UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Ciências dos Alimentos
Área de Bromatologia

O efeito da biodiversidade nativa da Mata Atlântica sobre o metabolismo de amadurecimento da banana (*Musa acuminata* AAA, Cavendish, cv. Nanicão)

Talita Pimenta do Nascimento

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientação:
Profa. Tit. Dra. Beatriz Rosana Cordenunsi

São Paulo
2015
Talita Pimenta do Nascimento

O efeito da biodiversidade nativa da Mata Atlântica sobre o metabolismo de
amadurecimento da banana (*Musa acuminata* AAA, Cavendish, cv. Nanicão)

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Profa. Tit. Dra. Beatriz Rosana Cordenunsi
Orientadora/presidente

1º examinador

2º examinador

3º examinador

4º examinador

São Paulo, março de 2015.

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

N244e	<p>Nascimento, Talita Pimenta do</p> <p>O efeito da biodiversidade nativa da Mata Atlântica sobre o metabolismo de amadurecimento da banana (<i>Musa acuminata</i>) AAA, Cavendish, cv. Nanicão) / Talita Pimenta do Nascimento. -- São Paulo, 2015. 187p.</p> <p>Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental</p> <p>Orientador : Cordenunsi, Beatriz Rosana</p> <p>1. Banana : Bioquímica dos alimentos 2. Metabolismo vegetal I. T. II. Cordenunsi, Beatriz Rosana, orientador.</p> <p>641.3477 CDD</p>
-------	--

DEDICO

A Deus pela vida e sustento durante esses anos de caminhada.
Agradeço por ter me concedido forças para superar todas as minhas limitações
e fazer-me mais que vencedora.

Aos meus pais Adiel Batista do Nascimento e Maria Aparecida Pimenta do
Nascimento, por compartilhar anos de ensinamento e por serem exemplos de
perseverança e fé. Obrigada pelo apoio e carinho incondicional.

À Beatriz Rosana Cordenunsi, por ser um exemplo de inspiração e dedicação
profissional. Agradeço por ter acreditado no meu trabalho e pelos anos de
amizade e parceria.

Aos familiares e amigos pelas orações, carinho e apoio.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Beatriz Rosana Cordenunsi pelos ensinamentos, amizade, e confiança, durante esses anos. Agradeço pela contribuição em minha formação e por tornar-me um profissional mais honesto, confiante e independente.

À Dra. Roberta Ghedini Der Agopian, pela supervisão, parceria, amizade. Sou grata por sempre estar disposta a ajudar e por apresentar-me ao mundo da metaboloma. Foi um prazer trabalhar com você.

À equipe do projeto Biodiversidade, Ma. Florence P. Castelan, Me. Victor C. C.Alves, Ma. Maria Fernanda N. S. Calháu e Me. Lorenzo A. Saraiva, por compartilhar os procedimentos do campo e caracterização das amostras.

Ao Prof. Dr. Silas Villas Bôas e à Universidade de Auckland, por ter me recebido durante três meses. Agradeço pelo suporte na análise dos dados e por disponibilizar toda infraestrutura necessária para o andamento do trabalho.

Aos Professores João Roberto Oliveira do Nascimento (FCF/USP) e Carlos Alberto Labate (ESALQ/USP) pelas sugestões e participação no Exame de Qualificação.

Ao Prof. Tit. Carlos Tadeu dos Santos Dias (ESALQ/USP) pela ajuda imensurável com as análises estatísticas dos dados de caracterização pré e pós colheita. Também, à Ma. Vanessa Caroline de Barros Bonato pelas discussões científicas, críticas e suporte com a estatística e à Luciane Lira pelo auxílio no doutorado sanduíche.

Aos funcionários da Faculdade Ciências Farmacêuticas (USP) pelo apoio na logística do trabalho. Aos Técnicos Lúcia Helena Silva e Elias Araújo pela execução das análises de amido, poliaminas e pelo apoio técnico. À assistente Marcia Moraes pela execução do método de extração dos açúcares solúveis e à Técnica Dra. Tânia Shiga pela quantificação dos açúcares por cromatografia líquida.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Química, Bioquímica e Biologia Molecular de Alimentos (FCF/USP), em especial ao Afonso Maia, Renata Shitakubo, Juliana Nunes e Virgínia Facundo, pelas sugestões e amizade.

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

RESUMO

NASCIMENTO, T. P. **O efeito da biodiversidade nativa da Mata Atlântica sobre o metabolismo de amadurecimento da banana (*Musa acuminata* AAA, Cavendish, cv. Nanicão).** 192p. Tese (Doutorado em Ciências dos Alimentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

A produção de banana no Vale do Ribeira, em São Paulo, está inserida numa região que abriga um fragmento remanescente da Mata Atlântica, considerada um dos principais repositórios de biodiversidade e a floresta mais devastada entre os biomas brasileiros. Medidas sustentáveis, como a adoção de práticas agrícolas alternativas, tem sido o caminho para a conservação da fauna e flora, como também para a redução do uso inapropriado de terras que consequentemente pode aumentar o índice de doenças que atacam as plantas. Apesar, do razoável conhecimento científico sobre a fisiologia pós-colheita da banana, ainda não foram elucidadas quais são as respostas fisiológicas do fruto diante das alterações do meio ambiente decorrentes das práticas agroecológicas. Principalmente quais são os mecanismos de ação de compostos específicos, relacionados com a resistência da planta contra os estresses bióticos e abióticos. Também, não há uma abordagem analítica integrada que identifique os reguladores das vias metabólicas e possibilite um estudo holístico a nível molecular. Neste trabalho, foi avaliado o efeito da proximidade da biodiversidade nativa da Mata Atlântica sobre o perfil de metabólitos da banana (*Musa acuminata* AAA, Cavendish, cv. Nanicão). Foram comparados os frutos da parcela Biodiversidade, o qual apresenta 60% de seu perímetro limítrofe à floresta com a parcela Controle, inserida em uma área de produção de banana convencional. Neste estudo, foram determinados os perfis de etileno, vida verde, amido, açúcares, textura, cor, metabólitos semi-voláteis e não-voláteis e poliaminas. Como resultado, ambas as parcelas avaliadas apresentaram diferenças significativas no metabolismo primário e secundário, nos frutos verdes e maduros, respectivamente. Os metabólitos com diferença significativa entre as parcelas experimentais apresentaram maior envolvimento no metabolismo primário, sobretudo na via de biossíntese de aminoácidos, compostos precursores de uma ampla faixa de metabólitos secundários. As alterações quanto à abundância destes compostos são uma referência de que as mudanças do meio modificam as respostas da planta a estresses e estímulos.

Palavras-chave: Banana. Metabolismo vegetal. Sistemas de cultivo. Biodiversidade.

ABSTRACT

NASCIMENTO, T.P. **The effect of the Atlantic Coastal Forest's native biodiversity on the metabolism of banana ripening (*Musa acuminata* AAA, Cavendish, cv. Nanicão).** 192p. Thesis (Food Science Ph.D.) – Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, 2014.

Banana production in the Ribeira Valley, in São Paulo, is set in a region that embraces a remaining fragment of the Atlantic Coastal Forest (*Mata Atlântica*), considered one of the main biodiversity repositories and the most devastated forest among the Brazilians' biomes. Sustainable measures such as the adoption of alternative farming practices has been the way for the conservation of fauna and flora, but also to reduce the inappropriate use of land which in turn may increase the disease index that attack plants. Although, reasonable scientific knowledge about banana postharvest physiology is available, the fruit's physiologic response given the environment changes as a result agro-ecological practices has not been elucidated yet. Primarily what are the mechanisms of action of specific compounds, related to plant resistance against biotic and abiotic stresses. In addition, there is not an integrated analytical approach to identify regulators of metabolic pathways and enable a holistic study at the molecular level. In this study, we evaluated the effect of proximity to the native biodiversity of the Atlantic Forest on the banana metabolites profile (*Musa acuminata* AAA, Cavendish, cv. Nanicão). The fruits of Biodiversity group were compared, which has 60% of its perimeter adjacent to the forest with the Control group set in a conventional banana production area. In this study, we determined the ethylene profiles, green life, starch, sugars, texture, colour, semi-volatile and non-volatile metabolites and polyamines. As a result, both evaluated groups showed significant differences in primary and secondary metabolism, green and ripen fruits respectively. The metabolites with significant differences between treatments showed greater involvement in primary metabolism, especially in amino acid biosynthesis, precursors of secondary metabolites. Changes in the abundance of these compounds are indicators that alterations in the environment modify the plant responses to stresses and stimuli.

Keywords: Banana. Plant metabolism. Farm system. Biodiversity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Representação das vias de biossíntese dos metabólitos primários e secundários. MEP - via metileritritol fosfato.....	28
Figura 2. Estruturas de alguns terpenos.....	29
Figura 3. Estruturas de alguns alcaloides.....	30
Figura 4. Estruturas das poliaminas putrescina, espermidina e espermina.....	33
Figura 5. Via de biossíntese das poliaminas em planta.....	35
Figura 6. Etapas necessárias para avaliação do perfil metabólico em plantas utilizando bananas e cromatografia gasosa acoplada a detector de massas.....	42
Figura 7. Posicionamento das parcelas dentro do bananal convencional, em relação à presença da mata (biodiversidade nativa).....	51
Figura 8. Representação das replicatas biológicas e técnicas dos frutos das áreas Controle e Biodiversidade, estádios verde e maduro.....	57
Figura 9. Produção de etileno ($\mu\text{L.Kg FW}^{-1}.\text{h}^{-1}$) de 6 plantas, mensurados desde a colheita até a senescência dos frutos da parcela Controle , cultivo distante da mata (C).....	67
Figura 10. Produção de etileno ($\mu\text{L.Kg FW}^{-1}.\text{h}^{-1}$) de 6 plantas, mensurados desde a colheita até a senescência dos frutos da parcela Biodiversidade , cultivo próximo da mata (B).....	68
Figura 11. Perfil da degradação do amido e acúmulo de açúcares solúveis nos frutos cultivados na parcela Controle (C) ($n=6$) durante o amadurecimento.....	70
Figura 12. Perfil da degradação do amido e acúmulo de açúcares solúveis nos frutos cultivados na parcela Biodiversidade (B) ($n=6$) durante o amadurecimento.....	71
Figura 13. Ângulo Hue ($^{\circ}$) de 6 plantas, mensurados desde a colheita até a senescência dos frutos da parcela experimental Controle , (C).....	73

Figura 14. Ângulo Hue (°) de 6 plantas, mensurados desde a colheita até a senescência dos frutos da parcela experimental Biodiversidade (B).....	74
Figura 15. Firmeza (N) de 6 plantas, mensurados desde a colheita até a senescência dos frutos da parcela Controle (C).....	77
Figura 16. Firmeza (N) de 6 plantas, mensurados desde a colheita até a senescência dos frutos da parcela experimental Biodiversidade , cultivo próximo da mata (B).....	78
Figura 17. Cromatogramas típicos de bananas verdes e maduras cultivadas na parcela Controle	80
Figura 18. Cromatogramas típicos de bananas verdes e maduras cultivadas na parcela Biodiversidade	81
Figura 19. Análise de Componentes Principais, tendo como variáveis todos os metabólitos identificados nos frutos verdes (<i>pool/1</i>) cultivados nas parcelas experimentais Controle e Biodiversidade.....	83
Figura 20. Gráfico biplot, tendo como variáveis metabólitos identificados nos frutos verdes (<i>pool1</i>) cultivados nas parcelas experimentais Controle e Biodiversidade.....	86
Figura 21. Análise de Componentes Principais, tendo como variáveis todos os metabólitos identificados nos frutos verdes (<i>pool/2</i>) cultivados nas parcelas experimentais Controle e Biodiversidade.....	92
Figura 22. Análise de Componentes Principais, tendo como variáveis somente os metabólitos significativos ($p \leq 0,05$, test t) nos frutos verdes (<i>pool/2</i>) cultivados nas parcelas experimentais Controle e Biodiversidade.....	93
Figura 23. Agrupamento hierárquico (<i>heatmap</i>) baseado nas quintuplicatas das amostras (<i>pool/1</i>) e na intensidade dos picos dos metabólitos identificados nos frutos verdes cultivados nas parcelas Controle (C) e Biodiversidade (B).....	97
Figura 24. Agrupamento hierárquico (<i>heatmap</i>) baseado nas quintuplicatas das amostras (<i>pool/2</i>) e na intensidade dos picos dos metabólitos identificados nos frutos verdes cultivados nas parcelas Controle (C) e Biodiversidade (B).....	99
Figura 25. Metabólitos significativos envolvidos ($p < 0,05$, test t) na biossíntese de aminoácidos e ciclo de Krebs.....	101
Figura 26. Análise de Componentes Principais, tendo como variáveis todos os metabólitos identificados nos frutos maduros (<i>pool/1</i>) cultivados nas parcelas experimentais Controle e Biodiversidade.....	108

Figura 27. Análise de Componentes Principais, tendo como variáveis somente os metabólitos significativos ($p \leq 0,05$, test t) nos frutos maduros (<i>pool/1</i>) cultivados nas parcelas experimentais Controle e Biodiversidade.....	109
Figura 28. Análise de Componentes Principais, tendo como variáveis todos os metabólitos identificados nos frutos maduros (<i>pool/2</i>) cultivados nas parcelas experimentais Controle e Biodiversidade.....	112
Figura 29. Análise de Componentes Principais, tendo como variáveis somente os metabólitos significativos ($p \leq 0,01$, test t) nos frutos maduros (<i>pool/2</i>) cultivados nas parcelas experimentais Controle e Biodiversidade.....	113
Figura 30. Agrupamento hierárquico (<i>heatmap</i>) baseado nas quintuplicatas das amostras (<i>pool/1</i>) e na intensidade dos picos dos metabólitos identificados nos frutos maduros cultivados nas parcelas Controle (C) e Biodiversidade (B).....	117
Figura 31. Agrupamento hierárquico (<i>heatmap</i>) baseado nas quintuplicatas das amostras (<i>pool/2</i>) e na intensidade dos picos dos metabólitos identificados nos frutos maduros cultivados nas parcelas Controle (C) e Biodiversidade (B).....	118
Figura 32. Metabólitos significativos envolvidos ($p < 0,05$, test t) na biossíntese de aminoácidos e ciclo de Krebs.....	122
Figura 33. Via de biossíntese dos aminoácidos e a via de biossíntese dos aminoácidos.....	124
Figura 34. Via do ciclo de Krebs.....	129
Figura 35. Metabolismo do glioxilato e dicarboxilato.....	130
Figura 36. Via de biossíntese dos ácidos graxos insaturados. A letra A indica os ácidos graxos que pertencem a família n-3 e a letra B indica os ácidos graxos que pertencem à família n-6.....	132
Figura 37. Produção de poliaminas ($\mu\text{g.g FW}^{-1}.\text{h}^{-1}$) mensurados desde a colheita até a senescência dos frutos (Verde, Intermediário e Maduro) das parcelas experimentais Controle e Biodiversidade.....	134

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classe de compostos fenólicos em plantas e sua estrutura.....	30
Tabela 2. Fontes de variação do método analítico concernente ao metaboloma vegetal por CG-EM.....	44
Tabela 3. Caracterização pré-colheita das parcelas Controle e Biodiversidade.....	60
Tabela 4. Análise foliar das plantas cultivadas nas parcelas Biodiversidade e Controle.....	61
Tabela 5. Análise de solo de macro e micronutrientes das parcelas experimentais Biodiversidade e Controle.....	62
Tabela 6. Comparação das médias de temperatura e umidade coletadas nas parcelas durante o período do experimento.....	63
Tabela 7. Estágios de coloração da casca da banana.....	75
Tabela 8. Metabólitos identificados por CG-EM (derivatização por MCF), classificação de grupos de metabólitos e tempo de retenção (TR) dos frutos verdes cultivados nas parcelas Controle e Biodiversidade, <i>pool/s</i> 1 e 2.....	87
Tabela 9. Metabólitos identificados por CG-EM (derivatização por MCF) e significativos ($p \leq 0,05$, test t), classificação de grupos e tempo de retenção (TR) dos frutos verdes cultivados nas parcelas Controle e Biodiversidade, <i>pool/2</i>	94
Tabela 10. Vias metabólicas com diferenças significativas nas bananas verdes cultivadas nas parcelas Biodiversidade e Controle (<i>pool/1</i> e <i>pool/2</i>).....	103
Tabela 11. Metabólitos identificados por CG-EM (derivatização por MCF) com diferença significativa ($p \leq 0,05$, test t), classificação de grupos de metabólitos relacionados e tempo de retenção (TR) dos frutos maduros (<i>pool/1</i>) cultivados nas parcelas Controle e Biodiversidade.....	110
Tabela 12. Metabólitos identificados por CG-EM (derivatização por MCF) com diferença significativa ($p \leq 0,05$, test t), classificação de grupos de metabólitos relacionados e tempo de retenção (TR) dos frutos maduros (<i>pool/2</i>) cultivados nas parcelas Controle (C) e Biodiversidade (B).....	114
Tabela 13. Vias metabólicas com diferenças significativas nas bananas maduras cultivadas nas parcelas Biodiversidade e Controle (<i>pool/1</i> e <i>pool/2</i>).....	119
Quadro 1. Dados sobre as plantas marcadas para a colheita das parcelas experimentais Controle e Biodiversidade.....	50

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1. A banana: qualidade do fruto	17
2.1.1. Alterações no sabor: metabolismo amido-sacarose.....	17
2.1.2. Alterações na textura: amaciamento da polpa da banana.....	20
2.1.3. Alterações na cor: degradação da clorofila e acúmulo de carotenoides	20
2.1.4 Alterações no aroma: síntese de ésteres	21
2.2. Sistemas de produção convencional e alternativos em cultivos de banana.....	22
2.3. Mecanismos de defesa da planta.....	25
2.3.1. Defesa química da planta	26
2.3.1.1. Metabólitos secundários.....	26
2.3.1.2.. Priming	31
2.3.2. Poliaminas: hormônio de defesa?	32
2.3.2.1. Mecanismos de ação e biossíntese das PA	32
2.3.2.2. O metabolismo das PA durante interações bióticas e abióticas.	34
2.4. Metaboloma	37
2.4.1. Definição do termo e aplicações.....	37
2.4.1.1. Análise fenotípica.	38
2.4.1.2. Compreensão da biologia de sistemas.....	39
2.4.1.3. Diagnóstico em plantas: Biomarcadores.	39
2.4.1.4. Sistemas de produção alternativos.....	40
2.4.2. A complexidade do preparo da amostra e análise posterior dos dados obtidos.....	40
2.4.3. Métodos de detecção	43

2.4.4. O processamento dos dados.....	45
3. OBJETIVOS	47
3.1. Objetivo geral	47
3.2. Objetivos específicos	47
4. MATERIAL E MÉTODOS	48
4.1. Desenho Experimental	48
4.2. Caracterização pré-colheita.....	50
4.2.1. Características edáficas e de nutrição.....	50
4.2.2. Características nutricionais foliares	51
4.2.3. Aspectos meteorológicos	51
4.2.4. Monitoramento da severidade da Sigatoka Negra (<i>Mycosphaerella</i>	52
<i>fijiensis</i> Morelet)	52
4.2.5. Monitoramento da Broca da Bananeira (<i>Cosmopolitus Sordidus</i>).....	52
4.3. Caracterização pós-colheita	53
4.3.1. Preparo das amostras	53
4.3.2. Medidas de etileno	53
4.3.3. Determinação da vida verde.....	54
4.3.4. Determinação dos carboidratos.....	54
4.3.5. Determinação da cor e textura	55
4.3.6. Determinação das poliaminas	55
4.3.7. Extração e derivatização dos metabólitos por CG-EM	56
4.3.8. Análise por CG-EM.....	56
4.3.9. Análise estatística	57
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	57
5.1. Caracterização pré-colheita.....	58
5.1.1. Características nutricionais foliares	59
5.1.2. Características edáficas e nutricionais	60
5.1.3. Monitoramento dos parâmetros climáticos	61
5.1.4. Monitoramento fitossanitário	62
5.1.4.1. Monitoramento da Broca da Bananeira (<i>Cosmopolitus Sordidus</i>	62
<i>Germar</i>)	62
5.1.4.2. Monitoramento da severidade da Sigatoka Negra (<i>Mycosphaerella</i>	63
<i>fijiensis</i> Morelet)	63

5.2. Caracterização pós-colheita	64
5.2.1. Vida Verde e Produção de etileno	64
5.2.2. Amido e açúcares	68
5.2.3. Evolução da cor da casca	71
5.2.4. Evolução da firmeza	75
5.3. Análise do perfil metabólico por CG-EM	78
5.3.1. Análise do perfil metabólico das amostras de polpa das bananas verdes cultivadas nas parcelas experimentais Controle e Biodiversidade: <i>Pool 1 e pool 2</i>	81
5.3.1.1. Análise de componentes principais (PCA)	81
5.3.1.2. Análise de agrupamentos hierárquicos (Hierarchical Clusters Analysis – HCA)	94
5.3.1.3. Vias metabólicas nos frutos verdes: parcelas Biodiversidade vs. Controle	99
5.3.2. Análise do perfil metabólico das amostras de polpa das bananas maduras cultivadas nas parcelas experimentais Controle e Biodiversidade: <i>POOL1 e POOL 2</i>	105
5.3.2.1. Análise de componentes principais (PCA)	105
5.3.2.2. Análise de agrupamentos hierárquicos (Hierarchical Clusters Analysis – HCA)	115
5.3.2.3. Vias metabólicas nos frutos maduros: parcelas Biodiversidade vs. Controle	118
5.3.2.4. Principais vias metabólicas alteradas entre as parcelas Biodiversidade e Controle	122
5.3.2.5. Metabolismo dos aminoácidos	122
5.3.2.6. Ciclo de Krebs e o metabolismo do glioxilato e dicarboxilato	126
5.3.2.7. Metabolismo dos ácidos graxos	130
5.4. Teores de poliaminas	132
6. CONCLUSÕES	135
7. REFERÊNCIAS	136
APÊNDICE A – Tabela da abundância relativa das replicatas dos metabólitos identificados no <i>pool/1</i> dos frutos verdes cultivados nas parcelas experimentais Controle (C) e Biodiversidade (B)	164
APÊNDICE B - Autovetores da matriz de correlação dos dados dos frutos verdes (<i>pool/1</i>) cultivados nas parcelas experimentais Biodiversidade e Controle	168

APÊNDICE C – Tabela da área relativa das replicatas dos metabólitos identificados no <i>pool</i> 2 dos frutos verdes cultivados nas parcelas experimentais Controle (C) e Biodiversidade (B).....	171
APÊNDICE D - Autovetores da matriz de correlação dos dados dos frutos verdes (<i>pool</i> 2) cultivados nas parcelas Biodiversidade e Controle.	175
APÊNDICE E – Tabela da área relativa das replicatas dos metabólitos identificados no <i>pool</i> 1 dos frutos maduros cultivados nas parcelas experimentais Controle (C) e Biodiversidade (B).	176
APÊNDICE F – Autovetores da matriz de correlação dos dados de frutos maduros (<i>pool</i> 1) cultivados nas parcelas Biodiversidade e Controle.	180
APÊNDICE G – Tabela da área relativa das replicatas dos metabólitos identificados no <i>pool</i> 2 dos frutos maduros cultivados nas parcelas experimentais Controle (C) e Biodiversidade (B).	181
APÊNDICE H – Autovetores da matriz de correlação dos dados de frutos maduros (<i>pool</i> 2) cultivados nas parcelas Biodiversidade e Controle.	186

1. INTRODUÇÃO

O sistema agrícola convencional utilizado atualmente no cultivo da banana baseia-se na monocultura e em disseminar reduzido número de espécies vegetais. A intensificação de tal sistema implica na dependência de insumos químicos, cuja contaminação pode afetar seres humanos, a fauna e a flora. O manejo inapropriado de terras promove um desbalanço nutricional no solo e pode aumentar o índice de pragas, podendo intensificar a degradação ambiental. Na bananicultura brasileira, as cultivares comercializadas são suscetíveis ao ataque de pragas e doenças, principalmente da Sigatoka Negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet), que ataca as regiões foliares da planta, produzindo necroses que reduzem as áreas fotossintéticas da planta, com consequências negativas para a produtividade e a qualidade do fruto comercializado.

Em São Paulo, a maior parte da produção da banana está concentrada próxima a um fragmento remanescente da Mata Atlântica, um dos principais *hotspots* de biodiversidade, com fauna e flora correspondentes a 1-8% do total de espécies no mundo, abrigando milhares de espécies endêmicas, de vegetais a vertebrados. Porém esta região encontra-se ameaçada pelo sistema de produção agrícola característico do local, o qual se baseia na monocultura e na aplicação de insumos agroquímicos para controle das principais doenças da bananeira Broca-do-rizoma Sigatoka Negra, Mal do Panamá, Moko e outras.

Diante do desaparecimento de espécies e ecossistemas, os resultados obtidos por cientistas que se dedicam ao assunto, sinalizam que o sistema agroecológico seria o caminho para a conservação da biodiversidade, pois proporciona habitat para as espécies, preserva o germoplasma de espécies sensíveis, reduz a conversão para sistemas de cultivo convencionais e a conservação da fauna e flora restantes.

O sistema agroecológico consiste em processos agrícolas que conservam ou melhoram a qualidade ambiental e permite um desenvolvimento rural humano e adaptativo. A partir de uma infraestrutura diversificada e autossuficiente, o sistema agroecológico implantado na bananicultura pode favorecer os recursos naturais e as interações biológicas, sem ou com baixo

uso de insumos sintéticos ou orgânicos. Ainda, propicia o acúmulo de matéria orgânica, melhoria na polinização, reciclagem de nutrientes e energia, controle de pragas e produtividade agrícola, logo, menor impacto ambiental.

Como alternativa ao cultivo tradicional da banana, este projeto teve como proposta estudar um sistema de produção de um fruto, tendo como vizinhança a Mata Atlântica, com toda sua biodiversidade de plantas, insetos e microrganismos. Tal sistema possui características semelhantes à produção agrícola convencional, como uso de insumos químicos, o mesmo tipo de solo, a mesma insolação e pluviosidade. A diferença entre as duas parcelas seria a proximidade da Mata Atlântica, que pode agir como uma barreira de proteção ao cultivo e atuar na redução de patógenos e pragas no agroecossistema.

Os sistemas ecológicos estão sempre sujeitos a distúrbios ou perturbações, mesmo que seja por uma pequena variação no ambiente. Em resposta a estes estresses, os mecanismos de ação da planta podem ser a nível celular e molecular, resultando em modificações fisiológicas, morfológicas e enzimáticas no vegetal. Os sistemas de defesas da planta, então, podem ser ativados para uma reprogramação celular e o reequilíbrio do ambiente.

O sistema de resistência da planta pode reconhecer a presença dessas perturbações e em seguida, desencadear cascatas de transdução de sinal que rapidamente mobilizam a defesa e culminam com a participação de uma gama de metabólitos como intermediários e produtos finais. Todos esses processos moleculares decorrentes da interação planta-biodiversidade ainda não foram elucidados na banana. Portanto, o nosso desafio é auxiliar a redesenhar o agroecossistema para um manejo mais sustentável a partir da identificação de compostos relacionados com a resistência da planta e da compreensão das redes metabólicas participantes deste processo.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a percepção da planta e, principalmente do fruto, às alterações nas condições ambientais, proporcionada pela biodiversidade sobre metabólitos produzidos no fruto verde e maduro. Para isso utilizamos a metaboloma como ferramenta no estudo de sistemas alternativos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. A banana: qualidade do fruto

A banana (família *Musaceae*) é uma fruta asiática situada nas regiões tropicais, pertencente à espécie *Musa acuminata* Colla (genoma A) ou de seu cruzamento com a espécie *Musa balbisiana* Colla (genoma B) (SIMMONDS; SHEPHERD, 1955; DANTAS; SOARES FILHO, 1995). Tem alto consumo e produção mundial, no qual o Brasil é um dos principais produtores (IBGE, 2010). Por ano, são colhidas cerca de 7 milhões de toneladas de banana, sendo que 84% da produção é direcionada para o mercado interno. A exportação não tem tido prioridade por conta do enorme mercado interno e devido à baixa qualidade dos frutos, que não se enquadram nos padrões do comércio exterior (FAO, 2011). As cultivares mais difundidas no Brasil pertencem ao grupo genômico AAB - Prata, Pacovan, Prata Anã, Maçã, Mysore, Terra e D'angola; ao grupo genômico AAA - Nanica, Nanicão e Grand Naine e ao grupo genômico AA – Ouro (BORGES et al., 2009).

A banana é um fruto climatérico, cuja maturação responde à ação do hormônio vegetal etileno num processo autocatalítico, no qual o hormônio estimula sua própria biossíntese em resposta a baixas concentrações, com concomitante aumento da taxa respiratória (MARTÍNEZ-ROMERO et al., 2007).

Durante o amadurecimento ocorrem alterações a nível molecular, de modo coordenado, o qual torna o fruto desejável e palatável para os animais dispersadores de sementes e aumenta a suscetibilidade do fruto a patógenos (BARRY; GIOVANNONI, 2007). Neste evento as alterações fisiológicas e fenotípicas resultam no desenvolvimento de atributos de qualidade, como sabor, cor, aroma e textura.

2.1.1. Alterações no sabor: metabolismo amido-sacarose

A principal alteração durante o amadurecimento da banana é referente ao sabor, devido à conversão do amido em açúcares solúveis. O amido é um polímero insolúvel de D-glicose constituído por amilose e amilopectina, que juntos formam uma estrutura granular semicristalina. A amilose consiste em moléculas de glicose unidas por ligações entre os carbonos α -1,4 e formam

longas cadeias lineares. A amilopectina corresponde a cerca de 75% do amido e contém resíduos de glicose unidos via ligações α -1,4 e por cadeias ramificadas via ligações α -1,6. Associados ao amido estão os componentes minoritários, como cinzas, proteínas, lipídios e fósforo (TETLOW, 2011).

O amido é a principal fonte de reserva de carboidratos produzida por plantas superiores, encontrado em folhas, raízes, tubérculos, cereais e frutas. A síntese provém do carbono assimilado via fotossíntese ocorrendo em organelas específicas, denominadas plastídios, a partir de duas formas principais: amido de reserva nos amiloplastos, e sob a forma de amido transitório, nos cloroplastos, cuja síntese ocorre durante o dia e a degradação à noite (PEREZ; BERTOFT, 2010). Dependendo da cultivar, a banana pode acumular cerca de 12 a 35% de amido de reserva durante o seu desenvolvimento, (MOTA et al, 2002; SOARES et al, 2011). Durante o amadurecimento do fruto, este amido é parcial ou inteiramente degradado, com a concomitante síntese e acúmulo de açúcares solúveis (GARCIA; LAJOLO, 1988; SOARES et al, 2011).

Além do etileno, que desencadeia as alterações no padrão de degradação de amido e no perfil de enzimas hidrolíticas durante o amadurecimento da banana (PERONI-OKITA, 2010; ZHANG et al., 2011; ZHANG et al., 2010), outros hormônios, como o ácido indol-3-acético (IAA), podem influenciar tais eventos. O IAA é considerado um inibidor do amadurecimento da banana, o qual retarda por vários dias a degradação do amido e a formação de sacarose e, possivelmente, também afeta a atividade das enzimas hidrolíticas (PURGATTO et al., 2001; 2002). O ácido giberélico é outro hormônio considerado como um modulador do metabolismo de amido na banana, com efeitos similares ao IAA (ROSSETTO et al., 2004).

De acordo com Soares et al. (2011), as cultivares consumidas *in natura*, como a Nanicão, Mysore e Pacovan, apresentam os maiores percentuais de degradação de amido, e por consequência, também possuem os menores teores de amido residuais no fruto maduro. Os plátanos Figo e Terra, consumidos processados, possuem os maiores teores de amido e os menores percentuais de degradação deste polissacarídeo. Esta distinção quanto ao metabolismo amido-sacarose pode estar associada à diferença na estrutura do

grânulo de amido e ao aparato enzimático para a degradação do amido característicos de cada cultivar.

A principal via de degradação do amido em banana é a degradação hidrolítica através das α e β amilases, com atividade e proteína presentes na polpa e associados aos grânulos de amido, temporalmente coincidente com o início do amadurecimento, produzindo dextrinas de alto e baixo peso molecular (GARCIA; LAJOLO, 1988; NASCIMENTO et al., 2006; PERONI-OKITA, 2010). As demais enzimas supostamente envolvidas na degradação do amido em banana são as desramificadoras como a isoamilase, as α -glicosidasas e as amido-fosforilases (GARCIA; LAJOLO, 1988; BIERHALS et al., 2004; MOTA et al., 2002; MAINARDI et al., 2006).

Quanto ao acúmulo de açúcares solúveis na banana, a sacarose é o açúcar solúvel predominante, seguido por glicose e frutose, os quais estão presentes em todas as cultivares, e dentre estes a Nanicão apresenta os maiores teores de açúcares (MOTA et al, 2002; SOARES et al, 2011). As diferentes cultivares de banana, com exceção da Mysore, também apresentam teores detectáveis de maltose, produto da ação da β -amilase. Os maiores teores de maltose em banana estão presentes na cultivar Pacovan, seguido pela Nanicão, Figo e Terra (SOARES, 2010).

Até onde se sabe, a banana é o único fruto identificado como sendo capaz de sintetizar e acumular frutooligossacarídeos (FOS) (L'HOMME et al., 2001; MUIR et al., 2007; AGOPIAN et al., 2008). Os FOS, que fazem parte dos frutanos, são constituídos por uma molécula de glicose e poucas unidades de frutose, sendo classificados como oligossacarídeos (VIJIN; SMEEKENS, 1999; LIVINGSTON; HINCHA, 2009; TREVISAN; CARVALHO, 2011). São considerados prebióticos por não serem hidrolisados por enzimas digestivas do organismo humano e por servirem de substratos para um número de bactérias no cólon, associadas ao bem-estar e à saúde do hospedeiro (CANDELA et al., 2010).

As cultivares Ouro, Nanicão, Prata, Maçã, Mysore, Pacovan, Terra e Figo acumulam 1-cestose, a primeira da série dos FOS e a cultivar Prata acumula 1-cestose e nistose, com maior grau de polimerização. Segundo estudos de AGOPIAN et al. (2008) existe uma correlação entre a síntese de

FOS e os níveis de sacarose, substrato para a síntese de FOS. Bananas cv. Prata, armazenadas a baixas temperaturas, apresentaram maior acúmulo tanto nos teores de sacarose como nos teores de frutanos, sugerindo que a sacarose exerce um efeito crioprotetor e os FOS exercem um efeito osmorregulador, pois podem ser convertidos em monossacarídeos e garantir, portanto, a sobrevivência do fruto a baixas temperaturas (AGOPIAN et al., 2009).

2.1.2. Alterações na textura: amaciamento da polpa da banana

Uma das alterações durante o amadurecimento dos frutos é o amaciamento da textura a partir do envolvimento de hidrolases sobre as fibras, sobretudo sobre as pectinas presentes na parede celular (BRUMMELL, 2006). De acordo com Cordenunsi et al. (2008), cultivares como Nanicão e Mysore, apresentam microfibrilas de celulose contendo ligações cruzadas de hemiceluloses, como glucuranoarabinoxilano e glucomananos, e pectinas, estabilizados por substâncias polifenólicas. (CORDENUNSI et al., 2008). Na banana, a atividade das enzimas pectina metil, poligalacturonase, pectato liase e celulase possuem principal *up-regulation* pelo hormônio etileno. Em contrapartida, a auxina suprime-as, e o ácido abscísico pode aumentar o amaciamento com ou sem o etileno (LOHANI et al., 2004; ASIF; PRAVENDRA, 2005).

Apesar do envolvimento das enzimas pécticas durante o processo de amadurecimento, o amaciamento na banana está mais relacionado aos níveis de amido do que a mudanças na parede celular. O amaciamento na banana é considerado principalmente uma consequência da degradação do amido e do acúmulo de açúcares solúveis, cuja grande quantidade de grânulos de amido contribui para a firmeza característica encontrada nos frutos verdes (SHIGA et al., 2011)..

2.1.3. Alterações na cor: degradação da clorofila e acúmulo de carotenoides

Associado à textura, a aparência e o aroma desempenham importância na avaliação da qualidade da banana, os quais influenciarão na aceitação do

consumidor. Durante o amadurecimento da banana, a degradação da clorofila, pela clorofilase, é a etapa fundamental para que os carotenoides sejam revelados. Os carotenoides são nutrientes essenciais não sintetizados pelo organismo humano e são antioxidantes naturais, protegendo células e tecidos contra os radicais livres e agindo como quelante do oxigênio singlete (DELGADO-VARGAS et al., 2000). A casca da banana é composta principalmente pelos carotenoides luteína, α e β -caroteno, violaxantina, auroxantina, isoluteína α e β -criptoxantina, sendo que a luteína aumenta significativamente durante o amadurecimento (SUBAGIO; MORITA, 1997). Alguns carotenoides, como o β -caroteno, com um anel beta no grupo terminal, são considerados precursores da vitamina A. As proporções de α e β -caroteno na polpa da banana são características de cada genótipo, sendo que os plátanos apresentam maiores teores de carotenoides comparados à banana de sobremesa (DAVEY et al., 2007; 2009). Pesquisas recentes com as cultivares Nanicão e Prata têm demonstrado que baixas temperaturas de armazenamento do fruto também podem induzir mudanças nos níveis de carotenoides na polpa. Os resultados obtidos mostram que os carotenoides majoritários foram acumulados na Nanicão, indicando que a via desses componentes foi afetada pelo tratamento a frio (FACUNDO et al., 2015).

2.1.4 Alterações no aroma: síntese de ésteres

Os compostos voláteis são os responsáveis pelo aroma do fruto. São mais de 250 compostos voláteis identificados na banana (IMAHORI et al., 2013). No estágio maduro, a banana produz ésteres, alcoóis, aldeídos e cetonas. Os ésteres são os principais componentes do aroma dos frutos, a fim de atrair animais dispersores de sementes e proteger o fruto contra patógenos (BEEKWILDER et al., 2004). O aroma característico da banana madura é constituído pelos ésteres acetato de isoamila, acetato de butila e 3-metil butil butanoato. Em bananas cv. Prata e Nanicão, submetidas a baixas temperaturas de armazenamento, o perfil de ésteres apresentou resultados distintos em cada uma destas, indicando que as vias metabólicas responsáveis

pela síntese de voláteis podem estar relacionadas com a tolerância do fruto ao frio (FACUNDO et al., 2012).

A enzima álcool aciltransferase é a responsável pela formação dos ésteres na banana, usando o álcool e o acil CoA como substratos (SALMON et al., 1998; NASCIMENTO JUNIOR et al., 2008). Os possíveis precursores de ésteres e alcoóis importantes no aroma da banana são os aminoácidos leucina e valina. Segundo Seymour (1996), tais aminoácidos aumentam durante o amadurecimento do fruto e se correlacionam com a produção de voláteis. Os metabólitos de carotenoides também são constituintes comuns em aromas dos frutos. A formação e degradação de carotenoides não apenas afetam a cor e o valor nutricional, como também o perfil aromático. A α -ionona é o principal composto do aroma na banana originado a partir dos carotenoides (UENOJO et al., 2007).

2.2. Sistemas de produção convencional e alternativos em cultivos de banana

Desde o início do século passado, a bananicultura brasileira tem sido mais expressiva na região sudeste, principalmente no Estado de São Paulo, o qual possui um pólo de produção importante, o Vale do Ribeira (68% da produção do Estado) (LICHTEMBERG; LICHTEMBERG, 2011).

O Vale do Ribeira não apenas se destaca na produtividade agrícola, mas também pela grande diversidade ecológica. Em 1999, esta região foi intitulada pela UNESCO como Patrimônio Natural da Humanidade por apresentar o maior fragmento contínuo da Mata Atlântica (CPLA, 2014), numa área que acolhe 2,1 milhões de hectares de florestas, 150 mil de restingas e 17 mil de manguezais (SOS MATA ATLÂNTICA, 2012).

A Mata Atlântica é um dos principais biomas brasileiros, cuja fauna e flora correspondem a 1-8% do total de espécies no mundo, abrigando milhares de espécies endêmicas, de vegetais (~40%) a vertebrados (16-60%) (MITTERMEIER et al., 2005). Em sua origem, a Mata Atlântica abrigava cerca de 150 milhões de hectares nas regiões tropicais e subtropicais, porém tem sido reduzida a 14% de áreas remanescentes e por isso é conhecida como uma das florestas mais ameaçadas do mundo (CARNAVAL et al., 2009;

PAYÉS et al., 2013; TAMBOSI, 2014). O desmatamento na Mata Atlântica pode atingir 0.5% anualmente, sendo que apenas na região metropolitana de São Paulo, este índice chega a 2.9% (TEIXEIRA et al., 2009; TABARELLI et al., 2013).

O atual sistema agrícola convencional contribui para o desaparecimento de ecossistemas e espécies, pois se baseia na prática da monocultura e da produção extensiva de reduzido número de espécies vegetais (MARCATTO, 2002; EHRLS, 2003). Também utiliza insumos químicos, que a princípio aumenta a produtividade, porém tem impacto negativo sobre o ambiente e a saúde humana, cuja contaminação pode afetar seres humanos, a fauna e a flora. A falta de manejo e cobertura do solo promove um desbalanço nutricional no solo e pode aumentar o índice de pragas, podendo intensificar a degradação ambiental (TILMAN et al., 2002; BELLAMY, 2013). Calcula-se que a devastação por pragas e doenças, como a Sigatoka Negra, seja 50% na produção agrícola de banana mundial (OERKE, 2006).

A Sigatoka Negra é uma doença fúngica (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) responsável pela mais severa destruição foliar na banana, a qual afeta as variedades cultivadas tradicionalmente no Brasil. A doença tem como característica a presença de estrias de coloração marrom nas folhas que progridem a estrias negras, e por fim a necrose. Como consequência da redução da área fotossintética da planta, a Sigatoka Negra pode diminuir 40% do peso do fruto, diminuindo a sua qualidade (FIORAVANÇO; PAIVA, 2005; CASTELAN et al., 2012; RAMSEY, et al., 1990). No entanto, para controlar a epidemia e manter um equilíbrio dinâmico, os agricultores intensificam o uso de insumos químicos, num ciclo que gera dependência e potencializa ainda mais a degradação e contaminação ambiental, desencadeando novas infestações locais..

Como medida sustentável para conter o desaparecimento de espécies e a deterioração dos ecossistemas e ao mesmo tempo atender as necessidades atuais, como o desenvolvimento socioeconômico, alternativas de manejo dos recursos naturais são indicadas para minimizar os impactos negativos (RESENDE, 2000; ALTIERI, 1998). A agricultura sustentável ou alternativa consiste em um manejo “ecologicamente correto, economicamente viável,

socialmente justo, culturalmente adaptado, que se desenvolve como um processo, numa condição democrática e participativa” (FÓRUM GLOBAL, 1992).

A aplicabilidade dos princípios e conceitos ecológicos ao manejo sustentável se dá através da agroecologia, uma ciência que estuda as interações e os processos envolvidos nos agroecossistemas. A agroecologia tem como finalidade a melhoria da qualidade ambiental e promoção do desenvolvimento rural, humano e adaptativo (MARCATTO, 2002; PERFECTO; VANDERMEER, 2010). Com a perspectiva de biodiversificação dos agroecossistemas, a agroecologia propõe um redesenho dos sistemas agrícolas convencionais a um sistema sustentável com princípios ecológicos e socioeconômicos (PEREIRA-NETO, 2010).

A partir de uma infraestrutura diversificada e autossuficiente, o sistema agroecológico implantado pode favorecer os recursos naturais e as interações biológicas, sem ou com baixo uso de insumos sintéticos ou orgânicos. Também proporciona habitat para as espécies, conserva a fauna e flora restante, favorece o acúmulo de matéria orgânica, o equilíbrio do solo e da vida microbiana, a melhoria na polinização, a reciclagem de nutrientes e energia, o controle de pragas e produtividade agrícola, logo, menor impacto ambiental (ALTIERI; NICHOLLS, 2006; CAMPOLIN; FEIDEN, 2011).

As técnicas utilizadas na agroecologia para aumentar a resistência da planta são a cobertura, a adubação verde e orgânica, plantio direto, o reflorestamento, a rotação de cultura e rotação de pastagem, o plantio consorciado, o controle de pragas e doenças através do uso de práticas alternativas e a compostagem (PENTEADO, 2001; SILVA, 2008).

O desenvolvimento de um sistema sustentável a partir do uso de técnicas agroecológicas, pode desencadear interações entre os organismos vivos e seu ambiente e gerar transformações em sua estrutura e função ao longo do tempo (ALTIERI, 2000). Como reflexo das alterações ambientais, os mecanismos de respostas fisiológicas também podem alterar e desencadear o acúmulo de biomassa, mudanças complexas na estrutura vegetal e nas relações entre os organismos, o qual progride para um equilíbrio dinâmico e melhor qualidade socioambiental (FEIDEN, 2005). Portanto, conhecer os

efeitos das práticas agroecológicas sobre o metabolismo vegetal pode melhorar o entendimento do papel dos compostos químicos em resposta a estímulos e estresses bióticos e abióticos.

2.3. Mecanismos de defesa da planta

As plantas estão limitadas ao mesmo local durante toda a sua vida. Como adaptação ao meio, tais organismos desenvolveram defesas químicas e estruturais em resposta aos estresses abióticos, causados por fatores ambientais, como por exemplo, deficiência a nutrientes, estresse hídrico, temperatura excessiva e poluição em resposta aos estresses bióticos, causados por invasores, tais como, bactéria, fungos, protozoários, insetos e vertebrados (PASTOR et al., 2014).

As plantas têm um potente e coordenado sistema de defesa e vigilância para combater estes estresses. No início da infecção, as plantas têm a capacidade de reconhecer padrões moleculares associados ao microrganismo (PAMPs - *pathogen-associated molecular patterns*) através de receptores de reconhecimento padrão ou proteínas de resistência intracelular (R) (ZIPFEL, 2014). Os receptores ativam o sistema imune (*PAMP-triggered immunity*, conhecido como PTI) no âmbito local e sistêmico por vias de sinalização, os quais envolvem os hormônios, como etileno, ácido abscísico, poliaminas, jasmonato e ácido salicílico (DICKE, VAN LOON, 2014; PIETERSE; VAN WEES, 2015). Porém existem microrganismos que rompem essa primeira linha de defesa da planta ao liberarem proteínas executoras (TTEs) para suprimir esta resistência basal (HIRUMA et al., 2013). Como alternativa, as plantas desenvolveram uma segunda linha de defesa, conhecida como *resposta hipersensitiva*, também desencadeada em casos de estresses abióticos. A resposta hipersensitiva reconhece a presença de moléculas responsáveis pela doença e limita o acesso do hospedeiro aos nutrientes da planta através de um mecanismo indutivo de morte celular programada no local da infecção (MUR eta al., 2008). Esta defesa local pode induzir um fenômeno chamado *Resistência sistêmica adquirida* (RSA), desencadeado pelo acúmulo de ácido salicílico, produção de sinais móveis e de proteínas antimicrobianas PR (relacionada a patogêneses). Como consequência, a RSA proporciona

proteção contra uma ampla faixa de patógenos, fungos, oomicetos, vírus e bactérias, por semanas ou meses (PIETERSE et al., 2012; JONES, DANGL, 2006; ETALO et al., 2013).

2.3.1. Defesa química da planta

2.3.1.1. Metabólitos secundários

Uma das estratégias de defesa da planta é a produção de metabólitos secundários, os quais agem através de sua toxicidade a fim de eliminar os herbívoros e patógenos que atuam contra o sistema imune da planta (PASTOR et al., 2013). Os metabólitos consistem em pequenas moléculas participantes de processos metabólicos como intermediários ou produtos finais, classificados como primário ou secundário. Os metabólitos primários, como lipídios, proteínas, carboidratos e ácidos nucleicos, são considerados como essenciais para a manutenção da vida vegetal. Ao contrário dos componentes químicos encontrados no metabolismo primário, os metabólitos secundários não estão diretamente envolvidos nos processos de crescimento, desenvolvimento e reprodução da planta, mas participam frequentemente na defesa da planta contra os estresses, como intermediários das interações entre as plantas e outros organismos. (PIETERSE et al., 2012).

Os metabólitos secundários possuem características químicas variadas e são provenientes do metabolismo primário, a partir da glicose, convertida em piruvato e entrando assim na via do ácido chiquímico, ou pode ser oxidado até formar acetil-coA. Por sua vez, as moléculas de acetil-coA podem entrar na via do ciclo do ácido cítrico, via do ácido mevalônico ou via do ácido malônico (TAIZ; ZEIGER, 2006). Através destas vias serão formados os terpenos, compostos nitrogenados ou compostos fenólicos (Figura 1).

Figura 1. Representação das vias de biossíntese dos metabólitos primários e secundários. MEP - via metileritritol fosfato. *Fonte:* TAIZ; ZEIGER, 2006.

Os *terpenos* ou *terpenóides* constituem a maior classe de metabólitos secundários e são derivados de dois precursores, do difosfato isopentil (IPP) e do seu isômero dimetilalil difosfato (DMAPP). O terpeno mais simples é o isopreno, contendo cinco carbonos. Os terpenos são classificados de acordo com o número de isoprenos identificados em sua estrutura química (Figura 2) (FREEMAN; BEATTIE, 2008). As vias responsáveis pela formação dos terpenos são o ácido mevalônico (no citoplasma) que dá origem aos sesquiterpenos (três unidades de isopreno) e a via metileritritol fosfato (no cloroplasto) precursora dos hemiterpenos, monoterpenos (duas unidades de isopreno) e diterpenos (quatro unidades de isopreno) (DUDAREVA et al., 2013).

Figura 2. Estruturas de alguns terpenos. *Fonte:* HALBE, 2005.

Os *compostos fenólicos* englobam diversas substâncias e tem como estrutura química característica um anel aromático com um ou mais grupos hidroxila (Tabela 1). Existem compostos fenólicos amplamente distribuídos na natureza, como os flavonóides e derivados, e ácidos fenólicos. O ponto de partida para a síntese destes é a fenilalanina sintetizada a partir da via do ácido chiquímico. Os compostos fenólicos também podem ser sintetizados pela via do ácido mevalônico, porém esta é menos significativa (HUI, 2010). Os flavonoides possuem como estrutura básica dois anéis aromáticos interligados por três carbonos e são subdivididos em vários grupos. As principais classes dos flavonóides são isoflavonas, flavanóis, flavanonas, flavonóis, flavonas e antocianidinas. Os ácidos fenólicos têm como característica comum um anel aromático e uma hidroxila e são subdivididos de acordo com sua estrutura carbônica, em hidroxicinâmicos e hidroxibenzóicos (PRADO, 2009).

Tabela 1. Classe de compostos fenólicos em plantas e sua estrutura.

Classe	Estrutura
Fenólicos simples, benzoquinonas	C_6
Ácido hidroxibenzóicos	C_6-C_1
Acetofenol, ácidos fenilacéticos	C_6-C_2
Ácidos hidroxicinâmicos, fenilpropanóides	C_6-C_3
Nafitoquinonas	C_6-C_4
Xantonas	$C_6-C_1-C_6$
Estibenos, antoquinonas	$C_6-C_2-C_6$
Flavonóides, isoflavonóides	$C_6-C_3-C_6$
Lignanas, neolignanas	$(C_6-C_3)_2$
Biflavonóides	$(C_6-C_3-C_6)_2$
Ligninas	$(C_6-C_3)_n$
Taninos condensados	$(C_6-C_3-C_6)_n$

Fonte: ANGELO, P. M. 2007.

Os *compostos nitrogenados* são sintetizados a partir de aminoácidos comuns e divididos em alcaloides, glicosídeos cianogênicos, glucosinolatos e aminoácidos não proteicos (Figura 3). Estes compostos são sintetizados a partir de aminoácidos aromáticos, como triptofano e tirosina (derivados do ácido chiquímico) e de aminoácidos alifáticos, como ornitina e lisina (TAIZ; ZEIGER, 2006).

Figura 3. Estruturas de alguns alcaloides. Fonte: TAIZ; ZEIGER, (2006).

Os metabólitos secundários podem atuar como atrativos de dispersores de sementes, na competição planta-planta e na simbiose plantas-microrganismos e como já foi dito acima, na defesa contra herbívoros e patógenos.

Muitos metabólitos secundários têm funções de *sinalização* e aumentam sua concentração em resposta aos estresses. Compostos como ácido salicílico, metil salicílico, ácido zeláico, glicerol-3-fosfato e abietano diterpenóide deidroabietinal, por exemplo, podem ter sua síntese desencadeada por uma doença e transmitir sinais do local da infecção para o resto da planta a fim de induzir a *Resistência sistêmica adquirida* (RSA) (PIETERSON et al., 2012).

Outras substâncias, como os aminoácidos metionina e cisteína e compostos tióis não proteicos, como a glutatona (γ -glutamil-cisteinil-glicina; GSH), também podem contribuir para a tolerância de plantas a estresses. Diversos estudos têm confirmado que os níveis destes metabólitos aumentam em plantas expostas a diferentes estresses abióticos como, sal, seca, frio, luz UV, metais e ozônio. A cisteína serve como um doador de enxofre para a metionina e de glutatona: a metionina é o substrato de síntese de poliaminas, os quais são participantes da resposta a estresses abióticos, e a glutatona é considerada um marcador de estresse e viabilidade celular, o qual contribui com a sinalização de vias responsáveis pela resposta hipersensitiva (ETALO et al., 2013).

Outro mecanismo de defesa das plantas é a síntese de metabólitos com atividade antimicrobiana. Esses metabólitos, conhecidos como *fitoalexinas*, são formados como resultado de estresses bióticos ou abióticos e podem ser tóxicos ou inibir o crescimento e desenvolvimento de uma ampla variedade de microrganismos (ZERNOVA et al., 2014). No modelo vegetal *Arabidopsis thaliana*, a principal fitoalexina sintetizada nas situações de estresses abióticos ou bióticos é a camalexina (3-thiazol-2-il-indol), que possui efeitos tóxicos e é capaz de romper com as membranas celulares de certos patógenos. Em espécies *Musa*, as fenilfenalenonas são as principais fitoalexinas com atividade antifúngica contra certas doenças, como Sigatoka

Negra (*Mycosphaerella fijensis*) e do Mal do Panamá (*Fusarium oxysporum* var. *cubensis* tipo 4) e também possuem atividade antioxidante (DUQUE et al, 2013). As fenilfenalenonas são produtos naturais derivados dos fenilpropanóides que se apresentam em níveis elevados 1 a 2 dias após a inoculação do microrganismo em bananas (JITSAENG; SCHNEIDER, 2013; KAMO et al., 2000). Estes compostos foram isolados nos rizomas, frutos e folhas, sendo que dentre uma variedade de fitoalexinas, a 2-hidróxi-9-(p-hidroxifenil)-fenalen-1-ona, tem sido encontrada em maiores concentrações na banana (BORGES et al., 2003).

2.3.1.2.. *Priming*

Os mecanismos químicos de defesa da planta podem estar ausentes ou presentes em pequena quantidade antes do contato inicial com o invasor (pós-formado), como também podem estar presentes antes da infecção (pré-formado). Dentro da categoria dos pré-formados estão os *priming*, e como o próprio nome diz, são metabólitos participantes da resistência da planta em resposta a um estímulo antes mesmo do acúmulo dos metabólitos secundários (PASTOR et al., 2013). De acordo Conrath et al. (2006), é um mecanismo não necessariamente de ação direta, mas uma sensibilidade do sistema imune da planta que possibilita uma resposta mais rápida e mais forte contra o patógeno. O *priming* de defesa induz um aumento na sinalização de certos componentes participantes da resistência basal em âmbito local ou sistêmico na planta. Os estudos apontam que o *priming* pode estar diretamente correlacionado com o aumento da expressão de fatores de transcrição de defesa. Numa pesquisa acerca da presença de *priming* em *Arabidopsis thaliana*, a bactéria *Pseudomonas fluorescens* induziu o *priming* após o aumento da expressão de fatores de transcrição regulatórios de defesa, e estes desencadearam a expressão primária de sistemas de defesa dependentes do ácido jasmônico e do ácido salicílico (VAN DER ENT et al., 2009). Alguns componentes químicos como o benzotiadiazol, o ácido azeláico e o ácido β -aminobutírico também podem desencadear respostas primárias contra patógenos. Como exemplo, *Arabidopsis thaliana* inoculada com o fungo *Plectosphaerella cucumerina* foram pré-tratadas com β -aminobutírico e apresentaram um aumento na produção de

peróxidos e calose, contribuindo posteriormente no acúmulo da fitoalexina camalexina (PASTOR et al., 2013).

2.3.2. Poliaminas: hormônio de defesa?

2.3.2.1. Mecanismos de ação e biossíntese das PA

As poliaminas (PA) apresentam baixo peso molecular e podem ser encontradas em todos os compartimentos da célula, incluindo o núcleo (ALCAZAR et al., 2010; ALCAZAR; TIBURCIO, 2014). Tais moléculas são constituídas de grupamentos nitrogenados e devido a sua carga positiva, podem se ligar a ácidos orgânicos e a macromoléculas, como membrana plasmática, polissacarídeos da parede celular, DNA, RNA e proteínas (BAIS; RAVISHANKAR, 2002). Tal característica lhes confere participação em diferentes processos regulatórios do crescimento e diferenciação celular, além do papel de proteção contra estresse: regulação da expressão gênica, tradução, modulação da sinalização, proliferação e estabilização da membrana (BITRIAN et al., 2012).

Em plantas, as PA podem influenciar no amadurecimento do fruto como agentes anti-senescência e quando aplicados em frutos, podem retardar as mudanças desencadeadas durante este estágio (DEYMAN et al., 2014).

As PA mais comuns em plantas são a putrescina (1,4 diaminobutano), a espermidina (N-(3aminopropil) butano-1,4-diamino) e a espermina (N,N'-bis(3aminopropil)butano-1,3-diamino) (Figura 4).

Figura 4. Estruturas das poliaminas putrescina, espermidina e espermina.
 Fonte: OLIVEIRA, (2010).

A biossíntese das PA se dá a partir do composto L-arginina que origina duas vias: a via de transformação da L-arginina em L-ornitina através da ornitina descarboxilase e a via de transformação da L-arginina em L-agmatina, através da arginina descarboxilase (Figura 5). Por uma das vias ocorre a conversão para a putrescina, que é convertida em espermidina pela espermidina sintase. Esta, por sua vez, é convertida na espermina. Além da arginina, a metionina também é um substrato de síntese das poliaminas. A metionina é regenerada eventualmente pela S-adenosil-L-homocisteína, que por sua vez é produzida pela S-adenosilmetionina (SAM), também precursor de etileno via ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) (NEELAM et al, 2008; MOSCHOU et al., 2008; IONNANDIS; KOTBASIS, 2014). Em *Arabidopsis thaliana*, os genes codificadores das enzimas chaves da via de biossíntese têm sido isolados e caracterizados: dois genes para arginina descarboxilase (ADC1 e ADC2), um gene para cada agmatina iminohidrolase (AIH) e um gene para N-carbamoilputrescina aminohidrolase (CPA). A espermidina sintase é codificada pelos genes SPDS1 e SPDS2 e a espermina sintase é codificada pelos genes ACL5 e SPMS (PARRA-LOBATO; GOMEZ-JIMENEZ, 2011; DEY; GUPTA; GUPTA, 2014).

Figura 5. Via de biossíntese das poliaminas em planta. ADC arginina descarboxilase; ODC ornitina descarboxilase; SPDS espermidina sintase; SPMS espermina sintase; SAM S-adenosilmetionina; SAMDC S-adenosilmetionina descarboxilase; dcSAM S-adenosilmetionina descarboxilado.

2.3.2.2. O metabolismo das PA durante interações bióticas e abióticas.

No início da infecção, receptores com alto grau de especificidade contra patógenos e herbívoros desencadeiam uma complexa rede de sinalização envolvendo reguladores vegetais, conhecidos também como hormônios (PIETERSE et al., 2012).

Os hormônios vegetais participam da regulação do crescimento e desenvolvimento da planta, agindo também em sinergismo e interações antagônicas, no processo de resistência da planta a estresses bióticos e abióticos, promovendo a produção de peróxidos e de outras espécies de oxigênio reativas, que atuam como mensageiros na ativação dos genes de defesa (BARTOLI et al., 2012). Os principais hormônios de defesa são o Ácido salicílico (SA) e o Ácido jasmônico (JA). Porém outros reguladores, como a Auxina (IAA), Citocininas (CK), Giberelinas ou Ácido giberélico (GA), Ácido abscísico (ABA) e o Etileno (ET) são importantes moduladores da interação

AS-AJ ou podem ter efeitos independentes sobre a resistência imune da planta (ROBERT-SEILANIAN et al. 2011). As PA também são detectadas em plantas expostas a estresses bióticos e abióticos como participantes da defesa, atuando contra os ataques de patógenos e os estresses oxidativo, ácido, osmótico e neuronal (KUSANO et al., 2008).

Estudos têm apresentado acúmulo nos níveis das PA em cultivares tolerantes a estresses abióticos, como temperatura, salinidade, aumento do ozônio atmosférico ou radiação UV-B (IOANNIDIS; KOTZBASIS, 2014). *Arabidopsis thaliana*, berinjela, tomate, laranja e arroz com os genes das PA superexpressos são alguns dos exemplos de que os níveis das PA podem aumentar a resistência da planta (PRABHAHAVATHI; RAJAM, 2007; PEREMARTI et al., 2010; HAZARIKA; RAJAM, 2011; CAPELL, et al., 2004; URANO et al., 2004; GONZALEZ et al., 2011; FU; LIU, 2013). Em contrapartida, a *Arabidopsis* transgênica ACL5 e SPMS, que não produz espermina, possui hipersensibilidade aos estresses abióticos (KUSANO et al., 2007). Nesse estudo foi observado na planta um estresse hídrico, cujo sintoma era a desregulação nos níveis de cálcio. O resultado foi explicado pelos autores do estudo como sendo alteração da modulação dos canais iônicos e o fluxo da membrana plasmática pela falta de espermina prejudicando a homeostase celular. Também, a inibição da espermina pode causar falhas no sistema de abertura e fechamento dos estômatos e, como consequência, promover uma maior perda de água (YAMAGUCHI et al., 2006; ALCÁZAR et al., 2010).

Em situações de estresses bióticos, após a interação entre o microrganismo e o gene de resistência *N*, a síntese da PA aumenta nos tecidos infectados, concomitante ao desencadeamento da *Resposta Hipersensitiva* (RH) (MARINI et al., 2001; MOSCHOU; ROUBELAKIS-ANGELAKIS, 2013). Além do acúmulo das PA livres, é observado um aumento na concentração das PA conjugadas, os quais afetam o crescimento e desenvolvimento de microrganismos. PA conjugadas ao ácido hidroxicinâmico, por exemplo, auxiliam na construção de uma barreira fenólica que torna a parede celular mais resistente à ação enzimática (WALTERS et al., 2001; JIMÉNEZ-BREMONT et al., 2013; ZAGORCHEV et al., 2013).

Pesquisadores têm observado que a espermidina é fundamental nos mecanismos de ativação da defesa da planta. O acúmulo de espermidina em plantas como tabaco e *Arabidopsis*, sugere que esta PA atua como um transmissor de sinais para ativar vias de defesa desencadeando a expressão de genes relacionados com a patogenicidade e, como consequência, induz a morte celular no local da infecção do mesmo modo que a RH (YAMAKAWA et al., 1998; MOSCHOU et al., 2008; ZHENG et al., 2005; JIMÉNEZ-BREMONT et al., 2013). A espermina juntamente com a espermidina também pode induzir o óxido nítrico em *Arabidopsis*, o qual tem participação na sinalização de defesa durante o ataque do patógeno (KUSANO et al., 2008).

A oxidação das PA também desempenha um importante papel na defesa da planta. O catabolismo das PA tem como intermediários enzimáticos as diaminas oxidases (DAO) e as poliaminas oxidases (PAO), os quais liberam peróxidos e 1,3-diaminopropano como produtos finais. Os peróxidos contribuem para ativação da RH e estão envolvidos na modulação da expressão gênica, na sustentação da parede celular e em outros mecanismos independentes da RH. Os outros produtos da reação, como a pirrolina, são metabolizados em gamma-aminobutírico (GABA), também associados à defesa da planta (NANDA et al., 2010; BOUCHE; FROMM, 2004; ALCÁZAR et al., 2010; JIMÉNEZ-BREMONT et al., 2013).

Quanto à interação das PA com os hormônios de defesa, sabe-se que o ácido jasmônico (JA) pode influenciar a expressão de genes do metabolismo das PA e hipoteticamente outros hormônios, como as auxinas (IAA) e o ácido abscísico (ABA), podem participar na via de sinalização. Diferentes espécies vegetais, como cevada, tabaco e nêspera, foram tratadas com metil-jasmonato e apresentaram maiores teores das PA livre e conjugadas, indução de proteínas como quitinases e peroxidases, e menor incidência de doenças (WALTERS et al., 2002; CAO et al., 2014; BIONDI et al., 2003; ALCAZAR et al., 2010). Sobre o ácido salicílico, ainda não está claro o seu papel na interação com o metabolismo das PA em situações de estresse.

2.4. Metaboloma

2.4.1. Definição do termo e aplicações

Allendorf et al. (2010) afirmaram que os progressos tecnológicos realizados nos últimos anos têm maximizado o potencial da genômica a tal ponto que em breve teremos sequências genômicas completas de milhares de espécies. Porém, o tempo para explorar todo esse conhecimento e dar sequência a novas abordagens tornou-se um fator limitante, e a genômica funcional pode ser a ferramenta apropriada para acelerar o entendimento biológico. A genômica funcional é a ciência que visa integrar a informação de diferentes campos da biologia molecular a fim compreender a relação genótipo-fenótipo (TANG, 2014). Tal informação é obtida a partir de experimentos automatizados e da análise bioinformática do genoma, transcriptoma, proteoma e metaboloma (SOPPA, 2011).

A metaboloma, ou metabonoma, foi um termo sugerido pela primeira vez em 1998, por Stephen Oliver ao discorrer sobre o conjunto de todos os compostos de baixa massa molecular (<1000 Da), do metabolismo primário e secundário, sintetizados e/ou modificados por um organismo (OLIVER et al., 1998). Os metabólitos, como substratos, produtos ou cofatores nas reações químicas, presentes dentro e fora das células, são a linguagem direta em resposta aos estímulos do ambiente ou modificações genéticas (ROESSNER; BOWNER, 2009).

Nem sempre o transcriptoma e o proteoma auxiliam no entendimento de uma célula ou organismo, pois os níveis alterados de RNAm podem não resultar em mudanças nos níveis de proteínas, como também uma enzima pode ou não estar ativa (GYGI et al., 1999; LYN et al. 2014; SATOU et al., 2014). Mas a metaboloma pode fazer a ponte entre o genótipo e o fenótipo e permitir a compreensão celular, a identificação de compostos desconhecidos e a formação de novas hipóteses a partir dos dados obtidos (SCHAUER; FERNIE, 2006).

Em 2002, Fiehn sugeriu o uso do termo para a análise de todos os metabólitos de um organismo. Isto seria o ideal, porém é impossível devido à ampla diversidade de componentes químicos presentes em ampla faixa de

concentração, onde milhares de reações acontecem simultaneamente. Quatro abordagens analíticas foram propostas por Fiehn (2002):

- 1) Perfil metabólico – análise de um número de metabólitos pré-selecionados de amostras biológicas;
- 2) Análise-alvo – análise de um ou poucos metabólitos específicos. Como exemplo, os hormônios vegetais;
- 3) Metaboloma – termo usado para análises quantitativa e qualitativa de todos os intermediários bioquímicos da amostra e tem como foco identificação de compostos desconhecidos;
- 4) *Fingerprinting* metabólico – rápida classificação das amostras, o qual não visa separar os metabólitos individualmente.

Villas-Bôas et al. (2005) sugerem o uso da metaboloma para descrever uma nova área da ciência, que caracteriza fenótipos metabólicos num determinado conjunto de condições biológicas de um organismo. Com base neste novo conceito de metaboloma, novas abordagens foram organizadas:

- 1) Perfil metabólico – análise ampla dos metabólitos, conhecidos ou não, detectados por uma ou mais técnica analítica particular; sendo este termo o mais utilizado devido a sua alta aplicação;
- 2) *Fingerprinting* metabólico – análise dos metabólitos intracelulares;
- 3) *Footprinting* metabólico – análise dos metabólitos extracelulares.

O perfil metabólico tem sido uma ferramenta útil nos estudos de diversas espécies vegetais como *Arabidopsis*, tomate, arroz, batata, arroz, trigo, cana de açúcar, milho, cereja e alface (KUSANO et al., 2011; PEREZ-FONS et al., 2014; KUSANO et al., 2014; SHEPHERD et al., 2014; BOWNE et al., 2012; MANNERS et al., 2011; MARTI et al., 2013; SMITH et al., 2011; PEREIRA et al., 2014). A metaboloma pode ser aplicada para diversos fins, os quais inclui análise fenotípica, compreensão da biologia de sistemas, diagnóstico em plantas e estudo de sistemas de cultivos alternativos.

2.4.1.1. Análise fenotípica. A metaboloma tem ajudado a estimar o modo de ação de herbicidas. Este foi um dos primeiros estudos diagnósticos da área, onde Sauter et al. (1991) compararam sementes de cevada tratadas com doses variadas de herbicidas, com sementes não tratadas, o qual resultou na

discriminação visual dos perfis de metabólitos. No estudo de diagnóstico de classificação e caracterização, Roessner et al. (2001), Defernez et al. (2004) e Catchpole et al. (2005) fizeram um comparativo de genótipos de *Arabidopsis thaliana* e de batata, provenientes de cultivos convencionais e geneticamente modificados, em busca de respostas metabólicas.

2.4.1.2. Compreensão da biologia de sistemas. Estudos relacionados com a função gênica, que envolvem mecanismos de expressão gênica, proteínas e metabólitos, podem também auxiliar no entendimento das redes metabólicas, das modificações genéticas específicas e futuras aplicações na biotecnologia. Fernie et al. (2004) avaliaram o perfil de metabólitos da *A. thaliana* *sdd1-1*, e *dgd1*, e seus ecótipos selvagens, Colombia (Col-2) e C24. Os resultados mostraram que mudanças nos níveis de certos metabólitos são causadas pela superexpressão de 0,1-1% dos genes, evidenciando que pequenas alterações da atividade enzimática alteram os níveis dos metabólitos no organismo. Este tipo de estudo na genômica é chamado de sistema biológico, uma abordagem holística que envolve o estudo dos organismos integrados e as interações dos produtos gênicos, mensuradas e correlacionadas para elucidação da bioquímica vegetal (DO et al., 2010).

2.4.1.3. Diagnóstico em plantas: Biomarcadores. A análise do perfil metabólico tem auxiliado na seleção de biomarcadores a fim de compreender a composição química das espécies vegetais. A identificação, quantificação e análise de biomarcadores auxiliam a prever características fenotípicas antes mesmo de elas aparecerem e podem ser empregadas no estudo de cultivos, doenças ou tolerância a estresses (STEINFATH, et al., 2010; PHELIX; FELTUS, 2014). Os metabólitos secundários estão envolvidos na defesa do organismo contra predadores e perturbações ambientais e, como muitos dos compostos, eles podem ser específicos para um determinado organismo, sendo considerados como biomarcadores (VAN DONGEN; SCHAUER et al., 2014; WOLFENDER et al., 2013).

2.4.1.4. Sistemas de produção alternativos. A metaboloma pode ser uma ciência útil na avaliação dos componentes químicos como indicação de modificações genéticas, do impacto geográfico (local e clima) e das práticas de cultivo (DAVIES et al., 2010). O perfil metabólico torna-se um reflexo das alterações da planta e de situações de estresse, expondo as variações dos metabólitos como resposta a biodiversidade das plantas e insetos (ARBONA, et al., 2013; ROESSNER; BACIC, 2009; NADELLA, 2012). Estudos revelam que a relação produtividade-biodiversidade é positiva e que os efeitos são visíveis sobre as espécies individualmente, porém ainda não são totalmente conhecidos os mecanismos de respostas celulares e moleculares (KUSANO; SAITO, 2012; SCHERLING et al., 2010). Matoo e Abdul-Baki et al. (2006), foram os primeiros pesquisadores que estudaram os efeitos do uso de sistemas alternativos sobre o genoma e a proteoma de tomates. Os resultados mostraram que coberturas como ervilhaca ajudam a adequar a diferentes culturas, fixar nitrogênio, produzir biomassa, retardar a senescência, inibir a presença de patógenos e ervas daninhas, como também são as responsáveis por dinâmica metabólica específica e vias de sinalização nos vegetais.

Estudos também têm indicado que as mudanças no metabolismo do fruto são dependentes do ambiente. Uma análise do perfil metabólico de ervas provenientes de uma área de biodiversidade composta por várias espécies - gramíneas, leguminosas, ervas com altas e baixas estaturas - detectou 139 mudanças significantes dos metabólitos, dos quais as ervas de pequena estatura, *L. autumnalis*, *B. perennis* and *L. corniculatus*, apresentaram respostas metabólicas com o aumento da biodiversidade local comparados às plantas de maior estatura (SCHERLING et al., 2010).

2.4.2. A complexidade do preparo da amostra e análise posterior dos dados obtidos

De acordo com Fiehn (2002), existem 200.000 diferentes compostos no reino vegetal, que representam diferentes classes com ampla variedade de propriedades físico-químicas. “São espécies iônicas a carboidratos hidrofílicos, alcoóis e cetonas voláteis, aminoácidos e ácidos orgânicos, lipídios hidrofóbicos e produtos naturais complexos” (VILLA-BOAS; GOMBERT, 2006).

Enquanto que a *Escherichia coli* contém cerca de 750 metabólitos, um organismo eucariótico pode apresentar entre 4.000 e 20.000 metabólitos, por exemplo, a *A. thaliana* tem cerca de 5.000 diferentes compostos já detectados (NOBELI et al. 2003; FERNIE et al., 2004; DO et al. 2010). No organismo humano, o número de pequenas moléculas chega a mais de 100.000 devido ao consumo de alimentos e remédios (KOEK et al., 2011). Esta vasta quantidade de metabólitos reflete na dificuldade de se obter protocolos com ótimas condições de extração e derivatização, no caso de cromatografia gasosa, dos metabólitos para uma matriz específica, e por isso a necessidade do aperfeiçoamento de um método. As etapas na preparação das amostras podem ser adicionadas ou excluídas dependendo da pergunta a ser respondida e/ou do desenho experimental. A Figura 6 resume as etapas necessárias para a avaliação do perfil metabólico de tecidos vegetais, utilizando a banana como exemplo e cromatografia gasosa e espectrometria de massas.

Figura 6. Etapas necessárias para avaliação do perfil metabólico em plantas utilizando bananas e cromatografia gasosa acoplada a detector de massas.

Durante o procedimento da análise há um grande risco de serem introduzidos artefatos analíticos, os quais geram mudanças indesejáveis nos metabólitos e podem tornar o método irreprodutível.

Para reduzir a variabilidade biológica é necessário ter cuidado com a amostra em todas as etapas desde antes da colheita (Tabela 2). A luminosidade ao qual a planta foi exposta é um dos principais fatores entre os que podem influenciar nos níveis de metabólitos de vias dependentes do carbono, como respiração e fotossíntese (VILLAS-BÔAS et al (2007).

O tempo é outro fator limitante para análise de metabólitos devido a sua meia vida curta (*turnover*). Durante o desenvolvimento do método deve-se controlar o crescimento do organismo e parar o metabolismo através do *quenching* celular. O *quenching* se dá pela mudança drástica e rápida de temperatura ou pH. O nitrogênio líquido e a solução de metanol a frio são os métodos mais utilizados (ROESSNER; BACIC, 2009).

Gullberg et al (2004) recomendam que na fase de extração dos metabólitos, uma série etapas sejam otimizadas como: o tipo de homogeneização do material vegetal que permita a melhor penetração do solvente influenciando no tempo requerido para extração; temperatura do processo e o tipo de solvente orgânico. Para extração de metabólitos polares usa-se frequentemente metanol, etanol e água, e para extração de metabólitos apolares, o clorofórmio é o mais indicado, porém também são utilizados acetato de etila ou hexano.

Para análise por cromatografia gasosa (CG), acoplada a espectrometria de massas (EM), os metabólitos que não são voláteis ou contêm grupos polares devem ser derivatizados (VILLAS-BÔAS et al., 2005). A derivatização se dá por reagentes de oximação, seguidos por sililação. De acordo com Villas-Bôas et al (2007), a sililação é eficiente para derivatizar açúcares e seus derivados. Os reagentes de sililação mais utilizados são trimetilsilil (TMS), N-metil-N-trimetilsililtrifluoroacetamida (MSTFA) e N,O-bis-trimetilsilil-acetamida (BSA). Koek et al. (2006) verificaram que o subproduto do MSTFA é mais volátil que o subproduto do BSA, tornando possível a quantificação de um maior número de metabólitos. Outra técnica de derivatização é a alquilação ou esterificação, cujas reações são baseadas no cloroformiato de metila (MCF), o

qual é responsável pela conversão de aminoácidos em ésteres e carbamatos voláteis (VILLAS-BÔAS et al., 2005). A eficiência durante a etapa de derivatização pode ser estimada a partir das respostas obtidas dos metabólitos comparadas com as respostas de n-alcane, os quais são os compostos de referência.

Tabela 2. Fontes de variação do método analítico concernente ao metaboloma vegetal por CG-EM.

Variabilidade Pré-analítica	Variabilidade biológica Durante a amostragem	Luminosidade; Turnover de metabólitos dentro da célula; Transferência de um material biológico para um recipiente; Tempo de remoção de plantas do solo.
	Durante o processamento da amostra	Adição de alta temperatura e pH; Múltiplas etapas no processamento; Armazenamento da amostra; Homogeneização; Concentração da amostra; Uso de solventes; Degradação química.
Variabilidade Intra-analítica	Instrumentação	Incertezas na identificação de metabólitos - produtos derivatizados são altamente degradáveis; risco de identificação de falso-positivo; Variabilidade quantitativa.
Variabilidade Pós-analítica	Extração dos dados Tratamento dos dados	

Fonte: VILLAS-BÔAS et al., 2007.

2.4.3. Métodos de detecção

Os estudos referentes ao metabolismo foram iniciados nos anos 70, porém antes havia menor informação genômica e baixa tecnologia para detecção dos metabólitos e, portanto, menor exatidão dos dados.

Na metaboloma os compostos detectáveis são aqueles que estão no limite de detecção da técnica analítica utilizada. As metodologias mais precisas

e sensíveis correspondem às análises de metabólitos simples. Quanto mais abrangente for a abordagem analítica, maior a probabilidade dos dados serem de baixa qualidade e a metodologia sujeita a artefatos. Nenhuma destas abordagens apresentadas é capaz de realizar uma análise metabolômica em sua totalidade. Um perfil de metabólitos apresenta alto número de compostos desconhecidos, os quais numa análise de CG-EM, por exemplo, representam cerca de 70-80% dos analitos. Dependendo da questão biológica, pode ser necessário o uso de diferentes abordagens (DIEKS et al., 2013).

As principais técnicas utilizadas para identificação dos metabólitos são a espectrometria de massas (EM) e ressonância magnética nuclear (RMN). Técnicas de separação cromatográfica podem ser acopladas a espectrometria de massas, sendo que os principais na metaboloma são a cromatografia gasosa-espectrometria de massas (CG-EM), cromatografia líquida-espectrometria de massas (CL-EM) e cromatografia gasosa-espectrometria de massa por analisador de tempo de voo (CG- EM-ATV).

O CG-EM consegue identificar e quantificar centenas de metabólitos de uma amostra. É a principal técnica usada na análise do perfil metabólito de plantas e por isso é mais validado que outras técnicas. Combina separação eficiente e detecção de massa seletiva e sensível. Esta técnica tem relativa cobertura de compostos não voláteis, como aminoácidos e ácidos orgânicos, açúcares, alcoóis, intermediários fosforilados, dentro da fase polar, e também abrange compostos apolares, como ácidos graxos, alcoóis graxos, esteróis e alifáticos (DO et al. 2010).

O CG- EM-ATV, comparado ao quadrupolo, tem a vantagem de ser mais rápido no escaneamento e possui alta precisão de massa, o que permite uma maior especificidade, pois restringe o número de analitos (KOPKA, 2006).

O CL-EM é adaptado para análise de compostos não voláteis, ou seja, não precisa de derivatização. É uma técnica que abrange a análise de uma ampla faixa de metabólitos secundários, como alcaloides, flavonoides, glicosinolatos, isoprenos, oxilipinas, fenilpropanóides, pigmentos e saponinas. A associação de técnicas proporciona um aumento na quantidade de metabólitos identificados. Em análises de folhas de *Arabidopsis*, por CG-EM e

CL-EM, obteve a identificação química de 60% dos picos identificados (FERNIE et al., 2004).

Outras abordagens mais recentes têm sido utilizadas na metaboloma, como eletroforese capilar (CE) e espectroscopia de infravermelho usando transformação de Fourier (FTCIR), acopladas a espectrometria de massas.

A RMN tem intensa validação, não é invasivo e tem ajudado na determinação das estruturas e quantificação dos metabólitos. Porém, tem menor sensibilidade que a EM diante de matrizes altamente complexas. É uma técnica que requer preparação mínima da amostra e é mais indicada para *fingerprinting* metabólico (KOEK et al., 2011). Para aumentar a sensibilidade e separação, a RMN tem sido acoplada à CL e extração em fase sólida (SPE). Noteborn et al. (2000) sugerem o acoplamento de CL com RMN nas análises do perfil metabólito de alimentos geneticamente modificados a fim de compreender os efeitos causados pela alteração.

Identificar picos a partir do banco de dados é considerado um ato simples visto que os padrões de fragmentação são reprodutíveis e podem ser utilizados para identificar compostos desconhecidos. Para aumentar a precisão das análises é necessária a adição de padrões internos, onde todas as áreas de pico integradas são normalizadas a partir da divisão pela área do padrão interno, a fim de evitar erros quanto às variações. Porém em certas ocasiões, como comparação das amostras e compreensão das redes metabólicas é necessário o uso da quantificação absoluta (KOEK et al., 2011).

2.4.4. O processamento dos dados

Entre os principais problemas da metaboloma estão a ocorrência dos isômeros estruturais e sua difícil identificação. Como alternativa, utiliza-se o AMDIS, sistema de identificação e decoluição do espectro de massa automatizado, é um algoritmo de decoluição, o qual separa os picos gerados pelo EM (VILLAS-BÔAS et al., 2007). Para analisar os extensos dados obtidos após a separação e identificação dos metabólitos são utilizados programas de informática específicos para cada abordagem analítica a fim de prevenir o erro humano, detectar valores atípicos e diminuir o tempo de trabalho executado

(VILLAS-BÔAS et al., 2005). As amostras podem ser classificadas por análise de dados multivariados e quimiometria. A quimiometria é um método estatístico para analisar dados na área química e afins, o qual tem intensa utilidade nas análises com RMN (FERNIE et al. 2004). A análise multivariada é indicada para a análise de diferentes metabólitos ao comparar os espectros e permite a identificação de certas características fenotípicas, pois reúne perfis metabólitos semelhantes (CRUZ, 2008).

Este trabalho foi dedicado à análise de metabólitos diferenciados entre bananas cultivadas em área de cultivo tradicional e bananas cultivadas em área parcialmente vizinha à Mata Atlântica e teve como objetivo verificar se as alterações nas condições ambientais de cultivo conferiu alguma influência no perfil de metabólitos dos frutos.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Avaliar o efeito da proximidade da biodiversidade nativa da Mata Atlântica no perfil de metabólitos dos frutos de bananeira.

3.2. Objetivos específicos

- Analisar o perfil do metabolismo primário e secundário dos frutos produzidos na parcela Biodiversidade e parcela Controle, no estágio verde e maduro;
- Com base no perfil metabólico dos frutos produzidos na parcela Biodiversidade e parcela Controle, identificar vias metabólicas que mudam em função da proximidade da biodiversidade;
- Identificar e quantificar as poliaminas, putrescina, espermina e espermidina;
- Correlacionar os dados de caracterização pós-colheita (padrões de etileno, vida-verde, amido, açúcares, textura, cor, perfil de compostos voláteis e hormônios ABA e IAA) com os metabólicos identificados na banana.

4. MATERIAL E MÉTODOS

O desenho experimental deste projeto (4.1) e a obtenção das amostras foram feitos pela Doutoranda Florence Castelan. A descrição das metodologias contidas no Desenho Experimental e Caracterização pré-colheita estão aqui descritas para melhor compreensão da qualidade dos resultados obtidos neste trabalho. A caracterização pós-colheita foi feita em conjunto pelos mestrandos Victor Castro Alves e Maria Fernanda Calhau e os doutorandos Florence Castelan, Lorenzo de Amorim Saraiva e Talita do Nascimento.

4.1. Desenho Experimental

Este experimento foi conduzido de agosto 2012 até outubro de 2013 no assentamento “Alves, Pereira e Teixeira”, Bairro Guapiruvu, município de Sete Barras, Região Vale do Ribeira, SP. Foram realizadas 8 colheitas, porém a amostragem utilizada neste trabalho consiste de uma parcela selecionada no primeiro trimestre de 2012, no qual as plantas foram numeradas na data de floração e monitoradas até a data da colheita (Quadro 1).

A idade fisiológica foi definida a partir da somatória de temperatura à que a cultura foi exposta no campo, expressa em graus-dias (GARRY; MEYER, 1975), o qual permite que os frutos sejam colhidos sempre com a mesma maturidade fisiológica e que as parcelas possam ser comparadas, sob qualquer parâmetro, de maneira mais confiável e reprodutível. O cálculo da idade fisiológica é $GD*2 = T_{máx} + T_{min} - T_b$, onde $T_{máx}$ é a temperatura máxima no período de desenvolvimento, T_{min} é a temperatura mínima no mesmo período e T_b é a temperatura basal de 14 °C.

Quadro 1. Dados sobre as plantas marcadas para a colheita das parcelas experimentais Controle e Biodiversidade.

Trimestre	Total de plantas marcadas	Período entre florescimento e colheita (dias)	Somatória das temperaturas (graus dias)	Data da colheita	Total de plantas colhidas
abr/mai/jun	65	154	915	9/10/2012	12

As colheitas são provenientes de duas parcelas escolhidas na região fronteira ao assentamento, submetidas ao mesmo tratamento convencional de cultivo da banana, da mesma variedade (Nanicão, grupo Cavendish, AAA) e obtidas sob as mesmas condições edafoclimáticas, diferindo apenas quanto à proximidade da mata (biodiversidade).

A parcela “Biodiversidade” apresenta 60% de seu perímetro limítrofe à floresta nativa. A outra parcela, “Ausência de Biodiversidade” (Controle), está plenamente inserida em uma extensa área de produção de banana, tendo o mínimo de 200 m de raio com a presença exclusiva do monocultivo convencional da banana (Figura 7).

Figura 7. Posicionamento das parcelas dentro do bananal convencional, em relação à presença da mata (biodiversidade nativa). Imagem de satélite, fonte: Google Earth.

Para a escolha das parcelas foram utilizados os seguintes critérios na seleção destas áreas: (1) proximidade e fronteira com biodiversidade e monocultivo: disposição da fronteira e estado de degradação da floresta; (2) época de implantação da área (idade do bananal) e histórico de tratos culturais; (3) uniformidade de relevo; (4) uniformidade do cultivo (tamanho do cacho, grossura do tronco, espaçamento, etc.). As parcelas de cada tratamento foram implantadas na mesma época e tinham o mesmo histórico de tratos culturais.

4.2. Caracterização pré-colheita

4.2.1. Características edáficas e de nutrição

As análises foliares e de solo foram determinadas no Laboratório de Agroquímica e Meio Ambiente da Universidade Estadual de Maringá (UEM) pela equipe do Núcleo de Agroecologia, sob a supervisão do Prof. Dr. José Ozinaldo Sena, do Eng. Agrônomo Rafael Granzioli Caldas e Maria Dias.

As amostras de solo de cada parcela experimental foram coletadas em 5 pontos diferentes, sob duas profundidades de coleta (20 e 40 cm), para posteriormente serem transformados em *pools*. Em seguida, as duas amostras foram encaminhadas ao Laboratório de Agroquímica e Meio Ambiente da Universidade Estadual de Maringá (UEM), onde foram realizadas as análises de macro e micronutrientes, como também a determinação da classificação textural. Para tanto, foram utilizados os seguintes extratores: Cloreto de Potássio (para Cálcio, Magnésio, Alumínio); Cloreto de Bário a quente (para Boro); Acetato de Amônio-Ácido Acético (para Enxofre); Mehlich 1 (para determinação de Fósforo, Potássio, Cobre, Ferro, Manganês, Sódio, Zinco).

4.2.2. Características nutricionais foliares

Para determinar as características nutricionais foliares, a amostragem da bananeira ($n=5$) de cada parcela experimental foi coletada segundo os critérios do protocolo da Embrapa (BORGES, 2004). Para cada parcela, foi determinado um valor médio (triplicata analítica) para cada elemento analisado. Após a coleta, as amostras foram transportadas em sacos de papel acondicionados em um isopor com gelo até o Laboratório de Agroquímica e Meio Ambiente da UEM. Para os elementos potássio, magnésio, cobre, ferro, para o manganês e o zinco foi utilizada espectrometria de absorção atômica em amostra digerida por solução nitro-perclórica; para fósforo e enxofre total, foi utilizada espectrofotometria UV-Vis em amostra digerida por solução nitro-perclórica; para boro total foi utilizado espectrofotometria UV-Vis em amostra incinerada com extração do boro mediante o ácido clorídrico e para nitrogênio total, foi utilizado o método clássico de Kjeldahl.

4.2.3. Aspectos meteorológicos

Para monitoração da temperatura (°C) e umidade relativa (UR%), microestações meteorológicas foram instaladas dentro das parcelas com a finalidade de captar e armazenar os valores a cada hora, durante todo o experimento do campo.

A luminosidade foi determinada no início do experimento usando um luxímetro (TEXT0-545), com a sonda presa a uma haste e o auxílio de uma escada. Foram realizadas sete medidas acima de cada planta, sendo coletado o valor médio entre elas, calculado pelo próprio aparelho. Foram medidas 5 plantas em cada parcela, em um dia ensolarado, sem a presença de nuvens.

Para estimar a radiação luminosa diariamente durante o experimento, a radiação global e fotossinteticamente ativa (PAR - *Photosynthetically-active radiation*) foram monitoradas com a instalação dos sensores S-LIB-M003 e S-LIA-M003 (Onset - HOBO® dataloggers), os quais são capazes de medir a intensidade luminosa global e PAR, respectivamente. Estes foram instalados em tripé apropriado à altura das bananeiras e acoplados a um *datalogger* associado ao software HOBOWare®.

4.2.4. Monitoramento da severidade da Sigatoka Negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet)

O monitoramento da severidade da Sigatoka Negra foi realizado nos dias da marcação das plantas (antese) e nos dias das colheitas dos frutos, sendo assim possível avaliar a evolução da doença ao longo do enchimento dos frutos. Esta avaliação foi baseada na estimativa da porcentagem de tecido foliar necrosado de todas as folhas das plantas, a partir de uma escala de aproximação (STOVER, 1971 IN GAHUL, 1993). A avaliação consiste na atribuição de notas, numa escala de 1 a 6, de acordo com a porcentagem estimada de ataque da doença. A nota 1 corresponde à 1% de ataque e a nota 6 corresponde à mais de 50%.

4.2.5. Monitoramento da Broca da Bananeira (*Cosmopolitus Sordidus*)

A incidência da Broca da bananeira nas duas parcelas foi monitorada através de armadilhas do tipo rampa com uso de feromônio (Cosmolure - Biocontrole), atrativo para este tipo de coleóptero. O sachê do feromônio foi pendurado com o auxílio de uma haste feita com arame dentro de um galão de plástico de 5L, que teve suas paredes laterais abertas, de maneira a formar “abas” apoiadas no solo, para que a entrada do coleóptero na armadilha fosse

facilitada. No galão foi colocada também uma solução de detergente neutro a 3% e uma fatia de pseudocaule de bananeira, posicionada de maneira a não encostar-se às paredes do galão. A quantidade de Broca da bananeira capturada nas armadilhas foi monitorada semanalmente, assim como a troca do pseudocaule. O feromônio foi trocado mensalmente.

4.3. Caracterização pós-colheita

4.3.1. Preparo das amostras

Os frutos provenientes de duas pencas da porção intermediária (quarta e quinta penca do cacho) de cada planta, foram lavados, tratados com fungicida Tebuconazol ([RS]-1-p-chlorophenyl-4,4-dimethyl-3-[1H-1,2,4-triazol-1-ylmethyl] pentan-3-ol; Folicur® 200 EC, Bayer - 250 mg.L⁻¹) por imersão durante 3 minutos e separados um a um. Após a secagem, os frutos foram armazenados a 20°C±1°C em BOD. Foram analisados diariamente os parâmetros de etileno. A cada três dias foram analisados textura e cor que, a partir do aumento do teor de etileno, foram analisados diariamente. As amostras com, aproximadamente 15 frutos, foram descascadas, fatiadas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C para as análises posteriores.

4.3.2. Medidas de etileno

O etileno produzido pelos frutos foi quantificado por cromatografia gasosa, utilizando detector de ionização de chama (FID) e coluna HP-PLOT-Q (comprimento de 30 m, 40,0 µm de espessura de filme e diâmetro interno de 0,53 mm). As injeções dos gases foram feitas manualmente, com uma seringa própria para gases do tipo *Gas-tight*. As amostras de gás foram retiradas de frascos (2,5 L) contendo, em média, três bananas, lacrados por 1 hora, em triplicata. As medidas de etileno foram feitas utilizando-se os mesmos frutos durante todo o amadurecimento. Como gás de arraste, foi utilizado hélio em ambas as análises. As medidas de etileno foram calculadas com base no volume livre do frasco, levando-se em consideração a massa de banana contida nos frascos de respiração.

4.3.3. Determinação da vida verde

A vida verde dos frutos foi calculada como o número de dias compreendido entre a colheita e quando o etileno atingiu $1.0 \mu\text{L.Kg FW}^{-1}.\text{h}^{-1}$ (CASTELAN et al., 2012).

4.3.4. Determinação dos carboidratos

A determinação do amido foi feita por método enzimático segundo descrito por Cordenunsi e Lajolo (1995). Aproximadamente 100 mg de polpa foi homogeneizada em 3mL de NaOH 0,5 M, seguido por neutralização por 5 mL de ácido acético 0,5 M. A solução foi então transferida para balão volumétrico (25 mL ou 50 mL), tendo sido o volume completado com água destilada. Uma alíquota de 1 mL foi colocada em tubo de centrifuga (15 mL), adicionado de 4mL de etanol absoluto e centrifugada por 15 min a 12000 xg. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com 4 mL de etanol 80%, por duas vezes. Após evaporação total do etanol à temperatura ambiente, o amido foi hidrolisado com 1mL de solução de amiloglicosidase (14 U/mL, pH 4,8), seguido por incubação a 37°C por 2 horas. A reação foi interrompida com 100 μL de ácido perclórico 0,6N. A glicose resultante foi quantificada através do método de glicose/peroxidase/ABTS, utilizando a glicose como padrão (BERGMEYER, 1974).

Os açúcares solúveis (glicose, frutose e sacarose) foram extraídos a partir de 100 mg de polpa de banana triturada em nitrogênio líquido, com etanol 80% (v/v) a 80°C por três ciclos. Após a centrifugação (12.000 g; 15 min), os sobrenadantes foram combinados e o volume ajustado. O etanol de uma alíquota foi evaporado por sistema a vácuo sob-baixas temperaturas (*speed vac*) e o volume reconstituído com água destilada. Os açúcares solúveis foram determinados por CLAE (Equipamento Dionex-DX500) em coluna de troca iônica CarboPac PA 1 (4 mm x 250 mm), utilizando um detector amperométrico de pulso. A fase móvel foi constituída de 100 % de NaOH 18 mM e o fluxo da fase móvel foi de 1,0 mL/min por 25 min.

4.3.5. Determinação da cor e textura

A análise da cor da casca foi realizada através do colorímetro da marca MINOLTA. As leituras foram feitas a partir dos três parâmetros que, segundo a CIE (Commission Internationale de L'Eclairage), definem a cor: luminosidade (L) e os parâmetros a^* e b^* , de acordo com metodologia descrita por Mcguire (1992). As análises foram realizadas com seis replicatas por amostra. A firmeza foi obtida na parte mediana do fruto após a retirada da casca, utilizando um texturômetro eletrônico TA.XT2i (*Stable Micro System*), equipado com plunger de ponta cilíndrica de 3mm de diâmetro, ligado a um computador com software apropriado (*Texture Exponent 32*). Os resultados foram obtidos em Newton (N), com três replicatas por amostra.

4.3.6. Determinação das poliaminas

As poliaminas na polpa da banana foram analisadas de acordo com o método proposto por Silveira et al. (2003), com modificações. As amostras de 1g de polpa congelada foram homogeneizadas por 1 min, em ácido tricloroacético gelado 5% (v/v). Depois o extrato foi centrifugado por 20 min a 4°C. Ao sobrenadante foram adicionados cloreto de dansila e carbonato de sódio saturado. Após a incubação no escuro por 50 min a 6 °C, foi adicionada prolina e mantida a incubação por mais 30 min. As poliaminas dansiladas foram extraídas com tolueno e alíquotas foram secas em nitrogênio líquido e ressuspensas em acetonitrila. Um volume de 20 µL das poliaminas dansiladas foram separadas por CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HP - Série 1100) fase reversa em uma coluna 5 µm Phenomenex C18. O fluxo do solvente foi de 1.0 mL.min⁻¹ a 40°C. O gradiente de acetonitrila absoluto foi de 65% entre 0 a 10 min; de 65 a 100% entre 10 a 13 min; e o gradiente entre 13 a 25 min foi 100%. O detector utilizado foi o de fluorescência (excitação: 340 nm, emissão: 510 nm). Uma mistura de padrões de putrescina, espermidina e espermina foi submetida ao mesmo processo. As análises foram realizadas em triplicata e os teores de poliaminas livres foram expressos em µg.g⁻¹ de matéria fresca.

4.3.7. Extração e derivatização dos metabólitos por CG-EM

Dentre as 12 plantas amostradas, 8 plantas foram escolhidas para dar seguimentos às análises do perfil metabólico. A análise dos metabólitos por CG-EM foi realizada a partir do método descrito por Smart et al. (2010). As amostras foram trituradas e homogeneizadas com o auxílio de nitrogênio líquido. Foram elaborados *pools* a fim de obter uma representação amostral para ser utilizada como replicata técnica. Cada *pool* foi composto por frutos de duas plantas, como ilustrado na Figura 8.

Figura 8. Representação das replicatas biológicas e técnicas dos frutos das áreas Controle e Biodiversidade, estádios verde e maduro.

Os metabólitos foram extraídos em solução fria metanol e água (50% v/v). Foi adicionado o padrão interno d4-alanina e as alíquotas foram secas em concentrador do tipo Speed Vac. As amostras secas foram redissolvidas em hidróxido de sódio, metanol e piridina e derivatizadas por adição de cloroformiato de metila (MCF).

4.3.8. Análise por CG-EM

Uma alíquota das amostras foi injetada em CG-EM HP 6890 (Hewlett Packard) acoplado a um espectrômetro de massas quadrupolo HP 5973 (Hewlett Packard) com ionização por impacto de elétrons (70eV). Foi utilizada uma coluna ZB-1701 30m, 0,25mm, 0,15um (Phenomenex). A temperatura de

injeção foi 290°C, da linha de transferência 250°C e da fonte de íons 200°C. A temperatura do forno foi mantida a 70°C por 2 min e, em seguida, aumentada para 180°C à razão de 9°C/min. Após 5 min. A temperatura foi aumentada para 240°C à razão de 40°C/min e mantida por 11.5 min. A temperatura final foi de 280°C na faixa de 40°C/min, mantido por 2 min. O hélio foi o gás carreador usado com uma faixa de fluxo de 1.0mL/min; modo splitless. O tempo Scan e faixa da massa foi 2/seg e 50-600 m/z, respectivamente. Todas as amostras foram aplicadas em quintuplicata.

4.3.9. Análise estatística

Os dados estatísticos foram processados separadamente entre as colheitas e os *pools*. As médias foram comparadas pelo teste-t a 5% de probabilidade através do pacote R Metab (AGGIO et al, 2011). A identificação e quantificação dos metabólitos foram realizadas pelo AMDIS, sistema de identificação e decoluição dos espectros de massa automatizado, e pelo pacote Metab. Os dados foram normalizados e as médias foram comparadas pelo teste-t a 5% de probabilidade. Em seguida, os dados foram submetidos a diferentes testes multivariados para serem apresentados e visualizados em alta dimensão: Análise Multivariada de Análise de Componentes Principais (ACP) e Análise Discriminante, com auxílio dos programas R Metab, Statistica Trial Version e Metaboanalyst 2.0 (XIA et al., 2012; AGGIO et al, 2011). Para comparar a atividade das vias metabólicas dos perfis metabólitos foi utilizado o pacote R PAPI e o banco de dados KEGG (AGGIO et al, 2010; TANABE; KANEHISA, 2012; STATISTICA, 2013).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Devido ao grande volume deste trabalho e a diferentes abordagens envolvidas, este projeto teve a parceria de outros alunos que contribuíram com a caracterização das amostras (perfis de etileno, cor, textura, teores de amido e de açúcares solúveis) das diferentes colheitas e, individualmente, desenvolveram assuntos específicos. Castro-Alves (2013) pesquisou os hormônios vegetais etileno, ácido abscísico (ABA) e ácido indol acético (IAA) nos frutos e níveis de fenólicos totais nas folhas. Calháu (2013) avaliou

atributos relativos à qualidade dos frutos como a cor, a textura e os compostos voláteis relativos ao aroma. E Castelan (2015) tem avaliado a proteômica entre os tratamentos, como também tem determinado a caracterização pré-colheita.

Os resultados relativos à caracterização das amostras, comum a todas as dissertações e teses serão apresentados como parte desta tese. Os resultados individuais de hormônios nos frutos, fenólicos nas folhas, compostos voláteis e caracterização física serão citados a fim de fortalecer a discussão dos resultados globais do projeto. Os dados relativos aos perfis proteicos ainda não foram apresentados e não serão aqui explorados.

5.1. Caracterização pré-colheita

No estudo do metabolismo vegetal, controlar as fontes de variações ambientais, biológicas e técnicas é fundamental para reduzir os erros experimentais, modificações indesejáveis e metodologias irreprodutíveis, desde o crescimento da amostragem no campo até a senescência do fruto (ALLWOOD et al., 2011). Portanto, a fim de reduzir variações ambientais e assegurar que a única diferença entre as parcelas experimentais fosse decorrente à proximidade da biodiversidade ao cultivo foram monitorados a nutrição do solo e foliar, o clima e os principais problemas fitossanitários (Sigatoka Negra e Broca da bananeira) durante todo o experimento do campo.

A Tabela 3 apresenta as médias de todos os parâmetros pré-colheita avaliados nas parcelas Controle e Biodiversidade. Todos os parâmetros avaliados, com exceção da severidade da Sigatoka Negra, não apresentaram diferenças significativas entre as parcelas experimentais Controle e Biodiversidade.

Tabela 3. Caracterização pré-colheita das parcelas Controle e Biodiversidade.

Caracterização pré-colheita⁽¹⁾	Parcela Controle	Parcela Biodiversidade
Temperatura	23,37±2,95 °C	23,26±2,86 °C
Umidade relativa do ar	89,36±7,71%	90,67±7,07%
Tipo de solo	Latossolo amarelo	Latossolo amarelo
Macro e micronutrientes no solo e na folha	Níveis adequados ⁽²⁾	Níveis adequados ⁽²⁾
Índice de severidade da Sigatoka Negra	8,0±3,3% (florescimento) 44,5±15,8% (colheita)	4,1±3,0% (florescimento) 27,7±13,5% (colheita)
Índice de severidade da Broca da Bananeira	4,2±3,7 unidades	3,4±3,1 unidades

⁽¹⁾ Dados adaptados da tese de Florence Castelan (2015); ⁽²⁾ Os níveis são adequados de acordo com Borges e Oliveira (2006) e Teixeira et al. (2007).

5.1.1. Características nutricionais foliares

As folhas das parcelas Controle e Biodiversidade foram avaliadas quanto à toxidez ou deficiência de alguns nutrientes (Tabela 4). Todos os elementos analisados estavam dentro da faixa estimada por Borges e Oliveira (2006) e Teixeira et al (2007), com exceção do boro e do ferro.

O boro foi encontrado em níveis acima de 30 mg. Kg⁻¹, numa concentração considerada tóxica à planta, o qual pode ocasionar clorose internerval e necrose nas margens das folhas (MOREIRA et al., 2010). Porém, tais análises foram realizadas antes da abertura das flores/pencas, quando os teores dos nutrientes podem estar elevados devido ao acúmulo destes na planta para o desenvolvimento dos cachos. Após a emissão total dos cachos, os níveis do boro podem ter diminuído. O teor adequado do boro é entre 10 a 25 mg. Kg⁻¹.

Em relação ao ferro, os níveis estavam abaixo do limiar esperado, em torno de 50 a 70 mg. Kg⁻¹. O teor adequado do ferro é entre 80 a 300 mg. Kg⁻¹. No entanto, a análise do solo mostrou teores satisfatórios deste micronutriente

para o cultivo de bananeira, em torno de 160 mg. dm³ para ambas parcelas experimentais (BORGES; OLIVEIRA, 2006).

Tabela 4. Análise foliar das plantas cultivadas nas parcelas Biodiversidade e Controle. Os valores entre parênteses correspondem ao desvio padrão.

g kg ⁻¹						
	Mg	Ca	K	N	P	S
Biodiversidade	3,48 (0,36)	6,57 (4,18)	25,03 (4,49)	24,6 (2)	11,92 (2,05)	11,57 (6,81)
Controle	3,52 (1,23)	11,05 (4,36)	23,87 (2,11)	30,17 (3,47)	10,04 (1,18)	10,27 (4,23)
mg kg ⁻¹						
	Fe	Cu	Mn	Zn	B	
Biodiversidade	48,83 (7,53)	8,4 (2,52)	579,4 (248,34)	11,03 (1,85)	31,44 (2,38)	
Controle	68,73 (15,11)	9,6 (3,58)	622,1 (251,49)	10,23 (2,12)	28,75 (3,62)	

⁽¹⁾ Dados adaptados da tese de Florence Castelan (2015).

5.1.2. Características edáficas e nutricionais

Os solos nas parcelas experimentais são classificados como latossolo amarelo distrófico que consiste numa variação do latossolo, predominante em 31% da área brasileira (EMBRAPA, 2006). O solo em ambas as parcelas também possui a mesma classificação textural. Tem como característica a profundidade de 0-20 cm, textura franco-argilo-silitosa e horizonte B de textura branca (Tabela 5).

A avaliação nutricional do solo mostrou diferença entre as parcelas quanto aos teores de potássio, fósforo, magnésio e zinco. No entanto, esta distinção não reflete no estado nutricional do cultivo, pois os níveis estão dentro dos padrões estabelecidos, além da semelhança destes elementos encontrada na análise foliar (TEIXEIRA et al., 2006 e 2007).

O teor de potássio no solo foi três vezes maior na parcela Biodiversidade. Esse comportamento pode ser consequência da floresta ao redor do cultivo, pois o potássio é um nutriente suscetível a lixiviação, mantendo-se livre na planta sem estabelecer ligações químicas com outros elementos. O potássio é

o elemento mais importante para a bananeira. Cerca de 41% dos nutrientes totais correspondem ao potássio, dentre estes 35% é direcionado para o fruto. Porém o baixo teor encontrado na parcela Controle não deve ser um impedimento para o desenvolvimento dos frutos, pois o potássio é um dos principais nutrientes repostos no solo pela adubação convencional (frequência mensal). O fósforo também foi encontrado em níveis superiores (2x) na parcela Biodiversidade. Tal excedente pode estar relacionado com o fato do fósforo não ser normalmente limitado no solo. No Vale do Ribeira, este elemento é o menos demandado nas formulações de adubo para os cultivos de bananas.

Tabela 5. Análise de solo de macro e micronutrientes das parcelas experimentais Biodiversidade e Controle.

mg dm ⁻³									
cmol dm ⁻³						mg dm ⁻³	g dm ⁻³	pH	
0-20 cm	H ⁺ + Al ³⁺	Al ³⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺	K ⁺	P	C	H ₂ O	CaCl ₂
Biodiversidade	2,65	0,00	6,00	2,17	0,62	5,47	14,22	5,84	5,41
Controle	2,61	0,00	5,66	2,05	0,23	2,53	10,51	6,05	5,86
20-40 cm									
Biodiversidade	2,79	0,80	2,50	1,03	0,21	2,37	7,20	5,48	4,81
Controle	2,95	0,55	1,65	1,00	0,10	2,00	5,25	5,86	5,10
	Fe	Cu	Mn	Zn	B	S			
Biodiversidade	155,50	7,29	15,79	1,89	0,60	25,52			
Controle	167,10	5,63	126,50	5,82	0,53	33,05			
20-40 cm									
Biodiversidade	218,20	4,68	72,39	1,68	0,41	44,38			
Controle	223,60	2,85	49,16	1,71	0,68	105,76			

(1) Dados adaptados da tese de Florence Castelan (2015).

5.1.3. Monitoramento dos parâmetros climáticos

As características climáticas são determinantes na avaliação do microclima ao redor da biodiversidade, pois são cruciais na fisiologia do cultivo e na propagação de doenças. Foram avaliados os parâmetros temperatura, umidade relativa do ar e radiação fotossinteticamente ativa, os quais não apresentaram diferenças significativas entre as parcelas experimentais (Tabela 6).

Tabela 6. Comparação das médias de temperatura e umidade coletadas nas parcelas durante o período do experimento.

		Temperatura (°C)	Umidade (%)
Primavera	Biodiversidade	23,0 ± 4,8	90,2 ± 15,0
	Controle	23,1 ± 5,0	88,8 ± 15,6
Verão	Biodiversidade	24,6 ± 3,8	93,9 ± 11,5
	Controle	24,8 ± 4,0	92,5 ± 13,1
Outono	Biodiversidade	20,8 ± 4,0	94,4 ± 11,7
	Controle	20,9 ± 4,0	93,7 ± 12,3
Inverno	Biodiversidade	18,0 ± 5,1	93,9 ± 13,5
	Controle	18,0 ± 5,1	93,3 ± 14,0

Valores correspondem a média ± desvio padrão dos valores médios diários para cada período. ⁽¹⁾ Dados adaptados da tese de Florence Castelan (2015).

O sensor de radiação permitiu estimar continuamente a luminosidade das parcelas a fim de observar se em algum período do dia havia sombreamento relacionado com a floresta. Durante o dia pode haver mínimas variações em decorrência a presença de nuvens, porém os resultados mostraram o sol nascente e poente ocorrem ao mesmo tempo nas parcelas Controle e Biodiversidade, momentos onde poderiam surgir sombreamento causados pela floresta.

5.1.4. Monitoramento fitossanitário

5.1.4.1. Monitoramento da Broca da Bananeira (*Cosmopolitus Sordidus Germar*)

A Broca da Bananeira, conhecida como moleque e broca-do-rizoma, é uma das principais pragas encontradas no cultivo de banana do país, cuja forma larval constrói galerias no rizoma, e por consequência causa enfraquecimento e queda das plantas (FANCELLI et al., 2004). A implantação de armadilhas com feromônios no sistema agrícola pode fornecer informações para o controle da doença. Nas parcelas experimentais avaliadas, foram colocadas armadilhas que atraíram cerca de 3 insetos, tanto na área Controle como na área Biodiversidade. A quantidade de insetos coletadas já é suficiente para adoção

de medidas de controle, porém médias de entre 2 e 5 adultos por isca não interferiram no peso médio dos cachos de banana 'Prata' (MESQUITA, 2003).

5.1.4.2. Monitoramento da severidade da Sigatoka Negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet)

A Sigatoka Negra, considerada uma das principais doenças foliares destrutivas da bananicultura mundial, provoca danos quantitativos e qualitativos a diversas cultivares comerciais na região do Vale do Ribeira, cujas perdas podem chegar a 100% dependendo do manejo agrícola. Portanto, é imprescindível a avaliação da severidade em diferentes períodos de desenvolvimento da planta.

O monitoramento da Sigatoka Negra indicou que as plantas cultivadas no sistema de produção baseado exclusivamente na monocultura (Controle) apresentaram maior severidade da doença, tanto no florescimento quanto na colheita dos frutos. Na primeira avaliação da doença, no florescimento, as plantas das parcelas Controle e Biodiversidade apresentaram 8 e 4 % de severidade na folha, respectivamente. Na segunda avaliação, a diferença da doença entre as parcelas foi acentuada após o período de enchimento dos frutos devido à bananeira não mais emitir folhas após o florescimento, e por isso, o índice de severidade na colheita é maior.

O índice de folhas sem necrose (IFSN) também foi estimado no florescimento a fim de observar a porcentagem de folhas saudáveis. As plantas da parcela Biodiversidade apresentaram maior porcentagem de folhas sem necrose. Porém esta diferença foi significativa em apenas uma das repetições.

A menor infestação das plantas na parcela Biodiversidade pode ser proveniente da presença de diferentes inimigos naturais de pragas de sistemas agrícolas e de mecanismos de resposta desencadeados pela interação da planta com outros organismos presentes no ecossistema, os quais podem promover a defesa física e química diante de perturbações bióticas (ALTIERI; SILVA; NICHOLLS, 2003). A Biodiversidade próxima ao cultivo também pode servir como uma barreira de proteção contra a propagação dos esporos e disseminação da doença a partir, principalmente, do vento e a umidade na forma de chuva (FERRARI; NOGUEIRA, 2003; BENDINI et al., 2013).

5.2. Caracterização pós-colheita

5.2.1. Vida Verde e Produção de etileno

A avaliação da vida verde da banana permite observar se o período pré-climatérico dos frutos colhidos é suficiente para o transporte e comercialização. Esse período entre a colheita e o início do amadurecimento do fruto dura em torno de 5 a 15 dias para as bananas provenientes do Vale do Ribeira (CASTELAN et al, 2012). As bananas da parcela experimental Controle tiveram menor vida verde quando comparadas às bananas da parcela experimental Biodiversidade, 7 ± 2 e 12 ± 1 dias, respectivamente, uma diferença de 75%. Uma hipótese que poderia explicar esta diferença poderia ser a presença de patógenos, como a Sigatoka, e o efeito desta sobre a fisiologia e a qualidade do fruto. A Sigatoka tem impacto sobre a taxa de crescimento dos frutos e, portanto, a vida verde das bananas pode ser drasticamente encurtada nas plantas infectada esta doença (RAMSEY et al., 1990; CHILLET et al., 2009; CASTELAN et al., 2012).

No presente estudo, os dados de severidade da Sigatoka corroboraram com esta afirmativa, pois as bananas que apresentaram maior infestação também tiveram menor vida verde.

Os frutos das duas parcelas não se diferenciaram quanto ao período de amadurecimento, depois do término da vida verde (8 ± 1 e 11 ± 2 dias, nas parcelas Controle e Biodiversidade, respectivamente).

O perfil de produção de etileno foi característico de fruto climatérico, que consiste na produção autocatalítica e aumento da respiração durante o início do amadurecimento. Até o término da vida verde, a síntese de etileno foi praticamente constante nas duas colheitas e nas áreas experimentais Controle e Biodiversidade (Figuras 9 e 10). O aumento da produção de etileno se deu após atingir $1 \mu\text{L.Kg FW}^{-1}.\text{h}^{-1}$. Em média, o aumento da síntese de etileno foi após o 8º e 13º dia pós-colheita, nas áreas Controle e Biodiversidade, respectivamente. Os perfis de etileno foram similares entre as parcelas Controle e Biodiversidade, porém distintos entre as colheitas. O maior teor de etileno foi de $3,14 \pm 0,09 \mu\text{L.Kg FW}^{-1}.\text{h}^{-1}$ na área Controle, planta C5, no 9º dia pós-colheita, e $3,36 \pm 0,16 \mu\text{L.Kg FW}^{-1}.\text{h}^{-1}$ na área Biodiversidade, planta B1, no 13º dia pós-colheita.

Em média a produção máxima de etileno, na Colheita foi de $1,96 \pm 0,63 \mu\text{L.Kg FW}^{-1}.\text{h}^{-1}$ na área Controle, no 11º dia pós-colheita, e $2,17 \pm 0,04 \mu\text{L.Kg FW}^{-1}.\text{h}^{-1}$ na área Biodiversidade, no 15º dia pós-colheita. Tais resultados são similares aos valores encontrados por Peroni-Okita (2007) na cv. Nanicão, grupos controle.

Figura 9. Produção de etileno ($\mu\text{L.Kg FW}^{-1}.\text{h}^{-1}$) de 6 plantas, mensurados desde a colheita até a senescência dos frutos da parcela **Controle**, cultivo distante da mata (C). As barras indicam desvio padrão.

Figura 10. Produção de etileno ($\mu\text{L.Kg FW}^{-1}.\text{h}^{-1}$) de 6 plantas, mensurados desde a colheita até a senescência dos frutos da parcela **Biodiversidade**, cultivo próximo da mata (B). As barras indicam desvio padrão.

5.2.2. Amido e açúcares

O início da degradação do amido é uma das características do início do processo de amadurecimento das bananas (CORDENUNSI; LAJOLO, 1995; PURGATTO et al., 2001). Nos frutos da parcela Biodiversidade, a degradação do amido teve início no 8º DPC, enquanto nos frutos da parcela Controle, a degradação do amido iniciou antes, no 6º DPC (Figuras 11 e 12). Os teores iniciais (2DPC) e finais (último DPC) de amido não apresentaram diferença significativa entre os frutos cultivados nas parcelas Controle e Biodiversidade. Os percentuais iniciais foram em média de $21,60 \pm 1,41 \text{ g.100 g}^{-1}$ e $22,02 \pm 0,96 \text{ g.100 g}^{-1}$, nas parcelas Biodiversidade e Controle, respectivamente. E os percentuais finais do amido foram em torno de $2,74 \pm 1,11 \text{ g.100g}^{-1}$ (Biodiversidade) e $4,18 \pm 1,63 \text{ g.100g}^{-1}$ (Controle), uma redução cerca de 87% e 95%, respectivamente.

Concomitante com a degradação do amido ocorreu a síntese e o acúmulo dos açúcares solúveis, o qual tornou o fruto doce. Também não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os açúcares solúveis totais ao final do amadurecimento. Os frutos cultivados nas parcelas Biodiversidade e Controle apresentam teores de $14,71 \pm 1,73 \text{ g.100g}^{-1}$ e $16,50 \pm 2,58 \text{ g.100g}^{-1}$, respectivamente. Durante o amadurecimento, a sacarose foi o açúcar predominante nos frutos cultivados em ambas as parcelas experimentais.

Figura 11. Perfil da degradação do amido e acúmulo de açúcares solúveis nos frutos cultivados na parcela **Controle** (C) ($n=6$) durante o amadurecimento. DPC representa dias pós-colheita. Valores expressos como média $\pm$ DP (g.100 g⁻¹) de, no mínimo, três análises ($n = 3$).

Figura 12. Perfil da degradação do amido e acúmulo de açúcares solúveis nos frutos cultivados na parcela **Biodiversidade** (B) ($n=6$) durante o amadurecimento. DPC representa dias pós-colheita. Valores expressos como média $\pm$ DP (g.100 g⁻¹) de, no mínimo, três análises ($n = 3$).

5.2.3. Evolução da cor da casca

A cor amarela da casca do fruto é um forte indicador do amadurecimento e um fator de qualidade determinante na escolha do consumidor. Durante o amadurecimento da banana observa-se a transição da coloração verde da casca para a coloração amarela, devido à degradação da clorofila, nas membranas do tilacóide através da clorofilase e enzimas oxidase, e o acúmulo de carotenoides (SHEMER et al., 2008).

A cor da casca foi determinada pelo ângulo Hue ($\tan^{-1} b^*/a^*$), o qual corresponde a uma tonalidade particular: 0°, vermelho; 90°, amarelo; 180°, verde e 270°, azul (McGuire, 1992). Não houve diferença no ângulo Hue nos frutos das duas colheitas, nem entre as parcelas experimentais estudadas (Figuras 13 e 14). O ângulo Hue calculado nos frutos diminuiu de $107,09^\circ \pm 2,68$ a $73,50^\circ \pm 6,40$, na área Controle, e de $107,83^\circ \pm 1,19$ a $74,13^\circ \pm 3,18$, na área Biodiversidade, uma redução de cerca de 30%, respectivamente.

Figura 13. Ângulo Hue (°) de 6 plantas, mensurados desde a colheita até a senescência dos frutos da parcela experimental **Controle**, (C). As barras indicam desvio padrão e a seta indica o dia pós-colheita com produção máxima de etileno.

Figura 14. Ângulo Hue (°) de 6 plantas, mensurados desde a colheita até a senescência dos frutos da parcela experimental Biodiversidade (B). As barras indicam desvio padrão e a seta indica o dia pós-colheita com produção máxima de etileno.

Durante o amadurecimento, a coloração da casca da banana pode ser representada em vários graus (Tabela 7) (MODENESE, 2011). Entre os graus 7 e 8, o fruto apresenta nuances na tonalidade próximos ao avermelhado devido à presença de manchas marrons, os quais indicam avançado estado de senescência. A redução dos valores do ângulo Hue para 70° na casca da banana indica que a coloração amarela tornou-se alaranjada devido a coloração tender ao vermelho. A queda do ângulo Hue coincidiu com os valores encontrados por Jin et al (2012), que diminuíram de 83 a 61°, na casca da banana.

Tabela 7. Estágios de coloração da casca da banana.

Grau	Coloração da casca
1	Verde
2	Verde com traços amarelos
3	Mais verde que amarelo
4	Mais amarelo que verde
5	Amarelo com pontas verdes
6	Totalmente amarelo
7	Amarelo com pequenas manchas de cor marrom
8	Amarelo com grandes manchas de cor marrom

Fonte: Adaptação de Modenese, 2011.

A mudança do ângulo Hue foi mais consistente a partir do término da vida verde nos frutos das duas colheitas. Porém as alterações na coloração não acompanharam de imediato o aumento da produção de etileno. As mudanças ocorreram lentamente até a senescência do fruto e muitos dos frutos não tiveram a casca totalmente amarelada. Segundo Ding et al. (2007), a retenção da clorofila na casca da banana pode ser devido a desintegração incompleta de membranas do tilacóide nos plastídios durante o amadurecimento. Para que se manifeste a coloração amarela na casca, é necessária a degradação de pelo menos 60% da clorofila total.

5.2.4. Evolução da firmeza

A firmeza é um dos principais parâmetros utilizados para determinar o grau de maturidade da banana através da avaliação da força necessária para penetração na polpa com o auxílio de um texturômetro ou penetrômetro (DITCHFIELD; TADINI, 2002).

No presente estudo este parâmetro confirmou resultados anteriores obtidos por Shiga et al (2011) de que o amaciamento da polpa da banana ocorre concomitante com o processo de conversão amido-sacarose por ação de enzimas hidrolíticas. Durante o amadurecimento, a firmeza da polpa diminuiu de $10,54 \pm 0,88$ a $1,18 \pm 0,16$ (N) e de $10,86 \pm 0,94$ a $0,90 \pm 0,21$ (N), nas áreas Controle e Biodiversidade, uma redução de 89 e 92%, respectivamente.

Os frutos da parcela Biodiversidade tiveram a firmeza da polpa reduzida acentuadamente após o pico climatérico, porém este perfil não foi tão definido nos frutos da parcela Controle (Figuras 15 e 16).

Figura 15. Firmeza (N) de 6 plantas, mensurados desde a colheita até a senescência dos frutos da parcela **Controle** (C). As barras indicam desvio padrão e a seta indica o dia pós-colheita com produção máxima de etileno.

Figura 16. Firmeza (N) de 6 plantas, mensurados desde a colheita até a senescência dos frutos da parcela experimental **Biodiversidade**, cultivo próximo da mata (B). As barras indicam desvio padrão e a seta indica o dia pós-colheita com produção máxima de etileno.

5.3. Análise do perfil metabólico por CG-EM

Os metabólitos extraídos da polpa dos frutos das diferentes parcelas experimentais (Biodiversidade e Controle), em diferentes estágios do amadurecimento (verde e maduro), foram derivatizados por cloroformiato de metila (MCF), seguido da cromatografia gasosa e espectrometria de massas. A análise escolhida favoreceu a separação e a identificação dos ácidos orgânicos amino e não-amino, ácidos orgânicos fosforilados e intermediários dos ácidos graxos.

O AMDIS, sistema de identificação e decoluição do espectro de massa automatizado, foi utilizado para avaliar os cromatogramas obtidos. As amostras derivatizadas com MCF produziram cerca de 500 e 600 metabólitos nas parcelas Biodiversidade e Controle, respectivamente, dos quais, em média, 90 metabólitos foram identificados usando a biblioteca do espectro de massas desenvolvida pelo Laboratório de Metabolômica da Universidade de Auckland, na Nova Zelândia. Nos frutos verdes de ambas as parcelas experimentais, os três principais grupos de metabólitos identificados na amostragem foram os aminoácidos e derivados (~34%), os ácidos graxos e conjugados (~25%) e os ácidos carboxílicos e derivados (~18%). Nos frutos maduros, os principais componentes são os açúcares e seus derivados. Porém, a análise ampla desses componentes químicos foi descartada porque a interferência das altas concentrações pode inibir a derivatização ou sobrecarregar o cromatógrafo, e consequentemente, limitar a detecção de outros metabólitos. Portanto, apenas os açúcares solúveis frutose, glicose e sacarose foram determinados por HPLC, como já apresentado no tópico 5.1.3. Além dos açúcares, os metabólitos predominantes nos frutos maduros também são os ácidos orgânicos e os aminoácidos.

As figuras 17 e 18 apresentam os cromatogramas típicos dos frutos verdes e maduros das parcelas experimentais avaliadas.

Figura 17. Cromatogramas típicos de bananas verdes e maduras cultivadas na parcela **Controle**. Controle. 1- ácido cítrico; 2 – ácido aconítico; 3 – ácido málico; 4 – asparagina; 5 – 10,13 - ácido dimetiltetradecanóico; 6 – ácido linoleico; 7 – ácido dedecanóico; 8 - ácido láctico; 10 – leucina. CV significa frutos verdes da parcela Controle; CM significa frutos maduros da parcela Controle.

Figura 18. Cromatogramas típicos de bananas verdes e maduras cultivadas na parcela **Biodiversidade**. 1- ácido cítrico; 2 – ácido aconítico; 3 – ácido málico; 4 – asparagina; 5 – 10,13 - ácido dimetiltetradecanóico; 6 – ácido linoleico; 7 – ácido dodecanóico; 8 - ácido láctico; 10 – leucina. BV significa frutos maduros da parcela Biodiversidade; BM significa frutos maduros da parcela Biodiversidade.

A metaboloma oferece uma gama de variáveis que torna inviável a interpretação dos dados se não utilizar ferramentas estatísticas adequadas para esse propósito. Para isso, foram escolhidas metodologias que auxiliem na exploração das interdependências entre os metabólitos analisados de maneira a responder o nosso principal questionamento: as alterações nas condições ambientais de cultivo produziram algum efeito no perfil de metabólitos dos frutos?

Também, para facilitar a análise comparativa das parcelas Biodiversidade e Controle, as próximas seções foram subdivididas em: (1) *pool* 1 e 2 dos frutos verdes; (2) *pool*1 e *pool*2 dos frutos maduros. E por último, foi realizada uma avaliação quantitativa dos hormônios poliaminas.

5.3.1. Análise do perfil metabólico das amostras de polpa das bananas verdes cultivadas nas parcelas experimentais Controle e Biodiversidade: Pool 1 e pool 2

5.3.1.1. Análise de componentes principais (PCA)

O grande número de variáveis originais foi reduzido a uma menor representação dos dados usando a Análise dos Componentes Principais (PCA, do inglês, *Principal Component Analysis*). A PCA é uma ferramenta estatística utilizada para extração e interpretação de determinados dados organizados em uma matriz constituída de autovetores e autovalores. Os autovetores reunidos com o maior autovalor determinam a direção do primeiro componente principal e os autovetores relacionados com o segundo maior autovalor orientam o segundo componente principal (MATOS et al., 2003; FUKUSAKI; KOBAYASHI, 2005).

No primeiro *pool*, os perfis gerados no PCA evidenciaram as diferenças entre as amostras Controle e Biodiversidade e reuniram os metabólitos semelhantes entre as replicatas. Os gráficos que representam as amostras estão rotulados com a letra A e os gráficos das variáveis (metabólitos) estão com a letra B, ambos posicionados em um espaço definido pelas duas primeiras componentes principais (Figura 19). Os números das variáveis estão apresentados na Tabela 8.

Figura 19. Análise de Componentes Principais, tendo como variáveis todos os metabólitos identificados nos frutos verdes (*pool*1) cultivados nas parcelas experimentais Controle e Biodiversidade. Os números das variáveis referem-se aos metabólitos da Tabela 8.

O primeiro componente explicou 94,12% da variabilidade entre as amostras. Nas Figuras 19A e 19B pode ser visto que houve separação das amostras dos frutos cultivados nas parcelas Controle (no lado esquerdo do gráfico) e Biodiversidade (no lado direito do gráfico). Também os dois primeiros componentes separaram os frutos cultivados em ambas as parcelas em relação à predominância de metabólitos.

As amostras Biodiversidade (B1 a B5) ficaram próximas no gráfico, indicando uma forte associação entre elas. Os resultados de PCA mostram que a Biodiversidade teve influência direta sobre o cultivo de banana e alguns compostos foram exclusivos desta parcela: ácido oxaloacético (11), ácido, 5-oxotetraidrofurano-2-carboxílico (41), heptadecano (52), ácido 9-heptadecanóico (69), tricosano (73) e ácido erúico (93). Os valores suplementares dos autovetores descritos progressivamente até chegar à menor variação, também ajudam a corroborar estes dados, pois os metabólitos exclusivos no cultivo da Biodiversidade apresentaram máxima variância (Apêndice B). Dentre os metabólitos identificados encontram-se dois componentes do metabolismo secundário: o tricosano e o ácido erúico. O tricosano é um hidrocarbono alifático constituinte da cera, o qual atua como um antibiótico na defesa das plantas ou são formados apenas em resposta a uma infecção. A camada de cera é uma mistura de acil lipídeos sobre o fruto, que auxilia na redução de perda de água e no bloqueio de microrganismos patogênicos (TAIZ, ZEIGER et al., 2006; DONG et al., 2012). Já o ácido erúico é um ácido graxo monoinsaturado (ômega 9) integrante dos óleos essenciais, com ação repelente para herbívoros presentes mesmo antes da infecção na planta (ESPINOSA; MEIER, 2011).

Com já citado acima, os compostos exclusivos nos frutos cultivados na parcela Biodiversidade são responsáveis pelo maior peso no espaço vetorial do conjunto de dados. Consequentemente, este tipo de análise exploratória pode esconder a existência de outras variáveis com alto peso no espaço multivariado. Portanto, a fim de melhorar a interpretação dos dados, foi construído um segundo gráfico (Figura 20) sem a presença dos compostos exclusivos. Como resultado, foi observado que os metabólitos ácido nicotínico (11), ácido cinâmico (35) e ácido glutárico (6) apresentaram maior peso,

contribuindo mais para a componente principal 1 (o qual explica 87% da variabilidade entre as amostras).

Muitos estudos têm evidenciado o papel de vitaminas, como do ácido nicotínico em reduzir os efeitos negativos dos estresses (HUSSEIN et al., 2014). De acordo com El-Bassiouny (2005), esta vitamina aumentou alguns hormônios vegetais como auxina, giberelina e citocininas no trigo. E em certas plantas, o ácido nicotínico é precursor para síntese de alcalóides como nicotina e ricinina (ASHIHARA et al., 2012).

Também, dentre os metabólitos com as maiores variabilidades destaca-se o ácido cinâmico, um ácido fenólico sintetizado a partir da fenilalanina e precursor de diversos componentes envolvidos na defesa da planta contra patógenos: flavonóides, fitoalexinas, ácido salicílico e lignina (DIXON, 2001; NIERO, 2010). O ácido cinâmico também tem sido apontado como um possível novo hormônio vegetal devido as suas funções análogas à auxina, hormônio regulador do crescimento e desenvolvimento da planta. Em bananas tem sido observado que o ácido cinâmico sintético pode atrasar o “surgimento” do etileno e, portanto, retardar o amadurecimento (YANG et al., 1995; WONG, et al., 2005; OKUDA et al., 2014). As parcelas avaliadas apresentaram distinção temporal nos perfis de degradação do amido, etileno e vida verde, o qual seria explicado por um desbalanço hormonal. Castro-Alves (2013) observou que o IAA, a principal auxina em frutas, apresentou diferença significativa entre os frutos verdes das parcelas experimentais (35% a mais na parcela Biodiversidade). Além da regulação da auxina, o ácido cinâmico também pode ser um dos hormônios moduladores do desenvolvimento e amadurecimento da banana, principalmente na parcela Biodiversidade.

Figura 20. Gráfico biplot, tendo como variáveis metabólitos identificados nos frutos verdes (*poa/1*) cultivados nas parcelas experimentais Controle e Biodiversidade. Os números das variáveis referem-se aos metabólitos do Apêndice A.

Tabela 8. Metabólitos identificados por CG-EM (derivatização por MCF), classificação de grupos de metabólitos e tempo de retenção (TR) dos frutos verdes cultivados nas parcelas Controle e Biodiversidade, *pools* 1 e 2. O “X” denota a detecção dos metabólitos nos frutos das parcelas Biodiversidade (B), Controle (C) ou em ambos.

Nº da variáveis	Metabólitos	Classe	TR (min)	B	C
1	Ácido oxálico	Ácidos carboxílicos e derivados	4.578	X	X
2	Ácido malônico	Ácidos carboxílicos e derivados	5.95	X	X
3	Nicotinamida	Compostos glicosil	6.545	X	X
4	Ácido succínico	Ácidos carboxílicos e derivados	7.606	X	X
5	Ácido fumárico	Ácidos graxos e conjugados	7.296	X	X
6	Ácido glutárico	Ácidos carboxílicos e derivados	8.007	X	X
7	Ácido octanóico	Cetoácidos e derivados	8.039	X	X
8	Ácido benzóico	Ácido benzóico e derivados	8.275	X	X
9	Ácido itacônico	Ácidos carboxílicos e derivados	8.601	X	X
10	Ácido citracônico	Ácidos graxos e conjugados	8.751	X	X
11	Ácido oxaloacético	Ácidos carboxílicos e derivados	9.2	X	
12	Ácido nicotínico	Piridinas e derivados	9.007	X	X
13	Ácido citramálico	Ácidos carboxílicos e derivados	9.306	X	X
14	Alanina	Aminoácidos e derivados	9.675	X	X
15	Tridecano	Hidrocarbonos acíclicos	9.347	X	X
16	Dodecano	Hidrocarbonos acíclicos	9.347	X	X
17	Ácido málico	Ácidos carboxílicos e derivados	10.017	X	X
18	Glicina	Ácidos carboxílicos e derivados	10.064	X	X
19	Benzotiazol	Benzotiazóis	10.803	X	X
20	Ácido 2-aminobutírico	Aminoácidos e derivados	10.827	X	X
21	Ácido adípico	Ácidos carboxílicos e derivados	10.999	X	X
22	Ácido undecanóico	Ácidos graxos e conjugados	11.123	X	X
23	Ácido caprinóico	Ácidos graxos e conjugados	11.125	X	X
24	Ácido decanóico	Ácidos graxos e conjugados	11.123	X	X
25	beta-alanina	Aminoácidos e derivados	11.374	X	X
26	Norvalina	Aminoácidos e derivados	11.423	X	X
27	Valina	Aminoácidos e derivados	11.423	X	X

28	Ácido 2-Isopropilmálico	Ácidos carboxílicos e derivados	11.492	X	X
29	Ácido 2-oxoglutárico	Cetoácidos e derivados	11.694	X	X
30	Ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico		11.81		X
31	DL-hidroxiglutamato		12.128		X
32	Leucina	Aminoácidos e derivados	12.685	X	X
33	Norleucina	Aminoácidos e derivados	12.685	X	X
34	Isoleucina	Aminoácidos e derivados	12.687	X	X
35	Pentadecano	Hidrocarbonos acíclicos	12.586	X	X
36	Ácido trans-cinâmico	Acido cinâmico e derivados	13.075	X	X
37	Ácido 2-fosfoenolpirúvico	Compostos oxoaniônicos orgânicos	13.221	X	X
38	Ácido 4-aminobutírico (GABA)	Aminoácidos e derivados	13.536	X	X
39	Prolina	Aminoácidos e derivados	13.734	X	X
40	Ácido dodecanóico	Aminoácidos e derivados	13.896	X	X
41	Ácido 5-oxotetraidrofurano-2-carboxílico			X	
42	Ácido cis-aconítico	Ácidos carboxílicos e derivados	14.208	X	X
43	Treonina	Aminoácidos e derivados	14.342	X	X
44	Ácido cítrico - pico secundário	Ácidos carboxílicos e derivados	15.235	X	X
45	Ácido quínico	Alcoois cíclicos e derivados	15.228	X	X
46	Ácido aspártico	Aminoácidos e derivados	15.255	X	X
47	Ácido cítrico	Ácidos carboxílicos e derivados	15.235	X	X
48	Ácido azeláico	Ácidos carboxílicos e derivados	15.314	X	X
49	Ácido piroglutâmico	Pirrolidinas	15.403	X	X
50	Asparagina	Aminoácidos e derivados	15.523	X	X
51	Creatinina	Aminoácidos e derivados	15.598	X	X
52	Heptadecano	Hidrocarbonos acíclicos	15.689	X	
53	Ácido salicílico	Ácido benzóico e derivados	15.806	X	X
54	Ácido 3-Hidroxibenzóico	Ácido benzóico e derivados	16.305	X	X
55	Serina	Aminoácidos e derivados	16.533	X	X
56	Ácido mirístico	Ácidos graxos e conjugados	17.005	X	X
57	Ácido glutâmico	Aminoácidos e derivados	17.684	X	X
58	Metionina	Aminoácidos e derivados	17.803	X	X
59	Glutaciona	Peptídeos	18.843		X

60	Ácido pentadecanóico	Ácidos graxos e conjugados	19.371	X	X
61	Fenilalanina	Aminoácidos e derivados	20.041	X	X
62	Ácido tartárico	Ácidos carboxílicos e derivados	20.36	X	X
63	Ácido isocítrico	Ácidos carboxílicos e derivados	20.526	X	X
64	Ácido isocítrico - pico secundário	Ácidos carboxílicos e derivados	20.526	X	X
65	Ácido palmiteláidico	Ácidos graxos e conjugados	20.63	X	X
66	Ácido palmitoléico	Ácidos graxos e conjugados	20.631	X	X
67	Ácido palmítico	Ácidos graxos e conjugados	20.755	X	X
68	Putrescina	Alquilaminas	20.968	X	X
69	Ácido 9-heptadecenóico	Ácidos graxos e conjugados	21.79	X	
70	Ácido margárico	Ácidos graxos e conjugados	22.007	X	X
71	Ácido 4-hidroxicinâmico	Ácidos cinâmicos e derivados	22.242	X	X
72	Ácido cumárico	Ácidos cinâmicos e derivados	22.242	X	X
73	Tricosano	Hidrocarbonos acíclicos	22.929	X	
74	Ácido oléico	Ácidos graxos e conjugados	23.277	X	X
75	Ácido cis-vacênico	Ácidos graxos e conjugados	23.359	X	X
76	Ácido trans-vacênico	Ácidos graxos e conjugados	23.294	X	X
77	Ácido 10,12-octadecadienóico		23.379		X
78	Ácido linoleico conjugado	Ácidos lineólicos e derivados	22.377	X	X
79	Ácido linoleico	Ácidos lineólicos e derivados	23.377	X	X
80	Ácido esteárico	Ácidos graxos e conjugados	23.515	X	X
81	Ácido araquidônico	Ácidos graxos e conjugados	23.647	X	X
82	Ácido alpha-linolênico	Ácidos lineólicos e derivados	23.651	X	X
83	Ácido bishomo-gamma-linolênico	Ácidos lineólicos e derivados	23.651	X	X
84	Ácido gamma-linolênico	Ácidos lineólicos e derivados	24.651	X	X
85	Ácido linoleláidico	Ácidos lineólicos e derivados	23.651	X	X
86	Ornitina	Aminoácidos e derivados	24.438	X	X
87	Glutamina	Aminoácidos e derivados	24.698	X	X
88	Lisina	Aminoácidos e derivados	26.256	X	X

89	Ácido araquídico	Ácidos graxos e conjugados	26.791	X	X
90	Histidina	Aminoácidos e derivados	27.165	X	X
91	Tirosina	Aminoácidos e derivados	28.608	X	X
92	N-alpha-acetil lisina	Aminoácidos e derivados	29.109	X	X
93	Ácido erúcico	Ácidos graxos e conjugados	30.106	X	X
94	Ácido sinápico	Derivados de ácido cinâmico	30.244	X	X
95	Ácido behênico	Ácidos graxos e conjugados	30.391	X	X

No segundo *pool* dos frutos verdes, os dois primeiros componentes explicaram 70,97% da variabilidade entre as amostras (Figura 21). O gráfico 20A de PCA corroborou os dados obtidos no primeiro *pool*, onde foi possível observar a distinção das amostras dos frutos cultivados nas parcelas Controle (no lado esquerdo do gráfico) e Biodiversidade (no lado direito do gráfico).

Como já observado no PCA do *pool*1, esta análise multivariada permite conhecer qual é a contribuição de cada metabólito num grande número de variáveis. Porém, algumas vezes a imagem visual pode ficar poluída e não permitir observar as diferenças entre as amostras, como observado nas representações gráficas do *pool* 2 (Figura 21B). Apesar da Figura 20A do PCA ter reunido as replicatas semelhantes que possibilitaram visualizar a distinção entre as parcelas experimentais avaliadas, foi difícil identificar sinais significativos nos dados do Figura 21B. A fim de facilitar a comparação entre as parcelas, os dados foram então submetidos a um test-t, tendo como resultado, 39 metabólitos significativos a nível 5% de probabilidade ($p > 0.05$). Em seguida, esses metabólitos foram submetidos à PCA (Figura 22) e estão listadas na Tabela 9.

No segundo gráfico de PCA (Figura 22), as duas primeiras componentes explicaram 87,14% da variabilidade entre as amostras. Os resultados revelaram que os compostos do grupo Biodiversidade tiveram influência direta sobre alguns compostos envolvidos na biossíntese dos ácidos graxos: ácido oleico (32), ácido esteárico (17), ácido palmitoléico (11) e ácido palmítico (1). Para confirmar estes dados os autovetores foram também verificados (Apêndice D). Os metabólitos que apresentaram a maior variabilidade entre as

parcelas foram: ácido oleico, ácido oxaloacético, ácido cis-vacênico e ácido esteárico.

Na parcela Controle, os metabólitos reunidos por sua semelhança estavam presentes na biossíntese de aminoacil RNAt, biossíntese dos aminoácidos, principalmente no metabolismo da arginina e prolina e no metabolismo da alanina, aspartato e glutamato.

Figura 21. Análise de Componentes Principais, tendo como variáveis todos os metabólitos identificados nos frutos verdes (*pool2*) cultivados nas parcelas experimentais Controle e Biodiversidade. Os números das variáveis referem-se aos metabólitos do Apêndice D.

Figura 22. Análise de Componentes Principais, tendo como variáveis somente os metabólitos significativos ($p \leq 0,05$, test t) nos frutos verdes (*poo/2*) cultivados nas parcelas experimentais Controle e Biodiversidade. Os números das variáveis referem-se aos metabólitos da Tabela 9.

Tabela 9. Metabólitos identificados por CG-EM (derivatização por MCF) e significativos ($p \leq 0,05$, test t), classificação de grupos e tempo de retenção (TR) dos frutos verdes cultivados nas parcelas Controle e Biodiversidade, *pool*/2. O “X” denota a detecção dos metabólitos nos frutos das parcelas Biodiversidade (B), Controle (C) ou em ambos.

Nº	Metabólitos	Classe	TR (min)	B	C
1	Ácido palmítico	Ácidos graxos e conjugados	20.755	X	X
2	Ácido adípico	Ácidos carboxílicos e derivados	10.999	X	X
3	Alanina	Aminoácidos e derivados	9.675	X	X
4	Ácido 3-Hidroxibenzóico	Ácido benzóico e derivados	16.305	X	X
5	Ácido trans-cinâmico	Ácido cinâmico e derivados	13.075	X	X
6	Ácido sinápico	Derivados de ácido cinâmico	30.244	X	X
7	Ácido cis-aconítico	Ácidos carboxílicos e derivados	14.208	X	X
8	Ácido margárico	Ácidos graxos e conjugados	22.007	X	X
9	Tirosina	Aminoácidos e derivados	28.608	X	X
10	Ácido palmiteláidico	Ácidos graxos e conjugados	20.63	X	X
11	Ácido palmitoléico	Ácidos graxos e conjugados	20.631	X	X
12	Ácido pentadecanóico	Ácidos graxos e conjugados	19.371	X	X
13	Glutamina	Aminoácidos e derivados	24.698	X	X
14	Ácido dodecanóico	Aminoácidos e derivados	13.896	X	X
15	Ácido succínico	Ácidos carboxílicos e derivados	7.606	X	X
16	Ácido málico	Ácidos carboxílicos e derivados	10.017	X	X
17	Ácido esteárico	Ácidos graxos e conjugados	23.515	X	X
18	Ácido cis-vacênico	Ácidos graxos e conjugados	23.359	X	X
19	Ácido fumárico	Ácidos graxos e conjugados	7.296	X	X
20	Norvalina	Aminoácidos e derivados	11.423	X	X
21	Valina	Aminoácidos e derivados	11.423	X	X
22	Glicina	Ácidos carboxílicos e derivados	10.064	X	X
23	Beta-alanina	Aminoácidos e derivados	11.374	X	X
24	Ácido aspártico			X	X

25	Isoleucina	Aminoácidos e derivados	12.687	X	X
26	Serina	Aminoácidos e derivados	16.533	X	X
27	Ácido oxaloacético	Ácidos carboxílicos e derivados	9.2	X	
28	Treonina	Aminoácidos e derivados	14.342	X	X
29	Ácido 2-aminobutírico	Aminoácidos e derivados	10.827	X	X
30	Prolina	Aminoácidos e derivados	13.734	X	X
31	Putrescina	Alquilaminas	20.968	X	X
32	Ácido oléico			X	X
33	Lisina	Aminoácidos e derivados	26.256	X	X
34	Ácido 2-oxoglutárico	Cetoácidos e derivados	11.694	X	X
35	Ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico		11.81	X	X
36	Ácido piroglutâmico	Pirrolidinas	15.403	X	X
37	Ornitina	Aminoácidos e derivados	24.438	X	X
38	Ácido 4-aminobutírico (GABA)	Aminoácidos e derivados	13.536	X	X
39	Ácido nicotínico	Piridinas e derivados	9.007	X	X

5.3.1.2. Análise de agrupamentos hierárquicos (*Hierarchical Clusters Analysis – HCA*)

Ferramentas de aglomeração são comumente usadas na metaboloma e a HCA é uma delas. A HCA dos metabólitos foi baseada na distância multivariada das replicatas e na intensidade dos picos dos metabólitos, o qual reafirmou a distinção entre as parcelas experimentais Biodiversidade e Controle, nos *pools* 1 e 2 (Figuras 23 e 24). Aqueles que possuem maior abundância foram representados pelos tons vermelhos e os metabólitos com menor intensidade foram representados pelos tons azuis. Os metabólitos foram agrupados (*clusters*) de modo que os componentes similares estão na mesma classe, aglomerados na menor distância possível. A matriz de correlação (*heatmap*) permitiu inferir quais vias, possivelmente, estão relacionadas com os metabólitos apresentados. Nos frutos verdes, tanto no *pool* 1 como no *pool* 2, os metabólitos agrupados estão associados principalmente ao metabolismo da

arginina e prolina, metabolismo da alanina e aspartato, biossíntese do aminoacil-tRNA, metabolismo dos fenilpropanóides, ciclo de Krebs e biossíntese dos ácidos graxos insaturados. Os metabólitos em sua maioria apresentam maior abundância na parcela Controle que na parcela Biodiversidade.

(Continuação)

Figura 23. Agrupamento hierárquico (*heatmap*) baseado nas quintuplicatas das amostras (*pool*/1) e na intensidade dos picos dos metabólitos identificados nos frutos verdes cultivados nas parcelas Controle (C) e Biodiversidade (B). A abundância dos metabólitos é a média normalizada das amostras das duas parcelas experimentais. A cor dos metabólitos é baseada na abundância relativa, sendo que o vermelho representa o metabólito mais abundante, o azul representa o menos abundante e o branco representa onde o metabólito não foi detectado. A cor representativa do metabólito é independente dos outros metabólitos e só pode ser comparada entre as replicatas das parcelas. Os números das variáveis referem-se aos metabólitos da Tabela 8.

Figura 24. Agrupamento hierárquico (*heatmap*) baseado nas quintuplicatas das amostras (*pool/2*) e na intensidade dos picos dos metabólitos significativos ($p \leq 0,05$, test t) nos frutos verdes cultivados nas parcelas Controle (C) e Biodiversidade (B). A abundância dos metabólitos é a média normalizada das amostras das duas parcelas experimentais. A cor dos metabólitos é baseada na abundância relativa, sendo que o vermelho representa o metabólito mais abundante, o azul representa o menos abundante e o branco representa onde o metabólito não foi detectado. A cor representativa do metabólito é independente dos outros metabólitos e só pode ser comparado entre as replicatas das parcelas. Os números das variáveis referem-se aos metabólitos da Tabela 8.

5.3.1.3. Vias metabólicas nos frutos verdes: parcelas Biodiversidade vs. Controle

A correlação dos metabólitos através da análise de agrupamento hierárquico sugere alterações tanto no metabolismo primário quanto no secundário dos frutos cultivados próximo à biodiversidade. Portanto, o mapeamento dos metabólitos pode indicar quais vias metabólicas têm suas atividades mais alteradas. Correlacionar os níveis dos metabólitos numa mesma via metabólica tem sido considerado o gargalo da Metaboloma devido à complexidade dos dados a serem avaliados. Além disso, como os metabólitos, intermediários de reações bioquímicas, estão envolvidos em diferentes vias numa complexa rede dentro do sistema biológico, um mesmo componente químico pode participar de diferentes vias (AGGIO et al., 2010). E, portanto, a interpretação biológica tem sido o grande desafio no estudo metabolômico. Muitas ferramentas computacionais e modelos matemáticos têm auxiliado no mapeamento das vias metabólicas, como o *Score Activity* (SA), escolhido para auxiliar a interpretação do nosso estudo.

Nos frutos verdes (*pool* 1) foram encontradas 64 vias metabólicas com diferença significativa entre as parcelas (Tabela 10). Também, observou-se que os compostos envolvidos em tais vias apresentaram menor abundância nos frutos cultivados na parcela Biodiversidade. O maior número de metabólitos identificados nesse estudo é participante das vias do metabolismo primário, sendo que as principais diferenças significativas entre as parcelas foram encontradas na biossíntese dos aminoácidos, metabolismo do glioxilato e dicarboxilato, ciclo de Krebs e metabolismo dos ácidos graxos insaturados. A figura 25 apresenta alguns metabólitos significativos envolvidos na biossíntese dos aminoácidos e ciclo de Krebs.

Figura 25. Metabólitos significativos envolvidos ($p \leq 0,05$, test t) na biossíntese de aminoácidos e ciclo de Krebs. A seta vermelha indica que estes metabólitos são mais abundantes nos frutos cultivados na parcela Controle.

O *pool 2* apresentou resultados semelhantes ao *pool 1* com exceção de algumas vias metabólicas apresentarem compostos com maior abundância nos frutos verdes da parcela Biodiversidade. Tais compostos estão envolvidos na biossíntese dos fenilpropanóides, biossíntese da fenilalanina, tirosina e triptofano, metabolismo dos ácidos graxos, biossíntese dos ácidos graxos insaturados, biossíntese da cutina, suberina e cera, biossíntese da ubiquinona e outros terpenóide-quinona, biossíntese da betalaína, biossíntese dos alcaloides isoquinolina. No *pool 2*, foram encontradas 47 vias metabólicas com diferenças significativas entre as parcelas. Todas as vias metabólicas com diferenças significativas nas bananas verdes cultivadas nas parcelas Biodiversidade e Controle estão listadas na Tabela 10.

A distinção entre as parcelas pode estar diretamente relacionada com a proximidade da floresta ao cultivo de bananas, considerando que este seja o único ponto divergente, pois não houve diferenças quanto ao solo, nutrição, condições climáticas e ponto de colheita.

As interações podem ser entre planta-inseto e planta-microrganismos e a parcela Biodiversidade pode oferecer todas essas combinações, onde os metabólitos presentes nos diferentes recipientes podem mediar respostas que, por consequência, desencadeiam menor severidade de Sigatoka Negra e alteram a fisiologia da planta. As interações positivas compreendem particularmente os microrganismos, tais como as associações simbióticas com epífitas, fungos micorrízicos e colonização de raízes por bactérias agentes de biocontrole e promotoras do crescimento vegetal (BAIS et al., 2006). A interação com microrganismos pode induzir mecanismos positivos associados a fixação de nitrogênio através da ação das proteobactérias, aumento da tolerância de perturbações ambientais por microrganismos endofíticos e vantagens provenientes de rizobactérias que induzem o crescimento vegetal (MOULIN et al., 2001, SCHARDLL et al., 2004; GRAY; SMITH, 2005). Também as plantas interagindo com outros organismos podem atuar em mutualismo de resistência, onde a planta contribui com receptores relacionados à imunidade e os organismos colonizadores podem modular os processos de indução e supressão de defesa da planta (DODDS; RATHJEN, 2010; WIN et al., 2012).

Tabela 10. Vias metabólicas com diferenças significativas nas bananas verdes cultivadas nas parcelas Biodiversidade e Controle (*pool1* e *pool2*).

Metabolismo Primário	Metabolismo Secundário
Fosforilação oxidativa	Transdução de sinais dos hormônios vegetais
Ciclo de Krebs	Biossíntese dos metabólitos secundários
Metabolismo do enxofre	Degradação dos compostos aromáticos
Metabolismo dos esfingolípídios	Biossíntese do glucosinolato
Metabolismo do glicoxilato e dicarboxilato	Biossíntese dos alcaloides tropano, priperidina e piridina
Metabolismo do ácido cianoamino	Biossíntese dos terpenóides
Metabolismo da biotina	Biossíntese de alcalóides derivados do terpenóide e policetido
Metabolismo da tirosina	Biossíntese de alcaloides derivados da histidina e purina
Metabolismo do propanoato	Biossíntese dos fenilpropanóides
Fixação de carbono em organismos fotossintéticos	Biossíntese de alcaloides derivados do ácido chiquímico
Degradação da lisina	Biossíntese dos hormônios vegetais
Metabolismo da fenilalanina	Metabolismo da glutatona
Metabolismo do nitrogênio	Biossíntese dos alcaloides derivados da ornitina, lisina e ácido nicotínico
Biossíntese do aminoacil-tRNA	Metabolismo do ácido 2-oxocarboxílico
Degradação da valina, leucina e isoleucina	Metabolismo da fenilalanina
Metabolismo da tiamina	
Metabolismo do ácido dibásico ramificado C5	Biossíntese de ubiquinona e outros terpenóide-quinona

Metabolismo da alanina, aspartato e glutamato	Biossíntese do alcalóide isoquinolina
Metabolismo da porfirina e clorofila	
Transportadores ABC	
Biossíntese da lisina	
Metabolismo da purina	
Biossíntese do pantotenato e CoA	
Biossíntese da valina, leucina e isoleucina	
Metabolismo da cisteína e metionina	
Metabolismo da beta-alanina	
Metabolismo da glicina, serina e treonina	
Metabolismo do butanoato	
Metabolismo da histidina	
Metabolismo da niacina e nicotinamida	
Metabolismo do ácido araquidônico	
Metabolismo do ácido alfa-linolênico	
Metabolismo do ácido linoleico	
Biossíntese dos ácidos graxos insaturados	
Glicólise e gliconeogênese	
Biossíntese dos ácidos graxos	
Biossíntese de cutina, suberina e cera	
Metabolismo da vitamina B6	
Metabolismo do ascorbato e aspartato	

Interconversões de pentose e glucuronato

Metabolismo do piruvato

Metabolismo da pirimidina

5.3.2. Análise do perfil metabólico das amostras de polpa das bananas maduras cultivadas nas parcelas experimentais Controle e Biodiversidade: POOL1 e POOL 2

5.3.2.1. Análise de componentes principais (PCA)

O perfil metabólito dos frutos maduros abrange cerca de 84 compostos identificados, os quais foram submetidos a análise de componentes principais (PCA). No primeiro *pool*, com apenas dois componentes principais explicando 64,22% da variância total, obteve-se a discriminação das amostras dos frutos verdes das parcelas experimentais Biodiversidade e Controle, como observado na Figura 26A. Os números das variáveis estão no apêndice (E).

Porém, na Figura 26B foi impossível visualizar individualmente os metabólitos presentes, e por isso os dados foram submetidos ao teste-t em nível de 5% de probabilidade ($p < 0,05$). Ao comparar o perfil metabólico entre as parcelas experimentais, foram identificados 20 metabólitos com diferenças significativas (Figura 27). Os dois primeiros componentes principais do novo gráfico de PCA foram responsáveis por 88,63% da variância total, o qual evidencia a existência de uma forte tendência de separação entre as duas parcelas. Os números das variáveis estão apresentados na Tabela 11.

As amostras Biodiversidade situadas nos quadrantes da esquerda da Figura 26B, que é a região com maior quantidade de metabólitos, revelam uma predominância dos compostos envolvidos no metabolismo da alanina, aspartato e glutamato e no ciclo de Krebs.

Nos quadrantes da direita, os resultados mostram que as amostras da Controle têm a predominância dos seguintes metabólitos: 4-aminobutírico (GABA) (15), ácido succínico (16), nonacosano (13), alanina (20) e tricosano (6) (Apêndice F). Os valores suplementares dos autovetores também ajudaram a validar estes dados, pois evidenciaram que metabólitos com diferença significativa nas parcelas Biodiversidade apresentam as maiores variabilidades.

Como já citado no tópico 5.2.2., o nonacosano é um dos principais componentes da cera (95%), e faz parte da cutícula juntamente com o tricosano. A presença abundante desses compostos na planta é um indício que a camada de material lipídico sobre a superfície dos frutos da parcela Controle

seja mais eficiente na proteção contra a entrada de patógenos (DONG et al., 2012; WHEELER; CARDÉ, 2014).

O GABA também é um tipo de resposta fisiológica funcional da planta que atua no sentido de atenuar tanto os estresses bióticos como abióticos, sugerindo sua ação como uma molécula sinalizadora intercelular. Além de atuar na defesa da planta, o GABA pode atuar na regulação do pH, no armazenamento de nitrogênio, no desenvolvimento da planta e sobre o metabolismo do carbono (ROBERTS, 2007; KINERLEY, TURANO, 2010). O GABA também pode estar associado com outras moléculas sinalizadoras. Ele pode ser formado a partir de produtos da reação do catabolismo das poliaminas via pirrolina (BITRIÁN et al., 2012).

A alanina é um substrato utilizado na conversão reversível para piruvato a partir da alanina aminotransferase, uma enzima regulada pela disponibilidade de nitrogênio e chave no metabolismo vegetal, pois faz a conexão entre o metabolismo do carbono central e a biossíntese de aminoácidos (KENDZIOREK et al., 2012). Portanto, a maior variação da alanina na parcela Controle pode sugerir a maior atividade enzimática da alanina aminotransferase a fim de disponibilizar uma maior quantidade de substrato para suprir a demanda de energia necessária para manter as funções fisiológicas da planta.

Quanto ao ácido succínico, a variância máxima deste metabólito entre as parcelas pode influenciar na qualidade sensorial do fruto. Durante o amadurecimento, o *flavor* é desenvolvido a partir de eventos fisiológicos e bioquímicos relacionados ao acúmulo de compostos aromáticos, degradação do amido e síntese de açúcares solúveis e aumento/diminuição da síntese de ácidos orgânicos. Contudo, os dados do presente estudo sugerem que as alterações ambientais desencadearam mudanças significativas quanto à abundância (ao fluxo) do ácido succínico. Consequentemente, a maior intensidade desse composto nos frutos cultivados na parcela Controle, pode ter alterado a razão entre ácidos orgânicos e os açúcares solúveis.

Figura 26. Análise de Componentes Principais, tendo como variáveis todos os metabólitos identificados nos frutos maduros (*pool*/1) cultivados nas parcelas experimentais Controle e Biodiversidade. Os números das variáveis estão no Apêndice F.

Figura 27. Análise de Componentes Principais, tendo como variáveis somente os metabólitos significativos ($p \leq 0,05$, test t) nos frutos maduros (*pool/1*) cultivados nas parcelas experimentais Controle e Biodiversidade. Os números das variáveis referem-se aos metabólitos da Tabela 11.

Tabela 11. Metabólitos identificados por CG-EM (derivatização por MCF) com diferença significativa ($p \leq 0,05$, test t), classificação de grupos de metabólitos relacionados e tempo de retenção (TR) dos frutos maduros (*pool*/1) cultivados nas parcelas Controle e Biodiversidade. O “X” denota a detecção dos metabólitos nos frutos das parcelas Biodiversidade (B), Controle (C) ou em ambos.

Nº Variáveis	Metabólitos	Classe	TR (min)	B	C
1	Dodecano	Hidrocarbonetos acíclicos	8.164	X	
2	Lisina	Aminoácidos e derivados	26.215	X	X
3	Ácido capróico	Ácidos graxos e conjugados	11.113	X	
4	Ácido decanóico	Ácidos graxos e conjugados	11.116	X	
5	Ácido fumárico	Ácidos graxos e conjugados	7.211	X	X
6	Tricosano	Hidrocarbonos acíclicos	25.178	X	X
7	Ácido sinápico	Derivados de ácido cinâmico	30.22	X	
8	Norvalina	Aminoácidos e derivados	11.409	X	X
9	Valina	Aminoácidos e derivados	11.409	X	X
10	2,3-Butanediol	Alcoois e polióis	4.765	X	
11	Ácido 2-isopropilmálico	Ácidos carboxílicos e derivados	11.479	X	X
12	Ácido 2-oxoglutárico	Cetoácidos e derivados	14.914	X	X
13	Nonacosano	Hidrocarbonos acíclicos	35.533		X
14	Ácido 2-Hidroxibutírico	Hidroxiácidos e derivados	8.98	X	
15	Ácido 4-Aminobutírico (GABA)	Aminoácidos e derivados	13.522	X	X
16	Ácido succínico	Ácidos carboxílicos e derivados	7.614	X	X
18	Ácido malônico	Ácidos carboxílicos e derivados	5.999	X	
19	Ácido 3-Hidroxibenzóico	Ácido benzóico e derivados	16.275	X	
20	Alanina	Aminoácidos e derivados	9.662	X	X

O perfil metabólito dos frutos maduros, *poo/2*, apresentou 96 compostos identificados, os quais foram submetidos à Análise de Componentes Principais (PCA). Com apenas dois componentes principais explicando 78,65% da variância total, obteve-se a discriminação das amostras dos frutos verdes das parcelas experimentais Biodiversidade e Controle (Figura 28A), como já observado no *poo/1* (Figura 27A).

A fim de melhorar a visualização dos metabólitos, os dados foram submetidos ao teste-t em nível de 5% de probabilidade. Da comparação do perfil metabólico entre as parcelas experimentais obteve-se 60 metabólitos com diferenças significativas (Figura 29). Os dois primeiros componentes principais do novo gráfico de PCA foram responsáveis por 80,41% da variância total. Os números das variáveis estão apresentados na Tabela 12.

Os valores dos autovetores ajudaram a identificar os metabólitos com as maiores variações: ácido glutárico (11), alanina (17), valina (18), pentadecano (23), ácido cinâmico (27), os quais estão situados nos quadrantes da direita, onde se encontram as amostras da Biodiversidade (Apêndice H).

Dentre estes compostos, o ácido cinâmico destaca-se por ter apresentado maiores variações tanto no fruto verde como no fruto maduro, na parcela Biodiversidade. Como já citado no tópico 5.3.1.1., ácido cinâmico um ácido fenólico precursor de componentes envolvidos na defesa da planta contra patógenos e tem sido apontado como um possível hormônio vegetal (DIXON, 2001; NIERO, 2010; YANG et al., 1995; WONG, et al., 2005; OKUDA et al., 2014).

Figura 28. Análise de Componentes Principais, tendo como variáveis todos os metabólitos identificados nos frutos maduros (*pool/2*) cultivados nas parcelas experimentais Controle e Biodiversidade. Os números das variáveis estão no Apêndice H.

Figura 29. Análise de Componentes Principais, tendo como variáveis somente os metabólitos significativos ($p \leq 0,05$, test t) nos frutos maduros (*pool/2*) cultivados nas parcelas experimentais Controle e Biodiversidade. Os números das variáveis referem-se aos metabólitos da Tabela 12.

Tabela 12. Metabólitos identificados por CG-EM (derivatização por MCF) com diferença significativa ($p \leq 0,05$, test t), classificação de grupos de metabólitos relacionados e tempo de retenção (TR) dos frutos maduros (*pool/2*) cultivados nas parcelas Controle (C) e Biodiversidade (B). O “X” denota a detecção dos metabólitos nos frutos das parcelas Biodiversidade, Controle ou em ambos.

Nº Variáveis	Metabólitos	Classe	TR (min)	B	C
1	Ácido oxálico	Ácidos carboxílicos e derivados	4.578	X	X
2	Ácido oxoaléico				
3	Ácido malônico	Ácidos carboxílicos e derivados	5.95	X	X
4	Ácido 3-metil-2-oxopentanóico	Cetoácidos e derivados		X	
5	Ácido 4-metil-2-oxopentanóico	Cetoácidos e derivados		X	
6	Ácido fumárico	Ácidos graxos e conjugados	7.296	X	X
7	Ácido succínico	Ácidos carboxílicos e derivados	7.606	X	X
8	Ácido octanóico	Cetoácidos e derivados	8.039	X	X
9	Ácido benzóico	Ácido benzóico e derivados	8.275	X	X
10	Ácido citramálico	Ácidos carboxílicos e derivados	9.306	X	X
11	Ácido glutárico	Ácidos carboxílicos e derivados	8.007	X	X
12	Alanina	Aminoácidos e derivados	9.675	X	X
13	Ácido málico	Ácidos carboxílicos e derivados	10.017	X	X
14	Glicina	Ácidos carboxílicos e derivados	10.064	X	X
15	Ácido adípico				
16	Ácido decanóico	Ácidos graxos e conjugados	11.123	X	X
17	Beta-alanina	Aminoácidos e derivados	11.374	X	X
18	Valina	Aminoácidos e derivados	11.423	X	X
19	Ácido glicérico				
20	Ácido 2-Isopropilmálico	Ácidos carboxílicos e derivados	11.492	X	X
21	Ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico		11.81		X
22	Ácido pimélico				
23	Pentadecano	Hidrocarbonos acíclicos	12.586	X	X
24	Leucina	Aminoácidos e derivados	12.685	X	X
25	Isoleucina	Aminoácidos e derivados	12.687	X	X
26	Ácido 5-oxotetraidrofurano-2-carboxílico			X	
27	Ácido trans-cinâmico	Ácido cinâmico e	13.075	X	X

		derivados			
28	Ácido 4-aminobutírico (GABA)	Aminoácidos e derivados	13.536	X	X
29	Prolina	Aminoácidos e derivados	13.734	X	X
30	Ácido dodecanóico	Aminoácidos e derivados	13.896	X	X
31	Ácido cis-aconítico	Ácidos carboxílicos e derivados	14.208	X	X
32	Treonina	Aminoácidos e derivados	14.342	X	X
33	Ácido aspártico	Aminoácidos e derivados	15.255	X	X
34	Ácido quínico	Alcoois cíclicos e derivados	15.228	X	X
35	Ácido cítrico	Ácidos carboxílicos e derivados	15.235	X	X
36	Ácido piroglutâmico	Pirrolidinas	15.403	X	X
37	Asparagina	Aminoácidos e derivados	15.523	X	X
38	Ácido 3-Hidroxibenzóico	Ácido benzóico e derivados	16.305	X	X
39	Serina	Aminoácidos e derivados	16.533	X	X
40	Ácido mirístico	Ácidos graxos e conjugados	17.005	X	X
41	Ácido glutâmico	Aminoácidos e derivados	17.684	X	X
42	Glutaciona	Peptídeos	18.843		X
43	Ácido pentadecanóico	Ácidos graxos e conjugados	19.371	X	X
44	Cis4-hidroxiprolina				
45	Fenilalanina	Aminoácidos e derivados	20.041	X	X
46	Ácido tartárico	Ácidos carboxílicos e derivados	20.36	X	X
47	Ácido palmitoléico	Ácidos graxos e conjugados	20.631	X	X
48	Putrescina	Alquilaminas	20.968	X	X
49	Ácido margárico	Ácidos graxos e conjugados	22.007	X	X
50	Ácido 4-hidroxicinâmico	Ácidos cinâmicos e derivados	22.242	X	X
51	Ácido esteárico	Ácidos graxos e conjugados	23.515	X	X
52	Ornitina	Aminoácidos e derivados	24.438	X	X
53	Lisina	Aminoácidos e derivados	26.256	X	X
54	Ácido araquídico	Ácidos graxos e conjugados	26.791	X	X
55	Histidina	Aminoácidos e derivados	27.165	X	X

56	Tirosina	Aminoácidos e derivados	28.608	X	X
57	N-alpha-acetil lisina	Aminoácidos e derivados	29.109	X	X
58	Ácido erúcico	Ácidos graxos e conjugados	30.106	X	X
59	Ácido sinápico	Derivados de ácido cinâmico	30.244	X	X
60	Nonacosano	Hidrocarbonos acíclicos	35.533	X	X

5.2.3. Análise de agrupamentos hierárquicos (*Hierarchical Clusters Analysis – HCA*)

Os espectros obtidos da amostragem dos frutos maduros também foram submetidos à HCA a fim de evidenciar as similaridades entre os padrões de dados. A distinção entre os frutos verdes das parcelas experimentais Biodiversidade e Controle também pôde ser observada nos frutos maduros, tanto no *pool*/1 quanto no *pool*/2 (Figuras 30 e 31).

Os resultados observados no *heatmap* permitiram melhor visualização quanto à similaridade entre os metabólitos que a análise do PCA. Os metabólitos foram agrupados (*clusters*) de modo que os componentes estão aglomerados na menor distância possível. Porém, ao comparar o perfil dos metabólitos entre os frutos verdes e maduros, percebe-se que houve um menor número de compostos com diferença significativa e portanto, é possível afirmar que a distinção entre as parcelas é mais acentuada nos frutos verdes e que a distinção nos frutos maduros possa ser apenas temporal. O número de agrupamentos de metabólitos formados foi tão grande que impossibilitou observar todas as correlações possíveis, o que presume uma gama de vias metabólicas envolvidas que possam apresentar alterações durante o amadurecimento.

A matriz de correlação permitiu inferir algumas das vias, que possivelmente, estão relacionadas com os metabólitos apresentados. Os metabólitos correlacionados nos frutos maduros estão envolvidos em especial no metabolismo do carbono, metabolismo da glutatona, na biossíntese do aminoacil-tRNA e biossíntese dos aminoácidos, especificamente o

metabolismo da alanina, aspartato e glutamato e o metabolismo da glicina, serina e treonina.

Figura 30. Agrupamento hierárquico (*heatmap*) baseado nas quintuplicatas das amostras (*pool*/1) e na intensidade dos picos dos metabólitos significativos ($p \leq 0,05$, test t) nos frutos maduros cultivados nas parcelas Controle (C) e Biodiversidade (B). A abundância dos metabólitos é a média normalizada das amostras das duas parcelas experimentais. A cor dos metabólitos é baseada na abundância relativa, sendo que o vermelho representa o metabólito mais abundante, o azul representa o menos abundante e o branco representa onde o metabólito não foi detectado. A cor representativa do metabólito é independente dos outros metabólitos e só pode ser comparado entre as replicatas das parcelas. Os números das variáveis referem-se aos metabólitos do Apêndice E.

Figura 31. Agrupamento hierárquico (*heatmap*) baseado nas quintuplicatas das amostras (*pool/2*) e na intensidade dos picos dos metabólitos significativos ($p \leq 0,05$, test t) nos frutos maduros cultivados nas parcelas Controle (C) e Biodiversidade (B). A abundância dos metabólitos é a média normalizada das amostras das duas parcelas experimentais. A cor dos metabólitos é baseada na abundância relativa, sendo que o vermelho representa o metabólito mais abundante, o azul representa o menos abundante e o branco representa onde o metabólito não foi detectado. A cor representativa do metabólito é independente dos outros metabólitos e só pode ser comparado entre as replicatas das parcelas. Os números das variáveis referem-se aos metabólitos do Apêndice G.

5.2.4. Vias metabólicas nos frutos maduros: parcelas Biodiversidade vs. Controle

Ao comparar as vias metabólicas, os frutos maduros cultivados nas parcelas experimentais Biodiversidade e Controle apresentaram distinção no metabolismo primário e secundário, como também observado nos frutos verdes. Ao todo, foram 64 vias metabólicas com diferenças significativas entre as parcelas avaliadas, tanto no *pool* 1 como no *pool*2 (Tabela 13).

Tabela 13. Vias metabólicas com diferenças significativas nas bananas maduras cultivadas nas parcelas Biodiversidade e Controle (*pool*1 e *pool*2).

Metabolismo Primário	Metabolismo Secundário
Fosforilação oxidativa	Transdução de sinais dos hormônios vegetais
Ciclo de Krebs	Biossíntese dos metabólitos secundários
Metabolismo do enxofre	Degradação dos compostos aromáticos
Metabolismo dos esfingolipídios	Biossíntese de glucosinolatos
Metabolismo do glicoxilato e dicarboxilato	Biossíntese dos alcaloides tropano, priperidina e piridina
Metabolismo do ácido cianoamino	Biossíntese de alcaloides derivados da histidina e purina
Metabolismo da biotina	Biossíntese dos fenilpropanóides
Metabolismo da tirosina	Biossíntese de alcaloides derivados do ácido chiquímico
Metabolismo do propanoato	Biossíntese dos hormônios vegetais
Fixação de carbono em organismos fotossintéticos	Metabolismo da glutatona
Degradação da lisina	Biossíntese dos alcaloides derivados da ornitina, lisina e ácido nicotínico
Metabolismo da fenilalanina	Metabolismo do ácido 2-oxocarboxílico

Metabolismo do nitrogênio	Metabolismo da alanina, aspartato e glutamato
Biossíntese do aminoacil-RNAt	Biossíntese de ubiquinona e outros terpenóide-quinona
Degradação da valina, leucina e isoleucina	Biossíntese do alcalóide isoquinolina
	Biossíntese de cutina, suberina e cera
Metabolismo da tiamina	
Metabolismo da alanina, aspartato e glutamato	
Metabolismo da porfirina e clorofila	
Transportadores ABC	
Biossíntese da lisina	
Metabolismo da purina	
Biossíntese do pantotenato e CoA	
Biossíntese da valina, leucina e isoleucina	
Metabolismo da cisteína e metionina	
Metabolismo da beta-alanina	
Metabolismo da glicina, serina e treonina	
Metabolismo do butanoato	
Metabolismo da histidina	
Metabolismo da niacina e nicotinamida	
Metabolismo do ácido alfa-linolênico	
Metabolismo do ácido linoleico	
Biossíntese dos ácidos graxos insaturados	

Glicólise e gliconeogênese

Biossíntese dos ácidos graxos

Metabolismo da arginina e ornitina

Metabolismo da vitamina B6

Metabolismo do ascorbato e aspartato

Interconversões de pentose e glucuronato

Metabolismo do piruvato

Metabolismo do composto seleno

Metabolismo da arginina e prolina

Metabolismo do glicerolipídio

Via da pentose-fosfato

Metabolismo da glutamina e glutamato

Sistema de retransmissão do enxofre

Metabolismo da fenilalanina, tirosina e triptofano

Metabolismo do nicotinato e nicotinamida

Metabolismo da pirimidina

Os metabólitos identificados nos frutos maduros, e com diferença significativa em ambas às parcelas, estão envolvidos principalmente no metabolismo primário, como visto nos frutos verdes: biossíntese dos aminoácidos, ciclo de Krebs, metabolismo dos ácidos graxos e metabolismo do glicoxilato e dicarboxilato (Figura 32).

Figura 32. Metabólitos significativos envolvidos ($p \leq 0,05$, test t) na biossíntese de aminoácidos e ciclo de Krebs. A seta vermelha indica que estes metabólitos são menos abundantes nos frutos cultivados na parcela Controle.

Se nos frutos verdes foi observado menor acúmulo dos metabólitos da parcela Biodiversidade, nos frutos maduros o resultado foi oposto. No *pool*1, houve acúmulo dos metabólitos envolvidos na maior parte das vias metabólicas dos frutos cultivados na parcela Biodiversidade. No *pool*2, apenas dezoito vias metabólicas (28%) apresentaram acúmulo dos metabólitos na parcela Biodiversidade.

Ao comparar os estádios de maturação da banana, verde e maduro, os dados apontam que nos frutos verde apresentaram maior quantidade de metabólitos significativos, o qual sugere que as principais diferenças entre as parcelas são mais evidentes nos frutos verdes, quando estes acabaram de ser fisiologicamente desligados da planta-mãe. As mudanças encontradas durante o amadurecimento dos frutos estão, sobretudo, relacionadas aos eventos temporais, os quais tem impacto direto sobre as qualidades nutricionais e organolépticas e podem influenciar na aceitação do consumidor. Como exemplo de alterações sensoriais encontradas neste estudo, Calháu (2014) detectou na parcela Biodiversidade compostos voláteis característicos de frutos verdes, conhecidos como Voláteis de Folhas Verdes (VFFVs). Associado a este resultado, as alterações no ciclo de Krebs também podem desequilibrar a razão ácidos orgânicos/açúcares solúveis, e, portanto, podem influenciar a qualidade do produto final.

5.2.5. Principais vias metabólicas alteradas entres as parcelas Biodiversidade e Controle

5.3.1.4. Metabolismo dos aminoácidos

Em nosso estudo, tanto nos frutos verdes como nos frutos maduros, foram observadas diversas vias de biossíntese dos aminoácidos com a atividade alterada. Os compostos identificados e correlacionados com o metabolismo dos aminoácidos foram: glicina, glutamina, treonina, serina, metionina, prolina, histidina, tirosina, lisina, leucina, valina e fenilalanina (Figura 33). A coloração preto em alguns círculos indica os metabólitos detectados nos frutos verdes e maduros de ambas as parcelas experimentais. Nos frutos verdes, tais compostos foram mais abundantes na parcela Controle e nos frutos maduros, o resultado foi o oposto.

Figura 33. Via de biossíntese dos aminoácil RNAt e a via de biossíntese dos aminoácidos. O círculo preenchido em preto significa que a presença do composto nos frutos verdes e maduros das parcelas experimentais Biodiversidade e Controle. Fonte: Banco de dados do KEGG - *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*. Acessível em: <http://www.genome.jp.jp/kegg/>

As vias do metabolismo dos aminoácidos que apresentaram maior número de metabólitos correlacionados foram o metabolismo da alanina, aspartato e glutamato, a biossíntese da valina, leucina e isoleucina e metabolismo da cisteína e metionina.

A via de biossíntese do aminoacil RNAt também apresentou diferença significativa entre as parcelas experimentais. Os aminoacils RNAt são importantes na transdução de sinais em uma célula. Eles determinam precisamente a ligação do RNA transportador a um aminoácido contendo o anticódon correspondente (WOESE et al., 2000). Portanto, um desequilíbrio quanto à abundância dos aminoácidos pode desencadear desordens que afetam o fluxo de informação genética do RNA às proteínas e, por consequência, podem modificar todo o metabolismo vegetal. As alterações na síntese de aminoácidos em ambas as parcelas podem estar relacionadas com:

(1) *a eficácia de sistemas simbióticos, localizado próximo à Biodiversidade, para absorção de nutrientes e a translocação destes à planta.* A bananeira é uma planta exigente em nitrogênio. Ele é o elemento mais importante durante o desenvolvimento da planta até a emissão dos cachos (SILVA, 1994; ARAÚJO, 2008). Como não é metabolizado pelas plantas, o nitrogênio presente no ar é transformado em formas absorvíveis (amônia e nitrato) a partir de bactérias fixadoras de nitrogênio e cianobactérias que contenham a enzima nitrogenase. Após a assimilação, o nitrogênio é distribuído pela planta para diferentes funções de crescimento e desenvolvimento (XAVIER et al., 2011). Num ambiente onde há diversidade biológica, a gama de microrganismos fixadores de nitrogênio num mesmo espaço é maior. Com isso acredita-se que a cultura da banana próxima à biodiversidade possa beneficiar-se mais com as diferentes associações simbióticas entre planta-microrganismos e ter maior disponibilidade de nitrogênio que as plantas cultivadas num sistema convencional, baseado na monocultura.

(2) *acúmulo de metabólitos secundários derivados de aminoácidos em cultivos infectados por doenças e pragas.* No início da infecção fúngica,

receptores de reconhecimento padrão de patógenos ou proteínas de resistência ativam o sistema imune e desencadeiam resposta de defesa como a produção de metabólitos secundários. Muitos aminoácidos têm relevância metabólica como precursores de metabólitos secundários como os compostos nitrogenados glucosinolatos, o peptídeo glutathione e hormônios vegetais, os quais tiveram alterações nas parcelas experimentais avaliadas. Em perturbações ambientais, a presença do ácido piroglutâmico em plantas, um metabólito precursor e fonte de ácido glutâmico, tem indicado a participação do metabolismo da glutathione, o qual está envolvido na regulação da homeostase, na proteção contra peróxidos de hidrogênio, no sequestro de xenofóbico e metais pesados, na regulação do ciclo celular e nas reações bioquímicas do metabolismo central (KUMAR; BACHHAWAT, 2012; OHTSU-OHKAMA et al., 2008).

(3) *atuação dos aminoácidos como metabólitos de defesa.* A resposta de defesa química dos organismos vegetais não é apenas através dos metabólitos secundários, mas também por metabólitos primários como os açúcares, aminoácidos e intermediários do ciclo de Krebs. Os aminoácidos, como outros componentes do metabolismo do carbono, têm sido reconhecidos como marcadores diretos de disfunção fotossintética e outros processos associados a estresses, até mesmo antes da produção de metabólitos secundários, (LOPES et al., 2013; ROJAS et al., 2014; ARBONA et al., 2013). Em *Arabidopsis* e tomate, alguns aminoácidos como a valina, leucina e tirosina acumularam após o tratamento com algum tipo de virulência. Outros aminoácidos, como o aspartato e o glutamato diminuíram após a inoculação de microrganismos. Todas estas alterações evidenciam que os aminoácidos estão envolvidos de alguma forma na defesa da planta (WARD et al., 2010). Outro exemplo mostra que genes envolvidos no metabolismo do aspartato são induzidos na presença de patógenos (ROJAS et al., 2014). Suas atividades estão relacionadas com a ativação de respostas de defesa, como o desencadeamento de proteínas PR, a formação de espécies de oxigênio reativas e a produção de ácido salicílico, os quais geram a Resposta Hipersensitiva na planta.

5.3.1.5. Ciclo de Krebs e o metabolismo do glioxilato e dicarboxilato

O maior número de metabólitos identificados com diferenças significativa entre as parcelas Controle e Biodiversidade foram os de duas vias envolvidas no metabolismo do carbono central, ciclo de Krebs o metabolismo do glioxilato e dicarboxilato (Figuras 34 e 35). Nos frutos verdes, tais compostos foram mais abundantes na parcela Controle e nos frutos maduros, o resultado foi o oposto.

O ciclo de Krebs, juntamente com a glicólise e a cadeia de transporte de elétrons, possui papel fundamental no metabolismo do carbono e energia. Estudos sugerem que a organização dessas vias envolvidas na respiração acontece de acordo com a demanda fisiológica da célula, ou seja, quanto mais a planta requer energia, maior será o fluxo metabólico (SWEETLOVE et al., 2010). No presente estudo foi observado que o ciclo de Krebs apresentou maior atividade na parcela Biodiversidade, o que significa maior oxidação dos substratos respiratórios com a finalidade de gerar energia necessária à planta para manter uma ampla faixa de funções fisiológicas da célula decorrentes das interações com o ambiente (FERNIE et al., 2004). Os metabólitos identificados em ambas as parcelas foram o oxaloacetato, citrato, isocitrato, 2-oxoglutarato, succinato e fumarato (Figura 35). Além das funções energéticas, as vias do metabolismo respiratório também podem estar associadas a resposta ao estresse. Como exemplo, a planta *Arabidopsis* foi exposta a doenças que induziram o aumento nos fatores de transcrição envolvidos na produção de energia, como glicólise, ciclo de Krebs e fosforilação oxidativa e biossíntese de alguns aminoácidos (LESS et al., 2011; ROJAS et al., 2014). Também, as vias da respiração têm impacto sobre a regulação do status redox da célula e a formação de espécies de oxigênio reativas em resposta adaptativa a estresses (DONGEN et al., 2008).

O metabolismo do glioxilato e dicarboxilato ocorre paralelo ao ciclo de Krebs, com a participação de algumas enzimas em comum: malato desidrogenase, citrato sintase e aconitase. O ciclo do glioxilato consiste em converter unidades de C_2 a precursores C_4 para a formação de intermediários precursores da biossíntese de carboidratos e aminoácidos a partir da acetil Co

A (KUNZE et al., 2006). Esta via metabólica é importante quando há uma indisponibilidade energética devido a um alto fluxo metabólico no vegetal. Portanto, para suprir a essa demanda, a planta pode sinalizar ao metabolismo do glioxilato aumento da conversão de ácidos graxos, alcoóis, ésteres, ceras, alcenos e compostos metilados em fontes de carbono durante o desenvolvimento e amadurecimento do fruto (CORNAH et al., 2004).

Figura 34. Via do ciclo de Krebs. O círculo preenchido em preto significa que a presença do composto nos frutos verdes e maduros das parcelas experimentais Biodiversidade e Controle. Fonte: Banco de dados do KEGG - *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*. Acessível em: <http://www.genome.jp.jp/kegg/>

Figura 36. Metabolismo do glioxilato e dicarboxilato. O círculo preenchido em preto significa que a presença do composto nos frutos verdes das parcelas experimentais Biodiversidade e Controle. Fonte: Banco de dados do KEGG - *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*. Acessível em: <http://www.genome.jp/kegg/>

5.3.1.6. Metabolismo dos ácidos graxos

As parcelas experimentais apresentaram diferenças significativas quanto ao metabolismo dos ácidos graxos, mas especificamente na via de biossíntese dos ácidos insaturados (Figura 36). Nos frutos verdes, os compostos envolvidos no metabolismo dos ácidos graxos acumularam mais nos frutos da parcela Controle e nos frutos maduros, o resultado foi o oposto.

Ao todo, foram identificados nos frutos verdes e maduros 11 ácidos graxos insaturados com diferença significativa entre as parcelas, sendo um destes o ácido oleico, o principal ácido graxo monoinsaturado de membranas glicerolípídicas em plantas (WU et al., 2009). A distinção desta via entre as parcelas pode estar associada com as alterações ambientais que podem perturbar a homeostase celular. Como resposta da planta a um estresse, a fluidez da membrana é remodelada a fim de manter íntegra a função das proteínas (UPCHURCH, 2008). Também, componentes da rede de sinalização, tais como as fosfolipases, podem atuar sobre ligações lipídicas dentro de membranas, os quais liberam ácido linoleico, componente que apresentou diferença significativa entre as parcelas avaliadas e que serve como substrato no acúmulo de jasmonato e metil jasmonato (ODJAKOVA; HADJIIVANOVA, 2001; WEBER, 2002).

Além da distinção do metabolismo de ácidos graxos insaturados entre as parcelas, componentes participantes da via de biossíntese de esfingolipídios apresentaram fluxo metabólico alterado. Os esfingolipídios correspondem a 10% do total de lipídios em plantas e são constituídos de uma base de cadeia longa, uma amida ligada a cadeia acil graxo e uma cabeça polar. Em situações de estresse, esta via apresenta envolvimento no desencadeamento de respostas de defesa que mediam a morte celular programada em *Arabidopsis* (SHI et al., 2007; BERKEY et al., 2012).

Figura 37. Via de biossíntese dos ácidos graxos insaturados. A letra A indica os ácidos graxos que pertencem a família n-3 e a letra B indica os ácidos graxos que pertencem à família n-6. O círculo preenchido em preto significa que a presença do composto nos frutos verdes das parcelas experimentais Biodiversidade e Controle. Fonte: Banco de dados do KEGG - *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*. Acessível em: <http://www.genome.jp.jp/kegg/>

5.4. Teores de poliaminas

As poliaminas são uma nova classe de hormônios vegetais detectadas tanto durante o crescimento e desenvolvimento, como também num período de estresse da planta (ALCAZAR; TIBURCIO, 2014; JANG et al, 2012; TORRIGIANI et al., 2012).

Nos frutos verdes, no segundo dia pós-colheita dos frutos, as poliaminas putrescina, espermina e espermidina apresentaram diferença significativa entre as parcelas experimentais, sendo que os níveis foram maiores na parcela Biodiversidade, tanto no *pool*/1 como no *pool*/2 (Figura 38). Como as poliaminas são consideradas agentes anti-senescência, pois retardam o amadurecimento do fruto, a presença mais expressiva na Biodiversidade pode estar associada com o período mais longo pós-colheita nos frutos desta parcela (SAFTNER; BALDI, 1990). Junto a isso, foram constatados níveis mais altos de ácido indol acético (IAA) nos frutos cultivados na parcela Biodiversidade (CASTRO-ALVES, 2013). Como já visto antes, níveis altos de IAA retardam processos de amadurecimento como a degradação do amido na banana (PURGATTO et al., 2001). Em períodos de estresse da planta, as poliaminas também estão associadas à defesa contra microrganismos e perturbações abióticas e esta pode ser uma das razões para a maior quantidade das poliaminas na parcela Biodiversidade (JANG et al, 2012; IOANNIDIS; KOTZBASIS, 2014). Como exemplo, estudos com frutas expostas a estresses tem mostrado a interação de poliaminas com seus produtos derivados do catabolismo, como por exemplo o GABA, uma molécula sinalizadora intercelular que apresentou maior abundância nos frutos da parcela Biodiversidade (DEYMAN et al., 2014). No tabaco, também foi observado um aumento das poliaminas e dos produtos finais do catabolismo que frente a estresses bióticos e abióticos induzem a morte celular programada (MOSCHOU et al., 2008).

Figura 38. Produção de poliaminas ($\mu\text{g.g FW}^{-1}.\text{h}^{-1}$) mensurados desde a colheita até a senescência dos frutos (Verde, Intermediário e Maduro) das parcelas experimentais Controle e Biodiversidade. Os *pool/s* seguem a mesma metodologia adotada no perfil metabólico. As barras indicam desvio padrão. Todas as poliaminas apresentaram diferença significativa entre as parcelas experimentais ($p \leq 0,05$, test t), com exceção da espermina da amostra *pool*1, estágio maduro.

Nos estádios intermediário e maduro, a produção de poliaminas também teve diferença significativa entre as parcelas experimentais Biodiversidade e Controle, com exceção da espermina em um dos *pools* avaliados do estágio maduro (*pool*1). O acúmulo de putrescina foi maior na parcela Controle, o qual, em modo geral, tem níveis mais elevados que das outras poliaminas por ser formada na primeira etapa de biossíntese da poliamina, a partir da descarboxilação da ornitina ou arginina (BÍTRIÁN et al., 2012).

A ausência de um perfil homogêneo da espermina e espermidina, nos estádios intermediário e maduro, *pools* 1 e 2, pode estar relacionada com a presença de poliaminas conjugadas. A conjugação se dá a partir de ligações covalentes entre a poliaminas e o ácidos hidroxicinâmico, um derivado do ácido cinâmico, o qual apresentou abundância nos frutos maduros da parcela Biodiversidade. Além das poliaminas livres estarem envolvidas na defesa da planta, as poliaminas conjugadas podem suprimir o crescimento e desenvolvimento de patógenos a partir de uma barreira fenólica mais resistente a ação de enzimas (DEL DUCA; SERAFINNOI FRACASSINI; CAI, 2014). A formação desses conjugados pode estar também envolvida na regulação dos níveis de poliaminas livres em plantas e por isso é considerado um controle na avaliação precisa de poliaminas totais (JANG et al., 2012; BAIS; RAVISHANKAR, 2002).

6. CONCLUSÕES

- As alterações nas condições ambientais de cultivo de bananas influenciaram o perfil metabólico dos frutos. Os frutos verdes e maduros das parcelas experimentais Biodiversidade e Controle apresentaram diferenças significativas quanto aos metabolismos primário e secundário;
- Os metabólitos com diferença significativa entre as parcelas experimentais apresentaram maior envolvimento no metabolismo primário, sobretudo na via de biossíntese de aminoácidos, compostos precursores de uma ampla faixa de metabólitos secundários;
- Foram encontrados metabólitos relacionados com a defesa da planta, como o ácido cinâmico, em maior quantidade na parcela Biodiversidade, nos frutos verdes e maduros;
- A vida verde dos frutos da parcela Biodiversidade foi maior que os da parcela Controle, com maiores níveis de poliaminas e IAA que podem colaborar como compostos que retardam o amadurecimento e senescência da banana.

7. REFERÊNCIAS

AGGIO, R. B. M.; RUGGIERO, K.; VILLAS-BÔAS, S. G. Pathway Activity Profiling (PAPi): from the metabolite profile to the metabolic pathway activity. **Bioinformatics**, v. 26, p. 2969-2976, 2010.

AGGIO, R.; VILLAS-BÔAS, S. G.; RUGGIERO, K. Metab: an R package for high-throughput analysis of metabolomics data generated by GC-MS. **Bioinformatics**, v. 27, p. 2316–2318, 2011.

AGOPIAN, R. G. et al. Low temperature induced changes in activity and protein levels of the enzymes associated to conversion of starch to sucrose in banana fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v. 62, p. 133–140, 2011.

AGOPIAN, R. G. et al. Synthesis of fructooligosaccharides in banana 'Prata' and its relation to invertase activity and sucrose accumulation. **J. Agric. Food Chem.**, v. 57, p. 10765–10771, 2009.

AGOPIAN, R. G. et al. Identification of fructooligosaccharides in different banana cultivars. **J. Agric. Food Chem.**, v. 56, p. 3305–3310, 2008.

ALBE, H. W. Conceitos e aspectos bioquímicos dos estrógenos. **Rev. Clínica Ter.**, v. 31, p. 68-76, 2005.

ALCÁZAR, R. et al. Polyamines: molecules with regulatory functions in plant abiotic stress tolerance. **Planta**, v. 231, p. 1237-1249, 2010.

ALCÁZAR, R.; TIBURCIO, A. F. Plant polyamines in stress and development: an emerging area of research in plant sciences. **Frontiers in plant science**, v. 5, p. 319, 2014.

ALIFERIS, K. A.; JABAJI, S. Deciphering plant–pathogen interactions applying metabolomics: principles and applications, **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 34, p. 29-33, 2012.

ALLENDORF, F. W.; HOHENLOHE, P. A.; LUIKART, G. Genomics and the future of conservation genetics. **Nature Reviews Genetics**, v.11, p. 697–709, 2010.

ALTIERI, M. A. Agroecology in action: What is agroecology, 2000. Disponível em: http://nature.berkeley.edu/~miguel-alt/what_is_agroecology.html. Acesso em 11 Nov. 2014.

ALTIERI, M. A. The ecological role of biodiversity in agroecosystems. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 74, p. 19–31, 1999.

ALTIERI, M. A.; NICHOLLS, C. Optimizando el manejo agroecológico de plagas a través de la salud del suelo. **Agroecología**, v. 1, 2006. Disponível em: <http://revistas.um.es/agroecologia/article/view/18>. Acesso em 24 jun. 2012.

ALLWOOD, J. W.; GOODACRE, R. An introduction to liquid chromatography–mass spectrometry instrumentation applied in plant metabolomic analyses. **Phytochemical Analysis**, v. 21, p. 33-47, 2010.

ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos: Uma breve revisão. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, v. 66, p.1-9, 2007.

ARAÚJO, J. P. C. **Crescimento e marcha de absorção de nutrientes de bananeira (*Musa spp.* AAA) “Grande Naine” no primeiro ciclo de produção**. Tese (Doutorado). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2008. 80p.

ARBONA, V. et al. Metabolomics as a tool to investigate abiotic stress tolerance in plants. **Int. J. Mol. Sci**, v. 14, p. 4885-4911, 2013.

ASIF, M. H.; NATH, P. Expression of multiple forms of polygalacturonase gene during ripening in banana fruit. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 43, p. 177-184, 2005.

ASHIHARA, H. et al. Comparison of the formation of nicotinic acid conjugates in leaves of different plant species. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 60, p. 190-195, 2012.

BAI, T. et al. Transcriptome and expression profile analysis of highly resistant and susceptible banana roots challenged with *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* tropical race 4. **PloS one**, v. 8, p. e73945, 2013.

BAIS, H. P.; RAVISHANKAR, G. A. Role of polyamines in the ontogeny of plants and their biotechnological applications. **Plant Cell, Tiss. Org. Cult.**, v. 69, p. 1–34, 2002.

BAIS, H. P. et al. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. **Annu. Rev. Plant Biol.**, v. 57, p. 233-266, 2006.

BAIT, T. T. et al. Transcriptome and expression profile analysis of highly resistant and susceptible banana roots challenged with *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* tropical race 4. **PLoS One**, v. 8, p. e73945, 2013.

BARRY, C. S.; GIOVANNONI, J. J. Ethylene and Fruit Ripening. **J. Plant Growth Regul**, v. 26, p. 143–159, 2007.

BARTOLI, C. G. et al. Interactions between hormone and redox signalling pathways in the control of growth and cross tolerance to stress. **Environmental and Experimental Botany**, v. 94, p. 73-88, 2013.

BEEKWILDER, J. et al. Functional characterization of enzymes forming volatile esters from strawberry and banana. **Plant Physiology**, v. 135, p. 1865-1878, 2004.

BELLAMY, A. S. Banana production systems: Identification of alternative systems for more sustainable production. **Ambio**, v. 42, p. 334-343, 2013.

BENDINI, H. N. et al. Análise de risco da ocorrência de Sigatoka-negra baseada em modelos polinomiais: Um estudo de caso. **Trop. plant pathol.**, v. 38, 2013.

BERGMEYER, H. U. **Methods of enzymatic analysis**. 2 ed. Springer: New York, 1974. p. 1205-1212.

BERKEY, R.; BENDIGERI, D.; ANDXIAO, S. Sphingolipids and plant defense/disease: The "death" connection and beyond. **Front. Plant Sci.**, v. 3, p.68, 2012.

BIERHALS, J. D. et al. Activity, cloning and expression of an isoamylase-type starch-debranching enzyme from banana fruit. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 7412-7418, 2004.

BIONDI, S. et al. Auxin and cytokinin modify methyl jasmonate effects on polyamine metabolism and ethylene biosynthesis in tobacco leaf discs. **Plant Science**, v. 165, p. 95-101, 2003.

BITRIÁN, M. et al. Polyamines under abiotic stress: metabolic crossroads and hormonal crosstalks in plants. **Metabolites**, v. 2, p. 516-528, 2012.

BORGES, A. A. et al. Molecular analysis of menadione-induced resistance against biotic stress in *Arabidopsis*. **Plant Biotechnology Journal**, v. 7, p. 744-762, 2003.

BORGES, A. A.; BORGES-PEREZ, A.; FERNANDEZ-FALCON, M. O. Effect of menadione sodium bisulfite, an inducer of plant defenses, on the dynamic of banana phytoalexin accumulation during pathogenesis. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 51, p. 5326-5328, 2003.

BORGES, A. L. **Diagnose química foliar em bananeira**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2004, 2p. (Embrapa. Banana em Foco, 54).

BORGES, A. L. et al. **Sistema de Produção da Bananeira Irrigada**. Embrapa Semiárido: Sistemas de Produção, v. 4, ISSN 1807-0027, 2009. Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Banana/BananeiraIrrigada/autores.htm>. Acesso em 11 Jul. 2012.

BORGES, A. L.; OLIVEIRA, A. M. G. Avaliação do estado nutricional da bananeira– diagnose visual. **Comunicado Técnico EMBRAPA**, v. 117, p. 7, 2006.

BOUCHE, N.; FROMM, H. GABA in plants: just a metabolite? **Trends in plant science**, v. 9, n. 3, p. 110-115, 2004.

BOWNE, J. B. et al. Drought responses of leaf tissues from wheat cultivars of differing drought tolerance at the metabolite level. **Molecular Plant**, v. 5, p. 418-429, 2012.

BRUMMELL, D. A. Cell wall disassembly in ripening fruit. **Functional Plant Biology**, v. 33, p. 103-119, 2006.

CALHAU, M. F. N. S. **A influência da proximidade da biodiversidade da Mata Atlântica no perfil de compostos voláteis de bananas (*Musa acuminata* AAA cv. Nanicão) produzidas no Vale do Ribeira-SP**. 155 p.

Dissertação (Mestrado em Ciências dos Alimentos). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo-SP, 2014.

CAMPOLIN, A. I.; FEIDEN, A. Metodologias participativas em agroecologia. **Embrapa Pantanal**, Corumbá, Documentos, n. 115, 2011.

CANDELA, M. et al., Functional intestinal microbiome, new frontiers in prebiotic design. **International Journal of Food Microbiology**, v. 140, p. 93–101, 2010.

CAO, S. et al. Effect of MeJA treatment on polyamine, energy status and anthracnose rot of loquat fruit. **Food chemistry**, v. 145, p. 86-89, 2014.

CAPELL, T.; BASSIE, L.; CHRISTOU, P. Modulation of the polyamine biosynthetic pathway in transgenic rice confers tolerance to drought stress. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 26, p. 9909-9914, 2004.

CARNAVAL, A. C. et al. Stability predicts genetic diversity in the Brazilian Atlantic Forest hotspot. **Science**, v. 323, p. 785-789, 2009.

CASTELAN, F. P. et al. Effects of Black Leaf disease and Sigatoka disease on fruit quality and maturation process of bananas produced in the subtropical conditions of southern Brazil. **Crop Protection**, v. 35, p. 127-131, 2012.

CASTELAN, F. P. **A influência da biodiversidade no entorno do cultivo sobre a expressão de proteínas de bananas produzidas no Vale do Ribeira**. 106p. Tese (Doutorado em Ciências dos Alimentos). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

CASTRO-ALVES, V. C. **O efeito da proximidade do fragmento florestal de Mata Atlântica sobre a área de cultivo no amadurecimento de bananas (*Musa acuminata* AAA cv. Nanicão) e nos compostos fenólicos das folhas de bananeiras**. 143 p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo-SP, 2013.

CATCHPOLE, G. S. et al. Hierarchical metabolomics demonstrates substantial compositional similarity between genetically modified and conventional potato crops. **PNAS**, v. 102, 2005.

CHAMPOLIN, A. I.; FEIDEN, A. **Metodologias participativas em agroecologia**. Corumbá: Embrapa Pantanal, 2011.

CHILLET, M. et al. Sigatoka disease reduces the green life of bananas. **Crop Prot**, v. 28, p. 41-45, 2009.

CONRATH, U. et al. Priming: getting ready for battle. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 19, p. 1062-1071, 2006.

CORDENUNSI, B. R.; LAJOLO, F. M. Starch breakdown during banana ripening: sucrose synthase and sucrose phosphate synthase. **J. Agric. Food Chem.**, v. 43, p. 347-351, 1995.

CORDENUNSI, B. R.; SHIGA, T. M.; LAJOLO, F. M. Non-starch polysaccharide composition of two cultivars of banana (*Musa acuminata* L.: cvs Mysore and Nanicao). **Carbohydrate Polymers**, v. 71, p. 26–31, 2008.

CORNAH, J. E. et al. Lipid utilization, gluconeogenesis, and seedling growth in *Arabidopsis* mutants lacking the glyoxylate cycle enzyme malate synthase. **J. Biol. Chem.**, v. 279, p. 42916-23, 2004.

CPLA – Coordenadoria de Planejamento Ambiental. **Vale do Ribeira**. Disponível em: <http://www.ambiente.sp.gov.br/cpla/zoneamento/zoneamento-ecologico-economico/vale-do-ribeira/>. Acesso em 17 de novembro de 2014.

CRUZ, A. C. M. **Metabolômica nutricional**. 2008. 41 p. Monografia. Faculdade de Ciências da Nutrição e Alimentação, Universidade do Porto, Porto, 2008.

DANTAS, J. L. L.; SOARES FILHO, W. S. Classificação botânica, origem e evolução. In: ALVES et al. **Banana para exportação: aspectos técnicos da produção**. Cruz das Almas: MAARA-SDR-BA/EMBRAPA-SPI; 1995. p. 9-13.

DAVEY, M. W. et al. Genetic variability in *Musa* fruit provitamin A carotenoids, lutein and mineral micronutrient contents. **Food Chemistry**, v. 115, p. 806–813 2009.

DAVEY, M. W. et al. Sampling strategies and variability in fruit pulp micronutrient contents of West and Central African bananas and plantains (*Musa* Species), **J. Agric. Food Chem.**, v. 55, p. 2633-2644, 2007.

DAVIES, H. V. et al. Metabolome variability in crop plant species – When, where, how much and so what? **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 58, p. 54–61, 2010.

DEFERNEZ, M. et al. (2004) NMR and HPLC-UV profiling of potatoes with genetic modifications to metabolic pathways. **J. Agric. Food Chem**, v. 52, p. 6075–6085, 2004.

DEL DUCA, S.; SERAFINI-FRACASSINI, D.; CAI, G. Senescence and programmed cell death in plants: polyamine action mediated by transglutaminase. **Frontiers in plant science**, v. 5, 2014.

DELGADO-VARGAS, F., JIMÉNEZ, A. R.; PAREDES-LÓPEZ, O. Natural pigments: carotenoids, anthocyanins, and betalains — characteristics, biosynthesis, processing, and stability. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 40, p.173-289, 2000.

DEY, A.; GUPTA, K.; GUPTA, B.. Role of Polyamines in Plant–Pathogen Interactions. **Plant Adaptation to Environmental Change: Significance of Amino Acids and their Derivatives**, p. 222, 2014.

DEYMAN, K. L. et al. Impact of 1-methylcyclopropene and controlled atmosphere storage on polyamine and 4-aminobutyrate levels in “Empire” apple fruit. **Frontiers in plant science**, v. 5, 2014.

DICKE, M.; VAN LOON, J. J. A. Chemical ecology of phytohormones: how plants integrate responses to complex and dynamic environments. **Journal of chemical ecology**, v. 40, p. 653-656, 2014.

DIEKS, D. et al. **New challenges to philosophy of science**. Springer, 2013.

DING, P. et al. Plastid ultrastructure, chlorophyll contents, and colour expression during ripening of Cavendish banana (*Musa acuminata* 'Williams') at 18°C and 27°C, **New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science**, v. 35, p. 201-210, 2007.

DITCHFIELD, C.; TADINI, C.C. Acompanhamento do processo de amadurecimento da banana Nanicao (*Musa cavendishii* Lamb) In: **XVIII Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 2002, Porto Alegre, RS. Anais do XVIII CBCTA. Porto Alegre: SBCTA, 2002. p.1629-1632.

DIXON, R. A. Progress natural products and plant disease resistance. **Nature**, v. 411, p. 843-847, 2001.

DO, P. T.; OSORIO, S.; FERNIE, A. R. Metabolic Profiling of Plant Cells. 2010. Essay 4.2: The cohesion–tension theory at work. **Plant Physiology**, Fifth Edition Online. Disponível em: <http://www.plantphys.net>. Acesso em 14 de outubro de 2014.

DODDS, P. N.; RATHJEN, J. P. Plant immunity: towards an integrated view of plant–pathogen interactions. **Nature Reviews Genetics**, v. 11, p. 539-548, 2010.

DONG, X. et al. Wax composition of ‘Red Fuji’ apple fruit during development and during storage after 1-methylcyclopropene treatment. **Hort. Environ. Biotechnol.**, v. 53, p. 288-297, 2012.

DUDAREVA, N. et al. Biosynthesis, function and metabolic engineering of plant volatile organic compounds. **New Phytologist**, v. 198, p. 16-32, 2013.

DUQUE, L. et al. Radical Scavenging Capacity of 2, 4-Dihydroxy-9-phenyl-1 H-phenalen-1-one: A Functional Group Exclusion Approach. **Organic letters**, v. 15, p. 3542-3545, 2013.

EHRLS, E. M. **Determinantes da recuperação da Mata Atlântica no Estado de São Paulo**. São Paulo. 351p. Dissertação (Doutorado em Ciência Ambiental). Faculdade de Economia e Administração, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

EL-BASSIOUNY, HALA MS. Physiological responses of wheat to salinity alleviation by nicotinamide and tryptophan. **Inter J Agric Biol**, v. 7, p. 653-659, 2005.

EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Solos. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. 2. ed. Rio de Janeiro: Embrapa Solos, 2006. 306 p.

ESPINOSA, L. M.; MEIER, M. A. R. Plant oils: The perfect renewable resource for polymer science. **European Polymer Journal**, v. 47, p. 837–852, 2011.

ETALO, D. W. et al. System-wide hypersensitive response-associated transcriptome and metabolome reprogramming in tomato. **Plant physiology**, v. 162, p. 1599-1617, 2013.

FACUNDO, H. V. V. et al. Influence of different banana cultivars on volatile compounds during ripening in cold storage. **Food Research International**, v. 49, p. 626–633, 2012.

FACUNDO, H. V. V. et al. Storage at low temperature differentially affects the colour and carotenoid composition of two cultivars of banana. **Food chemistry**, v. 170, p. 102-109, 2015.

FANCELLI, M. et al. **Controle biológico de *cosmopolites sordidus* (germ.) (coleoptera: Curculionidae) pelo fungo *beauveria bassiana* (bals.) vuill.** Cruz das Almas. Embrapa Mandioca e Fruticultura. 2004. 3p. (Comunicado Técnico, 102).

FAOSTAT. **Produção Mundial de Banana**. 2010. Disponível em: <<http://www.fao.org>>. Acesso em: 28 Jan. 2013.

FEIDEN, A. Agroecologia: introdução e conceitos. In: AQUINO, A. M.; ASSIS, R. L. **Agroecologia: princípios e técnicas para uma agricultura orgânica sustentável**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, p. 49-70, 2005.

FERNIE, A. R. et al. Metabolite profiling: from diagnostics to systems biology. **Nature Reviews**, v. 5, p. 763-769, 2004.

FERNIE, A. R.; CARRARI, F.; SWEETLOVE, L. J. Respiratory metabolism: Glycolysis, the TCA cycle and mitochondrial electron transport. **Curr. Opin. Plant Biol.**, v. 7, p. 254-261, 2004.

FERNIE, A. R.; TADMOR, Y.; ZAMIR, D. Natural genetic variation for improving crop quality. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 9, p. 196–202, 2006.

FERRARI, J. T.; NOGUEIRA, E. M. C. Como identificar e combater a Sigatoka Negra da bananeira. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, p. 656-663. 2003.

FIEHN O. et al. Metabolite profiling for plant functional genomics. **Nat Biotechnol**, v. 18, p. 1157-1161, 2000.

FIEHN O. et al. Metabolite profiling for plant functional genomics. **Nat Biotechnol**, v. 18, p. 1157-1161, 2000.

FIEHN O. et al. Metabolomics: the link between genotypes and phenotypes. **Plant Mol Biol**, v. 48, p. 155-171, 2002.

FIORAVANÇO, J. C. Mercado mundial da banana: produção, comércio e participação brasileira. **Informações econômicas**, v. 33, p. 15-27, 2003.

FIORAVANÇO, J. C.; PAIVA, M. C. Sigatoka-negra da bananeira. **R. Bras. Agrocência**, v. 11, p. 135-141, 2005.

FÓRUM GLOBAL. **Tratado das ONGs relativo a agricultura sustentável**. Rio de Janeiro, 1992. Mimeografado.

FREEMAN, B. C.; BEATTIE, G. A. An overview of plant defenses against pathogens and herbivores. **The Plant Health Instructor**, 2008.

FU, Z. Q.; DONG, X. Systemic acquired resistance: turning local infection into global defense. **Annual Review of Plant Biology**, v. 64, p. 839-863, 2013.

FU, X.; LIU, J. Transcriptional profiling of canker-resistant transgenic sweet orange (*Citrus sinensis* Osbeck) constitutively overexpressing a spermidine synthase gene. **BioMed research international**, v. 2013, 2012.

FUKUSAKI, E.; KOBAYASHI A. Plant Metabolomics: Potential for Practical Operation . **The Society for Biotechnology**, v. 100, p. 347–354, 2005.

GARCIA, E.; LAJOLO, F. M. Starch transformation during banana ripening: The amylase and glucosidase behavior. **Journal of Food Science**, v. 53, p. 1181-1186, 1988.

GARRY, J.; MEYER, J. P. Recherche d'une loi d'action de la temperature sur la croissance des fruits du bananier. **Fruits**, v. 30, p. 375-392, 1975.

GLASSOP, D. et al. Changes in the sugarcane metabolome with stem development. Are they related to sucrose accumulation? **Plant Cell Physiol**, v. 48, p. 573-584, 2007.

GRAY, E. J.; SMITH, D. L. Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant–bacterium signaling processes. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 37, p. 395-412, 2005.

GONZALEZ, M. E. et al. Perturbation of *spermine synthase* gene expression and transcript profiling provide new insights on the role of the tetraamine spermine in *Arabidopsis thaliana* defense against *Pseudomonas viridiflava*. **Plant Physiology**, p. pp. 110.171413, 2011.

GONZÁLEZ-LAMOTHE, R.; EL OIRDI, M.; BRISSON, N.; BOUARAB, K. The conjugated auxin indole-3-acetic acid–aspartic acid promotes plant disease development. **The Plant Cell Online**, v. 24, p. 762-777, 2012.

GULLBERG, J. et al. Design of experiments: an efficient strategy to identify factors influencing extraction and derivatization of *Arabidopsis thaliana* samples in metabolomic studies with gas chromatography/mass spectrometry. **Analytical Biochemistry**, v. 331, p. 283–295, 2004.

GYGI, S. P. et al. Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. **Mol. Cell. Biol.**, v. 19, p. 1720-1730, 1999.

HAZARIKA, P.; RAJAM, M. V. Biotic and abiotic stress tolerance in transgenic tomatoes by constitutive expression of S-adenosylmethionine decarboxylase gene. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, v. 17, n. 2, p. 115-128, 2011.

HIRUMA, K. et al. Glutathione and tryptophan metabolism are required for *Arabidopsis* immunity during the hypersensitive response to hemibiotrophs. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 23, p. 9589-9594, 2013.

HUI, J. et al. Effect of low light intensity on growth and accumulation of secondary metabolites in roots of *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 38, p. 160–168, 2010.

HUSSEIN, M. M.; FAHAM, S. Y.; ALVA, A. K. Role of foliar application of nicotinic acid and tryptophan on onion plants response to salinity stress. **Journal of Agricultural Science**, v. 6, p. p41, 2014.

IBGE. **Produção Agrícola Municipal**. 2010. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em: 28 Jan. 2013.

IMAHORI, Y. et al. Residual effects of low oxygen storage of mature green fruit on ripening processes and ester biosynthesis during ripening in bananas. **Postharvest Biology and Technology**, v. 77, p. 19–27, 2013.

IOANNIDIS, N. E.; KOTZABASIS, K. Polyamines in chemiosmosis in vivo: a cunning mechanism for the regulation of ATP synthesis during growth and stress. **Frontiers in plant science**, v. 5, 2014.

JANG, S. J. et al. Increased polyamine biosynthesis enhances stress tolerance by preventing the accumulation of reactive oxygen species: T-DNA mutational analysis of *Oryza sativa* lysine decarboxylase-like protein 1. **Molecules and cells**, v. 34, p. 251-262, 2012.

JIN, W. et al. A digital imaging method for measuring banana ripeness. **COLOUR research and application**, v. 00, p. 1-11, 2012.

JIMÉNEZ-BREMONT, J. F. et al. Physiological and molecular implications of plant polyamine metabolism during biotic interactions. **Frontiers in plant science**, v. 5, 2014.

JITSAENG, K.; PAETZ, C.; SCHNEIDER, B. Phenylphenalenones from *Musa* cv. „Thepanom” (BBB). **Rec. Nat. Prod**, v. 4, , p. 26-30, 2010.

JONES, J. DG; DANGL, J. L. The plant immune system. **Nature**, v. 444, p. 323-329, 2006.

KAMO, T. Phenylphenalenones and their biosynthetic pathway. **Journal of the Faculty of Agriculture-Shinshu University (Japan)**, 2004.

KENDZIOREK, M.; PASZKOWSKI, A.; ZAGDANSKA, B. Differential regulation of alanine aminotransferase homologues by abiotic stresses in wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings. **Plant Cell Rep.**, v. 31, p. 1105–1117, 2012.

KINNERSLEY, A. M.; TURANO, F. J. Gamma aminobutyric acid (GABA) and plant responses to stress. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 19, p. 479-509, 2000.

KOEK, M. M. et al. Quantitative metabolomics based on gas chromatography mass spectrometry: status and perspectives, **Metabolomics**, v. 7, p. 307–328, 2011.

KOEK, M. M. et al. Microbial metabolomics with gas chromatography/ mass spectrometry. **Anal. Chem.**, v. 78, p. 1272-1281, 2006.

KOPKA, J. Current challenges and developments in GC–MS based metabolite profiling technology. **Journal of Biotechnology**, v. 124, p. 312–322, 2006.

KOPKA, J. et al. **Plant metabolomics and its potential for systems biology research: Background concepts, technology, and methodology**. Burlington: Academic Press, v. 500, 2011, 299-336 p.

KUMAR, A.; BACHHAWAT, A. K. Pyroglutamic acid: Throwing light on a lightly studied metabolite. **Curr. Sci**, v. 102, p. 288–297, 2012.

KUNZE, M. et al. A central role for the peroxisomal mebrane in glyoxylate cycle function. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1763, p. 1441-1452, 2006.

KUSANO, M. et al. Metabolomics reveals comprehensive reprogramming involving two independent metabolic responses of *Arabidopsis* to UV-B light. **The Plant Journal**, v. 67, p. 354–369, 2011.

KUSANO, M. et al. Using metabolomic approaches to explore chemical diversity in rice. **Molecular Plant**, v. 8, p. 58-67, 2015.

KUSANO, M.; SAITO, K. Role of metabolomics in crop improvement. **J. Plant Biochem. Biotechnol.**, v. 21, p. 24–31, 2012.

KUSANO, T. et al. Polyamines: essential factors for growth and survival. **Planta**, v. 228, p. 367-381, 2008.

LESS, H. et al. Coordinated gene networks regulating *Arabidopsis* plant metabolism in response to various stresses and nutritional cues. **The Plant Cell Online**, v. 23, p. 1264-1271, 2011.

L'HOMME, C. et al. Evaluation of fructans in various fresh and stewed fruits by high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection. **Journal of chromatography A**, v. 920, p. 291-297, 2001.

LICHTENBERG, L. A.; LICHTENBERG, P. S. F. Avanços na bananicultura brasileira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, p. 29-36, 2011.

LI, C. et al. Transcriptome profiling of resistant and susceptible Cavendish banana roots following inoculation with *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* tropical race 4. **BMC genomics**, v. 13, p. 374, 2012.

LIVINGSTON III, D. P.; HINCHA, D. K.; HEYER, A. G. Fructan and its relationship to abiotic stress tolerance in plants. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 66, p. 2007-2023, 2009.

LOAKE, G.; GRANT, M. Salicylic acid in plant defence-the players and protagonists. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 10, p. 466-472, 2007.

LOHANI, S.; TRIVEDI, P. K.; NATH, P. Changes in activities of cell wall hydrolases during ethylene-induced ripening in banana: Effect of 1-MCP, ABA and IAA. **Postharvest Biology and Technology**, v. 31, p. 119-126, 2004.

MAINARDI, J.A. et al. The effects of ethylene and 1-MCP on gene expression and activity profile of starch phosphorylase during banana ripening. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 7294-7299, 2006.

MANNERS, J. M.; CASU, R. E. Transcriptome analysis and functional genomics of sugarcane. **Tropical Plant Biology**, v. 4, p. 9-21, 2011.

MARCATTO C. **Agricultura sustentável: Conceitos e princípios**. Disponível em: <http://www.redeambiente.org.br>. Acesso em 22 ago. de 2012.

MARINI, F. et al. Polyamine metabolism is upregulated in response to tobacco mosaic virus in hypersensitive, but not in susceptible, tobacco. **New phytologist**, v. 149, n. 2, p. 301-309, 2001.

MARTI, G. et al. Metabolomics reveals herbivore-induced metabolites of resistance and susceptibility in maize leaves and roots. **Plant, Cell & Environment**, v. 36, p. 621-639, 2013.

MARTÍNEZ-ROMERO, D. et al. Tools to maintain postharvest fruit and vegetable quality through the inhibition of ethylene action: a review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 47, p. 543-560, 2007.

MATOS, G. D.; PEREIRA-FILHO, E. R.; POPPI, R. J.; ARRUDA, M. A. Z. Análise exploratória em química analítica com emprego de quimiometria: PCA e PCA de imagens. **Revista Analytica**, v. 6, p. 38-50, 2003.

MATTOO, A. K.; ABDUL-BAKI, A. Crop genetic responses to management: evidence of root-shoot communication. IN: UPHOFF N. et al. **Biological approaches to sustainable soil systems**. Boca Raton, FL: CRC Press; 2006. pp. 221–230.

MCDUGALL, G.; MARTINUSSEN, I.; STEWART, D. Towards fruitful metabolomics: high throughput analyses of polyphenol composition in berries using direct infusion mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 871, p. 362–369, 2008.

MCGUIRE, R. G. Reporting of objective color measurement. **Hort Sci.**, v. 27, p. 1254, 1992.

MESQUITA, A. L. M. **Importância e métodos de controle do "moleque" ou broca-do-rizoma-da-bananeira**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2003. 6p. (Circular Técnica 17).

MITTERMEIER, R. A. et al. Uma breve história da conservação da biodiversidade no Brasil. **Megadiversidade**, v. 1, p. 14-21, 2005.

MODENESE, D. **Efeito da radiação gama e de tratamento hidrotérmicos sobre as características físico-químicas, funcionais e nutricionais da farinha e do amido de banana verde (*Musa acuminata* cv. Nanica)**. 2011. 111p. Dissertação (Mestrado em Ciências). Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

MOREIRA, A.; CASTRO, C.; FAGERIA, N. K. Efficiency of boron application in Oxisol cultivated with banana in the Central Amazon. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 82, p. 1137-1145, 2010.

MOSCHOU, P. N. et al. Bridging the gap between plant and mammalian polyamine catabolism: a novel peroxisomal polyamine oxidase responsible for a

full back-conversion pathway in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, v. 147, p. 1845-1857, 2008.

MOSCHOU, P. N.; ROUBELAKIS-ANGELAKIS, K. A. Polyamines and programmed cell death. **Journal of experimental botany**, v. 65, n. 5, p. 1285-1296, 2014.

MOTA, R. V. et al. Activity and expression of banana starch phosphorylases during fruit development and ripening. **Planta**, v. 216, p. 325-333, 2002.

MOULIN, L. et al. Nodulation of legumes by members of the beta-subclass of proteobacteria. **Nature**, v. 411, p. 948-950, 2001.

MUIR, J. G. et al. Fructan and free fructose content of common Australian vegetables and fruit. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 55, p. 6619-6627, 2007.

MUR, L. A. J et al. The hypersensitive response; the centenary is upon us but how much do we know? **Journal of experimental Botany**, v. 59, p. 501-520, 2008.

NADELLA, K. D.; MARLA, S. S.; KUMAR, P. A. Metabolomics in agriculture. **Omics: a journal of integrative biology**, v. 16, p. 149-159, 2012.

NANDA, A. K. et al. Reactive oxygen species during plant-microorganism early interactions. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 52, p. 195-204, 2010.

NASCIMENTO JUNIOR, B. B. et al. Efeito do 1-metilciclopropeno sobre a emissão dos ésteres voláteis de bananas ao longo do amadurecimento. **Quim. Nova**, v. 31, p. 1367-1370, 2008.

NASCIMENTO, J. R. O. et al. Beta-amylase expression and starch degradation during banana ripening. **Postharvest Biology and Technology**, v. 40, p. 41-47, 2006.

NEELAM, A. et al. A field-grown transgenic tomato line expressing higher levels of polyamines reveals legume cover crop mulch-specific perturbations in fruit phenotype at the levels of metabolite profiles, gene expression, and agronomic characteristics. **J. Exp. Bot.**, v. 59, p. 2337-2346, 2008.

NIERO, E. L. O. **Efeitos de ácido cinâmico sobre melanócitos e células derivadas de melanoma humanos em cultura: Avaliação do seu potencial antitumoral e de proteção contra danos celulares causados por radiação ultravioleta.** 2010. Tese (Biologia Celular e Tecidual) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

NOBELI, I. et al. A structure-based anatomy of the *E. coli* metabolome. **Journal of Molecular Biology**, v. 334, p. 697–719, 2003.

NOTEBORN, H. P. J. M. et al. Chemical fingerprinting for the evaluation of unintended secondary metabolic changes in transgenic food crops. **Journal of Biotechnology**, v. 77, p.103–114, 2000.

ODJAKOVA, M.; HADJIIVANOVA, C. The complexity of pathogen defense in plants. **Bulg. J. Plant Physiol**, v. 27, p. 101-109, 2001.

OERKE, E. C. Crop losses to pests. **Journal of Agricultural Science**, v. 144, p. 31–43, 2006.

OHKAMA-OHTSU, N. et al. A gamma-glutamyl transpeptidase-independent pathway of glutathione catabolism to glutamate via 5-oxoproline in Arabidopsis. **Plant Physiol**, v. 148, p. 1603–1613, 2008.

OKUDA, K. et al. Cis-cinnamic acid selective suppressors distinct from auxin inhibitors. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 62, p. 600–607, 2014.

OLIVEIRA, M. S. N. **Síntese e caracterização de complexos envolvendo poliaminas e os íons metálicos zinco (II), níquel (II) e paládio (II).** 2010. Dissertação (Química) – Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

OLIVER, S. G. et al. Systematic functional analysis of the yeast genome. **Trends Biotechnol.**, v. 16, p. 373–378, 1998.

PARRA-LOBATO, M. C.; GOMEZ-JIMENEZ, M. C. Polyamine-induced modulation of genes involved in ethylene biosynthesis and signalling pathways and nitric oxide production during olive mature fruit abscission. **Journal of experimental botany**, p. err124, 2011.

PASTOR, V. et al. Fine tuning of reactive oxygen species homeostasis regulates primed immune responses in Arabidopsis. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 26, p. 1334-1344, 2013.

PASTOR, V. et al. Preparing to fight back: generation and storage of priming compounds. **Frontiers in plant science**, v. 5, 2014.

PAYÉS, A. C. L. M. et al. The conservation success over time: evaluating the land use and cover change in a protected area under a long re-categorization process. **Land Use Policy**, v. 30, p. 177– 185, 2013.

PENTEADO, S. R. Agricultura orgânica. **Piracicaba, ESALQ. 41p. (Série Produtor Rural, Edição Especial)**, 2001.

PEREIRA, S. L. et al. Changes in the metabolome of lettuce leaves due to exposure to mancozeb pesticide. **Food Chemistry**, v.154, p. 291-298, 2014.

PEREIRA-NETO, J. S. **Agroecologia e planejamento agrícola: gestão sustentável dos recursos naturais**. Monografia (Especialização em Geografia e Território: planejamento urbano, rural e ambiental), Departamento de Ge-história, Universidade Estadual da Paraíba, Paraíba. 2010.

PEREMARTI, A. et al. Spermine facilitates recovery from drought but does not confer drought tolerance in transgenic rice plants expressing *Datura stramonium* S-adenosylmethionine decarboxylase. **Plant molecular biology**, v. 70, n. 3, p. 253-264, 2009.

PEREZ-FONS, L. et al. A genome-wide metabolomic resource for tomato fruit from *Solanum pennellii*. **Scientific reports**, v. 4, 2014. DOI: 10.1038/srep03859.

PEREZ, S.; BERTOFT, E. The molecular structures of starch components and their contribution to the architecture of starch granules: A comprehensive review. **Starch/Starke**, v. 62, p. 389–420, 2010.

PERFECTO, I.; VANDERMEER, J. The agroecological matrix as alternative to the land-sparing/agriculture intensification model. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, p. 5786-5791, 2010.

PERONI-OKITA, F. G. H. **Estrutura do grânulo de amido de banana e sua relação com as enzimas que atuam no metabolismo amido-sacarose**. 2007. 152 p. Dissertação (Doutorado em Ciências dos Alimentos) - Instituto de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

PERONI-OKITA, F. H. G. et al. In vivo degradation of banana starch: Structural characterization of the degradation process. **Carbohydrate Polymers**, v. 81, p. 291–299, 2010.

PHLIX, C. F.; FELTUS, F. A. Plant stress biomarkers from biosimulations: The Transcriptome-To-Metabolome™ (TTM™) technology—effects of drought stress on rice. **Plant Biology**, v. 17, p. 63-73, 2015.

PIETERSE, C. M. J. et al. Hormonal modulation of plant immunity. **Annual review of cell and developmental biology**, v. 28, p. 489-521, 2012.

PIETERSE, C. M. J; VAN WEES, S. C. M. Induced disease resistance. In: **Principles of Plant-Microbe Interactions**. Springer International Publishing, 2015. p. 123-133.

PRABHAVATHI, V. R.; RAJAM, M. V. Polyamine accumulation in transgenic eggplant enhances tolerance to multiple abiotic stresses and fungal resistance. **Plant biotechnology**, v. 24, p. 273-282, 2007.

PRADO, A. **Composição fenólica e atividade antioxidante de frutas tropicais**. 2009. 106p. Dissertação (Mestrado em Ciências). Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

PURGATTO, E. et al. Inhibition of b-amylase activity, starch degradation and sucrose formation by indole-3-acetic acid during banana ripening. **Planta**, v. 212, p. 823-828, 2001.

PURGATTO, E. et al. The onset of starch degradation during banana ripening is concomitant to changes in the content of free and conjugated forms of indole-3-acetic acid. **Journal of Plant Physiology**, v. 159, p. 1105-111, 2002.

RAMSEY, M. D.; DANIELLS, J. W.; ANDERSON, V. J. Effects of Sigatoka leaf spot (*Mycosphaerella musicola* Leach) on fruit yields, field ripening and green life of bananas in North Queensland. **Scientia horticultrae**, v. 41, p. 305-313, 1990.

RESENDE, R. U. **As regras do jogo: Legislação florestal e desenvolvimento sustentável no Vale do Ribeira**. São Paulo: Annablume, 2000.

ROBERTS, M. R. Does GABA Act as a Signal in Plants? Hints from Molecular Studies: Hints from Molecular Studies. **Plant signaling & behavior**, v. 2, p. 408-409, 2007.

ROBERT-SEILANIANZ, A.; GRANT, M.; JONES, J. D. G. Hormone crosstalk in plant disease and defense: more than just jasmonate-salicylate antagonism. **Annual review of phytopathology**, v. 49, p. 317-343, 2011.

ROESSNER, U. et al. Metabolic profiling allows comprehensive phenotyping of genetically or environmentally modified plant systems. **The Plant Cell**, v. 13, p. 11-29, 2001.

ROESSNER, U.; BACIC, A. Metabolomics in plant research. **Australian Biochemist.**, v. 40, p. 9-11, 2009.

ROESSNER, U.; BOWNE, J. What is metabolomics all about? **BioTechniques**, v. 46, p. 363-365, 2009.

ROJAS, C. M. et al. Regulation of primary plant metabolism during plant-pathogen interactions and its contribution to plant defense. **Frontiers in plant science**, v. 5, 2014.

ROSSETTO, M. R. M.; LAJOLO, F. M.; CORDENUNSI, B. R. Influência do ácido giberélico na degradação do amido durante o amadurecimento da banana. **Ciência Tecnologia de Alimentos**, v. 24, p. 076-081, 2004.

SAFTNER, R. A.; BALDI, B. G. Polyamine levels and tomato fruit development: Possible interaction with ethylene. **Plant Physiol.**, v. 92, p. 547-550, 1999.

SALMON, B. et al. Compositional and isotopic studies of fruit flavours: The banana aroma. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 11, p. 353-359, 1996.

SATOU, M. et al. Integrated analysis of transcriptome and metabolome of Arabidopsis albino or pale green mutants with disrupted nuclear-encoded chloroplast proteins. **Plant Molecular Biology**, v. 85, p. 411-428, 2014.

SAUTER, H.; LAUER, M.; FRITSCH, H. Metabolic profiling of plants: A new diagnostic technique. **ACS Symp. Ser.**, v. 443, p. 288–299, 1991.

SCHARDLL, C. L.; LEUCHTMANN A.; SPIERING, M. J. Symbioses of grasses with seed-borne fungal endophyte. **Annual review of plant biology**, v. 55, p. 315–340, 2004.

SCHAUER, N.; FERNIE, A. R. Plant metabolomics: Towards biological function and mechanism. **Trends in Plant Science**, v. 11, p. 508–516, 2006.

SCHAUER, N.; ZAMIR, D.; FERNIE, A. R. Metabolic profiling of leaves and fruit of wild species tomato: a survey of the *Solanum lycopersicum* complex. **Journal of Experimental Botany**, v. 56, p. 297-307, 2005.

SCHERLING, C. et al. Metabolomics unravel contrasting effects of biodiversity on the performance of individual plant species. **PLoS ONE**, v. 5, p. 9, 2010.

SCHLINDWEIN, J. A. **Calibração de métodos de determinação e estimativa de doses de fósforo e potássio em solos sob sistema plantio direto**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 169 p, 2003.

SEN, C.; MISHRA, H. N.; SRIVASTAV, P. P. Modified atmosphere packaging and active packaging of banana (*Musa* spp.): A review on control of ripening and extension of shelf life. **Journal of Stored Products and Postharvest Research**, v. 3, p. 122 – 132, 2012.

SEYMOUR, G. B. Banana. IN: SEYMOUR, G. B.; TAYLOUR, J. E.; TUCKER, G. A. **Biochemistry of fruit ripening**. London: Chapman & Hall, 1996.

SHEMER T. A. et al. Citrus chlorophyllase dynamics at ethylene-induced fruit color-break: a study of chlorophyllase expression, post translational processing kinetics, and *in situ* intracellular localization. **Plant Physiol.**, v. 148, p. 108–118, 2008.

SHEPHERD. L. V. T. et al. Effect of agricultural production systems on the potato metabolome, **Metabolomics**, v. 10, p. 212-224, 2014.

SHI, L. et al. Involvement of sphingoid bases in mediating reactive oxygen intermediate production and programmed cell death in *Arabidopsis*. **Cells Res.**, v. 17, p. 1030-1040, 2007.

SHIGA, T. M. et al. Ripening-associated changes in the amounts of starch and non-starch polysaccharides and their contributions to fruit softening in three banana cultivars. **J. Sci. Food Agric.**, v. 91, p. 1511–1516, 2011.

SILVA, D. A. **Manual de agricultura natural**. Instituto Agronômico Pernambucano. Recife, PE. 2008.

SILVA, J. T. A. **Adubação e nutrição da bananeira para o Norte de Minas**. Belo Horizonte: EPAMIG, 1994. 24p. (Boletim Técnico, 46).

SILVEIRA, V. et al. Effect of plant growth regulators on the cellular growth and levels of intracellular protein, starch and polyamines in embryogenic suspension cultures of *Pinus taeda*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 76, p. 53-60, 2004.

SIMMONDS, N. W.; SHEPHERD, K. The taxonomy and origins of the cultivated bananas. **Journal of the Linnean Society of London (Botany)**, v. 55, p. 302-312, 1955.

SMART, K. F. et al. Analytical platform for metabolome analysis of microbial cells using methyl chloroformate derivatization followed by gas chromatography-mass spectrometry. **Nature Protocols**, v. 5, p. 1709-1729, 2010.

SMITH, E. D.; WHITING, M. D.; RUDELL, D. R. Metabolic profiling of ethephon-treated sweet cherry (*Prunus avium* L.). **Metabolomics**, v. 7, p. 126–133, 2011.

SOARES, C. A. **Avaliação de cultivares de banana que se diferenciem do modelo (cv. Nanicão), no que se refere ao acúmulo ou degradação do amido**. Dissertação (Doutorado em Ciências dos Alimentos) - Instituto de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

SOARES, C. A. et al. Plantain and banana starches: granule structural characteristics explain the differences in their starch degradation patterns. **J. Agric. Food Chem.**, v. 59, p. 6672–6681, 2011.

SOPPA, J. Functional genomic and advanced genetic studies reveal novel insights into the metabolism, regulation, and biology of *Haloferax volcanii*. **Archaea**, v. 2011, 2011.

SOS MATA ATLÂNTICA. **A Mata Atlântica**. 2012 Disponível em: <http://www.sosma.org.br/nossa-causa/a-mata-atlantica/>. Acesso em: 05 de Janeiro de 2014.

STEINFATH, M. et al. Discovering plant metabolic biomarkers for phenotype prediction using an untargeted approach. **Plant biotechnology journal**, v. 8, p. 900-911, 2010.

STEPHANOPOULOS, G. Metabolic engineering. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 58, p. 119-120, 1998.

STOVER, R. H. A proposed international scale for estimating intensity of banana leaf spot. 1971. IN: GAUHL, F.; PASBERG-GAUHL, F.; VUYLSTEKE, D.; ORTIZ, R. Multilocal evaluation of black sigatoka resistance in banana and plantain. IITA, Ibadan, Nigeria. **IITA Res. Guide** 1993, pp. 47, 59.

SUBAGIO, A.; MORITA, N. Changes in carotenoids and their fatty acid esters in banana peel during ripening. **Food Sci. Technol. Int.**, v. 3, p. 264-268, 1997.

SWEETLOVE, L. J. et al. Not just a circle: flux modes in the plant TCA cycle. **Trends in plant science**, v. 15, p. 462-470, 2010.

TABARELLI, M. et al. Prospects for biodiversity conservation in the Atlantic Forest: Lessons from aging human-modified landscapes. **Biological Conservation**, v. 143, p. 2328–2340, 2010.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Plant physiology. **New York: Sinauer**, 2006.

TAMBOSI, L. R. **Estratégias espaciais baseadas em ecologia de paisagens para a otimização dos esforços de restauração**. 116p. Tese de Doutorado. Instituto de Biociências. Universidade de São Paulo. 2014.

TANABE, M.; KANEHISA, M. Using the KEGG Database Resource. **Current Protocols in Bioinformatics**, v. 38, p. 1-12, 2012.

TANG, A. Functional genomics: an introduction to EMBL-EBI resources. **EMBL-EBI: TRAIN ONLINE COURSES**. Disponível em: <http://www.ebi.ac.uk/training/online/course/functional-genomics-introduction-embl-ebi-resource/what-functional-genomics-1>. Acesso em: 23 dez. 2014.

TEIXEIRA, L. A. J., ZAMBROSI, F. C. B., NETO, J. E. B. Avaliação do estado nutricional de bananeiras do subgrupo Cavendish no estado de São Paulo: normas dris e níveis críticos de nutrientes. **Rev. Bras. Frutic.**, v.29, p. 613-620, 2007.

TEIXEIRA, A. M. G. et al. Modeling landscape dynamics in an Atlantic Rainforest region: Implications for conservation. **Forest Ecology and Management**, v. 257, p. 1219-1230, 2009.

TETLOW, I. J. Starch biosynthesis in developing seeds. **Seed Science Research**, v. 21, p. 532, 2011.

TILMAN, D. et al. Agricultural sustainability and intensive production practices. **Nature**, v. 418, p. 671-677, 2002.

TINZAARA, W. et al. Host plant odours enhance the responses of adult banana weevil to the synthetic aggregation pheromone Cosmolure. **International Journal of Pest Management**, v. 53, p.127-137, 2007.

TORRIGIANI, P. et al. Spermidine application to young developing peach fruits leads to a slowing down of ripening by impairing ripening-related ethylene and auxin metabolism and signaling. **Physiologia plantarum**, v. 146, p. 86-98, 2012.

TREVISAN, F.; CARVALHO, M. A. M. **Frutanos: Origem e papel ecológico em plantas superiores**. São Paulo: Instituto de Botânica – Ibt, 2011. pp. 1-11.

UENOJO, M.; MARÓSTICA JUNIOR, M. R.; PASTORE, G. M. Carotenóides: Propriedades, aplicações e biotransformação para formação de compostos de aroma. **Quim. Nova**, v. 30, p. 616-622, 2007.

UPCHURCH, R. G. Fatty acid unsaturation, mobilization, and regulation in the response of plants to stress. **Biotechnology Lett**, v. 30, p. 967–977, 2008.

URANO, K. et al. Arabidopsis stress-inducible gene for arginine decarboxylase AtADC2 is required for accumulation of putrescine in salt tolerance. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 313, n. 2, p. 369-375, 2004.

VAN DER ENT, S. et al. Priming of plant innate immunity by rhizobacteria and β -aminobutyric acid: differences and similarities in regulation. **New Phytologist**, v. 183, p. 419-431, 2009.

VAN DONGEN, J. T. et al. Regulation of respiration in plants: a role for alternative metabolic pathways. **Journal of plant physiology**, v. 168, p. 1434-1443, 2011.

VAN DONGEN, J. T.; SCHAUER, N. Metabolic marker as selection tool in plant breeding. **Information Systems for Biotechnology News Reports**, v. 11, p. 7-10, 2010.

VIJN, I.; SMEEKENS, S. Fructan: More than a reserve carbohydrate. **Plant Physiology**, v. 120, p. 351–359, 1999.

VILLAS-BÔAS, S. G.; GOMBERT, A. K. Análise do metaboloma: uma ferramenta biotecnológica emergente na era pós-genômica. **Biociência e Desenvolvimento**, v. 36, p. 58-69, 2006.

VILLAS-BÔAS, S. G.; KOULMAN, A.; LANE, G. A. Analytical methods from the perspective of method standardization. IN: NIELSEN, J.; JEWETT, M. C. **Metabolomics**, v. 18, p. 11-51, 2007.

VILLAS-BÔAS, S. G.; RASMUSSEN, S.; LANE, G. A. Metabolomics or metabolite profiles? **Trends in Biotechnology**, v. 23, p. 385-386, 2005.

WALTERS, D. R. Polyamines in plant–microbe interactions. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 57, n. 4, p. 137-146, 2000.

WANG, Z. et al. Activation of salicylic acid metabolism and signal transduction can enhance resistance to Fusarium wilt in banana (*Musa acuminata* L. AAA group, cv. Cavendish). **Functional e integrative genomics**, v. 15, p. 47-62, 2015.

WARD, J. L. et al. The metabolic transition during disease following infection of *Arabidopsis thaliana* by *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. **Plant J.**, v. 63, p. 443-457, 2010.

WEBER, H. Fatty acid-derived signals in plants. **TRENDS in Plant Science**, v.7, 2002.

WHEELER C. A.; CARDÉ, R. T. Following in their footprints: Cuticular hydrocarbons as overwintering aggregation site markers in *Hippodamia convergens*. **J. Chem. Ecol.**, v. 40, p. 418–428, 2014.

WIN, J. et al. Effector biology of plant-associated organisms: Concepts and perspectives. **Cold Spring Harb Symposia Quantitative Biology**, v. 77, p. 235-247, 2012.

WOESE, C. R. et al. Aminoacyl-trna synthetases, the genetic code and the evolutionary process. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 64, p. 202-236, 2000.

WOLFENDER, J. et al. Plant metabolomics: from holistic data to relevant biomarkers. **Current medicinal chemistry**, v. 20, p. 1056-1090, 2013.

WONG et al. Study of cis-cinnamic acid in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 43, p. 929-937, 2005.

WU, Q. et al. Unsaturated fatty acid: metabolism, synthesis and gene regulation. **African Journal of Biotechnology**, v. 8, p. 1782-1785, 2009.

YAMAGUCHI, K. et al. The polyamine spermine protects against high salt stress in *Arabidopsis thaliana*. **FEBS letters**, v. 580, n. 30, p. 6783-6788, 2006.

YAMAKAWA, H. et al. Spermine is a salicylate-independent endogenous inducer for both tobacco acidic pathogenesis-related proteins and resistance against tobacco mosaic virus infection. **Plant Physiology**, v. 118, n. 4, p. 1213-1222, 1998.

YANG, X. X. et al. UV-light activated cinnamic acid isomer regulates plant growth and gravitropism via an ethylene receptor-independent pathway. **Aust. J. Plant. Physiol.**, v. 26, p. 325-335, 1999.

XIA, J. et al. MetaboAnalyst 2.0—a comprehensive server for metabolomic data analysis. **Nucleic acids research**, v. 40, p. W127-W133, 2012.

ZAGORCHEV, L. et al. A central role for thiols in plant tolerance to abiotic stress. **International journal of molecular sciences**, v. 14, p. 7405-7432, 2013.

ZERNOVA, O. V. et al. Regulation of plant immunity through modulation of phytoalexin synthesis. **Molecules**, v. 19, p. 7480-7496, 2014.

ZHANG, H. et al. Physiology and quality response of harvested banana fruit to cold shock. **Postharvest Biology and Technology**, v. 55, p. 154–159, 2010.

ZHANG, Q. et al. The influence of low temperature on photosynthesis and antioxidant enzymes in sensitive banana and tolerant plantain (*Musa* sp.) cultivars. **Photosynthetica**, v. 49, p. 201-208, 2011.

ZHENG, M. S. et al. Identification of the cis-acting elements in *Arabidopsis thaliana* *NHL10* promoter responsible for leaf senescence, the hypersensitive response against *Cucumber mosaic virus* infection, and spermine treatment. *Plant science*, v. 168, n. 2, p. 415-422, 2005.

ZIPFEL, C. Plant pattern-recognition receptors. **Trends in immunology**, v. 35, p. 345-351, 2014.

APÊNDICE A – Tabela da abundância relativa das replicatas dos metabólitos identificados no *pool*1 dos frutos verdes cultivados nas parcelas experimentais Controle (C) e Biodiversidade (B).

Nº	Nome dos metabólitos	B1	B2	B3	B4	B5	C1	C2	C3	C4	C5
1	Ácido oxálico	0.233258	0.219281	0.25381	0.170658	0.197042	1.952664	1.611474	3.109144	3.281232	4.018586
2	Ácido malônico	0.052918	0.070619	0.061595	0.053874	0.075893	0.685861	0.664792	0.827431	0.808932	0.956958
3	Nicotinamida	0.014467	0.018891	0.018226	0.016955	0.018651	0.175564	0.1536	0.197774	0.200148	0.195035
4	Ácido succínico	0.111533	0.139846	0.108143	0.107912	0.131304	1.455738	1.579078	1.584302	1.744488	2.081927
5	Ácido fumárico	0.105255	0.109885	0.12021	0.08886	0.102374	2.935082	2.48243	2.444609	2.822159	3.291563
6	Ácido glutárico	0.001969	0.002144	0.002732	0.002195	0.00206	0.024769	0.025478	0.025899	0.02194	0.024639
7	Octanóico	0.013663	0.017504	0.015732	0.010847	0.015328	0.110989	0.123706	0.1544	0.166549	0.14215
8	Ácido benzóico	0.090587	0.08848	0.066381	0.062623	0.077095	0.640164	0.692463	0.601216	0.637648	0.971631
9	Ácido citracônico	0.172888	0.201626	0.185714	0.167959	0.220859	1.991639	1.817593	2.187315	1.907292	2.276156
10	Ácido oxalacético	0.006552	0.011006	0.006682	0.010139	0.012562	0	0	0	0	0
11	Ácido nicotínico	0.000596	0.000785	0.000988	0.000675	0.000803	0.071901	0.06617	0.089654	0.086101	0.085596
12	Ácido citrimálico	0.009785	0.012533	0.011158	0.010321	0.015331	0.113448	0.124438	0.148058	0.144503	0.171038
13	Alanina	0.097535	0.114654	0.104495	0.097716	0.117092	0.989016	1.015973	1.145877	1.122894	1.162338
14	Tridecano	0.017129	0.019753	0.019619	0.017628	0.019893	0.098591	0.080793	0.099861	0.10207	0.097029
15	Ácido dodecano	0.046272	0.050658	0.0545	0.046644	0.060832	0.098591	0.080793	0.099861	0.10207	0.097029
16	Ácido Málico	1.004247	1.09863	1.181867	1.10838	1.340188	11.55279	13.39033	14.67738	16.51193	15.64549
17	Glicina	0.358549	0.408916	0.405714	0.39977	0.45938	4.121311	4.569629	4.799154	4.929339	5.288335
18	Benzotiazol	0.006409	0.011351	0.009786	0.010231	0.009165	0.089549	0.090326	0.107096	0.118499	0.106383
19	Ácido 2-aminobutírico	0.023538	0.030228	0.027655	0.025607	0.030554	0.249385	0.284533	0.296743	0.312747	0.347885
20	Ácido adípico	0.012982	0.013718	0.01614	0.011859	0.014904	0.117008	0.106946	0.134415	0.143054	0.164496
21	Ácido undecanóico	0.022596	0.025172	0.017167	0.020904	0.020709	0.154867	0.191142	0.234012	0.183296	0.200997
22	Ácido caprílico	0.022596	0.025172	0.017167	0.020904	0.020709	0.154867	0.191142	0.234012	0.183296	0.200997
23	Ácido decanóico	0.022596	0.025172	0.017167	0.020904	0.020709	0.154867	0.191142	0.234012	0.183296	0.200997
24	Beta-alanina	0.061773	0.07014	0.065976	0.065519	0.074348	0.722336	0.657368	0.778013	0.726682	0.907068

Nº	Nome dos metabólitos	B1	B2	B3	B4	B5	C1	C2	C3	C4	C5
25	Norvalina	0.120353	0.140636	0.120571	0.12049	0.133379	1.313279	1.319775	1.519239	1.543923	1.68178
26	Valina	0.120353	0.140636	0.120571	0.12049	0.133379	1.313279	1.319775	1.519239	1.543923	1.68178
27	Ácido 2-isopropilmálico	0.037523	0.039504	0.034068	0.033702	0.04598	0.32354	0.331637	0.392871	0.386482	0.407159
28	Ácido 2-oxoglutárico	0.01928	0.028909	0.022122	0.020552	0.02115	0.280712	0.302475	0.317488	0.30872	0.486702
29	1-aminociclopropano-1-carboxílico	0.013452	0.011403	0.017905	0.011035	0.009891	0.153714	0.160742	0.128931	0.157858	0.185589
30	2-hidroxiglutamato	0	0	0	0	0	0.110297	0.132171	0.139138	0.125247	0.153247
31	Leucina	0.201566	0.221579	0.191448	0.207197	0.244329	1.685738	1.782497	2.086681	2.05766	2.079335
32	Norleucina	0.201566	0.221579	0.191448	0.207197	0.244329	1.685738	1.782497	2.086681	2.05766	2.079335
33	Isoleucina	0.410014	0.456788	0.412952	0.39024	0.489796	3.486885	3.652193	4.40592	4.456755	4.664221
34	Ácido pentadecano	0.045497	0.045727	0.04419	0.040395	0.040721	0.408017	0.382227	0.509084	0.454671	0.488934
35	Ácido trans-cinâmico	0.003447	0.003406	0.002283	0.00285	0.003226	0.043417	0.03428	0.035577	0.040595	0.056371
36	Ácido 2-Fosfoenolpirúvico	0.029259	0.0293	0.025202	0.02115	0.035034	0.171081	0.159843	0.309725	0.281409	0.315756
37	Ácido 4-Aminobutírico	0.083847	0.094372	0.080686	0.059382	0.080946	1.017213	0.989696	0.879493	1.118372	1.063732
38	Prolina	0.116788	0.143048	0.125295	0.120062	0.148136	1.150328	1.20063	1.450317	1.363256	1.478112
39	Ácido dodecanóico	0.091009	0.104367	0.100438	0.085491	0.109772	0.89082	0.864972	1.084355	0.99853	1.058254
40	Ácido 5-oxotetraidrofurano-2-carboxílico	0.02394	0.024975	0.022762	0.02553	0.030155	0	0	0	0	0
41	Ácido cis-aconítico	0.678096	0.697972	0.682667	0.602037	0.832182	6.660984	5.898943	7.654968	7.611984	7.976131
42	Treonina	0.355294	0.46501	0.390857	0.43329	0.555141	4.618033	6.112036	5.877378	5.193895	5.491807
43	Ácido cítrico pico secundário	0.165891	0.202653	0.230568	0.191837	0.225903	2.120656	2.185935	2.653362	2.808005	2.52807
44	Ácido quínico	0.180166	0.24767	0.356571	0.241127	0.24529	1.861475	1.909336	2.215909	4.055399	2.336513
45	Ácido aspártico	0.960099	1.101992	1.055543	0.933027	1.21617	10.27541	10.32351	12.15222	12.08547	12.12541
46	Ácido Cítrico	2.031685	2.394738	2.496457	2.153533	2.5719	21.4859	23.58857	27.70909	29.63573	25.64226
47	Ácido azeláico	0.528445	0.568244	0.576571	0.546993	0.615973	5.432787	5.67829	6.966173	7.014132	6.657863
48	Ácido piroglutâmico	0.449791	0.461465	0.514438	0.474663	0.604396	5.080656	5.795276	6.586047	6.392764	6.814771
49	Asparagina	1.138428	1.260296	1.272686	1.030562	1.383203	11.94623	11.46529	15.474	14.67586	15.06481

Nº	Nome dos metabólitos	B1	B2	B3	B4	B5	C1	C2	C3	C4	C5
50	Creatinina	0.025883	0.032118	0.034399	0.04346	0.030428	0.341675	0.309843	0.352471	0.275191	0.407924
51	Heptadecano	0.010284	0.010403	0.009911	0.009874	0.011618	0	0	0	0	0
52	Ácido salicílico	0.009296	0.013058	0.009976	0.008986	0.012004	0.099769	0.093898	0.102636	0.115461	0.079879
53	Ácido 3-Hidroxibenzóico	0.029087	0.046153	0.029211	0.031715	0.037342	0.420697	0.325337	0.400634	0.349845	0.387625
54	Serina	0.095218	0.116093	0.083333	0.110849	0.13383	1.055738	0.964679	1.184197	0.961843	1.252629
55	Ácido mirístico	0.136529	0.171455	0.148643	0.107357	0.150289	0.849385	0.95703	1.252907	1.464952	1.704084
56	Ácido glutâmico	0.279523	0.308423	0.28859	0.300493	0.310302	3.28	3.033701	3.590698	2.718372	3.537295
57	Metionina	0.025032	0.019551	0.028006	0.025055	0.029508	0.224923	0.12829	0.222252	0.201385	0.052916
58	Glutaciona	0	0	0	0	0	3.395082	2.696063	3.609408	2.887224	4.386403
59	Ácido pentadecanóico	0.264145	0.332724	0.278429	0.196599	0.260621	1.108607	1.714286	1.693975	2.399378	3.946197
60	Fenilalanina	0.232367	0.257628	0.222571	0.238268	0.289757	2.763279	2.732598	3.649894	3.122216	3.653118
61	Ácido tartárico	0.052783	0.055134	0.04194	0.037753	0.066179	0.269698	0.261727	0.458344	0.541478	0.519932
62	Ácido Isocítrico	0.142552	0.139887	0.127829	0.098176	0.183026	1.008852	0.964499	1.448414	1.442171	1.491025
63	Ácido Isocítrico pico secundário	0.142552	0.139887	0.127829	0.098176	0.183026	1.008852	0.964499	1.448414	1.442171	1.491025
64	Ácido palmitelaidico	0.082747	0.101754	0.089657	0.071788	0.080848	0.454918	0.704972	0.821353	0.907631	1.413157
65	Ácido Palmitoleico	0.082747	0.101754	0.089657	0.071788	0.080848	0.454918	0.704972	0.821353	0.907631	1.413157
66	Ácido Palmítico	0.866594	1.009026	0.936533	0.656063	0.868289	5.22623	7.046479	6.854968	9.560204	12.50105
67	Putrescina	0.037049	0.036383	0.02964	0.034279	0.043438	0.341957	0.309899	0.32905	0.305081	0.368611
68	Ácido 9-Heptadecenóico	0.021075	0.023998	0.023851	0.017104	0.021316	0	0	0	0	0
69	Ácido margárico	0.152147	0.179061	0.166524	0.094438	0.154386	0.664959	1.070641	0.924683	1.321651	2.336513
70	Ácido 4-Hidroxicinâmico	0.020346	0.02616	0.015551	0.019301	0.021831	0.387218	0.437795	0.568975	0.390581	0.547322
71	Ácido p-cumárico	0.020346	0.02616	0.015551	0.019301	0.021831	0.387218	0.437795	0.568975	0.390581	0.547322
72	Tricosano	0.021295	0.022774	0.024589	0.022362	0.026467	0	0	0	0	0
73	Ácido Oleico	0.067586	0.076064	0.089429	0.071936	0.114678	0.85377	1.003555	1.468499	1.266478	1.235314
74	Ácido cis-vacênico	0.183072	0.222638	0.208152	0.158495	0.194486	1.117049	1.545467	1.769767	1.98892	1.910296
75	Ácido 10,12-octadecadienóico	0.219299	0.26247	0.25181	0.206293	0.236911	1.421639	1.990551	2.321564	2.526625	3.609293

Nº	Nome dos metabólitos	B1	B2	B3	B4	B5	C1	C2	C3	C4	C5
76	Ácido linoleico Conjugado	0.219299	0.26247	0.25181	0.206293	0.236911	1.421639	1.990551	2.321564	2.526625	3.609293
77	Ácido Linoleico	0.219299	0.26247	0.25181	0.206293	0.236911	1.421639	1.990551	2.321564	2.526625	3.609293
78	Ácido Esteárico	0.129313	0.170729	0.138267	0.09535	0.118779	0.667049	0.688954	0.99408	1.506388	1.296552
79	Ácido araquidônico	0.128662	0.16353	0.13621	0.138465	0.13803	0.779672	1.190011	1.441438	1.158168	2.477281
80	Ácido alfa-linolênico	0.128662	0.16353	0.13621	0.138465	0.13803	0.779672	1.190011	1.441438	1.158168	2.477281
81	Ácido bishomo-gama linolênico	0.128662	0.16353	0.13621	0.138465	0.13803	0.779672	1.190011	1.441438	1.158168	2.477281
82	Ácido gama linolênico	0.128662	0.16353	0.13621	0.138465	0.13803	0.779672	1.190011	1.441438	1.158168	2.477281
83	Ácido Linolelaídico	0.128662	0.16353	0.13621	0.138465	0.13803	0.779672	1.190011	1.441438	1.158168	2.477281
84	Ornitina	0.085626	0.07553	0.075095	0.067963	0.082025	0.816598	0.672891	0.870243	0.715659	0.863781
85	Glutamina	0.099209	0.18589	0.078024	0.144224	0.21669	1.512295	2.145782	2.642442	2.200678	2.092443
86	Lisina	0.631468	0.731591	0.657371	0.657903	0.83438	6.897049	6.466232	8.575053	7.273714	7.835265
87	Ácido araquídico	0.057995	0.068884	0.063905	0.040164	0.050505	0.253253	0.402868	0.360036	1.272188	0.969675
88	Histidina	0.103984	0.122163	0.109962	0.108906	0.146958	1.097541	1.136918	1.434038	1.390616	1.312203
89	Tirosina	0.284685	0.35344	0.26081	0.340946	0.386504	2.327664	2.391001	3.332981	2.721877	2.945953
90	N-alfa-Acetil lisina	0.140211	0.172574	0.170405	0.131819	0.167337	0.930533	0.829921	1.401956	1.633691	1.515529
91	Ácido erúcico	0.013823	0.015594	0.015592	0.011794	0.01614	0	0	0	0	0
92	Ácido sinápico	0.00854	0.009501	0.006131	0.007517	0.008791	0.095005	0.078093	0.125132	0.09292	0.098251
93	Ácido behênico	0.013273	0.019179	0.013518	0.008993	0.012314	0.070466	0.126969	0.084798	0.194637	0.211849

APÊNDICE B - Autovetores da matriz de correlação dos dados dos frutos verdes (*pool1*) cultivados nas parcelas experimentais Biodiversidade e Controle.

Nº das variáveis	Nome dos metabólitos	Componente Principal 1	Componente Principal 2
1	Ácido oxálico	-0.101989058	-0.102650736
2	Ácido malônico	-0.105676309	-0.00250228
3	Nicotinamida	-0.104913858	0.062052627
4	Ácido succínico	-0.105308004	-0.014524295
5	Ácido fumárico	-0.103940096	0.033107778
6	Ácido glutárico	-0.102967373	0.102150187
7	Ácido octanóico	-0.104332668	0.045929736
8	Ácido benzóico	-0.103040965	-0.057544274
9	Ácido itacônico	-0.092839365	-0.06444535
10	Ácido citracônico	-0.104847711	0.053524544
11	Ácido oxaloacético	0.097477244	-0.09305591
12	Ácido nicotínico	-0.105119701	0.055506613
13	Ácido citramálico	-0.105688557	-0.013927131
14	Alanina	-0.105207724	0.054133715
15	Tridecano	-0.10397497	0.08884288
16	Dodecano	-0.10153059	0.08116828
17	Ácido málico	-0.105113337	0.023246979
18	Glicina	-0.105375365	0.029786115
19	Benzotiazol	-0.104829134	0.051456471
20	Ácido 2-aminobutírico	-0.105518779	0.004378821
21	Ácido adípico	-0.105444476	-0.016116824
22	Ácido undecanóico	-0.103935134	0.058742281
23	Ácido caprinóico	-0.103935134	0.058742281
24	Ácido decanóico	-0.103935134	0.058742281
25	beta-alanina	-0.105237017	0.018315493
26	Norvalina	-0.105614116	0.024282805
27	Valina	-0.105614116	0.024282805
28	Ácido 2-Isopropilmálico	-0.105527916	0.035071206
29	Ácido 2-oxoglutárico	-0.10376925	-0.079273091
30	Ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico	-0.103398219	0.017154554
31	DL-hidroxiglutamato	-0.105118905	0.022544989
32	Leucina	-0.105339721	0.045195305
33	Norleucina	-0.105339721	0.045195305
34	Isoleucina	-0.105630054	0.019399044
35	Pentadecano	-0.105172209	0.05119335
36	Ácido trans-cinâmico	-0.103162851	-0.026986831
37	Ácido 2-fosfoenolpirúvico	-0.102681309	-0.050325361
Nº das	Nome dos metabólitos	Componente	Componente

variáveis	Principal 1	Principal 2
38 Ácido 4-aminobutírico (GABA)	-0.103465858	0.063141864
39 Prolina	-0.105528442	0.033416914
40 Ácido dodecanóico	-0.10525335	0.052737755
41 Ácido 5-oxotetraidrofurano-2-carboxílico	0.10270333	-0.093983735
42 Ácido cis-aconítico	-0.105322544	0.039319874
43 Treonina	-0.103243207	0.073566366
44 Ácido cítrico - pico secundário	-0.104843072	0.056515901
45 Ácido quínico	-0.095803515	0.027615132
46 Ácido aspártico	-0.105245991	0.053605054
47 Ácido cítrico	-0.104499151	0.061397969
48 Ácido azeláico	-0.105111241	0.05109211
49 Ácido piroglutâmico	-0.105463399	0.027998147
50 Asparagina	-0.105318716	0.038838847
51 Creatinina	-0.103608509	0.031948976
52 Heptadecano	0.103319998	-0.094617005
53 Ácido salicílico	-0.100845279	0.152786808
54 Ácido 3-Hidroxibenzóico	-0.102856808	0.106052846
55 Serina	-0.104589697	0.042543652
56 Ácido mirístico	-0.10364012	-0.09741063
57 Ácido glutâmico	-0.103561359	0.075123354
58 Metionina	-0.080331162	0.348370549
59 Glutamina	-0.104090256	0.007588805
60 Ácido pentadecanóico	-0.094599138	-0.249932355
61 Fenilalanina	-0.105353944	0.027836618
62 Ácido tartárico	-0.101590723	-0.069706506
63 Ácido isocítrico	-0.104893207	-0.005252748
64 Ácido isocítrico - pico secundário	-0.104893207	-0.005252748
65 Ácido palmiteláidico	-0.099509569	-0.190777918
66 Ácido palmitoléico	-0.099509569	-0.190777918
67 Ácido palmítico	-0.101144198	-0.154814359
68 Putrescina	-0.104128028	0.060321323
69 Ácido 9-heptadecenóico	0.102251257	-0.095907162
70 Ácido margárico	-0.093833727	-0.253974262
71 Ácido 4-hidroxicinâmico	-0.104051089	0.026986063
72 Ácido cumárico	-0.104051089	0.026986063
73 Tricosano	0.103074269	-0.094402906
74 Ácido oléico	-0.104037269	0.036927815
75 Ácido cis-vacênico	-0.104334924	-0.021608388
76 Ácido trans-vacênico	-0.100224421	-0.179671277
77 Ácido 10,12-octadecadienóico	-0.102026745	-0.148086226
78 Ácido linoleico conjugado	-0.102026745	-0.148086226
79 Ácido linoleico	-0.102026745	-0.148086226
Nº das	Nome dos metabólitos	Componente
		Componente

variáveis	Principal 1	Principal 2
80 Ácido esteárico	-0.09964588	-0.081776521
81 Ácido araquidônico	-0.097037659	-0.203132905
82 Ácido alpha-linolênico	-0.097037659	-0.203132905
Ácido bishomo-gamma-		
83 linolênico	-0.097037659	-0.203132905
84 Ácido gamma-linolênico	-0.097037659	-0.203132905
85 Ácido linoleláidico	-0.097037659	-0.203132905
86 Ornitina	-0.104026601	0.073038763
87 Glutamina	-0.103048696	0.061465474
88 Lisina	-0.104733509	0.068991663
89 Ácido araquídico	-0.084710465	-0.184924356
90 Histidina	-0.104908646	0.060328281
91 Tirosina	-0.104617701	0.05105172
92 N-alpha-acetil lisina	-0.102692791	-0.035087175
93 Ácido erúcico	0.102395194	-0.096329382
94 Ácido sinápico	-0.102880259	0.099928764
95 Ácido behênico	-0.095071476	-0.186428188

APÊNDICE C – Tabela da área relativa das replicatas dos metabólitos identificados no *pool*2 dos frutos verdes cultivados nas parcelas experimentais Controle (C) e Biodiversidade (B).

Nº	Nome dos metabólitos	B1	B2	B3	B4	B5	C1	C2	C3	C4	C5
1	Ácido oxálico	0.163711	0.241147	0.24253	0.308469	0.204245	0.218502	0.240343	0.18337	0.2336	0.140465
2	Ácido malônico	0.062185	0.113406	0.077025	0.089694	0.078705	0.063492	0.077423	0.027499	0.076927	0.059742
3	Nicotinamida	0.018368	0.020464	0.017331	0.020791	0.018354	0.018535	0.022213	0.015319	0.018588	0.017513
4	Ácido succínico	0.10806	0.119871	0.129748	0.128435	0.122662	0.205775	0.266528	0.145662	0.216905	0.215119
5	Ácido fumárico	0.751587	0.808038	0.678353	0.79102	0.667914	2.062901	2.002267	1.358188	1.767017	1.543843
6	Ácido glutárico	0.002635	0.003074	0.002731	0.002564	0.003094	0.003096	0.003152	0.001815	0.002523	0.00271
7	Ácido octanóico	0.013076	0.015427	0.010886	0.017568	0.016673	0.010206	0.017614	0.011155	0.012213	0.015565
8	Ácido benzóico	0.073316	0.077045	0.064268	0.069966	0.07759	0.054685	0.099547	0.063737	0.0769	0.069329
9	Ácido itacônico	1.465677	1.790051	1.418592	1.380952	1.308777	0.288369	0.291155	0.113598	0.260951	0.181297
10	Ácido citracônico	1.465677	1.790051	1.418592	1.380952	1.308777	2.485266	2.385342	1.803129	2.06807	1.453074
11	Ácido oxaloacético	0.015021	0.03396	0.02073	0.02162	0.021434	0	0	0	0	0
12	Ácido nicotínico	0.001462	0.00087	0.000714	0.000923	0.000863	0.005079	0.007308	0.008277	0.007126	0.006745
13	Ácido citramálico	0.013503	0.014281	0.013181	0.016348	0.013952	0.014155	0.015407	0.011544	0.014209	0.011951
14	Alanina	1.147495	1.122541	1.033997	1.086803	1.044317	1.266339	1.400076	1.180618	1.196693	1.120447
15	Tridecano	0.016557	0.018892	0.0199	0.020128	0.018696	0.012919	0.011139	0.008728	0.00966	0.009666
16	Dodecano	0.067434	0.095243	0.073174	0.077789	0.077986	0.012919	0.011139	0.008728	0.00966	0.009666
17	Ácido málico	1.739147	1.491849	1.324197	1.396027	1.319597	1.540763	1.743559	1.775863	1.91866	1.623743
18	Glicina	0.315864	0.420918	0.382171	0.368061	0.365827	0.975066	1.302796	0.703893	1.163195	0.929273
19	Benzotiazol	0.012494	0.009881	0.011072	0.010429	0.010418	0.010067	0.011381	0.016887	0.010988	0.009795
20	Ácido 2-Aminobutírico	0.021033	0.021887	0.022842	0.023933	0.025261	0.0355	0.043767	0.030913	0.037232	0.037679
21	Ácido adípico	0.014021	0.012182	0.010989	0.014651	0.014335	0.015678	0.016658	0.016449	0.02298	0.014806
22	Ácido undecanóico	0.021244	0.030881	0.019343	0.020344	0.022172	0.01368	0.023653	0.016438	0.025274	0.025228
23	Ácido caprinóico	0.021244	0.030881	0.019343	0.020344	0.022172	0.01368	0.023653	0.016438	0.025274	0.025228

Nº	Nome dos metabólitos	B1	B2	B3	B4	B5	C1	C2	C3	C4	C5
24	Ácido decanóico	0.021244	0.030881	0.019343	0.020344	0.022172	0.01368	0.023653	0.016438	0.025274	0.025228
25	Beta-Alanina	0.057014	0.070308	0.063923	0.06344	0.061974	0.14226	0.15808	0.093938	0.137964	0.123844
27	Valina	1.149814	1.141091	1.126428	1.100408	1.123165	1.947866	2.245183	1.99228	1.935796	1.754866
28	Ácido 2-Isopropilmálico	0.031987	0.036955	0.034367	0.039609	0.037986	0.031578	0.040426	0.02483	0.031928	0.027727
29	Ácido 2-oxoglutárico	0.017898	0.019424	0.021223	0.017015	0.015238	0.045901	0.037427	0.038147	0.031471	0.035152
30	Ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico	0.004179	0.00653	0.006138	0.004775	0.00585	0.027992	0.024184	0.018333	0.026221	0.020714
31	DL-hidroxioglutamato	0	0	0	0	0	0.012452	0.020023	0.147136	0.016913	0.010542
32	Leucina	1.43692	1.317313	1.30332	1.325442	1.331511	1.708916	1.83793	1.542869	1.570754	1.404895
33	Norleucina	1.43692	1.317313	1.30332	1.325442	1.331511	1.708916	1.83793	1.542869	1.570754	1.404895
34	Isoleucina	0.259246	0.302452	0.290538	0.30415	0.311151	0.512656	0.546657	0.380534	0.476916	0.436115
35	Pentadecano	0.035291	0.044021	0.033495	0.036165	0.037338	0.043575	0.045933	0.03758	0.043228	0.038131
36	Ácido trans-Cinâmico	0.001656	0.003219	0.002341	0.002989	0.00232	0.003748	0.005224	0.00341	0.003754	0.002903
37	Ácido 2-fosfoenolpirúvico	0.018644	0.028093	0.026087	0.033329	0.02741	0.020359	0.034473	0.07564	0.041433	0.023246
38	Ácido 4-aminobutírico	0.416264	0.430965	0.408367	0.385816	0.510036	2.067813	1.680771	1.36408	1.477346	1.615726
39	Prolina	1.304731	1.3086	1.232669	1.270748	1.270791	2.864941	3.173404	2.83909	2.864935	2.891501
40	Ácido dodecanóico	0.89401	1.214.165.261	1.018.592.297	0.982585	0.744173	1.338119	1.28844	1.225112	1.25875	1.184236
41	Ácido 5-oxotetraidrofurano-2-carboxílico	0.01773	0.024909	0.023738	0.026008	0.02357	0	0	0	0	0
42	Ácido cis-Aconítico	0.581122	0.715458	0.575405	0.609959	0.60823	0.74847	0.732452	0.746526	0.814945	0.612835
43	Treonina	0.456321	0.4733	0.484296	0.449082	0.466799	0.79864	0.938799	0.897196	0.875242	0.819426
44	Ácido cítrico pico secundário	2.465139	3.035188	2.484356	2.697578	2.652317	1.303929	1.401776	1.196871	1.072579	0.859318
45	Ácido quínico	0.37324	0.353921	0.28994	0.380204	0.328669	0.284048	0.243908	0.327001	0.328001	0.362064
46	Ácido aspártico	1.211132	1.092299	0.966799	1.049469	0.993612	1.258935	1.293993	1.221292	1.192699	1.116824
47	Ácido cítrico	6.079035	3.683642	3.481116	3.566367	3.771626	2.475708	2.475708	2.66282	2.814344	2.525805
48	Ácido azeláico	0.075675	0.72344	0.594688	0.648435	0.651223	0.589724	0.649037	0.668224	0.69723	0.553286

Nº	Nome dos metabólitos	B1	B2	B3	B4	B5	C1	C2	C3	C4	C5
49	Ácido piroglutâmico	4.439239	4.84317	4.489774	4.378503	4.318849	6.901398	8.087646	8.295815	8.273137	6.506071
50	Asparagina	1.281262	1.345925	1.200106	1.257143	1.158216	1.289762	1.374235	1.23202	1.285806	1.11112
51	Creatinina	0.029555	0.038878	0.039812	0.029366	0.030405	0.034134	0.037501	0.031045	0.025855	0.048239
52	Heptadecano	0.010381	0.013965	0.011612	0.011709	0.01192	0	0	0	0	0
53	Ácido salicílico	0.010458	0.010013	0.008408	0.009396	0.010288	0.008482	0.012638	0.011009	0.009995	0.011804
54	Ácido 3-Hidroxibenzóico	0.028779	0.033538	0.03342	0.028878	0.030297	0.034951	0.040845	0.036134	0.035545	0.031548
55	Serina	0.09764	0.106099	0.11577	0.105	0.093309	0.159449	0.176426	0.136568	0.134958	0.14285
56	Ácido mirístico	0.13956	0.168353	0.191268	0.203095	0.166942	0.14396	0.171184	0.133621	0.14089	0.115075
57	Ácido glutâmico	2.473562	2.726813	2.926428	2.697959	2.566906	4.430676	4.305251	3.421373	3.278076	3.407208
58	Metionina	0.010135	0.01299	0.012649	0.009911	0.00969	0.015516	0.018851	0.021277	0.016467	0.008022
59	Glutamina	0	0	0	0	0	0.39762	0.423687	0.322942	0.345528	0.361173
60	Ácido pentadecanóico	0.262904	0.275857	0.361786	0.411939	0.305108	0.232126	0.286858	0.190072	0.167007	0.101585
61	Fenilalanina	2.011132	2.128724	2.118991	2.141769	2.168345	1.118058	1.217794	1.065217	0.928709	0.87512
62	Ácido tartárico	0.034368	0.050832	0.041314	0.057334	0.043916	0.034113	0.042356	0.043169	0.050203	0.039004
63	Ácido Isocítrico	0.903671	1.388983	1.028154	1.263401	1.267914	0.996411	1.205705	1.012903	1.310715	0.941607
65	Ácido palmitelaidico	1.372449	1.121135	1.32324	1.456327	1.152806	0.866264	1.169815	0.719021	0.800515	0.555791
66	Ácido palmitoleico	1.372449	1.121135	1.32324	1.456327	1.152806	0.866264	1.169815	0.719021	0.800515	0.555791
67	Ácido palmítico	1.254545	1.117931	1.18757	1.337252	1.050705	0.967737	1.060975	1.264852	0.796736	0.471613
68	Putrescina	0.020537	0.026389	0.025174	0.026054	0.020256	0.076195	0.074943	0.0552	0.065949	0.051865
69	Ácido 9-Heptadecenóico	0.022133	0.02703	0.025523	0.028061	0.023381	0	0	0	0	0
70	Ácido margárico	0.169921	0.162767	0.220385	0.257993	0.177518	0.137986	0.179283	0.135261	0.100548	0.060416
71	Ácido 4-Hidroxicinâmico	0.037292	0.041201	0.061056	0.061675	0.040216	0.044425	0.046503	0.031761	0.03078	0.039106
72	Ácido cumárico	0.037292	0.041201	0.061056	0.061675	0.040216	0.044425	0.046503	0.031761	0.03078	0.039106
73	Tricosano	0.028766	0.027645	0.026785	0.030136	0.023467	0	0	0	0	0
74	Ácido oleico	2.806586	2.080101	1.645684	1.835918	1.860432	1.14847	1.120703	1.259854	1.293322	1.046444
75	Ácido cis-vacênico	3.176716	2.371838	2.901195	3.299864	2.365468	2.210427	2.674537	3.112759	1.841744	1.203315

Nº	Nome dos metabólitos	B1	B2	B3	B4	B5	C1	C2	C3	C4	C5
76	Ácido trans-vacênico	3.176716	2.371838	2.901195	3.299864	2.365468	2.210427	2.674537	3.112759	1.841744	1.203315
77	Ácido 10,12-octadecadienóico	3.949907	3.01321	3.391235	3.809524	2.740144	3.4847	2.634303	2.048151	3.868585	2.160146
78	Ácido linoléico conjugado	3.949907	3.01321	3.391235	3.809524	2.740144	3.4847	2.634303	2.048151	3.868585	2.160146
79	Ácido linoléico	3.949907	3.01321	3.391235	3.809524	2.740144	3.4847	2.634303	2.048151	3.868585	2.160146
80	Ácido esteárico	1.824212	1.490725	1.507039	1.78068	1.362014	1.167548	1.293729	1.4423	1.167705	1.052997
81	Ácido araquidônico	2.089054	1.620011	2.311819	2.377687	1.328345	0.143181	0.143134	0.180465	0.149399	0.156051
82	Ácido alfa-linolênico	2.089054	1.620011	2.311819	2.377687	1.328345	0.143181	0.143134	0.180465	0.149399	0.156051
83	Ácido bis-homo-gama-linolênico	2.089054	1.620011	2.311819	2.377687	1.328345	1.41122	2.236116	2.522552	1.414645	1.006745
84	Ácido gama linolênico	2.089054	1.620011	2.311819	2.377687	1.328345	1.41122	2.236116	2.522552	1.414645	1.006745
85	Ácido linoleláidico	2.089054	1.620011	2.311819	2.377687	1.328345	1.41122	2.236116	2.522552	1.414645	1.006745
86	Ornitina	0.066136	0.048522	0.056532	0.04838	0.053813	0.110809	0.128872	0.092964	0.109486	0.098935
87	Glutamina	0.182652	0.208368	0.249037	0.191259	0.234892	0.181385	0.340952	0.368548	0.264682	0.200304
88	Lisina	0.531401	0.515795	0.511235	0.47717	0.497957	0.784284	0.792747	0.739212	0.75671	0.671266
89	Ácido araquídico	0.061478	0.057186	0.070717	0.140204	0.067999	0.058557	0.064719	0.086541	0.037541	0.030422
90	Histidina	1.191002	1.585441	1.45923	1.346395	1.273381	1.29864	1.501511	0.005259	1.451578	1.309308
91	Tirosina	0.150117	0.17826	0.184495	0.168673	0.182842	0.129038	0.160441	0.080478	0.138635	0.117219
92	N-alfa-acetil-lisina	0.151359	0.141477	0.148539	0.159762	0.158201	0.143181	0.143134	0.113765	0.149399	0.156051
93	Ácido erúcico	0.013175	0.016047	0.014127	0.015901	0.017158	0	0	0	0	0
94	Ácido sinápico	0.009117	0.009995	0.012566	0.012054	0.015764	0.007541	0.010321	0.006337	0.008515	0.00757
95	Ácido behênico	0.014508	0.012551	0.0166	0.025731	0.019303	0.013804	0.012328	0.01599	0.00722	0.006329

APÊNDICE D - Autovetores da matriz de correlação dos dados dos frutos verdes (*pool 2*) cultivados nas parcelas Biodiversidade e Controle.

Nº das variáveis	Nome dos metabólitos	Componente Principal 1	Componente Principal 2
1	Ácido palmítico	0.111988	-0.318920
2	Ácido adípico	-0.123671	0.015248
3	Alanina	-0.149394	-0.241229
4	Ácido 3-Hidroxibenzóico	-0.140158	-0.183996
5	Ácido trans-cinâmico	-0.144439	-0.246644
6	Ácido sinápico	0.123448	-0.187374
7	Ácido cis-aconítico	-0.137554	-0.092059
8	Ácido margárico	0.125443	-0.292974
9	Tirosina	0.117606	-0.248492
10	Ácido palmiteláidico	0.123843	-0.327032
11	Ácido palmitoléico	0.123843	-0.327032
12	Ácido pentadecanóico	0.128427	-0.305365
13	Glutamina	-0.160794	-0.146407
14	Ácido dodecanóico	-0.152771	-0.042835
15	Ácido succínico	-0.169554	-0.111412
16	Ácido málico	-0.157530	-0.059421
17	Ácido esteárico	0.146730	-0.235221
18	Ácido cis-vacênico	0.155141	-0.191091
19	Ácido fumárico	-0.178043	-0.060532
20	Norvalina	-0.178639	-0.100566
21	Valina	-0.178639	-0.100566
22	Glicina	-0.179316	-0.078884
23	Beta-alanina	-0.180029	-0.082845
24	Ácido aspártico	-0.167978	-0.152064
25	Isoleucina	-0.177754	-0.108219
26	Serina	-0.171907	-0.114712
27	Ácido oxaloacético	0.165479	-0.080264
28	Treonina	-0.164407	0.060543
29	Ácido 2-aminobutírico	-0.176546	-0.063725
30	Prolina	-0.182363	-0.025596
31	Putrescina	-0.181347	-0.073565
32	Ácido oléico	0.166492	-0.007403
33	Lisina	-0.183468	-0.050427
34	Ácido 2-oxoglutárico	-0.172570	0.014940
35	Ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico	-0.182959	-0.010765
36	Ácido piroglutâmico	-0.171017	-0.011165
37	Ornitina	-0.180352	-0.028436
38	Ácido 4-aminobutírico (GABA)	-0.180343	0.025529
39	Ácido nicotínico	-0.173142	0.077967

APÊNDICE E – Tabela da área relativa das replicatas dos metabólitos identificados no *pool*1 dos frutos maduros cultivados nas parcelas experimentais Controle (C) e Biodiversidade (B).

Nº	Nome dos metabólitos	B1	B2	B3	B4	C1	C2	C3	C4
1	Ácido cabâmico	0.049448	0.14056	0.076806	0.090179	0.037151	0.049226	0.048026	0.137975
2	2-3-Butanodiol	0.101673	0.184233	0.069625	0.113138	0	0	0	0
3	Ácido malônico	0.044634	0.0739	0.056181	0.076255	0	0	0	0
4	Nicotinamida	0.016225	0.048608	0.017358	0.077444	0.029941	0.025667	0.022788	0.079194
5	Ácido 2-oxovalérico	0	0	0	0	0.017443	0.01444	0.015734	0.050735
6	Ácido fumárico	0.458788	0.586687	0.697114	0.643911	0.366983	0.401271	0.398974	0.375291
7	Ácido succínico	0.16018	0.300771	0.264204	0.315932	0.531383	0.455852	0.647307	0.765543
8	Ácido láctico	0.494848	1.455284	0.82033	1.136971	0.916138	0.5557	0.838695	0.744624
9	Dodecano	0.012295	0.035587	0.015044	0.044227	0	0	0	0
10	Ácido benzóico	0.025395	0.066472	0.030337	0.0384	0.030834	0.029536	0.035636	0.079061
11	Ácido citracônico	0.066619	0.117102	0.075445	0.299171	0.561599	0.129577	0.220594	0.072478
12	Ácido itacônico	0.066619	0.117102	0.075445	0.299171	0.561599	0.129577	0.220594	0.072478
13	Ácido 2-hidroxibutírico	0.013999	0.03333	0.020251	0.02835	0	0	0	0
14	Alanina	1.337879	1.740128	2.052641	1.766914	3.826947	3.706508	3.173324	3.204468
15	Ácido málico	1.754343	2.179767	1.773389	1.721938	2.252877	2.004809	2.029608	1.112414
16	Glicina	1.021086	1.101918	1.845707	1.739677	1.701277	1.254664	1.123488	0.661613
17	Ácido 2-aminobutírico	0.046181	0.055848	0.06427	0.051113	0.064603	0.057448	0.054576	0.059844
18	Ácido adípico	0.012737	0.038407	0.008917	0.011753	0.01643	0.016858	0.020108	0.039763
19	Ácido caprinóico	0.017408	0.051758	0.027886	0.025338	0	0	0	0
20	Ácido decanóico	0.017408	0.051758	0.027886	0.025338	0	0	0	0
21	Norvalina	1.719596	2.007371	2.044073	1.721938	1.679659	1.417825	1.449176	1.482652
22	Valina	1.719596	2.007371	2.044073	1.721938	1.679659	1.417825	1.449176	1.482652
23	Ácido 2-isopropilmálico	0.151199	0.237589	0.22917	0.258752	0.120416	0.09353	0.136772	0.108518

Nº	Nome dos metabólitos	B1	B2	B3	B4	C1	C2	C3	C4
24	Isoleucina	1.768687	2.659646	1.855146	1.711043	1.785606	1.94915	2.049652	2.559213
25	Leucina	1.995152	3.013765	2.069051	1.918045	1.996209	2.132154	2.340931	2.881043
26	Ácido 4-aminobutírico	1.855051	2.727341	2.405518	1.89402	3.323719	3.597071	3.23635	2.753907
27	Prolina	4.929293	6.345243	6.369214	5.72117	6.281555	5.195523	5.335288	6.203072
28	Ácido dodecanóico	1.952652	0.454541	1.770194	1.745962	2.273314	2.181152	2.332539	0.353481
29	Ácido cis-aconítico	2.191919	4.305378	3.651479	4.162375	4.395001	2.361199	4.384023	1.933107
30	Treonina	0.43346	0.53507	0.931385	0.8701	1.092707	0.625674	0.547636	0.338387
31	Leucina	0.43346	0.53507	0.931385	0.8701	1.092707	0.625674	0.547636	0.338387
32	Ácido 2-oxoglutárico	0.04012	0.07578	0.068411	0.075218	0.022353	0.02033	0.021368	0.041226
33	Ácido aspártico	2.565657	5.467845	2.968234	3.128066	5.042165	3.894431	5.181385	3.827914
34	Ácido cítrico pico secundário	1.283737	2.04528	1.408023	1.53086	2.234418	1.328396	2.325687	1.171993
35	Ácido quínico	0.529672	1.17375	0.500091	0.500044	0.561187	0.581042	0.670942	1.445841
36	Ácido cítrico	2.411313	3.803234	2.655146	2.863937	4.151518	2.415144	4.247123	2.16908
37	Pentadecano	0.054056	1.004137	1.009711	1.586731	0	0	0	0
38	Heptadecano	0.047838	1.004137	0.250045	1.49175	0.088947	0.049969	0.037582	0.102467
39	Ácido piroglutâmico	0.116335	0.222922	0.116639	0.554605	1.165087	0.410115	0.276429	0.198218
40	DL-hidroxiglutaramato	0.110559	0.701956	0.110354	0.136938	0.09178	0.126624	0.163567	0.325886
41	Asparagina	0.817551	1.199323	1.931385	2.206198	3.369867	1.144673	1.471418	0.564
42	Creatinina	0.378914	0.556553	0.531585	0.722043	0.608021	0.271953	0.488091	0.487
43	Ácido 3-hidroxibenzóico	0.013621	0.023505	0.020206	0.022392	0	0	0	0
44	Serina	0.084154	0.197302	0.16709	0.189786	0.175182	0.101026	0.13755	0.101735
45	Ácido mirístico	0.181455	0.521108	0.217553	0.124618	0.136142	0.200618	0.119572	0.27575
46	Ácido glutâmico	0.494192	1.031591	0.740062	0.878132	1.61997	0.974161	1.532429	1.001263
47	Metionina	0.021196	0.141642	0.029815	0.012364	0.022576	0.017255	0.009917	0.022209
48	Ácido pentadecanóico	0.091414	1.231666	0.119407	0.1189	0.137618	0.170616	0.066393	0.143627
49	Fenilalanina	0.693813	0.873261	1.06081	0.910258	1.416976	1.207406	1.059179	0.967019
50	Ácido 2-aminoadípico	0.019918	0.166322	0.03264	0.031613	0.045169	0.038362	0.032223	0.038699

Nº	Nome dos metabólitos	B1	B2	B3	B4	C1	C2	C3	C4
51	Ácido isocítrico	0.069807	0.425395	0.13723	0.216063	0.181568	0.072112	0.118061	0.06789
52	Isocitríco pico secundário	0.069807	0.425395	0.13723	0.216063	0.181568	0.072112	0.118061	0.06789
53	Ácido palmitelaídico	0.459217	1.081234	0.650209	0.723876	0.793435	0.783612	0.445768	0.704369
54	Ácido palmitoleico	0.459217	1.081234	0.650209	0.723876	0.793435	0.783612	0.445768	0.704369
55	Ácido 10-13-dimetiltetradecanóico	1.051616	2.78601	1.014195	0.980882	1.333223	1.555893	0.684207	1.486907
56	Ácido palmítico	1.051616	2.78601	1.014195	0.980882	1.333223	1.555893	0.684207	1.486907
57	Putrescina	0.260354	0.421446	0.620349	0.535749	0.39088	0.391322	0.317195	0.559213
58	Ácido margárico	0.068103	0.212533	0.085474	0.08529	0.102699	0.119248	0.054736	0.09861
59	Ácido oleico	0.888384	2.470854	0.977038	0.842514	1.362038	1.245544	0.78985	1.492652
60	Ácido cis-vacênico	1.106313	3.121098	1.212561	1.171104	1.602527	1.60094	0.856907	1.705433
61	Ácido trans-vacênico	1.106313	3.121098	1.212561	1.171104	1.602527	1.60094	0.856907	1.705433
62	Ácido 10-12-octadecadienóico	1.301263	3.808951	1.439553	1.303623	1.961406	2.311455	1.049285	1.932043
63	Ácido linoléico	1.301263	3.808951	1.439553	1.303623	1.961406	2.311455	1.049285	1.932043
64	Ácido linoléico conjugado	1.301263	3.808951	1.439553	1.303623	1.961406	2.311455	1.049285	1.932043
65	Ácido esteárico	0.703788	1.725837	0.844164	0.625753	0.661997	0.874672	0.499634	1.34743
66	Ácido linolelaídico	1.494823	3.408048	1.805772	1.878656	2.018404	2.374465	0.958226	1.71288
67	Ácido alfa-linolênico	1.494823	3.408048	1.805772	1.878656	2.018404	2.374465	0.958226	1.71288
68	Ácido gama linolênico	1.494823	3.408048	1.805772	1.878656	2.018404	2.374465	0.958226	1.71288
69	Ornitina	0.021149	0.032155	0.056306	0.051157	0.049152	0.033871	0.032315	0.026664
70	Lisina	1.320202	1.515231	3.59194	3.484941	0.071127	0.037084	0.033002	0.096349
71	Tricosano	0.04154	0.720807	0.041614	0.031547	3.274276	2.284925	1.693294	1.092094
72	Ácido araquídico	0.135732	0.086029	0.132839	0.027313	0.049203	0.106398	0.020223	0.10659
73	Histidina	0.038305	0.043014	0.255582	0.521257	0.296663	0.054529	0.071134	0.025135
74	Ácido desidroabiético	0.017282	0.042215	0.011946	0.010334	0.015623	0.017894	0.01839	0.062504
75	Tirosina	0.107181	0.158189	0.340715	0.34797	0.218909	0.127142	0.114305	0.093158
76	N-alfa-acetil-lisina	0.177068	0.357888	0.116639	0.05634	0.155198	0.191119	0.189767	0.495512

Nº	Nome dos metabólitos	B1	B2	B3	B4	C1	C2	C3	C4
77	Ácido erúcico	0.028488	0.117243	0.026411	0.010127	0	0	0	0
78	Ácido sinápico	0.003015	0.008838	0.010063	0.007584	0	0	0	0
79	Ácido behênico	0.058302	0.027736	0.066244	0.008424	0	0	0	0
80	Nonacosano	0	0	0	0	0.015486	0.010329	0.007901	0.018086

APÊNDICE F – Autovetores da matriz de correlação dos dados de frutos maduros (*pool1*) cultivados nas parcelas Biodiversidade e Controle.

Nº das variáveis	Nome dos metabólitos	Componente Principal 1	Componente Principal 2
1	Dodecano	-0.219472	0.012982
2	Lisina	-0.215487	0.139479
3	Ácido capróico	-0.229278	-0.239601
4	Ácido decanóico	-0.229278	-0.239601
5	Ácido fumárico	-0.227289	-0.038603
6	Tricosano	0.196305	-0.452307
7	Ácido sinápico	-0.236775	-0.142237
8	Norvalina	-0.211299	-0.321941
9	Valina	-0.211299	-0.321941
10	2,3-Butanediol	-0.226008	-0.064908
11	Ácido 2-isopropilmálico	-0.233396	-0.063595
12	Ácido 2-oxoglutárico	-0.230816	-0.051028
13	Nonacosano	0.218151	-0.154483
14	Ácido 2-Hidroxibutírico	-0.240858	-0.078696
15	Ácido 4-Aminobutírico (GABA)	0.183063	-0.529069
16	Ácido succínico	0.193343	-0.104962
18	Ácido malônico	-0.246136	-0.003724
19	Ácido 3-Hidroxibenzóico	-0.246136	-0.003724
20	Alanina	0.220481	-0.314404

APÊNDICE G – Tabela da área relativa das replicatas dos metabólitos identificados no *pool*2 dos frutos maduros cultivados nas parcelas experimentais Controle (C) e Biodiversidade (B).

Nome dos metabólitos	C1	C2	C3	C4	C5	B1	B2	B3	B4	B5
1 Ácido oxálico	0.109093	0.135906	0.338048	0.131522	0.148305	0.132428	0.069758	0.299908	0.158068	0.084009
2 Ácido 2-oxovalérico	0.010566	0.011485	0.02671	0.010845	0.013219	0.044667	0.035814	0.093464	0.052736	0.041159
3 Ácido malônico	0.071422	0.083998	0.215675	0.071709	0.107061	0.095012	0.098765	0.110072	0.103146	0.153621
4 Ácido 3-metil-2-oxopentanoico	0.07631	0.081634	0.169429	0.050817	0.080954	0.073822	0.048386	0.12516	0.073072	0.050076
5 Ácido 4-metil-2-oxopentanoico	0.110341	0.115822	0.236611	0.06407	0.116932	0.466469	0.163337	0.176819	0.236034	0.313907
6 Ácido 4-metil-2-oxopentanoico	0.110341	0.115822	0.236611	0.06407	0.116932	0	0	0	0	0
7 Ácido fumárico	0.316109	0.509176	1.330722	0.461551	0.421739	1.426645	0.986196	0.322814	0.839865	1.009932
8 Ácido succínico	0.390376	0.469346	1.204395	0.570978	0.515813	0.233948	0.309754	0.168256	0.335827	0.262487
9 Ácido láctico	0.042916	0.037339	0.124339	0.068303	0.059011	1.264322	1.0639	0.128022	0.728189	0.932782
10 Ácido glutárico	0.002172	0.002779	0.006147	0.00275	0.002915	0	0	0	0	0
11 Ácido octanoico	0.019929	0.020128	0.057003	0.024504	0.023175	0.141219	0.113969	0.424686	0.171844	0.123156
12 Ácido benzóico	0.13272	0.120681	0.280583	0.158056	0.160305	0.07381	0.06634	0.038062	0.078441	0.054501
13 Ácido itacônico	0.97185	1.345658	3.669999	1.360593	1.233338	0.279421	0.12619	1.384748	0.208246	0.377354
14 Ácido citracônico	0.984374	1.369652	3.723643	1.374055	1.247896	0.160738	0.073269	0.577362	0.125877	0.188384
15 Ácido 2-hidroxibutírico	0	0	0	0	0	0.034154	0.025161	0.007045	0.026436	0.025611
16 Ácido citramálico	0.011293	0.011195	0.025973	0.012436	0.01498	0.042372	0.030073	0.017105	0.034928	0.030432
17 Ácido nicotínico	0.005955	0.006816	0.015613	0.006854	0.006626	0	0	0	0	0
18 Alanina	0.932588	1.144138	3.184586	1.409955	1.323679	1.099045	0.978792	0.893471	1.059876	1.125321
19 Ácido glioxílico	0	0	0	0	0	0.309368	0.550731	0.102978	0.421062	0.467356
20 Ácido málico	1.594952	2.173349	5.381395	2.117617	2.437231	2.60515	2.471477	3.263895	3.058305	3.742448

Nº	Nome dos metabólitos	C1	C2	C3	C4	C5	B1	B2	B3	B4	B5
21	Glicina	0.527207	0.673132	1.798098	0.783295	0.786252	0.905242	0.94592	1.032891	1.046258	1.209678
22	Ácido adípico	0.017251	0.015879	0.041963	0.035356	0.021051	0.030573	0.016636	0.017974	0.029802	0.028351
23	Ácido decanóico	0.02747	0.029922	0.063396	0.041466	0.034411	0.076621	0.048113	0.412535	0.057324	0.051735
24	Ácido undecanóico	0.027099	0.029626	0.062427	0.040982	0.034278	0.043649	0.02395	0.015268	0.0306	0.028087
25	Beta-Alanina	0.140744	0.181173	0.481361	0.231255	0.203611	1.009737	0.871265	0.842054	1.02611	0.966285
26	Ácido glicérico	0.162409	0.110555	0.548892	0.218925	0.173642	0	0	0	0	0
27	Norvalina	1.156139	1.530334	3.964766	2.150065	1.764651	0	0	0	0	0
28	Valina	0.115614	0.153033	0.396477	0.215007	0.176465	1.67577	1.397112	1.197105	1.508838	1.463114
29	Norvalina	0	0	0	0	0	0.543747	0.487584	0.226524	0.559209	0.360255
30	Ácido 2-Isopropilmálico	0.011685	0.013792	0.035502	0.016466	0.015386	0.17793	0.183219	0.214995	0.251347	0.209367
31	Ácido 2-oxoglutarico	0.035562	0.025971	0.099452	0.041739	0.036404	0	0	0	0	0
32	Ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico	0.003983	0.006824	0.014138	0.004682	0.005446	0.016365	0.01823	0.006075	0.01804	0.018394
33	Ácido pimélico	0.007807	0.008978	0.020186	0.010361	0.009263	0.037141	0.022982	0.015109	0.030419	0.024127
34	Pentadecano	0.060308	0.06982	0.144736	0.048907	0.064994	0.451797	0.260545	0.106158	0.359683	0.374269
35	Isoleucina	0.29882	0.372722	0.963766	0.475885	0.464041	2.174815	1.778877	1.569023	2.194251	2.00517
36	Leucina	0.133304	0.16938	0.40479	0.241754	0.208235	2.171136	1.728389	1.408563	2.207061	1.961407
37	Ácido 5-Oxotetra-hidrofuran-2-carboxílico	0.081635	0.09139	0.249437	0.107488	0.093943	0.390013	0.265967	0.65056	0.367413	0.422389
38	Ácido trans-Cinâmico	0.002086	0.002313	0.004869	0.001753	0.002176	0.008481	0.006065	0.005376	0.008459	0.004711
39	Ácido 2-Fosfoenolpirúvico	0.010911	0.011141	0.027192	0.012441	0.012417	0	0	0	0	0
40	Ácido 4-Aminobutírico	0.748729	0.846842	2.617592	1.106794	0.938796	1.818508	1.859166	2.245089	2.897796	2.132063
41	Prolina	1.378601	1.682473	4.609347	2.0877	2.068875	2.391584	2.456177	2.170742	2.58577	2.709606
42	Ácido dodecanóico	1.232673	1.393488	3.9493	1.565606	1.426224	1.378378	1.577976	2.13903	1.544521	1.874458
43	Ácido cis-aconítico	2.759539	3.071852	8.970483	3.766681	3.520319	1.732893	2.648199	1.373364	2.209699	2.935816

Nº	Nome dos metabólitos	C1	C2	C3	C4	C5	B1	B2	B3	B4	B5
44	Treonina	0.501655	0.713048	1.957077	0.818521	0.785986	0.550978	0.77193	0.722784	0.687546	0.759754
45	Ácido aspártico	0.826584	0.962245	2.661808	0.693963	1.103678	0.160143	0.242696	0.225295	0.205357	0.279644
46	Ácido quínico	0.131529	0.122164	0.273397	0.171502	0.170271	0.674118	0.279459	0.264298	0.515364	0.360356
47	Ácido cítrico pico secundário	2.804358	3.305366	8.112016	2.454733	3.537327	0.017309	0.017411	0.071501	0.021864	0.030635
48	Ácido cítrico	4.651308	5.500191	13.48095	5.077497	5.911093	2.063208	2.839066	3.677393	3.156423	3.863129
49	Heptadecano	2.712375	3.325335	8.422166	3.251398	3.443939	0.259087	0.453284	1.781723	0.284606	0.612959
50	Ácido azeláico	0.545245	0.657719	1.685881	0.702033	0.704462	0.032255	0.030761	0.294	0.036175	0.030455
51	Ácido piroglutâmico	0.999966	1.478625	4.273874	1.821877	1.592533	0.203993	0.164767	0.338086	0.249954	0.351433
52	Asparagina	0.522377	0.625674	1.753772	0.713097	0.692069	0.0611	0.137056	0.311157	0.081582	0.142952
53	Creatinina	0.038211	0.04328	0.083708	0.05	0.040648	0.392768	0.477015	0.077622	0.50417	0.451721
54	Ácido salicílico	0.012436	0.01108	0.024898	0.012336	0.01409	0	0	0	0	0
55	Ácido 3-hidroxibenzoico	0.016823	0.018184	0.038525	0.02185	0.021989	0.028289	0.024997	0.022863	0.034141	0.025214
56	Serina	0.179707	0.171776	0.465805	0.249996	0.206079	0.090992	0.159975	0.184873	0.149728	0.143246
57	Ácido mirístico	0.093478	0.088691	0.186376	0.198593	0.11532	0.142388	0.101296	0.573254	0.267679	0.174893
58	Ácido glutâmico	1.237976	1.418331	4.559829	1.740749	1.546171	0.25125	0.47138	0.584516	0.500184	0.532238
59	Glutationa	0.12593	0.113133	0.30901	0.154077	0.126068	0.034781	0.04887	0.0454	0.052073	0.044978
60	Metionina	0	0	0	0	0	0.032395	0.023431	0.004348	0.028328	0.04396
61	Ácido 4-hidroxifenilacético	0.002813	0.00295	0.006238	0.00323	0.003181	0	0	0	0	0
62	Ácido N-acetilglutâmico	0.010364	0.014772	0.037213	0.017435	0.016461	0	0	0	0	0
63	Ácido pentadecanoico	0.063718	0.046837	0.105576	0.094359	0.066494	0.103345	0.088714	0.094336	0.222893	0.206724
64	cis-4-hidroxi prolina	0.031917	0.043294	0.123583	0.048419	0.047588	0.047507	0.068154	0.052904	0.07315	0.071815
65	Fenilalanina	0.340937	0.403998	1.019548	0.47818	0.541775	0.574235	0.547126	0.60832	0.681651	0.643306
66	Ácido 2-Aminoadípico	0	0	0	0	0	0.033502	0.029312	0.030934	0.032411	0.034491
67	Cisteína	0	0	0	0	0	0.007564	0.005313	0.009506	0.007282	0.008646

Nº	Nome dos metabólitos	C1	C2	C3	C4	C5	B1	B2	B3	B4	B5
68	Ácido tartárico	0.062399	0.062726	0.17754	0.084326	0.08124	0.138012	0.145878	0.103641	0.151118	0.140036
69	Ácido isocítrico	0.401062	0.475365	1.421962	0.590837	0.569918	0.08605	0.123677	0.207473	0.117798	0.142759
70	Isocítrico pico secundário	0.401062	0.474392	1.421962	0.589649	0.568661	0.08605	0.123677	0.207473	0.117798	0.142759
71	Ácido vanílico	0.014809	0.014189	0.034008	0.015889	0.018097	0	0	0	0	0
72	Ácido palmitoléico	0.189784	0.187455	0.507795	0.226581	0.205815	0.509885	0.505273	0.479402	0.76933	0.669752
73	Ácido palmítico	0.1283	0.098309	0.207991	0.135791	0.136513	0.681029	0.342249	0.484035	1.387849	0.856531
74	Putrescina	0.132244	0.154104	0.504085	0.255954	0.202606	0.250329	0.557242	0.902968	0.961012	0.523804
75	Ácido margárico	0.047553	0.039459	0.10431	0.073783	0.056505	0.074325	0.05673	0.078896	0.152423	0.097834
76	Ácido 4-hidroxicinâmico	0.017505	0.018503	0.05392	0.023726	0.022366	0.013208	0.014923	0.02106	0.01799	0.014339
77	Ácido oleico	0.215481	0.13321	0.312069	0.13822	0.208559	1.282359	0.732122	0.816923	2.741366	1.441014
78	Ácido cis-vacênico	0.313573	0.176831	0.410187	0.18166	0.275597	1.073524	0.689198	1.009731	2.357895	1.300261
79	Ácido linoléico	0.331217	0.174763	0.382804	0.151631	0.278642	1.147438	0.621658	1.067498	2.629982	1.27514
80	Ácido esteárico	0.617356	0.66355	1.199506	0.951724	0.84022	0	0	0	0	0
81	Ácido alfa-linolênico	0.229934	0.162673	0.300103	0.140301	0.196268	0.588756	0.492626	0.679151	2.9973	1.592751
82	Ácido gama linolênico	0.229934	0.162673	0.300103	0.140301	0.196268	1.109669	0.702786	1.313802	2.630469	1.363189
83	Ácido araquidônico	0.229287	0.162155	0.299384	0.139631	0.195678	0	0	0	0	0
84	Ornitina	0.0613	0.069053	0.206414	0.088672	0.08351	0.032803	0.056272	0.1501	0.084059	0.068834
85	Glutamina	0.038341	0.042358	0.17722	0.084436	0.070121	0.018093	0.008993	0.041238	0.020304	0.013382
86	Tricosano	0.043263	0.04039	0.09014	0.048251	0.049738	0.083356	0.411681	0.059664	0.138009	0.401438
87	Lisina	0.279235	0.35633	0.943414	0.426009	0.412859	0.136113	0.20472	0.469397	0.303724	0.265175
88	Ácido ferúlico	0	0	0	0	0	0.022259	0.045559	0.055161	0.055343	0.03384
89	Ácido araquídico	0.017709	0.014317	0.028484	0.023999	0.020898	0.043303	0.022316	0.336085	0.202692	0.049621
90	Histidina	0.181651	0.213502	0.56498	0.535508	0.31412	0.029075	0.118704	1.203049	0.323695	0.184568
91	Tirosina	0.200442	0.214248	0.506831	0.299626	0.329696	0.167735	0.351489	1.184887	0.601261	0.428166
92	N-alfa-acetil-lisina	0.156447	0.132427	0.298556	0.191664	0.207122	0.256533	0.057075	0.190513	0.552179	0.212159

Nº	Nome dos metabólitos	C1	C2	C3	C4	C5	B1	B2	B3	B4	B5
93	Ácido erúcico	0.032188	0.031237	0.068539	0.033597	0.037242	0.071794	0.084285	0.105831	0.102474	0.114183
94	Ácido sinápico	0.006768	0.00675	0.013023	0.006947	0.008073	0.004525	0.008793	0.014249	0.01305	0.007295
95	Ácido behênico	0.007257	0.006268	0.013642	0.009994	0.008552	0.025684	0.008799	0.26956	0.112164	0.024575
96	Nonacosano	0.018183	0.017412	0.03831	0.017908	0.020244	0.050606	0.199583	0.032717	0.055773	0.244526

APÊNDICE H – Autovetores da matriz de correlação dos dados de frutos maduros (*pool*/2) cultivados nas parcelas Biodiversidade e Controle.

Nº das variáveis	Nome dos metabólitos	Componente Principal 1	Componente Principal 2
1	Ácido oxálico	-0.165345	0.004162
2	Ácido oxoalérico	-0.172270	-0.010425
3	Ácido malônico	-0.135304	-0.066529
4	Ácido 3-metil-2-oxopentanóico	-0.168640	0.054428
5	Ácido 4-metil-2-oxopentanóico	0.007289	-0.049727
6	Ácido fumárico	-0.134007	-0.075410
7	Ácido succínico	-0.160691	-0.062477
8	Ácido octanóico	0.036652	-0.220347
9	Ácido benzóico	-0.168588	0.071082
10	Ácido citramálico	0.053789	-0.196774
11	Ácido glutárico	0.087209	-0.206766
12	Alanina	-0.156613	-0.085140
13	Ácido málico	-0.169125	0.001934
14	Glicina	-0.147464	-0.107850
15	Ácido adípico	-0.151409	-0.070415
16	Ácido decanóico	-0.060952	-0.178347
17	Beta-alanina	0.072551	-0.212295
18	Valina	0.090155	-0.198797
19	Ácido glicérico	-0.159836	0.021188
20	Ácido 2-Isopropilmálico	0.020265	-0.223788
21	Ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico	0.039896	-0.208868
22	Ácido pimélico	0.056134	-0.227163
23	Pentadecano	0.109314	-0.160085
24	Leucina	0.072473	-0.210065
25	Isoleucina	0.037381	-0.222483
26	Ácido 5-oxotetraidrofurano-2-carboxílico	-0.016415	-0.189654
27	Ácido trans-cinâmico	0.083902	-0.195956
28	Ácido 4-aminobutírico (GABA)	0.044897	-0.213899
29	Prolina	-0.151440	-0.103455
30	Ácido dodecanóico	-0.164931	0.024435
32	Ácido cis-aconítico	-0.173424	0.006802
33	Treonina	-0.168853	-0.037721
34	Ácido aspártico	-0.170399	0.004611
35	Ácido quínico	0.014947	-0.218840
36	Ácido cítrico	-0.169364	0.030429
37	Ácido piroglutâmico	-0.166590	0.023521
38	Asparagina	-0.169692	0.063129
Nº das	Nome dos metabólitos	Componente	Componente

variáveis		Principal 1	Principal 2
39	Ácido 3-Hidroxibenzóico	-0.171615	-0.025726
40	Serina	-0.175440	0.029850
41	Ácido mirístico	-0.122346	-0.088951
42	Ácido glutâmico	-0.166880	0.014542
43	Glutamina	-0.173006	0.042237
44	Ácido pentadecanóico	-0.058794	-0.128096
45	Cis4-hidroxiprolina	-0.144818	-0.124645
46	Fenilalanina	-0.013673	-0.220639
47	Ácido tartárico	-0.048379	-0.159983
48	Ácido palmitoléico	-0.018451	-0.234176
49	Putrescina	-0.163465	-0.080533
50	Ácido margárico	-0.072519	-0.162722
51	Ácido 4-hidroxicinâmico	-0.174727	0.030597
52	Ácido esteárico	-0.166436	-0.025082
53	Ornitina	-0.176061	-0.004999
54	Lisina	-0.175398	-0.004419
55	Ácido araquídico	-0.047529	-0.136482
56	Histidina	-0.130040	-0.045699
57	Tirosina	-0.174016	-0.025009
58	N-alpha-acetil lisina	-0.127352	-0.030841
59	Ácido erúcico	-0.021081	-0.056395
60	Ácido sinápico	-0.131453	-0.127198
61	Nonacosano	0.053686	-0.038084