UNIVERSIDADE REGIONAL INTEGRADA DO ALTO URUGUAI E DAS MISSÕES
URI – ERECHIM
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS

CAROLINA DOS SANTOS BINDA

QUANTIFICAÇÃO DE INULINA EM DIFERENTES ESTÁDIOS DE DESENVOLVIMENTO DE CREM (*Tropaeolum pentaphyllum*) CULTIVADOS EM CAMPO E MICROPROPAGADOS.

Orientadores: Profª. Drª. Geciane Toniazzo
Prof. Dr. Rogério Luis Cansian

ERECHIM, RS - BRASIL

JULHO DE 2013

UNIVERSIDADE REGIONAL INTEGRADA DO ALTO URUGUAI E DAS MISSÕES
URI – ERECHIM
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS

QUANTIFICAÇÃO DE INULINA EM DIFERENTES ESTÁDIOS DE DESENVOLVIMENTO DE CREM (*Tropaeolum pentaphyllum*) CULTIVADOS EM CAMPO E MICROPROPAGADOS

Carolina dos Santos Binda

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da URI-Erechim, como requisito parcial à obtenção do Grau de Mestre em Engenharia de Alimentos, Área de Concentração: Engenharia de Alimentos, da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI Erechim.

ERECHIM, RS - BRASIL

JULHO DE 2013

QUANTIFICAÇÃO DE INULINA EM DIFERENTES ESTÁDIOS DE DESENVOLVIMENTO DE CREM (*Tropaeolum pentaphyllum*) CULTIVADOS EM CAMPO E MICROPROPAGADOS

Carolina dos Santos Binda

Dissertação de Mestrado submetida à Comissão Julgadora do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Mestre em Engenharia de Alimentos, Área de Concentração: Engenharia de Alimentos.

Comissão Julgadora:

_____

Prof[a]. Dr[a] Geciane Toniazzo
Orientador

_____

Prof. Dr. Rogério Luis Cansian
Orientador

_____

Prof[a]. Dr[a]. Morgana Karin Pierozan
UDESC Pinhalzinho

_____

Prof[a]. Dr[a] Natalia Paroul
URI Erechim

Erechim, julho de 2013

NESTA PÁGINA DEVERÁ SER INCLUÍDA A FICHA CATALOGRÁFICA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO. ESTA FICHA SERÁ ELABORADA DE ACORDO COM OS PADRÕES DEFINIDOS PELO SETOR DE PROCESSOS TÉCNICOS DA BIBLIOTECA DA URI ERECHIM.

Dedico este trabalho:

Ao meu pai, Carlito, e minha mãe Sandra Mara pelo incentivo e apoio em todas as minhas escolhas e decisões.

AGRADECIMENTOS

A Deus.

Aos meus pais, que são meus exemplos e também as minhas bases fortes, pelo amor, carinho, compreensão nos momentos de ausência, e pelo constante apoio e incentivo em todas as etapas da minha vida.

A minha irmã Camila pelo companheirismo, disposição e ajuda nos momentos mais tensos e também nos momentos de alegria compartilhados.

Ao meu noivo Eduardo pelo carinho e companheirismo, apoio e incentivo sempre, pela compreensão nos momentos de ausência.

Aos meus mestres da graduação e do mestrado, por todo conhecimento adquirido com eles, o qual me possibilitou chegar a mais esta conquista.

Aos meus orientadores Rogério Luis Cansian e Geciane Toniazzo pela orientação, aprendizado, dedicação, pelo auxílio nos momentos de dúvidas, pela confiança depositada em mim, contribuindo muito na minha formação profissional.

A equipe do Laboratório de Cultura de Tecidos e Citogenética Vegetal – Biotecnologia do IFRS – campus Sertão: professores Nice Livio Borsoi e Adriano Michel, ao estagiário Andersom Bertoldi, pela ajuda, incentivo e aprendizado.

A colega de trabalho Denise Bilibio do Centro de Análise de Alimentos do IFRS – campus Sertão pela ajuda e auxílio nos momentos de dúvidas.

A todos os amigos que de alguma forma, perto ou distante contribuíram para a realização deste trabalho.

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.”

(Arthur Schopenhauer)

Resumo da Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos como parte dos requisitos necessários para a obtenção do Grau de Mestre em Engenharia de Alimentos.

QUANTIFICAÇÃO DE INULINA EM DIFERENTES ESTÁDIOS DE DESENVOLVIMENTO DE CREM (*Tropaeolum pentaphyllum*) CULTIVADOS EM CAMPO E MICROPROPAGADOS

Carolina dos Santos Binda

Julho/2013

Orientadores: Geciane Toniazzo
Rogério Luis Cansian

O objetivo deste trabalho foi investigar a presença de inulina na parte aérea de plantas de Crem (*Tropaeolum pentaphyllum*). Os experimentos foram conduzidos em três estádios de desenvolvimento do crem, antes, durante e após a floração da planta em campo experimental, utilizando a parte aérea e os tubérculos. Para comparação de resultados, foi utilizado ainda, material cultivado *in vitro* de Crem. Com a parte aérea foi determinada a curva de secagem. As extrações foram realizadas através do método de infusão em água quente (80 ± 2℃), com três tempos para a extração (1, 2 e 4 horas). Para a identificação e quantificação da inulina foi utilizado cromatografia líquida de alta performance (HPLC), com detector de índice de refração, utilizando como fase móvel acetonitrila e água (70:30%, respectivamente) e coluna NH_2. Para a análise dos resultados foi realizada uma curva padrão através da injeção de inulina comercial (Orafti) nas concentrações de: 2; 4; 6; 8 e 10% nas mesmas condições instrumentais. Os resultados obtidos mostram a presença de inulina na parte aérea de plantas de Crem, sendo o maior teor quantificado de 15,03 mg/g com tempo de extração de 2 horas. Em tubérculos de Crem o maior teor de inulina obtido foi de 70,92 mg/g também com 2 horas de extração, durante a floração. No material *in vitro* de Crem o maior teor de inulina encontrado foi de 11,4 mg/g, no tempo de 4 horas de extração, sendo este valor, estatisticamente igual ao encontrado no período de 2 horas de extração. Os teores de inulina encontrados nos tubérculos são aproximadamente 5 e 7 vezes superiores aos encontrados na parte aérea e no material cultivado *in vitro*, respectivamente.

Abstract of Dissertation presented to Food Engineering Program as a partial fulfillment of the requirements for the Degree of Master in Food Engineering.

VERIFICATION AND QUANTIFICATION OF INULINE ON THE AERIAL PARTS OF CREM PLANTS (*Tropaeolum pentaphyllum*)

Carolina dos Santos Binda

July/2013

Advisors: Geciane Toniazzo
Rogério Luis Cansian

The aim of this work was to investigate the presence of inulin at the aerial part of “Crem” plants(*Tropaeolum pentaphyllum*). The experiments was conducted on three stages of development of Crem, before, during and after flourish of the plant in experimental field, using the aerial part and the tubercles. To comparison of the results, was still used, *in vitro* cultivated material of Crem. With the aerial part was determined the curve of dry. The extractions were realized throughout the infusion methodology of hot water (80 ± 2℃), with three times to extraction (1,2 and 4 hours). To identification and quantification of inulin was used high performance liquid chromatography (HPLC), with detector of refraction index, using as moble faze acetonitrile and water (70:30%, respectively) and NH_2 column. To analyze the outcome was realized a pattern curve using the injection of commercial inulin (Orafti) on the concentrations of: 2; 4; 6; 8 e 10% on the same instrumentals conditions. The outcomes obtained show the presence of inulin on the aerial part of Crem´s plants, having the highest teor quantificated of 15,3 mg/g with the time of extraction of 2 hours. In tubercles of Crem the highest teor of inulin obtained was of 70,92 mg/g, also with 2 hours of extraction, during the flourishing. At the material Crem *in vitro* material, the highest teor of inulin found was of 11,4 mg/g, on the time of 4 hours of extraction, being this value, statiscally equal to the obtained on the period of 2 hours of extraction. The teors of inulin found at the tubercles are approximately 5 and 7 times above the one´s found on the aerial part and on the cultivated *in vitro* material, respectively.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS xii

LISTA DE TABELAS xiii

1. INTRODUÇÃO 1

2. OBJETIVO.....3

2.1. Objetivo Geral.....3

2.2. Objetivos Específicos 3

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....4

3.1. *Tropaeolum pentaphytllum* 4

3.2. Cultivo – *Tropaeolum pentaphyllum:* 6

3.3. Descrição – *Tropaeolum pentaphyllum:* 8

3.4. Inulina 9

3.5. Obtenção de Inulina.....11

3.6. Utilização da Inulina.....14

3.7. Micropropagação 16

4. METODOLOGIA.....21

4.1. Obtenção das amostras.....22

4.1.1. Parte aérea e tubérculos de crem.....22

4.1.2 Material *in vitro*.....23

4.2. Extração de inulina 25

4.3. Quantificação da inulina 25

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....27

6. CONCLUSÃO.....37

7. PERSPECTIVAS PARA TRABALHOS FUTUROS 38

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 39

ANEXO I.....44

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Imagem da parte aérea de *Tropaeolum pentaphyllum* 5

Figura 2 – Estrutura química da inulina. 10

Figura 3 - Fluxograma das etapas desenvolvidas para quantificação da inulina em *Tropaeolum pentaphyllum.* 21

Figura 4. Preparação do material de campo para secagem. 23

Figura 5 - Material *in vitro* em meio de cultura (a) e Material *in vitro* processado (em pó) (b).....24

Figura 6 - Cromatógrafo líquido utilizado para identificação e quantificação de inulina nas amostras. 26

Figura 7 - Curva de secagem da parte aérea do Crem. 27

Figura 8 - Desenvolvimento *in vitro* de Crem (*Tropaeolum pentaphyllum*). 30

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Taxa de multiplicação vegetativa de Crem (*Tropaeolum pentaphyllum*) durante a micropopagação.....29

Tabela 2 – Valores médios (mg/g) e desvio padrão do teor de inulina em extrato seco de tubérculos, folhas e material cultivado *in vitro* de Crem (*Tropaeolum pentaphyllum*).....31

1. INTRODUÇÃO

A inulina é um carboidrato (frutooligosacarídeo) de reserva que pode ser encontrado em mais de 30 mil vegetais. Inulina e oligofrutoses são polímeros de frutose que apresentam propriedades funcionais de grande importância para a indústria de alimentos; tanto a inulina como as oligofrutoses vem sendo utilizadas para enriquecer com fibras produtos alimentares. Diferentemente de outras fibras, estas não têm sabores adicionais, podendo enriquecer os alimentos sem alterar a viscosidade, aparência e sabor das formulações (HAULY; MOSCATTO, 2002).

As propriedades nutricionais da inulina e oligofrutoses são similares, porém, a inulina é mais indicada quando se pretende obter produtos com menos teor de gordura (como sorvetes, bolos e sopas), enquanto que oligofrutoses são adequadas para iogurtes de baixa caloria e para mascarar o sabor residual de adoçantes de alta intensidade utilizados nas preparações alimentares. Estudos têm indicado que a inulina e oligofrutoses apresentam características de prebiótico por não serem digeríveis, mas são seletivamente utilizadas pelas bifidobactérias, melhorando assim a microbiota intestinal (OLIVEIRA et al., 2004; HAULY; MOSCATTO, 2002).

A aplicação da inulina nas indústrias de alimentos e farmacêuticas está associada à possibilidade de substituição do açúcar e da gordura, com baixa contribuição calórica, e na formulação de medicamentos e alimentos funcionais, atuando no organismo de maneira similar às fibras dietéticas (TONELI et al., 2008), pois nos dias de hoje, os consumidores estão mais conscientes da relação que existe entre alimentação e saúde, de modo que a indústria de alimentos tem procurado oferecer produtos que apresentem benefícios múltiplos, associados ao sabor e à aparência (HAULY; MOSCATTO, 2002).

No Rio Grande do Sul muitas plantas possuem potencial alimentício, embora sejam classificadas como “plantas invasoras” ou “rudeiras” (ROSSI et al., 2011), também denominadas como “daninhas” ou “ inços”, pois permeiam entre as plantas cultivadas, no entanto, são espécies com grande importância ecológica

e econômica. Muitas destas espécies, por exemplo, são alimentícias mesmo que em desuso, atualmente, pela maior parte da população (KINUPP, 2007).

O uso e a valorização das hortaliças não convencionais (HNC) são ainda menores quando comparados às frutas não convencionais, que tem o apelo da cor, doçura e suculência. Ainda assim, algumas espécies de HNC fazem parte da culinária regional (KINUPP, 2007).

O Crem (*Tropaeolum pentaphyllum*), considerada uma hortaliça não convencional (HNC), possui tubérculos comestíveis, mesmo crus, tendo função antiescorbútica. Na realidade, é praticamente impossível consumir os tubérculos crus (exceto em poções mínimas), devido a altíssima pungência. O consumo usual no RS e no Planalto catarinense é na forma de conservas, ou seja, os tubérculos são ralados e curtidos em vinagre tinto colonial. Estas conservas são comercializadas e também são muito consumidas como condimento em sopas e carnes especialmente nas regiões serranas do RS e SC (KINUPP, 2007). Esta espécie foi selecionada e fornecida para um estudo de conclusão de curso no ICTA/UFRGS, visando quantificar o teor inulina existente nos seus tubérculos. O teor de inulina detectado (2,92 g/L) foi significativo (MAGALHÃES, 2006 apud KINUPP, 2007).

Segundo Mors, 2000 (apud KINUPP, 2007), os tubérculos de Crem são considerados antiescorbúticos e depurativos, tendo também à indicação popular de uso para a redução e controle do colesterol, o que faz a demanda pelo produto aumentar.

Devido a estas características, e também à inexistência de estudos e/ou trabalhos nesta área especificamente com o Crem, este estudo visa quantificar a inulina presente na parte aérea de plantas de Crem (*Tropaeolum pentaphyllum*), em diferentes estágios de desenvolvimento, cultivados em campo e micropropagados, e também avaliar a curva de secagem oriunda da parte aérea do Crem.

2. OBJETIVO

2.1. Objetivo Geral

Quantificar a Inulina na parte aérea de plantas de Crem (*Tropaeolum pentaphyllum*) em diferentes estádios de desenvolvimento cultivados em campo e micropropagados.

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar a curva de secagem oriunda da parte aérea do Crem (*Tropaeolum pentaphyllum*) para determinar o tempo de secagem ideal, em estufa de circulação de ar a 55℃;

- Verificar a presença de inulina na parte aérea de plantas de Crem (*Tropaeolum pentaphyllum*) cultivadas *in vitro*;

- Comparar o teor de inulina do crem cultivado *in vitro* com o encontrado em partes aéreas e em tubérculos de plantas de crem cultivado a campo;

- Comparar o teor de inulina da parte aérea e de tubérculos, em diferentes estágios de desenvolvimento do crem (antes durante e após o florescimento).

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1*. Tropaeolum pentaphytllum*

A família Tropaeolaceae, a qual pertence a espécie *Tropaeolum pentaphyllum* (Crem), é pertencente à ordem Geraniales, a qual é formada por cinco famílias e cerca de 2600 espécies (CRONQUIST, 1988), sendo que a maior parte destas espécies pertencem ao gênero *Tropaeolum*, enquanto os outros dois gêneros são monotípicos. A posição taxonômica foi baseada principalmente em semelhanças superficiais na morfologia floral e vegetativa, especialmente na homologia suposta entre os esporos de *Tropaeolum* e *Pelargonium* (DECRAENE; SMETS, 2001).

Esta família apresenta plantas que se caracterizam por serem ervas ou lianas herbáceas, frequentemente suculentas; folhas alternas, simples, frequentemente palmilobadas ou palmissectas, estípulas geralmente presentes, margem inteira ou serreada, frequentemente peltadas. Inflorescência geralmente reduzida a uma única flor, axilar; flores vistosas, bissexuadas, zigomorfas, diclamídeas, cálice pentâmero, com as três sépalas inferiores unidas, formando uma espora, com tecido nectarífico em seu interior, perfloração imbricada; estames 8, anteras rimosas; ovário súpero, trilocular, placentação axial ou pêndula, lúculos uniovulados, estilete único. Fruto esquizocárpico, seco ou carnoso (SOUZA; LORENZI, 2008).

A família Tropaeolaceae possui distribuição neotropical, ocorrendo principalmente em áreas de maior altitude, incluindo dois gêneros, *Mallagana* e *Tropaeolum* e aproximadamente 100 espécies (SOUZA; LORENZI, 2008).

No Brasil ocorrem quatro espécies deste gênero: *Tropaeolum pentaphylulm, T. peregrinum, T. sanctae-catharinae* e *T. warmingianum*, restritas aos estados do Sul e Sudeste, ocorrendo especialmente em bordas de mata em áreas de maior altitude (SOUZA; LORENZI, 2008).

Em estudos sobre o DNA ribossomal de *Tropaeolum*, Anderssom e Anderssom, (2000; apud RIX, 2010), indicaram que *Tropaeolum pentaphyllum*

deve ser incluído no grupo das *Chilensias*, sendo mais intimamente relacionada com *T. speciosum*. Mais tarde, Hershkovitz et al. (2006 apud RIX, 2010) sugeriu que estas duas espécies, e mais *T. patagonicun* Speg., são ancestrais de todas as espécies chilenas. Eles postularam que *T. pentaphyllum* e *T. speciosum* são relíquias de um misto de vegetações de clima temperado, que cobria a América do Sul, antes do surgimento da Cordilheira dos Andes no Piloceno e secagem das áreas de deserto.

As duas subespécies de *T. ciliatum*, formam a ligação entre as espécies da floresta Valdiviana *T. speciosum* e as espécies mais xerófitas, que se dividem em dois grupos, o deserto e as costeiras de flor pequena, tais espécies como *T. brachyceras* e *T. azureum* e as da montanha *T. polyphyllum*, *T. incisum* e *T. leptophyllum* (RIX, 2010).

Tropaeolum pentaphyllum foi descrita pela primeira vez e ilustrada por Monet de La Marck na *Encyclopédie méthodique, Botanique* em Paris em 1785 (Figura 1), a partir de amostras coletadas perto de Buenos Aires e Montevidéu por Philibert Commerçon (1727 – 1773), que era um cientista e médico na circunavegação em Bouganville em 1766 – 1769.

Figura 1 – Imagem da parte aérea de *Tropaeolum pentaphyllum*

Sparre e Andersson (1991; apud RIX, 2010), reconheceram três subespécies de *Tropaeolum pentaphyllum*: subesp. *pentaphyllum*, subesp. *megapetaloides* Sparre e subesp. *megapetalum* (Buch.) Sparre. Na subespécie *pentaphyllum*, o par superior de pétalas são vermelhas brilhantes e mais curtas que o cálice, porém, as outras duas subespécies apresentam as pétalas superiores ampliadas, maiores que o cálice; na subespécie *megapetaloides* as pétalas superiores são 9 – 13 mm de comprimento, e as sépalas são agudas, com poucos pontos, enquanto na subespécie *megapetalum* as pétalas superiores são 15 mm de comprimento, 6 – 8 mm de diâmetro, as sépalas são mais arredondadas e ambas as sépalas e pétalas são geralmente manchadas densamente (RIX, 2010).

As subespécies diferem também nas suas distribuições: subespécie *pentaphyllum* são comuns nos redores de Buenos Aires e ao longo das margens do Rio da Prata na Argentina e no Uruguai, assim como ocorre em alguns lugares ao longo da costa norte e do interior da bacia do Rio Paraná. A subespécie *megapetaloide* é encontrada perto da costa do sul do Brasil em até 800 m, enquanto a subespécie *megapetalum* é encontrada na Bolívia em Cochabamba, Santa Cruz, Chuquisaca, Potosí e Tarija, em torno de 2100 – 2500 m (SPARRE; ANDERSSON, 1991 apud RIX, 2010).

O habitat usual das três subespécies é entre os campos cultivados, em cercas vivas, sobre arbustos ou nas bordas de pequenas madeiras. Este é também o ambiente típico de alguns pássaros dispersadores que se alimentam dos frutos antes de voarem para um novo hábitat, assim dispersando naturalmente as sementes. Os carpelos maduros das três subespécies, tem um revestimento azul suculento, semelhante a encontrada em *Tropaeolum speciosum*. A maioria dos registros da subespécie *megapetalum* mencionam que esta tem preferência por locais próximo à riachos ou terras irrigadas (RIX, 2010).

3.2. Cultivo – *Tropaeolum pentaphyllum*:

A subespécie *pentaphylum* é relativamente fácil de ser cultivada na Europa, os brotos emergem no final da primavera, crescimento e floração durante o verão

ou no final da primavera na região do Mediterrâneo. Necessitam amplamente de água enquanto a planta está em crescimento, e pode ser mantido bastante seco durante o inverno. Esta subespécie sobrevive ao ar livre na maior parte da Grã-Bretanha, desde que os tubérculos sejam mantidos sem congelar; para garantir isso, elas podem ser plantadas sob rochas ou em uma laje de pavimentação, desde que os brotos possam surgir na primavera (RIX, 2010).

A subespécie *megapetalum* foi cultivada por vários anos até 2008 por Harry Hay em Reigate (Inglaterra), onde formou-se um grande tubérculo com hastes de 20 metros de comprimento, em um túnel de polietileno, porém não teve uma livre floração ou uma livre semeadura como na subespécie *pentaphyllum* (RIX, 2010).

No Brasil, foi registrado a presença nos três estados do Sul (PR, SC e RS) e também para o estado de São Paulo apesar de não citada na recente flora estadual (KINUPP et al., 2011).

Segundo Sparre (1972 apud KINUPP et al., 2011), a subespécie *megapetalum* ocorre no Rio de Janeiro onde foi coletada em Itatiaia. Este mesmo autor cita que esta subespécie é mais setentrional em relação a subspécie *pentaphyllum* ocorrendo até no sudeste boliviano e no Brasil. Recentemente com a descrição de uma nova subespécie (*T. pentaphyllum* subspécie *megapetaloides*) coletada no estado do Rio de Janeiro, a distribuição setentrional da espécie foi corroborada. No entanto, é mais abundante nos estados da Região Sul. Sobretudo em regiões de maiores altitudes (KINUPP et al., 2011).

A floração ocorre principalmente em setembro – dezembro na natureza, junho – agosto em cultivo na Europa (RIX, 2010).

Há registros de florescimento de junho a dezembro, com auge entre outubro e novembro. A frutificação ocorre logo após o florescimento, se as flores forem adequadamente polinizadas. Na natureza a emissão dos brotos, a partir dos tubérculos existentes no solo, inicia-se em abril. Sendo assim, abril e maio são os meses recomendáveis para o início do plantio. O ciclo da planta é rápido, estando completo em menos de um ano (nove a dez meses em geral). As partes aéreas de tubérculos plantados em maio começam a senescer no final de novembro e dezembro (KINUPP et al., 2011).

Segundo Fabbri e Valla, 1998 (apud KINUPP et al., 2011), afirmam que na latitude de Buenos Aires (Argentina), os tubérculos começam a brotar em fevereiro e no fim de novembro, após a frutificação, toda a parte aérea morre. Dados etnobotânicos de cultivadores domésticos de Nova Prata/RS afirmam que os tubérculos estão no ponto ideal de colheita após dois ciclos completos, porém após um ciclo de junho a abril os tubérculos atingem dimensões e massa suficientes para consumo e comercialização, pois os consumidores preferem tubérculos menores (KINUPP et al., 2011).

3.3. Descrição – Tropaeolum pentaphyllum:

É uma trepadeira herbácea que se fixa ao suporte pela torção dos pecíolos; parte aérea anual, e tubérculos subterrâneos rebrotando (perenes) na estação seguinte apresenta ramos finos e frágeis, com coloração verde-arroxeada quando jovens, sendo os brotos jovens recém-emergidos do solo totalmente roxos (KINUPP et al., 2011).

Tubérculo com rizoma grande. Hastes delgadas, glabras, que atinge 6 m ou mais de altura. Pecíolos delgados com 3 cm, sinuosos, redondos, enrolando-se em qualquer apoio. Estípulas ausentes. Folhas peltadas e fina textura, 2,5 – 5 cm de largura, divididas na base em cinco desiguais, lineares, lobos em geral lanceoladas, aguda ou obtusa, maior lobo a 34 x 4 mm, mas geralmente 25 x 11 mm, peciólulos 1 – 3 mm. Flores 25 – 35 mm de comprimento, zigomórficas solitárias sem brácteas, rosa, vermelho e verde, nas axilas das folhas na parte superior do tronco. Pedicelos vermelhos, curvos, 8 – 10 cm de comprimento, excedendo as folhas. Cálice lobado triangular agudo, os lóbulos com 7-10 x 4-5 mm, verde com máculas avermelhadas ou amarronzadas, geralmente riscado e manchado de vermelho no interior, ovado, obtuso, em vez rígida, estimular inflado, rosa, afinando a partir do cálice para um ponto sacular. Possui corola vermelho-alaranjada com formato abovado a espatulado menor que o cálice. O número de pétalas varia de 2 a 5, 3 – 6 mm de comprimento, inferior ausente, esporão ou calcar com 20 a 25 mm de comprimento, avermelhado, cônico, região terminal curvada com seu ápice avermelhado até enegrecido. Estames – 8, com

filamentos de 8 mm, anteras ovado-cordadas; pólen verde. Estilete delgado, mais curto que os estames, com três ramos filiformes. Ovário súpero, tricarpelar, trilocular e triovulado, frutos sésseis esquizocarpos compostos por 1 a 3 mericarpos monospermos, verdes quando imaturos e roxo-azulados quando maduros, com pericarpo macio; após a fecundação com o início da formação dos frutos até a abscisão dos mesmos, as sépalas e o esporão tornam-se roxos, geralmente formam-se três frutos por flor (RIX, 2010; KINUPP et al., 2011).

Espécie seletiva higrófita e heliófita, sendo típica de bordas de capoeiras, bordas de matas e margens de rodovias, estradas e clareiras. Medra em geral próximo às rochas e/ou amontoados de material orgânico (galhos e troncos em decomposição) em solos bem drenados e férteis. A subespécie *megapetalum* também é heliófita, porém medrando em terrenos mais secos, assim conquistando regiões mais secas da Bolívia e do Brasil central. Esta variabilidade e plasticidade genética é um bom indicativo das possibilidades de cultivo da espécie em diferentes regiões brasileiras (KINUPP et al., 2011).

3.4. Inulina

A inulina é um hidrato de carbono constituído por ligações β(1,2) ligadas principalmente a resíduos frutosil, que terminam com resíduos de glicose, estando presente na forma de hidratos de carbono de armazenamento em um grande número de plantas (VAN LOO et al., 1995; RITSEMA; SMEEKENS, 2003 apud MEYER et al., 2011).

Descoberta por Rose (cientista alemã), em 1804, a partir de um extrato de *Inula helenium*, e mais tarde chamada de inulina por Thonson (1818), sendo elucidado ainda nesta data, a síntese deste composto nas plantas. Suas propriedades no organismo humano foram percebidas no início do século XX. No entanto, plantas contendo frutanos, como a inulina, já eram consumidas como alimento, forragem ou na forma de medicamento (SANCHES, 2010).

Em 1950, o uso de plantas com altos teores de inulina foi recomendado em alimentos destinados a diabéticos (CAPITO; FILISETTI, 1999 apud SANCHES, 2010; RANAWANA, 2008).

A inulina é um polímero de D-frutose, sendo importante como carboidrato de reserva em plantas. Esta, pertence ao grupo das frutanas e é sintetizada por uma grande variedade de plantas (aproximadamente 36 mil espécies, que representam 10 famílias) (CARPITA; KAMABUS; HOUSLEY, 1989 apud HAULY; MOSCATTO, 2002).

Segundo Quememer et al., 1997 (apud HAULY; MOSCATTO, 2002) a inulina é uma frutana polidispersa, constituída de uma mistura de polímeros e oligômeros superiores lineares de frutose. As unidades de β-D-frutofuranosil são mantidas entre si por ligações do tipo β(2→1), e possuem uma molécula de glicose na porção inicial de cada cadeia linear de frutose, a qual é unida por uma ligação tipo (α 1-β2), como na molécula de sacarose (Figura 2).

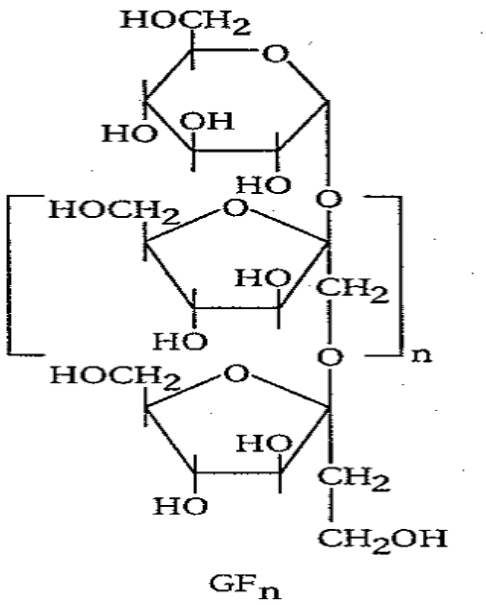

Figura 2 – Estrutura química da inulina.
Fonte: Roberfroid, 1993 apud Oliveira et al., 2004.

Os frutooligossacarídeos (FOS) são definidos como polímeros de D-frutose, terminando com uma molécula de glicose, de forma que a inulina pode ser classificada como um frutooligossacarídeo (SILVA et al., 1996 apud OLIVEIRA et al., 2004), também é definida pelo mesmo autor, como um frotooligossacarídeo composto por uma mistura de oligômeros de diferentes graus de polimerização (GP) que ocorre, naturalmente, em diversos vegetais.

A hidrólise (ácida ou enzimática) da inulina produz oligômeros lineares. Estes são estruturalmente designados GFn (glicose-frutose), onde n representa o número de unidades frutofuranosil obtidas pela hidrólise, e Fm, que é constituída apenas por frutose (onde m representa o número de unidades frutofuranosil obtidas). Os valores de n e m variam entre 2 e 9 (ROBERFROID, 1993; DE BRUYN et al., 1992 apud HAULY; MOSCATTO, 2002). GFn e Fm tem propriedades físico-químicas muito semelhantes, embora se verifique a presença de grupo terminal frutose redutor, os produtos tipo Fm são redutores, enquanto os GFn são não redutores. Oligômeros de frutose são denominados de frutooligossacarídeos (FOS) ou, de forma simplificada, oligofrutoses (ROBERFROID, 1993 apud HAULY; MOSCATTO, 2002).

Sendo utilizada na obtenção de outros ingredientes alimentares como xarope de frutose e frutooligossacarídeos, a inulina é hidrolizada pela inulinase, enzima produzida principalmente por leveduras, bactérias e plantas (ROSSI et al., 2011). A inulina também pode servir de substrato para microrganismos que utilizam este polissacarídeo na produção de inulinase (BARRANCO-FLORIDO et al., 2001; GILL et al., 2006; ROCHA et al., 2006 apud ROSSI et al., 2011). Assim, tem-se estudado o conteúdo de inulina em diferentes espécies como yacon (*Smallanthus sonchifolius*), alcachofra de Jerusalém (*Helinthus tuberosus*), cebola (*Allium cepa*) e outras (ROSSI et al., 2011).

3.5. Obtenção de Inulina

A inulina pode ser encontrada, em diversos vegetais como, na cebola (1-5% peso fresco), alho (4-12%), banana (0,2%) e em raízes de chicória (15-20%). A inulina, uma vez que está presente em chicória tem um grau de polimerização

(GP) que varia de 3 a 60 unidades de monossacarídeos com uma média de cerca de 10 unidades, o seu produto de hidrólise parcial enzimática é chamado de oligofrutose (OF), que tem um GP variando de 2-8, com uma média de cerca de 4 unidades. A inulina de cadeia longa com uma média de GP de cerca de 23 entre 10 e 60 pode ser produzido a partir de inulina nativa, aplicando técnicas de separação específicas (MEYER et al., 2011).

A inulina é utilizada por algumas plantas como um meio de armazenamento de energia (CHI et al., 2011). Espécies de plantas que contêm inulina, são encontrados em número de mono e dicotiledôneas, tais como famílias Liliaceae, Amaryllidaceae, Gramineae e Compositae. Em Liliaceae, Amaryllidaceae e Compositae, inulinas são normalmente armazenados em órgãos como bulbos, tubérculos e raízes tuberosas. As duas espécies atualmente utilizados pela indústria para a produção de inulina pertencem a família Compositae: alcachofra de Jerusalém (*Helianthus tuberosus*) e chicórias (*Cichorium intybus)* (KAUR; GUPTA, 2002).

Muitas plantas que contêm inulina fazem parte da dieta básica há muitos anos, sendo a cebola a mais consumida entre elas. A concentração de inulina em cada planta depende da variedade, do tempo decorrido desde a colheita até a utilização desta em condições de estocagem. Na cebola, dependendo destes fatores, a concentração de inulina pode chegar até 50% da matéria seca (RUTHERFORD; WHITTLE, 1982 apud HAULY; MOSCATTO, 2002).

A chicória é utilizada principalmente como matéria-prima para a produção industrial de inulina como ingrediente alimentar (BOECKNER et al, 2000 apud MEYER et al., 2011). A produção começou no início de 1990 na Bélgica e nos Países Baixos e o volume de produção tem aumentado desde então. Este hidrato de carbono não digerível é utilizado crescentemente em todo o mercado de alimentos, podendo ser encontrado em produtos lácteos e padaria, em bebidas, em barras de cereais com baixo teor de gordura, em sorvetes e em produtos de confeitaria (FRANK , 2000; Meyer et al, 2007 apud MEYR et al., 2011). Seguindo estas aplicações, a inulina também encontra utilização em aplicações não alimentares como para medicamentos na forma de comprimidos (EISSENS et al.,

2002 apud MEYER et al., 2011), e em alimentos para animais domésticos (VAN LOO, 2007 apud MEYER et al., 2011).

Yacon é uma erva perene que pertence à família Asteraceae, e apresenta inulina em seus tubérculos (3-10%) (POREMBSKI; KOCH, 1999 apud CHI et al., 2011). Alho (*Allium sativum*) pertence à família botânica de Liliaceae, que armazena carboidratos em dentes que constituem 75% da matéria seca (BAUMGARTHER et al., 2000 apud CHI et al., 2011).

Isto confirma que a inulina é uma polifrutana generalizada que ocorre naturalmente em várias plantas. De fato, ela é produzida naturalmente em mais de 36 mil plantas em todo o mundo, incluindo 1200 gêneros em 10 famílias (MARCHETTI, 1993 apud CHI et al., 2011).

Extraída de plantas, a inulina se apresenta em forma de pó branco, amorfo e higroscópico, com odor e sabor neutros e isenta de sabor residual (FRANCK, 2006 apud ROSSI et al., 2011). Apresenta solubilidade que varia de acordo com a temperatura da água, sendo de aproximadamente 6% a 10ºC e de 35% a 90ºC, dificultando assim seu emprego à temperatura ambiente. A capacidade de ligação de água pela inulina é de 2:1, ou seja, duas moléculas de água para cada molécula de inulina (HAULY; MOSCATTO 2002).

Devido ao comprimento de cadeia longa, a inulina é menos solúvel e tem a capacidade para formar microcristais quando diluídos em água ou leite. Por conseguinte, foi utilizada com sucesso como um substituto de gordura (NINESS, 1999 apud RANAWANA, 2008). Quando a inulina é acrescentada aos alimentos em concentrações baixas, as propriedades reológicas e da qualidade sensorial do produto não será afetada fortemente devido ao sabor levemente doce ou neutro e do efeito limitado sobre a viscosidade deste ingrediente (FRANK, 2002 apud MEYER et al., 2011).

A inulina, sendo um carboidrato largamente encontrado na natureza, apresenta hidrólise endógena em moléculas de menor grau de polimerização, o que permite a sobrevivência destas plantas durante o inverno em regiões frias e moderadamente frias e atua na osmorregulação (CARPITA et al., 1989 apud HAULY; MOSCATTO, 2002).

3.6. Utilização da Inulina

O uso tecnológico da inulina é baseado nas suas propriedades como açúcar (especialmente em combinação com edulcorantes de intensidade elevada), como um substituto da gordura e modificador da textura (MEYER et al., 2011).

Derivados químicos de inulina são usados em aplicações industriais, por exemplo, a inulina é utilizada como carboximetil no tratamento de águas residuais (MARTINOD et al., 2009 apud MEYER et al., 2011).

A vasta utilização na indústria alimentar é baseada nas propriedades funcionais e tecnológicas da inulina. Para o primeiro, não só a dieta, como as propriedades das fibras da inulina são importantes (tais como o efeito positivo sobre hábitos intestinais) (TUNGLAND; MAYER, 2002), mas também as propriedades pré-bióticas. Estes surgem do fato de que a inulina pode causar uma mudança específica na composição da microbiota do cólon intestinal, que tem efeitos benéficos ao hospedeiro humano, tais como o alívio de constipação, melhoria na composição de lipídeos do sangue e eliminação da produção de substâncias putrefativas no trato intestinal (GIBSON et al., 2004 apud MEYER et al., 2011; ROBERFROID, 2005 apud DALONSO et al., 2009).

A inulina foi provada recentemente para melhorar a saúde do intestino, através do aumento da produção das fezes, melhorando assim a integridade do epitélio intestinal, absorção crescente de minerais, reduzindo significativamente a incidência de diarréia, o fortalecimento do sistema imune e estimular o crescimento de microrganismos benéficos ao intestino (NYMAN, 2002; WATZL et al., 2005).

O aumento específico de bifidobactérias é encontrado em seres humanos de todas as idades (MEYER; STASSE-WOLTHUIS, 2009 apud MAYER et al., 2011), e está ligado a uma variedade de efeitos fisiológicos benéficos. Estes incluem hábitos intestinais melhores, o aumento da absorção de cálcio com efeitos positivos para a saúde dos ossos, favorecendo a síntese de vitamina B (MEYER; STASSE-WOLTHUIS, 2009 apud MEYER et al., 2011; BALCÁZAR et al., 2003 apud DALONSO et al., 2009), uma redução de lipídeos séricos com

relevância para a saúde do coração (BRIGUENTI, 2007), um efeito positivo sobre a sensação de saciedade com potenciais consequências positivas para o controle de peso (CANI et al., 2006).

Existem evidências de que a inulina auxilia na absorção de minerais, principalmente o cálcio. Através de estudos *in vitro* com jovens que receberam 15g/dia de inulina, Van Den Heuvel ET al., 1998, 1999 (apud SANCHES, 2010), observaram que houve aumento na absorção de cálcio pelos jovens.

A redução dos triglicerídeos plasmáticos, fosfolipídios e colesterol é resultado do metabolismo dos lipídios modificados pelas fibras e FOS (FIORDALISO ET al., 1995 apud SANCHES, 2010). Tais autores chegaram a estas conclusões, a partir de estudos feitos em ratos que tiveram uma dieta contendo 10% de FOS e demonstraram uma diminuição das lipoproteínas de muito baixa densidade; sendo que a redução acontece pela absorção dos ácidos graxos de cadeia curta pelas membranas intestinais e posterior migração até o fígado, onde atuariam como reguladores das vias metabólicas.

A inulina também está relacionada com a inibição da carcinogênese do cólon. Em um estudo desenvolvido por Reddy et al. (1998 apud SANCHES, 2010), foram induzidas lesões pré-cancerosas em ratos, usando azoximetano, sendo administrada uma dieta de 10% de FOS ou inulina e após certo período foi observada uma redução significativa das lesões.

Os frutanos tem ação redutora da glicose e da insulina. Dessa forma, as células tumorais não se desenvolvem por aproveitarem pouco a glicose, além da mudança à sensibilidade à inulina, que faz parte do mecanismo de inibição do crescimento dos tumores (TAPER; ROBERFROID, 1999 apud SANCHES, 2010).

A inibição dos estádios iniciais do câncer de cólon é atribuída à formação dos ácidos de cadeia curta, mais especificamente, o ácido butírico, que promove um acréscimo da apoptose (morte das células malignas) no cólon (QUINTEROS, 2000 apud SANCHES, 2010). Segundo Reddy, 1999 (apud SANCHES, 2010), o efeito inibidor do câncer de cólon deve-se à remoção dos carcinógenos pelas bifidobactérias, via fezes.

Além disso, há uma grande especulação sobre o uso da inulina por pessoas diabéticas, considerando a capacidade da inulina em reduzir os níveis de glicose no sangue (TAPER; ROBERFROID, 1999 apud SANCHES, 2010).

3.7. Micropropagação

A propagação vegetativa *in vitro*, também denominada de micropropagação por causa do tamanho dos propágulos utilizados, é a aplicação mais prática da cultura de tecidos, é também umas das principais ferramentas da biotecnologia de plantas que explora a natureza totipotente das células, sendo este, um conceito proposto por Haberlant (1902). A cultura *in vitro* de plantas facilita a rápida multiplicação de clones superiores e é pré-requisito para o desenvolvimento de plantas através de técnicas de engenharia genética (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998; KOTHARI et al., 2010).

A micropropagação, é definida como a cultura de diferentes células, tecidos ou órgãos de plantas sob condições controladas, objetivando produzir um grande número de plantas geneticamente idênticas às plantas matrizes em um período relativamente curto, em comparação a propagação convencional. Isto implica que a clonagem *in vitro* é baseada no fato de que diferentes partes da planta como brotos, meristemas, tecidos e células são capazes de se regenerar em plantas inteiras, em condições *in vitro* adequadas. Uma característica especial destas células de plantas e meristemas é que se conserva uma capacidade latente para produzir toda uma planta, sendo esta capacidade chamada de totipotência (REINERT; BECKS, 1968; VASIL, 1972; VERDEIL et al., 2007; GEORGE, 2008 apud DOBRÁNSZKI; SILVA, 2010).

Esta técnica permite a propagação em larga escala de plantas sadias, conservando as mesmas características agronômicas da planta mãe. Muitas vezes a propagação assexuada convencional é um processo lento e apresenta sérios riscos de disseminação de doenças e pragas, que podem comprometer a produção (ULISSES et al., 2010).

No entanto, a propagação *in vitro* de plantas tem apresentado algumas vantagens, como possibilitar maior controle sobre a sanidade do material propagado e também possibilitar a obtenção de várias plantas, a partir de um único explante inicial, independentemente de condições climáticas; redução do tempo e da área necessária à propagação da espécie; melhores condições sanitárias por meio do cultivo de meristemas previamente tratados por termoterapia, para eliminação de doenças; reprodução do genótipo da mãe, geralmente com fidelidade durante multiplicação e a propagação vegetativa de espécies difíceis de serem propagadas por outros métodos (ERIG; SCHUCH, 2005 apud CARVALHO et al., 2006; CARVALHO et al., 2005).

Há algumas décadas, uma linha com trabalhos com cultura de tecidos teve como objetivo a regeneração de plantas a partir da cultura de ápices caulinares. Esses estudos procuravam estabelecer melhor entendimento da fisiologia do crescimento de regiões isoladas sem a interferência dos efeitos correlativos do resto da planta e de influências do ambiente. Ball (1946 apud GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998), observou que os ápices caulinares de *Tropaeolum* e *Lupinus* perderam a capacidade de regeneração quando cultivados desprovidos de primórdios foliares. Wetmore e Morel (1949 apud GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998) conseguiram regenerar e propagar samambaias a partir de meristemas apicais do rizoma. Mais tarde, Smith e Murashigue em 1970, conseguiram desenvolver plantas em explantes de meristemas apicais desprovidos de primórdios foliares em meio contendo sais minerais, vitaminas e enriquecido com fitorreguladores.

A terminologia “cultivo *in vitro* de plantas” engloba o cultivo de células, tecidos e órgãos de plantas. Existem várias técnicas de cultivo *in vitro* de plantas além da micropropagação, dentre elas pode-se citar: o cultivo de protoplastos, que permite hibridizar variedades diferentes vencendo barreiras genéticas; o cultivo de anteras que viabiliza a produção de plantas haplóides, que em seguida diploidizadas produzem um só tipo de gameta para um determinado locus (produção de linhagens puras); limpeza clonal utilizada para produção de plantas livres de patógenos, entre outras. O cultivo *in vitro* de células, tecidos e ou órgãos,

dá também suporte técnico a trabalhos de transformação genética e obtenção de plantas transgênicas (ULISSES et al., 2010).

Dentre as técnicas de cultivo *in vitro*, a micropropagação é uma das aplicações mais rotineiras e de maior impacto para a agricultura, pois permite uma rápida multiplicação de plantas em larga escala, com características agronômicas superiores. Esta técnica também vem se destacando em vários setores agrícolas, tais como: fruticultura, floricultura, horticultura, como também na área florestal, por promover o incremento da produção de mudas vigorosas e livres de patógenos, contribuindo conseqüentemente, para o aumento da produtividade do setor agrícola (ULISSES et al., 2010).

Os explantes, sendo estes, segmento de tecido ou órgão retirado da planta matriz utilizado para iniciar o cultivo *in vitro*, os utilizados mais frequentemente são ápices caulinares, meristemas ou gemas (ULISSES et al., 2010).

A cultura de tecidos tem sido explorada para criar variabilidade genética através da produção de haplóides, variantes somaclonal e gametoclonal de plantas de cultura que podem ser melhoradas; a mesma, em combinação com técnicas de biologia molecular também tem sido utilizada com sucesso, para incorporar características específicas através de transferência de genes (KOTHARI et al., 2010).

A utilização da micropropagação em âmbito comercial já é realizada em diversos países do mundo com destaque para a Europa Ocidental, América do Norte, Ásia, Austrália e Israel, sendo que os laboratórios comerciais surgiram, em grande maioria, agregados aos viveiros como iniciativa das próprias companhias produtoras de mudas (ULISSES et al., 2010; SOUZA et al., 2010). A primeira aplicação comercial da micropropagação foi feita por Morel (1960), ao multiplicar orquídeas mediante cultura de ápices caulinares e regeneração de protocormos, diminutas estruturas que se diferenciavam e davam origem a embriões, sendo que a sucessiva divisão destes protocormos acelera a propagação das orquídeas (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

No Brasil, a cultura de ápices caulinares *in vitro* está sendo utilizada de forma crescente nos últimos anos (ALVES et al., 2004 apud SOUZA et al., 2010)

representada principalmente pela fruticultura moderna voltada para os plantios adensados, que necessitam de grande número de mudas por área, e do uso de mudas certificadas (SCHUCH; ERIG, 2005 apud SOUZA et al., 2010). Contudo, a principal limitação para o acesso dos produtores às mudas micropropagadas é relativamente o elevado custo deste tipo de material propagativo sendo, entretanto, bastante superior ao das mudas convencionais (ULISSES et al., 2010).

A técnica de micropropagação consiste, basicamente, em cultivar em ambiente asséptico (laboratório) segmentos de plantas (gemas, ápices caulinares, meristemas, fragmentos de folhas e raízes, entre outros), em frascos específicos contendo meio nutritivo adequado, proporcionando a produção de milhares de plantas idênticas a planta mãe (ULISSES et al., 2010).

O sistema de micropropagação pode ser dividido em diferentes estágios, na década de setenta, quando a micropropagação ganhou grande impulso, Murashigue (1974 apud GRATTAPAGLIA; MACHADO,1998) apresentou o conceito de estágios de desenvolvimento no processo de propagação *in vitro*. Este esquema, padrão para sistemas de micropropagação, divide-se em:

Estágio I – Seleção da planta mãe ou matriz: Geralmente as plantas matrizes possuem características agronômicas superiores e recebem tratamento fitossanitário, nutricional e hídrico, para aumentar a probabilidade de sucesso nos estágios seguintes da micropropagação;

Estágio II – Seleção e tratamento do explante: Nesse estágio retira-se um segmento de tecido (explante) da planta matriz, desinfesta-se em meio nutritivo sob condições assépticas;

Estágio III – Fase de multiplicação: Para propagação *in vitro* utiliza-se principalmente gemas apicais e axilares, além de brotações laterais para realizar os sucessivos subcultivos;

Estágio IV – Faze de enraizamento: Transferência das partes aéreas para meio de enraizamento e posteriormente transplantio e aclimatização das plantas em substrato.

A etapa de transplantio envolve transferência das plantas da condição *in vitro* para o telado de aclimatização (condição *ex vitro*). Essas plantas são transferidas para tubetes, bandejas ou potes plásticos contendo substrato, que pode ser solo, areia entre outros. Após o período de aclimatização, as plantas são levadas ao campo, onde desenvolvem-se normalmente (ULISSES et al., 2010; GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

4. METODOLOGIA

Os materiais utilizados neste trabalho foram: a parte aérea de Crem (*Tropaeolum pentaphyllum*), composta pelas folhas e caule, originário do campo experimental, tubérculos de crem também cultivados em campo experimental, e mudas cultivadas *in vitro* da mesma.

Na Figura 3, são apresentadas as etapas seguidas para a preparação das amostras (parte aérea, tubérculos e material *in vitro*), para posteriormente serem analisadas quanto à presença de inulina.

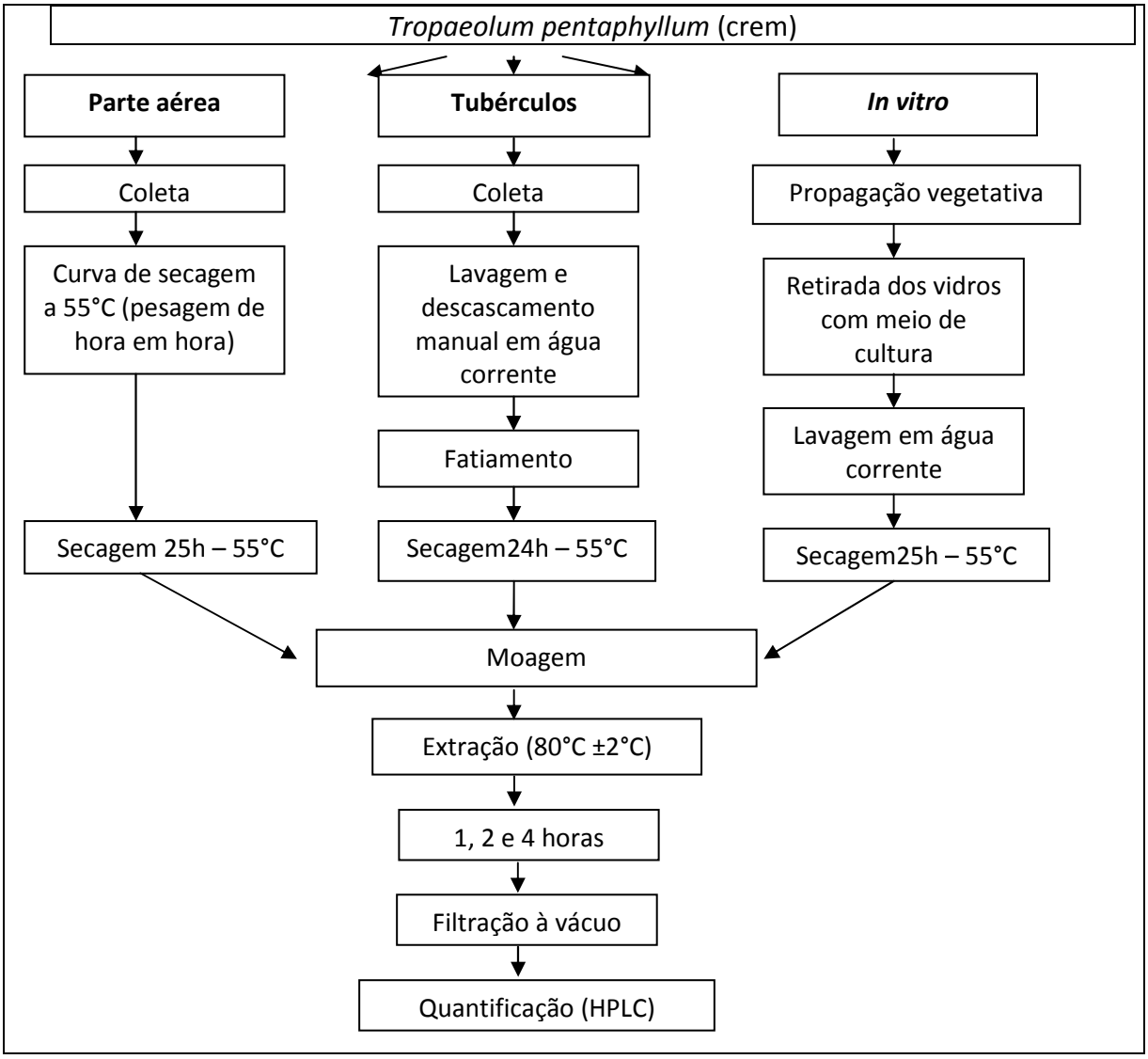

Figura 3 - Fluxograma das etapas desenvolvidas para quantificação da inulina em *Tropaeolum pentaphyllum.*

4.1. Obtenção das amostras

4.1.1. Parte aérea e tubérculos de crem

As plantas de Crem (*Tropaeolum pentaphyllum*) foram cultivadas em campo experimental no Instituto Federal do Rio Grande do Sul – Campus Sertão, RS, a partir de 8 matrizes cultivadas em casa de vegetação.

Durante o ciclo normal do Crem (abril a dezembro), foram colhidos tubérculos e também a parte aérea das plantas (Figura 4) em três diferentes fases de desenvolvimento, antes, durante e após a floração.

Para determinação do tempo de secagem das folhas e tubérculos do Crem, foi feita uma curva de secagem em estufa de circulação de ar. Com uma temperatura pré-estabelecida na literatura de 55ºC (PADILHA et al., 2009; DIAS et al., 2005; VIEIRA; MORAES, 1992), as amostras foram conduzidas em triplicatas pesando-as de hora em hora, considerando para o encerramento da operação a estabilização do peso.

Após a obtenção da curva de secagem, as amostras da parte aérea, passaram pelo processo de secagem em estufa de circulação de ar, permanecendo por 25 horas à temperatura de 55ºC, utilizando-se sacos de papel com algumas perfurações, para melhor ventilação e trocas de calor do material com o meio interno da estufa.

Os tubérculos do Crem, após serem colhidos, passaram pelo processo de descascamento manual em água corrente, em seguida foram fatiados e colocados em bandejas de inox e submetidos a secagem em estufa de circulação de ar permanecendo por 24 horas à temperatura de 55ºC.

Após a secagem das amostras da parte vegetal, aérea e tubérculos, o material seco foi processado em um Micro Moinho tipo Ciclone, transformando-as em pó, onde foram armazenadas protegidas da luz e da umidade para posterior extração e análise da inulina.

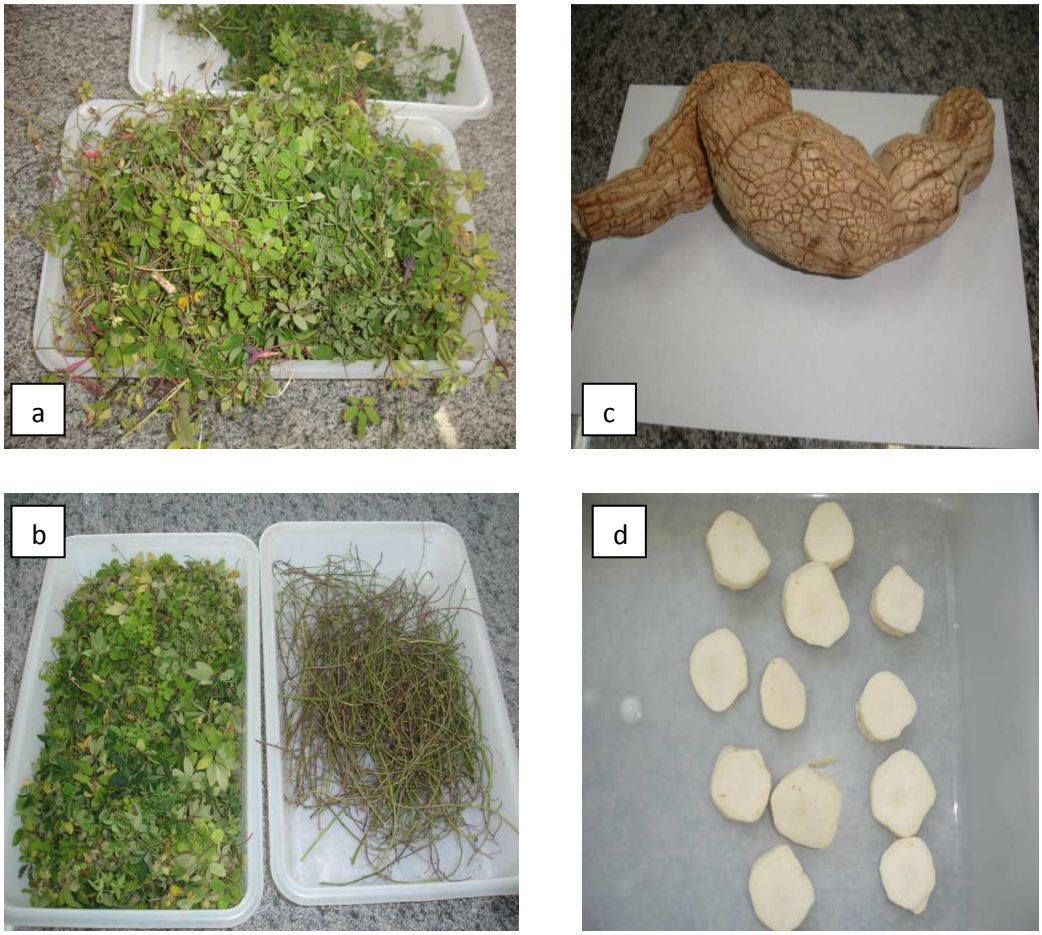

Figura 4. Preparação do material de campo para secagem.
a) Parte aérea de crem recém colhida do campo. b) Parte aérea (folhas e caules) preparados para a secagem. c) Tubérculo de crem colhido do campo e lavado. d) Tubérculo já cortado para a secagem.

4.1.2 Material *in vitro*

As mudas cultivadas *in vitro*, foram oriundas do Laboratório de Cultura de Tecidos e Citogenética Vegetal – Biotecnologia do IFRS campus Sertão.

Com o objetivo de produzir o maior número de plantas possíveis em menor espaço de tempo, as mudas de Crem passaram pelo processo de repicagem 3 vezes (R3) para a multiplicação do material, no qual consiste em segmentar a planta cultivada *in vitro* em pequenos propágulos ou explantes (segmentos nodais) de aproximadamente 1cm cada, em seguida, estes propágulos foram transferidos para um vidro contendo meio de cultura MS de Murashigue & Skoog

(1962) (ANEXO I), até a obtenção de uma quantidade de mudas necessária para o processo de extração de inulina.

Todos os procedimentos foram realizados em local livre de contaminação e com condições assépticas, assim como os materiais utilizados durante os procedimentos de micropropagação, passaram por diversas flambagens após imersão em álcool absoluto, e estes materiais foram utilizados somente após estarem frios para que não houvesse danos aos tecidos vegetais. O material *in vitro* foi mantido sob condições controladas, com fotoperíodo de 16 horas luz/8 horas escuro a uma temperatura de 25ºC (±2ºC).

Após a obtenção de um número suficiente de mudas (Figura 5 a), estas foram retiradas dos vidros contendo meio de cultura, lavadas em água corrente (para a retirada de resíduos de meio de cultura que possam ficar aderidos na base da planta), e então passaram pelo processo de secagem em estufa de circulação de ar por 25 horas, à temperatura de 55ºC. O material seco foi processado em um Micro Moinho tipo Ciclone, e o pó resultante (Figura 5 b) foi armazenado protegido da luz e da umidade em temperatura ambiente.

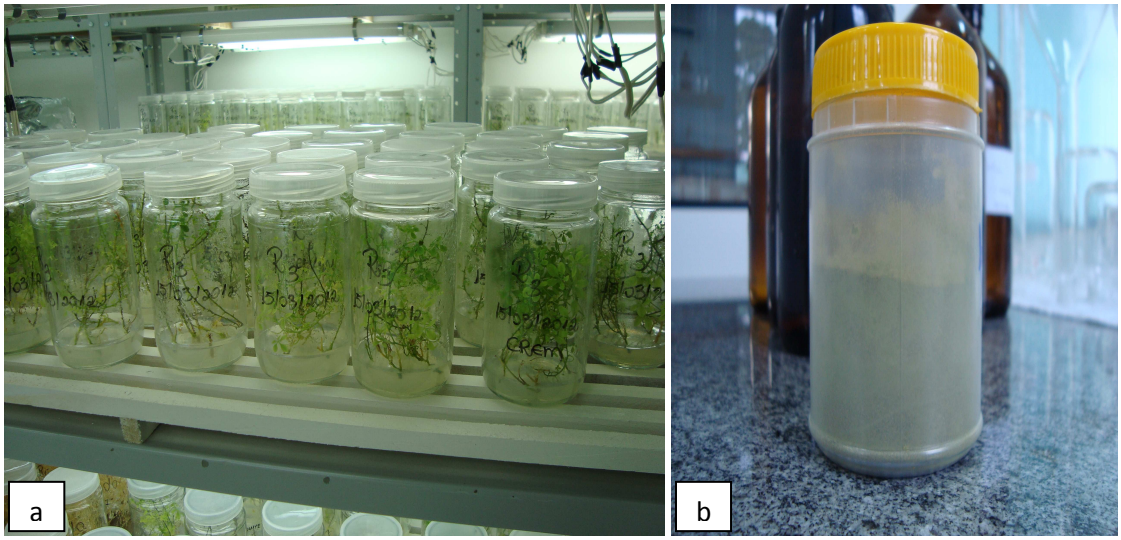

Figura 5 - Material *in vitro* em meio de cultura (a) e Material *in vitro* processado (em pó) (b).

4.2. Extração de inulina

Com as amostras (parte aérea, tubérculos e o material cultivado *in vitro*) desidratadas e moídas, foram misturadas com água na proporção de 1:10 (5 g de amostra: 50 mL de água destilada).

A extração da inulina foi realizada através de infusão em água quente. Com a amostra misturada com água, esta foi colocada em um agitador magnético com aquecimento, a uma temperatura de 80ºC (±2ºC) e com agitação constante, sendo que estas condições foram estabelecidas de acordo com Toneli et al. (2008).

As amostras foram conduzidas em triplicatas, sendo testados 1, 2 e 4 horas de extração da inulina. A temperatura de extração foi fixada em 80ºC (±2ºC).

Após este período, as amostras passaram pelo processo de filtração à vácuo, onde foi utilizado filtro qualitativo de 3 micras de porosidade e funil de Buchner. Os extratos, resultantes, foram armazenados em vidros de amostra e, em seguida foram congelados (-15℃).

4.3. Quantificação da inulina

Os extratos das amostras de crem foram descongelados, num processo de descongelamento lento, e após, as amostras foram filtradas novamente com filtro Millex HV de 0,45 micras de porosidade.

A quantificação da inulina foi realizada pelo método de Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC). As amostras foram injetadas em triplicatas, e analisadas em um cromatógrafo líquido de alta performance (HPLC) (Agilent 1.100) (Figura 6), com detector de índice de refração, usando acetonitrila (Merck) e água (70:30% respectivamente), como fase móvel a um fluxo de 1,0 mL/min, temperatura de 80ºC, pressão média de 70 bars, tempo de corrida 15 minutos e coluna NH_2 da Rezex RCM (Phenomenex, 300). Para a análise dos resultados foram construídas previamente uma curva padrão através da injeção de inulina comercial (Orafti) nas concentrações de: 2; 4; 6; 8 e 10 %, nas mesmas condições instrumentais.

Figura 6 - Cromatógrafo utilizado para identificação e quantificação de inulina nas amostras.

Os teores de inulina foram expressos em mg/g de matéria seca usada na extração e foram tratados estatisticamente por análise de variância (ANOVA) e comparação de médias pelo teste de Tukey com 95% de confiança utilizando o software *Statistica* versão 8.0.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados da curva de secagem da parte aérea do Crem, utilizada para determinar o tempo de secagem ideal, em estufa de circulação de ar a 55ºC, encontram-se na Figura 7. Segundo Corrêa et al. (2007) a secagem dos produtos é o processo mais utilizado para assegurar sua qualidade e sua estabilidade, considerando que a diminuição da quantidade de água no material reduz a atividade biológica e as mudanças químicas e físicas que ocorrem durante o armazenamento.

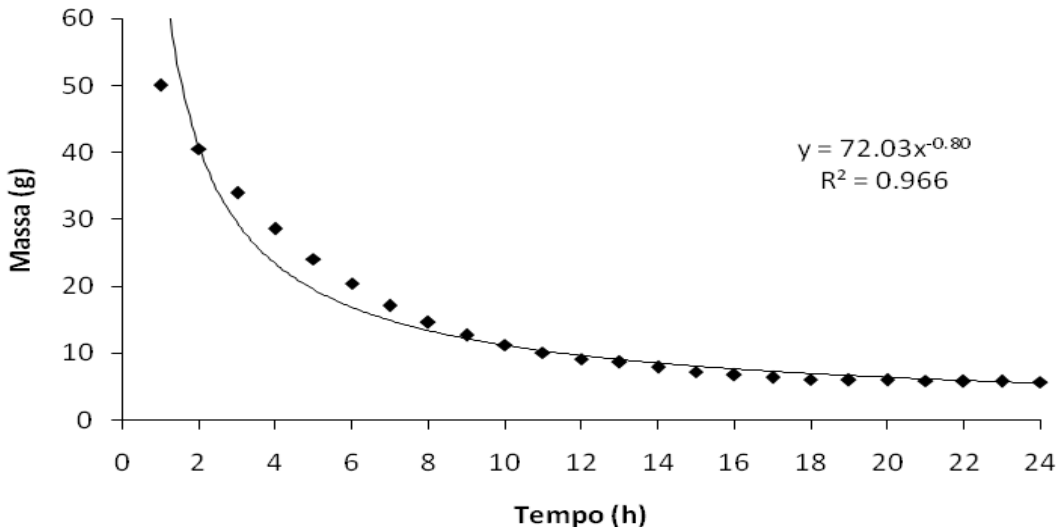

Figura 7 - Curva de secagem da parte aérea do Crem.

Analisando a curva de secagem, verifica-se uma exponencial perda de água, principalmente nas primeiras 10 horas. Segundo Brooker et al. (1992 apud Corrêa et al., 2007), o processo de secagem de um produto pode ser dividido em período de velocidade constante e outro de velocidade decrescente. Durante o período de velocidade constante, a temperatura do produto mantém-se igual a do ar de secagem saturado, e as transferências de calor e massa compensam-se, ou seja, o ar recupera sob a forma de vapor, o que perdeu sob a forma de calor. No período de velocidade decrescente de secagem, a taxa de transporte interno de

água é menor do que a taxa de evaporação; desta forma, a transferência de calor do ar para o produto não é compensada pela transferência do vapor da água e, consequentemente a temperatura do material aumenta, tendendo a atingir a temperatura do ar de secagem. Esta exponencial redução do teor de água neste primeiro período de tempo (10 horas) também é observado em outros trabalhos, no qual foram utilizados tubérculos de yacon (PADILHA et al., 2009).

Verificou-se também que no período de 20 para 24 horas houve uma pequena oscilação na umidade do material vegetal, o qual também foi observado em outros trabalhos, como em Padilha et al., (2009).

Segundo Corrêa et al. (2004), a secagem de material vegetal é definida como uma operação adotada para eliminar a água da superfície e do interior de um material, e, tem como objetivo cessar as alterações químicas dos tecidos vegetais e evitar possíveis degradações durante o seu armazenamento, mantendo assim, suas características físicas e químicas por mais tempo; uma vez que a análise imediata do material recém-coletado a campo é inconveniente e impraticável, especialmente quando se trata de um grande lote amostrado (MARUR; SODEK, 1995 apud ROCHA et al., 2011).

Através do processo de propagação vegetativa, obteve-se um grande volume de material cultivado *in vitro* de Crem, volume este, de aproximadamente 700 vidros contendo em seu interior 6 explantes (em cada vidro), em desenvolvimento que se tornaram mudas potenciais, totalizando assim aproximadamente 4.200 mudas potenciais de Crem em 1 ano.

As mudas produzidas através da técnica de micropropagação apresentaram, neste trabalho, uma taxa de multiplicação de 1:20 (Tabela 1), ou seja, com um vidro contendo 6 explantes gera-se, em média, 20 novos vidros contendo também 6 explantes cada, sendo através desta elevada taxa de multiplicação do Crem, que foi possível produzir 4.200 mudas em um período de tempo de aproximadamente 1 ano (outubro de 2011 a setembro de 2012), sendo realizado três repiques no material cultivado in vitro chegando ao estádio R3.

Tabela 1 – Taxa de multiplicação vegetativa de Crem (*Tropaeolum pentaphyllum*) durante a micropopagação.

Estádio (inicial) (fase de repicagem)	**Repetições**	**N° de plantas/explantes produzidas na 3ª repicagem**
R2	1	10
R2	2	22
R2	3	18
R2	4	25
R2	5	29
R2	6	35
R2	7	10
R2	8	23
R2	9	11
R2	10	20
Média:		**20,3**

Verificou-se neste ensaio (Tabela 1), realizado para se obter a taxa de multiplicação do Crem, um bom valor como taxa de multiplicação levando em consideração o tempo que a planta leva para se desenvolver *in vitro*, sendo que para o desenvolvimento completo levou em torno de 90 a 120 dias, para atingir seu estádio máximo *in vitro* (Figura 8).

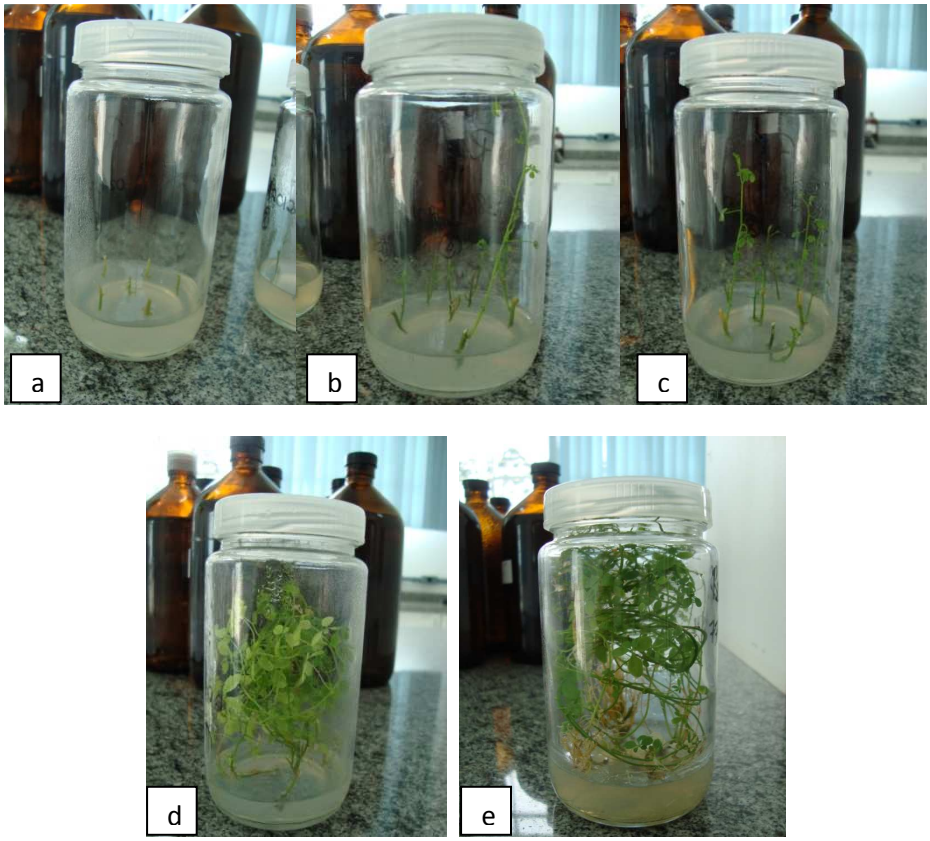

Figura 8 - Desenvolvimento *in vitro* de Crem (*Tropaeolum pentaphyllum*).
a) 0 dias, início da multiplicção; b) 30 dias de desenvolvimento; c) 60 dias de desenvolvimento; d) 90 dias de desenvolvimento; e) ± 120 dias de desenvolvimento.

No processo de extração de inulina em amostras de Crem, foi utilizada a temperatura de 80℃ (± 2℃) e foram testados três t empos de extração: 1, 2 e 4 horas respectivamente, sendo este experimento conduzido em triplicata.

Na literatura encontra-se uma variação muito grande de tempos de extração de inulina, havendo trabalhos em que o tempo de extração utilizado foi de apenas 15 minutos (ROSSI et al., 2011) até trabalhos em que o tempo foi de 4 horas de extração de inulina (DALONSO et al., 2009), esta variação de tempo de extração se dá em função de vários fatores entre eles o tipo de material trabalhado, como a espécie vegetal, parte da planta trabalhada como tubérculos, folhas, frutos, entre outros.

Na Tabela 2 encontram-se os resultados obtidos, resultantes da extração e quantificação da inulina presente no material vegetal trabalhado.

No presente trabalho observou-se que o melhor tempo de extração de inulina em tubérculos (batatas) de crem, conforme mostrado na Tabela 2, foi de 2 horas. Este tempo mostrou-se ideal para o melhor rendimento de inulina, pois segundo Hauly; Moscatto (2002), a solubilidade da inulina varia em função da temperatura da água, sendo que a solubilidade é de aproximadamente 6% a 10℃, enquanto que a 90℃ é de 35%. Assim verifica- se que o período de 1 hora não foi suficiente para a total solubilização da inulina na água, para que pudesse ser quantificado posteriormente.

Tabela 2 – Valores médios (mg/g) e desvio padrão do teor de inulina em extrato seco de tubérculos, folhas e material cultivado *in vitro* de Crem (*Tropaeolum pentaphyllum*) a 80℃ (± 2℃).

Material Vegetal	**Estágio de desenvolvimento**	**Teor de inulina (mg/g) em diferentes tempos de extração**		
		1 hora	**2 horas**	**4 horas**
Tubérculos	Antes Floração	19,34 ± 0.28 ^{e}	11,64 ± 0.28 ^{f}	7,22 ± 0.07 ^{g}
	Durante Floração	64,55 ± 0.59 ^{ab}	70,92 ± 0.19 ^{a}	52,97 ± 0.64 ^{c}
	Depois Floração	56,34 ± 0.89 ^{bc}	67,32 ± 0.65 ^{ab}	37,07 ± 0.92 ^{d}
Folhas	Antes Floração	3,72 ± 0.03 ^{h}	3,69 ± 0.01 ^{h}	3,34 ± 0.05 ^{h}
	Durante Floração	3,04 ± 0.04 ^{h}	2,90 ± 0.02 ^{h}	3,51 ± 0.10 ^{h}
	Depois Floração	14,98 ± 0.17 ^{ef}	15,03 ± 0.38 ^{ef}	3,13 ± 0.07 ^{h}
Plantas cultivadas *in vitro*		7,45 ± 0.09 ^{g}	9,25 ± 0.04 ^{fg}	11,40 ± 0.09 ^{f}

Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente em nível de 5%, pelo teste de Tukey.

Já no período de 4 horas, verificou-se uma queda na quantidade de inulina solubilizada das amostras. Esta queda pode ser atribuída ao fato de haver maior evaporação de água durante a extração na solução, pois conforme Hauly;

Moscatto (2002), a inulina possui uma capacidade de ligação com a água de 2:1, ou seja, duas moléculas de água para cada molécula de inulina; observando-se assim ao final deste período de tempo relativamente longo uma amostra com aspecto pastoso e de difícil filtragem do extrato resultante.

Kinupp (2007), visando quantificar o teor de inulina existente nos tubérculos de crem, detectou o teor de inulina de 2,92 g/L sendo este um valor significativo para o referido trabalho. Já, nas amostras analisadas no presente trabalho, o teor máximo obtido de inulina em tubérculos de crem chega a 70,92 mg/g, com 2 horas de extração.

Nas folhas, também foi observado que o maior teor de inulina foi obtido com 2 horas de extração (15,03 mg/g), em folhas coletadas após a floração. O tempo de extração não mostrou-se significativo para folhas antes e durante a floração, apresentando baixos teores de inulina. No material *in vitro*, o maior teor de inulina foi obtido com 4 horas de extração (11,4 mg/g), mas estatisticamente igual ao teor observado com 2 horas de extração.

Em relação ao estágio de desenvolvimento, nos tubérculos de Crem, observa-se que os maiores teores de inulina foram obtidos durante a floração, seguido do estágio após a floração. Nas folhas, os maiores teores de inulina foram observados somente depois da floração (Tabela 2).

Os frutanos presentes em plantas magnoliopsidas (dicotiledôneas) são todos do tipo inulina (DIETRICH; FIGUEIREDO RIBEIRO, 1986), e podem ser sintetizados em uma gama de tecidos vegetais, em órgãos especializados em estocagem, como rizóforos e tubérculos, mas quando as condições favorecem a síntese sobre a demanda, os frutanos podem ser acumulados em tecidos não especializados em armazenamento de carboidratos (POLLOK, 1986 apud TREVISAN; CARVALHO, 2011), justificando os maiores teores de inulina nos tubérculos, e também a presença desta em tecidos foliares, ainda que em menores quantidades.

Os frutanos são sintetizados a partir da sacarose e são acumulados nos vacúolos, onde podem alcançar níveis superiores a 70% de massa seca sem promover inibição na fotossíntese e, além disso ao contrário do amido os frutanos

são solúveis em água, (VIJN; SMEEKENS, 1999 apud TREVISAN; CARVALHO, 2011), fato este que justifica o maior teor de inulina presente nas folhas de crem no período depois da floração, sendo este o momento de maior síntese pela planta. Como estão presentes na célula como solutos ou em estado coloidal, os frutanos são osmoticamente ativos, podendo seu potencial osmótico ser facilmente alterado por rápida polimerização ou despolimerização, assim o mecanismo avançado do metabolismo desses compostos permite mobilização rápida das moléculas, diferentemente do amido, que é sólido (DIETRICH; FIGUEIREDO RIBEIRO, 1986), assim, segundo Trsevisan e Carvalho (2011), foi proposto que os frutanos constituem uma forma natural de proteção a baixas temperaturas nas angiospermas.

Plantas de regiões temperadas estão naturalmente expostas a prolongados períodos de temperaturas baixas, e os frutanos são os principais polissacarídeos armazenados nos tecidos vegetativos dessas plantas (FIGUEIREDO-RIBEIRO, 1993 apud TREVISAN; CARVALHO, 2011). Foi proposto que por sua alta solubilidade em água, os frutanos atuariam como crioprotetores, reduzindo a temperatura de congelamento do vacúolo e aumentando a resistência celular pela redução da taxa de desidratação pelo frio, ou pelo menos conferindo tolerância às plantas sob baixas temperaturas (LEVITT, 1980; PONTIS. DEL CAMPILLO, 1985; NELSON; SPOLLEN, 1987; HENDRY, 1987 apud TREVISAN; CARVALHO, 2011).

Outra forma de atuação dos frutanos seria também como protetores da membrana plasmática. Uma vez que as membranas são danificadas por congelamento ou dessecação, foi sugerido que os frutanos podem apresentar uma interação direta com a estabilidade das membranas sob essas condições de estresse, sendo que o resultado do estresse promovido pelo dessecamento é o deslocamento das proteínas das membranas acarretando perda da integridade da mesma, da seletividade, interrupção da compartimetalização celular e perda das atividades enzimáticas (TREVISAN; CARVALHO, 2011).

Nos tubérculos de Crem, (Tabela 2), verifica-se o maior teor de inulina durante a floração pelo fato de a inulina atuar principalmente como um carboidrato

de reserva (HAULY; MOSCATTO, 2002; DIETRICH; FIGUEIREDO RIBEIRO, 1986). Segundo Trevisan; Carvalho (2011), o principal papel ecológico dos frutanos é o armazenamento de reservas, no entanto a distribuição desse tipo de carboidrato é de apenas 15% da flora de angiospermas.

Em *Vernonia herbacea*, Dias-Tagliacozzo (2004), observaram que a indução ao estresse hídrico produz mudanças no metabolismo de frutanos com aumento no conteúdo de frutose e na razão entre oligo:polissacarídeos nos órgão de reserva subterrâneos. De fato, foi observado que o estresse hídrico na espécie induziu as atividades das enzimas frutanoexohidrolase (FEH) e invertase promovendo o acúmulo de açúcares redutores e frutooligosacarídeos, os quais foram associados à manutenção do turgor nos rizóforos, reforçando o papel dos frutanos como reguladores osmóticos. Assim, segundo Garcia et al. (2011 apud Trevisan; Carvalho, 2011), a planta é capaz de reter água em seus rizóforos por longos períodos em solo com reduzido conteúdo de água, justificando os altos teores de inulina nos tubérculos como uma forma de manutenção da viabilidade destes, mesmo em condições de escassez de água.

Em um estudo realizado em uma área do cerrado na Estação Experimental e Reserva Biológica de Mogi-Guaçú (SP), foram analisadas 35 espécies pertencentes a família Asteraceae, e dessas 80% apresentaram frutanos do tipo inulina em órgãos de reserva subterrâneos (TERTULIANO; FIGUEIREDO-RIBEIRO, 1993 apud TREVISAN; CARVALHO, 2011). Dentre essas, duas espécies *Vernonia herbacea* e *Viguiera discolor*, destacam-se por sua alta concentração de frutanos, com cerca de 80% de massa seca nos órgãos de reserva subterrâneos (CARVALHO; DIETRICH, 1993; ISEJIMA; FIGUEIREDO-RIBEIRO, 1993 paud TREVISAN; CARVALHO, 2011).

O material *in vitro* apresentou um teor de inulina de 11,40 mg/g no período de 4 horas de extração, este resultado nos mostra que a cultura de tecidos conserva as mesmas características genéticas do material de campo (matriz), ou seja, ocorre através da cultura de tecidos, a conservação do germosplasma, pelo menos em relação à síntese de inulina. Segundo Torres et al. (1998), em casos em que a conservação de sementes apresenta certa dificuldade é possível a

preservação do germoplasma *in vitro*, sob a forma de ápices caulinares, hastes, embriões zigóticos e/ou somáticos, ou mesmo calos; sendo que a utilização da cultura de tecidos para a conservação de germoplasma tem sido especialmente útil para espécies propagadas vegetativamente como a batata (*Solanum tuberosum*), a mandioca (*Manihot esculenta*), o alho (*Allium sativum*) e a batata-doce (*Ipomoea batatas*).

A cultura de tecidos tem sido apontada como valioso instrumento para o estudo dos metabolismos primário e secundário, constituindo um sistema apropriado para a produção de compostos importantes, dentre esses os carboidratos solúveis e suas enzimas associadas. Contudo, a presença de frutanos em tecidos vegetais produzidos *in vitro* tem sido reportada de forma muito esparsa na literatura (ITAYA et al., 2005). Estudos pioneiros mostraram a presença de frutanos e suas características estruturais em calos de *Symphytum officinale* L*., Phleum pratense* L*., Gomphrena macrocephala* (ABOU-MANDOUR et al., 1987; HALE et al., 1987; VIEIRA et al., 1995 apud OLIVEIRA et al., 2009); sendo que mais recentemente Itaya et al.(2005) demonstraram a ocorrência de frutanos e a presença de algumas atividades enzimáticas em extratos de calos de *Viguiera discolor* Baker, Asteraceae do cerrado, ampliando o conhecimento sobre o metabolismo de frutanos em tecidos cultivados *in vitro*.

Oliveira et al. (2009), estudou a presença de frutanos em calos obtidos a partir de raízes tuberosas de *Smallanthus sonchifolius* popularmente conhecido como Yacon, obtiveram os seguintes teores de frutanos: 8,1 mg/g (massa fresca) em calos da linhagem vermelha de *S. sonchifolius* e nos da linhagem amarela foi de 8,8 mg/g (massa fresca), enquanto que os teores destes compostos em órgãos de reserva de plantas de yacon cultivadas em campo obtidos por Fukai et al. (1997) e Iataya et al. (2002) (apud Oliveira et al., 2009), foi de aproximadamente 85 mg/g (massa fresca) e 65 mg/g (massa fresca) para as linhagens vermelha e amarela, respectivamente, aproximadamente 8 a 10 vezes superiores aos valores encontrados em calos. No presente trabalho, os teores de inulina encontrados nos tubérculos são aproximadamente 7 vezes superiores aos encontrados no material micropropagado.

Em outro trabalho com *Viguiera discolor* cultivadas *in vitro*, foram verificados valores de frutanos presentes, de 10,25 a 13,45 mg/g e foi constatado este valor sendo cerca de sete vezes inferior aos mesmos tecidos mantidos em condições de campo (ITAYA et al., 2005). Resultados semelhantes também foram observados em plantas micropropagadas de outra espécie herbácea nativa do cerrado *Gomphrena macrocephala*, as quais também acumularam frutanos iguais aos encontrados na planta crescida em condições naturais, porém em concentrações inferiores (MOREIRA et al., 1999 apud ITAYA et al., 2005).

A partir destes resultados, é demonstrada a preservação do metabolismo de frutanos em células menos diferenciadas e possibilitam estudos mais aprofundados visando a regulação do metabolismo desses compostos, ao aumento da produção de frutanos, bem como à obtenção de material em quantidades suficientes para estudos específicos (OLIVEIRA et al., 2009).

6. CONCLUSÃO

Na curva de secagem foi observado uma exponencial perda de água nas primeiras 10 horas, e após este período a perda de água do material ocorreu de forma mais lenta, chegando a completa estabilização do peso no tempo de 25 horas.

O estudo de teores de inulina no material vegetal trabalhado indicaram a presença de inulina, tanto nos tubérculos quanto na parte aérea, e também no material cultivado *in vitro* de plantas de crem (*Tropaeolum pentaphyllum*).

O melhor tempo de extração foi de 2 horas para os tubérculos, sendo que nestes, o maior teor de inulina identificado foi de 70,92 mg/g no estádio fisiológico durante a floração.

Nas folhas foi também observado a presença de inulina, sendo que o maior teor obtido foi também no tempo de extração de 2 horas, sendo encontrado 15,03 mg/g e estas folhas foram coletadas no estádio fisiológico após a floração.

No material *in vitro* foi observado também a presença de inulina, comprovando assim que a cultura de tecidos mantém as características originais da planta matriz. O maior teor de inulina encontrado no material cultivado *in vitro* foi de 11,4 mg/g passando pelo processo de extração pelo período de 4 horas, porém estatisticamente, este valor é igual ao teor observado com 2 horas de extração (9,25 mg/g).

Conclui-se também, ao final deste trabalho que os teores de inulina encontrados nos tubérculos são aproximadamente 7 vezes superiores aos encontrados no material cultivado *in vitro* e aproximadamente 5 vezes superiores aos encontrados nas folhas.

7. PERSPECTIVAS PARA TRABALHOS FUTUROS

- ✓ Avaliar a viabilidade econômica do cultivo de *Tropaeolum pentaphyllum in vitro* e da extração de inulina de tubérculos, parte aérea e material micropropagado.
- ✓ Investigar a possibilidade de produção de tubérculos *in vitro.*

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRIGHENTI, F. Dietary fructans and serum triacylglycerols: a meta-analysis of randomized controlled trials. The Journal of Nutrition. Inulin and Oligofructose: Health Benefits and Claims – A Critical Review. 2007; p. 2552-2556.

CALDAS, L.S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M.E. Meios nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. Cultura de Tecidos e transformação genética em plantas. Brasília: Embrapa, SPI; Embrapa CNPH, 1998. V.1,p.87-132.

CANI, P.D.; JOLY, E.; HORSMANS, Y.; DELZENNE, N.M. Oligofructose promotes satiety in healthy human: a pilot study. European Journal of Clinical Nutrition. 2006; 60: 567 – 572.

CARVALHO, J.F.R.P.; CARVALHO, C.R.; OTONI, W.C. Regeneração *in vitro* de urucum (*Bixa orellana* L.). Sociedade de Investigações Florestais. Rev. Árvore, Viçosa – MG, v.29, n.6, p.887-895, 2005.

CARVALHO, J.M.F.C.; SILVA, M.M.A.; MEDEIROS, M.J.L. Fatores inerentes à micropropagação. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Centro Nacional de Pesquisa de Algodão. Documento 148. Campina Grande, PB. 2006.

CHI, Z.; ZHANG, T.; CAO, T.; LIU, X.; CUI, W.; ZHAO, C. Biotechnological potential of inulin for bioprocesses. Bioresource Technology. 2011; 102: 4295 – 4303.

CORRÊA, P.C.; RESENDE, O.; MARTINAZZO, A.P.; GONELI, A.L.D.; BOTELHO, F.M. Modelagem matemática para a descrição do processo de secagem do feijão (*Phaseoulus vulgaris* L.) em camadas delgadas. Eng. Agríc. Jaboticabal. 2007; v. 27, n. 2, p. 501 – 510.

CORRÊA, R.M.; BERTOLUCCI, S.K.V.; PINTO, J.E.B.P.; REIS, E.S.; ALVES,T.L. The essential oil yield and organoleptic leaves characteristics of “assa-peixe” under various dry methods. Ciênc. Agrotec., Lavras. 2004; v. 28, n. 2, p. 339 – 344.

CRONQUIST, A. The evolution and classification of flowering plants. The New York Botanical Garden. 2nd ed. 1988.

DALONSO, N.; IGNOWSKI, E.; MONTEIRO, C. M. A.; GELSLEICHTER, M.; WAGNER, T. M.; SILVEIRA, M. L. L.; SILVA, D. A. K. Extraction and characterization of carboydrates present in the garlic (*Allium sativum* L.): proposal of alternative methods. Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas, 29(4): 793-797, out.-dez. 2009.

DECRAENE, L. P. R.; SMETS, E. F. Floral developmental evidence for the systematic relationships of *Tropaeolum* (Tropaeolaceae). Annals of Botany 88: 879-892, 2001.

DIAS, J.F.G.; CÍRIO, G.M.;MIGUEL, M.D.; MIGUEL, O.G. Contribuição ao estudo alelopático de *Maytenus ilicifolia* Mart. Ex Reiss., Celastraceae. Revista Brasileira de Farmacognosia. 15 (3): jul/set. 2005.

DIETRICH, S.M.C.; FIGUEIREDO RIBEIRO, R.C.L. Carboidratos de reserva em plantas superiores e sua importância para o homem. 1986; v.16, n. 61, p. 65 – 71.

DOBRÁNSZKI, J.; SILVA, J.A.T. Micropropagation of apple – A review. Biotechnology Advances. 2010; 28: 462 – 488.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. Cultura de Tecidos e transformação genética em plantas. Brasília: Embrapa, SPI; Embrapa CNPH, 1998. V.1,p.183-260.

HAULY, M. C. O.; MOSCATTO, J. A. Inulin and Oligofructosis: a review about functional properties, prebiotic affects and importance for food industry. Semina: Ciências Exatas e Tecnológica, Londrina, v. 23, n. 1, p. 105-118, dez. 2002.

ITAYA, N.M.; VAZ, A.P.A.; KERBAUY, G.B.; FIGUEIREDE-RIBEIRO, R.C.L. Produção de frutanos em calos e plântulas clonadas in vitro de Viguiera discolor Baker (Asteraceae). Acta Botanica Brasilica. 2005; 19: 579-586.

KAUR, N.; GUPTA, A.K. Applications of inulin and oligofructose in health and nutrition. Indian Academy of Sciences. J. Biosci. 2002; v. 27, n. 7, p. 703-714.

KINUPP, V. F. Plantas alimentícias não convencionais da região Metropolitana de Porto Alegre, RS. 2007. 562 f. (Tese de doutorado) – Programa de Pós Graduação em Fitotecnia. Faculdade de Agronomia. Universidade Federal do Rio

Grande do Sul, Porto Alegre, 2007. Cap. 2. Riqueza de plantas alimentíceas não convencionais na região metropolitana de Porto Alegre.

KINUPP, V.F.; LISBOA, G.N.; BARROS, I.B.I. Capítulo 5 – Aromáticas. *Tropaeolum pentaphyllum* – Batata-crem. In: CORADIN, L.; SIMINSKI, A.; REIS, A. Espécies nativas da flora brasileira de valor econômico atual ou potencial. Plantas para o futuro – Região Sul. Ministério do Meio Ambiente. Brasília – DF, 2011.

KOTHARI, S.L.; JOSHI, A.; KACHHWAHA, S.; OCHOA-ALEJO,N. Chilli peppers – A review on tissue culture and transgenesis. Biotechnology Advances. 2010; 28: 35 – 48.

MEYER, D.; BAYARRI, S.; TÁRREGA, A.; COSTELL, E. Inulin as texture modifier in dairy products. Food Hydrocollois. 2011; 25: 1881 – 1890.

MURASHIGUE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum. 1962; v.15,p. 473 – 497.

NYMAN, M. Fermentation and bulking capacity of indigestible carbohydrates: the case of inulin and oligofructose. British Journal of Nutrition. 2002; 87: S163 – S168.

OLIVEIRA, R. A.; PARK, K. J.; CHIORATO, M.; PARK, K. J. B.; NOGUEIRA, R. I. Otimização de extração de inulina de raízes de chicórea. Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais, Campina Grande, v.6, n.2,p.131-140, 2004.

OLIVEIRA, V.F.; ITAYA, N.M.; FLOH, E.I.S.; CARVALHO,M.A.M. Frutanos em calos de *Smallantus sonchifolius* (Poepp.) H. Rob. Hoehnea. 2009; 36 (1): 89 – 97.

PADILHA, V.M.; ROLIM, P.M.; SALGADO, S.M.; LIVERA, A.V.S.; OLIVEIRA, M.G. Tempo de secagem e da atividade de óxido-redutases e *yacon* (*smallanthus sonchifolius*) sob tratamento químico. Ciência Rural, Santa Maria. 2009; v. 39,n. 7, p. 2178 – 2184.

RANAWANA, V. Inulin: A review of its functional properties in relation to calcium absorption in humans. Journal of Food and Agriculture. 2008; v.1 (1), p. 26 – 35.

RIX, M. 687. *Tropaeolum Pentaphyllum*. Tropaeolaceae. Curtis's Botanical Magazine. vol. 27(3): p.296-300. The Board of Trustees of the Royal Botanic Gardens, Knew, 2010.

ROCHA, L.C.M.; PRADO, R.M.; DIAS, J.L.C.S.; VIEIRA, D.S.T. Métodos de secagem de amostras de folhas de aceroleira, cana-de-açúcar e citros na determinação da massa seca e nos teores de macronutrientes. Comunicata Scientiae. 2011; 2 (3): 177 – 180.

ROSSI, D. M.; MAGALHÃES, C. R. P.; KINUPP, V.; FLÔRES, S. H. Triagem preliminar da presença de inulina em plantas alimentícias. Alim. Nutr., Araraquara, v. 22, p. 247-250, abr/jun. 2011.

SANCHEZ, M. F. Caracterização física de soluções de inulina e FOS por análise de textura e comportamento reológico. Florianópolis, SC. 2010. 100 f. (Dissertação de mestrado) – Programa de Pós Graduação em Engenharia Química. Centro Tecnológico – CTC. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010.

SOUZA, D.S.; SIQUEIRA, D.L.; CECON, P.R.; SANTOS, D. Micropropagação das bananeiras "Prata-Anã" e "Fhia 01" a partir de explantes de plantas tratadas com paclobutrazol. Rev. Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal – SP, v. 32, n. 2, p. 561-570, 2010.

SOUZA, V.C.; LORENZI, H. Botânica Sistemática: Guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas do Brasil. 2ª Ed. Nova Odessa – SP: Instituto Plantarum, 2008.

TONELI, J. T. C. L.; MURR, F. E. X.; NEGREIROS, A. A. Effect of moisture on the microstructure of inulin pownder. Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas, Jan/Mar. 2008. http://dx.doi.org/10.1590/S0101-20612008000100018.

TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. Cultura de Tecidos e transformação genética em plantas. Brasília: Embrapa, SPI; Embrapa CNPH, 1998. V.1,p.183-260.

TREVISAN, C.; CARVALHO, M.A.M. Frutanos: origem e papel ecológico em plantas superiores. Instituto de Botânica – IBT. Programa de Pós Graduação em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente. Curso de capacitação de monitores e educadores. São Paulo. 2011.

TUNGLAND, B.C.; MEYER, D. Nondigestible oligo and polysaccharides (dietary fiber): Their physiology and role in human health and food. Institute of Food Technologists. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety. 2002; v.1, p.73-92.

ULISSES, C.; WILLADINO, L.; ALBUQUERQUE, C.C.; CÂMARA, T.R. Clonagem Vegetal. Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica, Recife, vol. 7, p.86-91, 2010.

VIEIRA, J.A.G.; MORAES, I.O. Propriedades físicas e secagem de batata doce (Ipomoea batatas, L). Alim. Nutr, São Paulo, 4: 79-87, 1992.

WATZL, B.; GIRRBACH, S.; ROLLER, M. Inulin, oligofructose and immunomodulation. British Journal of Nutrition. 2005; 93: S49 – S55.

ANEXO I

Composição do meio MS (Murashigue & Skoog, 1962).

Composição do Meio MS	
Macronutrientes (mg/L)	
NH_4NO_3	1,650
KNO_3	1,900
$CaCl_2$. 2 H_20	440
$MgSO_4$. 7 H_20	370
KH_2PO_4	170
Micronutrientes (mg/L)	
$MnSO_4$. 4 H_20	22,3
$ZnSO_4$. 7 H_20	8,6
H_3BO_3	6,2
KI	0,83
Na_2MoO_4 . 2 H_2O	0,25
$CuSO_4$. 5 H_2O	0,025
$CoCl_2$. 6 H_2O	0,025
Fe–EDTA (mg/L)	
Na_2EDTA . 2 H_20	37,3
$FeSO_4$. 7 H_2O	27,8
Vitaminas e Aminoácidos (mg/L)	
Ácido Nicotínico	0,5
Piridoxina . HCL	0,5
Tiamina . HCL	0,1
Glicina	2,0
Mio – inositol	100
Sacarose	30,000

Fonte: CALDAS et al., 1998.