Lu, M.H., Tong, P., Chen, G.N. (2008). Identification and quantitation of auxins in plants by liquid chromatography/electrospray ionization ion trap mass spectrometry. *Rapid Communications Mass Spectrometry*, 22, 2565-2572.

Ludwig-Muller, J., Vertocnik, A., Town, C.D. (2005). Analysis of indole-3-butyric acid-induced adventitious root formation on Arabidopsis stem segments. *Journal of Experimental Botany*, 56 (418), 2095-2105.

Maillet, F., Poinso, V., Andre, O., Puech-Page, V., Haouy, A., Gueunier, M., Cromer, L., Giraudet, D., Formey, D., Niebel, A., Martinez, E.A., Driguez, H., Bécard, G., Dénarié, J. (2011). Fungal lipochitooligosaccharide symbiotic signals in arbuscular mycorrhiza. *Nature*, 469, 58–63.

Mano, H., Ogasawara, F., Sato, K., Higo, H., Minobe, Y. (2007). Isolation of a Regulatory Gene of Anthocyanin Biosynthesis in Tuberous Roots of Purple-Fleshed Sweet Potato. *Plant Physiology*, 143(3), 1252-1268.

Martins, S.I.F.S., Jongen, W.M.F., van Boekel, M.A.J.S. (2001). A review of Maillard reaction in food and implications to kinetic modeling. *Trends in Food Science & Technology*, 11, 364-373.

Matsui, T., Ebuchi, S., Kobayashi, M., Fukui, K., Sugita, K., Terahara, N., Matsumoto, K. (2002). Anti-hyperglycemic effect of diacylated anthocyanin derived from *Ipomoea batatas* cultivar Ayamurasaki can be achieved through the R-glucosidase inhibitory action. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 7244–7248.

Mazza, G., Cottrell, T. (1999). Volatile Components of Roots, Stems, Leaves, and Flowers of Echinacea Species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 3081-3085.

Menge, J.A., Steirle, D., Bagyaraj, D.J., Johnson, E.L.V., Leonard, R.T. (1978). Phosphorus concentrations in plants responsible for inhibition of mycorrhizal infection. *New Phytologist*, 80, 575-578.

Miller, J.C., Miller, J.N. (1988). *Statistics for Analytical Chemistry*. Ellis Horwood Limited.

Miller, J.N. (1991). Basic statistical methods for analytical chemistry part 2 calibration and regression methods a review. *Analyst*, 116, 3-14.

Minorsky, P.V. (2005). On the Inside. *Plant Physiology*, 139, 1097–1098.

Miyazaki, K., Makino, K., Iwadate, E., Deguchi, Y., Ishikawa, F. (2008). Anthocyanins from Purple Sweet Potato *Ipomoea batatas* Cultivar Ayamurasaki Suppress the Development of Atherosclerotic Lesions and Both Enhancements of Oxidative Stress and Soluble Vascular Cell Adhesion Molecule-1 in Apolipoprotein E-Deficient Mice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(23), 11485-11492.

Morrison, T.A., Pressey, R., Kays, S.J. (1993). Changes in alpha e beta-amylase during storage of sweetpotato lines with varying starch hydrolysis potential. *Journal of American Society and Horticultural Science*, 118(2), 236-242.

Mosse, B. (1962). The Establishment of Vesicular - Arbuscular Mycorrhiza under Aseptic Conditions. *Journal of General Microbiology*, 27, 509-520.

Mosse, B. (1973). Advances in the study of vesicular-arbuscular mycorrhiza. *Annual Review of Phytopathology*, 11, 171-196.

Mosse, B., Phillips, J. M. (1971). The Influence of Phosphate and Other Nutrients on the Development of Vesicular-arbuscular Mycorrhiza in Culture. *Journal of General Microbiology*, 69, 157-166.

Mouchili, A., Wichtel, J.J., Bosset, J.O., Dohoo, I.R., Imhof, M., Altieri, D., Mallia, S., Stryhn, H. (2005). HS-SPME gas chromatographic characterization of volatile compounds in milk tainted with off-flavour. *International Dairy Journal*, 15(12), 1203-1215.

Mugnier, J. (1988). Establishment of new axenic hairy root lines by inoculation with *Agrobacterium rhizogenes*. *Plant Cell Reports*, 7, 9-12.

Mugnier, J., Mosse, B. (1987). Vesicular-Arbuscular Mycorrhizal Infection in Transformed Root-Inducing T-DNA roots grown axenically. *Techniques The American Phytopathological Society*, 77(7), 1045-1050.

Mulongoy, K., Callens, A., Okogun, J.A. (1988). Differences in mycorrhizal infection and P uptake of sweet potato cultivars (*Ipomoea batatas* L.) during their early growth in three soils. *Biology and Fertility of Soils*, 7, 7-10.

Murashige, T., Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15, 473-497.

Murkovic, M., Pichler, N. (2006). Analysis of 5-hydroxymethylfurfural in coffee, dried fruits and urine. *Molecular Nutrition Food Research*, 50, 842-846

Nagahashi, G., Douds Jr., D.D. (2000). Partial separation of root exudate components and their effects upon the growth of germinated spores of AM fungi. *Mycological Research*, 104(12), 1453-1464.

Nakamura, A., Ono, T., Yagi, N., Miyazawa, M. (2013). Volatile compounds with characteristic aroma of boiled sweet potato (*Ipomoea batatas* L. cv Ayamurasaki, *I. batatas* L. cv Beniazuma and *I. batatas* L. cv Simon 1). *The Journal of Essential Oil Research*, 25(6), 497-505.

Navazio, L., Mariani, P. (2008). Calcium opens the dialogue between plants and arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Signaling & Behavior*, 3(4), 229-230.

Negeve, J.M., Roncadori, R.W. (1985). The interaction of vesicular-arbuscular mycorrhizae and soil phosphorus fertility on growth of sweet potato *Field Crops Research*, 12, 181–185.

Neumann, E., Schmid, B., Römheld, V., George, E. (2009). Extraradical development and contribution to plant performance of an arbuscular mycorrhizal symbiosis exposed to complete or partial rootzone drying. *Mycorrhiza*, 20, 13-23.

Niemi, K., Vuorinen, T., Ernstsén, A., Häggman H. (2002). Ectomycorrhizal fungi and exogenous auxins influence root and mycorrhiza formation of Scots pine hypocotyl cuttings in vitro. *Tree Physiology*, 22, 1231–1239.

Nishiyama, I., Teramura, T. (1962). Mexican Wild Forms of Sweet Potato. *Economic Botany*, 16(4), 305-314.

Nishiyama, Y., Yamakawa, T. (2004). Effect of medium composition on the production of anthocyanins by hairy root cultures of *Ipomoea batatas*. *Plant Biotechnology*, 21(5), 411-414.

Nordstrom, A-C., Jacobs, F.A., Eliasson, L. (1991). Effect of Exogenous Indole-3-Acetic Acid and Indole-3-Butyric Acid on Internal Levels of the Respective Auxins and Their Conjugation with Aspartic Acid during Adventitious Root Formation in Pea Cuttings. *Plant Physiologist*, 96, 856-861.

Nuutila, A.M., Vestberg, M., Kauppinen, V. (1995). Infection of hairy roots of strawberry (*Fragaria x Ananassa* Duch.) with arbuscular mycorrhizal fungus. *Plant Cell Reports*, 14, 505-509.

O'Keefe, D. M., Sylvia, D. M. (1992). Chronology and mechanisms of P uptake by mycorrhizal sweet potato plants. *New Phytologist*, 122, 651-659.

O'Keefe, D.M., Sylvia, D.M. (1993). Seasonal dynamics of the association between sweet potato and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycorrhiza*, 3, 115-122.

Oki, T., Masuda, M., Furuta, S., Nishiba, Y., Terahara, N., Suda, I. (2002). Involvement of Anthocyanins and other Phenolic Compounds in Radical-Scavenging Activity of Purple-Fleshed Sweet Potato Cultivars. *Journal of Food Science*, 67(5), 1752–1756.

Oliveira, R.S., Castro, P.M.L., Dodd, J.C., Vosátka, M. (2006). Different native arbuscular mycorrhizal fungi influence the coexistence of two plant species in a highly alkaline anthropogenic sediment. *Plant Soil*, 287, 209–221.

Oliveira, R.S., Vosátka, M., Dodd, J.C., Castro, P.M.L. (2005). Studies on the diversity of arbuscular mycorrhizal fungi and the efficacy of two native isolates in a highly alkaline anthropogenic sediment. *Mycorrhiza*, 16(1), 23-31.

Olsen, R.A., Odham, G., Lindeberg, G. (1971). Aromatic Substances in Leaves of *Populus tremula* as Inhibitors of Mycorrhizal Fungi. *Physiologia Plantarum*, 25(1), 122–129.

Olubobokun, T.H., Olusola, A.E., Eghosa, I.E., Bond, A.U., Ifeanyi, N.U. (2013). *Ipomoea batatas* L. Extract Reduces Food Intake, Fasting Blood Glucose Levels and Body Weight. *European Journal of Medicinal Plants*, 3(4), 530-539.

Ortas, I. (2012). The effect of mycorrhizal fungal inoculation on plant yield, nutrient uptake and inoculation effectiveness under long-term field conditions. *Field Crops Research*, 125, 35-48.

Oswald A., Kapinga R., Lemaga B., Ortiz O., Kroschel J., Lynam J. (2009). Unleashing Potential of Sweetpotato in Sub-Saharan Africa, challenge theme paper 5: integrated crop management. *International Potato Center (CIP)*, 130-160.

Padda, M.S., Picha, D.H. (2008). Quantification of phenolic acids and antioxidant activity in sweetpotato Genotypes. *Scientia Horticulturae*, 119, 17–20.

Paiva, L.M., Silva, M.A., Silva, P.C., Maia, L.C. (2003). *Glomus clarum* e *G. etunicatum*: cultivo em solo e aeroponia. *Revista Brasileira de Botânica*, 26(2), 257-262.

Pan, X.Q., Welti, R., Wang, X.M. (2008). Simultaneous quantification of major phytohormones and related compounds in crude plant extracts by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Phytochemistry*, 69, 1773-1781.

Paula, M.A., Urquiaga, S., Siqueira, J.O., Dobereiner, J. (1992). Synergistic effects of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi and diazotrophic bacteria on nutrition and growth of sweet potato (*Ipomoea batatas*). *Biology and Fertility of Soils*, 14, 61-66.

Pawliszyn, J. (2002). Sampling and Sample Preparation for Field and Laboratory: Fundamentals and New Directions in Sample Preparation. Em D. Barceló, *Comprehensive analytical chemistry* (vol.37). Elsevier.

Pawlowska, T.E., DOUDS Jr., D.D., Charvat, I. (1999). *In vitro* propagation and life cycle of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus etunicatum*. *Mycology Research*, 103(12), 1549–1556.

Pellissier, F. (1993). Allelopathic effect of phenolic acids from humic solutions on two spruce mycorrhizal fungi: *Cenococcum graniforme* and *Laccaria laccata*. *Journal of Chemical Ecology*, 19(10), 2105-2114.

Pereda-Miranda, R., Rosas-Ramírez, D., Castañeda-Gómez, J. (2010). Resin Glycosides from the Morning Glory Family. Em A.D. Kinghorn *et al.* (Eds.), *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products* (Vol. 92). Viena: Springer-Verlag/Wien.

Peters, D. (2006). Carbohydrates for fermentation. *Biotechnology Journal*, 1, 806–814.

Peterson, J.K, Harrison Jr., H.F. (1991). Isolation of substance from sweet potato (*Ipomoea batatas*) periderm tissue that inhibits seed germination. *Journal of Chemical Ecology*, 17(5), 943-951.

Poole, C.F., Li, Q., Kiridena, W., Koziol, W.W. (2000). Selectivity equivalence of poly(ethylene glycol) stationary phases for gas chromatography. *Journal of Chromatography A*, 898, 211-226.

Poole, C.F., Poole, S.K. (2010). Extraction of organic compounds with room temperature ionic liquid. *Journal of Chromatography A*, 1217, 2268–2286.

Pouillart, P., Mauprivez, H., Ait-Ameur, L., Cayzeele, A., Lecerf, J.-M., Tessier, F.J., Birlouez-Aragon, I. (2008). Strategy for the Study of the Health Impact of Dietary Maillard Products in Clinical Studies The Example of the ICARE Clinical Study on Healthy Adults. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1126, 173-176.

Pratap C.R., Potty V. P. (2009). Arbuscular mycorrhizal fungal inoculum production using *Ipomoea batatas* hairy roots in bioreactor. *The Icfai University Journal of Biotechnology*, 3(2), 56-64

Prior, R.L., Wu, X., Gu, L. (2006). Identification and Urinary Excretion of Metabolites of 5-(Hydroxymethyl)-2-furfural in Human Subjects following Consumption of Dried Plums or Dried Plum Juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(10), 3744-3749.

Purcell, A.E., Later, D.W., Lee, M.L. (1980). Analysis of the volatile constituents of baked, “jewel” sweet potatoes. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 28, 939-941.

Qi, M., Armstrong, D.W. (2007). Dicationic ionic liquid stationary phase for GC-MS analysis of volatile compounds in herbal plants. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 388, 889-899.

Ragonese, C., Sciarrone, D., Tranchida, P.Q., Dugo, P., Dugo, G., Mondello, L. (2011). Evaluation of a Medium-Polarity Ionic Liquid Stationary Phase in the Analysis of Flavor and Fragrance Compounds. *Analytical Chemistry*, 83, 7947–7954.

Ragonese, C., Sciarrone, D., Tranchida, P.Q., Dugo, P., Mondello, L. (2012). Use of ionic liquids as stationary phases in hyphenated gas chromatography techniques. *Journal of Chromatography A*, 1255, 130-144.

Rantakokko, P., Yritys, M., Vartiainen, T. (2004). Matrix effects in the gas chromatographic–mass spectrometric determination of brominated analogues of 3-chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2(5H)-furanone. *Journal of Chromatography A*, 1028, 179-188.

Rega, B., Fournier, N., Guichard, E. (2003). Solid Phase Microextraction (SPME) of Orange Juice Flavor: Odor Representativeness by Direct Gas Chromatography Olfactometry (D-GC-O). *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 51(24), 7092-7099.

Reinecke, D.M. (1999). 4-Chloroindole-3-acetic acid and plant growth. *Plant Growth Regulation*, 27, 3-13.

Reinhardt, C.F., Meissner, R., Nel, P.C. (1993). Allelopathic effect of sweet potato (*Ipomoea batatas*) cultivars on certain weed and vegetable species. *South African Journal of Plant and Soil*, 10(1), 41-44.

Ribani et al. 2004 Ribani, M., Bottoli, C.B.G., Collins, C.H., Jardim, I.C.S.F., Melo, L.F.C., (2004). Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Quimica Nova*, 27(5), 771-780.

Ribnicky, D.M., Cooke, T.J., Cohen, J.D. (1998). A microtechnique for the analysis of free and conjugated indole-3-acetic acid in milligram amounts of plant tissue using a benchtop gas chromatograph-mass spectrometer. *Planta*, 204, 1-7.

Robins, R.J. (1998). The application of root cultures to problems of biological chemistry. *Natural Product Reports*, 15, 549-570.

Rodríguez-Echeverría, S., Peña, E., Moens, M., Freitas, H., van der Putten, W.H. (2009). Can root-feeders alter the composition of AMF communities? Experimental evidence from the dune grass *Ammophila arenaria*. *Basic and Applied Ecology*, 10, 131-140.

Rolcik, J., Recinska, J., Bartak, P., Strnad, M., Prinsen, E. (2005). Purification of 3-indolylacetic acid by solid phase extraction. *Journal of Separation Science*, 28, 1370-1374.

Rosu, A., Brezeanu, A., Banciu, C., Stoiculescu, R., Danaila-Guidea, S. (2007). Aspects in Early Colonization Processes by AMF *Glomus intraradices* of "in vitro" Sweetpotato, Cucumber and Maize Root and Callus Cultures. *Electronic Journal of Biology*, 3(1), 1-4.

Rumbaoa, R.G.O., Cornago, D.F., Geronimo, I.M. (2009). Phenolic content and antioxidant capacity of Philippine sweet potato (*Ipomoea batatas*) varieties. *Food Chemistry*, 113, 1133–1138.

RuWán-Henares, J.A., García-Villanova, B., Guerra-Hernández, E. (2008). Occurrence of furosine and hydroxymethylfurfural as markers of thermal damage in dehydrated vegetables. *European Food Research Technology*, 228, 249–256.

Ruyter-Spira, C., Kohlen, W., Charnikhova, T., van Zeijl, A., van Bezouwen, L., Ruijter, N., Cardoso, C., Lopez-Raez, J.A., Matusova, R., Bours, R., Verstappen, F., Bouwmeester, H. (2011). Physiological Effects of the Synthetic Strigolactone Analog GR24 on Root System Architecture in Arabidopsis: Another Belowground Role for Strigolactones?. *Plant Physiology*, 155, 721-734.

Ryan, M.H., Graham, J.H. (2002). Is there a role for arbuscular mycorrhizal fungi in production agriculture? *Plant and Soil*, 244, 263–271.

Said, A.G.E., Murashige, T. (1979). Continuous cultures of tomato and citron roots "in vitro". *In vitro*, 15(8), 593-602.

Sanchez-Prado, L., Lamas, J.P., Garcia-Jares, C., Llompart, M. (2012) Expanding the Applications of the Ionic Liquids as GC Stationary Phases: Plasticizers and Synthetic Musks Fragrances. *Chromatographia*, 75, 1039-1047.

Sandal, I., Bhattacharya, A., Ahuja, P.S. (2001). An efficient liquid culture system for tea shoot proliferation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 65(1), 75-80.

Santana, J., Giraudi, C., Marengo, E., Robotti, E., Pires, S., Nunes, I., Gaspar, E.M. (2013) Preliminary toxicological assessment of phthalate esters from drinking water consumed in Portugal. *Environmental Science Pollution Research*, 21(2), 1380-90.

Saxena, G., Banerjee, S., Laiq-ur-Rahman, Verma, P.C., Mallavarapu, G.R., Kumar, S. (2007). Rose-scented geranium (*Pelargonium* sp.) generated by *Agrobacterium rhizogenes* mediated Ri-insertion for improved essential oil quality. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 90, 215-223.

Scervino, J.M., Ponce, M.A., Erra-Bassells, R., Bompadre, M.J., Vierheilig, H., Ocampo, J.A., Godeas, A. (2006). Glycosidation of apigenin results in a loss of its activity on different growth parameters of arbuscular mycorrhizal fungi from the genus *Glomus* and *Gigaspora*. *Soil Biology & Biochemistry*, 38, 2919-2922.

Schenk, R.O., Hildebrandt, A.C. (1972). Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous plant cell cultures. *Canadian Journal of Botany*, 50, 199-204.

Sebastian, M., Figueiredo, A., Acioli, B., Sousa, L., Pessoa, F., Baldé, A., Pais, M.S. (2009). Identification of plant genes involved on the initial contact between ectomycorrhizal symbionts (*Castanea sativa* – European chestnut and *Pisolithus tinctorius*). *European Journal of Soil Biology*, 45, 275–282.

Shen, W.H., Petit, A., Guern, J., Tempé, J. (1988). Hairy roots are more sensitive to auxin than normal roots. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 85, 3417-3421.

Shewry, P.R. (2003). Tuber Storage Proteins. *Annals of Botany*, 91, 755-769.

Shibamoto, T., Bjeldanes, L.F. (2009). *Introduction to food toxicology*. Food Science and Technology, International Series.

Sigma-Aldrich (2013). Supelco Ionic Liquid GC Columns: Introduction to the Technology. Recuperado em 2013 do site https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Supelco/Posters/1/ionic_liquid_gc_columns.pdf

Singh, S. (2002). Mass production of AM Fungi: Part 1. *Mycorrhiza News*, 14(3), 1-23.

Sircar, D., Roychowdhury, A., Mitra, A. (2007). Accumulation of p-hydroxybenzoic acid in hairy roots of *Daucus carota*. *Journal of Plant Physiology*, 164, 1358-1366.

Slininger, P.J., Burkhead, K.D., Schiler, D.A. (2004). Antifungal and sprout regulatory bioactivities of phenylacetic acid, indole-3-acetic acid, and tyrosol isolated from the potato dry rot suppressive bacterium *Enterobacter cloacae* S11:T:07. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 31, 517–524.

Somers, E., Ptacek, D., Gysegom, P., Srinivasan, M., Vanderleyden, J. (2005). *Azospirillum brasilense* produces the auxin-like phenylacetic acid by using the key enzyme for indole-3-acetic acid biosynthesis. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(4), 1803-1810.

Somoza, V. (2005). Five years of research on health risks and benefits of Maillard reaction products: An update. *Molecular Nutrition and Food Research*, 49, 663-672.

Song, J., Gardner, B.D., Holland, J.F., Beaudry, R.M. (1997). Rapid Analysis of Volatile Flavor Compounds in Apple Fruit Using SPME and GC/Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 45(5), 1801–1807.

Squire, G., Ritz, K. (2000). *Plants, soils and environment*. Recuperado em 2000, do site <http://www.scri.ac.uk/scri/files/annualreports/2000/29PSE1.PDF>

Srisuwan, S., Sihachakr, D., Siljak-Yakovlev, S. (2010). The origin and evolution of sweet potato (*Ipomoea batatas* Lam.) and its wild relatives through the cytogenetic approaches. *Plant Science*, 171, 424-433.

Srivastava, S., Srivastava, A.K. (2007). Hairy Root Culture for Mass-Production of High-Value Secondary Metabolites. *Critical Reviews in Biotechnology*, 27, 29-43.

St-Arnaud, M., Hamel, C., Vimard, B., Caron, M., Fortin, J. A. (1996). Enhanced hyphal growth and spore production of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* in an *in vitro* system in the absence of host roots. *Mycology Research*, 100(3), 328-332.

Steinkellner, S., Lenzemo, V., Langer, I., Schweiger, P., Khaosaad, T., Toussaint, J.-P., Vierheilig, H. (2007). Flavonoids and Strigolactones in Root Exudates as Signals in Symbiotic and Pathogenic Plant-Fungus Interactions. *Molecules*, 12, 1290-1306.

Stoll, D.R., Cohen, J.D., Carr, P.W. (2006). Fast, comprehensive online two-dimensional high performance liquid chromatography through the use of high temperature ultra-fast gradient elution reversed-phase liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1122, 123-137.

Sun, J.-B., Severson, R.F., Kay, S.J. (1994). Effect of heating temperature and microwave pretreatment on the formation of sugars and volatiles in jewel sweetpotato. *Journal of Food Quality*, 17, 447-456.

Sun, J.-B., Severson, R.F., Kays, S.J. (1993). Quantitative Technique for Measuring Volatile Components of Baked Sweetpotatoes. *Hortscience*, 28(11), 1110-1113.

Sun, J.-B., Severson, R.F., Schlotzhauer, W.S., Kays, S.J. (1995). Identifying Critical volatiles in the flavor of baked “jewel” sweetpotatoes [*Ipomoea batatas* (L.) Lam.]. *Journal American Society Horticultural Science*, 120(3), 468-474.

Sunesson, A., Vaes, W., Nilsson, C., Blomquist, G., Andersson, B., Carlson, R. (1995). Identification of Volatile Metabolites from Five Fungal Species Cultivated on Two Media. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(8), 2911-2918.

Sylvia, D.M., Jarstfer, A.G. (1992). Sheared-Root Inocula of Vesicular-Arbuscular Mycorrhizal Fungi. *Applied and Environmental Microbiology*, 58(1), 229-232.

Takenaka, M., Nanayama, K., Isobe, S., Murata M.M. (2006). Changes in Caffeic acid derivatives in sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) during cooking and processing. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 70(1), 172-177.

Tan, Z.-Q., Liu, J.-F., Pang, L. (2012). Advances in analytical chemistry using the unique properties of ionic liquids. *Trends in Analytical Chemistry*, 39, 218-227.

Teixidó, E., Santos, F.J., Puignou, L., Galceran, M.T. (2006). Analysis of 5-hydroxymethylfurfural in foods by gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1135, 85-90.

Teow, C.C., Truong, V.-D., McFeeters, R.F., Thompson, R.L., Pecota, K.V., Yencho, G.C. (2007). Antioxidant activities, phenolic and b-carotene contents of sweet potato genotypes with varying flesh colours. *Food Chemistry*, 103, 829-838.

Tessier, F.J., Birlouez-Aragon, I. (2010). Health effects of dietary Maillard reaction products: the results of ICARE and other studies. *Amino Acids*, 42(4):1119-1131.

Thiele G., Lynam J., Lemaga B., Low J. (2009). Unleashing potential of sweetpotato in Sub-Saharan Africa, challenge theme paper 4: sweetpotato value chains. *International Potato Center (CIP)*, 106-129.

Tian, Q., Konczak, I., Schwartz, S.J. (2005). Probing Anthocyanin Profiles in Purple Sweet Potato Cell Line (*Ipomoea batatas* L. Cv. Ayamurasaki) by High Performance Liquid Chromatography and Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(16), 6503-6509.

Tone, S., Taya, M., Kino-oka, M. (1997). Alteration of metabolite formation and morphological properties of hairy roots by environmental stimuli. Em P.M. Doran (Ed.), *Hairy roots culture and applications* (pp.65-72). Holanda: Harwood Academic Publishers.

Tuohy, K.M., Hinton, D.J.S., Davies, S.J.M., Crabbe, J.C., Gibson, G.R., Ames, J.M. (2006). Metabolism of Maillard reaction products by the human gut microbiota – implications for health. *Molecular Nutrition & Food Research*, 50, 847-857.

Van, An L., Frankow-Lindberg, B.E., Lindberg, J.E. (2003). Effect of harvesting interval and defoliation on yield and chemical composition of leaves, stems and tubers of sweet potato (*Ipomoea batatas* L. (Lam.) plant parts. *Field Crops Research*, 82, 49-58.

Walker, T.S., Bais, H.P., Grotewold, E., Vivanco, J.M. (2003). Root Exudation and Rhizosphere Biology. *Plant Physiology*, 132, 44–51.

Walter, M.H., Floss, D.S., Strack, D. (2010). Apocarotenoids: hormones, mycorrhizal metabolites and aroma volatiles. *Planta*, 232(1), 1-17.

Wang, F.Y., Shi, Z.Y. (2008). Biodiversity of Arbuscular Mycorrhizal Fungi in China: a Review. *Advances in Environmental Biology*, 2(1), 31-39.

Wang, L.-F., Lee, J.-Y., Chung, J.-O., Baik, J.-H., So, S., Park, S.-K. (2008). Discrimination of teas with different degrees of fermentation by SPME–GC analysis of the characteristic volatile flavour compounds. *Food Chemistry*, 109(1), 196-206.

Wang, Y., Horvat, R.J., White, R.A., Kays, S.J. (1998). Influence of postharvest curing treatment on the synthesis of the volatile flavor components in sweetpotato. *Acta Horticulturae*, 464, 207-212.

Wang, Y., Kays, S.J. (2000). Contribution of Volatile Compounds to the Characteristic Aroma of Baked 'Jewel' Sweetpotatoes. *Journal of American Society Horticultural Science*, 125(5), 638-643.

Wang, Y., Kays, S.J. (2001). Effect of cooking method on the aroma constituents of sweet potatoes (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.). *Journal of Food Quality*, 24, 67-78.

Wang, Y., Kays, S.J. (2002). Sweetpotato volatile chemistry in relation to sweetpotato weevil (*Cylas formicarius*) behavior. *Journal of American Society and Horticultural Science*, 127, 656-662.

Wang, Y., Kays, S.J. (2003). Analytically directed flavor selection in breeding food crops. *Journal of American Society Horticultural Science*, 128(5), 711-720.

Wheatley, R.E. (2002). The consequences of volatile organic compound mediated bacterial and fungal interactions. *Antonie van Leeuwenhoek*, 81, 357-364.

Wodzicki, T.J., Abe, H., Wodzicki, A.B., Pharis, R.P., Cohen, J.D. (1987). Investigations on the Nature of the Auxin-Wave in the Cambial Region of Pine Stems. *Plant Physiology*, 84, 135-143.

Woolfe, J.A.. (1992). *Sweet potato: an untapped food resource*. Cambridge University Press.

Xie, Y., He, J., Huang, J., Zhang, J., Yu, Z. (2007). Determination of 2-Methylisoborneol and Geosmin Produced by *Streptomyces* sp. and *Anabaena* PCC7120. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 55, 6823-6828.

Yamashita, N., Murata, M., Inoue, S., Hiraku, Y., Yoshinaga, T., Kawanishi, S. (1998). Superoxide Formation and DNA Damage Induced by a Fragrant Furanone in the Presence of Copper(II). *Mutation Research*, 397, 191-201.

Yang, D.S., Lee, K.-S., Jeong, O.-Y., Kim, K.-J., Kays, S.J. (2008a). Characterization of volatile aroma compounds in cooked black rice. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 56, 235-240.

Yang, D.S., Shewfelt, R.L., Lee, K.-S., Kays, S.J. (2008b). Comparison of odor-active compounds from six distinctly rice flavor types. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 56, 2780-2787.

Yang, X., Peppard, I. (1994). Solid-Phase Microextraction for Flavor Analysis. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 42(9), 1925-1930.

Yano, K., Takaki, M. (2005). Mycorrhizal alleviation of acid soil stress in the sweet potato (*Ipomoea batatas*). *Soil Biology and Biochemistry*, 37(8), 1569-1572.

Yin, Y., Li, Y., Kong, L. (2008). Pentasaccharide Glycosides from the Tubers of Sweet Potato (*Ipomoea batatas*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 2363-2368.

Yin, Y.-Q., Kong, L.-Y. (2008). Ether-soluble resin glycosides from the roots of *Ipomoea batatas* 2008. *Journal of Asian Natural Products Research*, 10(3), 233-238.

Yin, Y.Q., Wang, J.S., Luo, J.G., Kong, L.Y. (2009). Novel acylated lipo-oligosaccharides from the tubers of *Ipomoea batatas*. *Carbohydrate Research*, 344(4), 466-473.

Yoshimoto, M., Okuno, S., Yamaguchi, M., Yamakawa, O. (2001). Antimutagenicity of deacylated anthocyanins in purple-fleshed sweetpotato. *Bioscience Biotechnology Biochemistry*, 65(7), 1652-1655.

Yoshimoto, M., Okuno, S., Yoshinaga, M., Yamakawa, O., Yamaguchi, M., Yamada, J. (1999) Antimutagenicity of sweetpotato (*Ipomoea batatas*) roots. *Bioscience Biotechnology Biochemistry*, 63(3), 537-541.

Yu, J.Q., Matsui, Y. (1993). Extraction and identification of phytotoxic substances accumulated in nutrient solution for the hydroponic culture of tomato. *Soil Science and Plant Nutrition*, 39(4), 691-700.

Yun, K.W., Choi, S.K. (2002). Mycorrhizal colonization and plant growth affected by aqueous extract of *Artemisia princeps* var.orientalis and two phenolic compounds.

Zdravković-Korać, S., Muhovski, Y., Druart, P., Čalić, D., Radojević, L. (2004). *Agrobacterium rhizogenes*-mediated DNA transfer to *Aesculus hippocastanum* L. and the regeneration of transformed plants. *Plant Cell Report*, 22, 698-704.

Zhang, Q., Ames, J.M., Smith, R.D., Baynes, J.W., Metz, T.O. (2009). A perspective on the Maillard reaction and the Analysis of Protein Glycation by mass spectrometry: Probing the pathogenesis of Chronic disease. *Journal of Proteome Research*, 8(2), 754-769.

Zhang, Z., Pawliszyn, J. (1993). *Headspace* solid-phase microextraction. *Analytical Chemistry*, 65(14), 1843-1852.

Zheng, W., Clifford, M.N. (2008). Profiling the chlorogenic acids of sweet potato (*Ipomoea batatas*) from China. *Food Chemistry*, 106, 147–152.

Zuraida N. (2003). Sweet potato as an alternative food supplement during rice shortage. *Journal Litbang Pertanian*, 22(4), 150-155.

