



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS  
FACULDADE DE AGRONOMIA ELISEU MACIEL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

Tese

**Efeitos da supressão do gene *tropinona redutase II* sobre propriedades do amido e acúmulo de metabólitos secundários em batata silvestre (*Solanum commersonii subsp. malmeanum* Bitt.)**

**Doutorando:** Leandro da Conceição Oliveira

**Orientador:** Prof. Dr. Leonardo Nora

Pelotas, julho de 2013.

**LEANDRO DA CONCEIÇÃO OLIVEIRA**

**Efeitos da supressão do gene *tropinona redutase II* sobre propriedades do amido e acúmulo de metabólitos secundários em batata silvestre (*Solanum commersonii subsp. malmeanum* Bitt.)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências (área do conhecimento: Ciência e Tecnologia de Alimentos).

Orientador: Prof. Dr. Leonardo Nora

Pelotas, 2013.

Dados de catalogação na fonte:  
Maria Beatriz Vagheti Vieira – CRB 10/1032

Biblioteca de Ciência & Tecnologia - UFPel

O48e      Oliveira, Leandro da Conceição  
              Efeitos da supressão do gene tropina redutase II sobre  
              propriedades do amido e acúmulo de metabólitos secundários  
              em batata silvestre (*Solanum commersonii*  
              subsp. *malmeanum* Bitt.) / Leandro da Conceição Oliveira. –  
              91f. – Tese (Doutorado). Programa de Pós-Graduação em  
              Ciência e Tecnologia Agroindustrial. Universidade Federal de  
              Pelotas. Pelotas, 2013. – Orientador Leonardo Nora.

              1. Batata silvestre. 2. Silenciamento gênico. 3. Inibição de  
              glucosidases. 4. Amido. 5. Metabólitos secundários. I. Nora,  
              Leonardo. II. Título

CDD: 635.21

**Banca examinadora:**

Prof. Dr. Leonardo Nora

Prof. Dr. Alvaro Renato Guerra Dias

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Leticia Mascarenhas Pereira Barbosa

Prof. Dr. Marcelo Zafalon Peter

Prof. Dr. Moacir Cardoso Elias

*Aos meus pais, Edison e Ana Lia e a minha irmã, Meliza, dedico.*

## **Agradecimentos**

Ao professor Leonardo Nora pela orientação, acolhimento, confiança, incentivo, paciência e compreensão durante a orientação deste trabalho e, principalmente, pela amizade e sabedoria que contribuíram para o meu enriquecimento.

A minha família amada. Meus pais, Edison Oliveira e Ana Lia Oliveira, minha irmã, Meliza Oliveira, e minha avó, Elça Miranda. Por estarem sempre presentes, mesmo que a distância, apoiando e incentivando as minhas escolhas.

Aos professores e colegas do Departamento de Ciência e Tecnologia Alimentos da Universidade Federal de Pelotas. Em especial, ao professor Moacir Cardoso Elias, meu orientador de mestrado e grande amigo; e aos colegas do Laboratório de Metabolismo Secundário de Plantas, Laboratório de Biotecnologia de Frutos e Hortaliças e Laboratório de Grãos.

Aos colegas Gabriel Ollé Dalmazo e Vania Zanella Pinto, pela enorme contribuição neste trabalho e, principalmente, pela amizade e bons momentos compartilhados.

A todos meus amigos pela presença e torcida a mim depositadas.

Aos colegas do Instituto Federal Sul-riograndense, Campus Visconde da Graça e Campus Pelotas pela amizade, convivência e incentivos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

A Deus, pela vida e pela luz no meu caminho.

*“...é que tem mais chã nos meus olhos do que cansaço nas minhas pernas,  
mais esperança nos meus passos do que tristeza nos meus ombros,  
mais estrada no meu coração do que medo na minha cabeça...”*

Cora Coralina

## Resumo

OLIVEIRA, Leandro da Conceição. **Efeitos da supressão do gene *tropinona reductase II* sobre propriedades do amido e acúmulo de metabólitos secundários em batata silvestre (*Solanum commersonii* subsp. *malmeanum* Bitt.)**. 2013. 90f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas/RS.

A batata (*Solanum* spp.) é frequentemente utilizada como planta modelo para estudos de metabolismo de carboidratos. Dentre as suas diversas espécies, as silvestres, quando comparadas às cultivadas (*Solanum tuberosum*), destacam-se pela maior tolerância a estresses bióticos e abióticos, menores conteúdos de açúcares redutores, e maiores conteúdos de sólidos solúveis totais. Assim, as batatas silvestres são frequentemente utilizadas como modelo de estudo e no melhoramento genético de batatas cultivadas. No entanto, é sabido que as espécies silvestres em regra apresentam elevada concentração de compostos tóxicos, tais como glicoalcaloides, poliaminas e alcaloides, sendo impróprias para alimentação. Assim, estratégias para suprimir genes que controlam a síntese desses compostos tóxicos, são de grande interesse, inclusive pelo potencial das mesmas para promover alterações na síntese de outros compostos naturalmente presentes; como o amido, por exemplo. Neste estudo, alterações nas propriedades do amido e no acúmulo de metabólitos secundários são descritas em batata silvestre (*Solanum commersonii* ssp. *malmeanum*) geneticamente modificada para supressão do gene *tropinona reductase 2*. Observou-se alterações no poder de inchamento e solubilidade, nas propriedades térmicas, de pasta e cristalinidade do amido extraído de tubérculos, mas sem alterações na morfologia dos grânulos. Além disso, observou-se aumentos nas concentrações de glicoalcaloides ( $\alpha$ -solanina e  $\alpha$ -chaconina) e de poliaminas (putrescina, espermidina e espermina). Os extratos de batatas silvestres ricos em calisteginas apresentaram excelente atividade antimicrobiana, sendo capazes de inibir por até 10 horas a fermentação dos açúcares manitol e maltose por *Salmonella enteritidis* e por até 12 horas a fermentação dos açúcares galactose e maltose por *Listeria monocytogenes*. Isto evidencia a inibição específica de glucosidases microbianas, supostamente pela ação de calisteginas presentes nos extratos.

Palavras-chaves: batata silvestre, silenciamento gênico, inibição de glucosidases, amido alterado, glicoalcaloides, poliaminas.

## Abstract

OLIVEIRA, Leandro da Conceição. **Effects of tropinone reductase II gene suppression on the starch properties and the secondary metabolites accumulation in wild potato (*Solanum commersonii* subsp. *malmeanum* Bitt.)**. 2013. 90p. Thesis (Doctorate) - Graduate Program in Food Science and Technology. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas/RS.

The potato is use frequently as a model plant for carbohydrate metabolites. The wild species when compared to the cultivated (*Solanum tuberosum*), they excel for biotic and abiotic stress tolerance, lower reduce sugar content, and bigger total soluble solids. Therefore, the wild potatoes are use as study model and in cultivated potatoes breeding. However, it is known the wild species by the rule shows a high concentration of toxics compounds, such as glycoalkaloids, polyamines and alkaloids, being inappropriate as food. Therefore, strategies to suppress the genes that control the syntheses of this toxics components are of great interest, including for the its potential to promote syntheses alterations in others components naturally presents; as corn flour for example. In this study, the corn flour properties alterations and the secondary metabolites accumulation are describe for wild breeding potato (*Solanum commersonii* ssp. *malmeanum*) for the tropinone reductase II gene suppression. We observed alterations in the swelling power and solubility, in thermic properties, of pulp and the corn flour crystallinity extracted from the tuber, but without beads morphologic alterations. Furthermore, we observed increases in glycoalkaloids concentrations ( $\alpha$ -solanine and  $\alpha$ -chaconine) and polyamines (putrescine, spermidine and spermine). The calystegine rich wild potatoes extracts showed a excellent antimicrobial activity, being capable to inhibiting for 10 hours the mannitol and maltose sugar fermentation from *Salmonella enteritidis* and for 12 hours the galactose and maltose sugar fermentations from *Listeria monocytogenes*. This highlights the specific inhibition of microbial glucosidases, supposed by the calistegianas action presents in the extracts.

Key-words: wild potato, gene silencing, glucosidades inhibition, modified corn flour, glycoalkaloids and polyamines.

## Lista de Figuras

Figura 1. Mapa de distribuição de batatas silvestres.....	17
Figura 2. Tubérculos de batata silvestre: (A) <i>Solanum sparsipilum</i> ; (B) <i>Solanum polyadenium</i> ; (C) <i>Solanum acaule</i> ; (D) <i>Solanum chiquidenum</i> ; (E) <i>Solanum commersonii</i> e (F) <i>Solanum piurae</i> .....	18
Figura 3. Modelo proposto para síntese de amido.....	20
Figura 4. Estrutura química da amilose (a) e amilopectina (b).....	20
Figura 5. Representação esquemática do grânulo de amido.....	21
Figura 6. Distribuição das regiões amorfas e cristalinas do amido.....	22
Figura 7. Difratoograma de amidos de padrões A, B e C.....	23
Figura 8. Representação de curva típica obtida na análise das propriedades viscoamilográficas de amidos em Rapid Visco Analyzer (RVA).....	25
Figura 9. Estruturas dos glicoalcalóides $\alpha$ -solanina e $\alpha$ -chaconina.....	27
Figura 10. Estrutura das principais poliaminas presente em batata.....	30
Figura 11. Biossíntese de poliaminas.....	31
Figura 12. Biossíntese de alcaloides tropânicos e de calisteginas.....	34
Figura 13. Estrutura de calisteginas de ocorrência natural.....	35
Figura 14. Padrões de difração de raio-X de amidos de tubérculos de diferentes linhagens (L) de batata silvestre ( <i>Solanum commersonii</i> ssp. <i>malmeanum</i> Bitt.), com baixa (L2, L21 e L42) e alta (L6, L49 e L57) expressão do gene <i>tr2</i> , e de amidos de <i>S. commersonii</i> ssp. <i>malmeanum</i> (Sc, <i>Wild</i> ) e de <i>S. tuberosum</i> (St, <i>Potato control</i> ), não transformados geneticamente.....	47
Figura 15. Curvas de DSC de amidos de tubérculos de diferentes linhagens (L) de batata silvestre ( <i>Solanum commersonii</i> ssp. <i>malmeanum</i> Bitt.), com baixa expressão do gene <i>tr2</i> , e de amidos de <i>S. commersonii</i> ssp. <i>malmeanum</i> (Sc, <i>Wild</i> ) e de <i>S. tuberosum</i> (St, <i>Potato control</i> ), não transformados geneticamente.....	51
Figura 16. Curvas de DSC de amidos de tubérculos de diferentes linhagens (L) de batata silvestre ( <i>Solanum commersonii</i> ssp. <i>malmeanum</i> Bitt.), com alta expressão do gene <i>tr2</i> , e de amidos de <i>S. commersonii</i> ssp. <i>malmeanum</i> (Sc, <i>Wild</i> ) e de <i>S. tuberosum</i> (St, <i>Potato control</i> ), não transformados geneticamente.....	52

- Figura 17. Perfil viscoamilográfico de amidos de tubérculos de diferentes linhagens (L) de batata silvestre (*Solanum commersonii* ssp. *malmeanum* Bitt.), com baixa expressão do gene *tr2*, e de amidos de *S. commersonii* ssp. *malmeanum* (Sc, *Wild*) e de *S. tuberosum* (St, *Potato control*), não transformados geneticamente.....53
- Figura 18. Perfil viscoamilográfico de amidos de tubérculos de diferentes linhagens (L) de batata silvestre (*Solanum commersonii* ssp. *malmeanum* Bitt.), com alta expressão do gene *tr2*, e de amidos de *S. commersonii* ssp. *malmeanum* (Sc, *Wild*) e de *S. tuberosum* (St, *Potato control*), não transformados geneticamente.....53
- Figura 19. Espectro de FT-IV de amidos de tubérculos de diferentes linhagens de batata silvestre (*Solanum commersonii* ssp. *malmeanum* Bitt.), com alta (A) e baixa (B) expressão do gene *tr2*, e de amidos de *S. commersonii* ssp. *malmeanum* (Sc, *Wild*) e de *S. tuberosum* (St, *Potato control*), não transformados geneticamente.....56
- Figura 20. Micrografias de grânulos de amido de batata silvestre (*S. commersonii*) (a); linhagens de SC com baixa expressão de *tr2*: L2 (b), L21 (c), L42 (d) e linhagens de SC com alta expressão de *tr2*: L6 (e), L49 (f), L57 (g).....58
- Figura 21. Acúmulo de transcritos do gene tropinona redutase 2 (*tr2*) e espermidina sintase (*spds*) em linhagens de batata silvestre (*Solanum commersonii*) geneticamente modificadas para supressão de *tr2*.....64
- Figura 22. Teor de açúcar redutor em tubérculos de diferentes linhagens de batata silvestre (*Solanum commersonii*), geneticamente modificada para silenciamento do gene tropinona redutase II, e em tubérculos de *S. tuberosum*.....68
- Figura 23. Teor de glicoalcaloides totais ( $\alpha$ -solanina +  $\alpha$ -chaconina) em tubérculos in natura de diferentes linhagens de batata silvestre (*Solanum commersonii*), geneticamente modificada para silenciamento do gene tropinona redutase II, e em tubérculos de *S. tuberosum*.....69
- Figura 24. Teores de putrescina em tubérculos in natura de diferentes linhagens de batata silvestre (*Solanum commersonii*), geneticamente modificada para silenciamento do gene tropinona redutase II, e em tubérculos de *S. tuberosum*.....71
- Figura 25. Teores de espermidina em tubérculos in natura de diferentes linhagens de batata silvestre (*Solanum commersonii*), geneticamente modificada para silenciamento do gene tropinona redutase II, e em tubérculos de *S. tuberosum*.....72
- Figura 26. Teores de espermina em tubérculos in natura de diferentes linhagens de batata silvestre (*Solanum commersonii*), geneticamente

modificada para silenciamento do gene tropinona redutase II, e em tubérculos de <i>S. tuberosum</i> .....	72
Figura 27. Atividade antimicrobiana de extrato de batata silvestre em meio contendo manitol e cepas de <i>S. enteritidis</i> .....	74
Figura 28. Atividade antimicrobiana de extrato de batata silvestre em meio contendo maltose e cepas de <i>S. enteritidis</i> .....	74
Figura 29. Atividade antimicrobiana de extrato de batata silvestre em meio contendo galactose e cepas de <i>L. monocytogenes</i> .....	74
Figura 30. Atividade antimicrobiana de extrato de batata silvestre em meio contendo maltose e cepas de <i>L. monocytogenes</i> .....	74
Figura 31. Microtubos, contendo meio púrpura de bromocresol, açúcar e extrato de batata silvestre ( <i>S. commersonii</i> ) rico em calisteginas, início do período de incubação a 37°C (A) e no final do processo de incubação (B). .....	75

## Lista de Tabelas

- Tabela 1. Poder de inchamento, solubilidade em água e claridade de pasta, a 90 °C, de amidos de tubérculos de diferentes linhagens (L) de batata silvestre (*Solanum commersonii* ssp. *malmeanum* Bitt.), com baixa e alta expressão do gene *tr2*, e de amidos de *S. commersonii* ssp. *malmeanum* (Sc) e de *S. tuberosum* (St), não transformados geneticamente.....45
- Tabela 2. Intensidade dos picos de difração de raio-X e cristalinidade relativa (CR) de amidos de tubérculos de diferentes linhagens (L) de batata silvestre (*Solanum commersonii* ssp. *malmeanum* Bitt.), com baixa e alta expressão do gene *tr2*, e de amidos de *S. commersonii* ssp. *malmeanum* (Sc) e de *S. tuberosum* (St), não transformados geneticamente.....48
- Tabela 3. Temperatura inicial (To), temperatura de pico (Tp), Temperatura de conclusão (Tc), diferença de temperatura ( $\Delta T$ ) e entalpia ( $\Delta H$ ) de amidos de tubérculos de diferentes linhagens (L) de batata silvestre (*Solanum commersonii* ssp. *malmeanum* Bitt.), com baixa e alta expressão do gene *tr2*, e de amidos de *S. commersonii* ssp. *malmeanum* (Sc) e de *S. tuberosum* (St), não transformados geneticamente.....49
- Tabela 4. Propriedades de pasta de amidos de tubérculos de diferentes linhagens (L) de batata silvestre (*Solanum commersonii* ssp. *malmeanum* Bitt.), com baixa e alta expressão do gene *tr2*, e de amidos de *S. commersonii* ssp. *malmeanum* (Sc, *Wild*) e de *S. tuberosum* não transformados geneticamente.....54
- Tabela 5. Classificação quanto à expressão do gene *tr2* em linhagens de batata silvestre (*Solanum commersonii* ssp. *malmeanum* Bitt) geneticamente modificadas para supressão do gene tropinona redutase 2 (*tr2*).....63

## Sumário

<b>Resumo</b> .....	VI
<b>Abstract</b> .....	VII
<b>Lista de Figuras</b> .....	VIII
<b>Lista de Tabelas</b> .....	X
<b>1. Introdução</b> .....	12
<b>2. Revisão bibliográfica</b> .....	16
2.1 Características gerais da cultura da batata ( <i>S. tuberosum</i> L.).....	16
2.2 Características gerais da cultura da batata silvestre ( <i>S. commersonii</i> ).....	17
2.3 Composição química de batata silvestre ( <i>S. commersonii</i> ).....	18
2.3.1 Amido.....	19
2.3.2 Metabólitos Secundários.....	26
2.3.2.1 Glicoalcalóides.....	26
2.3.2.2 Poliaminas.....	29
2.3.2.3 Compostos fenólicos.....	32
2.3.2.4 Alcalóides.....	33
2.4 Engenharia genética.....	37
<b>3. Estudo 1:</b> Propriedades de pasta, morfológicas, térmicas e cristalinidade de amido de batata silvestre ( <i>S. commersonii</i> ) geneticamente modificada.....	38
3.1 Introdução.....	38
3.2 Materiais e Métodos.....	40
3.2.1 Material.....	41
3.2.2 Métodos.....	41
3.3 Resultados e Discussão.....	44
3.4 Conclusão.....	59
<b>4. Estudo 2.</b> Efeito da supressão do gene <i>trypinona reductase II</i> sob o acúmulo de metabólitos secundários em batata silvestre ( <i>S. commersonii</i> ).....	60
4.1 Introdução.....	60
4.2 Materiais e Métodos.....	63
4.2.1 Material.....	63
4.2.2 Métodos.....	64
4.3 Resultados e Discussão.....	67
4.4 Conclusão.....	77
<b>5. Considerações Finais</b> .....	78
<b>6. Referencias Bibliográficas</b> .....	79

## 1. Introdução

O controle da expressão gênica para melhorar características nutricionais, funcionais, sensoriais e tecnológicas de alimentos tem se tornado comum no meio científico. Entretanto, a complexidade das rotas metabólicas e da expressão gênica associada às mesmas, constitui constante desafio para avaliar a contribuição de metabólitos específicos nas propriedades dos alimentos.

*Solanum tuberosum* constitui a principal espécie cultivada de batata para fins alimentares (Filgueira, 2005). Entretanto, tem-se observado um constante desenvolvimento de novas cultivares através de cruzamentos de *S. tuberosum* com espécies silvestres visando, principalmente, a incorporação de resistência a doenças e pragas e melhores características físico-químicas e sensoriais (Fontes, 2000).

As espécies de batatas silvestres encontram-se naturalmente no continente americano (Hijmans et al., 2001), sendo que a maior disponibilidade está nos países sul-americanos Peru, Bolívia e Argentina. No Brasil, foi retratado até hoje somente duas espécies: *Solanum commersonii* e *Solanum chacoense* (Hijmans e Spooners, 2001).

As espécies silvestres de batatas despertam enorme interesse para cruzamento com batata cultivada, não só por apresentarem maior resistência a temperaturas extremas e déficit hídrico, mas também por sua composição química (Barbosa, 2009), uma vez que busca-se, com o cruzamento, a obtenção de cultivares com baixo teor de açúcares redutores e alto teor de matéria seca, para assim apresentarem melhores resultados tecnológicos na agroindústria.

A composição química dessa matéria-prima é variada, destacando-se pelo alto teor de carboidratos, especialmente amido e também pela presença de metabólitos secundários, como glicoalcaloides, poliaminas e alcaloides tropânicos. Em virtude da complexa inter-relação entre rotas do metabolismo primário e secundário, a modificação genética para silenciamento ou redução de atividade de genes que levem à síntese de compostos específicos podem

também promover alterações na síntese de outros compostos. Neste contexto, o amido, componente majoritário no tubérculo, pode sofrer alterações resultantes de distúrbios na expressão de genes associados ao acúmulo de metabólitos secundários.

Conforme Yoo & Jane (2002), os grânulos de amido são formados, basicamente, por dois polímeros, amilose e amilopectina. Sendo que, a funcionalidade dos amidos está diretamente relacionada a proporção e organização dessas duas moléculas.

Tratando-se de metabólitos secundários naturalmente presentes em batatas, deve-se dar atenção aos glicoalcalóides, às poliaminas e aos alcalóides.

Glicoalcalóides são compostos tóxicos naturalmente presentes em todas as partes da planta de batata e podem estar envolvidos no mecanismo de defesa da planta contra ação de insetos e micro-organismos (Ginzberg et. al., 2009). As concentrações mais elevadas destes compostos se encontram na casca dos tubérculos e em seus brotos (Machado e Toledo, 2004). Os principais glicoalcalóides presentes em batatas são  $\alpha$ -solanina e  $\alpha$ -chaconina, ambos sendo formas glicosiladas do alcaloide esteroide solanidina, e estes correspondem a 95%, ou mais, dos glicoalcalóides totais (Friedman, 2006).

As poliaminas são moléculas que apresentam em sua estrutura grupamentos amino separados por cadeias metilênicas hidrofóbicas (Lima et. al., 2006). Poliaminas, tais como putrescina, esperimidina e espermina, estão presentes em todos os organismos e são relacionadas a multiplicação e diferenciação celular. Em células normais, os níveis desses três compostos são intrinsecamente controlados por enzimas de biossíntese e de catabolismo (Groppa, 2008).

Já os alcalóides são compostos orgânicos de baixo peso molecular, normalmente de caráter básico, com pelo menos um átomo de nitrogênio. Encontram-se naturalmente em plantas e apresentam propriedades farmacêuticas, estimulantes, narcóticas e até mesmo tóxicas (Ziegler e Facchini, 2008). Os alcalóides podem ser divididos em quatro grupos: indólicos,

benzilisquinólicos, purínicos e tropânicos (Dräger, 2003). Os alcalóides nortropânicos diferem dos tropânicos pela ausência do grupamento N-metila (Asano, 2000).

Um dos principais exemplos de alcalóides nortropânicos são as calisteginas. Os membros conhecidos desta classe de alcalóides foram subdivididos em três grupos de acordo com o número de hidroxilas presentes em sua estrutura: calisteginas A (com três grupos hidroxila), B (com quatro grupos) e C (com cinco grupos) (Asano et al., 2001). Essas substâncias possuem atividade inibitória de glicosidases, a qual se deve à semelhança estrutural destas moléculas com as unidades glicídicas dos substratos naturais das enzimas e à sua capacidade de mimetizar o estado de transição da reação de hidrólise da ligação glicosídica (Asano, 2003).

Levando em consideração a presença natural desses diferentes compostos em batatas silvestres, mecanismos de engenharia genética surgem como uma potencial ferramenta para eliminá-los, quando considerados do ponto de vista tóxico ou para aumentar as suas concentrações, quando considerados com potencial benéfico terapêutico ou farmacêutico. Conforme Moinard et.al., (2005), as poliaminas em concentrações adequadas podem ser uma aliada para o controle de diabetes, uma vez que podem apresentar significativa ação anti-glucagon. Também com potencial ação benéficas, Ikeda et al. (2003) sugere que os alcalóides nortropânicos, como as calisteginas, pela sua atividade de inibição de glicosidase, teriam ação de chaperona ativa sítio-específica, resgatando enzimas destinadas à degradação intracelular no retículo endoplasmático. Com isso, seriam eficientes no tratamento da doença de Gaucher, causada pela atividade deficiente da  $\beta$ -glicosidase lisossomal (Chang, 2006; Drager, 2004). Além disto, ao se considerar calisteginas como iminoaçúcares (Asano, 2003), pode-se inferir que as mesmas tenham potencial para o tratamento de pacientes diabéticos, impedindo o aumento súbito da glicemia pós-prandial, uma vez que, podem regular a atividade de enzimas envolvidas na digestão de carboidratos (Asano, 2000).

Neste cenário, a engenharia genética torna-se uma ferramenta importante, uma vez que possibilita aumentar ou diminuir a disponibilidade de

um composto ou grupo de compostos específicos em célula, órgão ou tecido (Facchini, 2001).

Com esse trabalho objetivou-se avaliar os efeitos de uma estratégia de silenciamento gênico da enzima tropinona redutase II, sobre as propriedades do amido e acúmulo de metabólitos secundários em tubérculos de batata silvestre.

## 2. Revisão Bibliográfica

### 2.1 Características gerais da cultura da batata (*Solanum tuberosum* L.)

A batata (*Solanum tuberosum* L.) é uma planta da família *Solanaceae* caracterizada por formar um caule subterrâneo intumescido pelo acúmulo de reservas, denominado tubérculo, que é a parte comercializável e, também, o órgão utilizado na propagação comercial (Párraga e Cardoso, 1981). O gênero *Solanum*, contém mais de 2.000 espécies, incluindo berinjela e tomate, embora somente cerca de 150 produzam tubérculos.

Esse tubérculo é originário dos Andes peruanos e bolivianos, onde é cultivada há mais de 7.000 anos. Foi introduzida na Europa antes de 1520 e difundida em outros continentes através da colonização realizada pelos países europeus, inclusive no Brasil. Inicialmente, era cultivada em pequena escala em hortas familiares, sendo chamada de batatinha. Durante a construção de ferrovias, ganhou o nome de batata inglesa, por ser uma exigência nas refeições dos técnicos vindos da Inglaterra (ABBA, 2007). Nos Andes há mais de duas centenas de espécies silvestres tuberíferas, além de dezenas de espécies cultiváveis (Filgueira, 2005). Segundo Chitarra (2005), todas as espécies de *Solanum* que produzem tubérculos são englobadas na subsecção *Potatoe*. A planta apresenta um genótipo herbáceo anual, dicotiledônea, obtida por via sexuada, a partir da semente, ou propagação clonal, a partir de tubérculos (Almeida, 2006).

Atualmente, a batata situa-se dentre as quatro mais importantes culturas de alimentos no mundo, depois do trigo, do arroz e do milho (FAO, 2010), com área plantada estimada em 140 mil ha/ano e produtividade de 22 ton/ha/ano (IBGE, 2012), tendo consumo per capita no Estados Unidos acima de 61 Kg por ano (Lachman et al., 2001). Conforme Chalá et. al. (2001), cerca de 1,5 a 2,0% da produção nacional de batata é destinada à indústria. Esse percentual denota que a industrialização no Brasil é uma atividade recente em relação a outros países, como Estados Unidos e Holanda, que utilizam, aproximadamente, 60% da sua produção para este fim.

A batata cultivada no Brasil pertence a espécie *Solanum tuberosum*. Porém, nos últimos anos observou-se o desenvolvimento e lançamento de novas cultivares produzidas através de cruzamentos com espécies silvestres, como *S. demissum*, *S. chacoense*, *S. phureja* e *S. commersonii*, visando principalmente a incorporação de resistência a doenças e pragas e melhores características físico-químicas e sensoriais (Fontes, 2000).

## 2.2 Características gerais da batata silvestre (*Solanum commersonii*)

As espécies de batatas silvestres são encontradas naturalmente somente no continente americano (Fig.1).

Estudos mostram que a batata silvestre está distribuída entre as latitudes 38°N e 41°N. No entanto, a maior diversidade de espécies é encontrada nas regiões montanhosas da América Central e do Sul. O maior número de espécies está no Peru, seguido pela Bolívia, México e Argentina (Hijmans e Spooners, 2001). No sul do Brasil, ocorrem duas espécies de batata silvestre, *Solanum commersonii*, com as subespécies *commersonii* e *malmeanum*, e *Solanum chacoense*, com a subespécie *muelleri*.

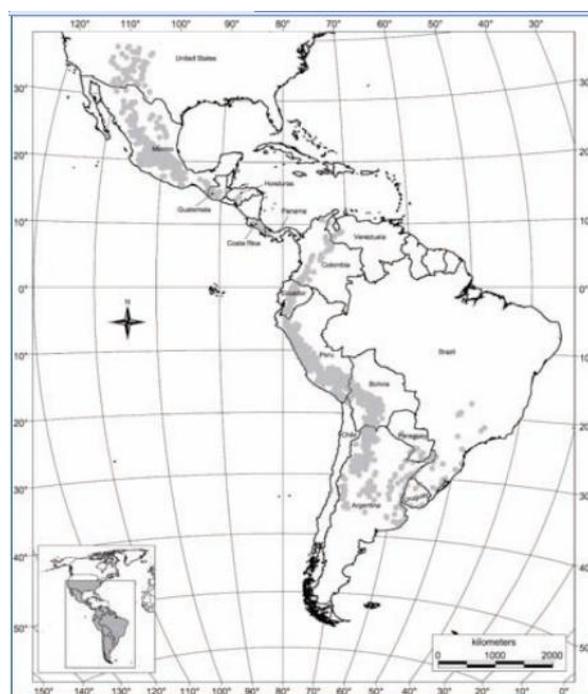


Fig. 1. Mapa de distribuição de batatas silvestres (Hijmans et al., 2001).

Por apresentar resistência a estresses ambientais, como baixas temperaturas, seca e geadas, e também a doenças, como as causadas por *Streptomyces scabies*, *Erwinia carotovora*, *Pseudomonas solanacearum* e insetos, é muito utilizada em programas de melhoramento genético para obtenção de cultivares com essas características (Rocha et al, 2000) e também com melhores características físico-químicas e sensoriais. As batatas silvestres caracterizam-se pela grande diversidade de tamanho, formatos e cor de tubérculos (Fig. 2).



Fig. 2. Tubérculos de batata silvestre A: *Solanum sparsipilum*; B: *Solanum polyadenium*; C: *Solanum acaule*; D: *Solanum chiquidenum*; E: *Solanum commersonii* e F: *Solanum piurae*. (Hijmans et al., 2001).

### 2.3 Composição química de batata silvestre

A composição química de tubérculos é importante não somente para determinar a qualidade da batata, mas também a qualidade da batata processada para consumo. O conteúdo de açúcares redutores e o teor de matéria seca interferem na coloração, textura e absorção de óleo do produto final, sendo assim considerados como parâmetros de qualidade da batata para fritura (Zorzella et al., 2003; Pereira, 2007; Fernandes et.al., 2010).

A batata silvestre, além de rica em carboidratos como o amido, também contém proteínas de elevado valor biológico, vitaminas e sais minerais, sendo

que 100g desse produto suprem cerca de 10% das necessidades de um indivíduo adulto em tiamina, niacina, vitamina B6 e ácido fólico, 50% da necessidade de vitamina C e 10% da demanda de proteínas, além de 840 mg de potássio (Pereira et. al., 2007). Além disso, essa matéria-prima apresenta diversos metabólitos secundários, como glicoalcaloides, poliaminas, compostos fenólicos e alcalóides tropânicos.

### **2.3.1 Amido**

O amido é sintetizado nas folhas das plantas à custa de resíduos de glicose formados durante o processo de fotossíntese, sendo acumulado nos cloroplastos sob a forma de grânulos insolúveis. Este amido, também chamado de amido transitório, serve de reserva de carboidratos, sendo mobilizado para auxiliar no metabolismo e crescimento da planta e durante a noite quando a fotossíntese não é possível. Já em amidos de tubérculos, a síntese é garantida pelo transporte da sacarose até os amiloplastos que catabolizam esse substrato para a síntese de amido conhecido como amido de reserva (Fig. 3) (Zeeman et. al., 2004).

Dentro dos amiloplastos se encontram as enzimas adenosina difosfato glicose pirofosforilase (AGPase), amido sintase (SS), enzima ramificadora de amido (SBE) e enzima desramificadora de amido (SBDE), as quais na presença de adenosina trifosfato (ATP) são responsáveis por catalizar a biossíntese de amilose e amilopectina. A sacarose é hidrolisada no citosol e convertida em moléculas de hexoses que atuam como precursores na síntese de amido, as quais são transportadas para o interior do amiloplasto. Estes precursores são chamados de ADP-glicose, glicose 1-fosfato e glicose 6-fosfato, sendo essas duas últimas também convertidas a ADP-glicose que serve como substrato para a síntese dos polímeros de amido (Denyer, 2001).

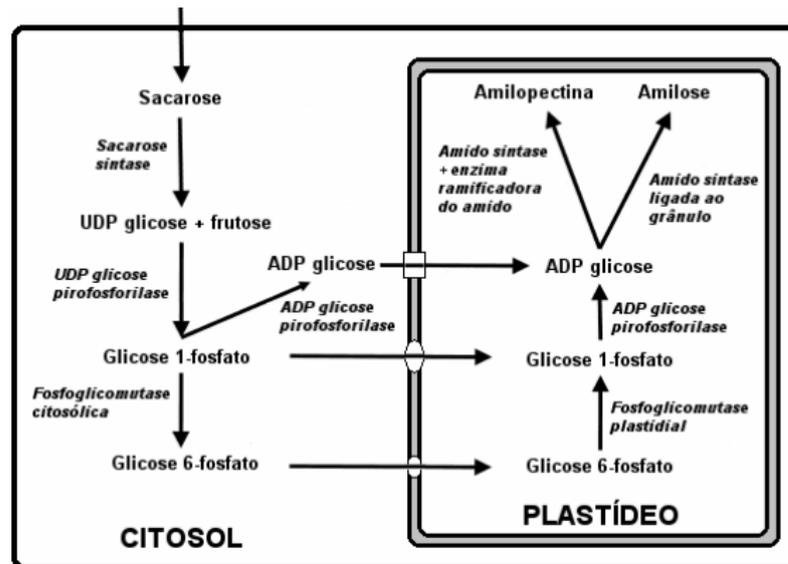


Fig. 3. Modelo proposto para síntese de amido (Kossmann e Lloyd, 2000).

O amido deve muito de sua funcionalidade às duas macromoléculas que o compõem, a amilose e amilopectina (Fig. 4), assim como à organização física das mesmas dentro da estrutura granular. A amilose e a amilopectina não existem livres na natureza, mas como agregados semicristalinos organizados sob a forma de grânulos (Cereda, 2001).

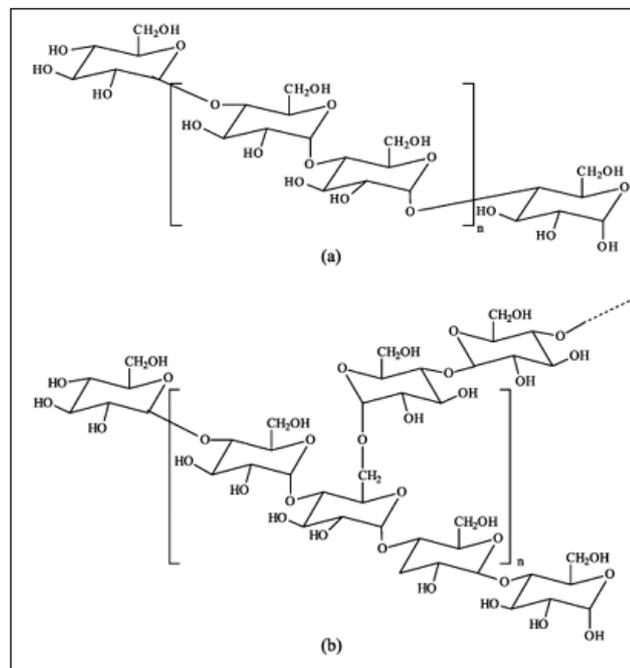


Fig. 4. Estrutura química da amilose (a) e amilopectina (b) (Coradini et.al., 2005)

A amilose é uma molécula essencialmente linear formada por unidades de D-glicose ligadas em  $\alpha$ -1,4. O peso molecular desse polímero é variável

com a fonte e as condições de processamento empregadas na extração do amido, podendo conter de 200 a 2000 unidades de glicose (Cereda, 2001). A amilose apresenta-se na forma helicoidal e o interior da hélice contém átomos de hidrogênio, enquanto que os grupos hidroxilas permanecem na parte externa da mesma. A presença de átomos de hidrogênio no interior da hélice torna-a hidrofóbica e permite a formação de complexos com ácidos graxos livres, com alguns álcoois e com iodo (Matsugma, 2006). Já a amilopectina é uma macromolécula bastante ramificada e consiste em cadeias mais curtas de ligações  $\alpha$ -1,4 contendo de 10 a 60 unidades de glicose e cadeias laterais com 15 a 45 unidades de glicose, com uma média de 5% de ligações  $\alpha$ -1,6 nos pontos de ramificação (Van Der Maarel et al., 2002). O peso molecular da amilopectina é cerca de 1000 vezes o peso molecular da amilose (You et al., 2002).

O grânulo de amido é birrefringente, e sob luz polarizada, apresenta uma imagem em forma de cruz, denominada de Cruz de Malta. A birrefringência ocorre pelo elevado grau de organização molecular dos grânulos, e não necessariamente pela forma cristalina dos mesmos. A proporção entre amilose e amilopectina, e suas estruturas moleculares, diferenciam os amidos de diferentes origens botânicas, cultivares e condições de cultivo (Kitahara e Copeland, 2004). A estrutura e a organização do grânulo de amido são visualizadas na Fig. 5.

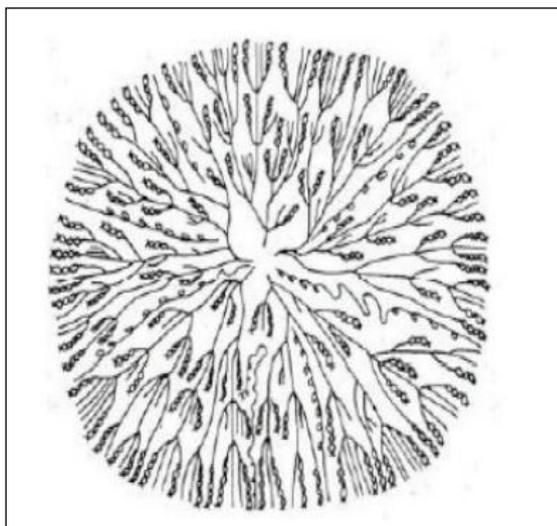


Fig. 5. Representação esquemática do grânulo de amido (Matsugma, 2006).

Os grânulos de amido apresentam regiões cristalinas e amorfas. As regiões cristalinas são formadas por cadeias ramificadas da molécula de amilopectina e são alternadas com camadas amorfas. As ramificações agrupadas de amilopectina ocorrem como feixes de dupla hélice (Liu, 2005) e formam assim, uma estrutura denominada *clusters* na língua inglesa.

São as áreas cristalinas do amido que mantêm a estrutura do grânulo, controlam o seu comportamento na presença de água e os tornam mais ou menos resistentes aos ataques químicos e enzimáticos. A zona amorfa dos grânulos de amido é a região menos densa, mais suscetível aos ataques enzimáticos e absorve mais água em temperaturas abaixo da temperatura de gelatinização (Biliaderis, 1991). Na Fig. 6 visualiza-se a distribuição das regiões amorfas e cristalinas do amido.

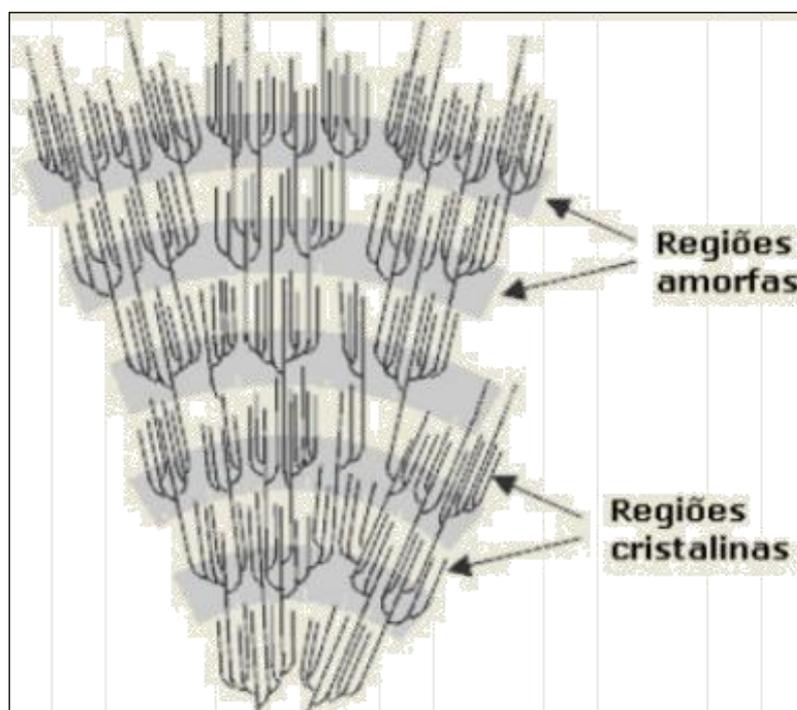


Fig. 6. Distribuição das regiões amorfas e cristalinas do amido  
LSBU (2009)

As propriedades de birrefringência e cristalinidade estão diretamente relacionadas aos diferentes graus de ordenamento estrutural dos grânulos. A birrefringência óptica e as propriedades de difração de raios-X evidenciam a existência de uma estrutura ordenada do grânulo de amido (Matsuguma, 2006).

A difratometria de raios-X é utilizada para revelar a presença e a característica da estrutura cristalina de um composto. Os grânulos de amido,

por serem parcialmente cristalinos, proporcionam padrões específicos de difração de raios-X. Os padrões A, B e C são as diferentes formas poliméricas encontradas nos amidos que diferem no empacotamento das duplas hélices da amilopectina (Fig. 7) (Singh, 2011).

O padrão A é característico de cereais, o padrão B de tubérculos e frutas e o padrão C é considerado uma mistura dos padrões A e B e é característico de amidos de leguminosas (Acevedo, 2006). O padrão B apresenta pico de maiores intensidade de refração para os ângulos a 2 Å, 5,6 Å, 15 Å, 17 Å, 22 Å e 23 Å . O amido de batata é um típico representante desse padrão. Os grânulos quando submetidos a mudanças físicas e químicas podem apresentar alterações no seu padrão de cristalinidade (Ceredas, 2001)

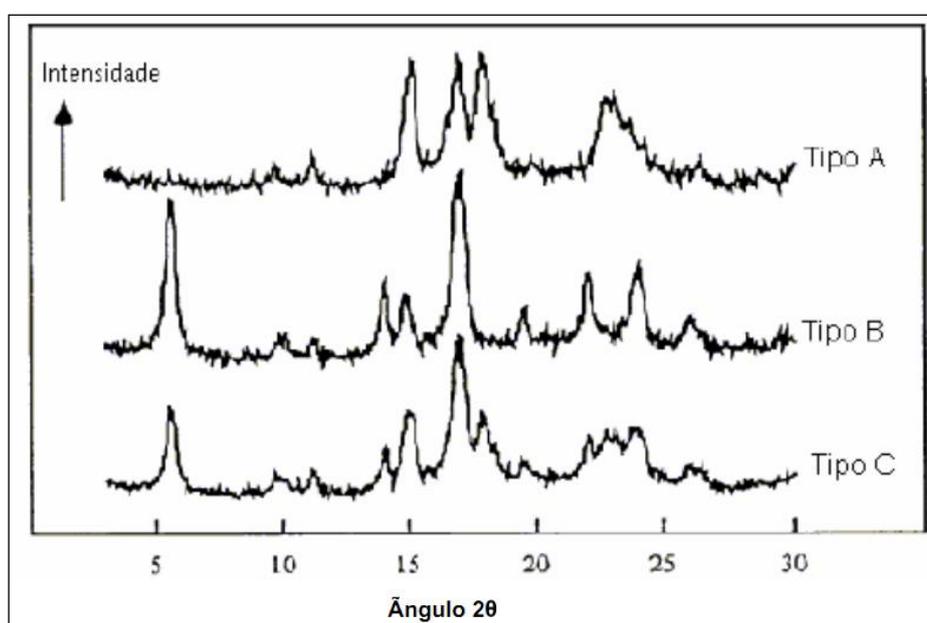


Fig. 7. Difratograma de amidos de padrões A, B e C.(Cereda, 2001)

Quando uma suspensão de amido em água é submetida a elevadas temperaturas, ocorre uma transição irreversível denominada gelatinização, que pode ser caracterizada por uma endoterma, obtida através de calorimetria diferencial de varredura (DSC) (Garcia et.al., 1997). A gelatinização promove um colapso do arranjo molecular, em que o grânulo de amido sofre mudanças irreversíveis em suas propriedades, como por exemplo, perda da cristalinidade, absorção de água, intumescimento do grânulo e lixiviamento de alguns componentes, principalmente amilose (Zhong et al., 2009). Já a retrogradação

é um processo que ocorre quando as moléculas de amido gelatinizado começam a se reassociar em uma estrutura ordenada. (Cereda, 2001).

Quando as moléculas do amido são aquecidas em excesso de água, a estrutura cristalina é rompida e as moléculas de água formam pontes de hidrogênio com os grupos hidroxila da amilose e da amilopectina, o que causa um aumento no inchamento do grânulo e na sua solubilidade (Singh, 2011).

O poder de inchamento e a solubilidade fornecem uma evidência da magnitude de interação entre as cadeias do amido no interior das zonas amorfas e cristalinas. O grau desta interação é influenciado pela relação entre os níveis de amilose e amilopectina, e pelas características destes compostos em termos de massa, distribuição molecular, grau e comprimento de ramificação (Hoover, 2001).

Sabe-se que a gelatinização tem início no hilo e se expande rapidamente para a periferia, dando-se, inicialmente, nas regiões amorfas devido à fragilidade das ligações de hidrogênio nessas áreas, ao contrário do que ocorre nas regiões cristalinas (Singh, 2003).

A calorimetria diferencial de varredura (DSC) é a técnica mais usada para medir as temperaturas de transição do processo de gelatinização (temperatura inicial, temperatura de pico e temperatura final) e a entalpia de gelatinização dos amidos. As temperaturas e a entalpia de gelatinização são influenciadas pela arquitetura molecular da região cristalina e não pela proporção de região cristalina, que corresponde aos níveis de amilose e amilopectina (Noda et.al., 1996).

Durante a gelatinização e retrogradação ocorrem mudanças no interior dos grânulos que são determinantes no comportamento de pasta desses amidos. Esse comportamento pode ser acompanhado pelas mudanças de viscosidade durante o aquecimento e resfriamento de dispersões de amido usando equipamentos como o viscoamilógrafo de Brabender ou Rápido Visco Analisador (RVA), que registram as alterações de viscosidade de um sistema amido-água, sob agitação, em relação a temperatura e ao tempo (Cereda, 2001).

No viscoamilógrafo (RVA) durante a fase de temperatura constante (95°C) os grânulos começam a se quebrar e a solubilização dos polímeros continua. Nesse ponto ocorre uma redução ou quebra na viscosidade. Durante

a fase de resfriamento, polímeros de amilose e amilopectina começam a se reassociar e outro aumento na viscosidade, conhecido como tendência a retrogradação, é registrado (Matsuguma, 2006). Na Fig. 8 é apresentada uma curva típica obtida na análise viscoamilográfica de amido.

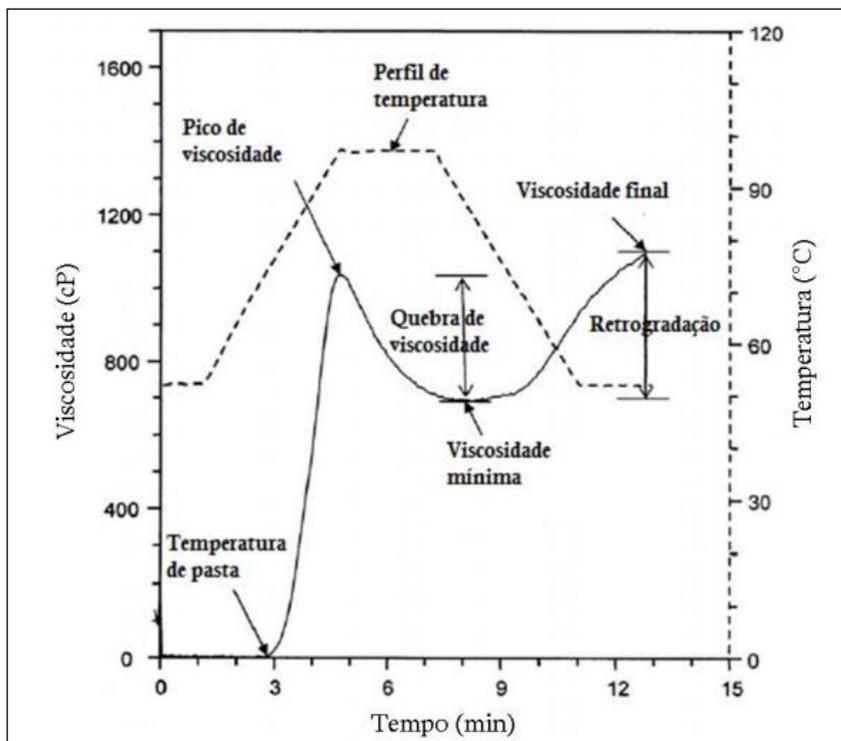


Fig. 8. Representação de uma curva típica obtida na análise das propriedades viscoamilográficas do amido em um Rápido Viscoanalisador (RVA) (Kaur et al., 2009)

Para muitas aplicações alimentícias e técnicas do amido, a amilopectina possui características de interesse muito mais elevado que a amilose. No entanto, não se costuma separar os dois polissacarídeos, visto que exige um processo difícil, de enorme prejuízo para o meio ambiente. O que se faz atualmente é processar o amido quimicamente de modo a alterar as características indesejadas da amilose (Redepapa, 2007).

Recentemente, porém, a empresa holandesa Avebe desenvolveu uma variedade de batata que só produz amilopectina. Pela engenharia genética, introduziu-se na batata um gene que impede a produção de amilose. Empregue-se o amido dessa variedade de batata apenas em aplicações industriais (Redepapa, 2007).

### **2.3.2 Metabólitos Secundários**

A presença de moléculas bioativas em plantas de interesse comercial e medicinal tem sido amplamente estudada nos últimos anos. Apenas algumas dessas moléculas são produzidas na rota primária do metabolismo, as demais são conhecidas como metabólitos secundários (De Luca e St-Pierre, 2000).

Metabólitos secundários são compostos orgânicos que não desempenham função direta no crescimento e desenvolvimento das plantas, mas que estão envolvidos em interações chaves entre a planta e seu ambiente, contribuindo para o funcionamento global do organismo, uma vez que, oferecem proteção contra estresse biótico e abiótico. As cores, aromas e sabores das plantas, determinadas fundamentalmente pela presença de metabólitos secundários, desempenham importante papel na reprodução das mesmas por atraírem polinizadores e disseminadores de sementes e de outras estruturas reprodutivas. Muitos metabólitos secundários comprovadamente possuem efeitos além dos nutricionais quando ingeridos, sendo seus benefícios explorados pelas indústrias alimentícias e farmacêuticas (Wink, 2003).

O gênero *Solanum* destaca-se pela presença dos metabólitos secundários glicoalcaloides, poliaminas, compostos fenólicos e alcalóides tropânicos.

#### **2.3.2.1 Glicoalcaloides**

Glicoalcaloides são compostos tóxicos naturalmente presentes em batatas, podendo estar envolvidos no seu mecanismo de defesa contra ação de insetos e micro-organismos (Friedman, 2006). Encontram-se distribuídos em toda a planta, porém, as concentrações mais elevadas destes compostos se encontram nos tecidos de maior atividade metabólica, como flores, folhas jovens, brotos, epiderme e área em torno dos “olhos” (Machado e Toledo, 2004; Lachman et al., 2001).

Os glicoalcaloides de batata são compostos de duas bases esteroidais: solanidina e espirosolano. Solanidina contém um sistema indolizina tipificado pelas estruturas de solaninas, chaconinas, solanidinas, leptinas e demissidinas.



glicoalcaloides aparecem de forma concentrada em uma curta camada de 1,5 mm a 3,0 mm imediatamente abaixo da pele (Lachman et al., 2001).

A exposição à luz, ao estresse biótico ou abiótico, ou mesmo o envelhecimento são causas da transformação dos amiloplastos em cloroplastos nos tubérculos, seguido da síntese do pigmento verde (clorofila). Estes mesmos fatores também ocasionam uma rápida produção de chaconina e solanina no tubérculo. O esverdeamento, da superfície (casca) ou avançando até o interior do tubérculo, sinaliza maior acúmulo de glicoalcalóides (800 mg a 1000 mg.kg<sup>-1</sup> de matéria fresca) (Simões, 2008).

Machado e Toledo (2004) ao avaliarem a estabilidade de glicoalcaloides submetidos a quatro tipos de cozimentos (microondas, fritura, assadura e fervura) demonstraram que os mesmos são termo-resistentes.

Easton (2008) quantificou glicoalcaloides esteroidais totais em produtos de batata. Os maiores conteúdos (mg.kg<sup>-1</sup> de massa fresca) foram encontrados em batata cortada (32-720), batata frita descascada (55-242), e batata descascada e congelada (76-120). Porém, os conteúdos de glicoalcaloides totais podem variar em decorrência da variabilidade genética das cultivares, tipo e umidade do solo, fertilização, tratamentos fitossanitários, e condições de armazenamento (Machado e Toledo, 2004; Percival et al., 1996). Além disso, tubérculos aéreos acumulam maiores quantidades de glicoalcaloides do que os subterrâneos, devido à exposição à luz durante o desenvolvimento do tubérculo.

Alguns estudos têm associado conteúdos de glicoalcaloides acima de 220 mg.kg<sup>-1</sup> de matéria fresca com alterações nas características sensoriais em batatas, incluindo sabor amargo e sensação de ardência na garganta (Machado e Toledo, 2004).

Slanina (1990), levando em conta o histórico de consumo de batata pelo homem e os dados de intoxicação em humanos, estimou uma ingestão diária aceitável em torno de 1 mg.kg<sup>-1</sup> de massa corpórea para um adulto de 60 kg.

Os glicoalcaloides presentes na batata estão entre os mais venenosos compostos da dieta humana. Em geral, humanos parecem ser mais sensíveis à

intoxicação por glicoalcaloides do que outros animais. Através de relatos de intoxicações em humanos decorrentes do consumo de batatas, estimou-se uma dose tóxica para o homem na faixa de 2 mg a 5 mg·kg<sup>-1</sup> de massa corpórea (m.c.). Esses valores de toxicidade se comparam àqueles observados para venenos bem conhecidos, tais como estroscina (5 mg·kg<sup>-1</sup> m.c.) e arsênico (8 mg·kg<sup>-1</sup> m.c.) (Machado e Toledo, 2004).

Esses compostos apresentam duas ações tóxicas no organismo humano: uma, inibindo a acetilcolinesterase, afetando o sistema nervoso central. Um inibidor de acetilcolinesterase causa acúmulo de acetilcolina em tecidos ou órgãos nervosos, resultando em sinais neurológicos associados a envenenamento com alcalóides, tais como hiperestesia, dispnéia, coceira no pescoço e sonolência. A outra ação dos glicoalcaloides é sobre as membranas celulares, causando ruptura das membranas do trato-gastrointestinal com danos hemolíticos e hemorrágicos e excesso de fluido nas cavidades corpóreas, o que leva a diarreia, vômitos e dores abdominais (Morris e Lee, 1984). Esses sintomas podem estar associados a desordens neurológicas, diminuição da pressão arterial, febre, alucinações e coma (Lachman et al., 2001).

Alguns trabalhos têm reportado benefícios dos glicoalcaloides no organismo, evidenciando assim que dependendo da dosagem esses compostos podem apresentar características benéficas (Lee et. al., 2004, Korpan, 2004, Friedman et. al., 2005). Conforme Korpan (2004) o consumo de pequenas doses de alguns glicoalcaloides, como a aglicona solanidina e a  $\alpha$ -solasonina, podem apresentar atividade antiviral e anticâncer contra células cancerosas do fígado (HepG2), estômago (AGS e KATO III), linfoma (U937) e cervical (HeLa).

### **2.3.2.2 Poliaminas**

As poliaminas são moléculas que apresentam em sua estrutura grupamentos amino separados por cadeias metilênicas hidrofóbicas. Em geral possuem baixa massa molecular e considerável solubilidade em água. Na

Fig.10 estão representadas as estruturas químicas das principais poliaminas presentes em batatas (Lima et. al., 2006).

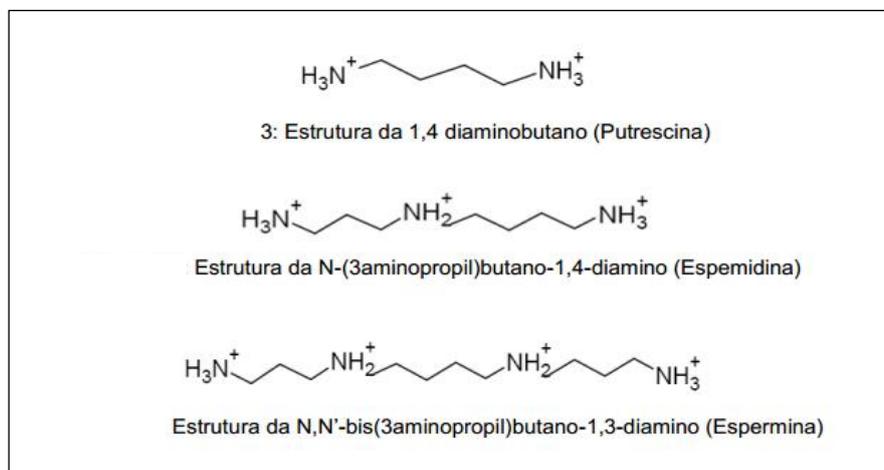


Fig. 10. Estruturas químicas das principais poliaminas presentes em plantas de batata (Groppa, 2008)

A descoberta inicial das poliaminas data de 1678, quando Antonie Van Leeuwenhek isolou alguns cristais do sêmen humano. Contudo, apenas em 1924 foi deduzida a formula empírica desses cristais e só dois anos mais tarde esses compostos foram sintetizados *in vitro*. Os nomes das primeiras poliaminas, esperimidina e espermina, refletem a essa descoberta inicial (Wallace et. al., 2003). A putrescina, por sua vez, foi primeiramente isolada do *Vibrio cholerae*, devido a elevada concentração da mesma em carnes em decomposição (Groppa, 2008).

As poliaminas são essenciais para animais em crescimento e desenvolvimento, estando envolvidas na regulação e no estímulo da síntese de DNA, RNA e proteínas (Lima et. al., 2006). Conforme Pegg e Feith (2007) e Saunders (2007), as poliaminas podem agir como ligantes em múltiplos sítios do DNA, RNA, proteínas e fosfolípidios. Em geral, a esperimidina e a espermina aumentam a rigidez da membrana celular pela formação de complexos com fosfolípidios e proteínas. Essas moléculas também apresentam papel antioxidante no organismo, prevenindo, assim, a oxidação lipídica (Moinard, et.al., 2005).

Em células normais, os níveis de poliaminas são intrinsecamente controlados por enzimas na biossíntese e no catabolismo. As enzimas

envolvidas na sua biossíntese são a ornitina carboxilase, a adenosilmetionina descarboxilase, espermidina sintase e a espermina sintase. Já as enzimas catabólicas incluem a espermidina acetiltransferase, a espermina acetiltransferase (Thomas e Thomas, 2003). A biossíntese e o catabolismo ocorrem em sincronia. Anormalidades nessa sincronia podem ser responsáveis pelos níveis aumentados de poliaminas em células cancerosas em comparação com níveis em células normais (Saunders e Wallace, 2007).

A biossíntese das poliaminas está representada na Fig. 11. O processo inicia com a produção de putrescina pela descarboxilação do aminoácido ornitina, através da ação da ornitina descarboxilase. Após, a adição do grupo aminopropil à putrescina conduz a síntese de espermidina e outra adição de grupamento aminopropil conduz a formação de espermina (Boncher, 2007).

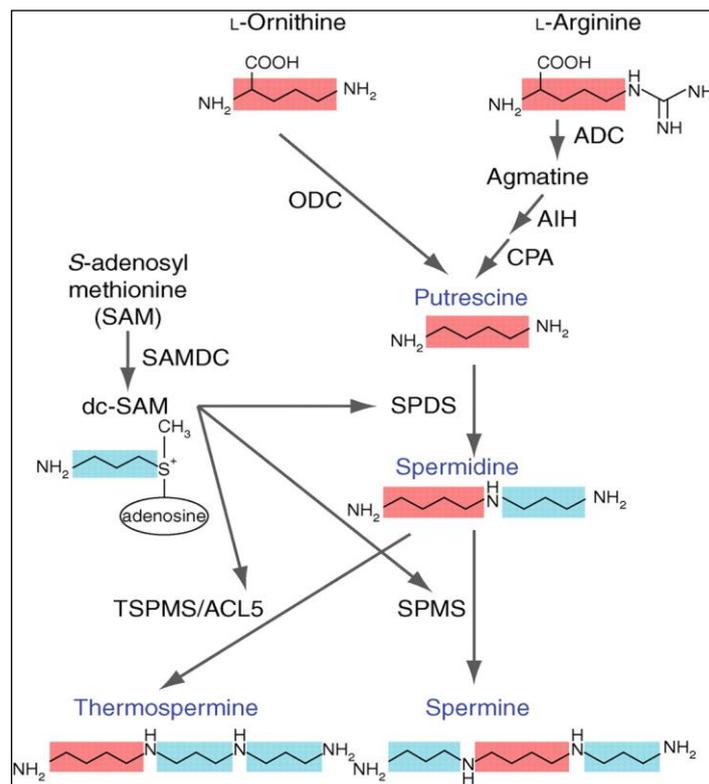


Fig. 11. Biossíntese de poliaminas (Kusano, 2008)

A enzima adenosilmetionina descarboxilase, juntamente com a ornitina descarboxilase, constitui-se como limitadora da biossíntese de poliamina. A adição de grupamentos aminopropil à putrescina e à espermidina é catalisada pelas enzimas espermidina isomerase e espermina isomerase, respectivamente (Kusano, 2008).

As poliaminas estão essencialmente envolvidas nos processos de crescimento e diferenciação celular (Moinard et. al., 2005). Saunders e Wallace (2003) encontraram altas concentrações de poliaminas em células cancerígenas, o que sugere que esses compostos podem ser promotores de fatores cancerígenos.

Estudos recentes também vêm relacionando as poliaminas ao diabetes. O glucagon apresenta importante papel na origem de complicações do diabetes e por esse motivo há em curso diversas pesquisas sobre agentes anti-glucagon. Moinard et.al., (2005) ao estudar o metabolismo e a implicação de poliaminas em doenças humanas, mostraram que a espermidina e a espermina apresentam uma significativa ação anti-glucagon. Apesar dos bons resultados, estudos *in vitro* e *in vivo* ainda são necessários para a confirmação destes resultados estudados.

### **2.3.2.3 Compostos fenólicos**

Os compostos fenólicos denominados flavonóides constituem um dos grupos de substâncias mais frequentes em espécies do gênero *Solanum* (Silva et al. 2003). Entre os principais flavonóides, pigmentos responsáveis pelas cores vermelha, azul e púrpura, denominados antocianinas, têm ganhado grande atenção ao longo dos anos, devido a uma ampla faixa de efeitos biológicos, tais como atividades antioxidante, anti-inflamatória e anticarcinogênica (Winkel-Shirley, 2001).

Diversos trabalhos têm sido realizados na caracterização de compostos fenólicos presentes em tubérculos de batatas, mas muito pouca informação é disponível referente à sua capacidade antioxidante, limitando o potencial interesse do setor produtivo no potencial nutracêutico dos mesmos. Ácidos fenólicos como clorogênico, caféico, protocatecico e p-cumárico, são os mais frequentemente encontrados nessa matéria-prima (Lewis et al. 1998; Rodríguez-Saona et al. 1998). Pequenas quantidades de rutina, quercetina, miricetina, kaempferol, naringenina e alguns outros flavonóides também têm sido detectados (Reyes et al., 2005).

Nas plantas, as antocianinas desempenham importante papel na fitoproteção, na atração de polinizadores e de dispersores de sementes, na sinalização entre plantas e micro-organismos. Atualmente, estão sendo usadas como corantes naturais em alimentos e bebidas e têm sido apresentadas como inibidores do crescimento de células malignas, além de excelente propriedade antiinflamatória e antioxidante (Han et al., 2006).

Normalmente, a batata não é lembrada como um alimento rico em antioxidantes, mas muitos estudos têm demonstrado que, dependendo do genótipo, algumas batatas contêm consideráveis concentrações de polifenóis, flavonóides e antocianinas. Além disso, novas variedades de batata estão sendo desenvolvidas com o objetivo de aumentar a sua capacidade antioxidante (Han et al., 2006).

Entre as novas batatas, as coloridas têm atraído especial interesse em muitos países, devido à cor atrativa amarela, púrpura ou vermelha (Han et al., 2006). Batatas púrpuras e vermelhas provêm uma fonte natural de compostos fenólicos (Reyes et al. 2004; Reyes and Cisneros-Zevallos 2003).

#### **2.3.2.4 Alcalóides**

Alcalóides são compostos orgânicos de baixo peso molecular, normalmente de caráter básico, com pelo menos um átomo de nitrogênio. São encontrados em aproximadamente 20% das espécies de plantas e apresentam propriedades farmacêuticas, estimulantes, narcóticas e até mesmo tóxicas. Os alcalóides podem ser divididos em quatro grupos: indólicos, benzilisoquinólicos, purínico e tropânico (Ziegler & Facchini, 2008).

Alcalóides tropânicos são aminas bicíclicas que combinam um anel de piperidina e um anel de pirrolidina. Ocorrem principalmente em plantas da família *Solanaceae*. Os alcalóides nortropânicos diferem dos tropânicos pela ausência do grupamento N-metila (Asano, 2000).

A biossíntese de alcalóides tropânicos (Fig. 12) inicia com os aminoácidos ornitina e arginina, que são descarboxilados pela ornitina

descarboxilase e arginina descarboxilase, respectivamente; ambos dando origem a putrescina (composto de ligação entre o metabolismo primário e secundário). A putrescina poderá originar a esperimidina ou ser metilada e formar a N-metil-putrescina. Para síntese de alcalóides tropânicos, a putrescina é metilada pela enzima putrescina N-metiltransferase. Subseqüentemente ocorre a oxidação desaminativa da N-metil-putrescina, catalisada pela N-metil-putrescina-oxidase, originando, assim, o 4-metilaminobutanal, o qual se converte espontaneamente a N-metil-pirrolino. A condensação do N-metil-pirrolino com o ácido acetoacético leva a formação de tropinona. A tropinona é reduzida a tropina ou a pseudotropina, através da tropinona redutase I ou II (*tr I* ou *tr II*). A tropina origina hiosciamina e escopolamina, e a pseudotropina origina calisteginas (Richter, 2006).

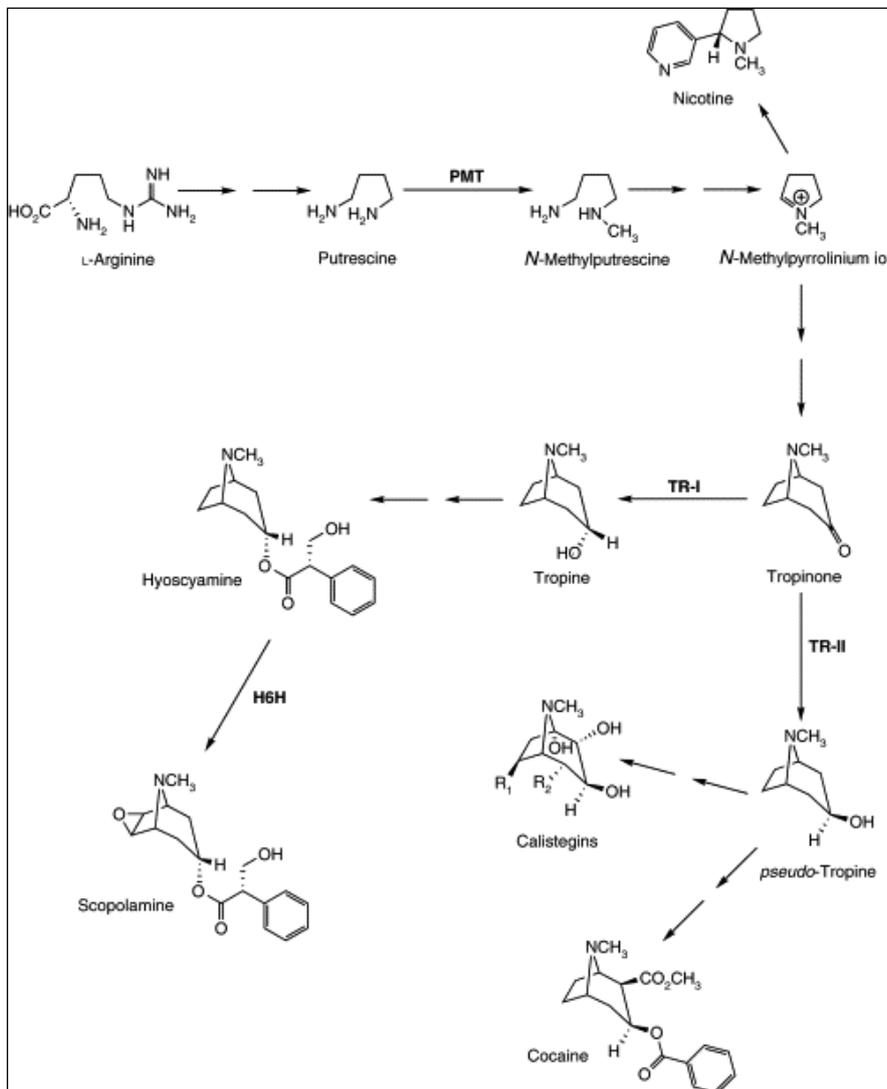


Fig.12. Biossíntese de alcalóides tropânicos e de calisteginas  
Dräger (2003)

As calisteginas são alcalóides nortropânicos poliidroxilados amplamente distribuídos nas espécies pertencentes às famílias *Solanaceae* e *Convolvulaceae* (Watson et al., 2001). O nome desse composto deriva do seu descobrimento em raízes de *Calystegia sepium* (Dräger, 2003). Os membros conhecidos desta classe de alcalóides foram subdivididos em três grupos de acordo com o número de hidroxilas presentes em sua estrutura: calisteginas A (com três grupos hidroxila), B (com quatro grupos) e C (com cinco grupos) (Asano et al., 2001). Novas estruturas são constantemente publicadas e poderão teoricamente ser concebidas, utilizando o esqueleto nortropano e atribuindo hidroxilas nas posições possíveis (Dräger, 2003). A determinação estrutural desses compostos pode ser realizada através de espectroscopia de massa de alta resolução, ressonância magnética de prótons e carbono e ressonância magnética nuclear. Na Fig. 13 são apresentadas as principais moléculas de calisteginas presentes em algumas espécies vegetais.

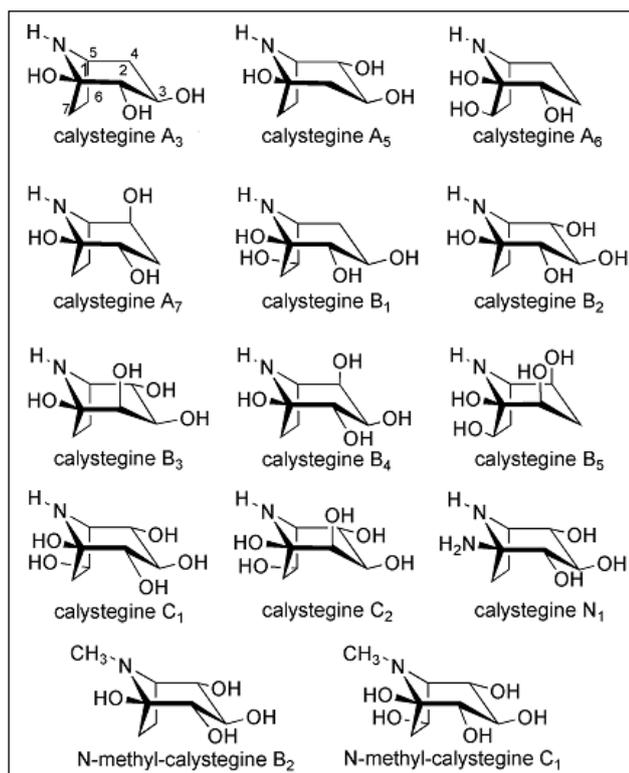


Fig. 13. Estrutura de calisteginas de ocorrência natural (Dräger, 2003)

A composição e a concentração de calisteginas variam entre plantas, sendo as formas A<sub>3</sub>, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> e B<sub>3</sub> as de maior ocorrência e a B<sub>2</sub>, a mais estável e

abundante. Em batata (*Solanum tuberosum* L.), a forma B<sub>2</sub> é encontrada em folhas, raízes, flores, tubérculos e brotações jovens de tubérculos, em concentrações aproximadas de 34, 50, 103, 450 e 2300 µg g<sup>-1</sup> de massa fresca, respectivamente (Ikeda et al., 2003; Dräger, 2004; Dräger, 2006).

As calisteginas são altamente hidrofílicas. Seu isolamento se baseia na extração com solvente orgânico a partir de uma solução alcalina; resultando na concentração dessa substância na fase aquosa (Dräger, 2003).

Outro aspecto interessante da atividade biológica das calisteginas é seu potencial de toxicidade, quando ingeridos por humanos. Asano (2000) propõe que as calisteginas estejam, juntamente com a suaisonina, envolvidos na intoxicação de gado alimentado com plantas das famílias *Solanaceae* e *Convolvulaceae*. Neste caso, estas substâncias levariam ao desenvolvimento das doenças de Fabry e de Gaucher. Porém, em um estudo mais detalhado, utilizando *Ipomoea carnea* (Ikeda et al., 2003), foi verificado que as calisteginas, apesar de se mostrarem potentes inibidores de β-glicosidase lisossomal in vitro, apresentam-se mais como indutores do que como inibidores desta enzima em sistema de cultivo de células. Dessa forma, estes compostos teriam ação de chaperona ativa sítio-específica, resgatando enzimas destinadas à degradação intracelular no retículo endoplasmático. Com isso, seriam eficientes no tratamento da doença de Gaucher, causada pela atividade deficiente da β-glicosidase lisossomal. Entretanto, há possibilidade das calisteginas agirem como coadjuvantes da ação tóxica das suainsonina (Chang, 2006; Dräger, 2004; Asano, 2000).

De acordo com Asano (2003), calisteginas agem como iminoaçúcares, nos quais o átomo de oxigênio endocíclico é substituído por um átomo de nitrogênio. A atividade inibitória de glicosidases destes alcalóides polihidroxilados se deve à semelhança estrutural destas moléculas com as unidades glicídicas dos substratos naturais das enzimas e à sua capacidade de mimetizar o estado de transição da reação de hidrólise da ligação glicosídica.

A capacidade de inibição das enzimas glicosidases e manosidases faz da calistegina, importantes ferramentas em estudos de agentes anticancerígenos, antitumores-proliferativos e antimetastáticos (Nemr et al.,

2001), uma vez que o catabolismo e processamento de glicoproteínas pelas glicosidases envolve a transformação de células normais em células tumorais. Portanto, em concentrações baixas, este alcalóide inibe a ação destas enzimas, impedindo a formação destas patologias sem acarretar efeitos tóxicos (Watson et al., 2001). Além disso, ao se considerar calisteginas como iminoaçúcares, pode-se inferir que as mesmas tenham potencial para o tratamento de pacientes diabéticos, impedindo o aumento súbito da glicemia pós-prandial, uma vez que, podem regular a atividade de enzimas envolvidas na digestão de carboidratos, retardando sua absorção (Dräger, 2004).

## **2.4 Engenharia genética**

A engenharia genética, através do controle da expressão gênica, permite aumentar ou diminuir a disponibilidade de um composto ou grupo de compostos específicos em célula, órgão ou tecido vegetal (Facchini, 2001). Assim, o emprego da mesma tem se popularizado, tanto para estudo metabólico de plantas quanto para obtenção de plantas com metabolismo alterado para uso comercial (Vaucheret et. a., 2001).

Na obtenção de plantas transgênicas visando o controle de rotas metabólicas, é notória a existência de variações entre linhagens quanto ao acúmulo de determinados compostos (Iglesias et. al., 1997). A aleatoriedade insercional do transgene no genoma da espécie alvo de transformação, em cada evento de transformação, é a principal fonte de variabilidade fenotípica entre as linhagens resultantes (Stam et. al., 1997).

## 3. ESTUDO 1

### Propriedades de pasta, morfológicas, térmicas e cristalinidade de amido de batata silvestre (*Solanum commersonii*)

#### 3.1 Introdução

A batata é uma planta modelo para estudos de metabolismo de carboidratos. Entre as diversas espécies de batatas, as espécies silvestres se destacam por suas excelentes características de resistência a estresses abióticos e defesa contra fitopatógenos (Friedmam, 2006), assim como suas características físico-químicas favoráveis para matérias-primas destinadas a industrialização, como baixo teor de açúcares redutores e alto conteúdo de sólidos totais (Rocha et al, 2000). Tendo em vista essas características, as batatas silvestres vem despertando interesse de melhoristas genéticos, a fim de adicionar as suas propriedades às espécies comerciais de batata. No entanto é sabido que as espécies silvestres se diferenciam das comerciais disponíveis pelo elevado teor de alcaloides, que podem conferir determinado grau de toxicidade à planta (Hijmans e Spooners, 2001). Sendo assim, processos de modificação genética para silenciamento ou redução de atividade de genes que levem a síntese desses compostos tóxicos, podem também promover alterações na síntese de outros compostos naturalmente presentes nos tubérculos; como o amido por exemplo, por ser seu componente majoritário.

O amido pode ser utilizado em variadas indústrias, sendo as principais consumidoras as alimentícias, as de papel e as têxteis. As necessidades das indústrias que se utilizam deste polissacarídeo estão cada vez mais complexas, fazendo com que inúmeras pesquisas sejam realizadas para desenvolver amidos diferenciados. Algumas das características funcionais específicas requeridas pelo mercado podem ser maior claridade, estabilidade ao congelamento e também ao cozimento, resistência a tratamentos estressantes que deterioram a estrutura do gel e outras (Vieira, 2004).

Conforme Yoo & Jane (2002), os grânulos de amido são formados, basicamente, por dois polímeros, amilose e amilopectina. Sendo que, a funcionalidade dos amidos está diretamente relacionada a proporção e organização dessas duas moléculas. A amilose e a amilopectina não existem livres na natureza, mas como agregados semi-cristalinos organizados sob a forma de grânulos. O tamanho, a forma e a estrutura desses grânulos de amido variam com as fontes botânicas. Os diâmetros dos grânulos geralmente variam de 1 a 100  $\mu\text{m}$ , e os formatos podem ser regulares ou irregulares (Liu, 2005).

Por apresentar propriedades específicas, variáveis com a fonte botânica, cada amido é considerado único em termos de organização de grânulos e estrutura de seus constituintes macromoleculares. Para incrementar as possibilidades de uso dos amidos extraídos de fontes convencionais, como milho, mandioca e batata, os mesmos podem ser submetidos a processos de modificação química no sentido de moldar os mesmos às necessidades requeridas. Entretanto, o emprego de amido em alguns setores, como o alimentício, é controlado e restringido por normas de proteção e segurança ao consumidor e ao meio ambiente. Desse modo, o uso de modificação química deixa de ser atraente, abrindo espaço para novas alternativas de modificação, como a genética, por exemplo.

A modificação genética de amidos é consequência de alterações diretas ou indiretas na sua rota biossintética. Sua síntese ocorre em uma organela celular especializada, o amiloplasto, que possui uma membrana lipoproteica limitante (Fulton et al., 2002). Dentro dos amiloplastos estão as enzimas que catalizam a biossíntese da amilose e da amilopectina (Schwall et al., 2000; Blennow et al., 2005), como a adenosina difosfato glicose pirofosforilase (AGPase), amido sintase (SS), enzima ramificadora de amido (SBE) e enzima desramificadora de amido (SBDE), as quais na presença de adenosina trifosfato (ATP) são responsáveis por catalizar a biossíntese de amilose e amilopectina. A sacarose é hidrolisada no citosol e convertida em moléculas de hexoses que atuam como precursores da síntese de amido, as quais são transportadas para o interior do amiloplasto. Estes precursores são chamados de ADP-glicose, glicose 1-fosfato e glicose 6-fosfato, sendo essas duas últimas

também convertidas a ADP-glicose que serve como substrato para a síntese dos polímeros de amido (Denyer et. al., 2001).

A batata silvestre é característica pela presença de metabólitos secundários, como os alcaloides, por exemplo, que são compostos orgânicos de baixo peso molecular, normalmente de caráter básico, com pelo menos um átomo de nitrogênio e podem ser divididos em quatro grupos: indólicos, benzilisoquinólicos, purínico e tropânico (Dräger, 2003). Os alcalóides nortropânicos diferem dos tropânicos pela ausência do grupamento N-metila (Asano, 2000), e seu principal representante, por abundância e disponibilidade, são as calisteginas. As calisteginas ocorrem em vegetais tais como batata, tomates berinjela e repolho (Richter, Sonnewald, & Dräger, 2007) e possuem atividade inibitória sobre as enzimas  $\beta$ -glicosidase,  $\alpha$ - e  $\beta$ -galactosidase, manosidase e  $\beta$ -xilosidase, pois estas apresentam estrutura semelhante à de carboidratos (Asano et al., 1997, Yoon & Robyt, 2003). Na cultura de tubérculos a biossíntese das calisteginas pode ser reforçada pela presença de açúcares solúveis, sendo a sacarose a mais eficaz (Rothe, Garske & Dräger, 2001, Grit Rothe & Dra, 2002). No metabolismo do amido e da sacarose estão envolvidas mais de 30 enzimas da família glicosidade hidrolase (EC 3.2.1-Keeg ) além da enzima  $\alpha$ -glicosidase (EC 3.2.1.10) e a própria enzima  $\beta$ -glicosidase (EC 3.2.1.21). No entanto, a relação da biossíntese das calisteginas em plantas com as propriedades do amido não foi claramente elucidado até hoje.

Partindo deste contexto, objetivo-se com esse estudo, verificar o efeito da modificação genética para silenciamento do gene *tropinona redutase 2 (tr2)*, responsável pela síntese de calisteginas, em batata silvestre (*Solanum commersonii*) sobre as propriedades de pasta, morfológicas, térmicas e cristalinidade do amido.

## **3.2 Materiais e Métodos**

### **3.2.1 Material**

Foram utilizados tubérculos provenientes de diferentes linhagem de plantas de batata silvestre (*Solanum commersonii* ssp. *malmeanum* Bitt.), geneticamente modificadas, conforme descrito por Barbosa (2009), com alta ou baixa expressão do gene *tr2* (Quadro 1.0).

Quadro 1.0 Classificação quanto à expressão do gene *tr2* de linhagens de batata silvestre (*Solanum commersonii* ssp. *malmeanum* Bitt) geneticamente modificadas.

<b>Expressão do gene <i>tr2</i></b>	
<b>Alta</b>	<b>Baixa</b>
L6	L2
L49	L21
L57	L42

Tubérculos de plantas não transformadas geneticamente, de batata silvestre (*S. Commersonii* ssp. *malmeanum* Bitt.) e de batata cultivada (*S. tuberosum*), foram empregadas como controle experimental. Os tubérculos foram produzidos em casa de vegetação conforme normas da CTNBIO para produtos transgênicos.

### **3.2.2 Métodos**

#### **3.2.2.1 Extração do amido**

A extração de amido foi realizada conforme método descrito por Liu, Weber, Currie, & Yada, 2003. Amostras de batatas foram descascadas e embebidas em solução 0,16% de bissulfito de sódio (NaHSO<sub>3</sub>) na razão 1:7 (p/v) por 2 horas. Após as batatas foram moídas em liquidificador por 5 minutos e o material resultante foi passado por peneira de 63 µm, repetindo a lavagem do material retido 3 vezes. O sobrenadante foi removido e a camada de amido decantada foi coletada e seca em estufa a 40 °C por 12 h.

#### **3.2.2.2 Poder de inchamento, solubilidade e claridade de pasta**

O poder de inchamento e a solubilidade dos amidos foram determinados conforme descrito por Leach, Mcwen, Schoch, (1959). Amostras de 1,0 g foram misturadas com 50 mL de água destilada em tubos de centrífuga. As

suspensões foram aquecidas a 90 °C por 30 min. As amostras aquecidas foram resfriadas à temperatura ambiente e centrifugadas a 1000 rpm por 20 min. O sobrenadante foi seco a 110 °C até peso constante para quantificar a fração solúvel. Assim, a solubilidade foi calculada pela relação da massa solúvel e a massa inicial de amido, expressa em porcentagem, enquanto o poder de inchamento foi obtido pela relação da massa final intumescida pela massa inicial de amido, sendo descontada a quantidade de amido solúvel.

A claridade de pasta foi determinada como descrito por Craig et al. (1989), utilizando suspensões de amido a 1 % (m/v) em água deionizada. A suspensão foi gelatinizada e mantida durante 30 minutos em banho com água a 90 °C e agitação de 30 s a cada 5 min. Após a solução foi agitada e resfriada à temperatura ambiente e a absorbância determinada a 650 nm, utilizando espectrofotômetro FEMTO, modelo 432.

### 3.2.2.3 Difração de Raios-X

Difratogramas de raios-X dos amidos foram obtidos com um difratômetro de raios-X (XRD-6000, Shimadzu, Brasil) em que a região de varredura da difração variou de 3° a 45°, com uma tensão alvo de 30 kV, uma corrente de 30 mA e velocidade de varredura de 1°/min. A cristalinidade relativa (CR) dos grânulos de amido foi calculada como descrito por Rabek (1980), seguindo a equação:

$$CR (\%) = (Ac / (Ac + Aa)) * 100,$$

Onde: CR: cristalinidade relativa

Ac: área cristalina

AA: área amorfa.

### 3.2.2.4 Calorimetria diferencial de varredura (DSC)

As características de gelatinização do amido de batata foram determinadas através de calorímetro diferencial de varredura (TA-60WS, Shimadzu, Kyoto, Japão). As amostras de amido seco (cerca de 2,5 mg) foram

pesadas diretamente em panela de alumínio (Mettler, ME-27.331) e adicionadas de água destilada (1:3) para obter uma suspensão. As panelas hermeticamente seladas com as amostras foram deixadas em repouso durante uma hora antes da análise. Uma panela vazia foi utilizada como referência. As panelas da amostra foram aquecidas, de 10°C a 120°C, à taxa de 10°C por minuto. A temperatura inicial de gelatinização ( $T_0$ ), a temperatura de pico ( $T_p$ ), a temperatura final ou de conclusão ( $T_c$ ) e a entalpia de gelatinização ( $\Delta H$ ) foram determinadas. A diferença entre a  $T_c$  e  $T_0$  foi calculada manualmente.

### **3.2.2.5 Viscoamilografia**

As propriedades de pasta das amostras de amido foram determinadas utilizando um Analisador Rápido de Viscosidade (RVA-4; Newport Scientific, Austrália) com o software Thermocline (Windows version 1.10) de acordo com o manual do equipamento (Newport Scientific). A viscosidade foi expressa em unidades viscoamilográficas (RVU). O amido (2.0 g corrigido para 14 % de umidade) foi pesado diretamente no canister RVA-4 e adicionado de 25 mL de água destilada. A amostra foi aquecida até 50 °C por 1 min, depois aquecida até 95 °C em 3,5 min, e o aquecimento foi mantido a 95 °C por 2,5 min. Então a amostra foi resfriada até 50 °C em 4 min e esta temperatura foi mantida por 2 min. A rotação foi de 960 rpm por 10 s e depois mantida por 160 rpm durante a análise. Os parâmetros avaliados foram viscosidade de pico, viscosidade mínima, quebra, viscosidade final e tendência a retrogradação.

### **3.2.2.6 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FT-IV)**

Os espectros de infravermelho das amostras de amidos *S. commersonii* e *S. tuberosum* foram obtidos em espectrofotômetro com transformada de Fourier (IR Prestige - 21; Shimadzu) na região de 4000-400  $\text{cm}^{-1}$ . Foram preparadas pastilhas a partir da mistura das amostras com KBr em uma proporção de 1:100 (amostra:KBr). Foram recolhidas dez leituras a uma resolução de 4  $\text{cm}^{-1}$ .

### **3.2.2.7 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)**

A morfologia dos grânulos de amidos foi analisada através de microscópio eletrônico de varredura, modelo DSM 940 A, no Laboratório de Microscopia Eletrônica da Embrapa Clima Temperado (Pelotas/RS).

As amostras de amido foram inicialmente suspensas em etanol a 1 % (m/v). Uma pequena quantidade de cada amostra foi espalhada diretamente sobre a superfície do porta-amostra (*stub*) e secadas em estufa a 2 °C por 24 h. Posteriormente, em todas as amostras foi feita a aplicação da camada de ouro, utilizando um metalizador a vácuo (EMITECH K550). As amostras foram observadas no microscópio eletrônico de varredura sob voltagem de aceleração de 10 KV, distância de trabalho de 31 mm e ampliação de 2000 vezes.

### **3.2.2.8 Análise estatística**

Empregou-se delineamento experimental completamente casualizado, com três repetições por tratamento. As determinações analíticas foram realizadas em triplicatas e o desvio padrão foi calculado utilizando a análise de variância (ANOVA) com posterior comparação das médias com o teste de Tukey a 5% de significância.

## **3.3. Resultados e Discussão**

### **3.3.1 Poder de inchamento, solubilidade e claridade de pasta**

Na Tabela 1 são apresentados os resultados para o poder de inchamento, a solubilidade e a claridade de pasta dos amidos de diferentes linhagens de batata silvestre (*Solanum commersonii* ssp. *malmeanum* Bitt.), com baixa e alta expressão do gene *tr2*, e de amidos de *S. commersonii* ssp. *malmeanum* (Sc) e de *S. tuberosum* (St), não transformados geneticamente.

Tabela 1. Poder de inchamento, solubilidade em água e claridade de pasta, a 90 °C, de amidos de tubérculos de diferentes linhagens (L) de batata silvestre (*Solanum commersonii* ssp. *malmeanum* Bitt.), com baixa e alta expressão do gene *tr2*, e de amidos de *S. commersonii* ssp. *malmeanum* (Sc) e de *S. tuberosum* (St), não transformados geneticamente.

Amostras	Poder de inchamento (g/g)	Solubilidade (%)	Claridade de pasta (Abs)
St	12,98 <sup>c</sup>	4,17 <sup>a</sup>	0,66 <sup>a</sup>
Sc	13,49 <sup>b</sup>	3,98 <sup>a</sup>	0,64 <sup>a</sup>
<b>Baixa expressão</b>			
L2	13,96 <sup>b</sup>	4,39 <sup>a</sup>	0,67 <sup>a</sup>
L21	14,26 <sup>b</sup>	3,82 <sup>abc</sup>	0,67 <sup>a</sup>
L42	11,40 <sup>bc</sup>	3,82 <sup>abc</sup>	0,69 <sup>a</sup>
<b>Alta expressão</b>			
L6	18,83 <sup>a</sup>	3,27 <sup>c</sup>	0,68 <sup>a</sup>
L49	18,25 <sup>a</sup>	3,76 <sup>bc</sup>	0,66 <sup>a</sup>
L57	20,26 <sup>a</sup>	3,03 <sup>c</sup>	0,65 <sup>a</sup>

\* Médias de uma mesma coluna, seguidas por letras distintas, diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

As amostras de *S. commersonii* apresentaram poder de inchamento superior às de *S. tuberosum*. Dentre as linhagens estudadas o poder de inchamento variou de 11,40 a 20,26 g/g; sendo que as linhagens de alta expressão demonstraram poder superior ao da amostra testemunha (13,49 g/g). Não houve diferenças significativas entre as linhagens de um mesmo grupo (baixa e alta expressão). Os resultados encontrados para poder de inchamento em *S. tuberosum* estão de acordo com Peroni (2003) que obteve poder de inchamento 12,92 g/g ao estudar as características estruturais e de pasta de amidos de diferentes fontes botânicas. O incremento no poder de inchamento do amido pode estar associado à presença de cadeias ramificadas muito mais longas de amilopectina; assim como também pode estar associado a um elevado teor de grupos fosfatos nessas cadeias ramificadas (Cereda, 2001).

Houve diferença na solubilidade do amido entre as linhagens de alta expressão, cujos valores variaram de 3,03 a 4,39%, sendo significativamente menores que a solubilidade da amostra não transformada (1,98%).

As pastas de amido formadas apresentaram coloração branca clara, não diferindo significativamente quanto aos valores de absorvância encontrados

dentre as linhagens, nem mesmo com relação ao *S. commersonii* não transformado. Os resultados obtidos estão de acordo com Aplevicz, (2006), que afirma que as pastas obtidas a partir de amidos de tubérculos, como batatas, e raízes apresentam colorações mais claras em comparação com amidos de cereais, como milho ou trigo.

A claridade das pastas formadas pode ser explicada pelo possível baixo teor de amilose das amostras estudadas. Karam (2003), em estudo feito com amido de mandioca e inhame, mostrou que a claridade da pasta de amido poderia ser associada não só com o baixo teor de amilose, mas também com seu menor comprimento molecular o que facilitaria o alinhamento dessas cadeias lineares. Segundo Alexander (2005), o amido de batata é de sabor suave, não apresentando o sabor e aroma característicos dos amidos de cereais, provavelmente devido ao baixo teor de proteínas residuais, em geral, abaixo de 0,1 %. Assim, esse amido não interfere no sabor e aroma dos alimentos em que é usado. O baixo teor de proteínas também é parcialmente responsável pela alta transparência dos seus amidos nativos e modificados. A cor clara, nesse caso, aparece também na pasta cozida, a qual é extremamente transparente.

### 3.3.2 Difratomia de raio X

A Fig. 14 apresenta o difratograma de raio-X obtido para os amidos de tubérculos de *S. tuberosum* e *S. commersonii*. Os amidos estudados apresentaram o padrão de difração de raio-X tipo B, que é justamente o característico de tubérculos. Em todas as amostras estudadas o padrão B foi evidenciado pela presença de picos intensos nos ângulos de difração 5,6, 15, 17, 22 e 23 Å; porém além dos picos característicos desse padrão, foram observados picos fortes também nos ângulos 19 e 28,4 Å. Resultados similares foram obtidos por Mendes e Curvelo (2009) os quais reportaram picos nos ângulos de difração 5,6°, 12,9°, 17,2°, 19,7° e 21,5° ao avaliar amido de batata submetido ao processo de plasticização com glicerol.

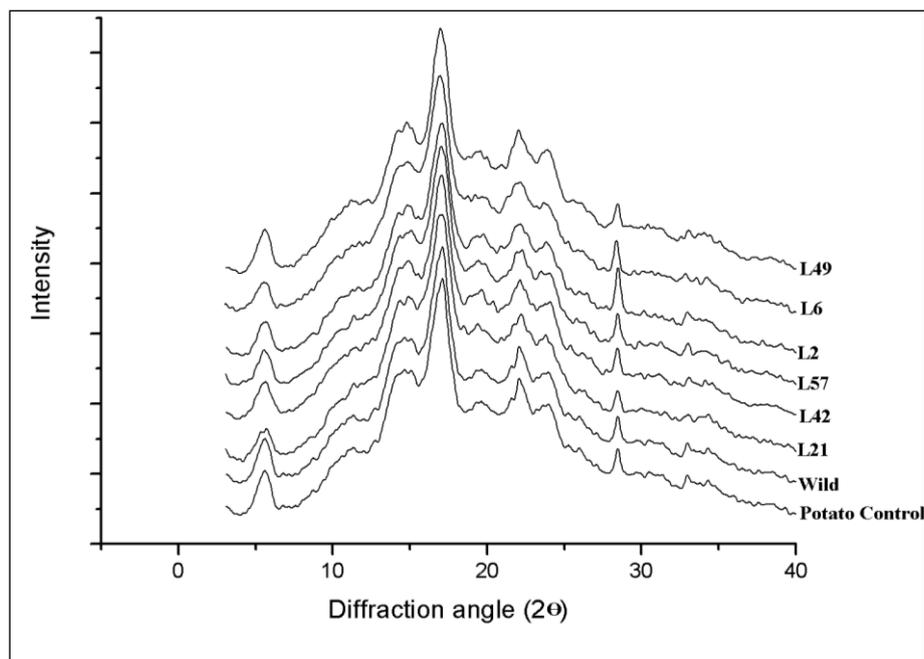


Fig.14. Padrões de difração de raio-X de amidos de tubérculos de diferentes linhagens (L) de batata silvestre (*Solanum commersonii* ssp. *malmeanum* Bitt.), com baixa (L2, L21 e L42) e alta (L6, L49 e L57) expressão do gene *tr2*, e de amidos de *S. commersonii* ssp. *malmeanum* (Sc, *Wild*) e de *S. tuberosum* (St, *Potato control*), não transformados geneticamente.

Através da Tabela 2 é possível verificar a intensidade dos picos de difração de raio-X e cristalinidade relativa (CR) de amidos de tubérculos de diferentes linhagens de batata silvestre *S. commersonii* (Sc) com baixa e alta expressão do gene *tr2*, e de *S. tuberosum* (St), não transformados geneticamente.

A cristalinidade relativa encontrada do amido de tubérculo de *S. tuberosum* (St) foi 15,46 % e de *S. commersonii* (Sc) foi de 14,77 %; já nas linhagens de baixa expressão oscilou entre 12,61 % a 15,35 % e de alta expressão entre 13,57 % e 14,32 %. Os resultados obtidos são inferiores aos obtidos por Gomand et al. (2010) que estudaram as propriedades estruturais e de gelatinização de amido de batatas silvestres e obtiveram valores entre 30,0 e 36,0 %; porém são similares aos descritos por Mendes e Curvelo (2009), que encontraram cristalinidade de 16,7 % ao caracterizar amido de batata para posterior processo de plasticização.

Tabela 2. Intensidade dos picos de difração de raio-X e cristalinidade relativa (CR) de amidos de tubérculos de diferentes linhagens (L) de batata silvestre (*Solanum commersonii* ssp. *malmeanum* Bitt.), com baixa e alta expressão do gene *tr2*, e de amidos de *S. commersonii* ssp. *malmeanum* (Sc) e de *S. tuberosum* (St), não transformados geneticamente.

Linhagens e Controles	Intensidade dos picos (CPS)							CR %
	5,6	15	17	19	22	23	28,4	
St	811	1531	2173	1303	1469	1280	970	15,46
Sc	790	1454	2197	1315	1455	1289	1010	14,77
<b>Baixa expressão</b>								
L21	691	1554	2169	1310	1404	1261	1114	13,87
L42	687	1638	2215	1440	1508	1361	1006	12,61
L57	824	1586	2254	1372	1528	1388	991	15,35
<b>Alta expressão</b>								
L2	723	1561	2140	1348	1423	1300	961	13,57
L6	739	1600	2195	1384	1449	1300	983	14,32
L49	743	1609	2212	1401	1472	1300	1000	13,67

A diferença na cristalinidade entre as amostras não pode ser atribuída à diferença no tamanho das zonas cristalinas, uma vez que a intensidade dos picos de refração foi muito semelhante entre as mesmas, porém pode ser devido a maior interação entre as duplas-hélices ou maior comprimento e ordenação das cadeias de amilopectina dentro dos grânulos. Já a diferença de cristalinidade relativa verificada na Tabela 3, em comparação a outros estudos com amido de batata, pode ocorrer em virtude do teor de água dos amidos analisados e do ângulo de varredura empregado na análise.

### 3.3.3 Calorimetria diferencial de varredura (DSC)

Os resultados obtidos para as propriedades de gelatinização, determinados através de calorímetro diferencial de varredura, são apresentados na Tabela 3 e nas Fig. 15 e 16.

Tabela 3. Temperatura inicial ( $T_0$ ), temperatura de pico ( $T_p$ ), Temperatura de conclusão ( $T_c$ ), diferença de temperatura ( $\Delta T$ ) e entalpia ( $\Delta H$ ) de amidos de tubérculos de diferentes linhagens (L) de batata silvestre (*Solanum commersonii* ssp. *malmeanum* Bitt.), com baixa e alta expressão do gene *tr2*, e de amidos de *S. commersonii* ssp. *malmeanum* (Sc) e de *S. tuberosum* (St), não transformados geneticamente.

<b>Linhagens</b>	<b><math>T_0</math> (°C)</b>	<b><math>T_p</math> (°C)</b>	<b><math>T_c</math> (°C)</b>	<b><math>\Delta T</math> (°C)</b>	<b><math>\Delta H</math> (J/g)</b>
St	64,69	68,45	74,43	9,74	7,81
Sc	68,71	73,14	78,44	9,73	8,91
<b>Baixa expressão</b>					
L2	63,76	67,98	75,38	11,62	14,23
L21	69,49	73,79	79,33	9,96	13,01
L42	63,73	68,31	74,91	11,18	12,69
<b>Alta expressão</b>					
L6	72,28	75,65	80,69	8,41	12,78
L49	63,53	74,23	80,57	17,04	17,81
L57	70,20	73,53	78,37	8,17	15,80

Através dos resultados obtidos é possível constatar que as linhagens transformadas apresentaram propriedades de gelatinização diferentes das amostras não transformadas; assim como é possível observar diferença no comportamento entre as amostras cultivadas e silvestres.

As amostras de *S. commersonii* não transformadas tiveram comportamento atípico, apresentando picos duplos de gelatinização. Esta observação surpreendente de dois picos (transição bifásica) na gelatinização endotérmica não ocorreu com as linhagens transformadas com alta expressão. O segundo pico apareceu como um ombro à direita do pico principal e pode indicar a presença de duas regiões cristalinas com estabilidades térmicas diferentes. Jiranuntakul, et al. (2011), encontraram comportamento similar em amidos de arroz com baixo conteúdo de amilose e também em amidos de diferentes fontes com baixo conteúdo de amilose após um tratamento térmico de baixa umidade. Pinto et al. (2012), também verificaram a presença de uma transição bifásica em amido de pinhão modificados com tratamento térmico de baixa umidade e concluíram que este comportamento se refere a diferente estabilidade térmica dos grânulos de amido.

Houve variação na temperatura inicial de gelatinização ( $T_0$ ) tanto entre as linhagens de baixa como de alta expressão, bem como quando comparadas às amostras não transformadas. A diferença verificada no  $\Delta T$  sugere que o

grau de heterogeneidade dos cristalitos nos grânulos dos amidos de batatas são diferentes. A maior  $\Delta T$  foi verificada na linhagem 49, com alta expressão (Tabela 3), sendo que as demais amostras variaram entre 8,17 °C e 8,41 °C.

A  $T_0$ ,  $T_p$ ,  $T_c$  e  $\Delta T$ , são influenciadas pela organização molecular das ramificações da amilopectina (região cristalina). Em relação à  $\Delta H$ , Varatharajan et al. (2011) sugeriram que pode refletir a fusão das duplas hélices, a cristalinidade global, quantidade e tamanho dos cristalitos da amilopectina, e a fusão dos cristais imperfeitos da amilopectina com a contribuição potencial de ambos no empacotamento e fusão das duplas hélices.

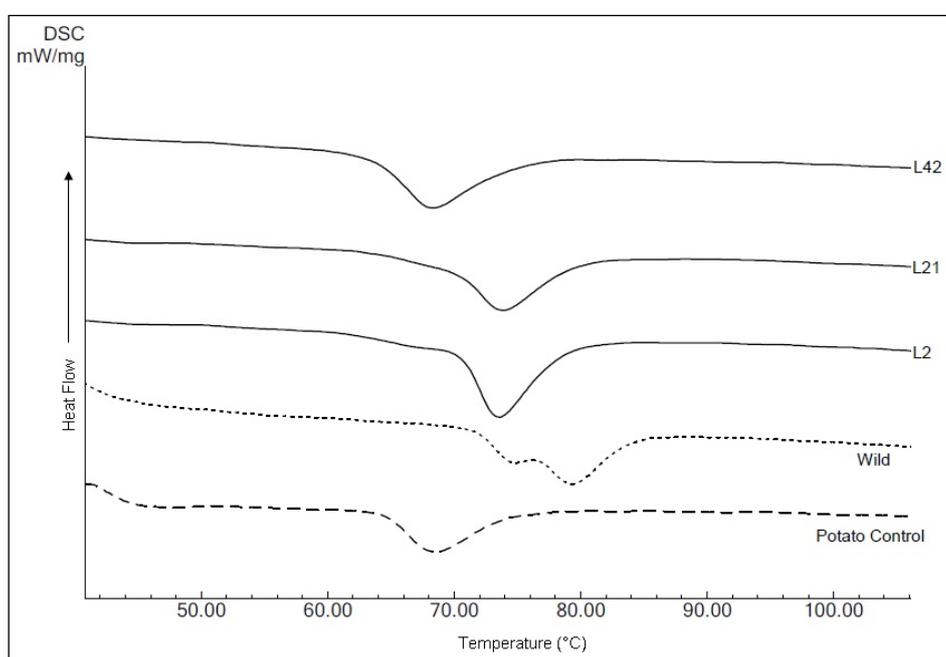


Fig. 15. Curvas de DSC de amidos de tubérculos de diferentes linhagens (L) de batata silvestre (*Solanum commersonii* ssp. *malmeanum* Bitt.), com baixa expressão do gene *tr2*, e de amidos de *S. commersonii* ssp. *malmeanum* (Sc, *Wild*) e de *S. tuberosum* (St, *Potato control*), não transformados geneticamente.

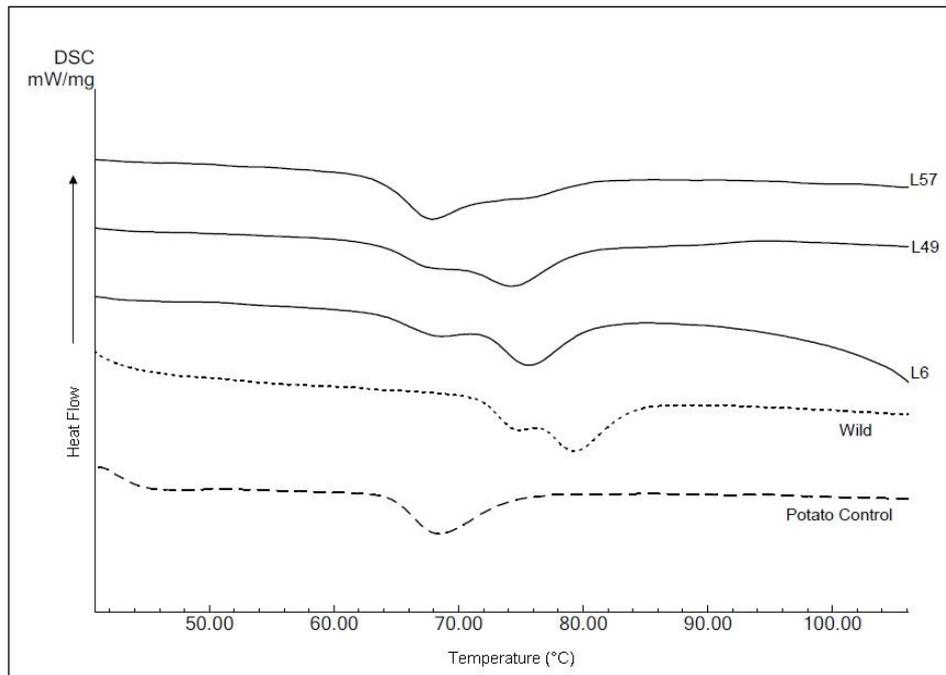


Fig. 16 Curvas de DSC de amidos de tubérculos de diferentes linhagens (L) de batata silvestre (*Solanum commersonii* ssp. *malmeanum* Bitt.), com alta expressão do gene *tr2*, e de amidos de *S. commersonii* ssp. *malmeanum* (Sc, *Wild*) e de *S. tuberosum* (St, *Potato control*), não transformados geneticamente.

Os amidos das linhagens transformadas e não transformada de *S. commersonii* (Sc) apresentaram comportamento claramente diferenciado do amido de batata cultivada, *S. tuberosum* (St), principalmente com relação à entalpia de gelatinização ( $\Delta H$ ). As entalpias de gelatinização variaram de 12,69 J/g a 14,23 J/g e entre 12,78 J/g e 17,81 J/g, entre as linhagens de baixa e alta expressão, respectivamente; valores superiores aos encontrados para os amido de Sc (8,91 J/g) e St (7,81 J/g). Resultados similares foram encontrados por Wischmann et.al. (2007) ao avaliarem os efeitos de diferentes escalas de extração de amido de batata sobre as suas propriedades e encontrou  $\Delta H$  de 15,14 J/g a 16,90 J/g. Já Gomand et al (2010) detectaram entalpias de 21,7 J/g a 23,21 J/g em amidos de batatas silvestres; sendo estes valores superiores aos encontrados nesses estudo.

Com os resultados obtidos, pode-se elucidar que as amostras que obtiveram maiores temperaturas de transição de gelatinização ( $T_0$ ,  $T_p$ ,  $T_c$ ) e entalpia de gelatinização ( $\Delta H$ ) correspondem às linhagens de amidos com maior organização das suas regiões cristalinas. De acordo com Hoover et al.

(2010), as temperaturas de transição e a entalpia de gelatinização são influenciadas pela arquitetura molecular da região cristalina, que corresponde a distribuição das cadeias curtas de amilopectina e não pela proporção da região cristalina, a qual corresponde a proporção de amilose e amilopectina.

As altas temperaturas de transição têm sido relatadas como resultados do grau de cristalinidade, que fornece estabilidade estrutural aos grânulos e maior resistência à gelatinização. Assim, a presença de amilose abaixa o ponto de fusão das regiões cristalinas e a energia para iniciar a gelatinização, pois as longas cadeias de amilopectina requerem maior temperatura para se dissociar completamente do que aquela requerida para cadeias mais curtas das duplas hélices. Essa correlação indica que o amido com baixo conteúdo de amilose tem menor região amorfa e logo, maior temperatura de gelatinização (Cereda, 2001).

### **3.3.4 Viscoamilografia (RVA)**

Os amidos de tubérculos de *S.tuberosum* e *S.commersonni* transgênicos e convencional foram avaliados quanto ao pico de viscosidade, a viscosidade mínima, a quebra, a viscosidade final e a tendência a retrogradação. Os perfis de pasta verificados estão representados nas Figuras 17 e 18 e os valores verificados para cada parâmetro estão apresentados na Tabela 4.

A alteração genética que os tubérculos foram submetidos promoveu alterações intensas nos amidos estudados, modificando os seus perfis de pasta. As propriedades de pasta são observadas pelas mudanças na viscosidade durante o aquecimento e resfriamento de uma suspensão de amido.

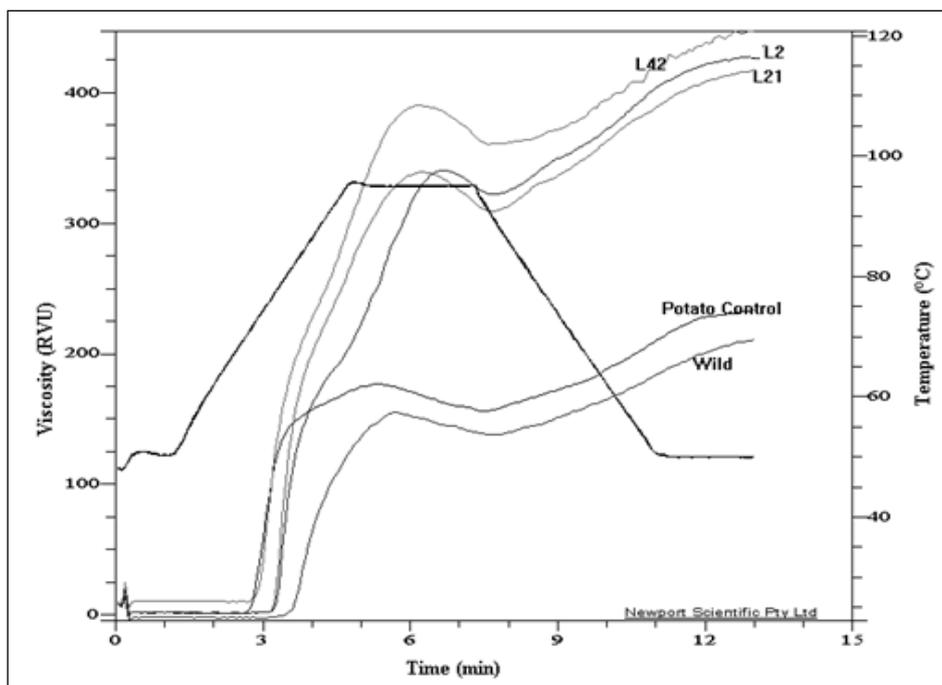


Fig. 17. Perfil viscoamilográfico de amidos de tubérculos de diferentes linhagens (L) de batata silvestre (*Solanum commersonii* ssp. *malmeanum* Bitt.), com baixa expressão do gene *tr2*, e de amidos de *S. commersonii* ssp. *malmeanum* (Sc, *Wild*) e de *S. tuberosum* (St, *Potato control*), não transformados geneticamente.

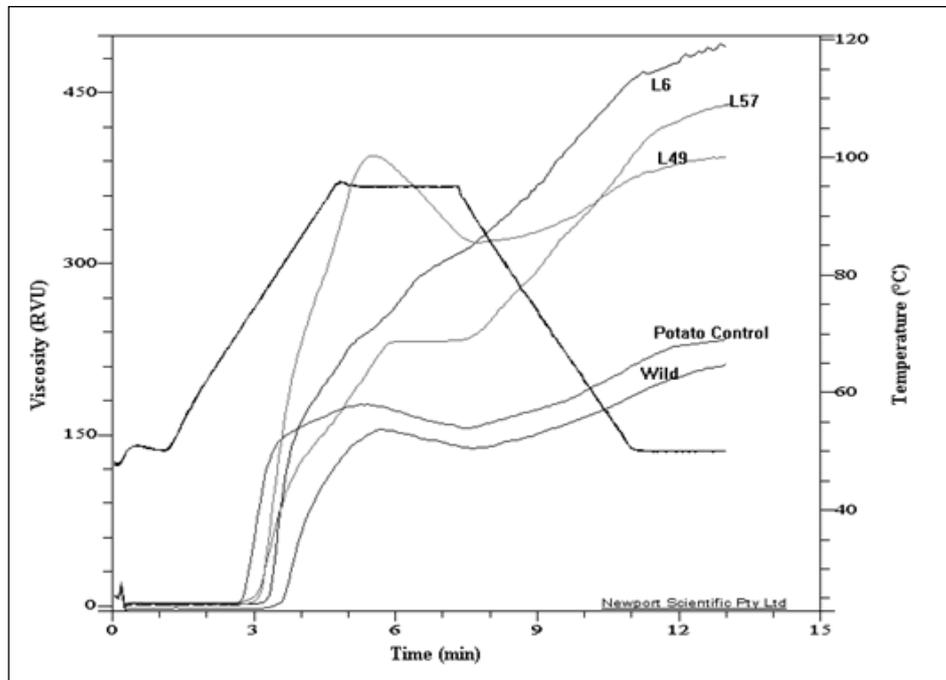


Fig. 18. Perfil viscoamilográfico de amidos de tubérculos de diferentes linhagens (L) de batata silvestre (*Solanum commersonii* ssp. *malmeanum* Bitt.), com alta expressão do gene *tr2*, e de amidos de *S. commersonii* ssp. *malmeanum* (Sc, *Wild*) e de *S. tuberosum* (St, *Potato control*), não transformados geneticamente.

Os amidos de *S. commersonii* transgênicos apresentaram comportamento diferente do amido de *S. tuberosum* (St) e do amido *S. commersonii* (Sc) não transgênico (Figuras 17 e 18). As características dos amidos, como a proporção de amilose e amilopectina, suas estruturas moleculares (comprimento das ramificações da amilopectina), além do número de pontes de hidrogênio entre as cadeias podem diferenciar os amidos de diferentes espécies e cultivares (Kitahara e Copeland, 2004). O pico de viscosidade, a viscosidade mínima, a viscosidade final do cultivar *S. commersonii* (Sc) foram menores que os verificados para a *S. tuberosum* (St).

Tabela 4. Propriedades de pasta de amidos de tubérculos de diferentes linhagens (L) de batata silvestre (*Solanum commersonii* ssp. *malmeanum* Bitt.), com baixa e alta expressão do gene *tr2*, e de amidos de *S. commersonii* ssp. *malmeanum* (Sc, Wild) e de *S. tuberosum* (St, Potato control), não transformados geneticamente.

.Linhagens	Pico de viscosidade (RVU)	Viscosidade mínima (RVU)	Quebra (RVU)	Viscosidade final (RVU)	Tendência a retrogradação (RVU)
St	178,16 <sup>e</sup>	153,33 <sup>h</sup>	24,83 <sup>abc</sup>	232,49 <sup>e</sup>	78,83 <sup>e</sup>
Sc	157,92 <sup>f</sup>	137,80 <sup>i</sup>	15,67 <sup>cde</sup>	210,49 <sup>f</sup>	72,62 <sup>e</sup>
<b>Baixa expressão</b>					
L21	343,75 <sup>b</sup>	311,04 <sup>c</sup>	32,70 <sup>a</sup>	419,80 <sup>c</sup>	108,04 <sup>d</sup>
L42	395,37 <sup>a</sup>	359,83 <sup>a</sup>	35,54 <sup>a</sup>	441,37 <sup>b</sup>	81,54 <sup>e</sup>
L2	237,33 <sup>d</sup>	229,45 <sup>e</sup>	11,95 <sup>ef</sup>	433,79 <sup>b</sup>	213,87 <sup>f</sup>
<b>Alta expressão</b>					
L57	344,16 <sup>b</sup>	323,79 <sup>b</sup>	20,37 <sup>bcd</sup>	443,33 <sup>b</sup>	110,87 <sup>d</sup>
L6	293,33 <sup>c</sup>	263,12 <sup>d</sup>	30,21 <sup>ab</sup>	492,46 <sup>a</sup>	229,33 <sup>a</sup>
L49	166,46 <sup>ef</sup>	162,75 <sup>f</sup>	3,71 <sup>f</sup>	297,83 <sup>d</sup>	135,08 <sup>c</sup>

\* Os resultados são as médias de três determinações. Letras minúsculas diferentes, na mesma coluna para cada propriedade diferem estatisticamente ( $p < 0,05$ ), entre as linhagens.

\*\* RVU: Unidade viscoamilográfica

Foram verificados valores superiores nos picos de viscosidade entre as linhagens de baixa expressão em relação ao encontrado para *S. commersonii* (Sc) não transformada (157,92 RVU) e também as linhagens de alta expressão apresentaram valores mais elevados que os controles (Tabela 4). As linhagens L6 e L57 apresentaram elevada tendência a retrogradação, 229,33 e 110,87 RVU, respectivamente. Os valores elevados de retrogradação indicam que o amido apresenta conteúdo de amilose de médio a alto (Silva, et al., 2008). Os amidos com elevada viscosidade final e tendência à retrogradação são indicados para a elaboração de macarrão (Cham e Suwannaporn, 2010). A

viscosidade mínima dos amidos de batata *S. commersonii* (Sc) foram menores do que os valores verificados para *S. tuberosum* (St). A viscosidade mínima e a quebra indicam a estabilidade da pasta ao aquecimento e cisalhamento (Cereda, 2001). Os amidos das cultivares *S. commersonii* (Sc) e *S. tuberosum* (St) não apresentaram diferenças entre si quanto à viscosidade mínima, quebra e tendência a retrogradação.

A viscosidade final e a retrogradação dos amidos das linhagens transformadas aumentaram significativamente, em relação aos controles de *S. commersonii* e *S. tuberosum*. No entanto, dentre as linhagens de alta e baixa expressão não foi verificado um padrão ou tendência, sendo que a amostra L6 apresentou os valores de viscosidade final e tendência a retrogradação mais elevados.

SwiVdrych, Stachowiak e Szopa (2004) avaliaram em batata a influência da superexpressão das catecolaminas na mobilidade do amido. A partir de plantas transgênicas os autores avaliaram o conteúdo de açúcares redutores e da quantidade de amido e verificaram um reflexo esperado na correlação positiva entre catecolaminas e o conteúdo de açúcares redutores e negativa com o conteúdo de amido. Com isso concluíram que a atividade das enzimas-chave na via de biossíntese de amido (sucrose sintase e sintase de amido), não mostrou nenhuma alteração em relação às plantas controle, reforçando a conclusão que a mobilidade do amido nas plantas analisadas é estimulada.

### **3.3.5 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FT-IV)**

Através da Fig. 19 é possível visualizar os espectros de representação das estruturas químicas das moléculas de amidos de batatas silvestres (*S. commersonii*) transformadas e não transformadas de *S. tuberosum* não transformadas.

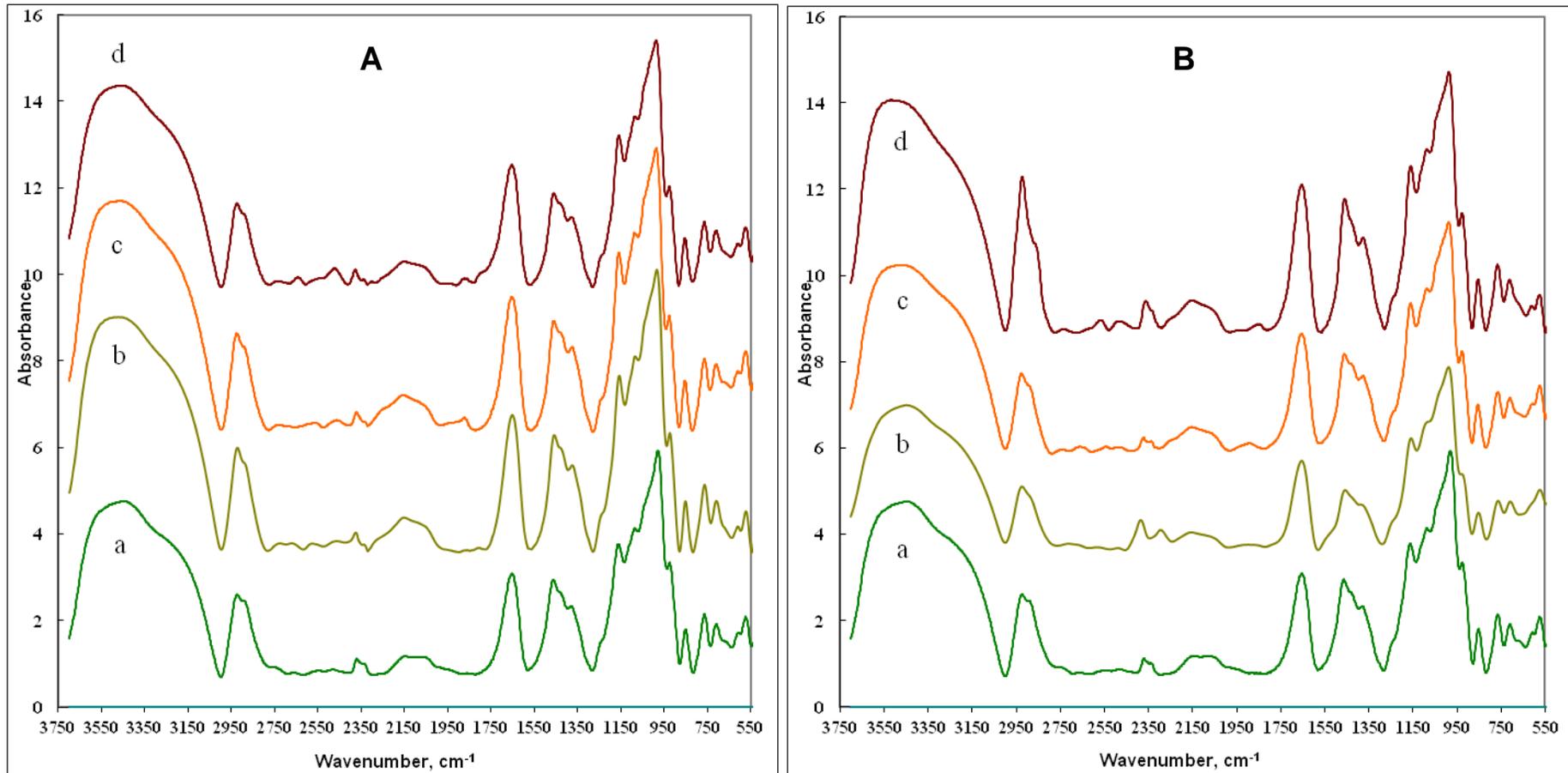


Fig. 19. Espectro de FT-IV de amidos de tubérculos de diferentes linhagens de batata silvestre (*Solanum commersonii* ssp. *malmeanum* Bitt.), com alta expressão (A) (b- L57, c-L6, d-L49) e baixa expressão (B) (b-L21, c-L42, d-L2) do gene *tr2*, e de amidos de *S. commersonii* ssp. *malmeanum* (Sc, Wild) não transformados geneticamente.

A espectroscopia no infravermelho, fornece evidências da presença de vários grupos funcionais na estrutura química das moléculas de amido, devido à interação dessas moléculas ou átomos com a radiação eletromagnética em um processo de vibração molecular. Como as demais técnicas espectroscópicas, ela pode ser usada para investigar a composição de uma amostra (Alves, 2013).

A Fig. 19 qualitativamente demonstra não haver diferença de grupamentos e elementos químicos entre as amostras de amidos estudadas. Todas as amostras tiveram os mesmos picos característicos, com destaque aos picos intensos nos comprimentos de onda em torno de  $1018\text{ cm}^{-1}$ ,  $1080\text{ cm}^{-1}$  e  $1157\text{ cm}^{-1}$ , atribuídos à vibração da ligação C-O. Também foram registrados picos em  $1641\text{ cm}^{-1}$ , resultantes da vibração dos grupos hidrofílicos hidroxilas (O-H) relativos à água fortemente ligada e em  $2960\text{ cm}^{-1}$ , derivados da vibração do estiramento C-H da molécula de anidroglicose .

### **3.3.6 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)**

O amido de batata apresenta formato oval e esférico, diâmetro médio de 27mm e em torno de  $60\text{ grânulos por grama de amido} \times 10^6$  (Cereda, 2001).

Na Fig.s 20 estão apresentadas as microfotografias dos grânulos de amidos de tubérculos de *S. tuberosum* e linhagens transformadas e não transformada de *S. commersonii*.

A transformação genética não alterou a morfologia dos grânulos de amido. Pelas micrografias apresentadas, nota-se que os grânulos de amido continuaram apresentando tamanhos irregulares e formatos esférico-ovais. Os microgramas obtidos neste estudo são semelhantes aos relatados por Mendes e Curvelo (2009), Suita e Campos (2009) e Park et.al. (2009). As linhagens 2 e 21 apresentaram resíduos aderidos as superfícies dos amidos, os quais podem ser proteínas não eliminadas pelo método de extração ou também resíduos de parede celular.

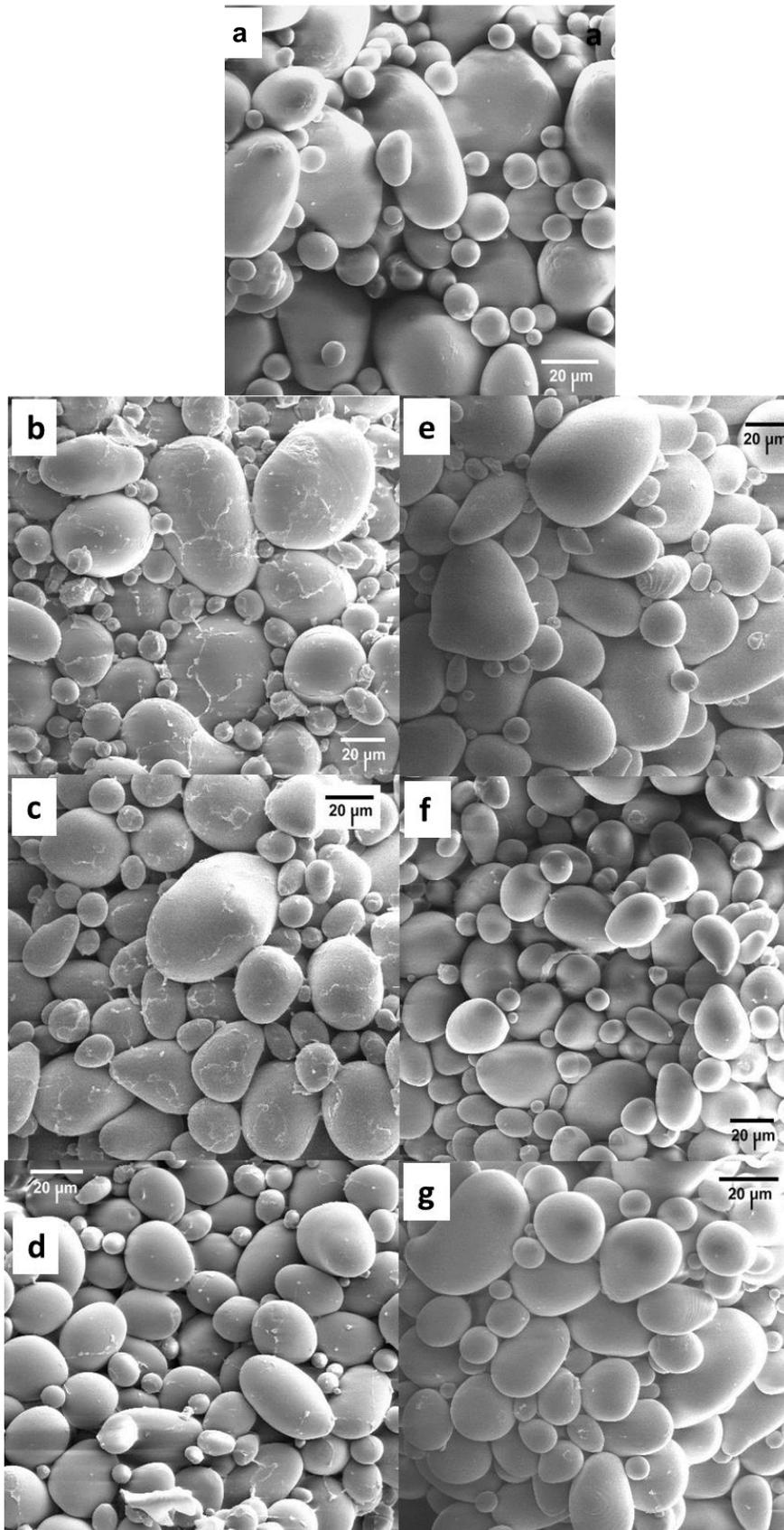


Fig. 20. Micrografias de grânulos de amido de batata silvestre (*S.commersonii*) (a); linhagens de SC com baixa expressão de *tr2*: L2 (b), L21 (c), L42 (d) e linhagens de SC com alta expressão de *tr2*: L6 (e), L49 (f), L57 (g).

### **3.4 Conclusão**

A transgenia em tubérculos de batata *S. commersonii* promoveram alterações no poder de inchamento e solubilidade, nas propriedades térmicas, propriedades de pasta e cristalinidade dos amidos extraídos dos tubérculos, no entanto não alterou a morfologia dos grânulos nem o padrão de difração de raio-X.

## 4. ESTUDO 2

### Efeitos da supressão do gene *tropinona redutase II* sobre o acúmulo de metabólitos secundários em batata silvestre (*Solanum commersonii*)

#### 4.1 Introdução

O gene *tropinona redutase II*, expressado em batatas, dentre outras solanáceas, controla a síntese de calisteginas, potentes e específicos inibidores de glicosidases. Muito embora a pertinência de inibidores de glicosidases seja inquestionável no metabolismo de carboidratos, especialmente em batatas que se caracterizam pelo substancial acúmulo de amido, bem como no metabolismo de animais ao consumirem os referidos inibidores, a função biológica do referido gene e as implicações da expressão do mesmo nas características químicas da batata permanecem desconhecidas.

Os genes biossintéticos já clonados, *tr1* e *tr2*, que controlam o ponto de ramificação da rota, para produção de tropina e pseudotropina, respectivamente, podem constituir excelentes alternativas para investigação da eficácia de diferentes estratégias transgênicas no redirecionamento do fluxo metabólico ou, até mesmo, na interrupção do mesmo (Barbosa, 2009). Neste contexto, no momento que se modifica o fluxo metabólico, seja por supressão ou superexpressão dos genes envolvidos, desencadeia-se, possivelmente, uma maior ou menor concentração de metabólitos secundários, como os próprios alcaloides (hiosciamina, escopolamina e calistegina), além de glicoalcalóides (solanina e chaconina), poliaminas (putrescina, espermina e esperimidina) e antocianinas.

Glicoalcalóides são compostos tóxicos naturalmente presentes em todas as partes da planta de batata (*Solanum tuberosum* L.) e podem estar envolvidas no mecanismo de defesa da planta contra ação de insetos e microrganismos (Ginzberg et. al., 2009). As concentrações mais elevadas destes compostos se encontram na casca dos tubérculos e em seus brotos (Machado e Toledo, 2004). Os principais glicoalcalóides presentes em batatas são  $\alpha$ -solanina e  $\alpha$ -chaconina, ambos sendo formas glicosiladas do alcalóide

esteroidal solanidina e estes correspondem a 95% ou mais dos glicoalcalóides totais (Friedman, 2006).

Os glicoalcalóides parecem ter duas ações tóxicas no organismo humano: uma sobre a acetilcolinesterase, afetando o sistema nervoso central, e outra sobre as membranas celulares, causando ruptura das membranas do trato-gastrointestinal com danos hemolíticos e hemorrágicos (Korpan et. al., 2004). Em geral, humanos parecem ser mais sensíveis à intoxicação por glicoalcalóides do que outros animais; sendo que a dose tóxica estimada para o homem é de 2 a  $5\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  de peso corpóreo (Friedman, 2006; Machado e Toledo, 2004).

Poliaminas, tais como putrescina, esperimidina e espermina, estão presentes em todos os organismos e são relacionadas a multiplicação e diferenciação celular. A putrescina, por exemplo, embora não exerça efeito tóxico direto, pode potencializar o efeito tóxico da histamina e da tiramina e também agir como precursor de nitrosamina (Groppa, 2008; Lima et. al., 2006).

Saunders e Wallace (2003) relatam que a privação de poliaminas em dietas alimentares pode ser benéfica para reduzir crescimento de tumores. Por outro lado, autores como Eliassen et. al., (2002) e Kalac (2005), afirmam a importância das poliaminas na dieta. A necessidade desses compostos é dependente do estado fisiológico dos indivíduos. As poliaminas são essenciais para jovens em crescimento e desenvolvimento, estando envolvidas na regulação da síntese de DNA, RNA e proteínas (Moinard et. al., 2005).

Já os alcalóides são compostos orgânicos de baixo peso molecular, normalmente de caráter básico, com pelo menos um átomo de nitrogênio. São encontrados em aproximadamente 20% das espécies de plantas e apresentam propriedades farmacêuticas, estimulantes, narcóticas e até mesmo tóxicas (Ziegler e Facchini, 2008). Os alcalóides podem ser divididos em quatro grupos: indólicos, benzilisoquinólicos, purínico e tropânico. Alcalóides tropânicos são aminas bicíclicas que combinam um anel de piperidina e um anel de pirrolidina. Ocorrem principalmente em plantas da família Solanaceae. Os alcalóides nortropânicos diferem dos tropânicos pela ausência do grupamento N-metila (Asano, 2000).

Um dos principais exemplos de alcalóides nortropânicos são as calisteginas. De acordo com Dräger (2003), calisteginas são potentes inibidores competitivos de glicosidases, sendo a calistegina B2 inibidora de  $\beta$ -glicosidases e  $\alpha$ -galactosidases e as B1e C1, inibidoras de  $\beta$ -glicosidases, mas não de  $\alpha$ -galactosidases. O nome desse composto deriva do seu descobrimento em raízes de *Calystegia sepium* (Dräger, 2003). Os membros conhecidos desta classe de alcalóides foram subdivididos em três grupos de acordo com o número de hidroxilas presentes em sua estrutura: calisteginas A (com três grupos hidroxila), B (com quatro grupos) e C (com cinco grupos) (Asano et al., 2001).

De acordo com Asano (2003), calisteginas agem como iminoaçúcares, nos quais o átomo de oxigênio endocíclico é substituído por um átomo de nitrogênio. A atividade inibitória de glicosidases destes alcalóides polihidroxilados se deve à semelhança estrutural destas moléculas com as unidades glicídicas dos substratos naturais das enzimas e à sua capacidade de mimetizar o estado de transição da reação de hidrólise da ligação glicosídica.

As calisteginas podem ser extraídas de tecidos vegetais com soluções concentradas de metanol, etanol ou até mesmo com água quente, uma vez que o calor é útil para inativação enzimática e coagulação e precipitação de proteínas. Em todos os protocolos descritos na literatura, a primeira etapa do processo de extração consiste na adsorção com uma resina fortemente catiônica. A identificação e quantificação são realizadas por análises instrumentais, onde pode ser empregada cromatografia gasosa, cromatografia líquida de alta eficiência ou eletroforese capilar (Aehle e Dräger, 2010). Já a determinação estrutural das calisteginas pode ser elucidada por espectrometria de massa ou por ressonância magnética nuclear (Dräger, 2003).

Baseado na característica das calisteginas de inibirem glicosidases, o acompanhamento dessa atividade inibitória, surge como uma análise qualitativa da sua presença, assim como pode fornecer um indicativo de sua proporção. Dessa forma, a adaptação de testes já padronizados com bactérias para estudo da ação hipoglicemiante de calisteginas representa um modelo simples, onde é possível avaliar com rapidez e reprodutibilidade, a capacidade

destes compostos de inibir glicosidases e, principalmente, as doses requeridas para o efeito hipoglicemiante (Barbosa, 2009). Ou seja, é possível ter uma previsão do teor de calistegina utilizando a estratégia de inibição de glicosidase, através do emprego de bactérias como bioindicadores.

Com esse trabalho objetivou-se avaliar os efeitos de uma estratégia de silenciamento gênico da enzima tropinona redutase II sobre o acúmulo dos metabólitos secundários e de açúcares redutores.

## 4.2 Materiais e Métodos

### 4.2.1 Material

Foram utilizados tubérculos provenientes de diferentes linhagens de plantas de batata silvestre (*Solanum commersonii* ssp. *malmeanum* Bitt.), geneticamente modificadas, conforme descrito por Barbosa (2009), com alta ou baixa expressão do gene *tropinona redutase 2* (*tr2*) (Tabela 5).

Tabela 5. Classificação quanto à expressão do gene *tr2* em linhagens de batata silvestre (*Solanum commersonii* ssp. *malmeanum* Bitt) geneticamente modificadas para supressão do gene tropinona redutase 2 (*tr2*).

Expressão do gene <i>tr2</i>	
Elevada	Reduzida
L6	L2
L49	L21
L57	L42

Tubérculos de plantas não transformadas geneticamente, de batata silvestre (*S. commersonii* ssp. *malmeanum* Bitt.) e de batata cultivada (*S. tuberosum*), foram empregadas como controle experimental. Os tubérculos foram produzidos em casa de vegetação, no campus Capão do Leão da Universidade Federal de Pelotas, conforme normas da CTNBIO para produtos transgênicos. Atraves da Fig. 21 é possível visualizar o acúmulo de transcritos

do gene *tropinona redutase 2* (*tr2*) e *espermidina sintase* (*spds*) em linhagens de batata silvestre (*Solanum commersonii*) geneticamente modificadas para supressão de *tr 2*.

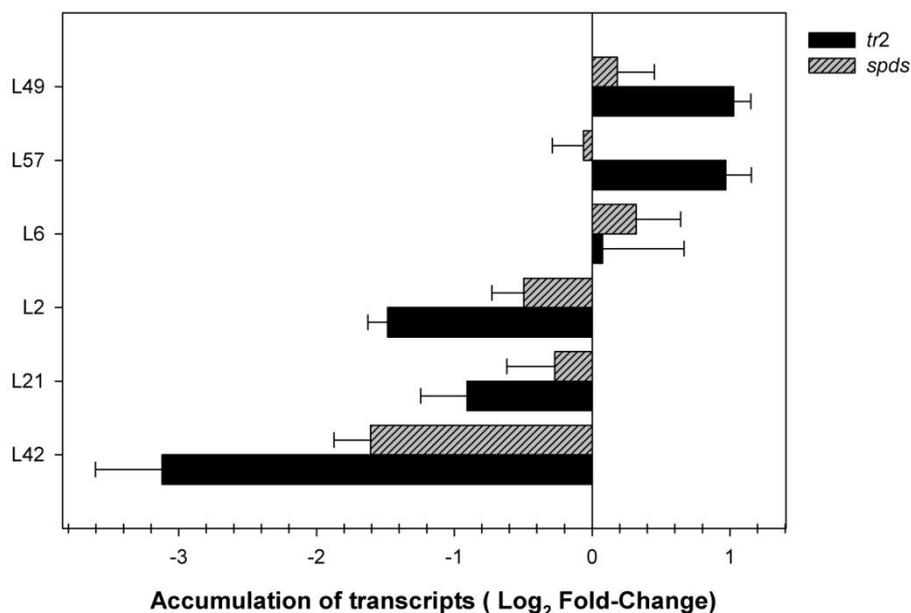


Fig. 21. Acúmulo de transcritos do gene *tropinona redutase 2* (*tr2*) e *espermidina sintase* (*spds*) em linhagens de batata silvestre (*Solanum commersonii*) geneticamente modificadas para supressão de *tr2*.

## 4.2.2 Métodos

### 4.2.2.1 Açúcares redutores

A determinação de açúcares redutores foi realizada através de método volumétrico, titulação com solução de Fehling, com resultados expressos em porcentagem de glicose (Instituto Adolfo Lutz, 1985).

### 4.2.2.2 Glicoalcalóides totais

A extração de glicoalcalóides foi realizada a partir de cortes longitudinais dos tubérculos com casca. As amostras foram trituradas e submetidas à determinação de glicoalcalóides com solução clorofórmio:metanol (2:1) (v/v). Realizou-se então uma extração líquido-líquido com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,8%, e a fase contendo água e glicoalcalóides totais foi colocada em banho-maria a 70°C até

evaporação completa. O extrato foi então ressuspendido em 10 mL de ácido acético 5 % e o pH foi elevado a 10 com  $\text{NH}_4\text{OH}$ . Após aquecimento a 70 °C por 30 min as amostras foram centrifugadas por 20 min a 9000 rpm. Secou-se então o precipitado a 70°C e redissolveu-se em 1 mL de  $\text{H}_3\text{PO}_4$  (0,5mol/L). Adicionou-se 10 mL de reagente de Clarke e após 30 min de repouso realizou-se a determinação colorimétrica dos glicoalcalóides totais através de leituras a 600 nm em espectrofotômetro. A curva de calibração foi realizada com o padrão  $\alpha$ -solanina nas concentrações de 50 mg/mL a 1000 mg/mL.

#### 4.2.2.3 Poliaminas

A determinação de poliaminas foi realizada no Departamento de Química e Bioquímica do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista (UNESP), campus Botucatu/SP, de acordo com o método proposto por Flores e Galston (1982) e por Lima et al. (1999).

Os tubérculos com casca, em duplicata, foram homogeneizados por um minuto, em ácido perclórico gelado a 5 % (v/v). Após centrifugação a 10.000 rpm por 20 min, a 4°C, ao sobrenadante (200 mL) foram adicionados 400 mL de cloreto de dansila e 200 mL de carbonato de sódio saturado. Após 1 h a 60 °C, 100 mL de prolina foram adicionados e a mistura foi mantida no escuro, à temperatura ambiente, por 30 min. Foram usados 500 mL para extrair as poliaminas e alíquotas de 20 mL foram aplicadas em placas de cromatografia de camada delgada (placas de vidro recobertas por sílica gel (60G – Merck, 20 x 20 cm) e submetidas à separação em cubas contendo clorofórmio:trietilamina (10:1). Padrões de putrescina, espermidina e espermina foram submetidos ao mesmo processo. Todo o procedimento foi acompanhado sob luz UV (254 nm). As poliaminas foram quantificadas, por comparação com os padrões também aplicados nas placas, por espectroscopia de emissão de fluorescência (excitação em 350 nm e medida de emissão em 495 nm), utilizando um sistema de documentação digital, com auxílio do software *Image Master* (versão 2.0), da *Amersham Pharmacia Biotech*. Os teores de poliaminas livres foram expressos em  $\text{mg g}^{-1}$  de matéria fresca.

#### **4.2.2.4 Atividade de inibição de glicosidase**

##### **4.2.2.4.1 Obtenção dos extratos com calisteginas**

A obtenção do extrato contendo calisteginas foi realizada de acordo com o protocolo descrito por Rothe e Drager (2002), com algumas modificações. Aproximadamente 2,5 g de tecido fresco (tubérculo com casca) de batata silvestre foram macerados sob nitrogênio líquido utilizando grau e pistilo, até a obtenção de um fino pó. Após, o pó foi ressuspensionado em 2 mL de metanol 50 % e centrifugado a 2000 x g por 2 min. O sobrenadante foi transferido a um balão de 500 mL e o metanol foi evaporado em rota evaporador, a 40°C por 1h. O extrato aquoso de calistegina foi carregado em uma coluna de 3 mL com amberlite (resina fortemente catiônica) (Fisher Scientific, IE/1015/48), empacotada no laboratório e pré-equilibrada com água. Os componentes não ligados foram eluídos com água até obtenção de eluente com pH neutro. Então, as calisteginas foram eluídas, com amônia 2 M, para o interior de um balão de 500 mL, até que a alcalinização (visualizada pelo escurecimento da resina) alcançasse o fim da coluna. Nesta etapa foi aplicado 1 mL de água na coluna, para coletar a fração final que poderia conter calisteginas. A amônia foi evaporada a 30 °C em rota evaporador e os extratos aquosos foram transferidos a tubos de microcentrifuga (*Eppendorf*) e armazenados a -20 °C. Os extratos foram padronizados de forma que 1 mL de extrato aquoso contivesse calisteginas de 6,25 g MF. Considerando-se que o conteúdo médio de calisteginas em *S. tuberosum* é de 35 µg/g.MF<sup>-1</sup>(Drager, 19XX), estimou-se que a concentração de calisteginas era de aproximadamente 218,25 µg por mL de extrato aquoso.

##### **4.2.2.4.2 Método de fermentação de açúcares**

A avaliação de inibição de glicosidases pelo extrato aquoso contendo calisteginas foi realizado conforme método desenvolvido por Barbosa (2009).

Foram utilizadas cepas de *Salmonella enteritidis* (ATCC 13076) e *Listeria monocitogenes* (ATCC 19114) incubadas a 5 °C em meio TSA (escreve por extenso) e TSA acrescido de extrato de levedura na concentração de 0,6 %

(v/m), respectivamente. Em todos os testes foram utilizadas suspensões de células cultivadas por 24 h a 37 °C. Para o preparo do inóculo, as culturas jovens de cada bactéria foram padronizadas pela adição de água peptonada 0,1 %, até alcançar 0,5 na escala McFarland de padrão de turbidez. Então, 1 mL dessas culturas foram diluídas em 9 mL de água peptonada 0,1 %, para a obtenção de  $10^7$  UFC mL<sup>-1</sup>.

Em tubos de microcentrífuga contendo 1 mL de meio líquido de púrpura de bromocresol acrescentaram-se 50 µL de solução de açúcares (manitol, dextrose, galactose e maltose) a 10 % e 100 µL de extrato aquoso de batata (correspondente a 625 mg de matéria fresca ou a conteúdo estimado de 20 µg de calisteginas). As amostras foram incubadas a 37 °C e avaliadas quanto a fermentação de açúcares, mensurada através da mudança de coloração do meio contendo o indicador de pH púrpura de bromocresol por leitura a 420 nm em espectrofotômetro. Foram utilizadas as duas cepas bacterianas para cada um dos quatro açúcares testados. Considerou-se como controle positivo amostras sem extrato de batata contendo calisteginas e como controle negativo amostra sem açúcares. O experimento foi realizado em triplicata.

## **4.3 Resultados e Discussão**

### **4.3.1 Açúcares redutores**

O teor de açúcar redutor nas linhagens de batata silvestre (*S. commersonii*) geneticamente modificadas, e também em *S. tuberosum*, é apresentado na Fig. 22.

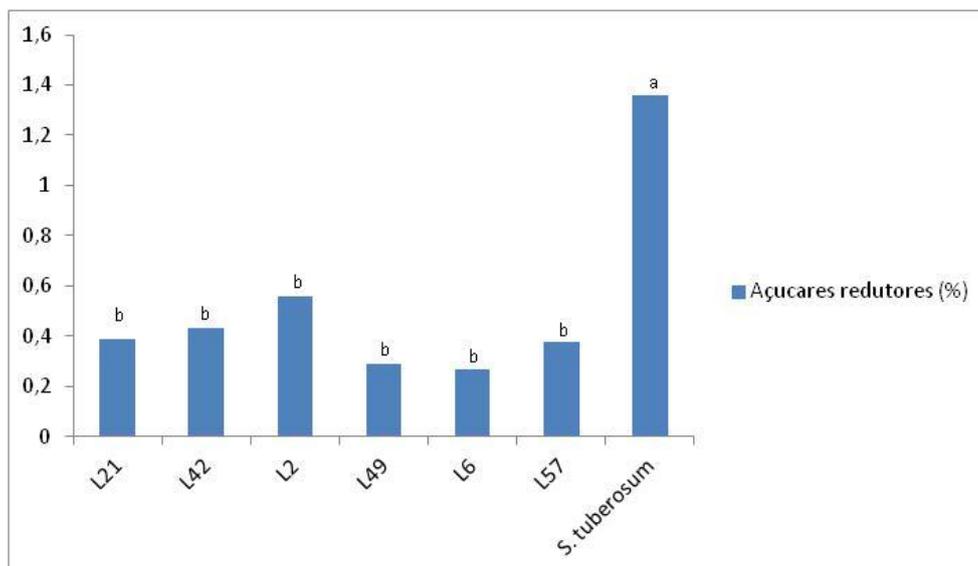


Fig. 22. Teor de açúcar redutor em tubérculos de diferentes linhagens de batata silvestre (*Solanum commersonii*), geneticamente modificada para silenciamento do gene tropinona redutase 2, e em tubérculos de *S. tuberosum*.

As linhagens geneticamente modificadas para silenciamento do gene *tropinona redutase 2* não diferiram entre si quanto ao teor de açúcares redutores, o qual variou de 0,27 % a 0,56 % e foi significativamente inferior ao teor encontrado em *S. tuberosum* (1,36 %). Chalá et. al., (2001), ao estudarem os efeitos da variabilidade genética no teor de açúcares redutores, observaram teores médios de 0,33 % e 0,59 % em tubérculos de *S. commersonii malmeanum* e *S. commersonii*, respectivamente. Portanto, a transformação genética realizada aparentemente não afetou o teor de açúcares redutores.

Segundo Zorzella et al. (2003), na produção industrial de batatas fritas são aceitáveis concentrações de açúcares redutores de até 0,40 %. Assim, apenas as linhagens L42 e L2 não estariam dentro desse limite aceitável.

#### 4.3.2 Glicoalcaloides

Pelos resultados obtidos, não foi evidenciado um comportamento característico para cada um dos grupos de linhagens, reafirmando, assim, que cada linhagem é um evento independente de transformação. Na Fig. 23 são apresentadas as concentrações de glicoalcaloides totais em tubérculos de

diferentes linhagens de *S. commersonii*, geneticamente modificadas para silenciamento do gene tropinona redutase II, e de *S. tuberosum*.

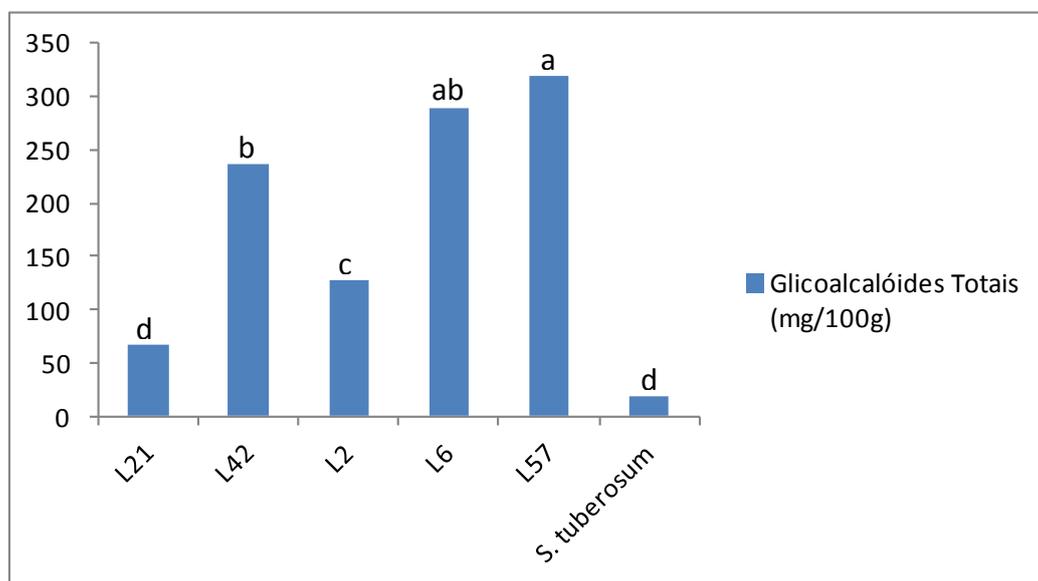


Fig. 23. Teor de glicoalcalóides totais ( $\alpha$ -solanina +  $\alpha$ -chaconina) em tubérculos *in natura* de diferentes linhagens de batata silvestre (*Solanum commersonii*), geneticamente modificada para silenciamento do gene tropinona redutase II, e em tubérculos de *S. tuberosum*.

As linhagens de *S. commersonii* apresentarem acúmulo de glicoalcalóides bastante variáveis entre si, e significativamente superiores aos observados em *S. tuberosum*.

As linhagens L57 e L6 foram as que apresentaram os maiores teores de glicoalcalóides totais e as linhagens L2 e L21 as que apresentaram os menores teores. Levando em consideração o acúmulo de transcritos dessas linhagens (Fig. 21), pode-se observar que L57 e L6 apresentam maior acúmulo de transcritos do gene tropinona redutase 2 (*tr2*) do que as linhagens L2 e L21. Estes resultados sugerem que as linhagens com maior acúmulo de transcritos de *tr2*, e supostamente com maior atividade de tropinona redutase (TR2), apresentam maior concentração de calisteginas (alcalóides nortropânicos), as quais atuam como inibidoras de glicosidases. A possível interação entre glicoalcalóides e calisteginas se baseia em algumas coincidências que merecem atenção. A presença de calisteginas e glicoalcalóides em regra

ocorre simultaneamente nas brotações, epiderme e exoderme de tubérculos, e também nas folhas jovens e flores (Smith, 1996; Keiner e Drager, 2000).

A bioatividade dos glicoalcaloides é majoritariamente conferida pelos grupamentos glicosídicos presentes nas suas estruturas, sendo que as formas não glicosiladas apresentam reduzida bioatividade (Rayburn, 1994). Em batata, foi demonstrado que a remoção dos grupamentos glicosídicos pode acontecer pela ação de glicosidases endógenas (Nikolic, 2005) ou exógenas, provenientes fungos patogênicos (Oda, 2002). Considerando a já estabelecida inibição de glicosidases mediada pelas calisteginas e a ocorrência concomitante de calisteginas e glicoalcaloides, pode-se inferir que as calisteginas contribuem para a manutenção dos níveis de glicoalcaloides.

Conforme Friedman (2006) e Ginzberg et.al., (2009), o limite aceitável e seguro de glicoalcaloides em batatas para consumo humano é de 20 mg/100g de matéria fresca. Considerando esse parâmetro, nenhuma das linhagens de batata avaliadas no presente estudo é adequada para o consumo humano. Diversos estudos reportam concentrações de glicoalcaloides em batatas. Bejarano et. al. (2000), ao estudarem o efeito do estresse hídrico sobre o acúmulo dos glicoalcalóides  $\alpha$ -solanina e  $\alpha$ -chaconina em tubérculos de batata, constataram um aumento de 63 % na concentração desses compostos. Esposito et.al. (2002) observaram concentrações de 453 ppm em tubérculos de *S. commersonii* e 253 ppm em clones geneticamente modificados de *S. tuberosum*, var. Desirée. Machado e Toledo (2004), ao estudarem a concentração de glicoalcaloides em batatas (*Solanum tuberosum*, var. Bolinha) comercializadas na cidade de Campinas, estado de São Paulo, encontraram concentrações de 11,2 g / 100 g. As concentrações de glicoalcaloides em *S. commersonii* e *S. tuberosum* relatada por outros autores foram semelhantes observadas no presente estudo.

Diversos estudos apontam para existência de efeitos não intencionais de eventos de transformações genéticas em níveis de glicoalcaloides em batatas (Khan et. al., 2013), porém, não há relatos de estudos que relacionem alterações na proporção e teor desses compostos com modificações na rota metabólica de tropano alcaloides. Como os glicoalcalóides fornecem proteção

contra fito-patógenos (Bianco et al., 2003), sua quantificação em qualquer experiência de transformação de batata é relevante. Eventuais reduções na concentração de glicoalcaloides decorrentes de transformações genéticas podem resultar em aumentos na susceptibilidade à pragas e doenças. (Birch et al., 2002).

### 4.3.3 Poliaminas

Nas Fig. 24, 25 e 26 são apresentadas as concentrações de poliaminas totais, putrescina, espermidina e espermina, respectivamente, nas diferentes linhagens transformadas de *S. commersonii* e não transformada de *S. tuberosum*. A exemplo dos resultados obtidos para glicoalcaloides, todas as linhagens de *S. commersonii* apresentaram concentrações de poliaminas significativamente maiores do que em *S. tuberosum*.

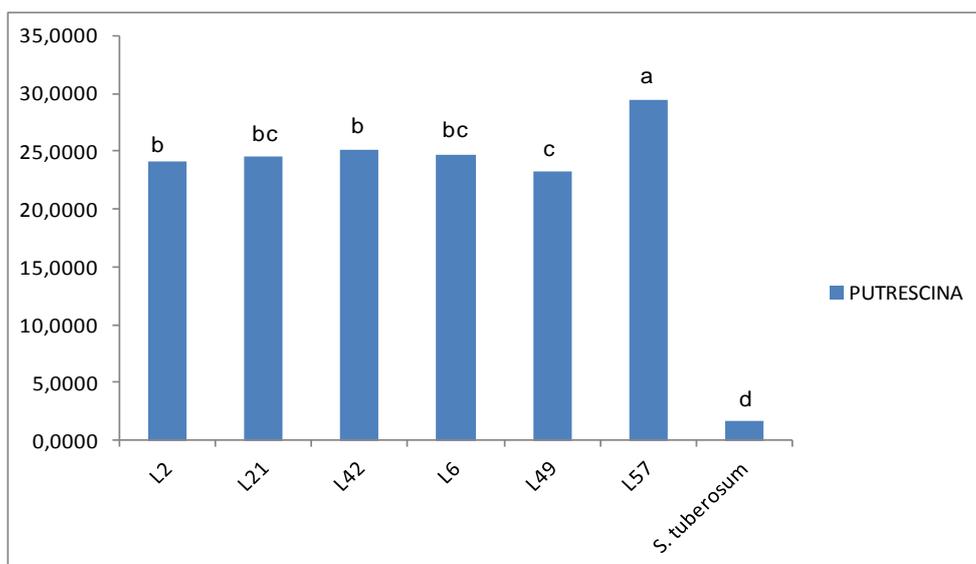


Fig. 24. Teores ( $\text{mg.g}^{-1}$ ) de putrescina em tubérculos in natura de diferentes linhagens de batata silvestre (*Solanum commersonii*), geneticamente modificada para silenciamento do gene *tropinona redutase 2*, e em tubérculos de *S. tuberosum*.

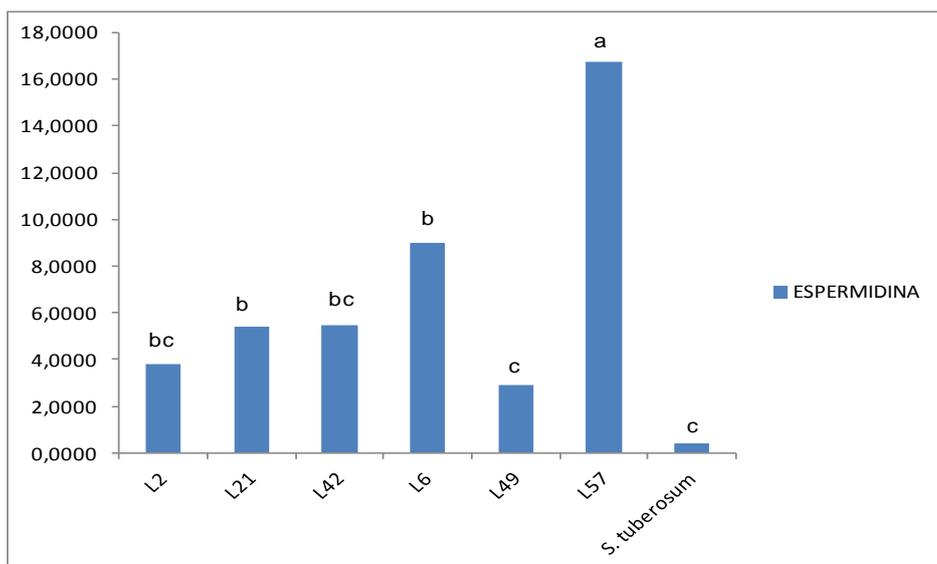


Fig. 25. Teores (mg.g<sup>-1</sup>) de espermidina em tubérculos in natura de diferentes linhagens de batata silvestre (*Solanum commersonii*), geneticamente modificada para silenciamento do gene *tropinona redutase 2*, e em tubérculos de *S. tuberosum*.

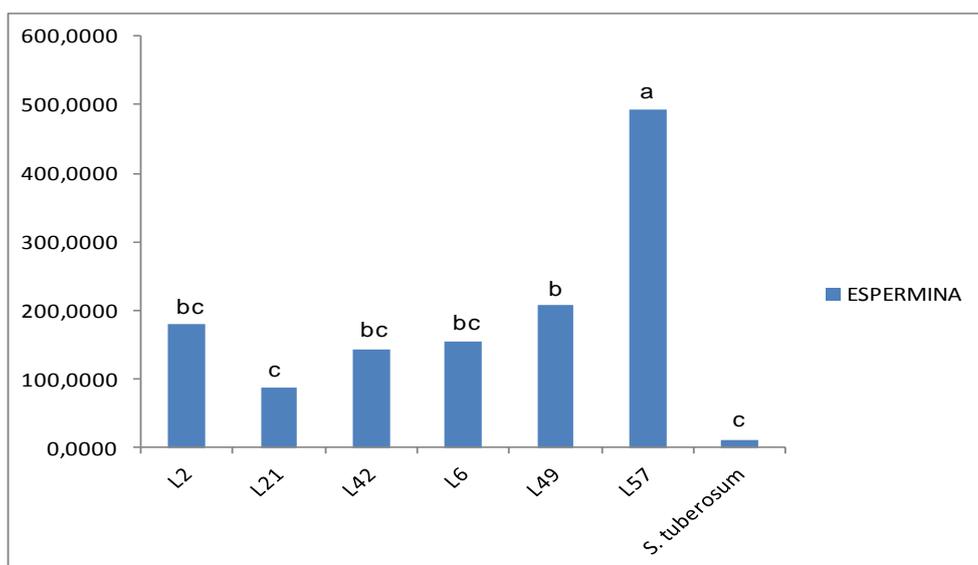


Fig. 26. Teores (mg.g<sup>-1</sup>) de espermina em tubérculos in natura de diferentes linhagens de batata silvestre (*Solanum commersonii*), geneticamente modificada para silenciamento do gene *tropinona redutase 2*, e em tubérculos de *S. tuberosum*.

A menor variação dentre as linhagens de *S. commersonii* foi observada para putrescina, onde os teores variaram de 24,15 mg.g<sup>-1</sup> a 29,50 mg.g<sup>-1</sup>, para as linhagens L2 e L57, respectivamente. Já as poliaminas espermidina e espermina apresentaram variações mais intensas, sendo que o teor de espermidina variou de 3,82 mg.g<sup>-1</sup> (L2) a 16,83 mg.g<sup>-1</sup>(L57) e de espermina variou de 86,24 (L21) a 491,87 mg.g<sup>-1</sup>(L57). Em *S. tuberosum* observou-se

concentrações de 1,66 mg.g<sup>-1</sup>, 0,38 mg.g<sup>-1</sup> e 11,54 mg.g<sup>-1</sup> de putrescina, espermidina e espermina, respectivamente.

As linhagens L57 e L6, as quais apresentam os maiores teores de putrescina e espermidina, apresentam os maiores acúmulos de transcritos do gene espermidina sintase (*spds*); o qual codifica para uma das enzimas responsáveis pela biossíntese dessas poliaminas (Leite et.al., 2012). O grande acúmulo de espermina nessas linhagens pode ser devido a incrementos na expressão dos genes que codificam para as enzima s-adenosil-metionina descarboxilase (*samdc*) e/ou espermina sintetase (*spms*) (Franceschetti et al., 2004).

Segundo Kaur-Sawhney et.al. (2003), eventos de modificação genética que alterem de forma direta ou indireta a disponibilidade das enzimas envolvidas na biossíntese de poliaminas, como ornitina descarboxilase, arginina descarboxilase e s-adenosilmetionina descarboxilase, promovem variações nas concentrações dos compostos relacionados.

É provável que um possível aumento na expressão de ornitina e/ou arginina descarboxilase tenham promovido elevações nos níveis de putrescina (Panicot et al., 2002). Conforme Bhatnagar et.al.( 2002) esse tipo de evento promove também uma variação insignificante os níveis de espermidina e espermina; fato esse que não está de acordo com os resultados encontrados nesse trabalho, uma vez que se observou uma grande variação na concentração dessas poliaminas.

A interrupção em rotas metabólicas leva ao acúmulo de produtos “upstream” (Mehta et. al., 2002). Assim, neste estudo, a supressão do gene *tr2* e a esperada redução na atividade da *tropinona redutase 2*, contribuiria para maior acúmulo de putrescina, espermidina e espermina. Entretanto, observa-se que as linhagens com menor expressão de *tr2* apresentam menor expressão de *spds* e menor acúmulo de poliaminas. Possivelmente esse comportamento possa estar associado ao efeito “feedback negativo”, quando o acúmulo de produtos finais ou intermediários leva a redução geral na atividade de todos os genes da rota.

Tomados em conjunto, os resultados obtidos sugerem que os níveis de espermina e espermidina estão sob forte regulação homeostática (Bhatnagar et.al. 2002; Kaur-Sawhney et al.; 2003); o que possivelmente poderia estar associado a uma grande organização molecular das enzimas envolvidas na biossíntese das poliaminas.

#### 4.3.4 Atividade de inibição de glicosidases

Nas Fig. 27 a 30 são apresentados resultados de inibição de fermentação dos açúcares manitol, galactose e maltose pelas bactérias *S. enteritidis* e *L. monocytogenes*, decorrente da ação de inibidores de glicosidases presentes em extratos de batata silvestre.

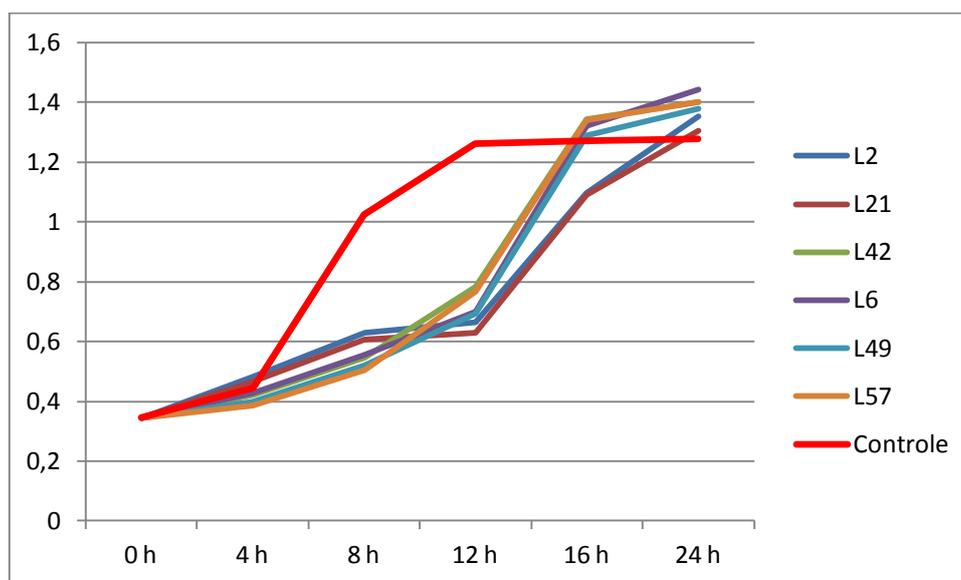


Fig 27. Atividade microbiana de extrato de batata silvestre em meio contendo manitol e cepas de *S. enteritidis*

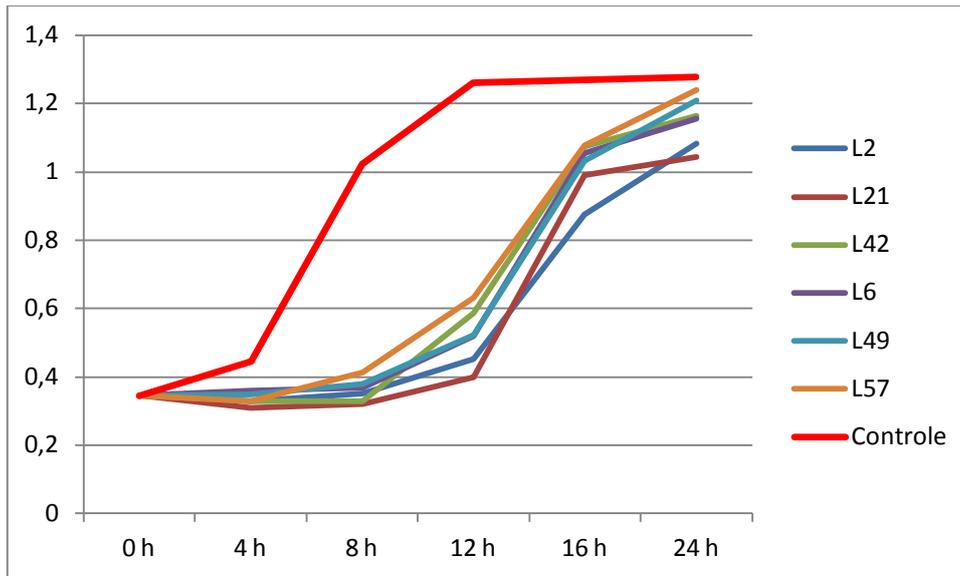


Fig 28. Atividade microbiana de extrato de batata silvestre em meio contendo maltose e cepas de *S. enteritidis*

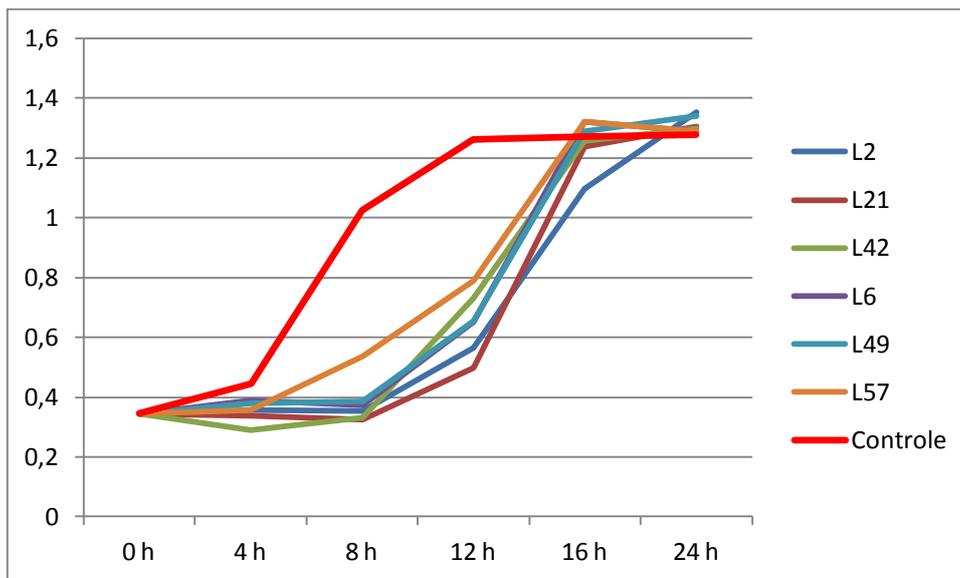


Fig 29. Atividade microbiana de extrato de batata silvestre em meio contendo galactose e cepas de *L. monocytogenes*

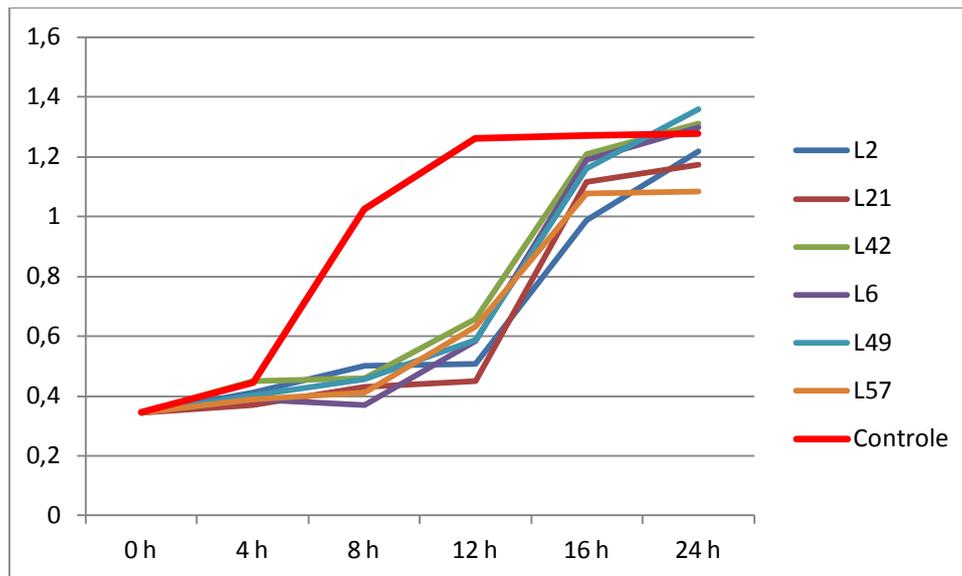


Fig 30. Atividade microbiana de extrato de batata silvestre em meio contendo maltose e cepas de *L. monocytogenes*

Conforme Frazier e Westhoff (2003), o meio púrpura de bromocresol permite o isolamento e diferenciação de bactérias. Este meio apresenta coloração violácea em pH superior a 6,2 e amarela em pH inferior a 5,8. Dessa forma é possível diferenciar micro-organismos que fermentam ou não açúcares específicos (Fig. 31). Os açúcares manitol, maltose e galactose, quando consumidos pelas bactérias, *S. enteritidis* e *L. monocytogenes*, produzem ácidos específicos, os quais acidificam o meio, reduzindo então o pH e alterando a coloração de violeta escuro para amarelo. A velocidade com a qual ocorre essa alteração de cor está diretamente relacionada à concentração de bactérias e, no caso desse estudo, à concentração de inibidores de fermentação, conferida às calisteginas presentes no extrato de batata dentre outros possíveis inibidores de glicosidasas.

Como esperado, os primeiros sinais de fermentação ocorreram com as amostras controle positivo, as quais não continham extrato de batata, mas sim os açúcares. Essas amostras iniciaram a fermentação 4 h após o início da incubação a 37 °C. Já as amostras controle negativo, as quais continham os extratos de batata, porém não continham açúcares, não tiveram processo fermentativo, permanecendo com a coloração violeta até 24 h após o início da incubação, conforme ilustrado na Fig. 31.



Fig.31. Microtubos, contendo meio púrpura de bromocresol, açúcar e extrato de batata silvestre (*S.commersonii*) rico em calisteginas, início do período de incubação a 37°C (A) e no final do processo de incubação (B).

Os extratos de batatas, preparados para conter concentrações de calisteginas de aproximadamente  $20 \mu\text{g. mL}^{-1}$ , foram suficientes para inibir a fermentação dos 3 açúcares pelas cepas de *S. enteritidis*, por até 12 horas. Já os meios contendo cepas de *L. monocytogenes*, iniciaram o processo fermentativo aproximadamente 10 h após o início da incubação. Demonstra-se, assim que as cepas de *S. enteritidis* mostram-se mais sensíveis aos extratos do que as cepas de *L. monocytogenes*.

Não foram observadas diferenças significativas de inibição de fermentação entre os extratos das diferentes linhagens de *S. commersonii* transformadas. Não se pode afirmar, no entanto, que isso se deve a concentrações semelhantes de calisteginas entre as linhagens, embora essa seja uma das possibilidades. Porém, é provável que o método não tenha sido sensível o suficiente para detectar a possível diferença de concentração existente nos extratos. Cabe ressaltar que a inibição da fermentação em 12 e 10 h, para *S. enteritidis* e *L. monocytogenes*; respectivamente, pode ser atribuídas, não somente às calisteginas, mas também a outros compostos que possivelmente estejam presentes nesses extratos.

Em estudo semelhante, Barbosa (2009) demonstrou que o inibidor de glicosidase comercial (Acarbose - Glucobay®) em concentrações de  $1,0\text{mg mL}^{-1}$  foi suficiente para inibir a fermentação de maltose por 16h, quando o micro-organismo utilizado era salmonella. Essa diferença de resultados encontrada

pode ser justificada pela diferença de concentração de inibidores de glicosidase nos meios, assim como pela diferença de integridade das cepas bacterianas empregadas. Segundo (Matasyoh et al.,2009), a atividade antimicrobiana de um extrato pode variar de acordo com a concentração e o tipo de bactéria a ser estudada.

Em todos os experimentos realizados neste estudo, a bactéria *S. enteritidis* (Gram negativa) foi significativamente mais sensível aos extratos que a bactéria *L. monocytogenes* (Gram positiva). Resultados semelhantes foram obtidos por Barbosa (2009).

As diferenças existentes entre a estruturas de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas podem causar danos diferenciados quando a bactéria é submetida a compostos antimicrobianos. As diferenças entre esses dois grupos residem principalmente nas suas propriedades de permeabilidade e nos componentes de superfície. Pela pequena quantidade de peptidoglicano, as bactérias Gram negativas podem se apresentar mais sensíveis que algumas bactérias Gram-positivas e, serem mais facilmente destruídas pela formação de lesões ou canais na parede celular (Wu et al., 2008).

#### **4.4 Conclusão**

A transformação genética para silenciamento do gene *tropinona redutase 2* alterou de forma significativa o acúmulo de alguns metabólitos secundários sem no entanto alterar a sua concentração de açúcares redutores.

## 5. Considerações Finais

A transgenia em tubérculos de batata *S. commersonii* promoveram alterações em algumas das suas propriedades, como o poder de inchamento e solubilidade, nas propriedades térmicas, propriedades de pasta e cristalinidade dos amidos extraídos dos tubérculos, no entanto não alterou a morfologia dos grânulos nem o padrão de difração de raio-X. Para elucidar melhor os resultados encontrados estudos mais aprofundados em relação ao teor de amilose, tamanho das cadeias e ramificações da amilose e amilopectina, susceptibilidade a enzimas como a alfa amilase, teor de amido resistente, bem como a atividade das enzimas envolvidas na biossíntese do amido devem ser desenvolvidos.

Com relação ao acúmulo de metabólitos secundários, os teores de glicoalcaloides, tiveram, para algumas linhagens, como L57 e L6, um aumento considerável de concentração. Com isso, é provável que a toxicidade dos tubérculos tenha aumentado, uma vez que os principais representantes desses compostos, ( $\alpha$ -solanina +  $\alpha$ -chaconina) são considerados de alta toxidez. Dessa forma, os tubérculos obtidos são considerados impróprios ao consumo humano, uma vez que ultrapassam o limite seguro de consumo de 20mg/100g de matéria fresca. A transformação genética também alterou o acúmulo das poliaminas putrescina, espermina e esperimidina; sendo que o teor de putrescina foi o que apresentou menor variação entre as amostras, provavelmente por ser, no caso da rota de biossíntese dos tropanos alcaloides, um componente “*upstream*”. A proporção das 3 poliaminas foi pouca alterada, provavelmente devido ao mecanismo de homeostase desses compostos.

Os extratos de batatas silvestres (*S. commersonii*) ricos em calisteginas apresentaram considerável atividade antimicrobiana, sendo capaz de inibir em até 10 horas a fermentação dos açúcares manitol e maltose no caso de *Salmonella enteritidis* e 12 horas a fermentação dos açúcares galactose e maltose no caso de *Listeria monocytogenes*. Sendo, portanto mais sensível ao controle de *Salmonella* do que *Listeria*.

## 6. Referências Bibliográficas

ACEVEDO, E.A. Almidón: definición, estructura y propiedades. In: LAJOLO, F.M; MENEZES, E.W. Carbohidratos em alimentos regionales iberoamericano. São Paulo: Edusp, p.17-46, 2006.

ALVANI, K.; QI, X.; TESTER, R.F. Gelatinization properties of native and annealed potato starches. *Starch*, v.64, p.297-303, 2012.

ANDREU M.A; PINTO C.; SIMON G.A.. Genetic markers for processing traits in potato. *Crop Breeding and Applied Biotechnology* 7: 67-73, 2007.

APLEVICZ, K.S. Caracterização de produtos panificados à base de mandiocas nativas e modificadas. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual de Ponta Grossa, 131p., 2006.

ASANO, N. Water soluble nortropane alkaloids in crude drugs, edible fruit and vegetables: biological activities and therapeutic applications. *Mechanisms of ageing and development*, v.116, p.155-156, 2000.

ASANO, N., NASH, R. J., MOLYNEUX, R. J., FLEET, G. W. Sugar-mimic glycosidase inhibitors: natural occurrence, biological activity and prospects for therapeutic application. *Tetrahedron: Asymmetry*, v.11, p.1645-1680, 2000.

ASANO, N.; KATO, A.; MIYAUCH, M.; KISU, H.; TOMIMORI, T.; MATSUI, K.; NASH, R.J.; MOLYNEUX, R.J. Specific  $\alpha$ -galactosidase inhibitors, N-methylcalystegines atruture and activity relationships of calystegines from *Lycium Chinense*. *European Journal of Biochemical*, v.248, n.2, p.296-303, 1997.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE BATATA, disponível em: <<http://www.abbabatatabrasileira.com.br>>, Acesso em março de 2013.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS - AOAC. Official methods of analysis. 16 ed. Arlington: AOAC, v.1, 1995.

BARBOSA, L.M.P. Supressão do gene tropinona redutase II e desenvolvimento de método para avaliar calisteginas em plantas de batata silvestre. Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial. Universidade Federal de Pelotas. 121p. 2009.

BHATNAGAR P., MINOCHA R., MINOCHA S. Genetic manipulation of the metabolism of polyamines in poplar cells. The regulation of putrescine catabolism. *Plant Physiology*, v.128, p.1455-1469, 2002.

BEJARANO L., MIGNOLET E., DEVAUX A., ESPINOLA N., CARRASCO E., LARONDELLE Y. The effect of variety and drought stress on the  $\alpha$ -solanine and  $\alpha$ -chaconine contents of potatoes. *Journal of science and food agricultural*, v.80, p.2096-2100, 2000.

BIANCO G., SCHMITT-KOPPLIN P., CRESCENZI A., COMES S., KETTRUP A., CATALDI T.R. Evaluation of glycoalkaloids in tubers of genetically modified virus Y-resistant potato plants (var. *Desiree*) by non-aqueous capillary electrophoresis coupled with electrospray ionization mass spectrometry (NACE-ESI-MS). *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v.375, p.799-804, 2003.

BILLIADERIS, C. G. The structure and interactions of starch with food constituents. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, v. 69, n.1, p. 60-78, 1991.

BIRCH A.N.E., GEOGHEGAN I.E., GRIFFITHS D.W., MCNICOL J.W. The effect of genetic transformations for pest resistance on foliar solanidine-based glycoalkaloids of potato (*Solanum tuberosum*). *Annals of Applied Biology*, v.140, p.143-149, 2002.

BONCHER, T., et al. Polyamine-Based Analogues as Biochemical Probes and Potential Therapeutics. *Biochemical Society Transactions*, v. 35, p.356-363, 2007.

CASTRO, L.A.S.; CAMPOS, A.D. Metodologia para avaliação de amidos e farinhas comerciais utilizando microscopia eletrônica de varredura – *Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, Embrapa Clima Temperado*, 28 p., 2009.

CEREDA, M.P. (org.). *Propriedades gerais de amido. (Série: Culturas de tuberosas amiláceas latino-americanas)*, v. 1, 221p, São Paulo, 2001.

CHALÁ, C.S.A.; PEREIRA, A.S.; CAMPOS, A.D., VIEGAS J.; SALAMONI, A.T. Genetic variability for reducing sugar content in wild potatoes that occur in southern Brazil. *Ciência Rural*, v.31, n.1, p.43-47, 2001.

CHAM, S., SUWANNAPORN, P., Effect of hydrothermal treatment of rice flour on various rice noodles quality, *Journal of Cereal Science*, v. 5, 284–291, 2010.

- CHANG, H. H.; ASANO, N.; ISHII, S.; ICHIKAWA, Y.; FAN, J. Q. Hydrophilic iminosugar active-site-specific chaperones increase residual glucocerebrosidase activity in fibroblasts from Gaucher patients. *Febs Journal*, v.273, n.17, p.4082-4092, 2006.
- CHANG, S., PURYEAR, J., CAIRNEY, J. A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. *Plant Molecular Biology Reporter*, v.11, p. 113-116, 1993.
- CHITARRA M.I.F; CHITARRA A.B. 2005. Pós-colheita de frutas e hortaliças: fisiologia e manuseio. 2 ed. Lavras: UFLA. 785 p.
- CHITARRA M.I.F; CHITARRA A.B. Pós-colheita de frutas e hortaliças: fisiologia e manuseio. 2 ed. Lavras: UFLA. 785 p. 2005
- CRAIG, S.A.S.; MANINGAT, C.C.; SEIB, P.A.; HOSENEY, R.C. Starch paste clarity. *Cereal Chemistry*, v.66, n.3, p.173-182, 1989.
- DE LUCA, V.; ST-PIERRE, B. The cell and developmental biology of alkaloid biosynthesis. *Trends in Plant Science*, v.5, p.168-173, 2000.
- DENYER, K.; JOHNSON, P.; ZEEMAN, S.; SMITH, A.M. The control of amylase synthesis. *Journal of Plant Physiology*, v.158, p.479-487, 2001.
- DRÄGER, B. Chemistry and biology of calisteginas. *Natural Products Reports*, v.21, p.211-223, 2004.
- DRÄGER, B. Tropinone reductases, enzymes at the branch point of tropane alkaloid metabolism. *Phytochemistry*, v.67, p.327-337, 2006.
- DRÄGER, B., FUNCK, C., HOHLER, A., MRACHATZ, G., NAHRSTEDT, A., PORTSTEFFEN, A., SCHAAL, A., SCHMIDT, R. Calystegines as a New Group of Tropane Alkaloids in Solanaceae. *Plant Cell Tissue Organ Cult*, v.38, 235-240, 2003.
- ESPOSITO F., FOGLIANO V., CARDI T., CARPUTO D., FILIPPONE E. Glycoalkaloid content and chemical composition of potatoes improved with non-conventional breeding approaches. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.50, p.1553-1561, 2002.
- FACCHINI, P. J. Alkaloid biosynthesis in plants: Biochemistry, cell biology, molecular regulation, and metabolic engineering applications. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, v.52, p.29-66, 2001.

FACCHINI, P. J.; ST PIERRE, B. Synthesis and trafficking of alkaloid biosynthetic enzymes. *Current Opinion in Plant Biology*, v.8, p.657-666, 2005.

FERNANDES A.M; SORATTO R.P; EVANGELISTA R.M; NARDIN I. Qualidade físico-química e de fritura de tubérculos de cultivares de batata na safra de inverno. *Horticultura Brasileira*, n.8, p. 299-304, 2010.

FILGUEIRA, F.A.R. Batata inglesa ou andina? *Batata Show*, Itapetininga, v.5, n.13, p. 40-41, 2005.

FLORES, H.E.; GALSTON, A.W. Analysis of polyamines in higher plants by performance liquid chromatography. *Plant Physiology*, v.69, p.701-706, 1982.

FONTES PCR; FINGER FL. Pós-colheita do tubérculo de batata. Viçosa: UFV. 32p. 2000.

FRANCESCHETTI M., FORNALE S., TASSONI A., ZUCCHERELLI K., MAYER M.J., BAGNI N. Effects of spermidine synthase over-expression on polyamine biosynthetic pathway in tobacco plants. *Journal of Plant Physiology*, v.161, p. 989–1001, 2004.

FRAZIER, W.C.; WESTHOFF, D.C. *Microbiologia de los alimentos*. 4.ed. Zaragoza: Acribia, 2003.

FRIEDMAN M, LEE KR, KIM HJ, LEE IS, KOZUKUE N. Anticarcinogenic effects of glycoalkaloids from potatoes against human cervical, liver, lymphoma, and stomach cancer cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.53, p.6162-6169, 2005.

FRIEDMAN, M. Analysis of biologically active compounds in potatoes (*Solanum tuberosum*), tomatoes (*Lycopersicon esculentum*), and Jimson weed (*Datura stramonium*) seeds. *Journal of chromatography A*, v. 1054, 143-155, 2004.

FRIEDMAN, M. Chemistry, biochemistry, and dietary role of potato polyphenols. A review. *J. Agric. Food Chem.* V.45, p.1523-1540, 1997.

FRIEDMAN, M. Potato glycoalkaloids and metabolites: Role in the plant and in the diet. *Journal of agricultural and food chemistry*, v.54, n.23, p.8655-8681, 2006.

GARCIA, V.; COLONNA, P.; BOUCHET, B.; GALLANT, D. J. Structural changes of cassava starch granules after heating at intermediate water contents. *Starch/Starke*, v.49, n. 5, p. 171-179, 1997.

GOMAND, S.V.; LAMBERTS, L.; DERDE, L.J.; GOESAERT, H.; VANDEPUTTE, G.E.; GODERIS, B.; VISSER, R.G.F.; DELCOUR, J.A. Structural properties and gelatinisation characteristics of potato and cassava starches and mutants thereof. *Food Hydrocolloids*, v.24, p.307-317, 2010.

GROPPIA, M. D.; BENAVIDES, M. P. Polyamines and Abiotic Stress: Recent Advances. *Amino Acids*, v.34, p.35-45, 2008.

HAN, K.; HASHIMOTO, N.; HASHIMOTO, M.; NODA, T.; SHIMADA, K.; LEE, C.; SEKIKAWA, M.; FUKUSHIMA, M., Red potato extract protects from d galactosamine-induced liver injury in rats. *Bioscience, Biothecology and Biochemistry*, v.70, p. 2285-2288, 2006.

HIGIMANS, R.J.; SPOONER, D.M.; SALAS, A.R.; GUARINO, L.; CRUZ, J. Atlas of wild potatoes. IPGRI – CGIAR, 2001.

HOOVER, R. Composition, molecular structure, and physicochemical properties of tuber and root starches: A Review. *Carbohydrate Polymers*, v. 45, n. 3, p. 253-267, 2001.

HOOVER, R.; HUGHES, T.; CHUNG, H. J.; LIU, Q. Composition, molecular structure, properties, and modification of pulse starches: A review. *Food Research International*, v.43, p. 399–413, 2010.

IKEDA, K.; KATO, A.; ADACHI, I.; HARAGUCHI, M.; ASANO, N. Alkaloids from the poisonous plant *Ipomoea carnea*: effects on intracellular lysosomal glycosidase activities in human lymphoblast cultures. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.51, p.7642-7646, 2003.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Normas analíticas: métodos químicos e físicos para análises de alimentos. 3.ed. São Paulo, v.1, 533p, 1985.

JIRANUNTAKUL, W.; PUTTANLEK, C.; RUNGSARDTHONG, V.; PUNCHA-ARNON, S.; UTTAPAP, D. Microstructural and physicochemical properties of heat-moisture treated waxy and normal starches. *Journal of Food Engineering*, V.104, P.246-258, 2011.

KHAN, M.S., MUNIR, I., KHAN, I. The potential of unintended effects in potato glycoalkaloids, *African Journal of Biotechnology*, v.12, p. 754-766, 2013.

KARAM, L.B. Propriedades funcionais de multimisturas de amidos de milho, mandioca e cará e sua relação com as características físicas e moleculares. Tese de doutorado, Universidade Estadual de Londrina, 2003.

KAUR-SAWHNEY, R.; TIBURCIO, A. F.; ALTABELLA, T.; GALSTON, A. W. Polyamines in plants: an overview, *Journal of Molecular Cell Biology*, v.2, p.1–12, 2003.

KEINER, R.; DRÄGER, B. Calistegina distribution in potato (*Solanum tuberosum*) tubers and plants. *Plant Science*, v.150, p.171-179, 2000.

KIEFER, E.; HELLER, W.; ERNST, D. A simple and efficient protocol for isolation of functional RNA from plant tissues rich in secondary metabolites. *Plant Molecular Biology Reporter*, v.18, p.33-39, 2000.

KITAHARA, K.; COPELAND, L. A simple method for fractionating debranched starch using a solid reversed-phase cartridge. *Journal of Cereal Science*, v.39, n. 1, p.91-98, 2004.

KORPAN, Y. I., NAZARENKO, E. A., SKRYSHEVSKAYA, I. V., MARTELET, C., JAFFREZIC-RENAULT, N., EL' SKAYA, A. V. Potato glycoalkaloids: True safety or false sense of security, *Trends in Biotechnology*, v.22, p.147-151, 2004.

KOSSMANN, J.; LLOYD, J. Understanding and influencing starch biochemistry. *Critical review in plant science*, v.19, n.3, p.171-226, 2000.

KRITS P, FOGELMAN E, GINZBERG I. Potato steroidal glycoalkaloid levels and the expression of key isoprenoid metabolic genes. *Plants*, v.227, p.143-150, 2007.

KUSANO, T. et al. Polyamines: Essential Factors for Growth and Survival. *Planta*, V. 228, p.367-381, 2008

LACHMAN, J., HAMOUZ, K., ORSÁ K.M., PIVEC V, Potato glycoalkaloids and their significance in plant protection and human nutrition – review. *Series Rostlinná Výroba*, n.47, v.4, p.181-191, 2001.

LEACH, H. W.; MCCOWEN, L. D.; SCHOCH, T. J. Structure of the starch granule. I. Swelling and solubility patterns of various starches. *Cereal Chemistry*, v. 36, p. 534–544, 1959

- LEWIS C.E., WALKER, J.E., LANCASTER, K.H. Determination of anthocyanins, flavonoids and phenolic acids in potatoes. I: Coloured cultivars of *Solanum tuberosum*, Journal of science and food agricultural, v.77, p.45-57, 1998.
- LIMA, G.P.P, ROCHA, S.A, TAKAKI, M, RAMOS, P.R.R Teores de poliaminas em alguns alimentos da dieta básica do povo brasileiro. Ciência Rural, v.36, n.4, p.1294-1298, 2006.
- LIMA, G.P.P. Poliaminas e atividade da peroxidase em feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivado sob estresse salino. Scientia Agricola, v.56, p.21-26, 1999.
- LIU, Q. Starch Modifications and Applications. In: CUI, S. W (Ed.). Food Carbohydrates: Chemistry, Physical Properties and Applications, p. 357-406, 2005.
- MACHADO, R. M. D.; TOLEDO, M. C. F., Determinação de glicoalcalóides em batatas *in natura* (*solanum tuberosum* l.) comercializadas na cidade de Campinas, estado de São Paulo, Ciência e Tecnologia de Alimentos, n. 1, v. 24, p. 47-52. 2004.
- MATSUGUMA, L. S. Caracterização do amido de mandioca salsa (*Arracacia xanthorrhiza*) nativo e modificado por oxidação. Dissertação (Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, PR, 112p., 2006.
- MENDES, F.M. E CURVELO, A.A.S. Produção e caracterização de bioplásticos a partir de amido de batata, poli-hidroxitirato e polihidroxitirato-co-valerato. In.: Anais do 10º Congresso Brasileiro de Polímeros, Foz do Iguaçu/ PR, 2009
- MEHTA, R. A.; CASSOL, T.; LI, N.; ALI, N.; HANDA, A. K.; MATTOO, A. K. Engineered polyamine accumulation in tomato enhances phytonutrient content, juice quality, and vine life. Nature Biotechnology., v.20, p. 613–618, 2002.
- MOINARD, C., CYNOBER, L., BANDT, J. Polyamines: Metabolism and Implications in Human Diseases. Clinical Nutrition, v.24, p.184-197, 2005.
- NEMR, A. E. Synthetic methods for the stereoisomers of swainsonine and its analogues. Tetrahedron, v. 56, p.8579-8629, 2000.
- NIKOLIC, N., STANKOVIC, M. Hydrolysis of glycoalkaloids from *Solanum tuberosum* L. haulm by enzymes present in plant material and by enzyme preparation, Potato Research, v.48, p.25-33, 2005.

NODA, T.; TAKAHATA, Y.; SATO, T.; IKOMA, H.; MOCHIDA, H. Physicochemical properties of starches from purple and orange fleshed sweet potato roots at two levels of fertilizer. *Starch*, v. 48, p. 395–399, 1996.

NORA, L. A virus-based transgenic approach to engineer the production of tropane alkaloids and calisteginas in *Hyoscyamus muticus* plants (*PhD*). John Innes Centre - Department of Cell and Developmental Biology. University of East Anglia, Norwich, UK. 280 pp, 2006.

ODA, Y., SAITO, K., OHARA-TAKADA, A., MORI, M. Hydrolysis of the potato glycoalkaloid  $\alpha$ -chaconine by filamentous fungi. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v.94, p. 321–325, 2002.

ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS PARA AGRICULTURA E ALIMENTAÇÃO (FAO). International Year of the Potato. 2010.

PARK, E.Y.; KIM, H; KIM, J.; LIM, S. Pasting Properties of Potato Starch and Waxy Maize Starch Mixtures, *Starch/Stärke*, V.61, p.352–357, 2009.

PÁRRAGA, M. S., CARDOSO M. R. O. Botânica, taxonomia e espécies cultivadas de batata, *Informe Agropecuário*, n. 76, p. 10-12. 1981.

PEGG, A. E.; FEITH, D. J. Polyamines and Neoplastic Growth. *Biochemical Society Transactions*, v.35, p. 295-299, 2007.

PEREIRA A.S; FRITSCHÉ N.R; SILVA R.S; BENDER C.I; SCHÜNEMANN A.P; FERRIN M.L; VENDRUSCOLO J.L. Genótipos de batata com baixo teor de açúcares redutores. *Horticultura Brasileira* n. 25, p.220-223, 2007.

PERONI, F.H.G. Características estruturais e físico-químicas de amidos obtidos de diferentes fontes botânicas. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual Paulista “Julio Mesquita Filho”, 107p, 2007.

PINTO, V.Z. Efeito do tratamento térmico de baixa umidade e da oxidação nas propriedades físico-químicas, reológicas e térmicas do amido de pinhão (*Araucaria angustifolia*) Dissertação de Mestrado. Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial. Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, 90p., 2012.

RABEK, J. F. Applications of wide-angle X-ray diffraction (WAXD) to the study of the structure of polymers, In: Experimental Methods in Polymer Chemistry p. 505-508, Chichester: Wiley-Interscience, 1980.

RAYBURN J.R., BANTLE J.A., QUALLS C.W., FRIEDMAN M. Protective effect of glucose-6-phosphate and NADP against R-chaconine-induced developmental toxicity in *Xenopus embryos*. Food Chemistry and Toxicology, v.33, p.1021-1025, 1995.

RAYBURN, J. R., J. A. BANTLE, Role of carbohydrate side-chains of potato glycoalkaloids in developmental toxicity. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v.42, p. 1511-1515, 1994.

RED ELECTRÓNICA DE LA PAPA, REDEPAPA, disponível em: <<http://www.redepapa.org/>>, Acesso em março de 2007.

REYES, L. F., MILLER, J. C. JR., CISNEROS-ZCVALLOS, L. Environmental conditions influence the content and yield of anthocyanins and total phenolics in purple- and red-flesh potatoes during tuber development. Journal of potato Research, v.81, p.187-193. 2004.

REYES, L. F.; MILLER, J. C. JR.; CISNEROS-ZEVALLOS, L., Antioxidant Capacity, Anthocyanins and Total Phenolics in Purple- and Red-Fleshed Potato (*Solanum tuberosum* L.) Genotypes. American Journal of Potato Research, 2005

REYES, L.F., CISNEROS-ZEVALLOS, L., Wounding stress increases the phenolic content and antioxidant capacity of purple-flesh potatoes (*Solanum tuberosum*.), Journal of Agricultural and Food Chemistry, v.51, p.5296-5300, 2003.

RICHTER, U.; ROTHE, G.; FABIAN, A. K.; RAHFELD, B.; DRAGER, B. Overexpression of tropinone reductases alters alkaloid composition in *Atropa belladonna* root cultures. Journal of Experimental Botany, v.56, p.645-652, 2006.

ROCHA, B.H.G.; AUGUSTIN, E.; SILVA, J.B.S.; PEREIRA, A.S. Associação entre isoenzimas e matéria seca em batata silvestre. Pesquisa agropecuária brasileira, Brasília, v.35, n.12, p.2415-2421, 2000.

SAUNDERS, F. R.; WALLACE, H. M. Polyamine Metabolism and Cancer Prevention. Biochemical Society Transactions, v.35, p.364-368, 2007.

SILVA, R.M.; FERREIRA, G.F.; AYUMI, M.; HASS, A.; SCHERER, M.L.; FRANCO, C.M.L; DEMIATE, I.M. Características físico-químicas de amidos modificados com permanganato de potássio/ácido láctico e hipoclorito de sódio/ácido láctico. *Ciência Tecnologia de Alimentos*, v..28, 2008.

SILVA, T. M. S.; CARVALHO, M. G.; BRAZ-FILHO, R.; AGRA, M. F., Ocorrência de flavonas, flavonóis e seus glicosídeos em espécies do gênero *Solanum* (Solanaceae) *Química Nova*, v.26, n.4. 2003.

SIMÕES, J. Evenenamento por glicoalcalóides da batata (*Solanum tuberosum*) em bovinos, *Veterinaria.com.pt*, v.1, n.1, 2008.

SINGH, N. Functional and physicochemical properties of pulse starch. In: *Pulse foods: processing, quality and technological applications*. Academic Press, p. 91-120, 2011.

SINGH, N. Morphological, thermal and rheological properties of starches from different botanical sources. *Food Chemistry*, v.81, p..219-231, 2003.

SMITH D.B.; RODDICK J.G. JONES L.J. Potato glycoalkaloids: some unanswered questions. *Trends Food Science and Technology*, v.7, p.126-131, 1996.

SMITH D.B.; RODDICK J.G.; JONES J.L. Synergism between the potato glycoalkaloids  $\alpha$ -chaconine and  $\alpha$ -solanine in inhibition of snail feeding. *Phytochemistry* v.57, p.229-234, 2001.

SWIVDRYCH, A.; STACHOWIAK, J.; SZOPA, J. The catecholamine potentiates starch mobilization in transgenic potato tubers. *Plant Physiology and Biochemistry*, v.42, p.103–109, 2004.

THOMAS, T., THOMAS, T. J. Polyamine Metabolism and Cancer. *J.Cell.Mol.Medicinal*, v.7, n. 2, p. 113-126, 2003.

VAN DER MAAREL, M.J.E.C.; VAN DER VEEN, B.; UITDEHAAG, J.C.M.; LEEMHUIS, H.; DIJKHUIZEN, L. Properties and applications of starch-converting enzymes of the  $\alpha$ -amylase family. *Journal of Biotechnology*, v. 94, n. 2, p. 137-155, 2002.

VANIER, N. Armazenamento de cultivares de feijão e seus efeitos na qualidade tecnológica dos grãos e nas propriedades do amido. *Dissertação de Mestrado*

Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial. Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, 90p., 2012.

VAUCHERET, H.; BÉCLIN, C.; FAGARD, M. Post-transcriptional gene silencing in plants. *Journal of cell science*, v.114, p.3083-309, 2001.

WALLACE, H. M., FRASER, A. V, HUGHES, A. A Perspective of Polyamine Metabolism, *Journal of Biochemistry*, v. 376, p.1-14, 2003

WATSON, A. A.; FLEET, G. W.; ASANO, N.; MOLYNEUX, R. J.; NASH, R. J. Polyhydroxylated Alkaloids - Natural Occurrence and Therapeutic Applications. *Phytochemistry*, v.56, p.265, 2001.

WINK, M. Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. *Phytochemistry*, v.64, p.3-19, 2003.

WINKEL-SHIRLEY, B. Flavonoid Biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, and biotechnology. *Plant Physiology*, v.126, p. 485- 493. 2001.

WISCHMANN, B.; AHMT, T.; BANDSHOLM, O.; BLENNOW, A.; YOUNG, N.; JEPPESEN, L.; TOMSEN, L. Testing properties of potato starch from different scale of isolations – A ringtest. *Journal of Food Engineering*, v.79, p.970–978, 2007.

YOON, S.H.; ROBYT, J.F. Study of the inhibition of four  $\alpha$ -amylases by acarbose and 4IV-alpha-maltohexaosyl analogues. *Carbohydrates Research*, v.338, n.19, p.1969-1980, 2003.

YOU, S.; STEVENSON, S. G.; IZYDORCZYK, M. S.; PRESTON, K. R. Separation and characterization of barley starch polymers by a flow field-flow fractionation technique in combination with multiangle light scattering and differential refractive index detection. *Cereal Chemistry*, v.79, n.5, p. 624-630, 2002.

ZEEMAN, S.C.; SMITH, S.M.; SMITH, A.M. Transley review: the breakdown of starch in leaves. *New phytologist*, v.163, p.247-261, 2004.

ZHONG, F.; LI, Y.; IBANZ, A.M.; OH, M.H.; MCKENZIE, K.S.; SHOEMAKER, C. The effect of rice variety and starch isolation method on the pasting and rheological properties of rice starch pastes. *Food Hydrocolloids*, v. 23, n. 2, p. 406-414, 2009.

ZIEGLER, J., FACCHINI P. J. Alkaloid biosynthesis: Metabolism and trafficking. *Annual Review Of Plant Biology* v. 59, p.735-769, 2008.

ZORZELLA C.A; VENDRUSCOLO J.L.S; TREPTOW R.O; ALMEIDA T.L.  
Caracterização física, química e sensorial de genótipos de batata processados na forma chips. Brazilian Journal of Food Technology n. 6, p.15-24, 2003.

WU, V. C.; QIU, W. Q.; BUSHWAY, A.; HARPER, L. Antibacterial effects of American cranberry (*Vaccinium macrocarpon*) concentrate on foodborne pathogens. Food Science and Technology, v.41, p.1834-1841, 2008.