



Caracterização morfológica, agronómica e teor de aminoácidos livres de acessos de *Momordica balsamina* provenientes Moçambique

Ângelo Dinis Gomes

Mestrado em Engenharia Agronómica

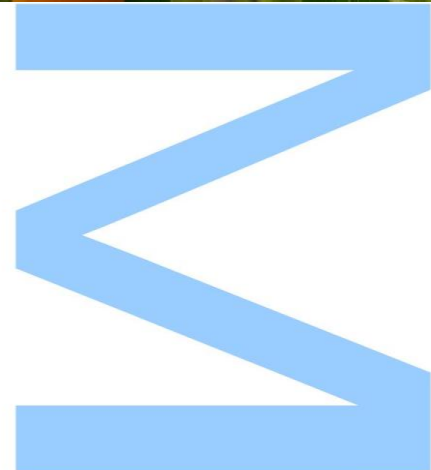
Departamento de Geociências, Ambiente e Ordenamento do território
2019

Orientador

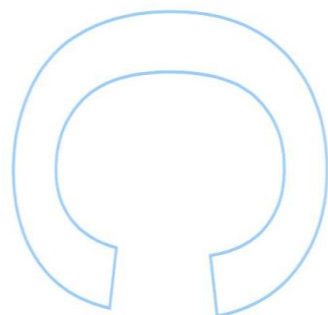
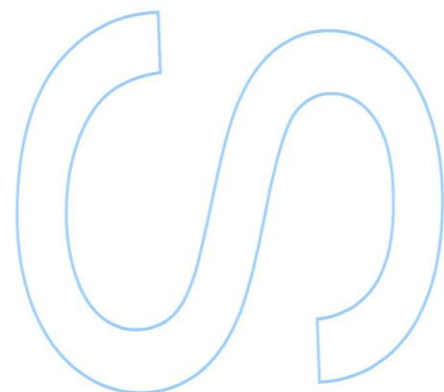
Eugénia Nunes, Professora Auxiliar, FCUP

Coorientador

Rita Alves, Investigadora Principal, REQUIMTE/LAQV, FFUP



L.
de

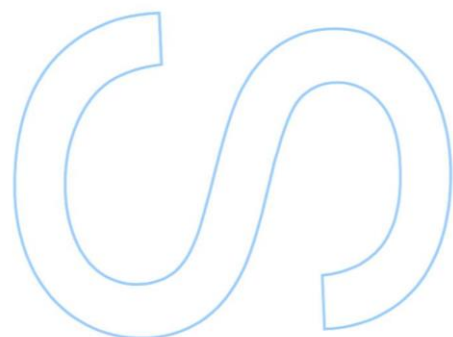
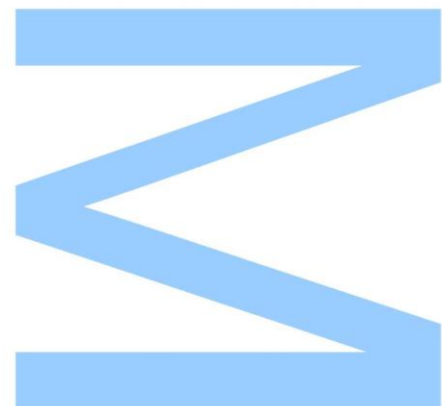




Todas as correções determinadas pelo júri, e só essas, foram efetuadas.

O Presidente do Júri,

Porto, ____/____/____



Agradecimentos

A minha gratidão vai para todos aqueles que disponibilizaram parte do seu tempo para me apoiar e incentivar durante o meu percurso académico na Universidade do Porto e estadia em Portugal.

À minha orientadora e Professora Eugénia Nunes, pelos ensinamentos e conhecimentos transmitidos, tempo disponibilizado e paciência durante a realização do trabalho.

À Investigadora Rita Alves, minha coorientadora, pelo conhecimentos transmitidos, tempo disponibilizado e simpatia contagiante.

À professora Beatriz Oliveira, pelo apoio e cedência das devidas autorizações para a realização do trabalho fora do horário normal de expediente.

À Susana Machado, Filipa Alexandra e Anabela Costa.

Ao Prof. Simião Gabriel Balane, pela colheita e disponibilização das sementes.

Ao João Ah Hing Shenga, Martim Freitas Benta Maia e Martim Presteux Santos, pela amizade, companheirismo e apoio transmitido durante este percurso.

À Fernanda, pelo apoio e experiência transmitida durante as minhas atividades em Vairão.

Aos colegas do Mestrado do ano 2017, pelas experiências transmitidas e momentos vividos.

E a todos aqueles que de alguma forma deram o seu contributo.

Resumo

Desde os tempos remotos, as plantas têm sido usadas para suprir as necessidades de dissuasão e cura de moléstias em humanos e animais. Cerca de 70% da população moçambicana depende do uso de plantas medicinais para atender aos cuidados primários de saúde. A *Momordica balsamina* L. (cacana), pelos diversos benefícios, é das espécies mais usadas. No entanto, apesar da sua importância já comprovada, são escassos os estudos sobre a sua biodiversidade em Moçambique, não estando identificadas as variedades produzidas nas diferentes regiões do país, nem as suas especificações agronómicas e composição química. Este estudo tem como objetivo avaliar as características morfológicas, agronómicas e químicas da cacana e identificar acessos de elevada qualidade e rendimento.

Foram avaliados indicadores morfológicos, fisiológicos e agronômicos, com registos semanais e durante a colheita.

Os acessos não apresentaram diferenças significativas quanto às características morfológicas e agronómicas.

Em condições de produção dentro da estufa, o acesso 3, originário da localidade de Chongoene, teve melhor desempenho na taxa fotossintética, taxa de transpiração, condutância estomática, eficiência de carboxilação e eficiência do uso da água, assim como na produção de matéria seca. Apresentou ainda um maior teor de aminoácidos livres.

Em condições de produção ao ar livre, o acesso 2, proveniente da localidade de Maciene, obteve a maior concentração em aminoácidos livres.

Dos 14 aminoácidos identificados, 4 (ácido aspártico, ácido glutâmico, glutamina e hidroxiprolina) foram maioritariamente quantificados nas plantas de cacana produzidas dentro da estufa e 11 (serina, histidina, glicina, tirosina, valina, metionina, triptofano, fenilalanina, isoleucina, leucina e lisina) em condições de ar livre.

Pelos resultados obtidos, o acesso 3 sugere ser o melhor acesso para o uso em infusões e consumo de folhas.

Palavras-chave: *Momordica balsamina* L., cacana, aminoácidos, Moçambique, fotossíntese, eficiência do uso da água, matéria seca.

Abstract

Since ancient times, plants have been used to meet the deterrence and cure needs of diseases in humans and animals. About 70% of the Mozambican population depends on the use of medicinal plants to provide primary health care. *Momordica balsamina* L. (cacana), due to its many benefits, is one of the most used species. However, despite its proven importance, studies on its biodiversity in Mozambique are scarce, and the varieties produced in different regions of the country are not identified, nor their agronomic specifications or chemical composition. This study aims to evaluate the morphological, agronomic and chemical characteristics of cacana and to identify high quality and yield accesses.

Morphological, physiological and agronomic indicators were evaluated, with weekly records and during harvest.

Morphological and agronomic indicators showed no significant differences between accesses.

Under greenhouse, access 3 presented the best performance in photosynthetic rate, transpiration rate, stomatal conductance, carboxylation efficiency, water use efficiency and dry matter. It also had a higher free amino acid content.

Under open production conditions, access 2 from Maciene locality, showed the highest concentration in free amino acids.

Of the 14 amino acids identified, 4 (aspartic acid, glutamic acid, glutamine and hydroxyproline) were mostly quantified in greenhouse cacana plants produced and 11 (serine, histidine, glycine, tyrosine, valine, methionine, tryptophan, phenylalanine, isoleucine, leucine). and lysine) under open conditions.

From the results obtained, access 3 suggests being the best access for use in infusions and leaf consumption.

Regarding consumption, accession 3 from Chongoene proved to be the best, with the highest dry matter and highest concentrations of free amino acids.

Keywords: *Momordica balsamina* L., cacana, amino acids, Mozambique, water use efficiency, photosynthesis, dry mater.

Índice

Índice de figuras	xiv
Índice de tabelas.....	xv
Lista de equações	xvi
Lista de Unidades.....	xvii
1. Introdução.....	18
2. Objetivos.....	19
A realização deste trabalho teve como objectivo:	19
3. Revisão bibliográfica.....	20
3.1. Classificação taxonómica e morfológica.....	20
3.2. Origem e distribuição	21
3.3. Importância.....	21
3.4. Caracterização nutricional.....	23
3.5. Propriedades terapêuticas	23
3.6. Parâmetros de produção.....	24
3.7. Identificação e caracterização de compostos	25
3.7.1. Métodos de extração.....	25
3.7.2. Cromatografia líquida.....	27
3.7.3. Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)	28
3.8. Aminoácidos (AA).....	29
4. Material e métodos.....	30
4.1. Localização da área experimental	30
4.2. Caracterização dos genótipos	30
4.3. Condução do ensaio	31

4.4.	Observação e registo efetuados	34
4.5.	Identificação e quantificação de aminoácidos	36
4.5.1.	Químicos e reagentes	36
4.5.2.	Preparação das amostras	37
4.5.3.	Extração	38
4.5.4.	Quantificação de aminoácidos livres	39
4.6.	Análise estatística	40
5.	Resultados	41
5.1.	Teste de germinação	41
5.2.	Descrição dos registos semanais	42
5.2.1.	Altura da planta	42
5.2.2.	Taxa fotossintética	43
5.2.3.	Taxa de transpiração	43
5.2.4.	Condutância estomática	43
5.2.5.	Concentração subestomática de CO ₂	44
5.2.6.	Temperatura foliar	44
5.2.7.	Eficiência de Carboxilação	45
5.4.	Descrição dos resultados dos aminoácidos	48
5.4.1.	Quantificação dos aminoácidos Livres	48
6.	Discussão	52
7.	Conclusão	55
8.	Referências bibliográficas	57
9.	Anexos	63

Índice de figuras

Figura 1. Estruturas vegetativas da cacana. A - Folhas e flor; B - Gavinhas e frutos.	20
Figura 2. Estruturas reprodutivas da cacana. A - Flor feminina; B - Flor masculina; C – Fruto.	21
Figura 3. Localização da área experimental.....	30
Figura 4. Regiões de colheita de sementes de oito acessos de cacana	30
Figura 5. . Regiões de colheita dos acessos de cacana.....	31
Figura 6. Germinação de sementes de <i>Momordica balsamina</i> L.; A- Câmara de fotoclíma, B - Plantúlas germinadas.....	32
Figura 7. Tratamento para quebra de dormência de sementes de <i>Momordica balsamina</i> L.	32
Figura 8. Sementes de cacana em diferentes tratamentos de quebra de dormência.	33
Figura 9. Acessos de cacana L., AL – Ar livre; E- Estufa.	33
Figura 10. Coleta de dados dos acessos de <i>Momordica balsamina</i> L.; A- Medição do comprimento do fruto; B - Pesagem do fruto.....	35
Figura 11. Determinação do teor em matéria seca. A-Pesagem da massa verde; B- Pesagem da massa seca.....	35
Figura 12. Leitura de dados fisiológicos em acessos de cacana com o aparelho IRGA LCPro – SD	36
Figura 13. A- Balança para determinação de teor de humidade; B-Liofilizador Telstar Cynodos 80	37
Figura 14. Amostras de <i>Momordica balsamina</i> L.; A - Folhas não inteiras, B- Folhas pulverizadas	38
Figura 15. Extração das amostras. A - Placa magnética de agitação com temperatura controlada, B - Centrífuga Habraeus 4500rpm.....	38
Figura 16. Preparação de extratos de <i>Momordica balsamina</i> L., A – Matrizes contendo extratos em triplicado de 3 plantas; B – Eppendorfs contendo extratos	39
Figura 17. Sistema integrado de HPLC Jasco.....	40
Figura 18. Evolução média semanal na altura de sete acessos de cacana ao longo de 14 semanas.....	42

Figura 19. Concentração dos aminoácidos obtidos em diferentes condições de extração: 3 horas em água a 40 °C e 3 horas em água a temperatura ambiente.	48
Figura 20. Valores médios da concentração dos aminoácidos extraídos em acessos de cacana desenvolvidos em dois ambientes de produção: Estufa e Ar livre. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre as médias.	49
Anexo Figura 1. Cromatograma com os aminoácidos livres analisados.	70
Anexo Figura 2. Perfil da concentração dos aminoácidos livres em sete acessos de cacana.	71
Anexo Figura 3. Evolução das médias semanais da temperatura ao longo do ensaio realizado.	72
Anexo Figura 4. Comparação da forma da folha de cacana dos acessos 1, 2, 3 e 4 desenvolvidos dentro da estufa (D).	73

Índice de tabelas

Tabela 1. Resumo das condições experimentais para 3 métodos de extração em material vegetal.	27
Tabela 2. Caracterização das regiões de colheita de sementes.	31
Tabela 3. Percentagem de germinação obtida em diferentes tratamentos utilizados na quebra de dormência nas sementes de cacana.	41
Tabela 4. Comparação de médias da taxa fotossintética pelo teste de Duncan em sete acessos de cacana.	43
Tabela 5. Comparação pelo teste de Duncan dos valores médios da taxa de transpiração em sete acessos de cacana.	43
Tabela 6. Comparação pelo teste de Duncan dos valores médios da condutância estomática de sete acessos de cacana.	44
Tabela 7. Médias das concentrações subestomáticas de CO ₂ em sete acessos de cacana.	44
Tabela 8. Comparação dos valores médios da temperatura foliar de sete acessos de cacana.	45
Tabela 9. Comparação pelo teste de Duncan dos valores médios da eficiência de carboxilação de sete acessos de cacana.	45
Tabela 10. Comparação pelo teste de Duncan dos valores médios da altura das plantas em sete acessos de cacana no momento da colheita.	46

Tabela 11. Comparação de médias do Peso fresco total de sete acessos de cacana.	46
Tabela 12. Comparação de médias do peso individual do fruto de sete acessos de cacana.	46
Tabela 13. Comparação do número médio de frutos por planta de sete acessos de cacana.	46
Tabela 14. Comparação do comprimento médio dos frutos em sete acessos e cacana. .	47
Tabela 15. Diâmetro médio do fruto em sete acessos de cacana.	47
Tabela 16. Comparação do valor médio do peso seco total da planta de sete acessos de cacana.	47
Tabela 17. Médias da percentagem de matéria seca de sete acessos de cacana.	47
Tabela 18. Coeficientes de determinação e de variação para os 19 aminoácidos quantificados.	49
Tabela 19. Valores médios da concentração dos aminoácidos extraídos em sete acessos de cacana produzidos em estufa.	50
Tabela 20. Valores médios da concentração dos aminoácidos extraídos em sete acessos de cacana produzidos ao ar livre.	51
21. Valores médios da concentração dos aminoácidos extraídos em sete acessos de cacana produzidos ao ar livre.	51
Anexo Tabela 1. Comparação de médias semanais do crescimento em altura em sete acessos de cacana Duncan.	63
Anexo Tabela 2. Composição química aproximada dos nutrientes da folha de cacana, expressa em percentagem de matéria seca.	63
Anexo Tabela 3. Composição nutricional de elementos químicos da folha da cacana, expressa em miligramas por 100 gramas de Matéria seca.	64
Anexo Tabela 4. Concentração de aminoácidos totais em mg/g de Matéria seca das folhas de cacana.	64
Anexo Tabela 5. Composição nutricional de aminoácidos da cacana, expressos em grama por 100 de proteína.	65
Anexo Tabela 6. Principais metabolitos e função dos aminoácidos na nutrição e metabolismo.	66

Lista de equações

Equação 1. Modelos estatísticos das variáveis testadas.....	41
---	----

Lista de Unidades

3-MPA, ácido 3-mercaptopropiônico

AA, aminoácidos

CF, comprimento dos frutos

CV, coeficiente de variação

DF, diâmetro dos frutos

EAA, aminoácidos essenciais

FF, peso de fruto fresco

FMOC, Fluorenilmetiloxycarbonilo

FTIR, espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier

FV, peso fresco total da planta

HPLC, *High-Performance Liquid Chromatography*

HPLC-DAD, *High-Performance Liquid Chromatography with Diode-Array Detection*

LC-MS, cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa

MAbs, anticorpos monoclonais

MS, matéria seca

MSV, percentagem de matéria seca da planta

NaClO, hipoclorito de sódio

NF, número de frutos

OPA, *o*-ftalaldeído

pH, potencial hidrogeniônico

R², coeficiente de determinação

Rpm, rotações por minuto

SV, peso seco total da planta

TLC, *Thin Layer Chromatography*

UV, ultravioleta

Vpm, volume por milhão

1. Introdução

O uso de plantas para fins de saúde teve seu início há muito tempo atrás, podendo-se supor que tenha sido a primeira fonte no tratamento de doenças na era primitiva. Desde tempos remotos, as plantas têm sido usadas para suprir as necessidades de dissuasão e cura de moléstias em humanos e animais (Kidane, Gebremedhin, & Beyene, 2018).

A população dos países em via de desenvolvimento, ainda continua vulnerável a doenças de natureza infecciosa, não infecciosa e a carências. Por falta de assistência básica de saúde, são várias as mortes causadas por doenças evitáveis e curáveis. A prevalência das doenças é agravada pela limitação do pessoal médico, equipamentos, provisão de medicamentos, e dificuldade de acesso às unidades de saúde que na maioria das vezes distam a quilómetros de distância. Dados do Ministério da Saúde do ano 2015, indicam que o rácio médico/habitantes para o igual período era de um médico para 13500 habitantes (MASA, 2015), o que reflete uma autêntica situação de vulnerabilidade.

Moçambique, tal como grande parte dos países africanos, além da riqueza histórica e cultural, possui um enorme repositório de biodiversidade. Este repositório, serve de fonte para que cerca de 90% da população adquira alimentos e materiais para satisfazer as suas necessidades básicas de habitação, energia e saúde (Ribeiro, Romeiras, Tavares, & Faria, 2010).

À semelhança de outros países da África Subsaariana, cerca de 70% da população depende do uso de plantas medicinais para os cuidados primários de saúde (Bandeira, Gaspar, & Pagula, 2001). No caso particular de Moçambique, além da longa ligação tradicional do uso das plantas, a guerra civil que assolou o país durante 16 anos, período em que grande parte das infraestruturas foram destruídas, e a escassez de produtos era generalizada, fez com que a população estivesse fortemente dependente de plantas medicinais para atender as necessidades de cuidado de saúde, portanto, esta tendência ainda se verifica até aos dias atuais.

Diversos estudos reportam o conhecimento tradicional do uso terapêutico destas plantas e a sua relevância (Bandeira et al., 2001; Dai, 1997; Jansen & Mendes, 1990; Sambane & Mangu, 2000; Simone, 2001; Verzár & Petri, 1987).

Moçambique possui cerca de 5500 espécies identificadas, das quais cerca de 800 espécies têm uso medicinal (Krog, Falcão, & Olsen, 2006), demonstrando a grande importância desse repositório ao nível das comunidades. A *Momordica balsamina* L.

(cacana), representa uma das espécies mais usadas, sendo utilizada no tratamento de várias doenças, nomeadamente, diarreia, malária, febres, diabetes, doenças respiratórias, doenças transmitidas sexualmente, doenças do foro estomacal e diurético (Bandeira et al., 2001; Ribeiro et al., 2010). Para além do aproveitamento medicinal, as folhas e os frutos de cacana também são utilizados para confeção de alimentos, sobretudo na zona sul de Moçambique (Ernesto, 2006; Haber, Carvalho, Bowell, & Resende, 2015).

Apesar da grande importância tradicional já comprovada, com destaque no tratamento da malária (Ramalhe et al., 2010), que é a principal causa de morte em Moçambique, são escassos os estudos sobre a biodiversidade da *Momordica balsamina* L. nesse país, e consequentemente não estão identificadas as variedades produzidas nas diferentes regiões, nem as suas especificações agronómicas ou composição química.

2. Objetivos

A realização deste trabalho teve como objectivo:

Geral

- Estudar as características morfológicas, agronómicas e químicas (mais particularmente, o teor em aminoácidos livres) de *Momordica balsamina* L.

Específico

- I. Avaliar os parâmetros de crescimento nos acessos de cacana (altura da planta e tamanho do fruto);
- II. Determinar os parâmetros produtivos nos acessos de cacana (número de frutos, peso dos frutos e biomassa);
- III. Quantificar os parâmetros fisiológicos nos acessos de cacana (taxa fotossintética, taxa transpiratória, condutância estomática, concentração interna de CO₂, temperatura foliar e eficiência de carboxilação).
- IV. Comparar a concentração em aminoácidos livres produzidos em condições de estufa e ao ar livre.
- V. Identificar os acessos de cacana de maior qualidade e rendimento.

3. Revisão bibliográfica

3.1. Classificação taxonômica e morfológica

Momordica balsamina L. pertence ao género *Momordica* da família Cucurbitaceae, ordem Cucurbitales, classe Magnoliopsida, filo Magnoliphytas, reino Plantae. Possui diferentes nomenclaturas locais para além de “cacana” como é conhecida em Moçambique.

A cacana é uma planta perene herbácea, de crescimento prostrado ou trepadeira, cuja haste principal varia entre 1,5 a 3 metros de comprimento (Joseph, 2005). É uma espécie dioica, constituída por folhas alternas palmatiquinquelobadas, com gavinhas enroladas em espiral e situadas na parte superior da base do pecíolo, sem estípulas (Fig. 1A,B).



Figura 1. Estruturas vegetativas da cacana. A - Folhas e flor; B - Gavinhas e frutos.

As inflorescências apresentam-se de forma axilar, cimeira e bem definida. As flores são brancas, actimórficas, com o cálice quinquelobado e corola gamopétala campanulada. As flores masculinas possuem cinco estames livres, biloculares, alternados com cinco pétalas (Fig. 2A e B). O androceu com anteras discentes por uma fenda longitudinal, mas com filetes coalescentes. A flor feminina tem um único pistilo (gineceu), um ovário ínfero, com 3 carpelos e um lóculo com placentação parietal.

O fruto é uma baga de cor verde, quando imaturo, e vai variando de cor durante a maturação, de amarelo a vermelho (Fig. 2C). Possui pericarpo macio e numerosas sementes revestidas por uma película vermelha (Ernesto, 2006).

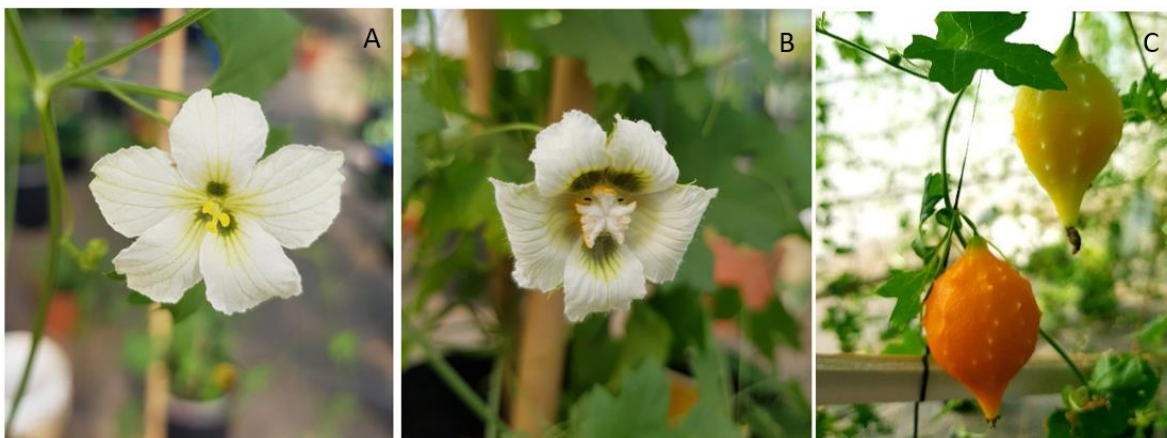


Figura 2. Estruturas reprodutivas da cacana. A - Flor feminina; B - Flor masculina; C –Fruto.

3.2. Origem e distribuição

As espécies do género *Momordica* encontram-se amplamente disseminadas e adaptadas a diversas regiões do globo, podendo ser encontradas sobretudo em áreas com predominância de clima tropical e subtropical da África, Ásia, Austrália, América central e sul (Jia, Shen, Zhang, & Xie, 2017; Madala, Piater, Dubery, & Steenkamp, 2016; Nagarani, Abirami, & Siddhuraju, 2014). Apesar da sua origem biogeográfica ser indicada por diversos investigadores a outros locais (Jia et al., 2017; Maulide Cane, 2012), estudos mais recentes indicam o leste asiático, entre a China e a Índia, como sendo o centro de biodiversidade genética da cacana (Nagarani et al., 2014).

3.3. Importância

Desde os tempos remotos, muitos dos medicamentos utilizados nos tratamentos de doenças e enfermidades tiveram a sua origem em plantas. Pode-se afirmar que o hábito de recorrer às virtudes curativas de certos vegetais se trata de uma das primeiras manifestações do antiquíssimo esforço do homem para compreender e utilizar a natureza como resposta para uma das suas mais antigas preocupações, aquela originada pela doença e pelo sofrimento (Cruz, Monteiro, & Brandelli, 2017).

Referências históricas das primeiras descrições do uso de plantas com fins terapêuticos foram escritas em cuneiforme e são originárias da Mesopotâmia e datam de 2.600 a.C., incluindo óleo de cedro (*Cedrus* sp.), alcaçuz (*Glycyrrhiza glabra*), mirra

(*Commiphora* sp.), papoila (*Papaver somniferum*), entre muitos outros derivados de drogas vegetais que ainda são utilizados no tratamento de doenças, como gripes, constipações e infeções bacterianas.

Na idade contemporânea, o progresso científico na área da química, permitiu analisar, identificar e separar os princípios ativos das plantas, constituindo o maior avanço a fitoterapia. A fitoterapia pode ser definida como a terapêutica caracterizada pelo uso de plantas medicinais em suas diferentes formas farmacêuticas, sem a utilização de substâncias ativas isoladas, ainda que de origem vegetal (Cruz Monteiro & Brandelli, 2017).

Actualmente, mais de 50% dos produtos medicinais utilizados em todo o mundo, têm origem nas plantas e produtos derivados, constituindo a fonte mais importante de medicamentos em uso (Thakur et al., 2009) com efeito profilático, atenuante ou curativo.

A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que cerca de 80% da população mundial, recorre a fitoterapia para algum aspeto da atenção primária à saúde. A fitoterapia é um dos principais componentes da medicina tradicional de todos os povos indígenas e um elemento comum na medicina ayurvédica, homeopática, naturopática, oriental tradicional e indígena (Bhushan, Rao, Ojha, Vijayakumar, & Verma, 2010). Em 2004, a produção e comercialização industrial de plantas medicinais foi estimada em mais de 60 biliões de dólares norte americanos, e devido à pronta disponibilidade, a sua popularidade mostrou um crescimento significativo em países desenvolvidos e uma contínua generalização nas regiões em desenvolvimento (WHO, 2004).

Tal como a maioria dos países da África austral, Moçambique possui uma vasta biodiversidade, que além de alimentos e matéria-prima para diversas atividades, contribui com mais de 800 espécies para uso em medicina tradicional moçambicana, sendo a cacana uma dessas espécies com extenso uso terapêutico.

A cacana tem sido utilizada na prevenção de doenças infecciosas, possui acção efetiva na cicatrização de feridas, tratamento de úlceras, controlo interno e externo de vermes e parasitas e no tratamento de febre e malária em Moçambique e na África do sul (Bandeira et al., 2001; Ramalhete et al., 2010). É também usada como emenagogo e antiviral para hepatite e sarampo (Grover & Yadav, 2004).

Na Índia, várias propriedades medicinais têm sido atribuídas a esta planta, incluindo antidiabético, abortivo, anti-helmíntico, contraceptivo, laxante, e é usado para tratamento de dismenorreia, eczema, galactagogo, gota, icterícia, pedra no rim, lepra, e leucorreia (Grover & Yadav, 2004).

Devido às suas propriedades nutricionais, todas as partes da planta são utilizadas na alimentação humana, sendo as folhas confeccionadas para preparação de guisado (caril); os frutos consumidos crus, cozidos, fritos ou em pickles; as sementes cozidas, fritas ou torradas e moídas servem de tempero; as raízes e flores também são comestíveis (Barraza, Benavides, & Aguilar, 2015). Estudos demonstram que as crianças que consomem regularmente a cacana como dieta suplementar, além de crescerem saudáveis, apresentam dentes saudáveis e unhas fortes (Ernesto, 2006).

3.4. Caracterização nutricional

A composição química da cacana pode variar em função da região em que é produzida, facto que é determinado pela combinação de diversos fatores, constando os tipos de solo, temperaturas médias, máximas e mínimas, precipitação, humidade relativa, entre outros elementos que compõem o clima (Maulide Cane, 2012).

A canana é caracterizada por possuir teores elevados de água, proteína, hidratos de carbono e fibra, minerais e vitaminas, e baixo teor em lípidos e valor energético (Anexo Tabela 2, 3, 4 e 5) (Maulide Cane, 2012).

Os constituintes químicos gerais da folha da cacana apresentados (Anexo Tabelas 2, 3, 4 e 5) não devem ser considerados como indicativos, uma vez que podem variar em função dos fatores edafolímáticos anteriormente referidos.

3.5. Propriedades terapêuticas

As plantas e seus derivados contribuem para mais de 50% de todos os medicamentos usados, sendo a fonte mais importante de medicamentos para salvar vidas para a maioria da população mundial. Devido às suas propriedades, a *Momordica balsamina* tem sido usada em diversos países. Thakur et al. (2009) refere a cacana como sendo uma planta maravilhosa para a ciência nutracêutica. Devido à sua adequada composição mineral e nutricional, com cerca de 17 aminoácidos, pode ser promovida como suplemento proteico para dietas à base de cereais em comunidades rurais. O seu elevado teor em potássio faz dela uma planta excelente para o controlo de hipertensão e doenças cardiovasculares. Bot et al. (2007) reportou atividade anti-HIV no extrato da polpa do fruto da cacana, com um aumento significativo de células CD4⁺. Testes realizados com extrato das folhas em ratos mostram eficácia de até 71,3% quando

comparado com pentazocina como medicamento padrão (Karumi, Onyeyili, & Ogugbuaja, 2003). Um estudo adicional reportou redução significativa do nível de glicose no sangue após administração de 500 e 1000 mg/kg de extrato bruto de cacana (Thakur et al., 2009).

Extratos de cacana com diferentes solventes mostraram atividade antibacteriana significativa contra *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa* e *P. mirabilis* (Jigam, Akanya, & Adeyemi, 2004; Karumi et al., 2003; Otimenyin, Uguru, & Ogbonna, 2008). Um bioensaio com novos compostos triterpenóides do tipo cucurbitano (balsaminois) identificados em extratos de cancana, mostraram atividade significativa contra *Plasmodium falciparum* (Ramalhete et al., 2010). Diversas propriedades terapêuticas têm sido atribuídas a essa planta, entre elas antidiarreica, atividade antioxidante, efeito hepatoprotetor e propriedade anti Shigelloides (Thakur et al., 2009).

3.6. Parâmetros de produção

Acredita-se que as espécies *Momordica ssp.* tenham sido originadas de regiões quentes, húmidas e áridas da África e da Ásia e, portanto, possuem exigências ecológicas em comum. Desenvolvem-se bem em áreas quentes e húmidas, mas também crescem bem no clima subtropical. No que diz respeito ao fotoperíodo, as espécies são quase neutras e crescem até uma altitude máxima de 1500 m. São sensíveis a geadas e ao estresse hídrico, que podem causar a morte dos caules em espécies anuais e dos bolbos em espécies perenes. Nas espécies perenes, os brotos novos emergem das raízes tuberosas após a cessação do inverno.

Em regiões de inverno rigoroso, as espécies de *Momordica* são cultivadas principalmente durante a primavera - verão, e em climas tropicais podem ser cultivadas durante todo o ano.

A germinação da semente, varia entre variedades, mas em geral ocorre na faixa de temperatura de 15 a 45° C (Singh, 1991).

A expressão sexual da inflorescência é afetada pelas condições ambientais (Qiaomei, Guangwen, & Youtiao, 1997), sendo os dias curtos determinantes na produção de flores femininas (Yonemori, 1985), e os dias longos na formação de flores masculinas, duas semanas antes da formação das flores femininas (Palada & Chang, 2003).

A faixa de temperatura ótima situa-se entre 25 e 30° C e a precipitação média anual requerida é de 1500 a 2500 mm para o crescimento e desenvolvimento favorável de

M. balsamina L. (Joseph, 2008; Ram, Banerjee, & Kalloo, 2002). Por sua vez, a espécie *M. sahyadrica* prefere uma temperatura média de 20 a 25 °C e uma precipitação média anual de 2.500 a 3.000 mm (John, 2004). O teor em acidez do fruto é condicionado pela temperatura mínima de 18°C durante o crescimento inicial (Larkcom, 1991), sendo descrito como temperatura ideal para desenvolvimento os 24-27°C (Desai & Musmade, 1998).

A planta prefere solos franco-arenosos, bem drenados, de profundidade de 50 a 150 cm, ricos em húmus ou matéria orgânica, com um pH de 6,0 a 6,5 (Bharathi & John, 2013). Embora a maioria das cucurbitáceas não tenha bom desempenho em solos ácidos, a *M. balsamina* desenvolve-se bem em solos ácidos com uma faixa de pH de 5,0 a 6,5 (John & Antony, 2008; Mishra & Sahu, 1983).

3.7. Identificação e caracterização de compostos

A ocorrência de extratos vegetais combinando vários tipos de compostos bioativos ou fitoquímicos com diferentes polaridades, ainda permanece um grande desafio para o processo de separação, identificação e caracterização de compostos bioativos. É uma prática comum no isolamento de compostos bioativos, o uso de diferentes técnicas de separação cromatográfica, para a obtenção de compostos puros. Os compostos puros são usados para a determinação da estrutura e da atividade biológica, e técnicas não-cromatográficas como imunoensaios que utilizam anticorpos monoclonais (MAbs), ensaios de triagem fitoquímica, espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), também podem ser utilizadas para obter e facilitar a identificação dos compostos bioativos (Sasidharan, Chen, Saravanan, Sundram, & Latha, 2011).

3.7.1. Métodos de extração

Na análise química das plantas medicinais, a extração é o primeiro passo crucial. Nesta fase, é necessário obter os componentes químicos desejados dos materiais vegetais para posterior separação e caracterização. A operação básica incluiu as seguintes etapas: pré-lavagem, secagem de materiais vegetais ou liofilização, moagem com o propósito de homogeneizar a amostra e consequentemente melhorar a extração os analitos, aumentando a superfície de contacto da amostra com o solvente(s) extrator(es). Além disso, os extratos vegetais podem ser preparados por maceração ou percolação de

plantas verdes frescas ou material vegetal em pó em água e/ou sistemas de solventes orgânicos (Sasidharan et al., 2011). Devem ser tomadas precauções para assegurar que potenciais constituintes ativos não sejam perdidos durante a preparação do extrato de amostras de plantas (Ernesto, 2006; Sasidharan et al., 2011).

Existem diferentes tipos de solventes usados para a extração dos compostos bioativos dos produtos naturais. A seleção do solvente depende em grande parte da natureza específica do composto alvo. Para a extração de compostos mais polares usam-se solventes como água, metanol, etanol ou acetato de etilo. Para a extração de compostos mais lipofílicos, pode utilizar-se diclorometano ou uma mistura de diclorometano/metanol na proporção de 1:1. Como os compostos-alvo podem ser apolares ou polares e termicamente instáveis, a adequação dos métodos de extração deve ser considerada e otimizada.

A Tabela 1 apresenta diferentes métodos de extração comumente usados para a extração de compostos bioativos em plantas (China, 2000; Pharmacopéia, 2001; United States Pharmacopéia and National Formulary, 2002) extração por Soxhlet, ultrassons e maceração.

Outras técnicas modernas de extração incluem microextração em fase sólida, extração com fluido supercrítico, extração com líquido pressurizado, extração assistida por micro-ondas, extração em fase sólida e técnicas mediadas por surfactante. Estas têm a vantagem da redução no consumo de solvente orgânico e na degradação da amostra, eliminação de etapas adicionais de limpeza e concentração da amostra antes da análise cromatográfica, melhoria na eficiência da extração, seletividade/cinética de extração, e facilidade de automação (Sasidharan et al., 2011).

Tabela 1. Resumo das condições experimentais para 3 métodos de extração em material vegetal

Condições	Extração por Soxhlet	Ultrassons	Maceração
Solventes	Metanol, etanol, ou mistura de álcool e água	Metanol, etanol, ou mistura de álcool e água	Metanol, etanol, ou mistura de álcool e água
Temperatura	Depende do solvente	—	Temperatura ambiente
Tempo (horas)	3-18 h	1 h	72-96 h
Volume solvente	150-200 ml	50-100 ml	Depende do tamanho da amostra
Referência	Huie (2002); Zygmunt and Namieśnik (2003)	Huie (2002); Zygmunt and Namieśnik (2003)	Phrompittayarat et al., 2007; Sasidharan et al., 2008; Cunha et al., 2004; Woisky et al., 1998

Fonte: (Sasidharan et al., 2011)

3.7.2. Cromatografia líquida

A cromatografia líquida é uma técnica de separação usada em diferentes áreas para auxiliar na identificação e quantificação de substâncias em várias matrizes. Esta técnica associada a vários modos de detecção tem sido amplamente utilizada para a determinação sensível e seletiva de quantidades vestigiais de compostos ativos em amostras (Gumustas, Kurbanoglu, Uslu, & Ozkan, 2013).

A cromatografia separa e distribui os compostos de uma mistura entre duas fases: móvel e estacionária (Simpson, 1976). A fase móvel (gás, líquido ou fluido supercrítico) juntamente com os compostos a separar, escoam em direção definida ao longo da fase estacionária. A fase estacionária é uma coluna composta por pequenas partículas porosas esféricas dotadas de um elevado potencial de separação. A fase móvel percorre a fase estacionária através dos poros existentes entre as partículas que compõem a mesma, promovendo a separação dos compostos da mistura através de interações químicas ou físicas (Simpson, 1976). Posteriormente, os compostos são identificados por um detetor localizado à saída da coluna cromatográfica (Porto, 2014). O detetor tem como finalidade identificar e representar na forma de um gráfico, designado por cromatograma, os compostos que percorreram a fase estacionária (Schwedt & Haderlie, 1997).

3.7.3. Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) é uma técnica versátil, robusta e amplamente utilizada para o isolamento de produtos naturais (Cannell, 1998). Frequentemente, o composto bioativo apresenta-se como componente minoritário do extrato, sendo o poder de resolução do HPLC o ideal para o processamento rápido de tais amostras compostas, tanto numa escala analítica como preparativa (Gumustas et al., 2013).

Muitos instrumentos de HPLC são de concepção modular, compostos por uma bomba de distribuição de solvente, injetor automático ou manual, coluna analítica, detetor e um software de tratamento de dados.

A identificação de compostos por HPLC é uma parte crucial de qualquer ensaio. Para identificar um composto usando esta técnica, primeiro é necessário selecionar um detetor. Uma vez o detetor selecionado, definem-se as condições ideais de detecção. O pico cromatográfico deve ter um tempo de retenção definido e deve estar bem separado dos restantes picos (Sasidharan et al., 2011).

Os detetores UV são os mais populares porque oferecem alta sensibilidade e também porque a maioria dos compostos de ocorrência natural absorvem na região do UV (Cannell, 1998; H.-B. Li, Jiang, & Chen, 2004). A alta sensibilidade destes detetores é vantajosa quando os compostos de interesse estão presentes em pequenas quantidades na amostra.

A cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa (LC-MS) também é uma técnica poderosa para a análise de extratos botânicos complexos (Cai, Lee, Wang, & Yu, 2002; He, 2000), fornecendo informações abundantes para a elucidação estrutural dos compostos quando a espectrometria de massa em tandem (MSn) é aplicada. Portanto, a combinação de HPLC e MS facilita a identificação rápida e precisa de compostos químicos em ervas medicinais, especialmente quando um padrão puro não se encontra disponível (Ye, Han, Chen, Zheng, & Guo, 2007).

O processamento de um material de origem bruto para fornecer uma amostra adequada para análise por HPLC, bem como a escolha do solvente para reconstituição de amostras, pode ter uma influência significativa no sucesso global do isolamento de produtos naturais. O material de origem (por exemplo, planta em pó) terá inicialmente de ser tratado de forma a assegurar que o composto de interesse seja eficientemente libertado na solução. No caso de material vegetal seco, um solvente orgânico (por

exemplo, metanol) pode ser usado como o método de extração inicial e após um período de maceração, o material sólido é então removido por decantação do extrato ou filtração. O filtrado é então concentrado e injetado no HPLC para separação (Sasidharan et al., 2011).

3.8. Aminoácidos (AA)

Os aminoácidos constituem a base da estrutura proteica e devido a variações nas cadeias laterais, possuem propriedades e funções bioquímicas notavelmente diferentes. Dos cerca de 200 que ocorrem na natureza, cerca de 20 estão ligados à formação de blocos proteicos. São precursores essenciais na síntese e regulação de diversas hormonas e substâncias de baixo peso molecular de grande importância biológica. Alguns têm um papel importante nas vias metabólicas, sendo fundamentais para a manutenção celular, crescimento, reprodução e imunidade do organismo (Wu, 2009) (Anexos Tabela 6, 7, 8 e 9).

Baseando-se nas necessidades biológicas, os aminoácidos são classificados como essenciais (AAE) e não essenciais. AAE são aqueles cuja estrutura não é sintetizada no organismo, ou são sintetizados em quantidades abaixo das necessidades e devem ser supridos através da dieta. Os aminoácidos não essenciais são aqueles que organismo pode sintetizar em quantidades satisfatórias para suprir as suas necessidades.

Frequentemente, a determinação do perfil dos aminoácidos através de diversas técnicas analíticas tem sido usada para o controlo de qualidade e autenticidade de diversos produtos naturais (Masondo & Makunga, 2019; Shen, Ying, Li, Zheng, & Zhuge, 2011; Wolfender, Marti, Thomas, & Bertrand, 2015). Sabe-se que as plantas medicinais contêm diversos compostos químicos, sintetizados em quantidades muito baixas e estão sujeitos a variações devido a fatores ambientais (Masondo & Makunga, 2019). Na China, o perfil dos aminoácidos livres tem sido usado para a identificação de plantas medicinais (J. Li, Zhao, Li, & He, 2019; Rainer, Qureshi, & Bonn, 2011). Esta técnica, além de possibilitar a discriminação do potencial medicinal dos genótipos, pode servir de confirmação para os tradicionais marcadores morfológicos de classificação taxonómica (Li et al., 2019).

No entanto, o uso do perfil dos aminoácidos livres associado aos descritores morfológicos e fisiológicos pode fornecer uma informação mais acurada, permitindo uma adequada discriminação dos acessos.

4. Material e métodos

4.1. Localização da área experimental

O ensaio foi conduzido no *Campus* Agrário de Vairão, da Universidade do Porto, localizado no conselho de Vila do Conde, cujas coordenadas geográficas são: Latitude: 41°19'35.87" N; Longitude: 8°40'32.46" W; Altitude: 86m) (Fig. 3).



Figura 3. Localização da área experimental

4.2. Caracterização dos genótipos

Os genótipos em estudo foram importados de Moçambique, tendo as sementes de cada acesso sido colhidas nas principais regiões de produção e consumo da cacana (Tabela 2; Fig. 5), do Sul (Quissico, Maciene, Chonguene, Duko e Vilankulos) e do Centro do país (Vanduzi, Beira e Tete).

No presente trabalho, a denominação Acessos é usada para caracterizar os genótipos provenientes de diferentes localidades (Tabela 2). No entanto, os acessos aqui descritos são constituídos por grupos de indivíduos da mesma espécie, colhidos de um germoplasma natural, desprovidos de caracteres agronómicos como identidade, uniformidade e estabilidade.

Tabela 2. Caracterização das regiões de colheita de sementes.

Genótipo	Localização	Localidade	Altitude (m)
Acesso 1	24°55'16.74"S; 34°05'17.34"E	Quissico	600
Acesso 2	25°01'41.23"S; 33°49'48.99"E	Maciene	400
Acesso 3	25°03'09.16"S; 33°46'46.22"E	Chongoene	300
Acesso 4	24°38'07.26"S; 34°58'01.82"E	Duco	100
Acesso 5	22°00'04.39"S; 35°13'42.49"E	Vilankulos	200
Acesso 6	19°02'55"S; 33°17'25"E	Vanduzi	600
Acesso 7	19°46'02.05"S; 34°53'30.12"E	Beira	100
Acesso 8	16°09'16.50"S; 33°36'24.29"E	Tete	200



Figura 5. Regiões de colheita dos acessos de cacana.

4.3. Condução do ensaio

O ensaio, constituído por 42 plantas de cacana, 6 plantas de cada um dos 7 acessos (o acesso 5 não germinou), teve o seu início em Março de 2019, com a germinação das sementes em placas de Petri. O procedimento consistiu na escarificação total das sementes de cada um dos 8 acessos, seguindo-se a desinfeção das mesmas com hipoclorito de sódio (NaClO) a 50% e passadas por água destilada 3 vezes para lavagem. Posteriormente, foram colocadas em placas de Petri, sobre papel de germinação, humedecidas e colocadas na câmara de germinação (Fig. 6A) a 26 °C e 16:8 horas de fotoperíodo. Após germinação, as sementes foram transferidas para alvéolos preenchidos de turfa negra durante 2 semanas para o crescimento inicial das plântulas, nas mesmas condições de temperatura e fotoperíodo e regadas diariamente (Fig. 6B).



Figura 6. Germinação de sementes de *Momordica balsamina* L.; A- Câmara de fotoclima, B - Plantúlas germinadas.

A escolha do método de germinação usado no presente trabalho, baseou-se nos resultados obtidos no teste de germinação previamente realizado, que consistiu na amostragem de 140 sementes de cacana submetidas a 7 tratamentos com 10 sementes cada e 2 réplicas. Os tratamentos aplicados foram os seguintes (Fig. 7 e 8): T₀ - controlo, sementes sem tratamento pré-germinativo; T₁ - imersão em ácido acético durante 48 horas; T₂ - embebição em água durante 24 horas; T₃ - embebição em água a 40°C durante 5 minutos; T₄ - embebição em água a 40°C durante 5 minutos + ½ escarificação; T₅ - embebição em água a 50°C durante 5 minutos; T₆ - embebição em água a 50°C durante 5 minutos + ½ escarificação; T₇ - escarificação total. O Tratamento T7 conduziu a uma maior percentagem de germinação das sementes de cacana e por conseguinte foi utilizado para quebrar a dormência da semente.



Figura 7. Tratamento para quebra de dormência de sementes de *Momordica balsamina* L.

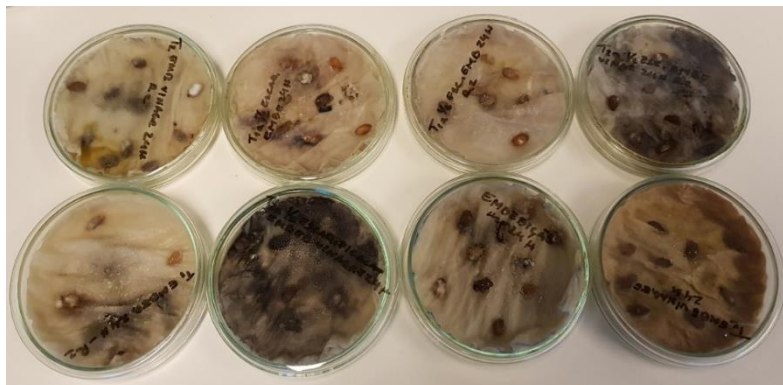


Figura 8. Sementes de cacana em diferentes tratamentos de quebra de dormência.

As plântulas foram transplantadas para vasos com capacidade de 9 litros, previamente preenchidos com substrato 1: (solo agrícola:turfa negra) e acrescidos 5 g de adubo 0-20-0. Para a aclimatização, as plantas permaneceram dentro da estufa, protegidos da radiação direta durante duas semanas, tendo sido posteriormente colocadas 42 plantas ao ar livre (AL) e 42 plantas dentro da estufa (E) (Fig. 9AL e 9E).

À medida que as plantas foram crescendo, estas foram tutoradas até a floração e maturação do fruto. O controlo da humidade do solo foi realizado duas vezes por semana. Foram realizados tratamentos contra *Toxoptera aurantii* (afídeo negro) e *Trialeurodes vaporariorum* (mosca branca) sempre que necessário. O controlo de infestantes foi realizado semanalmente através de monda manual.



Figura 9. Acessos de cacana L., AL – Ar livre; E- Estufa.

4.4. Observação e registo efetuados

Os dados foram recolhidos durante as fases vegetativa e reprodutiva das plantas e consistiu na quantificação dos seguintes parâmetros:

Registos semanais:

- ✓ Altura da planta (AP) – foi medido semanalmente o comprimento (m) da haste principal a partir da base do caule até ao meristema apical da ramificação maior;
- ✓ Taxa fotossintética;
- ✓ Taxa de transpiração;
- ✓ Condutância estomática;
- ✓ Concentração sub-estomática de CO₂;
- ✓ Temperatura foliar;
- ✓ Eficiência de carboxilação;

No momento da colheita:

- ✓ Peso fresco total da planta (FV) – peso médio (g) da parte vegetativa e radicular da planta;
- ✓ Peso fresco dos frutos por planta – peso médio (g) dos frutos colhidos;
- ✓ Número de frutos por planta – contagem do número médio de frutos colhidos;
- ✓ Comprimento do fruto – medição do comprimento médio (cm) do fruto;
- ✓ Diâmetro do fruto – medição do diâmetro médio (cm) do fruto;
- ✓ Peso seco total da planta (SV) – peso seco médio (g) da parte vegetativa e radicular da planta;
- ✓ Percentagem de matéria seca da planta.

As medições foram realizadas com recurso a uma fita métrica, um paquímetro digital (Fig. 10A; LIMIT, serial no. 036836) e uma balança analítica (Fig. 10B; Sartorius BP 221S).



Figura 10. Coleta de dados dos acessos de *Momordica balsamina* L.; A- Medição do comprimento do fruto; B - Pesagem do fruto.

Para a determinação da matéria seca, o peso fresco (Fig. 11A) foi registado antes das plantas terem sido colocadas a secar durante 72 horas a 65°C em uma estufa modelo Binder – FED 720. Depois da secagem (Fig. 11B) foi registado o peso seco das plantas.

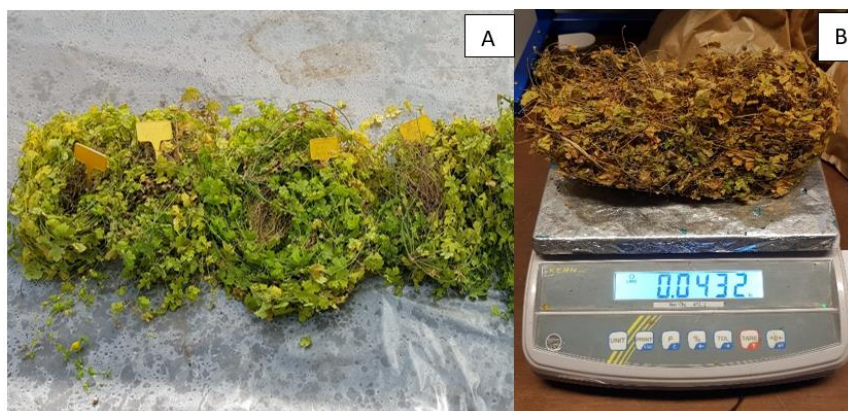


Figura 11. Determinação do teor em matéria seca. A- Pesagem da massa verde; B- Pesagem da massa seca.

Os indicadores fisiológicos foram medidos, utilizando um IRGA portátil (Fig. 12; Infrared Gás Analyzer; LCpro - SD, ADC BioScientific Ltd, série no. 33297). O aparelho foi calibrado para leitura com valores de PAR e temperatura da câmara de $1500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e 22°C, respetivamente, permanecendo os restantes parâmetros em condições ambiente. As medições foram realizadas na fase de floração/frutificação, semanalmente, durante 4 semanas, entre as 8 e 11 da manhã em duas folhas jovens completamente expandidas próximas ao fruto, e em 3 plantas de cada acesso.



Figura 12. Leitura de dados fisiológicos em acessos de cacana com o aparelho IRGA LCPro – SD

A recolha dos dados foi realizada somente nas plantas no interior da estufa, porque os acessos ao ar livre sofreram intempéries, resultando em reduzido desenvolvimento e morte da maioria das plantas. No acesso ao ar livre, foram somente colhidas folhas para a análise química.

4.5. Identificação e quantificação de aminoácidos

A análise química foi realizada no laboratório de Bromatologia e Hidrologia da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto.

4.5.1. Químicos e reagentes

O metanol e acetonitrilo para HPLC foram adquiridos na Merck; a água ultrapura foi tratada no desionizador Seralpur modelo PRO 90CN.

Os padrões usados foram adquiridos na Sigma-Aldrich (St. Louis, MA, USA) e foram os seguintes: L-ácido aspártico, L-ácido glutâmico, L-asparagina, L-serina, L-glutamina, L-histidina monoidroclorido monohidrato, L-glicina, L-treonina, L-arginina monoidroclorido, L-alanina, L-tirosina, L-cisteína, L-valina, L-metionina, L-triptofano, L-fenilalanina, L-isoleucina, L-leucina, L-lisina monoidroclorido, trans-4-hidroxi-L-prolina, e L-prolina. A L-norvalina foi utilizada como padrão interno.

4.5.2. Preparação das amostras

As amostras foram constituídas por folhas jovens, completamente expandidas e de tamanho uniforme, colhidas durante a fase vegetativa das plantas dentro e fora da estufa. Após colheita, foram colocadas em sacos plásticos devidamente identificados e transportadas de imediato numa caixa térmica para o laboratório, onde se retiraram alíquotas para determinação do teor de humidade. As restantes folhas foram congeladas a - 85°C e liofilizadas (Cryodos80, TELSTAR, Espanha)

Para determinar o teor de humidade, trituraram-se manualmente folhas frescas num almofariz de porcelana e colocaram-se numa balança de infravermelhos (KERN DBS60-3, Alemanha) (Fig. 13A). As amostras foram analisadas em triplicado.



Figura 13. A- Balança para determinação de teor de humidade; B-Liofilizador Telstar Cynodos 80

Após liofilizadas, as amostras foram pulverizadas num almofariz de porcelana (Fig. 14A, B), colocadas em recipiente plástico e hermeticamente seladas com parafilme.

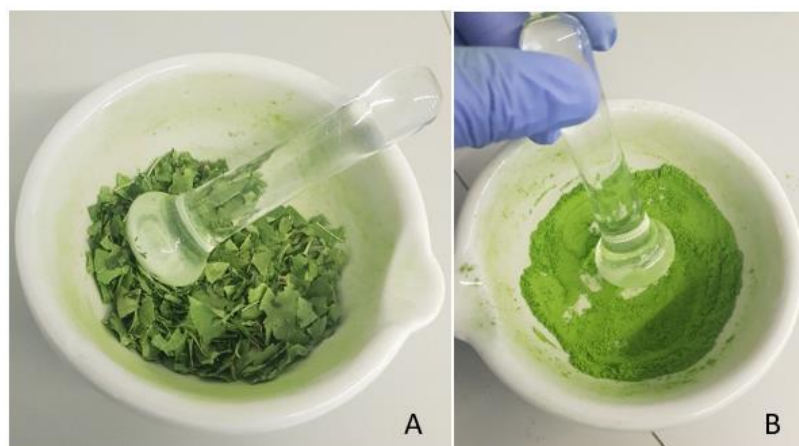


Figura 14. Amostras de *Momordica balsamina* L.; A - Folhas não inteiras, B- Folhas pulverizadas

4.5.3. Extração

Para a extração dos compostos analisados, pesaram-se 250 mg de amostra numa balança analítica (modelo 200-5CM, KERN AEJ, Alemanha), em triplicado, e adicionaram-se, a cada réplica, 10 ml de água ultrapura como solvente extrator. A extração foi realizada, durante 2 h, em placa com agitação magnética (modelo MS-H-S10, DRAGONLAB, China) aquecida a 40°C (Fig. 15 A). Após centrifugação (4500 rpm, HERAEUS, Alemanha) o sobrenadante foi retirado para outro tubo e o resíduo foi re-extraído com mais 10 ml de água desionizada, durante 1 h.



Figura 15. Extração das amostras. A - Placa magnética de agitação com temperatura controlada, B - Centrífuga Habraeus 4500rpm

O sobrenadante foi novamente recolhido e juntado ao anterior. Em seguida, transferiram-se 1500 µl de cada extrato *ependorfs* de 2 ml e centrifugaram-se a 13000 rpm numa centrífuga HERAEUS (Biofuge pico, Alemanha). A 990 µl do sobrenadante juntaram-se 10 µl de norvalina (2 mg/ml) e a mistura foi derivatizada automaticamente num injetor automático AS-4150 (Jasco, Japão) para análise do perfil de aminoácidos livres.

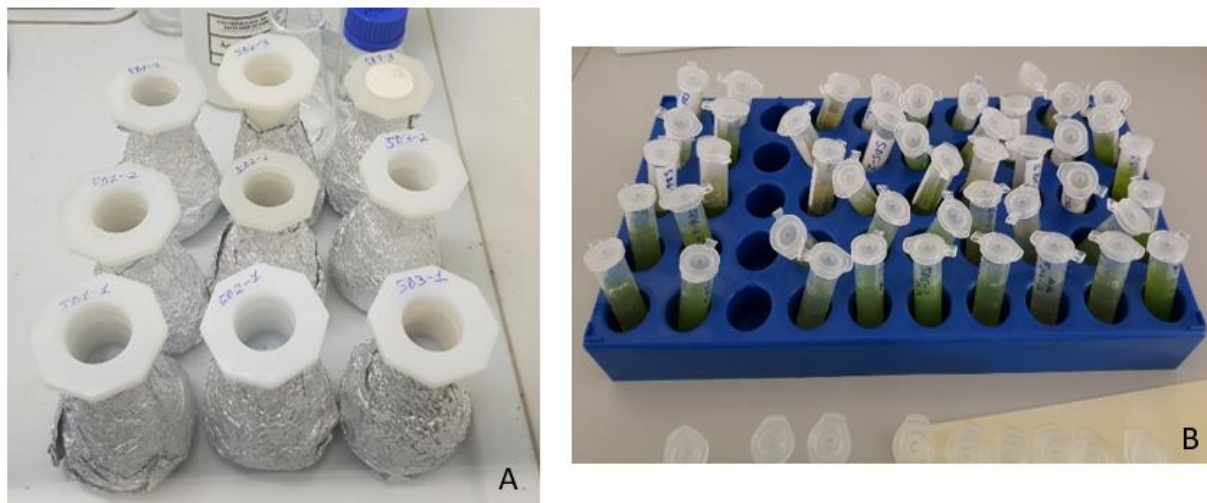


Figura 16. Preparação de extratos de *Momordica balsamina* L., A – Matrazes contendo extratos em triplicado de 3 plantas; B – Eppendorfs contendo extratos

4.5.4. Quantificação de aminoácidos livres

A determinação dos aminoácidos foi realizada através de um sistema integrado HPLC (Jasco, Japão; Fig. 17) composto por duas bombas Jasco PU-980 Plus, um injetor automático Jasco AS-4150 e um detetor de fluorescência Jasco FP-2020 (0-26,5 min: $\lambda_{exc}=340$ nm, $\lambda_{em}=450$ nm; 26,5-45 min: $\lambda_{exc}=266$ nm, $\lambda_{em}=305$ nm). A derivatização automática online (Jasco AS-4150) com os reagentes OPA/3-MPA e FMOC (para derivatização de amins primárias e secundárias, respetivamente) foi realizada de acordo com Henderson and Brooks (2010). O volume de injeção do extrato derivatizado foi de 3 µl. A separação dos componentes foi realizada numa coluna plus ZORBAX Eclipse Plus C18 (4,6 x 250 mm, 5 µm, Agilent Technologies) num forno de aquecimento Jones Chromatography (modelo 7981), com temperatura programada para 40°C.

A fase móvel foi constituída pela solução (A), uma mistura de tampão fosfato e borato (10 mM, pH 8.2) e a solução (B), uma mistura de água, metanol e acetonitrilo (10:45:45 v/v/v), com o seguinte gradiente 0,85' 2% B, 33,4' 57% B, 33,50' 85% B, 39,3' 85% B, 39,4' 2% B, 40' 2% B, com fluxo de 1,5 mL/min.



Figura 17. Sistema integrado de HPLC Jasco.

Os aminoácidos foram identificados através da comparação dos tempos de retenção com padrões puros. A quantificação foi realizada através do método do padrão interno. Para o tratamento dos dados foi usado o software ChromNAV (Jasco, Japão).

A título de exemplo, o Anexo Figura 1 apresenta um cromatograma de uma mistura contendo todos os padrões.

4.6. Análise estatística

Os dados apresentados neste trabalho, foram estatisticamente analisados pelo programa SAS University Edition, sendo testadas as médias a um nível de significância de 5% pelo teste de Duncan. Tendo em conta a natureza da sua apresentação, as variáveis foram analisadas em dois diferentes modelos, os quais são representados nas seguintes equações:

Equação 1. Modelos estatísticos das variáveis testadas

Variáveis agronómicas

$$Y = A + Plt;$$

Y = variável dependente;

A = acesso (i= 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8);

Plt = planta (j = 1, 2, 3, 4, 5, 6);

ε = erro.

Observações semanais

$$Y = A + Plt + S + A*Plt + A*S + Plt*S$$

Y = variável dependente;

A = acesso (i= 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8);

Plt = planta (j = 1, 2, 3, 4, 5, 6);

S = semana (k = 1, 2, ..., 29);

ε = erro.

5. Resultados

5.1. Teste de germinação

Na Tabela 3 são apresentados os resultados dos testes de germinação realizados com os diferentes métodos para a quebra de dormência das sementes de cacana.

Tabela 3. Percentagem de germinação obtida em diferentes tratamentos utilizados na quebra de dormência nas sementes de cacana.

Tratamento	Percentagem de germinação (%)
Embebição em ácido acético + 48h T1	0
Banho maria a 40°C + 5min T3	12
Banho maria a 40°C + 5min + 1/2 escarificação T4	22
Embebição em água 24h + 1/2 escarificação	24
Banho maria a 50°C + 5min T5	34
Controlo* T0	36
Embebição em água + 24h T2	48
Banho maria a 50°C + 5min + 1/2 escarificação T6	54
Escarificação Total	72

*Sementes germinadas sem tratamento prévio, n = 10 .

5.2. Descrição dos registos semanais

Nos registos semanais dos indicadores fisiológicos, as leituras das semanas 1, 2, 3 e 4, correspondem às datas de 10/6, 17/6, 24/6, e 1/07 de 2019, respetivamente.

5.2.1. Altura da planta

A Figura 18 apresenta as curvas de crescimento sigmoide de 6 acessos de plantas de cacana durante 15 semanas. No Anexo Tabela 1, observa-se a comparação das médias semanais do crescimento em altura dos acessos.

O modelo apresenta um coeficiente de determinação (R^2) de 0,96 e um coeficiente de variação de 15%. Foram encontradas diferenças significativas ($p < 0,01$) nas variáveis independentes semana e planta e na interação acesso x semana.

Verifica-se que nas semanas 9 e 10, o crescimento em todos os acessos foi menos expressivo, passando a partir da semana 11 a ter um crescimento acelerado até à semana 20. Foram registadas, na última semana do ensaio, como a maior e menor média das alturas 2,95 m e 2,44 m nos acessos 6 e 4, respetivamente.

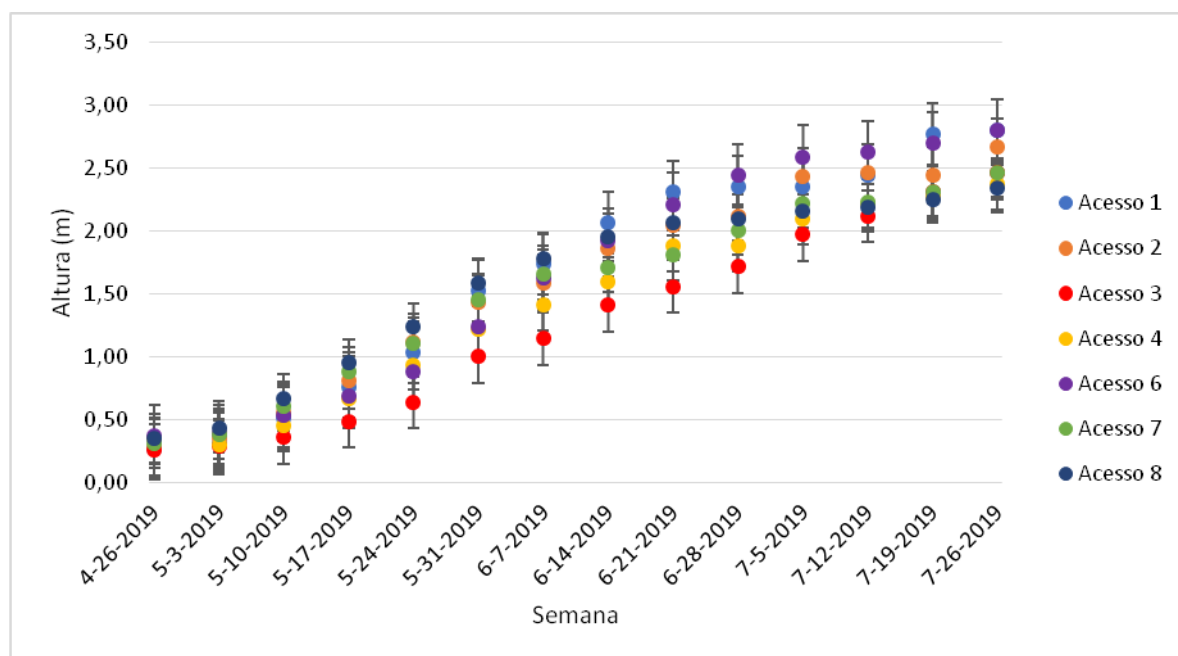


Figura 18. Evolução média semanal na altura de sete acessos de cacana ao longo de 14 semanas.

5.2.2. Taxa fotossintética

O modelo testado apresentou diferenças estatísticas na taxa fotossintética, tendo como coeficientes de determinação e variação de 0,67 e 40%, respetivamente. Verificaram-se diferenças significativas entre os acessos, as semanas e na interação entre os acessos e as semanas (Tabela 4). A maior e a menor média registadas foram de 16,12 $\mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$ e 2,59 $\mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$ nos acessos 3 e 6 nas semanas 3 e 4, respetivamente.

Tabela 4. Comparação de médias da taxa fotossintética pelo teste de Duncan em sete acessos de cacana.

Semana	Taxa fotossintética ($\mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$)						
	Acesso						
	1	2	3	4	6	7	8
10 junho	9,48 $\pm$ 1,54 ^{ab}	9,24 $\pm$ 1,97 ^{ab}	12,00 $\pm$ 6,67 ^a	8,72 $\pm$ 2,19 ^{ab}	8,57 $\pm$ 1,97 ^{ab}	9,58 $\pm$ 3,34 ^a	3,97 $\pm$ 0,46 ^c
17 junho	4,83 $\pm$ 1,26 ^b	6,72 $\pm$ 1,55 ^b	16,12 $\pm$ 2,34 ^a	4,27 $\pm$ 0,05 ^b	4,40 $\pm$ 2,02 ^b	3,70 $\pm$ 1,13 ^b	6,64 $\pm$ 6,21 ^b
23 junho	2,71 $\pm$ 0,80 ^b	4,52 $\pm$ 1,58 ^b	5,84 $\pm$ 0,64 ^{ab}	9,85 $\pm$ 4,96 ^a	2,59 $\pm$ 1,40 ^b	6,45 $\pm$ 4,88 ^{ab}	3,74 $\pm$ 0,88 ^b
1 julho	7,14 $\pm$ 2,35 ^a	5,10 $\pm$ 1,68 ^a	5,12 $\pm$ 1,96 ^a	4,09 $\pm$ 0,81 ^a	4,27 $\pm$ 0,81 ^a	4,17 $\pm$ 1,29 ^a	6,67 $\pm$ 0,73 ^a

Letras diferentes significam diferenças entre as médias (Duncan, $p < 0,05$)

5.2.3. Taxa de transpiração

O modelo testado apresentou diferenças significativas para a taxa de transpiração. Os coeficientes de determinação e variação foram de 0,73 e 28%, respetivamente ($p < 0,01$). Foram encontradas diferenças significativas para as variáveis acesso, semana e interação entre os acessos e as semanas. A maior e menor média foram de 2,67 $\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$ e 0,68 $\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$ registadas nos acessos 3 e 1 nas semanas 2 e 3 respetivamente (Tabela 5).

Tabela 5. Comparação pelo teste de Duncan dos valores médios da taxa de transpiração em sete acessos de cacana.

Semana	Taxa de transpiração ($\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$)						
	Acesso						
	1	2	3	4	6	7	8
10 junho	1,93 $\pm$ 0,35 ^{ab}	2,07 $\pm$ 0,46 ^a	2,22 $\pm$ 1,04 ^a	2,10 $\pm$ 0,38 ^a	1,87 $\pm$ 0,23 ^{ab}	2,19 $\pm$ 0,30 ^a	1,03 $\pm$ 0,01 ^b
17 junho	0,86 $\pm$ 0,14 ^b	1,30 $\pm$ 0,36 ^b	2,67 $\pm$ 0,08 ^a	0,98 $\pm$ 0,03 ^b	0,95 $\pm$ 0,18 ^b	0,94 $\pm$ 0,16 ^b	1,21 $\pm$ 0,64 ^b
23 junho	0,68 $\pm$ 0,26 ^b	1,12 $\pm$ 0,29 ^{ab}	1,22 $\pm$ 0,09 ^{ab}	1,75 $\pm$ 0,76 ^a	0,75 $\pm$ 0,09 ^b	1,33 $\pm$ 0,71 ^{ab}	1,05 $\pm$ 0,10 ^{ab}
1 julho	1,06 $\pm$ 0,23 ^b	1,12 $\pm$ 0,44 ^b	1,15 $\pm$ 0,35 ^b	1,13 $\pm$ 0,23 ^b	1,00 $\pm$ 0,13 ^b	1,15 $\pm$ 0,21 ^b	1,93 $\pm$ 0,41 ^a

Letras diferentes significam diferenças entre as médias (Duncan, $p < 0,05$).

5.2.4. Condutância estomática

O modelo testado apresentou diferenças significativas para a concentração estomática. Os coeficientes de determinação e variação foram de 0,75 e 42 %

respetivamente. Encontraram-se diferenças significativas ($p < 0,05$) para as variáveis acesso, semana e a interação entre o acesso e semana. A maior e a menor média foram verificadas nos acessos 3 e 6 com valores de $0,24 \text{ mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$ e $0,0324 \text{ mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$ nas semanas 2 e 3 respetivamente (Tabela 6).

Tabela 6. Comparação pelo teste de Duncan dos valores médios da condutância estomática de sete acessos de cacana.

Semana	Condutância estomática ($\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$)						
	Acesso						
	1	2	3	4	6	7	8
10 junho	$0,15 \pm 0,05^a$	$0,16 \pm 0,06^a$	$0,17 \pm 0,12^a$	$0,16 \pm 0,05^a$	$0,13 \pm 0,02^a$	$0,16 \pm 0,04^a$	$0,07 \pm 0,01^a$
17 junho	$0,04 \pm 0,01^c$	$0,09 \pm 0,03^b$	$0,24 \pm 0,01^a$	$0,06 \pm 0,01^{bc}$	$0,05 \pm 0,02^{bc}$	$0,04 \pm 0,01^c$	$0,07 \pm 0,05^{bc}$
23 junho	$0,04 \pm 0,02^b$	$0,05 \pm 0,02^b$	$0,08 \pm 0,01^{ab}$	$0,12 \pm 0,07^a$	$0,03 \pm 0,01^b$	$0,07 \pm 0,05^b$	$0,04 \pm 0,00^{ab}$
1 julho	$0,06 \pm 0,02^b$	$0,06 \pm 0,02^b$	$0,05 \pm 0,02^b$	$0,04 \pm 0,01^b$	$0,04 \pm 0,01^b$	$0,07 \pm 0,02^b$	$0,13 \pm 0,04^a$

Letras diferentes significam diferenças entre as médias (Duncan, $p < 0,05$)

5.2.5. Concentração subestomática de CO_2

O modelo testado não encontrou diferenças significativas para a subestomática de CO_2 . Os coeficientes de determinação e variação foram de 0.44 e 12 % respetivamente (Tabela 7).

Tabela 7. Médias das concentrações subestomáticas de CO_2 em sete acessos de cacana.

Semana	Concentração subestomática de CO_2 (vpm)						
	Acesso						
	1	2	3	4	6	7	8
10 junho	243 ± 10^{ab}	248 ± 19^{ab}	225 ± 24^b	253 ± 4^{ab}	235 ± 13^{ab}	233 ± 19^{ab}	260 ± 10^a
17 junho	199 ± 21^a	230 ± 23^a	210 ± 26^a	247 ± 6^a	236 ± 42^a	220 ± 24^a	215 ± 62^a
23 junho	258 ± 63^a	232 ± 18^a	240 ± 6^a	205 ± 5^a	268 ± 43^a	227 ± 30^a	220 ± 26^a
1 julho	191 ± 37^a	234 ± 20^{abc}	207 ± 11^{bc}	225 ± 48^{abc}	203 ± 16^c	266 ± 12^a	261 ± 33^{ab}

Letras diferentes significam diferenças entre as médias (Duncan, $p < 0,05$)

5.2.6. Temperatura foliar

O modelo testado apresentou diferenças significativas para a temperatura foliar. Os coeficientes de determinação e de variação foram de 0,96 e 0,5% respetivamente. Encontraram-se diferenças significativas ($p < 0,01$) para as variáveis acesso, semana e interação entre os acessos e as semanas. A maior e menor média foram de $29,57^\circ\text{C}$ e $27,37^\circ\text{C}$ registadas nos acessos 9 e 1 nas semanas 1 e 4 respetivamente (Tabela 8).

Tabela 8. Comparação dos valores médios da temperatura foliar de sete acessos de cacana.

Semana	Temperatura foliar (°C)						
	Acesso						
	1	2	3	4	6	7	8
10 junho	29,4 ± 0,06 ^b	29,3 ± 0,06 ^b	28,3 ± 0,10 ^d	29,5 ± 0,06 ^a	29,6 ± 0,06 ^a	29,5 ± 0,10 ^a	28,5 ± 0,06 ^c
17 junho	28,0 ± 0,55 ^e	28,1 ± 0,12 ^{de}	29,4 ± 0,06 ^a	28,5 ± 0,06 ^{cd}	28,6 ± 0,06 ^{bc}	29,1 ± 0,06 ^{ab}	28,8 ± 0,21 ^{bc}
23 junho	27,7 ± 0,20 ^e	28,8 ± 0,12 ^{bc}	28,3 ± 0,06 ^d	28,6 ± 0,06 ^c	28,8 ± 0,10 ^{bc}	28,9 ± 0,06 ^b	29,2 ± 0,00 ^a
1 julho	27,4 ± 0,15 ^e	27,9 ± 0,26 ^d	29,0 ± 0,00 ^b	28,9 ± 0,00 ^b	28,9 ± 0,00 ^b	28,6 ± 0,06 ^c	29,5 ± 0,00 ^a

Letras diferentes significam diferenças entre as médias (Duncan, $p < 0,05$).

5.2.7. Eficiência de Carboxilação

O modelo testado apresentou diferenças significativas para a eficiência de carboxilação. Os coeficientes de determinação e variação foram de 0,58 e 52 % respetivamente. Encontraram-se diferenças significativas ($p < 0,05$), para as variáveis, semana e interação entre acessos e as semanas. A maior e menor média foram de 0,0782 mol.m⁻²s⁻¹ e 0,0104 mol.m⁻².s⁻¹ nos acessos 3 e 6 nas semanas 2 e 3 respetivamente (Tabela 9).

Tabela 9. Comparação pelo teste de Duncan dos valores médios da eficiência de carboxilação de sete acessos de cacana.

Semana	Eficiência de carboxilação (mol.m ⁻² .s ⁻¹)						
	Acesso						
	1	2	3	4	6	7	8
10 junho	0,04 ± 0,01 ^{ab}	0,04 ± 0,01 ^{ab}	0,05 ± 0,03 ^a	0,03 ± 0,01 ^{ab}	0,04 ± 0,01 ^{ab}	0,05 ± 0,01 ^a	0,02 ± 0,00 ^b
17 junho	0,02 ± 0,01 ^b	0,03 ± 0,01 ^b	0,08 ± 0,02 ^a	0,02 ± 0,00 ^b	0,02 ± 0,01 ^b	0,02 ± 0,01 ^b	0,04 ± 0,05 ^b
23 junho	0,01 ± 0,01 ^b	0,02 ± 0,01 ^b	0,02 ± 0,00 ^{ab}	0,05 ± 0,02 ^a	0,01 ± 0,01 ^b	0,03 ± 0,03 ^{ab}	0,02 ± 0,01 ^b
1 julho	0,04 ± 0,02 ^a	0,02 ± 0,01 ^{ab}	0,03 ± 0,01 ^{ab}	0,02 ± 0,01 ^b	0,02 ± 0,01 ^{ab}	0,02 ± 0,01 ^b	0,03 ± 0,01 ^{ab}

Letras diferentes indicam diferenças entre as médias (Duncan, $p < 0,05$).

5.3. Descrição dos registos de produção

No Anexo Tabela 4 e 5, são apresentadas imagens comparativas das folhas dos sete acessos de cacana, no qual pode ser feita uma análise comparativa dos recortes das folhas de entre os acessos.

5.3.1. Altura da planta

O modelo testado apresentou diferenças significativas ($p < 0,05$), tendo os coeficientes de determinação e variação sido 0,95 e 15 %, respetivamente (Tabela 10).

Tabela 10. Comparação pelo teste de Duncan dos valores médios da altura das plantas em sete acessos de cacana no momento da colheita.

Altura da planta (m)						
Acesso 1	Acesso 2	Acesso 3	Acesso 4	Acesso 6	Acesso 7	Acesso 8
2,9 ± 0,53 ^a	2,9 ± 0,40 ^a	2,8 ± 0,27 ^a	2,4 ± 0,48 ^a	3,0 ± 0,09 ^a	2,5 ± 0,43 ^a	2,6 ± 0,05 ^a

Letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre as médias (Duncan, $p < 0,05$).

5.3.2. Peso fresco total da planta (FV)

O modelo testado não apresentou diferenças estatísticas ($p < 0,05$), tendo os coeficientes de determinação e variação sido 0,37 e 76 %, respetivamente (Tabela 11).

Tabela 11. Comparação de médias do Peso fresco total de sete acessos de cacana.

Peso fresco total da planta (g)						
Acesso 1	Acesso 2	Acesso 3	Acesso 4	Acesso 6	Acesso 7	Acesso 8
152 ± 12 ^a	183 ± 46 ^a	137 ± 28 ^a	164 ± 34 ^a	217 ± 36 ^a	219 ± 41 ^a	360 ± 392 ^a

Letras diferentes significam diferenças entre as médias (Duncan, $p < 0,05$)

5.3.3. Peso individual dos frutos

O modelo testado não apresentou diferenças significativas ($p < 0,05$), tendo os coeficientes de determinação e variação sido de 0,38 e 70 %, respetivamente (Tabela 12).

Tabela 12. Comparação de médias do peso individual do fruto de sete acessos de cacana.

Peso individual dos frutos (g)						
Acesso 1	Acesso 2	Acesso 3	Acesso 4	Acesso 6	Acesso 7	Acesso 8
10 ± 6,14 ^a	4,5 ± 3,19 ^a	3,1 ± 2,78 ^a	4,1 ± 1,41 ^a	4,0 ± 2,47 ^a	3,9 ± 3,21 ^a	5,1 ± 2,08 ^a

Letras diferentes significam diferenças entre as médias (Duncan, $p < 0,05$)

5.3.4. Número de frutos por planta

O modelo testado não apresentou diferenças significativas ($p < 0,05$), tendo os coeficientes de determinação e variação sido 0,44 e 67 %, respetivamente (Tabela 13).

Tabela 13. Comparação do número médio de frutos por planta de sete acessos de cacana.

Número de frutos por planta						
Acesso 1	Acesso 2	Acesso 3	Acesso 4	Acesso 6	Acesso 7	Acesso 8
3,7 ± 3,67 ^a	3,8 ± 2,63 ^a	3,0 ± 3,22 ^a	8,7 ± 2,58 ^a	4,3 ± 2,88 ^a	2,8 ± 3,19 ^a	5,8 ± 3,92 ^a

Letras diferentes significam diferenças entre as médias (Duncan, $p < 0,05$)

5.3.5. Comprimento dos frutos

O modelo testado não apresentou diferenças significativas ($p < 0,05$), tendo os coeficientes de determinação e variação sido 0,26 e 73 %, respetivamente (Tabela 14).

Tabela 14. Comparação do comprimento médio dos frutos em sete acessos e cacana.

Comprimento dos frutos (mm)						
Acesso 1	Acesso 2	Acesso 3	Acesso 4	Acesso 6	Acesso 7	Acesso 8
43,6 ± 0,13 ^a	36,1 ± 24,32 ^a	29,6 ± 23,79 ^a	30,8 ± 15,77 ^a	29,4 ± 23,46 ^a	14,8 ± 23,09 ^a	49,8 ± 24,40 ^a

Letras diferentes significam diferenças entre as médias (Duncan, $p < 0,05$)

5.3.6. Diâmetro do fruto

Não foram encontradas diferenças significativas no modelo proposto ($p < 0,05$), tendo os coeficientes de determinação e variação sido 0,41 e 62 %, respetivamente (Tabela 15).

Tabela 15. Diâmetro médio do fruto em sete acessos de cacana.

Diâmetro do fruto (mm)						
Acesso 1	Acesso 2	Acesso 3	Acesso 4	Acesso 6	Acesso 7	Acesso 8
19,4 ± 8,15 ^a	23,7 ± 1,37 ^a	13,7 ± 10,93 ^a	17,6 ± 8,69 ^a	14,6 ± 11,40 ^a	7,2 ± 11,16 ^a	26,7 ± 12,48 ^a

Letras diferentes significam diferenças entre as médias (Duncan, $p < 0,05$)

5.3.7. Peso seco total da planta (SV)

O modelo testado não apresentou diferenças significativas ($p < 0,05$), tendo os coeficientes de determinação e variação sido 0,65 e 19 %, respetivamente (Tabela 16).

Tabela 16. Comparação do valor médio do peso seco total da planta de sete acessos de cacana.

Peso seco total da planta (g)						
Acesso 1	Acesso 2	Acesso 3	Acesso 4	Acesso 6	Acesso 7	Acesso 8
55,5 ± 12,50 ^{ab}	64,1 ± 5,87 ^a	50,5 ± 8,28 ^{ab}	54,0 ± 14,61 ^{ab}	68,3 ± 12,96 ^a	63,8 ± 3,95 ^a	37,6 ± 13,94 ^b

Letras diferentes significam diferenças entre as médias (Duncan, $p < 0,05$)

5.3.8. Percentagem de matéria seca da planta

O modelo testado não apresentou diferenças significativas ($p < 0,05$), tendo os coeficientes de determinação e variação sido de 0,53 e 24 % respetivamente (Tabela 17).

Tabela 17. Médias da percentagem de matéria seca de sete acessos de cacana.

Matéria seca (%)						
Acesso 1	Acesso 2	Acesso 3	Acesso 4	Acesso 6	Acesso 7	Acesso 8
36,3 ± 6,84 ^a	35,7 ± 5,68 ^a	37,9 ± 10,48 ^a	32,7 ± 2,07 ^a	31,4 ± 1,08 ^a	29,7 ± 4,68 ^a	23,3 ± 17,81 ^a

Letras diferentes significam diferenças entre as médias (Duncan, $p < 0,05$)

5.4. Descrição dos resultados dos aminoácidos

Foi utilizado um método cromatográfico no laboratório de Bromatologia da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, para a identificação e quantificação dos aminoácidos livres em 7 acessos de cacana.

A extração dos aminoácidos livres foi efetuada usando água desionizada e agitação magnética durante 2h, seguida de re-extração durante 1 h, tendo sido testadas duas temperaturas diferentes: 40 °C e temperatura ambiente.

De uma maneira geral, as concentrações de aminoácidos mais elevadas foram obtidas com a extração a 40 °C, com exceção apenas para a treonina (não se observaram diferenças significativas) e o triptofano (maior extração à temperatura ambiente) (Fig. 19). Assim, o método de extração com temperatura a 40 °C foi escolhido para aplicação nas restantes amostras.

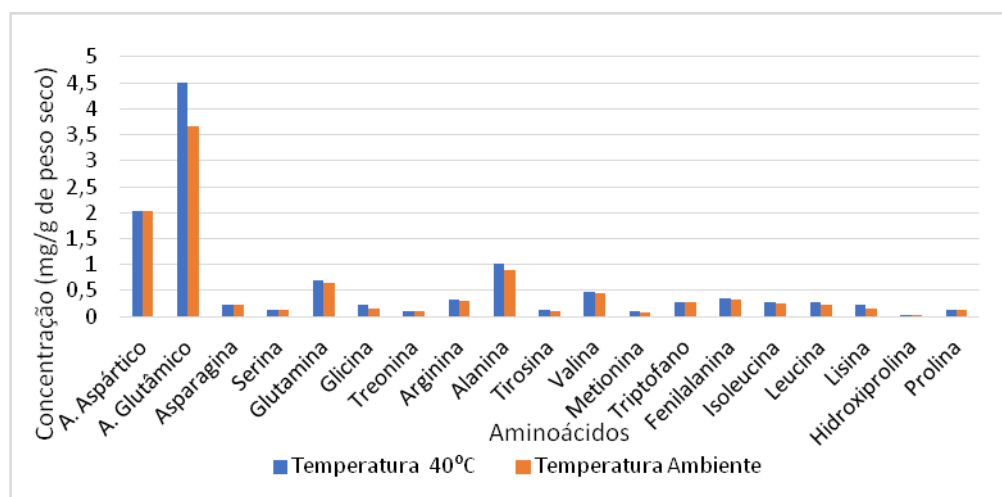


Figura 19. Concentração dos aminoácidos obtidos em diferentes condições de extração: 3 horas em água a 40 °C e 3 horas em água a temperatura ambiente.

5.4.1. Quantificação dos aminoácidos Livres

O modelo testado apresentou diferenças estatísticas ($p < 0,01$) para as variáveis Local e Acesso, sendo os coeficientes de determinação e variação apresentados na tabela 18.

Tabela 18. Coeficientes de determinação e de variação para os 19 aminoácidos quantificados.

A. Aspártico	R ² =0,46 CV = 23% p<0,01	Arginina	R ² =0,40 CV = 34% p<0,01	Fenilalanina	R ² =0,33 CV = 30% p<0,01
A. Glutâmico	R ² =0,46 CV = 28% p<0,01	Alanina	R ² =0,43 CV = 29% p<0,01	Isoleucina	R ² =0,41 CV = 25% p<0,01
Asparagina	R ² =0,44 CV = 19% p<0,01	Tirosina	R ² =0,40 CV = 34% p<0,01	Leucina	R ² =0,46 CV = 32% p<0,01
Serina	R ² =0,68 CV = 75% p<0,01	Valina	R ² =0,46 CV = 24% p<0,01	Lisina	R ² =0,44 CV = 34% p<0,01
Glutamina	R ² =0,37 CV = 44% p<0,01	Metionina	R ² =0,36 CV = 21% p<0,01	Hidroxiprolina	R ² =0,37 CV = 15% p<0,01
Histidina	R ² =0,20 CV = 60% p<0,01	Triptofano	R ² =0,33 CV = 39% p<0,01	Prolina	R ² =0,37 CV = 447% p<0,01
Glicina	R ² =0,28 CV = 31% p<0,01				

Na figura 20, são comparadas as médias das concentrações dos aminoácidos nos acessos produzidos em dois ambientes, estufa e ar livre. No entanto, pode se verificar que o ácido Glutâmico apresentou maior concentração em relação a outros aminoácidos, em ambos os ambientes de produção, sendo a média mais alta de 2,1787 mg/g de aminoácidos por peso seco, obtida nos acessos produzidos na estufa.

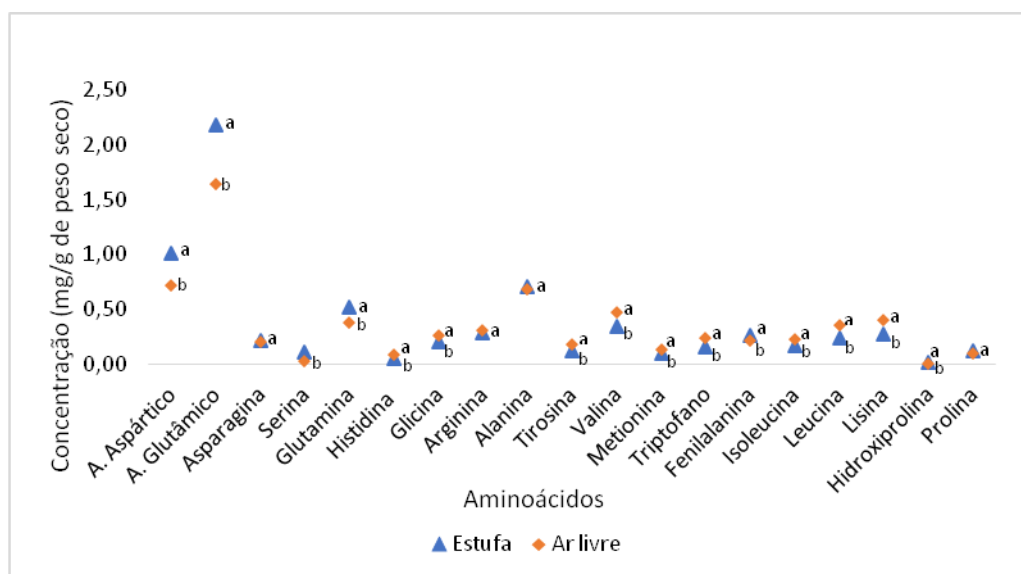


Figura 20. Valores médios da concentração dos aminoácidos extraídos em acessos de cacana desenvolvidos em dois ambientes de produção: Estufa e Ar livre. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre as médias.

Na Tabela 29, são apresentadas e comparadas (Duncan, $p < 0,05$) as médias das concentrações obtidas em 19 aminoácidos extraídos dos sete acessos produzidos em estufa.

Tabela 19. Valores médios da concentração dos aminoácidos extraídos em sete acessos de cacana produzidos em estufa.

Aminoácido	Concentração (mg/g de peso seco)						
	Acesso 1	Acesso 2	Acesso 3	Acesso 4	Acesso 6	Acesso 7	Acesso 8
A. Aspártico	0,94 ± 0,15 ^{cd}	1,03 ± 0,26 ^{bc}	1,12 ± 0,27 ^{ab}	1,24 ± 0,14 ^a	1,19 ± 0,27 ^{ab}	0,86 ± 0,16 ^d	0,68 ± 0,21 ^e
A. Glutâmico	1,65 ± 0,14 ^d	2,27 ± 0,37 ^{bc}	2,85 ± 0,87 ^a	2,64 ± 0,56 ^{ab}	2,50 ± 0,85 ^{abc}	2,11 ± 0,29 ^c	1,31 ± 0,45 ^d
Asparagina	0,20 ± 0,01 ^c	0,19 ± 0,03 ^c	0,26 ± 0,06 ^a	0,23 ± 0,04 ^b	0,23 ± 0,05 ^b	0,20 ± 0,03 ^c	0,15 ± 0,01 ^d
serina	n.d	n.d	n.d	0,12 ± 0,00 ^a	0,06 ± 0,06 ^b	0,01 ± 0,04	0,02 ± 0,05 ^c
Glutamina	0,46 ± 0,11 ^b	0,43 ± 0,16 ^b	0,78 ± 0,38 ^a	0,63 ± 0,17 ^a	0,64 ± 0,24 ^a	0,46 ± 0,17 ^b	0,24 ± 0,09 ^c
Histidina	0,04 ± 0,04 ^b	0,05 ± 0,02 ^{ab}	0,05 ± 0,05 ^{ab}	0,07 ± 0,02 ^a	0,07 ± 0,04 ^a	0,05 ± 0,04 ^{ab}	0,04 ± 0,02 ^b
Glicina	0,19 ± 0,03 ^b	0,17 ± 0,04 ^b	0,25 ± 0,08 ^a	0,25 ± 0,05 ^a	0,26 ± 0,09 ^a	0,18 ± 0,04 ^b	0,16 ± 0,10 ^b
Arginina	0,23 ± 0,03 ^{cd}	0,21 ± 0,02 ^{cd}	0,45 ± 0,21 ^a	0,32 ± 0,06 ^b	0,33 ± 0,10 ^b	0,27 ± 0,07 ^{bc}	0,18 ± 0,02 ^d
Alanina	0,61 ± 0,06 ^{de}	0,57 ± 0,07 ^e	0,96 ± 0,22 ^a	0,89 ± 0,25 ^{ab}	0,81 ± 0,28 ^{bc}	0,73 ± 0,15 ^{cd}	0,39 ± 0,12 ^f
Tirosina	0,11 ± 0,03 ^{bcd}	0,20 ± 0,01 ^{cd}	0,15 ± 0,06 ^a	0,15 ± 0,05 ^a	0,13 ± 0,05 ^{ab}	0,12 ± 0,04 ^{bc}	0,08 ± 0,03 ^d
Valina	0,31 ± 0,06 ^{cd}	0,29 ± 0,04 ^{cd}	0,44 ± 0,13 ^a	0,39 ± 0,08 ^a	0,39 ± 0,09 ^{ab}	0,33 ± 0,07 ^{bc}	0,25 ± 0,06 ^d
Metionina	0,11 ± 0,02 ^{ab}	0,11 ± 0,03 ^{ab}	0,12 ± 0,02 ^a	0,10 ± 0,02 ^{ab}	0,11 ± 0,02 ^{ab}	0,10 ± 0,02 ^b	0,08 ± 0,01 ^c
Triptofano	0,20 ± 0,08 ^a	0,14 ± 0,04 ^c	0,18 ± 0,05 ^{ab}	0,19 ± 0,05 ^{ab}	0,13 ± 0,03 ^c	0,15 ± 0,09 ^{bc}	0,14 ± 0,03 ^c
Fenilalanina	0,21 ± 0,05 ^{bc}	0,17 ± 0,02 ^{cd}	0,27 ± 0,09 ^a	0,27 ± 0,06 ^a	0,24 ± 0,09 ^{ab}	0,20 ± 0,05 ^c	0,14 ± 0,03 ^d
Isoleucina	0,16 ± 0,01 ^c	0,16 ± 0,03 ^c	0,21 ± 0,06 ^a	0,20 ± 0,04 ^a	0,19 ± 0,05 ^{ab}	0,17 ± 0,04 ^{bc}	0,13 ± 0,03 ^d
Leucina	0,20 ± 0,03 ^{bc}	0,19 ± 0,03 ^{bc}	0,33 ± 0,12 ^a	0,28 ± 0,08 ^a	0,29 ± 0,09 ^a	0,22 ± 0,06 ^b	0,15 ± 0,03 ^c
Lisina	0,23 ± 0,04 ^{bc}	0,21 ± 0,03 ^{bc}	0,38 ± 0,14 ^a	0,34 ± 0,11 ^a	0,33 ± 0,11 ^a	0,25 ± 0,06 ^b	0,17 ± 0,05 ^c
Hidroxiprolina	0,01 ± 0,00 ^{ab}	0,01 ± 0,00 ^{cd}	0,02 ± 0,00 ^a	0,02 ± 0,00 ^a	0,01 ± 0,00 ^{abc}	0,01 ± 0,00 ^{bcd}	0,01 ± 0,00 ^d
Prolina	0,08 ± 0,01 ^b	0,08 ± 0,02 ^b	0,15 ± 0,05 ^a	0,14 ± 0,06 ^a	0,14 ± 0,07 ^a	0,08 ± 0,02 ^b	0,04 ± 0,01 ^c

Letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre as médias. n.d. — não detetável.

Na Tabela 20, são apresentadas e comparadas (Duncan, $p < 0,05$) as médias das concentrações obtidas em 19 aminoácidos extraídos de sete acessos produzidos ao ar livre.

Tabela 20. Valores médios da concentração dos aminoácidos extraídos em sete acessos de cacana produzidos ao ar livre.

Aminoácido	Concentração (mg/g de peso seco)						
	Acesso 1	Acesso 2	Acesso 3	Acesso 4	Acesso 6	Acesso 7	Acesso 8
Aspártico	0,78 ± 0,09 ^{ab}	0,84 ± 0,08 ^a	0,87 ± 0,06 ^a	0,44 ± 0,02 ^c	0,70 ± 0,01 ^b	0,86 ± 0,02 ^a	0,40 ± 0,01 ^c
Glutâmico	1,60 ± 0,25 ^c	2,33 ± 0,06 ^b	3,14 ± 0,11 ^a	0,77 ± 0,04 ^d	1,16 ± 0,03 ^{cd}	1,71 ± 0,62 ^c	0,72 ± 0,02 ^d
Asparagina	0,20 ± 0,04 ^b	0,29 ± 0,00 ^a	0,29 ± 0,01 ^a	0,19 ± 0,00 ^b	0,17 ± 0,00 ^{bc}	0,21 ± 0,04 ^b	0,15 ± 0,00 ^c
Serina	0,13 ± 0,00 ^{bc}	n.d	0,13 ± 0,01 ^b	0,12 ± 0,00 ^{cd}	0,12 ± 0,00 ^d	0,14 ± 0,00 ^a	0,12 ± 0,00 ^{cd}
Glutamina	0,34 ± 0,03 ^c	0,94 ± 0,01 ^a	0,73 ± 0,04 ^b	0,19 ± 0,01 ^d	0,14 ± 0,00 ^{de}	0,32 ± 0,11 ^c	0,08 ± 0,00 ^e
Histidina	0,08 ± 0,01 ^{bc}	0,15 ± 0,00 ^a	0,07 ± 0,00 ^{bc}	0,06 ± 0,00 ^c	0,07 ± 0,01 ^{bc}	0,11 ± 0,05 ^{ab}	0,04 ± 0,01 ^c
Glicina	0,28 ± 0,02 ^b	0,37 ± 0,01 ^a	0,36 ± 0,03 ^a	0,19 ± 0,01 ^d	0,23 ± 0,00 ^c	0,23 ± 0,03 ^c	0,18 ± 0,01 ^d
Arginina	0,30 ± 0,09 ^b	0,49 ± 0,01 ^a	0,44 ± 0,03 ^a	0,29 ± 0,01 ^b	0,18 ± 0,01 ^c	0,30 ± 0,05 ^b	0,17 ± 0,00 ^c
Alanina	0,64 ± 0,06 ^c	1,19 ± 0,01 ^a	1,10 ± 0,04 ^b	0,46 ± 0,01 ^d	0,51 ± 0,02 ^d	0,67 ± 0,06 ^c	0,31 ± 0,01 ^e

Letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre as médias. n.d. – não detetável.

21. Valores médios da concentração dos aminoácidos extraídos em sete acessos de cacana produzidos ao ar livre.

Aminoácido	Concentração (mg/g de peso seco)						
	Acesso 1	Acesso 2	Acesso 3	Acesso 4	Acesso 6	Acesso 7	Acesso 8
Tirosina	0,16 ± 0,07 ^{bcd}	0,26 ± 0,00 ^a	0,24 ± 0,03 ^a	0,19 ± 0,02 ^{abc}	0,12 ± 0,01 ^{cd}	0,21 ± 0,06 ^{ab}	0,11 ± 0,01 ^d
Valina	0,46 ± 0,06 ^{bc}	0,66 ± 0,02 ^a	0,66 ± 0,03 ^a	0,44 ± 0,02 ^c	0,32 ± 0,01 ^d	0,52 ± 0,06 ^b	0,26 ± 0,01 ^d
Metionina	0,12 ± 0,03 ^{bc}	0,17 ± 0,01 ^a	0,18 ± 0,01 ^a	0,13 ± 0,00 ^b	0,10 ± 0,00 ^{cd}	0,13 ± 0,02 ^b	0,09 ± 0,00 ^d
Triptofano	0,37 ± 0,05 ^a	0,25 ± 0,00 ^{abc}	0,18 ± 0,01 ^{bc}	0,18 ± 0,01 ^{bc}	0,11 ± 0,00 ^c	0,31 ± 0,17 ^{ab}	0,11 ± 0,00 ^c
Fenilalanina	0,25 ± 0,07 ^b	0,40 ± 0,00 ^a	0,32 ± 0,03 ^b	0,28 ± 0,01 ^b	0,15 ± 0,00 ^c	0,31 ± 0,05 ^b	0,14 ± 0,00 ^c
Isoleucina	0,24 ± 0,06 ^b	0,32 ± 0,00 ^a	0,33 ± 0,03 ^a	0,23 ± 0,01 ^b	0,14 ± 0,00 ^c	0,23 ± 0,05 ^b	0,12 ± 0,01 ^c
Leucina	0,34 ± 0,12 ^b	0,52 ± 0,00 ^a	0,52 ± 0,05 ^a	0,36 ± 0,02 ^b	0,21 ± 0,01 ^c	0,38 ± 0,09 ^b	0,19 ± 0,00 ^c
Lisina	0,35 ± 0,14 ^{cd}	0,55 ± 0,01 ^{ab}	0,64 ± 0,06 ^a	0,39 ± 0,03 ^{bc}	0,22 ± 0,01 ^d	0,45 ± 0,12 ^{bc}	0,22 ± 0,01 ^d
Hidroxiprolina	0,01 ± 0,00 ^b	0,01 ± 0,00 ^b	0,01 ± 0,00 ^c	0,01 ± 0,00 ^a	0,01 ± 0,00 ^c	0,01 ± 0,00 ^b	0,01 ± 0,00 ^c
Prolina	0,11 ± 0,04 ^b	0,22 ± 0,01 ^a	0,18 ± 0,02 ^a	0,12 ± 0,00 ^b	0,06 ± 0,01 ^c	0,12 ± 0,03 ^b	0,05 ± 0,01 ^c

Letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre as médias. n.d. – não detetável.

6. Discussão

De uma maneira geral, as plantas mostraram uma tendência semelhante no crescimento. O baixo crescimento inicial verificado em todos os acessos pode ser explicado pelo facto das plantas terem sofrido durante o transplante apesar de terem sido colocadas em aclimação durante uma semana. A partir da semana 11 (06 a 12 de maio) com a subida da temperatura (Anexo Fig. 3) e o aumento do número de horas de luz, verificou-se um rápido crescimento em todos os acessos. Esta resposta foi confirmada por Went (1953), afirmando a importância da temperatura, luz e humidade, como fatores importantes no crescimento e desenvolvimento das plantas. O crescimento médio em altura verificado em todos os acessos no momento da colheita que variaram entre 1,5 e 3 metros de altura, estão de acordo com os valores registados por Joseph (2005).

As diferenças nas taxas fotossintéticas registadas entre os acessos podem ser explicadas pelo facto de os acessos serem provenientes de regiões com diferentes condições agroclimáticas, portanto, sendo expectável que as mesmas respondam aos estímulos externos de formas diferentes. A elevada taxa verificada na semana 1, poderá ser explicada pela combinação de fatores ambientais e morfológicos, como ótimas temperaturas e a presença de estruturas já desenvolvidas como raízes e folhas, os quais jogam um papel importante na realização da fotossíntese (Farquhar & Sharkey, 1982). No entanto, o acesso 3 revelou-se com maior capacidade fotossintética, em especial nas semanas 1 e 2 correspondentes as datas de 10/06 e 17/06. Na semana 3 (24/06), verificou-se uma maior irregularidade nas taxas, com o acesso 4 a registar o maior valor. No entanto, na semana 4 (01/07) os valores foram menos irregulares, não havendo diferenças entre os acessos.

As taxas transpiratórias tiveram ligeiras variações entre os acessos, sendo a grande diferença registada na semana 1 (10/06), tendo o acesso 3 registado a maior média. Esta tendência verificada na semana 1, pode ser explicada pela combinação de fatores climáticos, incluindo a subida da temperatura, o que favorece uma maior perda de água por transpiração Farquhar and Sharkey (1982). No entanto, nas semanas 3 (24/06) e 4 (01/07), os acessos 4 e 8 passaram a ter maiores taxas transpiratórias respetivamente.

A condutância estomática mostrou-se irregular ao longo das semanas, assim como entre os acessos, tendo a semana 1 (10/06) registado maiores trocas gasosas em

relação a outras. Nas semanas 1 e 2 (10/06 e 17/06) o acesso 3 mostrou-se mais efetivo ao registrar maiores médias quando comparado com outros acessos, tendo contrariado estas tendências nas semanas seguintes. Nas semanas 3 e 4 (24/06 e 01/07, respetivamente), os acessos 4 e 8 registaram os maiores valores. A tendência verificada para este indicador foi similar ao da taxa fotossintética e de transpiração, tal como observado por Machado, Medina, Gomes, and Habermann (2002), o que sugere que a redução da fotossíntese resulta da diminuição da transpiração induzido pelo fechamento parcial dos estomas. Portanto, os resultados observados a partir da semana 2 (17/06), remete-nos à hipótese de existir um fechamento gradual dos estomas, levando a uma diminuição da transpiração, afetando negativamente a fotossíntese, decurso desse período.

Os acessos mostraram muita irregularidade na temperatura foliar, tanto entre as semanas como entre os acessos, com destaque para as semanas 2, 3 e 4 (10/06, 17/06 e 24/06), o que sugere uma maior variação na temperatura exterior nesse período, exercendo uma grande influência nos padrões das temperaturas no interior da estufa. A maior temperatura foliar foi verificada no acesso 6 na semana 1 (10/06), tendo reduzido na semana 2 (17/06) e aumentado parcialmente nas restantes. O acesso 8 mostrou tendência contrária dos demais acessos, aumentado ao longo das semanas, e terminando com a média mais alta da semana 4 (01/07), o que não é expectável, uma vez que a condutância estomática aumentou e consequentemente a taxa transpiratória. De acordo com Jones et al. (2009) o aumento da condutância reduz a temperatura foliar pelo aumento da taxa transpiratória. O acesso 1 mostrou tendência decrescente, registrando o valor mais baixo para a temperatura foliar na semana 4, o que também não era de esperar (Jones et al., 2009). A temperatura da folha é o resultado da interação de vários fatores ambientais simultâneos que interagem com a folha em determinado grau por várias propriedades da planta (Farquhar & Sharkey, 1982; Gates, 1968), dos quais a transpiração é o principal mediador. No entanto, as temperaturas registadas nos acessos nas 4 semanas de leitura, contrariaram o aumento da temperatura em função do fechamento dos estomas, segundo Jones et al. (2009).

Embora menos expressivo, a eficiência de carboxilação dos acessos seguiu a mesma tendência da taxa fotossintética. O acesso 3 manteve-se com as maiores taxas, crescendo nas semanas 1 e 2 (10/06 e 17/06), e estabilizando com valores mais baixos nas semanas seguintes. Contrariando a tendência, no geral o acesso 8 registou menor eficiência comparado aos restantes acessos.

A eficiência do uso da água foi ligeiramente regular entre os acessos na semana 1 e bastante irregular nas outras semanas. Durante as semanas 1 e 2 (10/06 e 17/06), o acesso 1 mostrou melhor eficiência comparado a outros acessos, sendo que na semana 3 (24/06) a melhor taxa foi registada pelo acesso 4. Na semana 4 (01/07) foram verificados valores bastante próximos, tendo a maior média o acesso 1. De modo geral, o acesso 3 registou maiores taxas na eficiência do uso da água, tendo se mantido sempre acima da média dos acessos.

No peso fresco total da planta, embora se tenha verificado grandes variações entre as médias dos acessos, não foram encontradas diferenças significativas mediante diferenças existentes entre as plantas de cada acesso, o que é expetável acontecer em germoplasma. Esta interpretação é extensiva aos demais indicadores de produção que não registaram diferenças estatísticas no modelo testado. De registar que o acesso 8 atingiu o maior peso fresco total da planta, embora o maior crescimento em altura tenha se verificado no acesso 6.

No que toca ao perfil de aminoácidos, foi encontrado diferenças na sua concentração. Esta diferença verificou-se tanto nos acessos desenvolvidos dentro da estufa como ao ar livre. Na produção em estufa foram encontradas maiores teores para o ácido aspártico, ácido glutâmico, glutamina e hidroxiprolina. Para a produção ao ar livre, registaram-se maiores concentrações nos aminoácidos serina, histidina, glicina, tirosina, valina, metionina, triptofano, isoleucina, leucina e lisina, sendo os restantes aminoácidos indiferentes do local de produção.

Na produção em estufa, verificou-se que a maior concentração foi do ácido glutâmico, obtido no acesso 3, seguido do ácido aspártico pelo acesso 4. A menor concentração foi do aminoácido prolina, registado no acesso 8. No entanto, os maiores teores observados nos acessos produzidos ao ar livre foram o ácido aspártico, seguindo-se da alanina, nos acessos 3 e 2, respetivamente. Em ambos os ambientes, a ácido aspártico foi o constituinte maioritário para todos os acessos estudados. Na produção em estufa, o acesso 3 registou maior concentração total dos aminoácidos, sendo que ao ar livre, essa tendência foi contrariada pelo acesso 2 que registou a maior concentração.

De modo geral, verificou-se uma maior concentração dos aminoácidos nos acessos produzidos ao ar livre. No entanto, as plantas estabelecidas nestas condições estiveram diretamente expostas as condições ambientais e mais suscetíveis ao stresse biótico e abiótico. Schäfer and Wink (2009) e Zaynab et al. (2018) sugerem que em

resposta a condições de stresse, as plantas alteram o seu metabolismo passando a produzir maiores concentrações de metabolitos secundários que têm como função principal a proteção da planta, incluindo a absorção de radiação UV, ataques de pragas e doenças, efeitos alelopáticos, antioxição e reforço da parede celular. No entanto, a maioria destes compostos são sintetizados pela via fenilpropanoide, que tem como precursor o aminoácido fenilalanina (Oliva et al., 2019; Yoshikawa et al., 2018) e tirosina (Vogt, 2010). Em condições de stresse as plantas alteram a atividade da enzima fenilalanina amoniase, resultando uma maior acumulação de fenilperopanoides (McConn, Creelman, Bell, & Mullet, 1997).

7. Conclusão

Não foram encontradas diferenças nos indicadores morfológicos quantificados, no entanto, uma análise visual do aspeto da folha sugere que existem diferenças entre os acessos.

Os acessos mostram diferenças significativas nos indicadores fisiológicos e químicos.

O acesso 3 teve o melhor desempenho na taxa fotossintética, taxa de transpiração, condutância estomática, eficiência de carboxilação, eficiência do uso da água e matéria seca.

No que concerne a produção dos frutos, os acessos não tiveram diferenças, no número, no do peso, no comprimento e no diâmetro dos frutos.

Em condições de produção em estufa como ao ar livre, os acessos mostraram diferenças na concentração dos aminoácidos livres, tendo a maior concentração em produção ao ar livre. O ácido glutâmico foi o aminoácido que teve maior concentração, tendo sido registado em condições de estufa.

Nas condições de produção em estufa, o acesso 3, originário da localidade de Chongoene, obteve a maior concentração de aminoácidos livres, enquanto em ambiente de produção ao ar livre, o acesso 2, proveniente da localidade de Maciene, obteve a maior concentração de aminoácidos livres.

As plantas de cacana desenvolvidas em condições de estufa, produziram elevadas concentrações de 4 aminoácidos livres, nomeadamente, ácido aspártico, ácido glutâmico, glutamina e hidroxiprolina; e as desenvolvidas ao ar livre, produziram elevadas

concentrações de 11 aminoácidos livres, sendo a serina, histidina, glicina, tirosina, valina, metionina, triptofano, fenilalanina, isoleucina, leucina e lisina. O grupo de 4 aminoácidos livres, asparagina, arginina, alanina, e prolina não tiveram diferenças nas concentrações em ambos ambientes de produção.

No que diz respeito ao consumo, o acesso 3 originário Chongoene, revelou ser o melhor ao ter a maior matéria seca e maiores concentrações de aminoácidos livres.

8. Referências bibliográficas

- Bandeira, S. O., Gaspar, F., & Pagula, F. P. (2001). African ethnobotany and healthcare: emphasis on Mozambique. *Pharmaceutical Biology*, 39(sup1), 70-73.
- Barraza, F. V., Benavides, O., & Aguilar, Y. T. (2015). Análisis de crecimiento del cultivo de balsamina *Momordica charantia* L. en semillero. *Revista de Ciencias Agrícolas*, 32(1), 24-37.
- Bharathi, L. K., & John, K. J. (2013). *Momordica Genus in Asia-An Overview*. Springer.
- Bhushan, M. S., Rao, C., Ojha, S., Vijayakumar, M., & Verma, A. (2010). An analytical review of plants for anti diabetic activity with their phytoconstituent & mechanism of action. *Int J Pharm Sci Res*, 1(1), 29-46.
- Bot, Y., Mgbojikwe, L., Nwosu, C., Abimiku, A., Dadik, J., & Damshak, D. (2007). Screening of the fruit pulp extract of *Momordica balsamina* for anti HIV property. *African journal of Biotechnology*, 6(1).
- Cai, Z., Lee, F., Wang, X., & Yu, W. (2002). A capsule review of recent studies on the application of mass spectrometry in the analysis of Chinese medicinal herbs. *Journal of Mass Spectrometry*, 37(10), 1013-1024.
- Cannell, J. (1998). Natural products isolation Human Press. Totawa, New Jersy. pp-560.
- China, P. o. t. P. s. R. o. (2000). The Pharmacopeia Commission of PRC.
- Cruz Monteiro, S., & Brandelli, C. L. C. (2017). *Farmacobotânica: Aspectos Teóricos e Aplicação*: Artmed Editora.
- Dai, M. d. L. (1997). *Estudo dos padrões de uso de plantas medicinais na localidade de Catembe*. Universidade Eduardo Mondlane.
- Desai, U., & Musmade, A. (1998). Pumpkins, squashes, and gourds *Handbook of Vegetable Science and Technology* (pp. 291-354): CRC Press.
- Ernesto, M. M. (2006). *Composição química de extractos da Momordica balsamina cultivada em Moçambique*. Universidade de Aveiro.
- Farquhar, G. D., & Sharkey, T. D. (1982). Stomatal conductance and photosynthesis. *Annual review of plant physiology*, 33(1), 317-345.
- Gates, D. M. (1968). Transpiration and leaf temperature. *Annual Review of Plant Physiology*, 19(1), 211-238.
- Grover, J., & Yadav, S. (2004). Pharmacological actions and potential uses of *Momordica charantia*: a review. *Journal of ethnopharmacology*, 93(1), 123-132.

- Gumustas, M., Kurbanoglu, S., Uslu, B., & Ozkan, S. A. (2013). UPLC versus HPLC on drug analysis: advantageous, applications and their validation parameters. *Chromatographia*, 76(21-22), 1365-1427.
- Haber, L., Carvalho, C., Howell, W., & Resende, F. (2015). Horticultura em Moçambique: características, tecnologias de produção e de pós-colheita. *Embrapa Hortaliças-Livro técnico (INFOTECA-E)*.
- Hassan, L., & Umar, K. (2006). Nutritional value of Balsam Apple (*Momordica balsamina* L.) leaves. *Pak. J. Nutr*, 5(6), 522-529.
- He, X.-G. (2000). On-line identification of phytochemical constituents in botanical extracts by combined high-performance liquid chromatographic–diode array detection–mass spectrometric techniques. *Journal of Chromatography A*, 880(1-2), 203-232.
- Henderson, j. W., & Brooks, A. (2010). Improved Amino Acid Methods using Agilent Zorbax Eclipse Plus C18 Columns for a Variety of Agilent LC instrumentation and Separation Goals. *Agilent technologies, Inc.*
- Huie, C. W. (2002). A review of modern sample-preparation techniques for the extraction and analysis of medicinal plants. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 373(1-2), 23-30.
- Jansen, P. C. M., & Mendes, O. (1990). *Plantas medicinais seu uso tradicional em Mocambique*: Unknown Publisher.
- Jia, S., Shen, M., Zhang, F., & Xie, J. (2017). Recent advances in *Momordica charantia*: functional components and biological activities. *International journal of molecular sciences*, 18(12), 2555.
- Jigam, A., Akanya, H., & Adeyemi, D. (2004). Antimicrobial and antiparasitic effects of *Momordica balsamina*. *Nigerian Journal of Natural Products and Medicine*, 8(1), 11-12.
- John, K. J. (2004). Studies on ecogeography and genetic diversity of the Genus *Momordica* L in India.
- John, K. J., & Antony, V. (2008). Occurrence, distribution and ex situ regeneration of balsam apple (*Momordica balsamina* L.) in India. *Indian Journal of Plant Genetic Resources*, 21(1), 59-62.
- Jones, H. G., Serraj, R., Loveys, B. R., Xiong, L., Wheaton, A., & Price, A. H. (2009). Thermal infrared imaging of crop canopies for the remote diagnosis and quantification of plant responses to water stress in the field. *Functional Plant Biology*, 36(11), 978-989.

- Joseph, J. (2005). Studies on ecogeography and genetic diversity of the genus *Momordica* L. India. *PhD Thesis, University of Mahtma Gandhi Kottayam, Kerala, India*, 315.
- Joseph, J. (2008). Teasel gourd (*Momordica subangulata* Blume ssp. *renigera* (G. Don) de Wilde). *Underutilized and underexploited horticultural crops*, 4.
- Karumi, Y., Onyeyili, P., & Ogugbuaaja, V. (2003). Anti-inflammatory and antinociceptive (analgesic) properties of *Momordica balsamina* Linn.(Balsam apple) leaves in rats. *Pakistan Journal of Biological Sciences (Pakistan)*.
- Kidane, L., Gebremedhin, G., & Beyene, T. (2018). Ethnobotanical study of medicinal plants in Ganta Afeshum District, Eastern Zone of Tigray, Northern Ethiopia. *Journal of ethnobiology and ethnomedicine*, 14(1), 64.
- Krog, M., Falcão, M. P., & Olsen, C. S. (2006). *Medicinal plant markets and trade in Maputo, Mozambique*: Forest & Landscape Denmark (FLD).
- Larkcom, J. (1991). *Oriental Vegetables: The Complete Guide for Kitchen and Vegetables*: John Murray, London.
- Li, H.-B., Jiang, Y., & Chen, F. (2004). Separation methods used for *Scutellaria baicalensis* active components. *Journal of chromatography B*, 812(1-2), 277-290.
- Li, J., Zhao, A., Li, D., & He, Y. (2019). Comparative study of the free amino acid compositions and contents in three different botanical origins of *Coptis* herb. *Biochemical systematics and ecology*, 83, 117-120.
- Machado, E. C., Medina, C. L., Gomes, M. d. M. d. A., & Habermann, G. (2002). Variação sazonal da fotossíntese, condutância estomática e potencial da água na folha de laranja'Valência'. *Scientia Agricola*.
- Madala, N. E., Piater, L., Dubery, I., & Steenkamp, P. (2016). Distribution patterns of flavonoids from three *Momordica* species by ultra-high performance liquid chromatography quadrupole time of flight mass spectrometry: a metabolomic profiling approach. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 26(4), 507-513.
- Masondo, N., & Makunga, N. (2019). Advancement of analytical techniques in some South African commercialized medicinal plants: Current and future perspectives. *South African Journal of Botany*.
- Maulide Cane, R. (2012). *Obtención y caracterización de extractos de Momordica balsamina* L.
- McConn, M., Creelman, R. A., Bell, E., & Mullet, J. E. (1997). Jasmonate is essential for insect defense in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(10), 5473-5477.

- Mishra, K., & Sahu, R. (1983). Large-scale cultivation of small bitter-gourd: problems and possibilities. *Indian Horticulture*.
- Nagarani, G., Abirami, A., & Siddhuraju, P. (2014). Food prospects and nutraceutical attributes of *Momordica* species: a potential tropical bioresources—a review. *Food Science and Human Wellness*, 3(3-4), 117-126.
- Oliva, M., Hatan, E., Kumar, V., Galsurker, O., Nisim-Levi, A., Ovadia, R., . . . Alkan, N. (2019). Increased phenylalanine levels in plant leaves reduces susceptibility to *Botrytis cinerea*. *Plant Science*, 110289.
- Oliveira, J. S., & De Carvalho, M. F. (1975). Nutritional value of some edible leaves used in Mozambique. *Economic Botany*, 29(3), 255-263.
- Otimenyin, O., Uguru, M., & Ogbonna, A. (2008). Antimicrobial and hypoglycemic effects of *Momordica balsamina*. *Linn. J Nat Prod*, 1, 3-9.
- Palada, M., & Chang, L. (2003). Suggested cultural practices for bitter gourd. *AVRDC International Cooperators' Guide*, 03-547.
- Pharmacopoeia, T. J. (2001). *The Society of Japanese Pharmacopeia*.
- Porto, H. S. M. (2014). *HPLC versus UPLC: avaliação de aspetos críticos à transferência e validação de métodos analíticos*.
- Qiaomei, W., Guangwen, Z., & Youtiao, J. (1997). Effects of Temperature and Photoperiod on Sex Expression of *Momordica Charantia* [J]. *CHINA VEGETABLES*, 1.
- Rainer, M., Qureshi, M. N., & Bonn, G. K. (2011). Matrix-free and material-enhanced laser desorption/ionization mass spectrometry for the analysis of low molecular weight compounds. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 400(8), 2281-2288.
- Ram, D., Banerjee, M., & Kalloo, G. (2002). Popularizing kakrol and kartoli: the indigenous vegetables. *Indian Horticulture (India)*.
- Ramalhete, C., Lopes, D., Mulhovo, S., Molnár, J., Rosário, V. E., & Ferreira, M.-J. U. (2010). New antimalarials with a triterpenic scaffold from *Momordica balsamina*. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 18(14), 5254-5260.
- Ribeiro, A., Romeiras, M. M., Tavares, J., & Faria, M. T. (2010). Ethnobotanical survey in Canhane village, district of Massingir, Mozambique: medicinal plants and traditional knowledge. *Journal of ethnobiology and ethnomedicine*, 6(1), 33.
- Sambane, E., & Mangué, P. (2000). Estudo das plantas medicinais e de uso múltiplo de Potone.

- Sasidharan, S., Chen, Y., Saravanan, D., Sundram, K., & Latha, L. Y. (2011). Extraction, isolation and characterization of bioactive compounds from plants' extracts. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 8(1).
- Schäfer, H., & Wink, M. (2009). Medicinally important secondary metabolites in recombinant microorganisms or plants: progress in alkaloid biosynthesis. *Biotechnology Journal: Healthcare Nutrition Technology*, 4(12), 1684-1703.
- Schwedt, G., & Haderlie, B. (1997). *The essential guide to analytical chemistry*: Wiley New York.
- Shen, F., Ying, Y., Li, B., Zheng, Y., & Zhuge, Q. (2011). Multivariate classification of rice wines according to ageing time and brand based on amino acid profiles. *Food chemistry*, 129(2), 565-569.
- Simone, M. (2001). *Estudo de plantas medicinais em uso pelas comunidades locais no posto administrativo de Mahel e sua propagação*. Universidade Eduardo Mondlane.
- Simpson, C. (1976). *Practical high performance liquid chromatography*: Heyden [for] Continuing Education Committee of the Chemical Society.
- Singh, D. (1991). Effect of temperature on seed germinability of *Momordica charantia* L. cultivars. *New Agriculturist*, 2(1), 23-26.
- Thakur, G. S., Bag, M., Sanodiya, B. S., Bhadauriya, P., Debnath, M., Prasad, G., & Bisen, P. (2009). *Momordica balsamina*: a medicinal and nutraceutical plant for health care management. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 10(7), 667-682.
- United States Pharmacopeia and National Formulary, U., NF 19. (2002). United States Pharmacopeial Convention Inc.
- Verzár, R., & Petri, G. (1987). Medicinal plants in Mozambique and their popular use. *Journal of ethnopharmacology*, 19(1), 67-80.
- Vogt, T. (2010). Phenylpropanoid biosynthesis. *Molecular plant*, 3(1), 2-20.
- Went, F. (1953). The effect of temperature on plant growth. *Annual Review of Plant Physiology*, 4(1), 347-362.
- WHO. (2004). Medicinal plants: guidelines to promote patient safety and plant conservation for a US \$60 billion industry *Medicinal plants: guidelines to promote patient safety and plant conservation for a US \$60 billion industry* (pp. 3-3).
- Wolfender, J.-L., Marti, G., Thomas, A., & Bertrand, S. (2015). Current approaches and challenges for the metabolite profiling of complex natural extracts. *Journal of Chromatography A*, 1382, 136-164.

- Wu, G. (2009). Amino acids: metabolism, functions, and nutrition. *Amino acids*, 37(1), 1-17.
- Ye, M., Han, J., Chen, H., Zheng, J., & Guo, D. (2007). Analysis of phenolic compounds in rhubarbs using liquid chromatography coupled with electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 18(1), 82-91.
- Yonemori, S. F. K. (1985). Sex expression in *Momordica charantia* L. *Sci Bull of Colle Agric, Univ Ryukyus*, , 32:183–187.
- Yoshikawa, M., Luo, W., Tanaka, G., Konishi, Y., Matsuura, H., & Takahashi, K. (2018). Wounding stress induces phenylalanine ammonia lyases, leading to the accumulation of phenylpropanoids in the model liverwort *Marchantia polymorpha*. *Phytochemistry*, 155, 30-36.
- Zaynab, M., Fatima, M., Abbas, S., Sharif, Y., Umair, M., Zafar, M. H., & Bahadar, K. (2018). Role of secondary metabolites in plant defense against pathogens. *Microbial pathogenesis*, 124, 198-202.
- Zygmunt, B., & Namieśnik, J. (2003). Preparation of samples of plant material for chromatographic analysis. *Journal of chromatographic science*, 41(3), 109-116.

9. Anexos

Anexo Tabela 1. Comparação de médias semanais do crescimento em altura em sete acessos de cacana Duncan.

Semana	Acesso 1	Acesso 2	Acesso 3	Acesso 4	Acesso 6	Acesso 7	Acesso 8
9	0,2733 a	0,2795 a	0,2563 a	0,3482 a	0,369 a	0,3163 a	0,3538 a
10	0,3153 a	0,3498 a	0,291 a	0,3058 a	0,3967 a	0,3883 a	0,432 a
11	0,52 ab	0,5575 ab	0,36 b	0,4525 ab	0,5358 ab	0,61 a	0,6733 a
12	0,7567ab	0,8138 ab	0,4883 b	0,6642 ab	0,69 ab	0,88 a	0,9517 a
13	1,0417ab	1,12 a	0,6385 b	0,94 ab	0,8867 ab	1,1133a	1,2367 a
14	1,5233 a	1,4375ab	1,0025 b	1,22 ab	1,2433 ab	1,4567ab	1,5933 a
15	1,74 a	1,5925ab	1,1467 b	1,4133 ab	1,6333 a	1,6567a	1,7817 a
16	2,065 a	1,8675ab	1,4133 b	1,596 bc	1,93 ab	1,71 abc	1,9517 ab
17	2,31 a	2,0467ab	1,56 c	1,885 abc	2,215 ab	1,81 bc	2,0733 ab
18	2,3517ab	2,12 abc	1,7183 d	1,8833cd	2,4433 a	2,012 bcd	2,10 abc
19	2,3583ab	2,4367ab	1,9733 b	2,0967b	2,595 a	2,225 ab	2,1633 ab
20	2,445 ab	2,4675ab	2,12 b	2,22 ab	2,63 a	2,23 ab	2,188 ab
21	2,77 a	2,4475ab	2,3117 b	2,278 b	2,7 a	2,3175 b	2,255 b
22	2,808 a	2,6675a	2,464 a	2,374 a	2,8025a	2,47 a	2,34 a
29	2,8733a	2,9233a	2,7533 a	2,4367a	2,9467a	2,4633 a	2,6033 a

Letras diferentes significam diferenças estatísticas entre os números

Anexo Tabela 2. Composição química aproximada dos nutrientes da folha de cacana, expressa em percentagem de matéria seca.

Parâmetro	Matéria Seca (%)
*Energia	189,22
**Água	71,00
Hidratos de carbono disponíveis	39,05
Proteína bruta	11.29
Lípido bruto	2.66
Fibra bruta	29,00
Cinzas	18,00

**(% Peso Fresco); *(Cal/100g de MS).
Fonte: (Hassan & Umar, 2006).

Anexo Tabela 3. Composição nutricional de elementos químicos da folha da cacana, expressa em miligramas por 100 gramas de Matéria seca.

Elemento	Concentração (mg/100g MS)
Potássio	1.320,00
Cálcio	941,00
Magnésio	220,00
Fosforo	130,46
Sódio	122,49
Ferro	60,30
K/Na	10,78
Manganês	11,60
Ca/P	7,21
Cobre	5,44
Zinco	3,18

Fonte: (Hassan & Umar, 2006).

Anexo Tabela 4. Concentração de aminoácidos totais em mg/g de Matéria seca das folhas de cacana.

Aminoácidos	Concentração (g/mg de MS)
Arginina	13,59
Histidina	6,97
Lisina	12,75
Metionina	4,14
cisteína	2,44
fenilalanina	15,46
tirosina	8,29
leucina	28,6
isoleucina	13,9
velina	12,94
treonina	10,62
triptofano	6,41

Fonte: (Oliveira & De Carvalho, 1975)

Anexo Tabela 5. Composição nutricional de aminoácidos da cacana, expressos em grama por 100 de proteína.

Aminoácidos (abreviatura)	Concentração (g/100g proteína)
Acido glutâmico	12,38
Leucina	8,38
Acido aspártico	8,21
Total EAAs. Aromáticos	6,46
Arginina	4,87
Glicina	4,66
Alanina	4,16
Valina	4,11
Serina	4
Lisina	3,94
Fenilamina	3,94
Prolina	3,21
Treonina	3,13
Isoleucina	2,94
Tirosina	2,69
Histidina	2,5
Total EAAs. Sulfatados	1,46
Metionina	0,9
Cisteína	0,56

Fonte: (Hassan & Umar, 2006).

Anexo Tabela 6. Principais metabolitos e função dos aminoácidos na nutrição e metabolismo.

Aminoácido	Produto	Função maioritária
Alanina	Diretamente	Inibição de piruvato-quinase e autofagia hepática; gliconeogénese; transaminação; ciclo glicose-alanina.
B-Alanina	Diretamente	Componente da coenzima A e ácido pantotênico.
	Dipeptídeos	Carnosina (b-alanil-L-histidina), carcinina (b-alanil-histamina), anserina (b-alanil-1-metil-L-histidina) e balenina (b-alanil-3-metil-histidina) com função antioxidante.
Arginina	Diretamente	Ativação da sinalização mTOR; antioxidante; regulação da secreção hormonal; ativação alostérica da NAG sintase; Desintoxicação de amônia; regulação da expressão gênica; função imune; ativação da síntese de BH4; Reservatório de N; metilação de proteínas; deiminação (formação de citrulina) de proteínas.
	NO	Molécula sinalizadora; regulador do metabolismo dos nutrientes, tônus vascular, hemodinâmica, angiogénese, espermatogénese, embriogénese, fertilidade, função imune, secreção hormonal, cicatrização de feridas, neurotransmissão, crescimento de tumores, biogénese mitocondrial e função.
	Agmatina	Inibição de NOS, ODC e monoamina oxidase; ligante para recetores α_2 -adrenérgicos e imidazolina.
	Ornitina	Desintoxicação de amônia; sínteses de prolina, glutamato e poliaminas; integridade mitocondrial; cicatrização de feridas.
	Metilargininas	Inibição competitiva da NOS.
Asparagina	Diretamente	Metabolismo celular e fisiologia; regulação da expressão gênica e função imunológica; desintoxicação de amônia; função do sistema nervoso.
	Acrilamida	Oxidante; citotoxicidade; Mutação de Gene; qualidade alimentar.
Aspartato	Diretamente	Síntese de purina, pirimidina, asparagina e arginina; transaminação; ciclo de ureia; ativação de recetores NMDA; síntese de inositol e B-alanina.

Anexo Tabela 6. Principais metabolitos e função dos aminoácidos na nutrição e metabolismo. (cont.).

Aminoácido	Produto	Função maioritária
Cisteína	Diretamente	Ligação dissulfeto em proteína; transporte de enxofre.
	Taurina	Antioxidante; regulação do estado redox celular; osmólito.
	H ₂ S	Sinalização molecular.
Glutamina	Diretamente	Regulação da renovação de proteínas através da sinalização celular mTOR, expressão gênica e função imune; um grande combustível para células de proliferação rápida; inibição de apoptose; sínteses de purina, pirimidina, ornitina, citrulina, arginina, prolina e asparaginas; Reservatório de N; síntese de NAD (P).
	Glu e Asp	Neurotransmissores excitatórios; componentes do lançador de malato; metabolismo celular; desintoxicação de amônia; principais combustíveis para enterócitos.
	Glucosamina-6-P	Síntese de aminoaçucares e glicoproteínas; inibição da síntese de NO.
	Amônia	Regulação renal do balanço ácido-base; síntese de glutamato e PC.
Glicina	Diretamente	Influxo de cálcio através de um canal dependente de glicina na membrana celular; síntese de purina e serina; Síntese de porfirinas; neurotransmissor inibitório no SNC; co-agonista com glutamato para recetores NMDA.
	Hemo	Hemoproteínas (por exemplo, hemoglobina, mioglobina, catálase e citocromo c); produção de CO (uma molécula de sinalização).
Histidina	Diretamente	Metilação de proteínas; estrutura e função da hemoglobina; dipeptídeos antioxidantes; metabolismo unitário de carbono.
	Histamina	Reação alérgica; vasodilatador; secreção central de acetilcolina; regulação da função intestinal.
	Ácido urocânico	Modulação da resposta imune na pele.

Anexo Tabela 6. Principais metabolitos e função dos aminoácidos na nutrição e metabolismo. (cont.).

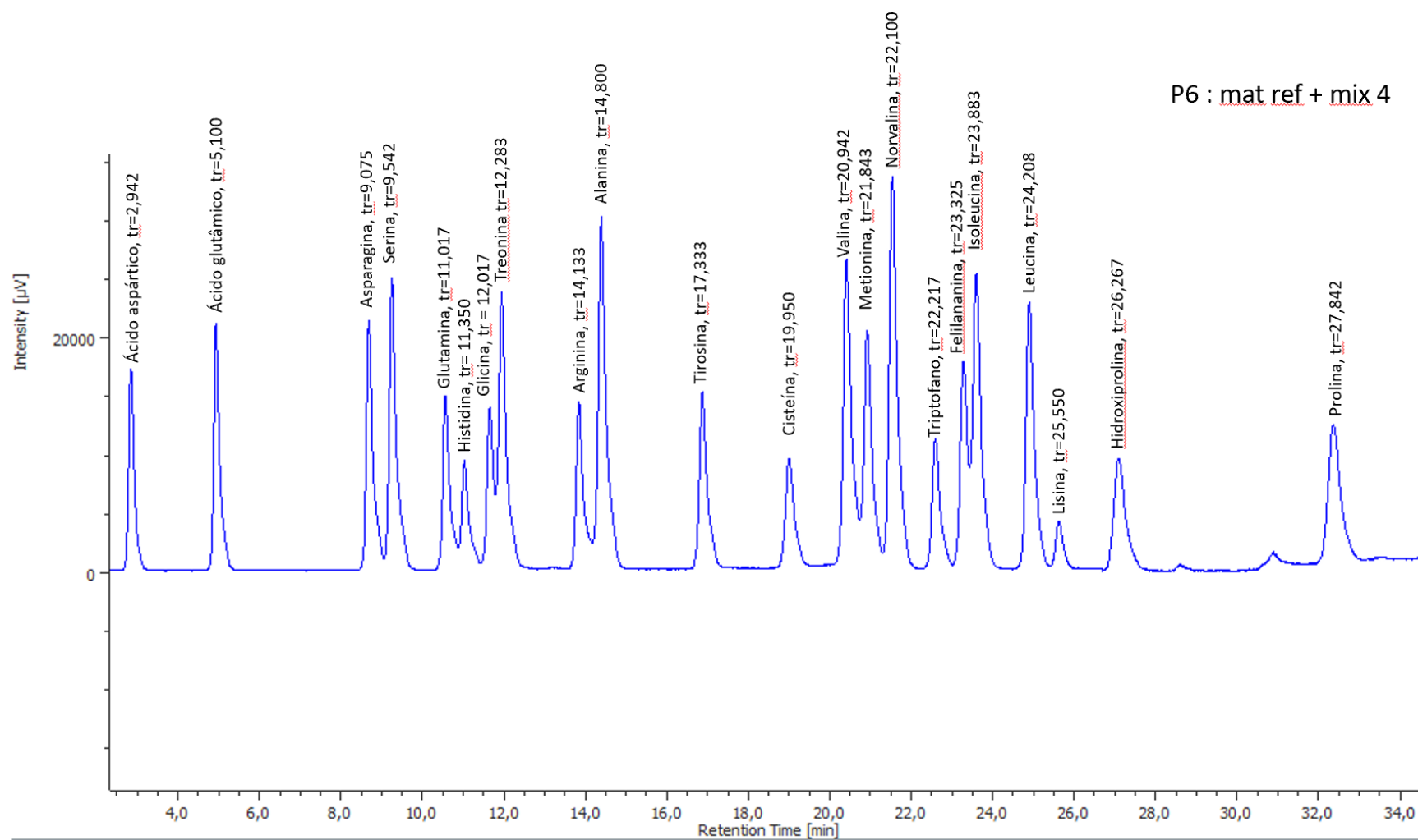
Aminoácido	Produto	Função maioritária
Isoleucina	Diretamente	Síntese de glutamina e alanina; equilíbrio entre BCAA.
Leucina	Diretamente	Regulação da renovação de proteínas através da sinalização celular de mTOR e expressão gênica; ativador de glutamato desidrogenase; Saldo de BCAA; intensificador de sabor.
	Gln and Ala	Metabolismo interorgãos de nitrogênio e carbono.
	HMB	Regulação das respostas imunes.
Lisina	Diretamente	Regulação da síntese de NO; atividade antiviral (tratamento de Herpes simplex); Metilação de proteínas (por exemplo, trimetillysina em calmodulina), acetilação, ubiquitinação e glicosilação ligada ao O.
	OH-lisina	Estrutura e função do colágeno.
Metionina	Homocisteína	Oxidante; fator de risco independente para DCV; inibição da síntese de NO.
	Betaína	Metilação de homocisteína em metionina; metabolismo unitário de um carbono.
	Choline	Síntese de betaína, acetilcolina, fosfatidilcolina e sarcosina.
	Cisteína	Metabolismo e nutrição celular.
	DCSAM	Metilação de proteínas e DNA; síntese de poliamina; expressão genética.
	Taurina	Antioxidante; osmorregulação; desenvolvimento de órgãos; funções vasculares, musculares, cardíacas e da retina; anti inflamação.
	Fosfolipídios	Síntese de sinalização celular de lecitina e fosfatidilcolina.
Fenilalanina	Diretamente	Ativação da síntese de BH4 (um cofator para NOS); síntese de tirosina; desenvolvimento e função neurológica.

Anexo Tabela 6.. Principais metabolitos e função dos aminoácidos na nutrição e metabolismo. (cont.).

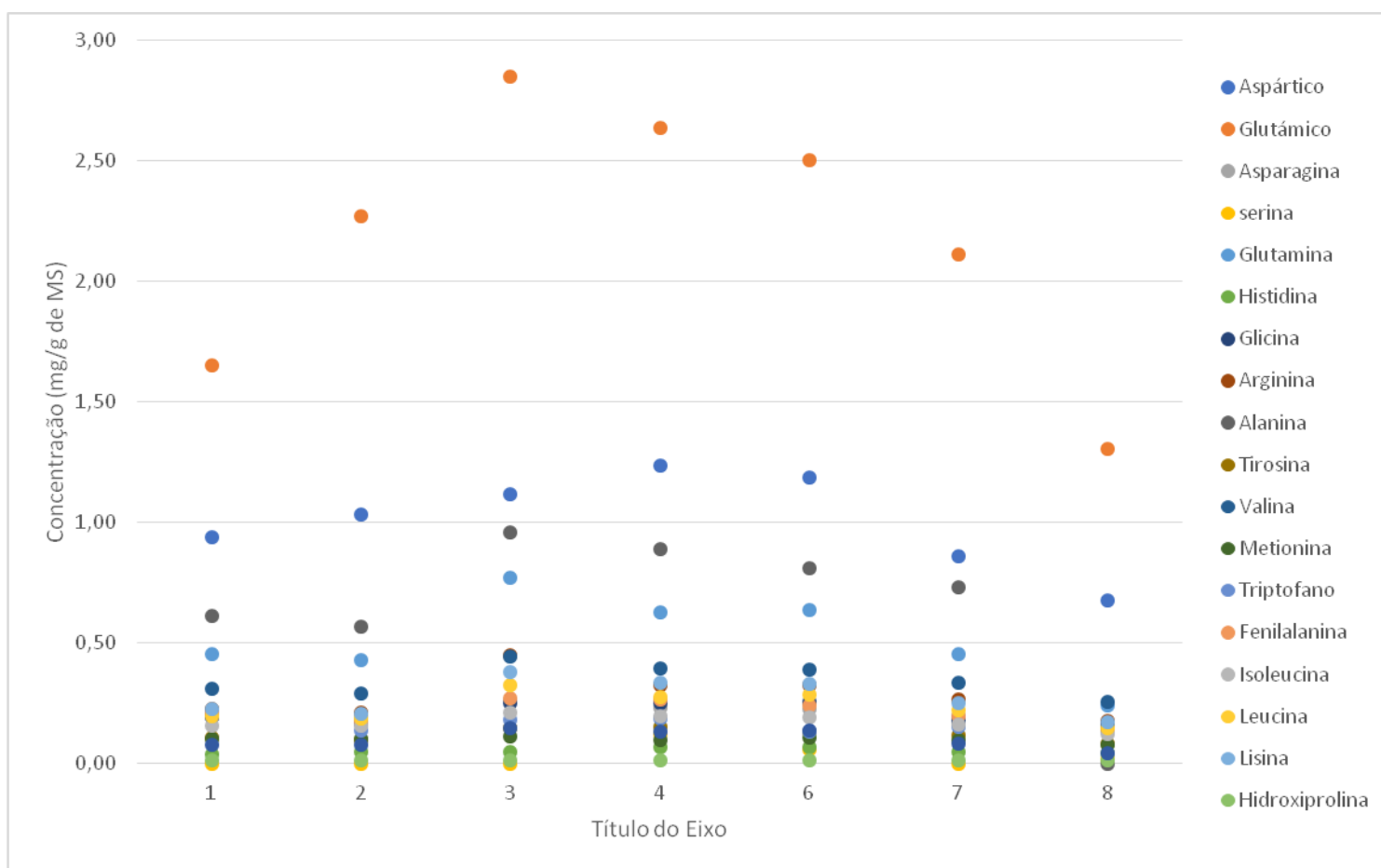
Aminoácido	Produto	Função maioritária
Prolina	Diretamente	Estrutura e função do colágeno; função neurológica; osmoprotetor.
	H ₂ O ₂	Matar patógenos; integridade intestinal; uma molécula de sinalização; imunidade.
	P5C	Estado redox celular; Síntese de DNA; proliferação de linfócitos; síntese de ornitina, citrulina, arginina e poliamina; expressão genética; resposta ao estresse.
	OH-prolina	Estrutura e função do colágeno
Treonina	Diretamente	Síntese da proteína mucina necessária para manter a integridade e a função intestinal; função imune; fosforilação de proteínas e glicosilação ligada a O; síntese de glicina.
Triptofano	Serotonina	Neurotransmissor; inibidor da produção de citocinas inflamatórias e superóxido.
	NAS	Inibidor da síntese de BH ₄ ; antioxidante; inibição da produção de citocinas inflamatórias e superóxido.
	Melatonina	Antioxidante; inibição da produção de citocinas inflamatórias e superóxido.
	ANS	Inibindo a produção de citocinas pró-inflamatórias T-helper-1; prevenção de neuro inflamação autoimune; melhorar a função imunológica.
	Niacina	Um componente do NAD e NADP, coenzimas para muitas oxidoredutases.
Tirosina	Diretamente	Fosforilação, nitroação e sulfatação de proteínas.
	Dopamina	Neurotransmissor; regulação da resposta imune.
	EPN e NEPN	Neurotransmissores; metabolismo celular.
	Melanina	Antioxidante; inibição da produção de citocinas inflamatórias e superóxido.
Valina	Diretamente	Síntese de glutamina e alanina; equilíbrio entre BCAA.

ANS - ácido antranílico do, BCAA - AA de cadeia ramificada, BH₄ - tetrahidrobiopterina, SNC - sistema nervoso central, CP - carbamioilfosfato, CVD - doença cardiovascular, DCSAM - S-adenosilmetionina descarboxilada, EPN - pinefrina, GABA - γ-aminobutirato, HMB - β-hidroxi-b-metilbutirato, NAG - N-acetilglutamato, NAS N-acetilserotonina, NEPN - noradrenalina, NOS - NO sintase, ODC - ornitina descarboxilase, P5C - pirrolina-5-carboxilato, Tau-Cl - taurina cloramina.

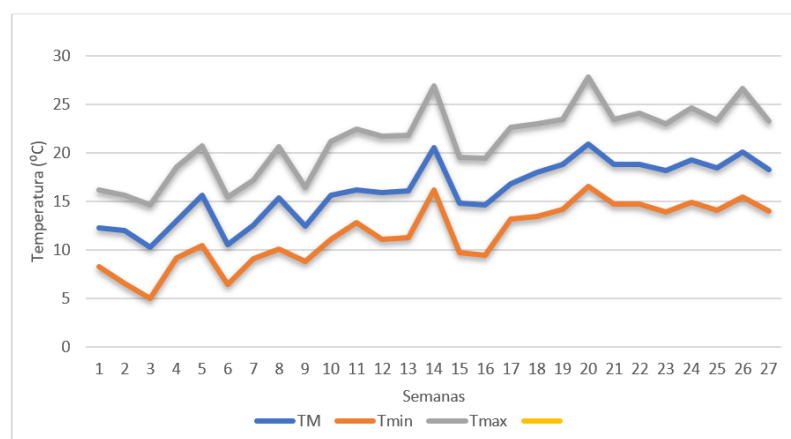
Fonte: (Wu, 2009).



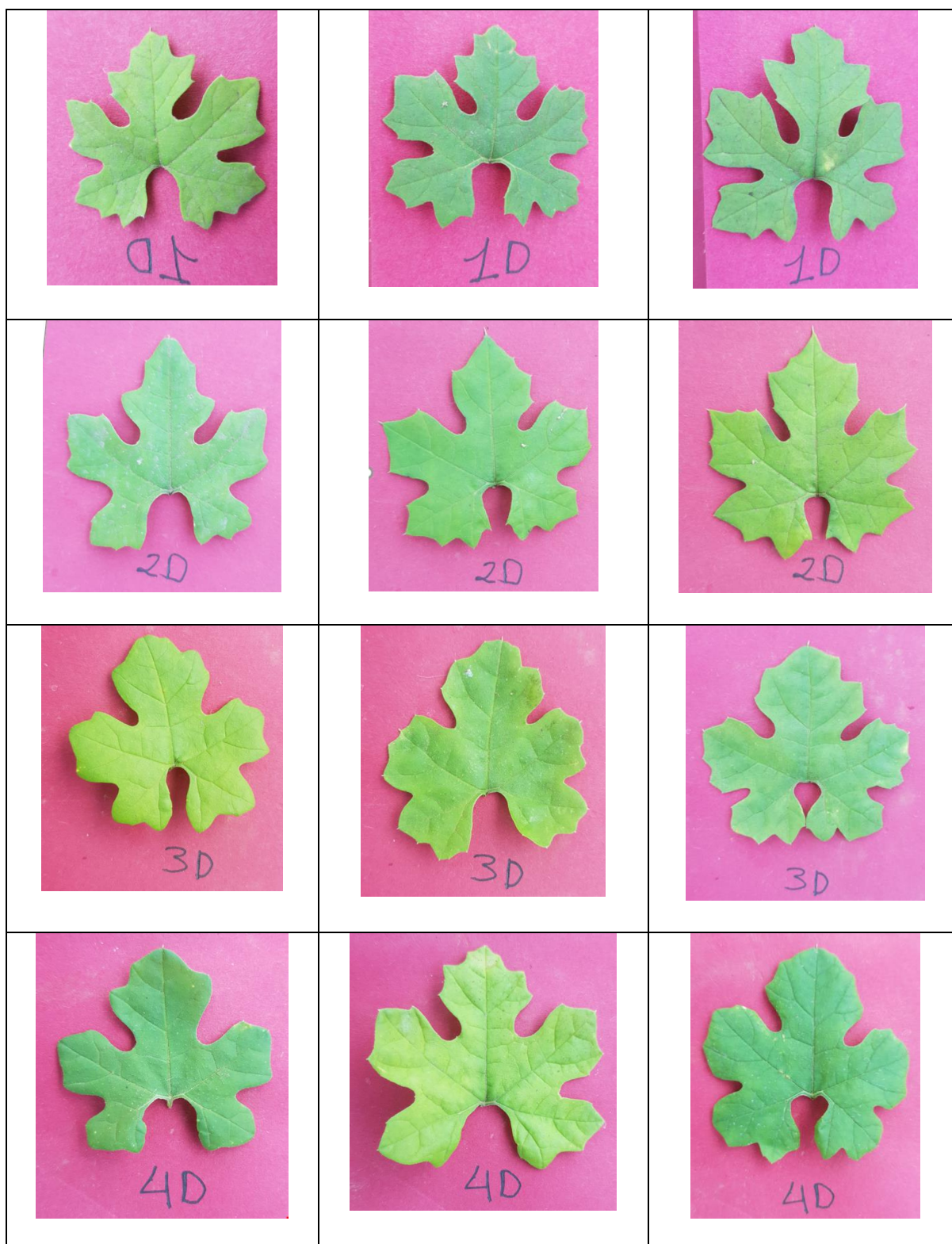
Anexo Figura 1. Cromatograma com os aminoácidos livres analisados.



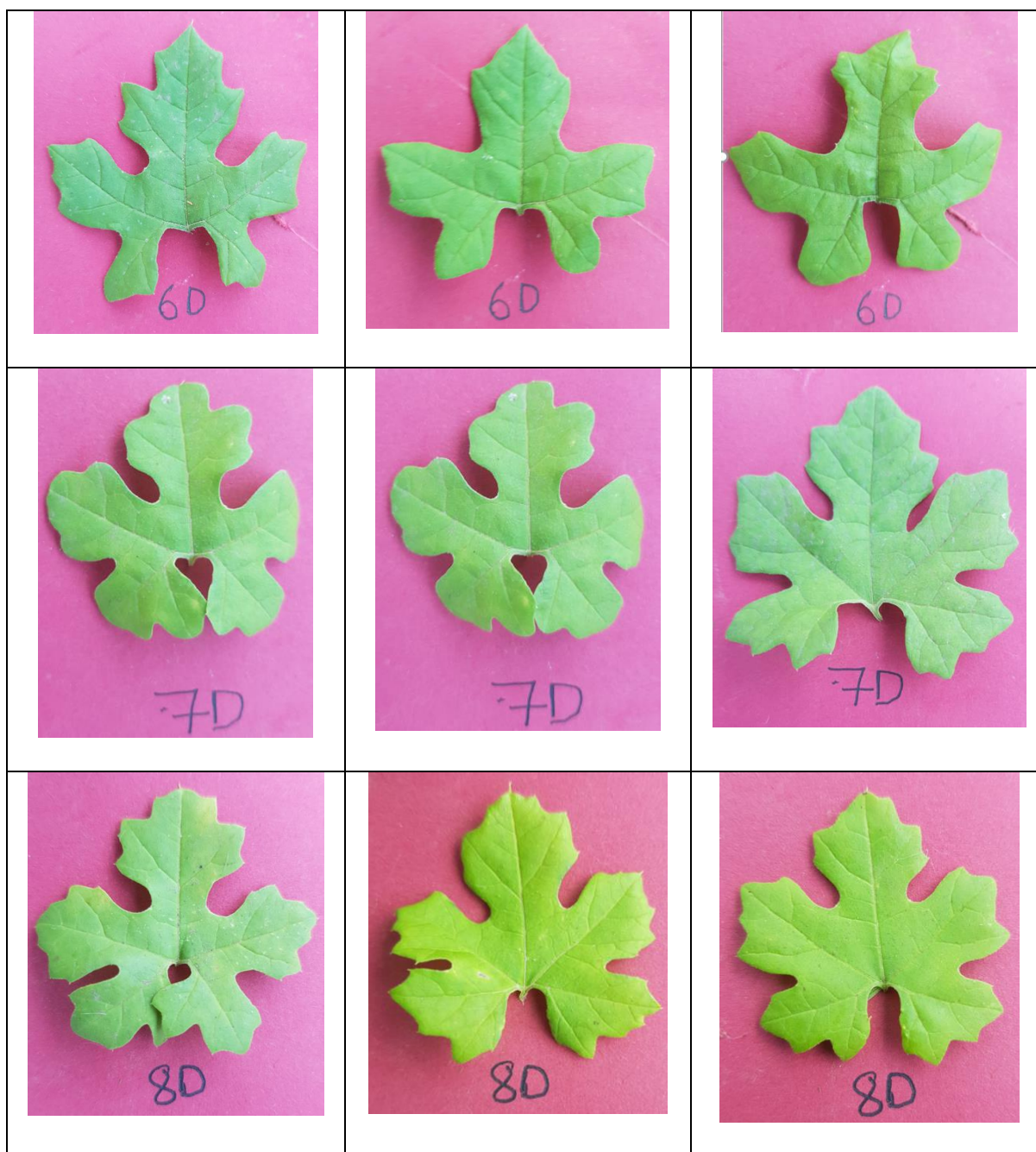
Anexo Figura 2. Perfil da concentração dos aminoácidos livres em sete acessos de cacana.



Anexo Figura 3. Evolução das médias semanais da temperatura ao longo do ensaio realizado.



Anexo Figura 4. Comparação da forma da folha de cacana dos acessos 1, 2, 3 e 4 desenvolvidos dentro da estufa (D).



Anexo Figura 5. Comparação da forma da folha de cacana dos acessos 6, 7 e 8 desenvolvidos dentro da estufa (D).