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

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

Victor Costa Castro-Alves

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientação:
Profa. Tit. Beatriz Rosana Cordenunsi

São Paulo
2014

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

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

Versão corrigida da Dissertação conforme Resolução CoPGr 5890.
O original encontra-se disponível no Serviço de Pós-Graduação da FCF/USP.

Victor Costa Castro-Alves

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientação:
Profa. Tit. Beatriz Rosana Cordenunsi

São Paulo
2014

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.

C355e	<p>Castro-Alves, Victor Costa</p> <p>O efeito da proximidade do fragmento florestal de Mata Atlântica sobre a área de cultivo no amadurecimento de bananas (<i>Musa acuminata</i> AAA cv. Nanicão) e nos compostos fenólicos das folhas de bananeiras / Victor Costa Castro-Alves. -- São Paulo, 2014.</p> <p>144p.</p> <p>Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental.</p> <p>Orientador: Cordenunsi, Beatriz Rosana</p> <p>1. Bromatologia 2. Alimento : Composto fenólico : Ciência dos alimentos 3. Banana : Bioquímica dos alimentos I. T. II. Cordenunsi, Beatriz Rosana, orientador.</p> <p>641 CDD</p>
-------	---

Victor Costa Castro-Alves

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

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profa. Tit. Beatriz Rosana Cordenunsi (FCF-USP)
Orientadora

Prof. Assoc. Lázaro Eustáquio Pereira Peres (ESALQ-USP)
1º examinador

Prof. Dr. Luciano Freschi (IB-USP)
2º examinador

São Paulo, 17 de janeiro de 2014.

A Deus por caminhar comigo e me dar forças para superar as dificuldades, sempre dando o que preciso.

A Dário Lopes de Castro Alves e Alina Maria Costa Castro Alves pelo amor, apoio, carinho e exemplo de dedicação pelos filhos, por não medirem esforços para me verem crescer como pessoa e por me ensinarem, e continuarem me ensinando, que o mais importante da vida é viver.

Ao meu irmão Bruno Costa Castro Alves pela amizade, convívio e pelas longas horas de conversa, e à minha irmã, Liana Costa Castro Alves, que mata nossa família de orgulho.

À Beatriz Rosana Cordenunsi, que me deu a oportunidade de realizar este trabalho e que, desde o começo, me incentivou e apoiou nessa jornada, pelos conselhos, amizade, paciência e exemplo que é de competência e de amor pelo que faz.

A Dra. Nirla Rodrigues Romero, Dra. Luzia Kalyne Almeida Moreira Leal, Dr. Carlos Couto de Castelo Branco e Dra. Deborah dos Santos Garruti, pela amizade, apoio e por incentivar meu crescimento pessoal e profissional.

À Samira Bernardino Ramos do Prado pela ajuda, paciência, amor, carinho e torcida, pelas mensagens positivas que me amparam e me dão forças para seguir em frente.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Tit. Beatriz Rosana Cordenunsi pelo apoio e orientação, além da liberdade e confiança depositada em mim no que se refere ao desenvolvimento do projeto.

À Ma. Florence Polegato Castelan, Ma. Talita Pimenta do Nascimento, Eng. Agr. Mariana Fernanda Nobre dos Santos Cálhau e Me. Lorenzo de Amorim Saraiva, equipe de pós-graduandos do projeto, que repartiram comigo a responsabilidade nos procedimentos de colheita, caracterização e armazenamento dos frutos, além de participarem ativamente das tomadas de decisões em relação ao projeto.

Ao Prof. Assoc. João Roberto Oliveira do Nascimento pelas críticas e sugestões durante a definição e o desenvolvimento do projeto, bem como pela participação no Exame de Qualificação.

Ao Prof. Assoc. Lázaro Eustáquio Pereira Peres e Prof. Dr. Luciano Freschi pela participação, críticas e sugestões fornecidas durante o Exame de Defesa de Mestrado, bem como as Pesquisadoras Dra. Maria Angela Machado de Carvalho e Dra. Fernanda Helena Gonçalves Peroni Okita pelas discussões levantadas durante o Exame de Qualificação.

Ao Prof. Dr. Eduardo Purgatto e à Profa. Dra. Neuza Mariko Ayomotto Hassimoto pelo apoio nas análises de hormônios e compostos fenólicos, respectivamente, e ajuda em relação à discussão dos temas.

À Técnica Lúcia Helena Silva pela execução das análises de amido e apio técnico.

À Assistente Marcia Moraes pela execução do método de microextração dos açúcares solúveis e à Técnica Dra. Tania Misuzu Shiga pela quantificação dos açúcares por cromatografia líquida.

Ao Prof. Assoc. Dr. Ernani Pinto Junior, em nome do Laboratório de Toxinas e Produtos Naturais de Algas (FCF/USP), e ao Técnico Dr. Felipe Augusto Dörr, pelo suporte e execução das análises de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas.

À Juliana Nunes da Cruz e Fernanda Helena Gonçalves Peroni pela revisão dos resumos em inglês e aos demais colegas do Laboratório de Química, Bioquímica e Biologia Molecular de Alimentos (FCF/USP), pelas sugestões e apoio na realização das análises.

À Comissão de Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (COPEsq/FCF/USP) pela organização do Workshop de Capacitação de Pesquisadores em Métodos Estatísticos Multivariados e ao Prof. Tit. Dr. Carlos Tadeu dos Santos Dias (ESALQ/USP) por ministrar o mesmo.

Aos demais funcionários da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (USP), em especial a Edilson Feitosa dos Santos, Monica Dealis Perussi, Roberta Uehara e Cleonice Estrela Cabral Gonçalves, membros da secretária do Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, pela atenção e apoio técnico.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de mestrado (GM, processo 130027/2012-0) e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos da Universidade de São Paulo, pela oportunidade e auxílio financeiro.

RESUMO

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

Considerando (1) a importância da bananicultura no Vale do Ribeira, (2) o destaque da Mata Atlântica no contexto da conservação da fauna e flora mundial, (3) a necessidade da adoção de práticas agrícolas alternativas mais eficientes do ponto de vista ambiental e econômico, (4) o papel dos hormônios etileno, ácido indol-3-acético (AIA) e ácido abscísico (ABA) no contexto das respostas dos vegetais a diferentes condições ambientais e nos atributos de qualidade da banana, (5) a falta de metodologias otimizadas para a extração de compostos fenólicos solúveis totais (CFST) em bananeiras e (6) a importância do estudo da relação entre os CFST e fatores de estresse, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a influência da proximidade do fragmento florestal de Mata Atlântica com a área de cultivo da banana (*Musa acuminata* AAA cv. Nanicão) sobre o amadurecimento da fruta e os CFST em folhas de bananeiras, além de otimizar uma técnica para a extração destes últimos. Foi observado que bananas colhidas próxima ao fragmento florestal apresentam vida-verde (período compreendido entre a colheita do fruto e o início do seu amadurecimento) maior quando comparados a frutos com a mesma idade fisiológica, porém colhidos em áreas sem a influência da floresta nativa. Este fato pode ser explicado, pelo menos em parte, pela diferença nos perfis de etileno, ABA e AIA ao longo do amadurecimento das bananas provenientes das diferentes áreas, que também influenciam no metabolismo amido-sacarose. Quanto aos CFST nas folhas, foi observado que a utilização de acetona 80% em água (v/v) e posterior emprego de hexano para a remoção do excesso de clorofilas é capaz de obter um bom rendimento de extração de CFST, sem extrair compostos que interferem significativamente no método de Folin-Ciocalteu. Além disso, a utilização da metodologia otimizada mostrou que bananeiras podem apresentar diferenças na sua composição de fenólicos quando influenciadas ou não pela presença de biodiversidade. Assim, a avaliação dos CFST em folhas pode fornecer informações importantes sobre as condições ambientais da planta.

Palavras-chave: Banana. Biodiversidade. Estresse biótico e abiótico. Fenólicos. Hormônios.

ABSTRACT

CASTRO-ALVES, V. C. **The effect of the proximity of the Atlantic Rainforest fragment over the crop area in the ripening of bananas (*Musa acuminata* AAA cv. Nanicão) and the phenolic compounds of banana leaves.** 144 p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo-SP, 2014.

Considering (1) the importance of banana production in Ribeira Valley, (2) the Atlantic Rainforest in the context of fauna and flora conservation, (3) the need for the adoption of more sustainable agricultural practices, (4) the ethylene, indole 3-acetic acid and abscisic acid responses in acclimation mechanisms of plants and in the quality attributes of the banana, (5) the lack of methodologies optimized for the extraction of total soluble phenolics compounds (TSPC) in banana leaves and (6) the importance of the relationship between the TSPC content and stress factors, the present work aimed to evaluate the influence of the Atlantic Forest fragments proximity in the banana (*Musa acuminata* AAA cv. Nanicão) crop area on fruit ripening and leaves TSPC levels, using a optimized methodology. It was observed that bananas harvested near to the forest fragment presented a longest greenlife (period between the harvest and the climacteric) when compared with the fruits with the same phisiologycal age, but without the influence of the native forest. This fact can be explained, at least partly, by the difference on ethylene, ABA and IAA profiles in the ripening of bananas from the different areas, which also influence the starch-sucrose metabolism. Moreover, it was observed that the extraction with acetone (80% v/v in water) and posterior hexane cycle to remove chlorophylls excess was able to obtain a good TSPC extraction yield in leaves, without extracting compounds that interfere significantly with Folin-Ciocalteu method. In additional, the use of optimized methodology showed that bananas leaves can present different TSPC amount when influenced by the presence of native forest. Thus, the evaluation of leaves TSPC profile can provide important information about the environmental conditions of the plant.

Keywords: Banana. Biodiversity. Biotic and abiotic stress. Phenolics. Hormones.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	13
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1 A BANANEIRA.....	15
2.2 A BANANICULTURA	17
2.2.1 Bananicultura no Brasil e no Mundo: aspectos produtivos	17
2.2.2 Bananicultura no Vale do Ribeira: contexto atual	18
2.2.3 Bananicultura: influência de fatores ambientais.....	22
2.2.4 Respostas de aclimação: mecanismos moleculares.....	26
2.2.4.1 Papel central do ácido abscísico.....	26
2.2.4.2 Compostos fenólicos na defesa do vegetal.....	28
3. OBJETIVOS.....	31
3.1 OBJETIVO GERAL	31
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	31
4. CAPÍTULO 1	33
INTRODUÇÃO.....	34
MATERIAL E MÉTODOS	36
RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
CONCLUSÃO	66
REFERÊNCIAS	66
5. CAPÍTULO 2.....	75
INTRODUÇÃO.....	76
MATERIAL E MÉTODOS	80
RESULTADOS E DISCUSSÃO	90
CONCLUSÃO	113
REFERÊNCIAS	114
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	125
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	127

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A banana está entre as frutas mais produzidas e comercializadas do mundo, principalmente em regiões tropicais e subtropicais (AURORE; PARFAIT; FAHRASMANE, 2009). No Brasil, quinto maior produtor mundial, a fruta ocupa o segundo lugar em termos de volume de produção e comércio, atrás apenas da laranja (IBRAF, 2010; FAOSTAT, 2012). Apesar dos números e da consequente importância econômica e social, a bananicultura brasileira ainda apresenta uma série de problemas que limitam uma participação mais expressiva no mercado externo. As regiões produtoras do país geralmente seguem padrões tradicionais de produção, com investimentos reduzidos em tecnologia, que acarretam em baixa produtividade e qualidade, fazendo com que a parcela da produção nacional voltada para a exportação não ultrapasse os 3% do total produzido (DOMINGUES, 2011).

Na região do Vale do Ribeira, no sudoeste de São Paulo, um dos maiores polos produtores do país, o problema da falta de recursos é somado ao fato de que a região abriga os maiores remanescentes florestais de Mata Atlântica existentes, sendo considerada uma das prioridades no contexto da conservação da fauna e da flora mundial (RIBEIRO et al., 2009; 2011). Nesse sentido, faz-se necessária a implantação de práticas agrícolas mais sustentáveis que promovam serviços ecossistêmicos, reduzindo os custos de produção e, possivelmente, aumentando a qualidade do produto da região, promovendo impactos positivos sob o ponto de vista ambiental e econômico.

Entretanto, ainda não se sabe como a manutenção de fragmentos florestais próximos a área de cultivo é capaz de influenciar o sistema de produção e, desse modo, exercer efeito sobre a qualidade dos frutos produzidos. Assim, a avaliação de substâncias que participam diretamente nos mecanismos de aclimação da planta ao meio ambiente pode fornecer hipóteses sobre os tipos de resposta do vegetal. Nesse contexto, o ácido abscísico (ABA) parece apresentar importância fundamental, respondendo a diferentes condições de estresse, influenciando outros hormônios e substâncias que participam na defesa química e física da planta, como os compostos fenólicos (ATKINSON; URWIN, 2012; ASSELBERGH; VIEESSCHAUWER; HOFTE, 2008; LUNA et al., 2011; TON; FLORS; MAUCH-MANI, 2009). Entretanto, apesar da importância dos compostos fenólicos para a bananeira, ainda não se tem relatos de estudos que otimizaram técnicas para a

avaliação desta classe de metabólitos secundários. Assim, o desenvolvimento de metodologias eficientes visando à avaliação destes compostos poderia ser uma ferramenta útil para a comparação de plantas submetidas a diferentes condições ambientais.

Além disso, a avaliação concomitante de substâncias relacionadas ao amadurecimento e à formação dos atributos de qualidade de frutas é essencial no sentido de verificar quais os efeitos da proximidade da floresta nativa na qualidade da fruta. Em frutos climatéricos como a banana, o etileno parece apresentar um papel chave no processo (PECH et al., 2012) e, dentre as transformações que ocorrem durante o amadurecimento desta fruta, as sofridas pelos carboidratos presentes na polpa tem um papel crítico na vida útil e são essenciais para o desenvolvimento de atributos de qualidade importantes (CORDENUNSI; LAJOLO, 1995).

A degradação do amido fornece carbono para a síntese de açúcares, em especial a sacarose (CORDENUNSI; LAJOLO, 1995), e compostos voláteis, conferindo sabor e aroma característicos da fruta (HUI, 2010; CASTRO-ALVES et al., 2012a; 2012b; FACUNDO et al., 2012). Além disso, existem fortes evidências de que a degradação do amido durante o amadurecimento está relacionada com amaciamento da banana (SHIGA et al., 2011). Assim, a avaliação de substâncias diretamente relacionadas com o metabolismo amido-sacarose da polpa, como o ácido indol-3-acético (AIA) (FORESTO, 2012; PURGATTO et al., 2001; 2002), pode facilitar o entendimento de diferentes fatores sobre a qualidade de frutos.

Portanto, tendo em vista (1) os serviços ecossistêmicos que a manutenção de fragmentos florestais na propriedade agrícola pode exercer sobre uma área de cultivo adjacente, (2) a necessidade da adoção de princípios ecológicos visando à criação de sistemas de cultivos mais sustentáveis, (3) a importância do etileno, AIA e ABA no amadurecimento da banana, (4) o metabolismo de degradação do amido como um fator determinante da qualidade da banana e (5) a ausência de técnicas otimizadas para a extração de compostos fenólicos na bananeira, o presente estudo avaliou o efeito da proximidade da floresta nativa (Mata Atlântica) com a área de cultivo da banana sobre hormônios (etileno, AIA e ABA) e o metabolismo amido-sacarose da fruta durante o amadurecimento, além de otimizar uma técnica de extração para a obtenção de compostos fenólicos solúveis totais em folhas de bananeiras e avaliar estas quando submetidas a diferentes condições de estresse.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A BANANEIRA

As bananeiras são plantas monocotiledôneas da ordem *Scitaminae* e família *Musaceae*, compreendendo os gêneros *Ensete* e *Musa*. O primeiro gênero compreende plantas ornamentais que geralmente não produzem frutos comestíveis, enquanto o último abrange frutos partenocárpicos, geralmente apresentando polpa abundante, comestível e sem sementes (DOMINGUES, 2011).

A história da domesticação de bananeiras (*Musa* spp.) é extremamente complexa, envolvendo vários estágios em diferentes locais e períodos da história (CARREEL et al., 2002). Evidências recentes sugerem que esta planta foi domesticada inicialmente na região da Melanésia, um conjunto de ilhas situado no extremo oeste do oceano Pacífico. No entanto, outros processos isolados de domesticação parecem ter ocorrido posteriormente, no sudeste asiático e no leste africano (DE LANGHE et al., 2011; NEUMANN; HILDEBRAND, 2009; PERRIER et al., 2011).

Bananeiras selvagens ainda são encontradas, principalmente, na Indonésia, Malásia, Filipinas e Nova Guiné, enquanto as plantas domesticadas são largamente cultivadas em mais de cem países, em ambientes tropicais e subtropicais. Hoje, a maioria das cultivares que produzem frutas comestíveis são híbridos diploides, triploides ou tetraploides, derivados exclusivamente da espécie diploide *Musa acuminata* (genoma A), da península malaia, ou da hibridização desta com a espécie *Musa balbisiana* (genoma B), originada na região leste da Índia (PERRIER et al., 2011).

As principais cultivares comerciais produzidas no Brasil são híbridos triploides pertencentes aos grupos genômicos AAB (subgrupos Prata, Maçã e Terra) e AAA (subgrupo Cavendish). Apesar das bananeiras do grupo AAB se destacarem em termos de produção e aceitação no mercado interno, as frutas provenientes de bananeiras do subgrupo Cavendish, como as cultivares Nanica e Nanicão, possuem relativa aceitação no mercado nacional, principalmente na região Sul e Sudeste, e apresentam maior potencial de exportação (GARRUTI et al., 2012; LICHTENBERG; LICHTENBERG, 2011).

Quanto à descrição morfológica, as bananeiras são consideradas plantas herbáceas completas que apresentam raiz, caule subterrâneo (rizoma), pseudocaule, folhas, flores, frutos e sementes. As plantas completas, na maioria das vezes, produzem frutos que são resultado do desenvolvimento do ovário da flor após a fecundação originando, desse modo, sementes (DOMINGUES, 2011).

Em bananeiras selvagens essa polinização acontece de forma cruzada, isto é, ocorre a transferência do pólen de flores masculinas de uma inflorescência para fecundar as flores femininas da inflorescência de outra planta. A polinização direta - transferência de pólen em uma mesma planta - não ocorre uma vez que, quando as flores masculinas se desenvolvem, as flores femininas da mesma inflorescência já não possuem mais a capacidade de serem polinizadas. Nas bananeiras domesticadas este processo de reprodução geralmente não é observado, sendo verificado quase que exclusivamente a reprodução assexuada, através da emissão de brotos a partir do rizoma que, por sua vez, possuem células meristemáticas que irão produzir novas raízes na porção basal e o pseudocaule na região apical formando, assim, uma nova planta (TURNER; FORTESCUE; THOMAS, 2007).

A ausência da reprodução sexuada nas bananeiras domesticadas é decorrente do processo de seleção promovido pelo homem que, após séculos de cultivo e seleção de plantas, resultou no surgimento de cultivares que não produzem grãos de pólen férteis, onde os ovários das flores femininas dificilmente podem ser fecundados. Isto ocorre devido ao atrofiamento do estigma, que impede a passagem do pólen e a consequente fecundação do óvulo, visualizado como pequenos pontos pretos na polpa da fruta (HESLOP-HARRISON; SCHWARZACHER, 2007; PERRIER et al., 2011).

Entretanto, por se tratar de um fruto partenocárpico, a banana é capaz de desenvolver o ovário mesmo sem a fecundação ocorrendo, consequentemente, a expansão do pericarpo, popularmente conhecido como polpa, formando assim o fruto sem semente (LEIVA-MORA, 2006).

Estes frutos só são formados após fatores hormonais induzirem a transformação da gema apical impedindo, desse modo, a emissão de novas folhas no ápice do pseudocaule (SCHAFFER; ANDRESEN, 1994). A partir desta etapa inicia-se o desenvolvimento da inflorescência da bananeira, que irá culminar na antese, o ato de abertura das flores femininas e masculinas e o início do desenvolvimento da fruta.

Nas bananeiras domesticadas, as flores masculinas, na maioria das vezes, são diferenciadas das femininas pelo tamanho e forma do ovário, geralmente atrofiado e delgado (DOMINGUES, 2011; SCHAFFER; ANDRESEN, 1994). A diferenciação entre as flores femininas e masculinas observada no momento antese, período do aparecimento da inflorescência, é frequentemente utilizada como um parâmetro em estudos para determinar o ponto em que se inicia o desenvolvimento das bananas.

2.2 A BANANICULTURA

2.2.1 Bananicultura no Brasil e no Mundo: aspectos produtivos

Após a formação da inflorescência, a bananeira inicia o processo de desenvolvimento das flores que, posteriormente, irão culminar na formação da banana, umas das culturas agrícolas mais importantes do mundo (FAOSTAT, 2011). Nutricionalmente, as bananas constituem uma rica fonte de energia, com elevada quantidade de carboidratos, fibras e minerais (HARDISSON et al., 2001; HONFO et al., 2007). Estima-se que o consumo anual *per capita* mundial da fruta seja de quase 11 kg, atrás apenas da laranja. No entanto, como grande parte do consumo de laranja é proveniente de produtos processados, a banana é considerada a fruta *in natura* mais consumida do planeta (FAOSTAT, 2011).

No Brasil, o seu consumo *per capita* anual ultrapassa os 25 kg e em outros países do hemisfério sul, principalmente no continente africano, a mesma é componente essencial da dieta de uma parcela significativa da população (FAOSTAT, 2011; HONFO; TENKOUANO; COULIBALY, 2011).

A produção mundial de aproximadamente 100 milhões de toneladas de banana se estende por uma área de cinco milhões de hectares. O Brasil é responsável por 7% desta produção, perdendo em volume apenas para a Índia (29,1%), China (9,6%), Filipinas (8,9%) e Equador (7,8%) (FAOSTAT, 2011). No país, o estado de São Paulo é o principal produtor, com aproximadamente 18% da produção nacional, sendo os municípios de Cajati e Miracatu, situados no Vale do Ribeira, os maiores produtores do estado (IBGE, 2010; IBGE, 2011).

2.2.2 Bananicultura no Vale do Ribeira: contexto atual

Na região do Vale do Ribeira, localizada entre o sudeste de São Paulo e o leste do Paraná, a prática da bananicultura é de grande importância para a geração de emprego, renda e a fixação do homem no campo. Porém, apesar de apresentar condições relativamente favoráveis para o cultivo da fruta, a produtividade na região é considerada baixa. O manejo do solo na bananicultura representa um dos custos mais elevados da produção agrícola (COELHO, 2008).

Desse modo, o aumento da área produtiva e a identificação de sistemas de produção mais eficientes sob o ponto de vista econômico são primordiais para o aumento da lucratividade do produtor (FURLANETO; MARTINS; ESPERANCINI, 2011). No entanto, a expansão da área produtiva como uma estratégia financeira, se contrapõe ao fato da região do Vale do Ribeira ser considerada uma das prioridades no contexto da conservação da fauna e da flora mundial. Reconhecida internacionalmente por sua diversidade biológica, a região abrange o maior remanescente contínuo de Mata Atlântica existente (BROOKS et al., 2006; GALETTI et al., 2009; MYERS et al., 2000; PAYÉS; PAVÃO; SANTOS, 2013; RIBEIRO et al., 2009; 2011) (**Figura 1**).

Figura 1. Vale do Ribeira. Limites territoriais segundo o Governo Federal (BRASIL, 2012) e remanescentes florestais de acordo com o Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (SOSMA, 2012).

Em São Paulo, a área original do bioma Mata Atlântica corresponde a quase 70% do território do estado. Com a intensificação das práticas de agricultura e

pecuária na região a partir do início do século passado, houve um incremento nas taxas de desmatamento. Atualmente, os remanescentes deste bioma ocupam menos de 10% do território estadual, concentrados principalmente na região do Vale do Ribeira (SOSMA, 2011).

Portanto, levando em conta as elevadas taxas de desmatamento e o declínio contínuo da biodiversidade regional e mundial (KLEIJN et al., 2011), é essencial a adoção de práticas agrícolas alternativas que abordem as necessidades dos agricultores, autoridades e sociedade, e que reduzam os impactos ao meio ambiente (KRAUSE et al., 2013; TIXIER et al., 2008). Segundo Porter-Bolland et al. (2012), uma solução global para o problema seria a implantação de sistemas alternativos de produção que se adequem a cada região, trazendo benefícios de ordem social, econômica e ambiental para a população local.

Nesse sentido, Altieri e Nicholls (2007) verificaram que a agroecologia, ciência que aplica conceitos ecológicos visando projetar e gerenciar sistemas sustentáveis de produção de alimentos (TOMICH et al., 2011), é essencial para orientar a conversão de sistemas convencionais de produção a sistemas mais autossuficientes. O sistema agroflorestal (SAF), uma forma de manejo e produção que envolve a associação de espécies arbóreas com culturas agrícolas, representa uma alternativa de manejo da propriedade. Neste sistema, a presença de uma biodiversidade mais abundante parece promover diferentes serviços ecossistêmicos que refletem diretamente na qualidade do produto e nos custos de produção. Entre estes serviços está o aumento da biodiversidade de insetos e, conseqüentemente, de inimigos naturais de pragas de cultivos agrícolas, bem como a redução da disseminação de esporos de fungos, uma vez que as espécies arbóreas podem funcionar como uma barreira física e reduzir a dispersão dos esporos pelo vento (ALTIERI; SILVA; NICHOLLS, 2003; RATNADASS et al., 2012; SCHROTH et al., 2000). Além disso, os mecanismos de sinalização entre os diferentes organismos presentes no sistema podem induzir alterações no metabolismo da cultura, refletindo em mecanismos mais eficientes de resposta a diferentes condições ambientais (ENGELBERTH et al., 2004; GAQUEREL; BALDWIN, 2013; MATSUI, 2006; MORRIS et al., 2009; SCALA et al., 2013).

Outra forma de sistema alternativo viável do ponto de vista ambiental e econômico é a produção em ilhas de alta produtividade (IAPs). Este sistema consiste em manejar pequenas propriedades de monocultivo espaçadas entre si e

circundadas pela diversidade da floresta natural, visando à proteção contra agentes patogênicos por meio do isolamento conferido pela estrutura florestal no entorno da plantação (KAGEYAMA et al., 2002) e, possivelmente, pela influência dos fragmentos próximos sobre a área de cultivo. Nesse sentido, Tomas (2010) verificou que em IAPs, os serviços ecossistêmicos proporcionados pelo componente florestal provocam menores índices de doenças e infestação de insetos-praga na cultura do tomate quando comparado a sistemas que utilizam agroquímicos e que, portanto, na maioria das vezes, apresentam um custo mais elevado de produção.

Portanto, é possível que a presença da floresta nativa adjacente à área de cultivo possa fornecer diferentes serviços ecossistêmicos do ponto de vista físico, químico e biológico, que promovam menores níveis de infestação de pragas refletindo, desse modo, na qualidade do produto (**Figura 2**).

Além dos serviços oferecidos a cultura agrícola, os sistemas alternativos citados acima são capazes de proporcionar a manutenção ou até a recuperação da vegetação e, conseqüentemente, da biodiversidade que ela pode manter (KAGEYAMA et al., 2002; TOMICH et al., 2011), constituindo, desse modo, um excelente modelo ambiental para recuperação de ambientes degradados como a Mata Atlântica, buscando o enriquecimento e a preservação da biodiversidade aliado à satisfação das necessidades do homem.

Assim, a utilização de princípios ecológicos, como a manutenção de fragmentos florestais na propriedade agrícola, é importante para o favorecimento de processos naturais e interações biológicas, de tal modo que a agrobiodiversidade seja capaz de promover a regulação biótica de pragas e atuar sobre outros processos como acumulação de matéria orgânica, fertilidade do solo e produtividade do sistema (TREWARAS, 2001; TSCHARNTKE et al., 2012), culminando na conservação dos recursos naturais do local de produção (ALTIERI; NICHOLLS, 2006; BAILEY et al., 2013; SOUZA et al., 2012).

É importante ressaltar que não existem somente aspectos ambientais que fornecem suporte a utilização de sistemas alternativos. Um dos motivos pelos quais muitos agricultores realizam a conversão de um sistema de monocultivo com a utilização de insumos agrícolas a uma forma de manejo mais sustentável é a possibilidade de obter uma produção mais estável e de qualidade, pouco dependente de insumos externos, com o objetivo de reduzir os custos de produção. Do ponto de vista financeiro é importante ressaltar que, embora estudos apontem

uma produtividade reduzida em alguns sistemas alternativos, o déficit no volume de produção por área é compensado pela expressiva redução nos custos de manejo da cultura (MACIEL, 2003; TOMAS, 2010).

Figura 2. Possíveis efeitos da proximidade da floresta nativa (biodiversidade vegetal) com a área de cultivo. A floresta nativa adjacente ao sistema de cultivo pode ser capaz de atuar por três mecanismos principais, atuando como (a) uma barreira física, dificultando a disseminação de esporos de fungos na área próxima; (b) uma barreira biológica, visto que a floresta nativa pode ser habitat natural de inimigos naturais dos patógenos da cultura agrícola e (c) como uma barreira química, emitindo substâncias que induzem mecanismos de defesa nas bananeiras.

Nesse sentido, Moraes (2007) avaliou as dificuldades de comercialização da banana produzida no Vale do Ribeira. O autor comenta que para aumentar o rendimento em torno da comercialização da banana, é necessário buscar uma maior produtividade e melhoria da qualidade do produto. No entanto, não há mais local para expansão do cultivo, visto que mais da metade da região do Vale do Ribeira é protegida legalmente por meio de um mosaico integrado de unidades de conservação, reservas ecológicas e áreas de proteção ambiental. Além disso, a elevada - e crescente - incidência de pragas da bananeira na região, em particular

do inseto *Cosmopolites sordidus* Germar, popularmente conhecido como broca-da-bananeira, e do fungo *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, agente causal da Sigatoka negra, culminam em um aumento na utilização de agroquímicos, representando um importante fator na redução da qualidade dos frutos produzidos na região (JONES, 2009; MORAES, 2007; PAVARINI et al., 2009; CASTELAN et al., 2012; SARAIVA et al., 2013). Apesar de Ghini et al. (2007) verificarem que haverá uma redução da área favorável a doença no país nas próximas décadas, os prejuízos atuais causados, principalmente pela Sigatoka negra, demandam novas estratégias para o manejo da cultura da banana.

Assim, a utilização dos serviços ecossistêmicos promovidos pelos remanescentes florestais de Mata Atlântica poderia reduzir os custos de produção e, possivelmente, aumentar a qualidade do produto da região. No entanto, apesar de numerosos estudos já terem avaliado os efeitos de diferentes tratamentos culturais e condições de estresse biótico e abiótico sobre a fisiologia de plantas e a qualidade de frutos (ATKINSON et al., 2011; BRANDT et al., 2011 e suas referências; CARDOSO et al., 2011; LÓPEZ et al., 2013; HALLMANN, 2012; SELLI et al., 2012), até o presente momento, não se tem conhecimento de estudos que tenham avaliado a influência de um fragmento florestal sobre um mesmo tratamento cultural.

Para explicar como a floresta nativa é capaz de influenciar na qualidade da banana, faz-se necessário entender a influência de diferentes condições ambientais sobre a fisiologia da planta e o desenvolvimento e amadurecimento da fruta.

2.2.3 Bananicultura: influência de fatores ambientais

Apesar das características fenológicas das bananeiras e, conseqüentemente, dos seus frutos, apresentarem variação em função das diferentes cultivares existentes (COSTA, 2011; GONZAGA NETO et al., 1995), uma série de outros fatores também podem afetar a qualidade do produto, que vão desde a seleção do local adequado para a produção até o manejo pós-colheita dos frutos. Dentre estes, as condições ambientais representam importância fundamental no desenvolvimento do vegetal e refletem diretamente na qualidade do produto.

As influências derivadas de aspectos físicos, químicos ou físico-químicos do meio ambiente sobre um vegetal são descritas como fatores abióticos. Já os efeitos causados por organismos vivos como fungos, bactérias, vírus, nematódeos e insetos

herbívoros, são denominados fatores bióticos (HAMMOND-KOSACK; JONES, 2000). Estas duas classes de fatores atuam de maneira concomitante durante todo o ciclo de desenvolvimento do vegetal e a modificação de um único componente pode induzir alterações nos demais fatores promovendo, desse modo, efeitos positivos ou negativos sobre o desenvolvimento do vegetal.

A temperatura, a umidade relativa (UR) do ar, o regime de chuvas, o solo e a luminosidade são apontados como os principais fatores abióticos que influenciam na bananicultura, apresentando importância fundamental no ciclo vegetativo e reprodutivo da bananeira, afetando o porte da planta e a qualidade e quantidade de frutos (AL-HARTHI; AL-YAHYAI, 2009; BHATTACHARYYA; RAO, 1985; BOWER; ROBINSON, 1987; DJGAL et al., 2012; DOMINGUES, 2011; GUO; GAO, 2002; LAHAV; TURNER, 1985; ROBINSON; ALBERTS, 1986; SHEN et al., 2013; TURNER; LAHAV, 1983; VAN HASTEN; FERMONT; TAULYA, 2011; YAO et al., 2009). Segundo Wang, Vinocur e Altman (2003), estes fatores são capazes de reduzir em até 50% o rendimento médio de produção das principais culturas agrícolas mundiais.

Nesse sentido, Silva et al. (2004) comentam que temperaturas e UR do ar relativamente altas, bem como precipitações pluviais bem distribuídas, geralmente induzem o desenvolvimento vegetativo pleno da bananeira. Já foi observado que temperaturas entre 20 e 29 °C proporcionam taxas de crescimento relativamente rápidas na planta. Entretanto, em temperaturas consideradas extremas, fora da faixa entre 14 e 35 °C, a maioria das cultivares de bananas não consegue se desenvolver adequadamente (ROZANE et al., 2013).

Quanto às condições edáficas (solo), as bananeiras geralmente são consideradas plantas exigentes, que demandam solo úmido e quantidades relativamente elevadas de nutrientes para manter o desenvolvimento e obter elevados níveis de produtividade. A luminosidade também apresenta um impacto direto no desenvolvimento da planta. Já foi observado que o seu crescimento é inversamente proporcional ao nível de sombreamento sobre a área, que é capaz de retardar a emissão de folhas e reduzir o peso e a produtividade da planta (ISRAELI; PLAUT; SCHWARTZ, 1995).

No entanto, os fatores abióticos não são determinantes apenas no desenvolvimento da bananeira. Estes também influenciam as características dos frutos produzidos (CANO et al., 1997; HARDISSON et al., 2001; MOSER et al.,

2012; SCARPARE FILHO, KLUGE, 2001). Nesse sentido, Bugaud, Daribo e Dubois (2007) verificaram que a casca de bananas pré-climatéricas colhidas em estações frias e secas é mais dura quando comparadas a casca de frutas provenientes de regiões mais quentes e úmidas. Além disso, já foram observadas diferenças na composição física e de compostos voláteis em bananas de regiões com o mesmo histórico de tratos culturais, porém localizadas em altitudes distintas. Frutas em áreas de cultivo localizadas a 300 m acima do nível do mar (ANM) parecem apresentar maior firmeza (BRAT et al., 2004) e uma concentração elevada de compostos voláteis (BUGAUD et al., 2006) quando comparadas a frutas cultivadas em áreas entre 50 e 100 m ANM.

Quanto aos fatores bióticos, além dos micro-organismos presentes no solo, que apresentam influencia nas características edáficas da área de cultivo, a incidência de patógenos é determinante no desenvolvimento, produtividade e qualidade da banana. Estes, por sua vez, podem ser divididos em três classes principais de acordo com a sua capacidade de infecção e desenvolvimento em tecidos vegetais. Organismos biotróficos necessitam de nutrientes provenientes do tecido vegetal vivo para o seu desenvolvimento e reprodução. Organismos necrotróficos induzem rapidamente a morte do tecido vegetal e se estabelecem neste, não sendo capaz de se desenvolver adequadamente no tecido vivo. Por fim, os organismos hemibiotróficos, que são capazes de infectar e se manter vivo em tecido vegetal viável, só se desenvolvendo após a morte dos tecidos atacados (CHOENG et al., 2002; DOWD; WILSON; MACFADDEN, 2004; GLAZEBROOK, 2005; NAVARRO et al., 2006). Estas duas últimas classes possuem maior capacidade de debilitar o tecido vegetal, visto que geralmente apresentam a capacidade de induzir necrose neste tecidual.

O fungo hemibiotrófico *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, apontado atualmente como um dos principais problemas fitossanitários da bananicultura nacional e mundial, é capaz de induzir a necrose nas folhas da bananeira reduzindo, desse modo, a capacidade fotossintética da planta, os níveis de clorofila e o teor de carboidratos em folhas de bananeiras (ANDREA; GERARDO, 2008). Estas alterações na planta refletem diretamente na qualidade dos frutos que, quando provenientes de áreas infestadas pelo fungo, apresentam um menor tempo de vida-verde, período compreendido entre a colheita e o início do amadurecimento da

banana, quando comparadas a frutas provenientes de áreas com baixo índice de infestação (CASTELAN et al., 2012).

Além do fungo *M. fijiensis*, o inseto *Cosmopolites sordidus* Germar, popularmente conhecido como broca-da-bananeira, é responsável pela perda de produtividade de bananeiras em regiões úmidas como o Vale do Ribeira. As fêmeas de *C. sordidus* são capazes de penetrar no rizoma, onde depositam os seus ovos. Estes, por sua vez, eclodem e liberam as larvas, que provocam mais perfurações no rizoma, debilitando as plantas e tornando-as mais sensíveis ao tombamento. Os danos físicos provocados pelo inseto também favorecem a penetração de patógenos nas áreas atacadas, podendo culminar na morte da planta (DUYCK et al., 2012).

Como observado, diversos estudos já avaliaram os efeitos de um único fator de estresse condicionante do cultivo, seja este biótico ou abiótico, na produtividade da bananeira ou na qualidade da banana. No entanto, a planta geralmente vive em um ambiente onde a mesma é frequentemente exposta a diferentes condições de estresse em combinação, ativando mecanismos de sinalização específicos quando submetidas a diversos fatores em conjunto (RIZHSKY et al., 2004).

Portanto, o estudo de vegetais a partir da indução de uma única condição de estresse e o controle das demais variáveis parece ser inadequado (MITTLER; BLUWALD, 2010). Isto é particularmente importante no entendimento dos mecanismos combinados de fatores de estresse bióticos e abióticos que, na maioria das vezes, quando estudados em separado, parecem induzir mecanismos de resposta que atuam de maneira antagônica (ANDERSON et al., 2004; ASSELBERGH et al., 2008).

Segundo Atkinson e Urwin (2012), existe uma necessidade urgente de mudança de foco na pesquisa sobre respostas de aclimação de plantas. Segundo os autores, faz-se necessário o entendimento da natureza das reações a múltiplas formas de estresse, visando à elucidação destes mecanismos para o desenvolvimento de híbridos resistentes a diferentes condições ambientais.

Assim, o estudo do efeito da proximidade da floresta nativa com a área de cultivo, além de abranger aspectos socioeconômicos e ambientais, pode fornecer hipóteses sobre como um vegetal é capaz de reagir ao efeito de múltiplas condições de estresse. Entretanto, quais os mecanismos moleculares envolvidos nas respostas de aclimação das plantas e dos frutos?

2.2.4 Respostas de aclimação: mecanismos moleculares

2.2.4.1 Papel central do ácido abscísico

Cada tipo de estresse induz no vegetal uma resposta de aclimação complexa, visando à prevenção do dano como um meio de assegurar a sobrevivência da planta, mas geralmente em detrimento do crescimento vegetal, afetando sua produtividade (ATKINSON; URWIN, 2012; HERMS; MATTSON, 1992; SHAO et al., 2008). Como citado anteriormente, em ambientes naturais, as alterações das condições ambientais ocorrem de maneira constante (MITTLER; BLUMWALD, 2010; NIINEMETS, 2010), exigindo do vegetal mecanismos complexos de aclimação.

Acreditava-se que as respostas a fatores abióticos eram determinadas pelo hormônio ácido abscísico (ABA), enquanto as respostas ao estresse biótico eram coordenadas pelo balanço entre a via de sinalização do ácido salicílico (AS), para organismos biotróficos, e a via de sinalização do etileno/metil jasmonato (MeJa), para organismo necrotróficos. Atualmente, sabe-se que o ABA também pode atuar de maneira sinérgica ou antagônica frente a fatores bióticos, criando assim uma rede de interação entre as diferentes vias (MOHR; CAHILL, 2003; YASUDA et al., 2008), apresentando um papel central na resposta a diferentes formas de estresse (ATKINSON; URWIN, 2012; ASSELBERGH; VIEESSCHAUWER; HOFTE, 2008; LUNA et al., 2011; TON; FLORS; MAUCH-MANI, 2009).

Assim, mudanças nas concentrações de ABA induzem alterações no padrão de genes e expressão de proteínas, resultando em diferentes respostas de aclimação ao ambiente. A **Figura 3** ilustra exemplos de mecanismos importantes da resposta de diferentes vegetais a condições distintas de estresse ambiental.

Níveis elevados de ABA induzem o fechamento dos estômatos, apêndices da epiderme da folha que permitem trocas gasosas entre o vegetal e o ambiente prevenindo a perda de água, principalmente em situações de estresse hídrico ou osmótico. Além disso, este mecanismo é capaz de prevenir a invasão de patógenos, visto que os estômatos são utilizados como porta de entrada para bactérias e fungos, como o *M. fijiensis* (CHUC-UC et al., 2011; LEE; LUAN, 2012; MELOTTO; UNDERWOOD; HE, 2008). Segundo Gascón (2012), esta relação simples parece

sugerir que as plantas foram capazes de desenvolver estratégias para evitar, simultaneamente, diferentes condições de estresse.

Figura 3. Exemplos de mecanismos importantes da resposta de diversas espécies vegetais a condições de estresse distintas. Setas indicam uma influência positiva (verde) ou negativa (vermelha). Evidências sobre as relações em diferentes espécies de vegetais podem ser observadas em (a), (o) Gil e Tuteja (2010); (b), (p) Suzuki et al. (2012); (c) Shy et al. (2013); (d) Torres (2010); (e) Chan (2012); (f) Crampton, Hein e Berger (2009); (g) Mengiste (2012); (h) Sánchez-Vallet et al. (2012), Anderson et al. (2004) e Asselbergh et al. (2008); (i) Riov et al. (1990), Ton, Flors e Mauch-Mani (2009) e Ye et al. (2013); (j) Varga et al. (2012); (k) Graham e Graham (1996); (l) Koornneef et al., 2008; (m) Singh et al. (2011); (n) Antico et al. (2012); (q) Ton, Flors e Mauch-Mani (2009); (r), (s) Luna et al. (2011); (t) Melotto et al. (2004); (u) Leshem (2010); (v), (w) Tuteja (2007); (x), (z) Fragnière et al. (2011); (y) Chen et al. (2006). Sequência de eventos adaptada de Atkinson e Urwin (2012).

Além de prevenir a infecção por diversos tipos de patógenos mediante o fechamento dos estômatos, o ABA também parece interagir diretamente na supressão do AS (YASUDA et al., 2008), apresentando também função sinérgica ou antagônica com a via de sinalização etileno/MeJa, dependendo das características do tecido-alvo, do patógeno e do estágio de infecção (ANDERSSON; et al., 2004; TON; FLORS; MAUCH-MANI, 2009).

No caso da banana, o ácido indol-3-acético (AIA), que também parece apresentar uma correlação com os níveis de ABA em diferentes tecidos vegetais (ANDERSON et al., 2012; BELIN et al., 2009; BRADY et al., 2003; DE SMET et al., 2003; DUNLAP; ROBACKER, 1990; TEALE et al., 2008; WOODWARD; BARTEL, 2005), tem uma importância fundamental no amadurecimento da fruta. Estes dois hormônios parecem estar ligados à alteração da sensibilidade do fruto ao etileno, indicando um balanço coordenado entre estas três substâncias durante o amadurecimento (BUTA; SPAULDING, 1994; JIANG; JOYCE; MACNISH, 2000; LOHANI; TRIVEDI; NATH, 2004; PURGATTO, 2001; PURGATTO et al., 2001; 2002).

Na banana, já foi observado que o padrão de degradação do amido é dependente da redução dos níveis de AIA na polpa, que culmina na indução da expressão de genes e no aumento da atividade de enzimas-chave do metabolismo de degradação do amido e acúmulo de açúcares solúveis (PURGATTO, 2001; PURGATTO et al., 2001; 2002). A indução destes mecanismos, por sua vez, apresenta influência direta no amaciamento da polpa e no adoçamento do fruto, aspectos fundamentais na aceitação do produto pelo consumidor (SHIGA et al., 2011).

Portanto, a avaliação concomitante do etileno, do ABA e do AIA na polpa de banana colhidas em áreas influenciadas por diferentes condições ambientais podem explicar, pelo menos em parte, os mecanismos de aclimação da planta e suas consequências sobre a fruta, como o efeito sobre o amadurecimento e em parâmetros determinantes da sua qualidade, como o metabolismo amido-sacarose.

2.2.4.2 Compostos fenólicos na defesa do vegetal

As respostas de aclimação frente a diferentes condições ambientais induzem a produção de uma vasta gama de compostos denominados metabólitos

secundários. Estes são definidos como substâncias que não participam diretamente do metabolismo fotossintético e respiratório de plantas, mas são fundamentais na resposta da planta ao ambiente (CHEYNIER et al., 2013). Apesar de serem produzidos em uma quantidade relativamente pequena quando comparado ao peso total do organismo - geralmente em quantidades menores do que 1% do seu peso seco (RAO; RAVISHANKAR, 2002) -, estes são fundamentais na manutenção de processos biológicos dos tecidos vegetais (LATTANZIO; LATTANZIO; CARDINALI, 2006; MATTIVI et al., 2011; RAMAKRISHNA; RAVISHANKAR, 2011).

No que diz respeito à ampla diversidade de reações e produtos envolvidos nas respostas de aclimação, os compostos fenólicos, produtos do metabolismo secundário de plantas derivados principalmente da via dos fenilpropanóides, têm sido repetidamente propostos como potenciais participantes nos mecanismos de defesa da bananeira e também da sua fruta, sendo considerada a classe de metabólitos secundários mais estudada (EWANÉ et al., 2012; KSOURI et al., 2008; SARAIVA et al., 2013). Além dos fatores bióticos, alterações na incidência de luz, na temperatura, na disponibilidade de água e na nutrição da planta podem influenciar no conteúdo de compostos fenólicos em tecidos vegetais (EWANÉ et al., 2012; KSOURI et al., 2008; LATTANZIO; LATTANZIO; CARDINALI, 2006; RAMAKRISHNA; RAVISHANKAR, 2011; SELMAR; KLEINWACHTER, 2013a; TREUTTER, 2010).

Quimicamente, são definidos como compostos que apresentam um ou mais grupamentos hidroxilas ligados a um anel aromático. Funcionalmente, estes apresentam diversas funções importantes relacionadas principalmente com o crescimento (FAN et al., 2006; KEFELI; KALEVITCH; BORSARI, 2003), pigmentação (KHODDAMI; WILKES; ROBERTS, 2013; KONG et al., 2003) e mecanismos adaptativos do vegetal (CABANI; AFIF; HAWKINS, 2013; FAN et al., 2006; KADIOGLU et al., 2012; LEE et al., 2007; MISHRA et al., 2006), variando quantitativamente e qualitativamente entre espécies e também entre indivíduos de uma mesma espécie vegetal (EWANÉ et al., 2012). Alguns compostos fenólicos são ubíquos em plantas (p.ex. ácidos hidroxicinâmicos) (VANNELLI et al., 2007), outros são comuns (p.ex. antocianinas) (HE et al., 2010), enquanto outros são específicos para determinadas classes de vegetais (p.ex. estilbenos) (JEANDET et al. 2010).

Dependendo da estrutura química e da localização celular, estas substâncias podem apresentar papéis distintos na defesa do tecido vegetal contra patógenos.

Por exemplo, ligninas e ácidos hidroxicinâmicos são comumente encontrados associados à parede celular, conferindo rigidez e resistência física ao tecido vegetal, enquanto outros (p.ex. ácidos fenólicos) podem atuar em mecanismos químicos de defesa, agindo principalmente como moléculas de sinalização ou participando de reações de oxirredução (FERREYRA; RIUS; CASATI, 2012; MANDAL; CHAKRABORTY; DEY, 2010; PÉREZ-JIMÉNEZ; TORRES, 2011). Estes últimos geralmente não se encontram associados a outros compostos da matriz vegetal e são frequentemente designados como compostos fenólicos solúveis, sendo extraídos com relativa facilidade empregando-se solventes orgânicos sem a necessidade da utilização de reações de hidrólise para sua obtenção (KHODDAMI; WILKES; ROBERTS, 2013).

Segundo Ewané (2012), já foi observado na bananeira um aumento na quantidade de compostos fenólicos e a indução da expressão de enzimas da via dos fenilpropanóides após a infecção com diferentes patógenos. Além disso, a comparação de cultivares parcialmente resistentes e sensíveis ao fungo *M. fijiensis* indicou que as bananeiras sensíveis ao fungo parecem apresentar uma menor quantidade de compostos fenólicos, fato que também foi observado em bananeiras sensíveis a nematódeos (BEVERAGGI; MOURICHON, SALLÉ, 1995; EWANÉ, 2012; WUYTS et al., 2007). Nesse sentido, o estudo dos compostos fenólicos solúveis totais (CFST) pode fornecer informações importantes sobre as condições de um tecido vegetal, visto que uma mudança na quantidade destas substâncias pode indicar uma resposta da planta a condições de estresse (EWANÉ, 2012). Na banana, diversos estudos tiveram como objetivo avaliar a composição de fenólicos na polpa da fruta visando, principalmente, aspectos nutritivos (AURORE; PARFAIT; FAHRASMANE, 2009; BALASUNDRUM; SUNDRUM; SAMMAN, 2006; BENNETT et al., 2010; KYAMUHANGIRE et al., 2006; KOFI; PHILLIPS; WICKER, 2007; SUN et al., 2002; VERDE-MENDEZ et al., 2003). Entretanto, pouco se sabe a respeito da composição de fenólicos na folha da planta (EWANÉ et al., 2012).

Até o presente momento, não existem estudos que relacionem a influência concomitante de fatores bióticos e abióticos sobre a composição de CFST de folhas de banana, um tecido vital para o desenvolvimento e a percepção da planta a alterações nas condições ambientais. Além disso, não se tem conhecimento de técnicas que tenham otimizado condições para a extração destas substâncias na folha da banana.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito da proximidade do fragmento florestal de Mata Atlântica com a área de cultivo da banana (*Musa acuminata* AAA cv. Nanicão) sobre o amadurecimento da fruta e a produção de compostos fenólicos solúveis totais (CFST) em folhas de bananeiras.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comparar o perfil hormonal (etileno, ácido abscísico e ácido indol-3-acético) da polpa de bananas durante o amadurecimento em frutos colhidos em sistema convencional, influenciados ou não pela presença de floresta nativa (Mata Atlântica) em seu entorno;

- Determinar o perfil de amido e açúcares solúveis na polpa de bananas durante o amadurecimento em frutos colhidos em sistema convencional, influenciados ou não pela presença de floresta nativa (Mata Atlântica) em seu entorno;

- Otimizar condições para a extração de CFST em folhas de bananeiras e verificar o efeito de interferentes (açúcares redutores e ácido ascórbico) sobre a quantificação de CFST após utilização da metodologia otimizada;

- Avaliar o efeito da presença de floresta nativa (Mata Atlântica) no entorno do sistema de cultivo convencional sobre os CFST das folhas de bananeiras.

4. CAPÍTULO 1

A proximidade do fragmento florestal de Mata Atlântica com a área de cultivo altera o perfil hormonal e a vida-verde de bananas (*Musa acuminata* AAA cv. Nanicão)

Victor C. Castro-Alves^a; Talita P. Nascimento^a; Lorenzo A. Saraiva^a; Florence P. Castelan^a; Maria Fernanda N. S. Calhau^a; Beatriz R. Cordenunsi.^{a,b}

^aDepartamento de Alimentos e Nutrição Experimental; ^b Núcleo de Apoio à Pesquisa em Alimentos e Nutrição - Universidade de São Paulo (USP) - Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 14 - Cid. Universitária, CEP 05508-000, São Paulo, SP, Brasil.

RESUMO

Atualmente observa-se a necessidade da adoção de princípios ecológicos para o favorecimento de interações biológicas nos sistemas de produção, visando não somente a redução dos impactos ambientais, mas também um aumento da qualidade dos produtos. No entanto, pouco se sabe como a presença de biodiversidade é capaz de influenciar na qualidade de um fruto. Desse modo, foi avaliado o efeito da proximidade da floresta nativa (Mata Atlântica) com a área de cultivo em sistema convencional sobre os perfis dos hormônios etileno, ácido abscísico (ABA) e ácido indol-3-acético (AIA), bem como os níveis de amido e açúcares solúveis na polpa de bananas (*Musa acuminata* AAA cv. Nanicão) durante o amadurecimento. Foram utilizadas frutas provenientes de duas parcelas experimentais com o mesmo histórico de tratamentos culturais, onde a única diferença entre estas era a presença de um fragmento florestal no entorno de 60% do perímetro da área “biodiversidade”, enquanto a área “controle” se encontrava a uma distância de mais de 200 m de qualquer remanescente florestal. As bananas colhidas na área “biodiversidade” apresentaram uma vida-verde, período entre a colheita e o início do climatério, aproximadamente 70% maiores quando comparadas a frutas da área “controle”, refletindo em um atraso na degradação do amido de frutas colhidas próximas à floresta nativa. Isto pode ser explicado, pelo menos em parte, pela diferença nos perfis de etileno, ABA e AIA ao longo do amadurecimento de bananas influenciadas ou não pela presença da Mata Atlântica no entorno da área de cultivo.

Palavras-chave: Banana. Biodiversidade. Carboidratos. Hormônios. Mata Atlântica.

ABSTRACT

The adoption of ecological principles for favoring biological interactions in production systems could reduce not only the environmental impacts, but also an increase in product quality. However, little is known about the influence of biodiversity in the fruit

quality. Thus, it was evaluated the effect of the proximity of native forest (Atlantic Rainforest) with the banana crop area on ethylene, abscisic acid (ABA) and indole-3-acetic acid (IAA) profiles, and the levels of starch and soluble sugars in banana (*Musa acuminata* AAA cv. Nanicão) pulp during ripening. Fruits were harvested from two areas with the same history of cultural traits where the only difference between them was the presence of a forest fragment surrounding 60% of the "biodiversity" area perimeter and the "control" area was at least 200 m of distance from any remnant forest. The results showed that bananas harvested from the "biodiversity" area presented a green life, time between the harvest and the beginning of the natural ripening, about 70% significantly higher when compared to fruits from the "control" area. Furthermore, it was observed that the starch degradation was delayed in fruits harvested near the native forest. These findings can be explained, at least partly, by the difference in the ethylene, ABA and IAA profiles along the ripening of bananas influenced or not by the presence of the Atlantic Rainforest surrounding the crop area.

INTRODUÇÃO

Embora seja uma das principais frutas brasileiras exportadas, a banana está longe de liderar as exportações para os países mais desenvolvidos. Em termos de volume, a parcela da produção nacional voltada para a exportação não ultrapassa os 3% do total produzido (DOMINGUES, 2011). Isto é decorrente do fato de que o produto nacional frequentemente não atende as exigências de qualidade dos mercados norte-americano e europeu, os maiores importadores da fruta (FAOSTAT, 2012).

O Vale do Ribeira, região que apresenta os maiores remanescentes florestais de Mata Atlântica existentes, sendo considerada uma área de prioridade no contexto da conservação da fauna e da flora mundial, é também um dos maiores polos produtores de banana no país. Nessa região, a elevada incidência do fungo *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, agente causal da Sigatoka negra, culmina em um aumento na utilização de agroquímicos, representando um importante fator na redução da lucratividade do produtor e na qualidade dos frutos produzidos na região (CASTELAN et al., 2012; JONES, 2009; MORAES, 2007; PAVARINI et al., 2009).

Nesse sentido, faz-se necessário a implantação e avaliação de práticas agrícolas alternativas que visem à preservação dos fragmentos florestais e, conseqüentemente, promovam serviços ecossistêmicos como uma estratégia para a redução da incidência de pragas e da utilização de agroquímicos, visando impactos positivos sob o ponto de vista ambiental e econômico. Entretanto, ainda não se sabe

como a biodiversidade da floresta nativa é capaz de influenciar o cultivo da banana e, desse modo, exercer efeitos sobre a qualidade dos frutos produzidos.

Diversos estudos já avaliaram os efeitos de diferentes condições ambientais sobre as respostas de aclimação de vegetais e verificaram que o hormônio ácido abscísico (ABA) parece apresentar importância fundamental nestes processos, respondendo a diferentes condições de estresse, influenciando outros hormônios e substâncias importantes na resposta da planta ao ambiente e, conseqüentemente, refletindo nos atributos de qualidade da fruta (ATKINSON; URWIN, 2012; ASSELBERGH; VIEESSCHAUWER; HOFTE, 2008; LUNA et al., 2011; TON; FLORS; MAUCH-MANI, 2009). Assim, a avaliação do ABA juntamente com outras substâncias determinantes dos atributos de qualidade da banana pode facilitar o entendimento de como a floresta nativa é capaz de influenciar na qualidade do produto.

Na banana, um fruto climatérico, o etileno é fundamental no desenvolvimento de características sensoriais importantes durante o processo de amadurecimento (CORDENUNSI; LAJOLO, 1995; PECH et al., 2012). Dentre estas transformações que ocorrem ao longo do amadurecimento, as sofridas pelos carboidratos presentes na polpa tem um papel crítico na vida útil e são essenciais para o adoçamento da banana (CORDENUNSI; LAJOLO, 1995) e o amaciamento da sua polpa (SHIGA et al., 2011). Este metabolismo, por sua vez, parece ser influenciado diretamente pelas concentrações de ácido indol-3-acético (AIA) na polpa da banana (FORESTO, 2012; PURGATTO et al., 2001; 2002).

Portanto, tendo em vista a necessidade de adoção de sistemas de cultivos mais eficientes do ponto de vista ambiental, além da importância dos hormônios etileno, AIA e ABA no contexto das respostas dos vegetais a diferentes condições ambientais e os seus reflexos sobre os atributos de qualidade da banana, o presente estudo visou avaliar os níveis destes hormônios, bem como os teores de amido e açúcares solúveis ao longo do amadurecimento de frutas colhidas em áreas de sistema convencionais de cultivo influenciadas ou não pela presença de floresta nativa (Mata Atlântica) em seu entorno. Os resultados mostram que bananas provenientes de áreas próximas a fragmentos florestais apresentaram uma vida-verde (período compreendido entre a colheita do fruto e o início do seu amadurecimento) maior quando comparadas a frutas com a mesma idade fisiológica, porém provenientes de áreas que não são influenciadas pelos

remanescentes florestais. Tal resultado pode ser explicado, pelo menos em parte, pela diferença nos perfis de etileno, ABA e AIA ao longo do amadurecimento de bananas influenciadas ou não pela presença da Mata Atlântica no entorno da área de cultivo.

MATERIAL E MÉTODOS

Material

Foram utilizadas bananas (*Musa acuminata* AAA cv. Nanicão) provenientes de duas áreas no bairro rural de Guapiruvu, município de Sete Barras-SP, na microrregião de Registro, localizada no Vale do Ribeira. A seleção das parcelas experimentais foi realizada no primeiro trimestre de 2012, por meio da avaliação das fotos aéreas, entrevistas com agricultores locais e verificação da uniformidade das condições edafoclimáticas (temperatura, umidade relativa do ar e solo) entre as áreas.

Também foram utilizados como critérios a padronização das condições de cultivo e o histórico semelhante de tratos culturais, além da distância da floresta nativa (Mata Atlântica) para as parcelas visto que, em estudo publicado por Altieri et al. (1981), foi verificado que a biodiversidade no entorno da plantação tem uma amplitude de influência de 40 m da borda para o interior do cultivo.

Nesse sentido, a área “biodiversidade” apresentava fragmento remanescente de Mata Atlântica no entorno de 60% do seu perímetro e a distância máxima do remanescente florestal para qualquer ponto desta parcela não ultrapassava os 40 m, sendo o restante do perímetro circundado por cultivo convencional banana. Já a área “controle” apresentava monocultivo de banana em todo o seu entorno, onde o fragmento florestal mais próximo se encontrava a mais de 200 m de qualquer ponto da área de cultivo (**Figura 1**), distância suficiente para evitar os efeitos da floresta nativa sobre a parcela (ALTIERI et al., 1981).

A relativa proximidade entre as áreas (aproximadamente 200 m) e a uniformidade do relevo local permitia inferir que estas eram influenciadas por condições edafoclimáticas semelhantes. Ainda assim, para garantir que diferenças no solo e temperatura e umidade relativa do ar nos locais escolhidos para a produção não iriam influenciar nos resultados, foram realizadas análises de

nutrientes no solo, bem como a verificação das condições climáticas locais. Além disso, também foi realizada a determinação do índice de severidade de Sigatoka negra nas bananeiras, no momento do florescimento da planta e no período da colheita dos frutos (**Quadro 1**). Como uma forma de padronização do ponto de colheita das bananas, foram selecionadas bananeiras que apresentaram o momento da antese (florescimento) na mesma data, determinado como o momento em que foi observado na inflorescência o aparecimento de todas as flores femininas e o início do aparecimento das masculinas. Desse modo, no dia 8 de maio de 2012, foi possível realizar a marcação de seis plantas de cada parcela, totalizando doze bananeiras.

Figura 1. Distribuição das parcelas experimentais - áreas em branco. A área “biodiversidade” possui fragmento remanescente de Mata Atlântica no entorno de 60% do seu perímetro, enquanto a área “controle” apresenta monocultivo de banana em todo o seu perímetro, estando distante a mais de 200 m de qualquer remanescente florestal. Escala aproximada. Fonte: *Software Google Earth v 7.0*.

As plantas foram então numeradas pela respectiva data de floração e acompanhadas ao longo do desenvolvimento do fruto até o momento da colheita. A definição do ponto de colheita foi realizada a partir do cálculo da idade fisiológica da planta, expressa em graus-dia (GD), segundo metodologia descrita por Ganry e Meyer (1975). Nesse método, é efetuada a soma das temperaturas médias diárias das parcelas experimentais, a uma temperatura basal de 14 °C, desde o momento

da floração, em que a planta foi marcada, até o dia da colheita, realizada próxima aos 900 GD (**Figura 2**).

Quadro 1. Características das parcelas “biodiversidade” e “controle”. As parcelas apresentavam o mesmo histórico de tratos culturais e espaçamento entre plantas. Além disso, a relativa proximidade entre estas permitia inferir que as mesmas apresentavam o mesmo regime de chuvas.

Características	Parcela "biodiversidade"	Parcela "controle"
Proximidade com o fragmento florestal	60% de fragmento florestal no entorno da parcela	Distância maior que 200 m do fragmento florestal
Temperatura*	23,26 ± 2,86 °C	23,37 ± 2,95 °C
Umidade relativa do ar*	90,67 ± 7,07%	89,36 ± 7,71%
Tipo de solo	Latossolo amarelo	Latossolo amarelo
Macro e micronutrientes no solo e na folha	Níveis adequados**	Níveis adequados**
Índice de severidade de sigatoka negra***	4,1 ± 3,0% (florescimento) 27,7 ± 13,5% (colheita)	8,0 ± 3,3% (florescimento) 44,5 ± 15,8% (colheita)

* Medições horárias da temperatura e umidade relativa do ar nas áreas por meio de sondas *Tinytag® Extra TGX-3580* (*Gemini Data Loggers®*, Chichester, Reino Unido); ** Níveis dentro da faixa considerada normal para a bananeira (*Musa acuminata* cv. AAA Nanicao) segundo Borges (2004), Borges et al. (2009) e Teixeira, Van Raij e Bettiol Neto (2008); *** Segundo metodologia descrita por Stover (1971) e modificada por Gahul (1993) (n = 6) (Resultados da tese de Florence Polegato Castelan, dados ainda não publicados).

As bananas foram colhidas no dia 8 de outubro de 2012, totalizando 153 DPA, que resultaram em uma idade fisiológica de 915 GD para as frutas. Foram selecionadas duas pencas de bananas da porção intermediária (quarta e quinta pencas) do cacho de cada bananeira. Os frutos foram então transportados ao Laboratório de Química, Bioquímica e Biologia Molecular de Alimentos (FCF-USP), em condições padronizadas para os dois cultivos. No primeiro dia após a colheita (1 DPC) as bananas foram destacadas da penca e devidamente identificadas de acordo com a respectiva bananeira.

Em seguida, as amostras foram higienizadas com água corrente e tratadas com o 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, conforme descrito por Sponholz et al. (2004), sendo

posteriormente armazenadas em câmara incubadora a $20 \pm 2^\circ\text{C}$ para os ensaios de caracterização. No segundo dia após a colheita (2 DPC), foram iniciadas as análises diárias da respiração e liberação de etileno de cada conjunto de frutos e, periodicamente, uma banana de cada conjunto teve sua porção central descascada, fatiada, congelada em nitrogênio líquido e armazenada a -80°C para as análises subsequentes.

Figura 2. Definição do ponto de colheita a partir do cálculo da idade fisiológica da planta em graus-dia (GD), segundo metodologia descrita por Ganry e Meyer (1975). No período da antese (floração), onde é visualizado o aparecimento de flores masculinas, inicia-se a contagem da idade fisiológica das plantas e, a partir deste período, é efetuado o somatório (Σ) das temperaturas médias diárias (T_{md}), a uma temperatura basal de 14°C , desde o dia da antese (d_{antese}) até o dia em que é atingido 900 GD ($d_{900\ GD}$). A T_{md} é definida como a média das medições horárias (T_h) de temperatura em um intervalo de 24 h.

Métodos

Medição da respiração e liberação de etileno

A avaliação dos níveis de respiração (CO_2) e liberação de etileno (C_2H_4) pelos conjuntos de frutos das diferentes bananeiras foi realizada diariamente até o final da senescência das mesmas, aproximadamente três dias após estas atingirem a nota máxima na escala de cor da casca de Von Loesecke (1950) (amarela com pontos pretos). Para as análises foi utilizado um cromatógrafo gasoso *HP-6890* equipado com coluna *HP-PlotQ* (30 m x 0,53 mm x 40 μm) (*Hewlett-Packard*[®], Palo Alto, CA,

EUA), acoplado aos detectores de ionização em chama e condutividade térmica para análise do C_2H_4 e CO_2 , respectivamente, e interface com um computador equipado com o *software MSD ChemStation E.02 (Agilent Technologies®*, Santa Clara, CA, EUA). As amostras (três bananas de cada planta) foram selecionadas aleatoriamente e acondicionadas em frascos hermeticamente fechados, incubadas por aproximadamente 1 h a temperatura ambiente.

Posteriormente, alíquotas do *headspace* de cada câmara foram analisadas em triplicata no modo *split* (50:1) para o CO_2 (1 mL) e *pulsed split* (20 psi; 2 min) para o C_2H_4 (10 mL). Padrões (*Air Liquid®*, São Paulo, SP, Brasil) dos dois gases foram utilizados para construção de uma curva padrão. Os valores obtidos foram subtraídos das análises diárias de CO_2 e C_2H_4 atmosférico da sala onde as amostras foram incubadas. Os resultados foram expressos como mg de $CO_2.Kg^{-1}.h^{-1}$ e μL de etileno. $Kg^{-1}.h^{-1}$ (PURGATTO et al., 2002; ROSSETTO et al., 2003).

Parâmetros relativos ao amadurecimento

Para a comparação dos conjuntos de frutos provenientes das diferentes bananeiras foram utilizados nove parâmetros com base nas análises dos perfis de respiração e liberação de etileno pelos diferentes conjuntos de bananas:

- (a) Dias pós-colheita (DPC), definido como número de dias desde a colheita até a senescência dos frutos;
- (b) Vida-verde (VV), descrito como o número de dias entre a colheita do fruto e o início do climatério (amadurecimento) (CHILET et al., 2008), que foi definido no presente estudo como o DPC anterior ao primeiro dia em que a liberação de etileno supera 1 μL de etileno. $Kg^{-1}.h^{-1}$, semelhante ao descrito por Castelan et al. (2012);
- (c) Dias pós-VV (DPVV), determinado como o número de dias entre a VV e a senescência dos frutos, calculado através da fórmula ($DPVV = DPC - VV$);
- (d) Dia (DPC $_{CO_2}$) e concentração ($CO_{2m\acute{a}x}$) do pico respiratório máximo para cada conjunto de frutos, expressos em dias e mg de $CO_2.Kg^{-1}.h^{-1}$, respectivamente;

- (e) Dia ($DPC_{C_2H_4}$) e concentração ($C_{2H_{4m\acute{a}x}}$) do pico máximo de liberação de etileno para cada conjunto de frutos, expressos em dias e μL de etileno. $Kg^{-1}.h^{-1}$, respectivamente;
- (f) Área sob a curva de respiração (ASC_{CO_2}) e liberação de etileno ($ASC_{C_2H_4}$) de cada conjunto de frutos calculados a partir do método do trapézio, expressos em unidades de área (UA).

Extração e determinação do ácido abscísico e ácido indol-3-acético

A determinação do ácido abscísico (ABA) e ácido indol-3-acético (AIA) foi realizada segundo metodologia proposta por Ludwig-Müller, Georgiev e Bley (2008) e adaptada por Foresto (2012). Em um microtubo de 2 mL foram adicionados aproximadamente 100 mg da polpa previamente triturada em nitrogênio líquido, 100 μL de solução extratora contendo isopropanol e ácido acético (95:5 v/v), 1 μg de padrão marcado de AIA ($[^{13}C_6]$ -AIA) (*Cambridge Isotopes*[®], Andover, MA, EUA) e 1 μg de padrão marcado ABA ($[^2H_6]$ -ABA) (*Olchemim*[®], Olomouc, MO, República Tcheca). Posteriormente a mistura foi agitada em vórtex (3000 rpm; 1 min) e o material incubado (2 h; 1000 rpm; 4 °C). O homogenato resultante foi então centrifugado (14000 g; 10 min; 4 °C) e o sobrenadante transferido para um novo microtubo. O material foi então concentrado em fluxo de nitrogênio até restar cerca de 20-50 μL de amostra. Em seguida foi realizado o ajuste do pH entre 2,5 e 3,5, utilizando-se HCl 1N, sendo então adicionado 500 μL de acetato de etila, seguido de agitação em vórtex (3000 rpm) e centrifugação (14000 g; 5 min; a 4 °C) para a separação de fases.

A fase orgânica (superior) foi coletada e transferida para um novo microtubo, enquanto a fase aquosa (inferior) foi submetida a mais duas etapas de extração com acetato de etila. Após combinação das fases orgânicas, foi efetuada a secagem completa desta em sistema a vácuo sob baixas temperaturas (*speed-vac*). As amostras foram então ressuspensas em 100 μL de metanol e transferidas para um *insert* de *vial* de 300 μL . Após a adição de 50 μL de trimetilsilil-diazometano (*Sigma-Aldrich*[®], St. Louis, MO, EUA), o *vial* foi imediatamente fechado e mantido a temperatura ambiente por 30 min. Em seguida, foi efetuada novamente a secagem da amostra em fluxo de nitrogênio e, posteriormente, o material foi solubilizado em

acetato de etila para posterior quantificação. Em todas as amostras analisadas foi realizada a triplicata da extração. Para a detecção e quantificação dos hormônios foi utilizado o método de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas, em modo de monitoramento seletivo de íons (CG-EM-MSI). Para isso, foi utilizado um cromatógrafo gasoso *HP-6890* (*Hewlett-Packard*[®], Palo Alto, CA, EUA) equipado com espectrômetro de massas *HP-5973*, injetor automático *ALS 7693A*, (*Agilent Technologies*[®], Santa Clara, CA, EUA) e coluna *HP-1701* (30 m x 0,25 mm x 0,50 µm), acoplado a um computador equipado com o *software MSD ChemStation E.02* (*Agilent Technologies*[®], Santa Clara, CA, EUA).

Foram injetados 1 µL de cada replicata do extrato para a análise do AIA e do ABA. A programação de temperatura do CG iniciou em 150 °C por 3 min, seguida de um aumento na temperatura de 5 °C.min⁻¹ até 210 °C e 15 °C.min⁻¹ até 260 °C, utilizando fluxo de hélio a 4 mL.min⁻¹. O monitoramento seletivo dos íons com relação massa carga (*m/z*) 130, 136, 162, 166, 189, 190, 194 e 195 foi iniciado 3 min após a injeção da amostra.

Para o AIA foram analisados os íons com relação massa carga (*m/z*) em 130 e 189 (correspondentes ao AIA endógeno) e 136 e 195 (correspondentes ao padrão interno [¹³C₆]-AIA). As concentrações endógenas de AIA foram obtidas pela razão entre as áreas dos picos nos cromatogramas extraídos em *m/z* 130 e 136, enquanto a razão 189:195 foi utilizada para a identificação da molécula. Já para o ABA foram analisados os íons com relação massa carga (*m/z*) em 162 e 190 (correspondentes ao ABA endógeno) e 166 e 194 (correspondentes ao padrão interno [²H₆]-ABA). As concentrações endógenas de ABA foram obtidas pela relação entre as áreas dos picos nos cromatogramas extraídos em *m/z* 162 e 166, enquanto a razão 190:194 foi utilizada para a identificação da molécula.

Determinação de amido e açúcares solúveis

A estimativa do teor de amido na polpa das bananas foi realizada conforme metodologia descrita por Áreas e Lajolo (1980). O amido de aproximadamente 100 mg da polpa previamente triturada em nitrogênio líquido foi solubilizado em 3 mL de hidróxido de sódio 0,5 M. O homogenato resultante foi neutralizado com ácido acético 0,5 M e o volume ajustado em um balão volumétrico. Em seguida, o amido de uma amostra de 1 mL foi precipitado utilizando 4 mL de etanol absoluto e

separado por centrifugação (12000 g; 15 min), sendo o sobrenadante descartado. O precipitado foi lavado com etanol 80% (v/v), por duas vezes.

Após evaporação do etanol à temperatura ambiente, o amido foi hidrolisado com a enzima amiloglicosidase (EC 3.2.1.3, 28 U/mL, pH 4,8) e a glicose resultante foi quantificada através do sistema glicose-oxidase (EC 1.1.3.4) - peroxidase (EC 1.11.1.7) - ABTS (2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato) através de leitura a 450 nm após 30 min. Foi utilizada glicose (*Sigma-Aldrich*[®], St. Louis, MO, EUA) como padrão (BERGMEYER, 1974) e os resultados foram expressos como percentual de amido na polpa (% g.100g⁻¹). Para cada ponto de análise foi realizada a triplicata da extração.

Os açúcares solúveis foram extraídos em triplicata a partir de 100 mg da polpa em três ciclos de extração com etanol 80% (v/v) (80 °C; 800 rpm). Após centrifugação (12000 g; 15 min), o sobrenadante foi transferido para um balão volumétrico e o volume ajustado com etanol 80%. Em seguida, o etanol foi evaporado de uma alíquota de 1 mL do extrato em sistema *speed-vac*, sendo os resíduos sólidos reconstituídos com água deionizada.

Os açúcares assim extraídos foram analisados utilizando o equipamento *Dionex-DX500* (*Thermo Scientific*[®], Waltham, MA, EUA), composto por um cromatógrafo líquido de alta eficiência, acoplado a um detector amperométrico de pulso, equipado com coluna *CarboPac PA1* (4 x 250 mm) (*Thermo Scientific*[®], Waltham, MA, EUA) e interface com um computador equipado com o *software PeakNet 5.0* (*Thermo Scientific*[®], Waltham, MA, EUA).

Foi utilizada fase móvel constituída de NaOH 18 mM em fluxo de 1 mL.min⁻¹ por 25 min. Padrões de sacarose, frutose e glicose (*Sigma-Aldrich*[®], St. Louis, MO, EUA) foram utilizados para a identificação dos picos e construção de uma curva padrão.

Análise estatística

Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão (DP). Para verificação do cumprimento dos pressupostos de normalidade (distribuição normal dentro de um conjunto de dados) e homogeneidade das variâncias (distribuição homogênea entre os diferentes conjuntos de dados) foi utilizado o teste de Shapiro-Wilk (SHAPIRO; WILK, 1965) e Levene (LEVENE, 1960), respectivamente. Para

dados paramétricos, foi realizada a comparação entre grupos utilizando o teste t (pareado ou não pareado). Para avaliar dados não paramétricos foi utilizado o teste U de Mann-Whitney (MANN; WHITNEY, 1947). Foi empregado o coeficiente de correlação de Spearman (SPEARMAN, 1904) para verificar a correlação entre os níveis iniciais de AIA, ABA, a VV e o período do início da degradação do amido. Para a análise de agrupamento foi utilizado o método da ligação completa, utilizando como parâmetros os níveis iniciais e finais de AIA, ABA, amido e açúcares solúveis, os valores máximos e de área sob a curva de etileno e respiração, bem como a VV e o período em que foi iniciada a degradação do amido nos diferentes conjuntos de frutos. As análises foram realizadas com auxílio dos programas *GraphPad Prism 5.0* (*Graph Pad Software*®, La Jolla, CA, EUA) e *IBM SPSS Statistics 20* (*IBM*®, New York, NY, EUA). O critério de significância utilizado foi de $p < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Através dos perfis individuais de liberação de etileno e respiração dos conjuntos de frutos é possível verificar que, visualmente, os gráficos das bananas provenientes da área “biodiversidade” (**Figura 3**) parecem apresentar uma sincronia maior em seus perfis quando comparadas aos conjuntos de frutos da área “controle” (**Figura 4**).

Apesar de a análise visual dos perfis de produção de etileno e respiração representar um instrumento útil para a verificação dos diferentes padrões de amadurecimento, a utilização de parâmetros numéricos pode facilitar a interpretação. Os resultados da análise dos diferentes parâmetros avaliados indicou que a parcela “biodiversidade” apresentou níveis significativamente maiores de dias pós-colheita (DPC), vida-verde (VV) e dia do pico máximo respiratório (DPC_{CO_2}) e de liberação de etileno ($DPC_{C_2H_4}$) (**Tabela 1**).

A avaliação dos teores de amido acumulado (2 DPC) na polpa de bananas das áreas “biodiversidade” indicou um valor médio de $21,60 \pm 1,41 \text{ g.100 g}^{-1}$, enquanto na área “controle” o resultado médio observado foi de $22,02 \pm 0,96 \text{ g.100 g}^{-1}$. Neste mesmo período não foi possível detectar açúcares solúveis na polpa dos frutos.

Figura 3. Perfil respiratório (□) e de liberação de etileno (■) do conjunto de frutos colhidos nas bananeiras B1 a B6 (parcela “biodiversidade”). C₂H₄: etileno; CO₂: gás carbônico; Linha tracejada indica o valor de C₂H₄ de 1 μL.Kg⁻¹.h⁻¹, utilizado como parâmetro para contagem da vida-verde do conjunto de frutos. Valores diários de respiração e etileno expressos como média ± DP (n = 3).

Figura 4. Perfil respiratório (□) e de liberação de etileno (■) do conjunto de frutos colhidos nas bananeiras C1 a C6 (parcela “controle”). C_2H_4 : etileno; CO_2 : gás carbônico; Linha tracejada indica o valor de C_2H_4 de $1 \mu\text{L} \cdot \text{Kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, utilizado como parâmetro para contagem da vida-verde do conjunto de frutos. Valores diários de respiração e etileno expressos como média $\pm$ DP ($n = 3$).

Tabela 1. Parâmetros relativos ao amadurecimento dos diferentes conjuntos de frutos das parcelas “biodiversidade” e “controle”. Frutos provenientes de uma única bananeira foram analisados em conjunto ao longo do amadurecimento.

Planta	DPC (d)	VV (d)	DPVV (d)	DP _{CO2} (d)	CO ₂ máx ($\mu\text{L.Kg}^{-1}.\text{h}^{-1}$)	DPC _{C2H4} (d)	C ₂ H ₄ máx ($\mu\text{L.Kg}^{-1}.\text{h}^{-1}$)	ASC _{CO2} (UA)	ASC _{C2H4} (UA)
B1	21	11	10	15	29,8	18	4,8	29,2	26,6
B2	21	12	9	16	30,4	18	3,4	250,9	15,5
B3	21	12	9	16	28,4	16	2,5	240,9	15,6
B4	22	13	9	18	27	15	3,5	220,3	12,7
B5	22	13	9	18	32,1	14	2,6	214,1	10,4
B6	22	14	8	19	32,1	15	2,7	206,1	8,8
C1	17	7	10	12	34,2	9	2,1	262,8	10,9
C2	16	8	8	16	25,9	10	2,1	207,0	9,3
C3	14	5	9	10	45,8	8	3,2	257,5	20,3
C4	21	9	12	10	26,8	10	2,3	236,1	11,0
C5	14	5	9	7	41,5	11	3,1	249,3	18,8
C6	17	10	7	13	24,8	11	4,2	191,8	11,8
“biodiversidade” (média $\pm$ DP)	21,5 $\pm$ 0,6 ^a	12,5 $\pm$ 1,1 ^a	9,0 $\pm$ 0,6	17,0 $\pm$ 1,6 ^a	30,0 $\pm$ 2,0	16,0 $\pm$ 1,7 ^a	3,2 $\pm$ 0,9	193 $\pm$ 82	14,9 $\pm$ 6,3
“controle” (média $\pm$ DP)	16,5 $\pm$ 2,6	7,3 $\pm$ 1,1	9,2 $\pm$ 1,7	11,3 $\pm$ 3,1	33,2 $\pm$ 8,9	9,8 $\pm$ 1,2	2,8 $\pm$ 0,8	234 $\pm$ 28	13,7 $\pm$ 4,7

DPC: dias pós-colheita; VV: vida-verde; DPVV: dias pós-VV; DPC_{CO2}: dia do pico respiratório máximo; CO₂máx: valor do pico respiratório máximo; DPC_{C2H4}: dia do pico de etileno máximo; C₂H₄máx: valor do pico de etileno máximo; ASC_{CO2}: área sob a curva de CO₂; ASC_{C2H4}: área sob a curva de C₂H₄; UA: unidades de área. ^a: diferença significativa em relação à parcela “controle” (Teste U de Mann-Whitney; p<0,05). Valores expressos como média $\pm$ DP dos diferentes parâmetros (n = 6).

Ao final do amadurecimento (último DPC) também não foram observadas diferenças significativas nos teores de amido entre os frutos provenientes da parcela “biodiversidade” ($2,74 \pm 1,11 \text{ g.100g}^{-1}$) e “controle” ($4,18 \pm 1,63 \text{ g.100g}^{-1}$). Quanto aos açúcares solúveis, a diferença também não foi estatisticamente significativa. Os frutos das áreas “biodiversidade” e “controle” apresentaram $14,71 \pm 1,73 \text{ g.100g}^{-1}$ e $16,50 \pm 2,58 \text{ g.100g}^{-1}$ de açúcares solúveis totais ao final do amadurecimento (**Tabela 2**).

Tabela 2. Teores iniciais (2 DPC) e finais (último DPC) de amido e açúcares solúveis na polpa de bananas provenientes das áreas “biodiversidade” e “controle”.

Parâmetros (g.100g ⁻¹)	Teores iniciais (2 DPC)		Teores finais (último DPC)	
	“controle”	“biodiversidade”	“controle”	“biodiversidade”
Amido	$22,02 \pm 0,96$	$21,60 \pm 1,41$	$4,18 \pm 1,63$	$2,74 \pm 1,11$
AST	nd	nd	$16,50 \pm 2,58$	$14,71 \pm 1,73$
Sacarose	nd	nd	$10,92 \pm 2,23$	$9,83 \pm 1,90$
Glicose	nd	nd	$2,89 \pm 0,53$	$2,48 \pm 0,47$
Frutose	nd	nd	$2,79 \pm 0,46$	$2,39 \pm 0,38$

DPC: dias pós-colheita; AST: açúcares solúveis totais; nd: não detectado. Não houve diferenças estatisticamente significativas entre as parcelas “controle” e “biodiversidade” em nenhum dos parâmetros avaliados (teste t não pareado; $p < 0,05$). Valores expressos como média $\pm$ DP (g.100g⁻¹ de polpa fresca) dos diferentes parâmetros (n = 6).

Apesar de não terem sido observadas diferenças nos teores iniciais e finais de amido e açúcares solúveis nas parcelas, as modificações temporais visualizadas para o perfil de liberação de etileno e respiração dos frutos sugerem uma alteração no comportamento fisiológico do fruto que, por sua vez, podem culminar em uma modificação dos processos que ocorrem ao longo do amadurecimento sem refletir, necessariamente, nos primeiros dias pós-colheita ou nos dias próximos a senescência. Nesse sentido, foi realizada a análise do perfil de degradação do amido e acúmulo de açúcares solúveis ao longo de todo o amadurecimento dos conjuntos de frutos das parcelas “biodiversidade” (**Figura 5**) e “controle” (**Figura 6**).

(continua...)

Figura 5. Carboidratos na polpa de bananas colhidas na parcela “biodiversidade”. Níveis de amido, açúcares solúveis totais (AST), sacarose, glicose e frutose em diferentes estágios do amadurecimento de frutos colhidos nas bananeiras da parcela “biodiversidade” (B1, B2, B3, B4, B5 e B6). DPC: dias pós-colheita. Valores expressos como média $\pm$ DP (g.100 g^{-1}) de, no mínimo, três análises ($n = 3$).

(continuação...)

Figura 5. Carboidratos na polpa de bananas colhidas na parcela “biodiversidade”. Níveis de amido, açúcares solúveis totais (AST), sacarose, glicose e frutose em diferentes estágios do amadurecimento de frutos colhidos nas bananeiras da parcela “biodiversidade” (B1, B2, B3, B4, B5 e B6). DPC: dias pós-colheita. Valores expressos como média $\pm$ DP (g.100 g^{-1}) de, no mínimo, três análises ($n = 3$).

(continua...)

Figura 6. Carboidratos na polpa de bananas colhidas na parcela “controle”. Níveis de amido, açúcares solúveis totais (AST), sacarose, glicose e frutose em diferentes estágios do amadurecimento de frutos colhidos nas bananeiras da parcela “controle” (C1, C2, C3, C4, C5 e C6). DPC: dias pós-colheita. Valores expressos como média $\pm$ DP ($\text{g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$) de, no mínimo, três análises ($n = 3$).

(continuação...)

Figura 6. Carboidratos na polpa de bananas colhidas na parcela “controle”. Níveis de amido, açúcares solúveis totais (AST), sacarose, glicose e frutose em diferentes estágios do amadurecimento de frutos colhidos nas bananeiras da parcela “controle” (C1, C2, C3, C4, C5 e C6). DPC: dias pós-colheita. Valores expressos como média $\pm$ DP (g.100 g^{-1}) de, no mínimo, três análises ($n = 3$).

Tendo em vista as alterações temporais nos eventos observados, optou-se também por avaliar os hormônios AIA e ABA, que parecem participar das respostas de aclimação de tecidos vegetais a condições ambientais, podendo influenciar no amadurecimento das bananas.

Os resultados indicam que, diferente das demais análises realizadas, os níveis de AIA e de ABA nas parcelas “biodiversidade” (**Figura 7**) e “controle” (**Figura 8**) apresentam diferenças significativas desde o início do período pós-colheita. Os conjuntos de amostras de bananas provenientes da parcela “biodiversidade” apresentaram uma concentração média de AIA na polpa de $12,63 \pm 1,27 \text{ ng.g}^{-1}$ no início do período pós-colheita (2 DPC), valor cerca de 35% maior do que o observado para os frutos da parcela controle ($9,20 \pm 2,12 \text{ ng.g}^{-1}$). No mesmo período, o ABA pareceu se comportar de maneira contrária, visto que a polpa dos frutos da parcela “biodiversidade” possuem concentrações significativamente menores ($580,30 \pm 53,15 \text{ ng.g}^{-1}$) quando comparadas às bananas da área “controle” ($820,30 \pm 52,69 \text{ ng.g}^{-1}$), apresentando uma diferença de, aproximadamente, 30%.

Já no último dia pós-colheita foi verificado que, em relação ao AIA, as parcelas não apresentam diferenças significativas, possuindo valores médios menores do que 2 ng.g^{-1} do hormônio na polpa fresca. Entretanto, a análise do ABA no mesmo período indicou níveis significativamente maiores na polpa das bananas provenientes da parcela “controle” ($1006,33 \pm 34,10 \text{ ng.g}^{-1}$) quando comparadas aos frutos colhidos em áreas próximas ao fragmento florestal ($894,01 \pm 53,13 \text{ ng.g}^{-1}$).

Desse modo, os resultados demonstram que, apesar da utilização dos mesmos tratos culturais e das condições edafoclimáticas semelhantes, existem diferenças entre bananeiras influenciadas ou não pela presença de floresta nativa em seu entorno.

Apesar do número relativamente pequeno de observações (12 conjuntos de bananeiras) para a aplicação de técnicas de estatística multivariadas, a análise de agrupamento utilizando como parâmetros os níveis iniciais e finais de AIA, ABA, amido e açúcares solúveis, os valores máximos e de área sob a curva de etileno e respiração, bem como a VV e o período em que foi iniciada a degradação do amido permitiu agrupar os conjuntos de frutos provenientes das parcelas “biodiversidade” e “controle” em dois blocos distintos (**Figura 9**).

Figura 7. Níveis de ácido indol-3-acético (■) (AIA) e ácido abscísico (□) (ABA) em diferentes estágios de desenvolvimento de frutos colhidos nas bananeiras da parcela “biodiversidade” (B1, B2, B3, B4, B5 e B6). DPC: dias pós-colheita. Valores expressos como média $\pm$ DP (ng.g^{-1}) de três análises ($n = 3$).

Figura 8. Níveis de ácido indol-3-acético (■) (AIA) e ácido abscísico (□) (ABA) em diferentes estágios de desenvolvimento de frutos colhidos nas bananeiras da parcela “biodiversidade” (B1, B2, B3, B4, B5 e B6). DPC: dias pós-colheita. Valores expressos como média $\pm$ DP (ng.g⁻¹) de três análises (n = 3).

Figura 9. Dendrograma representando as diferenças entre os conjuntos de frutos. Foi possível agrupar em dois blocos distintos os frutos das parcelas “biodiversidade” (verde) e “controle” (vermelho) utilizando os valores de dissimilaridade (distância euclidiana relativa) a partir do método da ligação completa, com base nos parâmetros de níveis iniciais e finais de AIA, ABA, amido e açúcares solúveis, os valores máximos e de área sob a curva de etileno e respiração, bem como a VV e o período em que foi iniciada a degradação do amido nos diferentes conjuntos de frutos.

Embora não esteja inserida dentro do fragmento florestal, a parcela “biodiversidade” apresenta uma diversidade vegetal maior no entorno da área, o que pode ser capaz de reforçar o controle natural de pragas e patógenos no local quando comparado à parcela “controle”, refletindo nos parâmetros de amadurecimento avaliados no presente estudo.

A diferença menor do que 2% no valor de DPVV entre as duas parcelas e a VV aproximadamente 70% maior nos frutos da área “biodiversidade” permitem inferir que bananas provenientes de áreas próximas à floresta nativa parecem demorar mais para atingir o climatério. Entretanto, quando este é alcançado, os frutos das

duas áreas duram o mesmo período até a senescência. Portanto, a diferença significativa de aproximadamente 30% no DPC entre os frutos das diferentes parcelas é resultado de um período maior de VV nas bananas colhidas próximas ao fragmento florestal, o que também reflete nos resultados distintos de DPC_{CO_2} e $DPC_{C_2H_4}$ entre as áreas.

Para reforçar a hipótese de que os frutos da área “biodiversidade” e “controle” apresentam comportamento similar desde o final da VV até a senescência, não foram observadas diferenças nos valores dos picos máximos e na área sob a curva de respiração e liberação de etileno entre as parcelas. Apesar destes parâmetros não fornecerem uma ideia exata do comportamento das curvas de respiração e liberação de etileno, uma vez que é analisado um único ponto por dia de cada conjunto de bananas, os dados permitem uma estimativa do comportamento das variáveis analisadas no período pós-colheita. Desse modo, como citado anteriormente, os dados obtidos apontam uma mudança que parece temporal nos eventos de amadurecimento nas bananas das diferentes áreas.

Tal fato pode ser explicado, pelo menos em parte, pelos diferentes níveis de severidade de Sigatoka negra nas parcelas, uma vez que já foi observado que tanto a Sigatoka negra como a Sigatoka amarela, esta última causada pelo fungo *Mycosphaerella musicola*, são capazes de reduzir a VV de bananas e, consequentemente, provocar uma alteração no processo de amadurecimento das frutas (ABADIE et al., 2008; CASTELAN et al., 2012. CHILLET et al., 2009).

Diferente do que foi observado no presente estudo, Castelan et al. (2012) verificaram níveis significativamente maiores no pico máximo de respiração ($CO_{2máx}$) e de liberação de etileno ($C_2H_{4máx}$) em frutos provenientes de áreas com elevado índice de infestação.

A aparente contradição entre os resultados pode ser decorrente da relação linear que existe entre o grau de severidade da doença e a VV das bananas (CASTELAN et al., 2013) visto que, a ausência da utilização de agroquímicos na parcela avaliada por Castelan et al. (2012) resultou em IS mais elevados e, consequentemente, refletiu em distúrbios mais pronunciados durante o período pós-colheita das bananas. Segundo Chillet et al. (2009), esta alteração no comportamento pós-colheita dos frutos parece ser decorrente da indução da via de biossíntese de etileno a partir da necrose foliar causada pelo fungo.

Apesar da hipótese de Chillet et al. (2009) ser plausível, uma vez que o aumento nas concentrações de etileno geralmente reduz a VV em frutos climatéricos (ALEXANDER; GRIERSON, 2002), é possível que a alteração dos níveis de outros hormônios, como o AIA e o ABA, preceda os efeitos da doença sobre a biossíntese do etileno.

Estes dois hormônios parecem estar ligados à alteração da sensibilidade do fruto ao etileno, indicando um balanço coordenado entre estas três substâncias durante o amadurecimento (BUTA; SPAULDING, 1994; JIANG; JOYCE; MACNISH, 2000; LOHANI; TRIVEDI; NATH, 2004; PURGATTO, 2001; PURGATTO et al., 2001; 2002). Nesse sentido, já foi observado que o padrão de degradação do amido na polpa de bananas, que é dependente principalmente das concentrações de AIA (FORESTO, 2012; PURGATTO, 2001; PURGATTO et al., 2001; 2002), parece ser diferenciado em frutos provenientes de plantas com graus distintos de severidade de Sigatoka negra (SARAIVA et al., 2013).

Saraiva et al. (2013) também verificaram que a polpa de bananas pré-climatéricas provenientes de áreas com elevados índices de infestação pelo fungo *M. fijiensis* apresentam maiores níveis de ABA e menores de AIA, quando comparados a frutos proveniente de áreas com baixo IS de Sigatoka negra. Porém, ainda não se sabe de que forma a proximidade com a floresta nativa pode influenciar neste mecanismo.

Nesse contexto é importante ressaltar que, apesar da infestação pelo *M. fijiensis* refletir na concentração de hormônios da banana, é necessário ter cautela ao afirmar que os efeitos entre as diferentes parcelas são causados exclusivamente pelos níveis diferenciados de severidade de Sigatoka negra. Diversos estudos já apontaram que as plantas podem interagir com outros vegetais e organismos próximos através da emissão de compostos voláteis (RODRIGUEZ-SAONA; MESCHER; DE MORAES, 2013 e suas referências).

Assim é possível que a parcela “biodiversidade”, situada próxima ao fragmento florestal, responda de maneira diferente aos estímulos ambientais quando comparada à área “controle”, que apresenta apenas monocultivo de banana em sua proximidade. Resultados recentes do nosso grupo de pesquisa (dados ainda não publicados) parecem reforçar esta hipótese. Foi observado que bananas maduras provenientes das diferentes áreas utilizadas no presente estudo apresentam composição de voláteis distintas. Frutas colhidas próximas ao fragmento florestal

parecem produzir uma maior quantidade de aldeídos e alcoóis voláteis de seis carbonos, frequentemente descritos como substâncias que permitem a sinalização entre plantas e outros organismos próximos (ARIMURA et al., 2000; ARIMURA; MATSUI; TAKABAYASHI, 2009; ENGELBERTH et al., 2004; GAQUEREL; BALDWIN, 2013; MATSUI, 2006; SCALA et al., 2013).

Portanto, a proximidade com o fragmento florestal pode estabelecer mecanismos de sinalização característicos entre bananeiras influenciadas pela presença da floresta nativa em seu entorno, o que pode culminar nas diferenças verificadas. A complexidade de fatores que parecem exercer efeitos na modificação do perfil de amadurecimento de bananas colhidas em áreas sob a influência do fragmento florestal é grande, e seu estudo requer diversos tipos de abordagem. No presente trabalho foi avaliado, além dos perfis de liberação de etileno e respiração dos frutos, o perfil de degradação de amido e os níveis de AIA e ABA na polpa de bananas colhidas nas diferentes parcelas.

Os eventos relacionados com a degradação do amido e consequente formação de açúcares solúveis durante o amadurecimento de bananas são influenciados - diretamente ou indiretamente - por fatores bióticos e abióticos. A degradação do amido fornece carbono para a síntese de açúcares (CORDENUNSI; LAJOLO, 1995), e também de compostos voláteis, que irão conferir sabor e aroma característicos da fruta (HUI, 2010; CASTRO-ALVES et al., 2012a; 2012b; FACUNDO et al., 2012). Além disso, evidências apontam que o metabolismo amido-sacarose durante o amadurecimento da banana pode ser responsável pelo amaciamento da polpa da fruta (SHIGA et al., 2011).

Portanto, compreender processos determinantes na qualidade das frutas como a degradação do amido durante o amadurecimento da banana é fundamental para entender a implicação de diferentes processos sobre a qualidade final do produto.

Os teores iniciais e finais de amido e açúcares solúveis foram semelhantes entre os frutos das diferentes parcelas, e são semelhantes aos dados geralmente obtidos para a cultivar Nanicão (CORDENUNSI; LAJOLO, 1995; ROSSETO et al., 2003). Nascimento et al. (2006) verificaram que, em polpa de bananas que duraram 21 DPC, período semelhante ao observado para os frutos da parcela “biodiversidade”, os teores iniciais de amido foram de aproximadamente 22% do peso da polpa fresca e decresceram até valores abaixo de 5%. Quanto aos açúcares

solúveis, estes não são identificados logo após a colheita através da metodologia empregada, entretanto, após a degradação do amido, os níveis destes aumentam até atingirem valores próximos a 15% do peso da polpa fresca. A sacarose é o açúcar predominante, mas também são sintetizadas quantidades relativamente pequenas de glicose e frutose, que geralmente se encontram em proporções próximas a 1:1. Ao final do amadurecimento, a banana Nanicão apresenta aproximadamente 10% de sacarose em relação ao peso fresco da polpa. Já os níveis de glicose e frutose são mais baixos, cada um correspondendo a aproximadamente 3% (NASCIMENTO et al., 2006; ROSSETTO et al., 2003).

Nas principais cultivares de bananas, este perfil de degradação do amido e acúmulo de açúcares solúveis pode ser dividido em três fases. A primeira fase, logo após a colheita dos frutos, é caracterizada pela presença de amido e ausência ou valores baixos de açúcares solúveis, que não ultrapassam 0,5% do peso fresco da polpa. Na segunda fase, ocorre a degradação rápida do amido e concomitante síntese de açúcares solúveis. Esta etapa geralmente não dura mais do que três dias e é caracterizada por alterações no metabolismo da fruta, resultando em níveis elevados de enzimas relacionadas com a degradação do amido e uma redução nas concentrações de AIA (FORESTO, 2012; NASCIMENTO et al., 2006; PURGATTO et al., 2001; 2002). A última etapa, próxima a senescência do fruto, é caracterizada por níveis maiores de açúcares solúveis quando comparado ao amido.

No presente estudo, os frutos provenientes da parcela “controle” apresentam uma transição precoce para a segunda fase do metabolismo amido-sacarose quando comparada as bananas da área “biodiversidade”. Tal fato parece estar correlacionado com a VV e os níveis iniciais (2 DPC) de AIA e ABA na polpa das banana. No presente estudo, foi observado que o início da degradação do amido parece apresentar uma correlação forte e direta com os níveis iniciais de AIA ($p = 0,903$) e a VV ($p = 0,823$) do fruto, bem como uma correlação forte e inversa ($p = -0,794$) com os níveis iniciais de ABA (**Figura 10**).

Apesar de já ter sido observada uma relação entre os níveis de AIA e o início da degradação do amido na polpa de bananas (PURGATTO, 2001; PURGATTO et al., 2001; 2002), até onde sabemos, o presente estudo é o primeiro a demonstrar estatisticamente a correlação entre estes dois parâmetros, bem como a relação entre estes e os níveis iniciais (2 DPC) de ABA e a VV dos frutos.

Figura 10. Gráficos de dispersão (*scatter plots*) e coeficientes de correlação de Spearman (ρ) entre diferentes parâmetros observados para os conjuntos de bananeiras das parcelas "biodiversidade" (■) e "controle" (■). O cálculo do ρ indicou uma correlação forte ($\rho > 0,750$ ou $\rho < -0,750$) e significativa ($p < 0,05$) entre todos os pares de parâmetros avaliados. AIA: ácido indol-3-acético; ABA: ácido abscísico; DPC: dias pós-colheita. Valores expressos como média dos parâmetros analisados.

Fatores abióticos como a redução na temperatura são capazes de retardar os efeitos relacionados à produção de etileno, respiração e degradação do amido em bananas (JIANG; JOYCE; JIANG, 2004), atrasando o processo de amadurecimento da fruta. Além disso, Der Agopian et al. (2011) já observaram que, em temperaturas relativamente baixas (13°C), pode ser observado um aumento na produção de

sacarose. Fatores bióticos também parecem induzir uma modificação no metabolismo amido-sacarose de bananas. Saraiva et al. (2013) verificaram que, além da mudança temporal na degradação do amido, bananas provenientes de áreas infestadas pelo fungo *M. fijiensis* apresentam maiores níveis de açúcares solúveis quando comparadas a áreas com baixo índice de infestação. Como citado anteriormente, apesar do IS de Sigatoka negra ser maior na parcela “controle”, não foi observada uma diferença nos níveis de sacarose, glicose ou frutose de bananas.

A aparente contradição entre os estudos pode ser explicada pelo fato de que Saraiva et al. (2013), por não ter utilizado agroquímicos em uma das parcelas, foi capaz de verificar níveis maiores de infestação de *M. fijiensis*, o que resultou em um distúrbio maior nos eventos relativos ao amadurecimento (CASTELAN et al., 2013) quando comparados aos dados obtidos no presente estudo, onde foram utilizados os mesmos tratamentos culturais nas diferentes parcelas.

Quanto aos perfis dos hormônios, o AIA é frequentemente apontado como a principal auxina em frutas e, apesar de Ghanashyan e Jain (2009) apontarem que o mecanismo de resposta mediado pelo hormônio ainda não está bem elucidado, já foi verificado que esta molécula parece atuar como um fator de resistência à ação do etileno e, conseqüentemente, ao amadurecimento (PURGATTO, 2001; FORESTO, 2012).

Desse modo, níveis mais elevados de AIA nos primeiros dias pós-colheita em frutos da parcela “biodiversidade” poderiam explicar a alteração temporal na degradação do amido, níveis de etileno e o conseqüente período de VV maior nos frutos desta parcela. Esta hipótese é reforçada por Frenkel e Dyck (1973), que observaram que o tratamento de peras com este hormônio promove um retardo no amaciamento e na mudança de coloração da fruta, fato que também foi observado para a banana por nosso grupo de pesquisa (PURGATTO et al., 2001; 2002).

Este atraso no amadurecimento induzido pelo AIA parece ser resultado, pelo menos em parte, dos efeitos deste hormônio sobre a alteração na expressão de receptores de etileno. Foresto (2012) observou que a infiltração do AIA na polpa de bananas cv. Nanica reduzia a transcrição de genes dos receptores de etileno e de enzimas relacionadas com a degradação do amido, sugerindo o possível efeito indireto do AIA sobre o amadurecimento. Entretanto, é provável que este hormônio atue também de maneira direta, uma vez que regiões promotoras de genes de

enzimas relacionadas com a degradação do amido possuem sequências responsivas a auxinas (ASTORINO FILHO, 2008).

No que diz respeito à defesa do tecido vegetal, o nível de AIA parece estar envolvido na modulação de vias de sinalização importantes para a resposta ao estresse biótico, principalmente contra patógenos necrotróficos e hemibiotróficos (CHOENG et al., 2002; DOWD; WILSON; MACFADDEN, 2004; GLAZEBROOK, 2005; NAVARRO et al., 2006). Já na resposta contra organismos biotróficos, o AIA parece exercer um efeito contrário, uma vez que a aplicação do hormônio é capaz de induzir a supressão de genes relacionados com a biossíntese do ácido salicílico, molécula envolvida na resposta de defesa de vegetais contra estes tipos de patógenos (RAHMAN et al., 2012; SPAEPEN; VANDERLEYDEN, 2011; WANG et al., 2007; YAMADA et al., 1993).

Como citado anteriormente, a parcela “biodiversidade” apresentava menores níveis de *M. fijiensis*, um fungo hemibiotrófico (CHUC-UC et al., 2011). Desse modo, os resultados maiores de AIA nesta parcela podem ser resultados de mecanismos mais eficientes de proteção do fruto que se desenvolveu próximo à floresta nativa. No entanto, são necessários mais estudos acerca dos mecanismos de sinalização vegetal, a fim de determinar o grau de influência da biodiversidade sobre as respostas de defesa do tecido vegetal. Nesse sentido, a avaliação do ácido jasmônico e do seu derivado volátil, o metil jasmonato (MeJa), poderia fornecer suporte a hipótese, uma vez que a via de sinalização do AIA parece estar ligada a ação destes hormônios (TIRYAKI.; STASWICK, 2002). Qi et al. (2012) observaram que o MeJa, em conjunto com o AIA, geralmente atua de maneira sinérgica no aumento da expressão de genes relacionados a defesa do vegetal contra patógenos necrotróficos e hemibiotróficos.

Já o nível de AIA semelhante no final do período pós-colheita nos frutos das diferentes parcelas parece ser resultado do eficiente sistema de conjugação do hormônio com outras moléculas, que inativa o AIA de maneira reversível ou irreversível, e mantém em relativo equilíbrio as concentrações deste hormônio na sua forma livre. Tal mecanismo foi observado por Purgatto (2001) e, mais recentemente, por Foresto (2012), que verificaram que os níveis de AIA em polpas de bananas infiltradas com 100 μ M deste hormônio eram cerca de 80 vezes maiores no primeiro dia após a infiltração quando comparadas a polpas não infiltradas. No entanto, após quatro dias, os níveis de AIA não apresentavam diferenças

significativas entre as frutas, sugerindo mecanismos eficientes de controle dos níveis deste hormônio.

Quanto ao perfil de ABA nas diferentes parcelas, é possível verificar que este parece se comportar de maneira semelhante ao etileno. De fato, geralmente é observada uma relação entre os níveis destes hormônios durante o amadurecimento de frutos climatéricos, onde a concentração de ABA parece aumentar e induzir, dessa forma, a biossíntese autocatalítica de etileno (BASTÍAS et al., 2011; ZHANG et al., 2009; ZHANG; YUAN; LENG, 2009).

Apesar dos perfis semelhantes ao etileno e do comportamento similar dos teores de ABA ao longo do amadurecimento nos frutos das diferentes parcelas, foi observado que os níveis de ABA são significativamente maiores na área “controle”.

Em folhas, além do aumento das concentrações de ABA induzir o crescimento, este promove o fechamento dos estômatos, reduzindo a perda de água em condições de estresse abiótico. Esse fechamento também dificulta a penetração de alguns patógenos no hospedeiro atuando, desse modo, frente a condições de estresse biótico (LEE; LUAN, 2012). Nas frutas climatéricas, o ABA parece facilitar o disparo e o progresso da sequência de eventos relacionados ao etileno (JIANG; JOYCE; MACNISH, 2000). Mas por que os níveis de ABA na polpa de frutos provenientes da parcela “controle” são maiores do que o observado na área próxima ao fragmento florestal? Considerando os parâmetros ambientais monitorados nas áreas é possível inferir que estes não são a causa para a diferença na concentração do hormônio. Provavelmente, fatores bióticos podem, direta ou indiretamente, influenciar de maneira distinta as duas parcelas, conforme observado pelo IS de Sigatoka maior na parcela “controle”.

O ABA é capaz de responder a patógenos através da interação com outras substâncias envolvidas nas respostas de defesa, sendo associado geralmente com a supressão do ácido salicílico e consequente inibição da via de biossíntese dos fenilpropanóides, além da indução da via do etileno e do MeJa (ANDERSON et al., 2004; KUSAJIMA et al., 2010; MOHR; CAHILL, 2003; YASUDA et al., 2008). Nesse sentido, Fan et al. (2009) observaram que o mutante de *Arabidopsis thaliana aba3-1*, que apresenta deficiência na biossíntese de ABA, possui um fenótipo resistente a bactéria biotrófica *Pseudomonas syringae*. O tratamento do vegetal com ABA exógeno, por sua vez, aumenta a susceptibilidade do mutante a bactéria, sugerindo um papel do ABA na supressão das respostas de defesa a organismos biotróficos.

Quanto aos organismos necrotróficos e hemibiotróficos como o *M. fijiensis*, o ABA não parece ter um padrão específico, uma vez que as concentrações do hormônio dependem tanto do estresse biótico provocado pelo patógeno, quanto do estresse abiótico que pode ocorrer em consequência da infecção do organismo invasor. A perturbação da homeostase do vegetal induz múltiplas vias de estresse dependentes de uma rede regulatória complexa, onde o ABA parece ser um dos pontos centrais entre a percepção da mudança e a resposta de aclimação da planta ao ambiente (ATKINSON; URWIN, 2012; SÁNCHEZ-VALLET, 2012).

Como citado anteriormente, já foi observado que a infestação por Sigatoka negra na bananeira parece estimular a biossíntese de ABA na polpa da fruta (SARAIVA et al., 2013), semelhante ao que foi observado na parcela “controle”. No entanto, o mecanismo deste aumento não está bem elucidado. A verificação de níveis reduzidos de ácido salicílico e de compostos fenólicos na polpa das frutas da parcela “controle” pode reforçar a hipótese de que o relativo aumento do ABA nesta área é resultado de um mecanismo em resposta a níveis mais elevados de *M. fijiensis* na área, suprimindo a resposta a patógenos biotróficos e estimulando a biossíntese de etileno, MeJa e o fechamento dos estômatos, o local de penetração do fungo (ASENSI-FABADO; MUNNÉ-BOSCH, 2011; HOSSAIN et al., 2011).

De uma forma geral, os resultados apontam que a floresta nativa parece exercer um efeito positivo sobre a área de cultivo próxima, seja pela redução da disseminação de esporos de fungo na área, pela presença de inimigos naturais de pragas no fragmento florestal, ou até através da emissão de compostos voláteis que, por sua vez, induzem as plantas próximas a responderem de maneira mais eficiente a diferentes condições ambientais. Estes mecanismos parecem reduzir o grau de desequilíbrio nas bananeiras da parcela “biodiversidade” ou induzir um mecanismo mais eficiente de manutenção da homeostase do vegetal nesta área.

A compreensão de como a proximidade com a biodiversidade nativa é capaz de influenciar no perfil de hormônios e no perfil de degradação do amido da banana, do ponto de vista da pesquisa básica, pode trazer informações importantes para o entendimento de mecanismos relacionados ao efeito concomitante de fatores bióticos e abióticos sobre o amadurecimento dos frutos. Do ponto de vista prático, a elucidação desta relação fornece bases sólidas que justifiquem a implantação de sistemas mais sustentáveis, trazendo benefícios não somente ambientais, mas

também socioeconômicos pelo entendimento dos fatores que afetam a qualidade dos frutos.

CONCLUSÃO

Apesar da mesma idade fisiológica, frutos colhidos em regiões próximas ao fragmento florestal de Mata Atlântica parecem apresentar um período pós-colheita mais longo quando comparados a frutos provenientes de áreas sem a influência do fragmento florestal próximo. Tal resultado parece estar relacionado, pelo menos em parte, pelos níveis significativamente diferentes dos hormônios AIA e ABA nas polpas das bananas colhidas nas diferentes parcelas, o que parece refletir nos níveis de etileno e no período de degradação do amido na polpa da fruta.

Apesar de não serem conclusivos, os resultados observados fornecem subsídios para elucidar estes mecanismos, trazendo uma perspectiva nova a respeito da importância do estudo dos efeitos concomitantes de múltiplos fatores bióticos e abióticos no vegetal e seu reflexo na qualidade dos frutos produzidos.

REFERÊNCIAS

- ABADIE, C.; HUBERT, O.; NGANDO ESSOH, J.; NGOH, G.; MBÉGUIÉ-A-MBÉGUIÉ, D.; LAPEYRE DE BELLAYRE, L.; CHILLET, M. **Evidence of the effects of *Mycosphaerella* leaf spot diseases on fruit quality.** In: XVIII ACORBAT Meeting, Guayaquil, Equador, 2008.
- ALTIERI, M. A.; TODD, J. W.; HAUSER, E. W.; PATTERSON, M.; BUCHANAN, G. A.; WALKER, R. H. Some effects of weed management and row spacing on insect abundance in soybean fields. **Protection Ecology**, v. 3, n. 4, p. 339-343, 1981.
- ANDERSON, J. P.; BADRUZSAUFARI, E.; SCHENK, P. M.; MANNERS, J. M.; DESMOND, O. J.; EHLERT, C.; MACLEAN, D. J.; EBERT, P. R.; KAZAN, K. Antagonistic interaction between abscisic acid and jasmonate-ethylene signaling pathways modulates defense gene expression and disease resistance in Arabidopsis. **Plant Cell**, v. 12, p. 3460-3479, 2004.
- ARÊAS, J. A. G.; LAJOLO, F. M. **Determinação enzimática específica de amido, glicose, frutose e sacarose em bananas pré-climatéricas e climatéricas.** Anais de Farmácia e Química de São Paulo, v. 20, p. 307-318, 1980.
- ARIMURA, G.; MATSUI, K.; TAKABAYASHI, J. Chemical and molecular ecology of herbivore-induced plant volatiles: proximate factors and their ultimate functions. **Plant and Cell Physiology**, v. 50, p. 911-923, 2009.

ASCENSI-FABADO, M. A.; MUNNÉ-BOSCH, S. The aba3-1 mutant of *Arabidopsis thaliana* withstands moderate doses of salt stress by modulating leaf growth and salicylic acid levels. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 30, p. 456-466, 2011.

ASSELBERGH, B.; DE VIEESSCHAUWER, D.; HOFTE, M. Global switches and fine-tuning ABA modulates plant pathogen defense. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 21, p. 709-719, 2008.

ASTORINO FILHO, R. **Caracterização funcional do gene maBMY que codifica para uma beta-amilase endereçada a plastídeos e expressa durante o amadurecimento da banana**. 95 f. Tese (Doutorado em Ciências dos Alimentos), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo-SP, 2008.

ATKINSON, N. J.; URWIN, P. E. The interaction of plant biotic and abiotic stresses: from genes to the field. **Journal of Experimental Botany**, v. 63, p. 3523-3543, 2012.

BASTÍAS, A.; LÓPEZ-CLEMENT, M.; VALCÁREL, M.; ROSELLO, S.; GÓMEZ-CADENAS, CASARETTO, J. A. Modulation of organic acids and sugar content in tomato fruits by an Absciscic acid-regulated transcription factor. **Physiologia Plantarum**, v. 141, p. 215-226, 2011.

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

BORGES, A. L. **Recomendação de adubação para a bananeira**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2004. (Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, Comunicado Técnico, 106).

BORGES, A. L.; SILVA, A. L.; BATISTA, D. G.; MOREIRA, F. R. B.; FLORI, J. E.; OLIVEIRA, J. E. M.; ARAÚJO, J. L. P.; PINTO, J. M.; CASTRO, J. M. C.; MOURA, M. S. B.; AZOUBEL, P. M.; CUNHA, T. J. F.; SILVA, S. O.; CORDEIRO, Z. J. M. **Sistema de produção da bananeira irrigada**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2009. (Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, Sistemas de Produção, 4).

BUTA, J. G.; SPAULDING, D. W. Changes in indole-3-acetic acid and abscisic acid levels during tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) fruit development and ripening. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 13, p. 163-166, 1994

CASTELAN, F. P.; ABADIE, C.; HUBERT, O.; CHILI-CHARLES, Y.; LAPEYRE DE BELLAIRE, L.; CHILLET, M. Relation between the severity of Sigatoka disease and banana quality characterized by pomological traits and fruit green life. **Crop Protection**, v. 50, p. 61-65, 2013.

CASTELAN, F. P.; SARAIVA, L. A.; LANGE, F.; LAPEYRE DE BELLAIRE, L.; CORDENUNSI, B. R.; CHILLET, M. Effects of black leaf streak 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. **Efeitos da infestação de Sigatoka amarela e Sigatoka negra sobre a qualidade das bananas**. 91 f. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Alimentos), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo-SP, 2012.

CASTRO-ALVES, V. C.; PEREIRA, G. S.; PINTO, N. O.; PENHA, M. F. A.; GARRUTI, D. S. Sensory and volatile compounds profile of Thap Maeo banana: An option for the replacement of pest-susceptible cultivars. **The Natural Products Journal**, v. 2, p. 205-211, 2012a.

CASTRO-ALVES, V. C.; PENHA, M. F. A.; PINTO, N. O.; GARRUTI, D. S. Volatile compounds profile of Musa Fhia 02: an option to counter losses by black Sigatoka. **The Natural Products Journal**, v. 2, p. 55-60, 2012b.

CHILLET, M.; ABADIE, C.; HUBERT, O.; CHILIN-CHARLES, Y.; LAPERYE DE BELLAIRE, L. Sigatoka disease reduces the green life of bananas. **Crop Protection**, v. 28, p. 41-45, 2009.

CHILLET, M.; LAPEYRE DE BELLAIRE, L.; OLIVIER, H.; MBÉGUIÉ-A-MBÉGUIÉ, D. Measurement of banana green life. **Fruits**, v. 63, p. 125-127, 2008.

CHOENG, Y. H.; CHANG, H. S.; GUPTA, R.; WANG, X.; ZHU, T.; LUAN, S. Transcriptional profiling reveals novel interactions between wounding, pathogen, abiotic stress and hormonal responses in Arabidopsis. **Plant Physiology**, v. 129, p. 661-77, 2002.

CHUC-UC, J.; BRITO-ARGÁEZ, L.; CANTO-CANCHÉ, B.; TZEC-SIMÁ, M.; RODRÍGUEZ-GARCIA, C.; PERAZA-ECHEVERRÍA, L.; PERAZA-ECHEVERRÍA, S.; JAMES-KAY, A.; CRUZ-CRUZ, C. A.; PEÑA-RODRÍGUEZ, L.M.; ISLAS-FLORES, I. The in vitro secretome of *Mycosphaerella fijiensis* induces cell death in banana leaves. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 49, p. 572-578, 2011.

CORDENUNSI, B. R.; LAJOLO, F. M. Starch breakdown during banana ripening: Sucrose synthase and sucrose phosphate synthase. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 43, p. 347-351, 1995.

DOMINGUES, A. R. **Produção de banana 'Nanicão' (Musa sp. AAA) em clima Cwa**. 79 p. Dissertação (Mestrado em Ciências), Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba-SP, 2011.

DOWD, C.; WILSON, I. W.; MCFADDEN, H. Gene expression profile changes in cotton root and hypocotyl tissues in response to infection with *Fusarium oxysporum* f. sp. vasinfectum. **Molecular Plant-Microbe Interaction**, v. 17, p. 654-667, 2004.

ENGELBERTH, J.; ALBORN, H. T.; SCHMELZ, E. A.; TUMLINSON, J. H. Airborne signals prime plants against insect herbivore attack. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, p. 1781-1785, 2004.

FACUNDO, H. V. V.; GARRUTI, D. S.; CORDENUNSI, B. R.; LAJOLO, F. M. Influence of different banana cultivars on volatile compounds during ripening in cold storage. **Food Research International**, v. 49, p. 626-633, 2012.

FAN, J.; HILL, L.; CROOKS, C.; DOERNER, P.; LAMB, C. Absciscic acid has a key role in modulating diverse plant-pathogen interactions. **Plant Physiology**, v. 150, p. 1750-1761, 2009.

FAOSTAT - Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Food and agricultural commodities production** - Final 2011 data, 2012. Disponível em: <<http://faostat3.fao.org/home/index.html>>. Acesso em: 29 jul 2013.

FORESTO, M. F. **Influência da aplicação de ácido indol-3- acético na expressão dos receptores de etileno e na atividade de duas enzimas relacionadas ao metabolismo de amido em bananas**. 62 f. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Alimentos), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo-SP, 2012.

FRENKEL, C.; DYCK, R. Auxin inhibition of ripening in barlett pears. **Plant Physiology**, v. 51, p. 6-9, 1973.

GANRY, 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.

GAQUEREL, E.; BALDWIN, I. T. Honing in on phenotypes: comprehensive two-dimensional gas chromatography of herbivory-induced volatile emissions and novel opportunities for system-level analyses. **AoB Plants**, v. 5, p. 1-10, 2013.

GHANASHYAM, C.; JAIN, M. Role of auxin-responsive genes in biotic stress responses. **Plant Signaling and Behavior**, v. 4, p. 846-848, 2009.

GLAZE BROOK, J. Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, v. 43, p. 205-227, 2005.

HOSEIN, H. K. M.; ZINAB, D. Phenolic compounds and antioxidant activity of Henna leaves extracts (*Lawsonia inermis*). **World Journal of Dairy and Food Sciences**, v. 2, p. 38-41, 2007.

HUI, Y. H. **Handbook of fruit and vegetable flavors**. 1 ed. New Jersey: John Wiley and Sons, 2010. 1095 p.

JIANG, Y.; JOYCE, D. C.; JIANG, W.; LU, W. Effects of chilling temperatures on ethylene binding by banana fruit. **Journal of Plant Growth Regulators**, v. 43, p. 109-115, 2004.

JIANG, Y.; JOYCE, D. C.; MACNISH, A. J. Effect of abscisic acid on banana fruit ripening in relation to the role of ethylene. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 19, p. 106-111, 2000.

JONES, D. R. Disease and pest constrains to banana production. **Acta Horticulturae**, v. 828, p. 21-36, 2009.

KUSAJIMA, M.; YASUDA, M.; KAWASHIMA, A.; NIJIRI, H.; YAMANE, H.; NAKAJIMA, M.; AKUTSU, K.; NAKASHITA, H. Suppressive effect of abscisic acid on systemic acquired resistance in tobacco plants. **Journal of General Plant Pathology**, v. 76, p. 161-167, 2010.

LEE, S. C.; LUAN, S. ABA signal transduction at the crossroad of biotic and abiotic stress responses. **Plant, Cell and Environment**, v. 35, p. 53-60, 2012.

LEVENE, H. Robust tests for equality of variances. In: OLKIN, I.; GHURYE, S. G.; HOEFFDING, W.; MADOW, W. G.; MANN, H. B. (Ed). **Contributions to probability and statistics: essays in honor of Harold Hotelling**. Stanford: Stanford University Press, 1960. p. 278-292.

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.

LUDWIG-MÜLLER, J.; GEORGIEV, M.; BLEY, T. Metabolite and hormonal status of hairy root cultures of Devil's claw (*Harpagophytum procumbens*) in flasks and in bubble column bioreactor. **Process Biochemistry**, v. 43, p. 15-23, 2008.

LUNA, E.; PASTOR, V.; ROBERT, J.; FLORS, V.; MAUCH-MANI, B.; TON, J. Callose deposition: a multifaceted plant defense response. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 169, p. 695-703, 2011.

MANN, H. B.; WHITNEY, D. R. On a test of whether one of two random variables is stochastically larger than the other. **Annals of Mathematical Statistics**, v. 18, p. 50-60, 1947.

MATSUI, K. Green leaf volatiles: hydroperoxide lyase pathway of oxylipin metabolism. **Current Opinion on Plant Biology**, v. 9, p. 274-280, 2006.

MOHR, P. G.; CAHILL, D. M. Absciscic acid influences the susceptibility of *Arabidopsis thaliana* to *Pseudomonas syringae* pv. tomato and *Peronospora parasitica*. **Functional Plant Biology**, v. 30, p. 461-469, 2003.

MORAES, G. I. Estratégias para a comercialização da banana no Vale do Ribeira. **Cadernos de Economia**, v. 20, p. 119-128, 2007.

NASCIMENTO, J. R. O.; JÚNIOR, A. V.; BASSINELLO, P. Z.; CORDENUNSI, B. R.; MAINARDI, J. A. Beta-amylase expression and starch degradation during banana ripening. **Postharvest Biology and Technology**, v. 40, p. 41-47, 2006.

NAVARRO, L.; DUNOYER, P.; JAY, F.; ARNOLD, B.; DHARMASIRI, N.; ESTELLE, M.; VOINET, O.; JONES, J. D. G. A plant miRNA contributes to antibacterial resistance by repressing auxin signaling. **Science**, v. 312, p. 436-439, 2006.

PAVARINI, R.; PAVARINI, G. M. P.; GOMES, J. M.; PINOTTI, E. B.; MARZOLA, D.; RESENDE, R. Influência das diferentes estações do ano na ocorrência de adultos de *Cosmopolites sordidus* (Coleoptera: Curculionidae). **Revista Científica Eletrônica de Agronomia**, v. 16, p. 07-11, 2009.

PECH, J.; PURGATTO, E.; BOUZAYEN, M.; LATCHÉ, A. Ethylene and fruit ripening. **Annual Plant Reviews**, v. 44, p. 275-304, 2012.

PURGATTO, E. **Efeito do ácido 3-indol 3-acético no metabolismo amido-sacarose da banana**. 133f. Tese (Doutorado em Ciências dos Alimentos), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo-SP, 2001.

PURGATTO, E.; LAJOLO, F. M.; NASCIMENTO, J. R. O.; CORDENUNSI, B. R. The onset of starch degradation is concomitant to changes in the content of free and conjugated forms of indole-3-acetic acid. **Journal of Plant Physiology**, v. 158, p. 1105-1111, 2002.

PURGATTO, E.; LAJOLO, F. M.; NASCIMENTO, J. R. O.; CORDENUNSI, B. R. Inhibition of β -amylase activity, starch degradation and sucrose formation by indole-3-acetic acid during banana ripening. **Planta**, v. 212, p. 823-828, 2001.

QI, L.; YAN, J.; LI, Y.; JIANG, H.; SUN, J.; CHEN, Q.; CHU, J.; YAN, C.; SUN, X.; YU, Y.; LI, C. LI, C. Arabidopsis thaliana plants differentially modulate auxin biosynthesis and transport during defense responses to the necrotrophic pathogen *Alternaria brassicicola*. **The New Phytologist**, v. 195, p. 872-882, 2012.

RAHMAN, T. A. E.; OIRDI, M. E.; GONZALEZ-LAMOTHE, R.; BOUARAB, K. Necrotrophic pathogens use the salicylic acid signaling pathway to promote disease development in tomato. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 12, p. 1584-1593, 2012.

RODRIGUEZ-SAONA, C. R.; MESCHER, M. C.; DE MORAES, C. **The role of volatiles in plant-plant interactions**. In: BALUSKA, F. (Org.). Long-distance systemic signaling and communication in plant. Berlim: Springer-Verlag, 2013. p. 393-412.

ROSSETTO, M. R. M.; PURGATTO, E.; NASCIMENTO, J. R. O.; LAJOLO, F. M. CORDENUNSI, B. R. Effects of giberellic acid on sucrose metabolism accumulation and sucrose biosynthesis enzymes activity during ripening. **Plant Growth Regulators**, v. 41, p. 207-214, 2003.

SÁNCHEZ-VALLET, A.; LÓPEZ, G.; RAMOS, B.; DELGADO-CEREZO, M.; RIVIERE, M. P.; LLORENTE, F.; FERNÁNDEZ, P. V.; ESTEVEZ, J. M.; GRANT, M.; MOLINA, A. Disruption of abscisic acid signaling constitutively activates Arabidopsis resistance to the necrotrophic fungus *Plectosphaerella cucumerina*. **Plant Physiology**, v. 160, p. 2109-2124, 2012.

SARAIVA, L. A.; CASTELAN, F. P.; SHITAKUBO, R.; HASSIMOTO, N. M. A.; PURGATTO, E.; CHILLET, M.; CORDENUNSI, B. R. Black leaf streak disease

affects starch metabolism in banana fruit. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, p. 5582-5589, 2013.

SCALA, A.; MIRABELLA, R.; MUGO, C.; MATSUI, K.; HARING, M. A.; SCHUURINK, R. C. E-2-hexenal promotes susceptibility to *Pseudomonas syringae* by activating jasmonic acid pathways in Arabidopsis. **Frontiers in Plant Science**, v. 4, art. 74, 2013.

SHAPIRO, S. S.; WILK, M. B. An analysis of variance test for normality (complete sample). **Biometrika**, v. 52, n. 3, p. 591-611, 1965.

SHIGA, T. M.; SOARES, C. A.; NASCIMENTO, J. R. O.; PURGATTO, E.; LAJOLO, F. M.; CORDENUNSI, B. R. Ripening-associated changes in the amounts of starch and non-starch polysaccharides and their contributions to fruit softening in three banana cultivars. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 91, n. 8, p. 1511-1516, 2011.

SPAEPEN, S.; VANDERLEYDEN, J. Auxin and plant-microbe interactions. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 3, art. a001438, 2011.

SPONHOLZ, C.; BATISTA, U. G.; ZAMBOLIM, L.; SALOMÃO, L. C. C.; CARDOSO, A. Efeito do tratamento hidrotérmico e químico de frutos de banana 'Prata' no controle da antracnose em pós-colheita. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, p. 480-485, 2004.

STOVER, R. H. Distribution and cultural characteristics of the pathogens causing banana leaf spot. **Tropical Agriculture**, v. 53, p. 111-114, 1976.

TEIXEIRA, L. A. J.; VAN RAIJ, B.; BETTIOL NETO, J. E. Estimativa das necessidades nutricionais de bananeiras do subgrupo Cavendish cultivadas no Estado de São Paulo. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 30, p. 540-545, 2008.

TIRYAKI, I.; STASWICK, P. E. An Arabidopsis mutant defective in jasmonate response is allelic to the auxin-signaling mutant *axr1*. **Plant Physiology**, v. 130, p. 887-894, 2002.

TON, J.; FLORS, V.; MAUCH-MANI, B. The multifaceted role of ABA in disease resistance. **Trends in Plant Science**, v. 14, p. 310-317, 2009.

VON LOESECKE, H. W. **Bananas: chemistry, physiology, technology**. 1 ed. Interscience Publishers: New York, 1950. 189 p.

WANG, D. PAJEROWSKA-MUKHTAR, K.; CULLER, A. H.; DONG, X. Salicylic acid inhibits pathogen growth in plants through repression of the auxin. signaling pathway. **Current Biology**, v. 17, p. 1784-1790, 2007.

YAMADA, T. The role of auxin in plant-disease development. **Annual Review of Phytopathology**, v. 31, 1993, p. 253-273, 1993.

YASUDA, M.; ISHIKAWA, A.; JIKUMARU, Y.; SEKI, M.; UMEZAWA, T.; ASAMI, T.; MARUYAMA-NAKASHITA, A.; KUDO, T.; SHINOZAKI, K.; YOSHIDA, S.; NAKASHITA, H. Antagonistic interaction between systemic acquired resistance and the abscisic acid-mediated abiotic stress response in Arabidopsis. **Plant Cell**, v. 20, p. 1678-1692, 2008.

ZHANG, M.; LENG, P.; ZHA, G. L.; LI, X. X. Cloning and functional analysis of 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase (NCED) genes encoding a key enzyme during abscisic acid biosynthesis from peach and grape fruits. **Journal of Plant Physiology**, v. 166, p. 1241-1252, 2009.

ZHANG, M.; YUANG, B.; LENG, P. The role of ABA in triggering ethylene biosynthesis and ripening of tomato fruit. **Journal of Experimental Botany**, V. 60, p. 1579-1588, 2009.

5. CAPÍTULO 2

Influência da proximidade do fragmento florestal de Mata Atlântica sobre compostos fenólicos de folhas de bananeiras (*Musa acuminata* AAA cv. Nanicão): otimização de metodologia para a obtenção e avaliação de compostos fenólicos solúveis

Victor C. Castro-Alves^a; Florence P. Castelan^a; Lorenzo A. Saraiva^a; Talita P. Nascimento^a; Maria Fernanda N. S. Calháu^a; Beatriz R. Cordenunsi.^{a,b}

^aDepartamento de Alimentos e Nutrição Experimental; ^b Núcleo de Apoio à Pesquisa em Alimentos e Nutrição - Universidade de São Paulo (USP) - Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 14 - Cid. Universitária, CEP 05508-000, São Paulo, SP, Brasil.

RESUMO

Entre a grande diversidade de reações e produtos envolvidos na resposta de defesa de vegetais ao estresse biótico, os compostos fenólicos têm sido repetidamente propostos como potenciais participantes nos mecanismos de defesa. Nesse sentido, o presente estudo visou a otimização de uma técnica de extração sólido-líquido (ESL) para a extração de compostos fenólicos solúveis totais (CFST) nas lâminas das folhas de bananeiras (*Musa acuminata* AAA cv. Nanicão), que se mostrou simples, rápida e barata. Utilizando esta técnica, amostras de folhas provenientes de áreas de cultivo, influenciadas ou não pela presença de biodiversidade em seu entorno e com níveis distintos de severidade de Sigatoka negra, foram analisadas quanto aos níveis de CFST. A utilização da ESL com dois ciclos de extração empregando acetona 80% em água (v/v) e posterior emprego de hexano para a remoção do excesso de clorofilas foi capaz de obter um bom rendimento de extração de CFST sem extrair compostos que interferem significativamente no método de Folin-Ciocalteu. Também observado que lâminas de folhas de bananeiras cultivadas próximas à floresta nativa apresentaram maiores quantidades de CFST quando comparadas a plantas sem a influência do fragmento florestal. Assim, a avaliação dos CFST em folhas parece ser uma ferramenta útil para a comparação de bananeiras submetidas a diferentes condições de estresse.

Palavras-chave: Bananeira. Biodiversidade. Compostos fenólicos. Folha. Sigatoka negra.

ABSTRACT

Phenolic compounds have been repeatedly proposed as potential participants in the defense mechanisms among the wide variety of reactions and products involved in the defense response of plants to biotic stress. The present study aimed to optimize a solid-liquid extraction (SLE) technique to extract total phenolics soluble compounds

(TSPC) in bananas (*Musa acuminata* AAA cv. Nanicão) leaves. The TSPC profiles were evaluated in banana leaves from both areas with different levels of severity of black leaf streak disease. The results showed that the technique was simple, fast and economic and the use of two cycles with acetone (80% v/v in water) and posterior hexane cycle in order to remove chlorophylls excess was able to obtain a good TSPC extraction yield without extract compounds that interfere in the Folin-Ciocalteu method. The results also showed that banana leaves from plants grown near to the native forest had higher levels of TSPC. Thus, the evaluation of TSPC in leaves seems to be a useful tool for comparing bananas exposed to different stress conditions.

Keywords: Banana tree. Biodiversity. Phenolic compounds. Leaf. Black leaf streak disease.

INTRODUÇÃO

As principais cultivares de bananas comercializadas no país são susceptíveis ao fungo *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, causador da Sigatoka negra (DOMINGUES, 2011; GARRUTI et al., 2012). Esta doença é apontada atualmente como o principal problema fitopatológico na bananicultura mundial. A doença inicia-se geralmente nas folhas mais novas e evolui para as mais velhas, provocando sintomas como estrias marrons e manchas negras necróticas, que afetam os tecidos fotossintetizantes e, conseqüentemente, a qualidade dos frutos e a produtividade da planta, levando a perdas de até 100% na produção (CASTELAN et al., 2012; MORAES et al., 2011).

Segundo Cavalcante (2012), apesar da influência negativa desta doença na produção mundial de banana, o patossistema *Musa acuminata* x *Mycosphaerella fijiensis* é pouco documentado no que se refere ao entendimento dos mecanismos desta interação. Acredita-se que os mecanismos de defesa da planta podem ser atribuídos a fatores fisiológicos e bioquímicos, iniciados logo após a penetração estomática da hifa do fungo no tecido do hospedeiro (CAVALCANTE, 2012; EWANÉ et al., 2012; HOSS; HELBIG; BOCHOW, 2000; TRAORE et al., 2008). Dentre os diversos mecanismos de aclimação que a planta é capaz de induzir em resposta ao ataque de um fungo, a síntese de compostos fenólicos parece apresentar um papel importante na defesa do tecido. A comparação de cultivares parcialmente resistentes e sensíveis ao *M. fijiensis* indicou que as bananeiras sensíveis ao fungo parecem apresentar uma menor quantidade de compostos fenólicos solúveis totais (CFST) (BEVERAGGI; MOURICHON, SALLÉ, 1995; EWANÉ, 2012), fato que

também foi observado em bananeiras sensíveis a nematódeos (WUYTS et al., 2007).

Além disso, estes compostos podem ser sintetizados em situações de estresse abiótico e, portanto, parecem ser importantes nas respostas de aclimação das plantas (DIXON; PAIVA, 1995; NIGGEWEG; MICHAEL; MARTIN, 2004; RICE-EVANS; MILLER; PAGANGA, 1996; WU; JIANG; WU, 2013). Assim, a avaliação dos compostos fenólicos em folhas de bananeiras pode ser útil, tanto na investigação da resposta do tecido vegetal ao ataque de fungos, em particular o *M. fijiensis*, quanto na avaliação dos mecanismos de aclimação da planta a diferentes condições ambientais. Entretanto, até o presente momento, não se tem conhecimento de estudos que otimizaram metodologias para a extração de fenólicos em folhas de bananeiras.

O procedimento de extração de compostos fenólicos de matrizes vegetais é influenciado não somente pela natureza, quantidade e tamanho das partículas da matriz analisada, mas também pelo tipo de técnica empregada (DAI; MUMPER, 2010; KHODDAMI; WILKES; ROBERTS, 2013; LAPORNIK; PROSEK; WONDRA, 2005). Portanto, a utilização de uma metodologia adaptada de outra fonte, deve ser rigorosamente avaliada quanto ao seu rendimento de extração e verificação dos interferentes na quantificação.

Técnicas de extração sólido-líquido (ESL) como a maceração e a extração a quente por refluxo ainda são bastante descritas por conta do baixo custo e relativa simplicidade. No entanto, além de empregar, na maioria das vezes, quantidades relativamente grandes de solventes orgânicos, processos de extração longos e elevadas temperaturas, fatores que aumentam a ocorrência de reações de oxidação, hidrólise e complexação de compostos fenólicos com outras substâncias da matriz vegetal (DAI; MUMPER, 2010; KHODDAMI; WILKES; ROBERTS, 2013; SANTANA et al., 2009). O aquecimento também é uma desvantagem na utilização da técnica de micro-ondas que tem o seu emprego limitado para a extração de substâncias específicas, como alguns ácidos fenólicos (p.ex. ácido gálico e ácido elágico) (LI et al., 2004), quercetina (HUANG; ZHNAG, 2004), isoflavonas (ROSTAGNO; PALMA; BARROSO, 2007) e o trans-resveratrol (DU; XIAO; LI, 2007), substâncias que apresentam relativa estabilidade a temperaturas mais elevadas.

O uso de ultrassom associado à extração com solventes orgânicos foi empregado com relativo sucesso para amostras da parte aérea de girassol

(*Helianthus annuus*) (TAHA et al., 2011) e erva-cidreira (INCE; SAHIN; SÜMNÜ, 2013), folhas de milefólio (*Achillea biebersteinii*) (BASHI et al., 2012) e loureiro (*Laurus nobilis*) (MUÑIZ-MÁRQUEZ et al., 2013) e casca de laranja (*Citrus sinensis*) (KHAN et al., 2010). Apesar de não necessitar da utilização de instrumentos complexos, apresentando custo relativamente baixo (VINATORU, 2001), a elevada amplitude de frequência e força das ondas sonoras utilizadas para a extração de compostos fenólicos tornam o processo de otimização lento e o emprego de frequências ou forças elevadas podem induzir reações de polimerização de compostos fenólicos (MA et al., 2009; SANTOS-BUELGA et al., 2012).

Técnicas que utilizam fluido supercrítico (GELMEZ; KINCAL; YENER, 2009), pressão hidrostática elevada (SHOUQIN; JUN; CHANGZHENG, 2005) ou pulso de campo elétrico (DELSART et al., 2012; LÓPEZ et al., 2008) não requerem a utilização de solventes orgânicos, mas tem seu emprego limitado devido o alto custo (KHODDAMI; WILKES; ROBERTS, 2013; SANTOS-BUELGA et al., 2012). Desse modo, a utilização de técnicas que requerem o emprego de solventes ainda são os procedimentos mais comuns para a extração de compostos fenólicos em plantas (SANTOS-BUELGA et al., 2012).

Além das técnicas existentes para a extração de compostos fenólicos solúveis totais (CFST), já foram desenvolvidos diversos métodos visando a quantificação dos compostos desta classe (p.ex. método de Folin-Denis, Folin-Ciocalteu, titulação com permanganato de potássio, colorimetria com sais de prata e medida da absorbância em região ultravioleta) (DAI; MUPER, 2010; SINGLETON; ORTHOFER; LAMUELA-RAVENTOS, 1999). Dentre estas, a quantificação dos CFST pelo método de Folin-Ciocalteu (F-C) parece ser a mais utilizada, tendo em vista sua simplicidade, baixo custo e elevada reprodutibilidade, sendo largamente empregada na quantificação de CFST em tecidos vegetais (DAI; MUMPER, 2010) (**Figura 1**).

Figura 1. Reação entre compostos fenólicos e o reagente de Folin-Ciocalteu (F-C). (1) Compostos fenólicos (p.ex. ácido gálico) em meio básico (Na_2CO_3) geram ânions (fenolatos) que, por sua vez, (2) reagem com o complexo fosfomolibdídico e fosfotungstíco no qual o molibdênio, que quando se encontra na cor amarela ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), sofre redução formando um complexo de coloração azul (possivelmente $\text{PMoW}_{11}\text{O}_{40}^{-4}$). Adaptado de Oliveira et al., 2009a.

O método F-C é capaz de quantificar a capacidade redutora do extrato avaliado. Desse modo, compostos não fenólicos como o ácido ascórbico e alguns açúcares redutores podem interferir na quantificação dos CFST, levando a superestimação do conteúdo de fenólicos (OLIVEIRA et al., 2009b). Portanto, recomenda-se a quantificação ou a eliminação destes interferentes antes da determinação dos CFST (SUN et al., 2002). Ainda assim, apesar das limitações, a investigação do conteúdo de compostos fenólicos em tecidos vegetais por meio da utilização de técnicas rápidas e eficientes de extração pode fornecer pistas de respostas do metabolismo de tecidos vegetais frente a alterações nas condições ambientais.

Tendo em vista a necessidade de aprofundar os estudos sobre a relação entre compostos fenólicos nas folhas e doenças ou condições ambientais que afetam a bananeira, o presente estudo mostra os resultados obtidos com o desenvolvimento de uma técnica de extração sólido-líquido (ESL) simples, rápida e barata para a extração de CFST nas lâminas das folhas desta planta. Ao final do desenvolvimento da técnica, foi verificado que compostos interferentes na quantificação pelo método de Folin-Ciocalteu (açúcares redutores e ácido ascórbico) não eram extraídos pelo método otimizado e que o excesso de clorofila poderia ser

removido a partir do emprego de hexano, sem a redução significativa na quantidade de CFST extraída. Além disso, a comparação entre os extratos de CFST de folhas provenientes de áreas de cultivo influenciadas ou não pela presença de biodiversidade e com níveis distintos de infestação pelo fungo *M. fijiensis*, indicaram diferenças significativas nas quantidades de fenólicos demonstrando, desse modo, o potencial da análise dos CFST em folhas na comparação de plantas submetidas a diferentes condições ambientais.

MATERIAL E MÉTODOS

Material

Duas áreas de cultivo, denominadas parcela “biodiversidade” e “controle”, foram selecionadas no bairro rural do Guapiruvu, no município de Sete Barras-SP, região do Vale do Ribeira, por meio da avaliação de fotos aéreas, entrevistas com agricultores locais e padronização das condições climáticas e de cultivo (**Figura 2**).

A área “biodiversidade” apresentava fragmento remanescente de Mata Atlântica no entorno de 60% do seu perímetro e a distância máxima do fragmento florestal para qualquer ponto desta parcela não ultrapassava os 40 m, sendo o restante do perímetro circundado por cultivo convencional banana. Já a parcela “controle”, que apresentava em todo o seu entorno áreas de monocultivo de banana, onde o fragmento florestal mais próximo se encontra a mais de 200 m da área de cultivo, distância suficiente para evitar os efeitos da floresta nativa sobre a parcela (ALTIERI et al., 1981).

As parcelas selecionadas possuíam o mesmo histórico de tratamentos culturais e eram próximas entre si (aproximadamente 200 m de distância), o que permitia inferir condições edafoclimáticas semelhantes (relevo, regime de chuvas, nutrição do solo e temperatura e umidade do ar). A principal diferença observada entre as áreas era a presença de floresta nativa no entorno de uma das parcelas e o índice de severidade de Sigatoka negra nas bananeiras utilizadas no estudo (**Quadro 1**).

Figura 2. Distribuição das parcelas experimentais - áreas em branco. A área “biodiversidade” possui fragmento remanescente de Mata Atlântica no entorno de 60% do seu perímetro, enquanto a área “controle” apresenta monocultivo de banana em todo o seu perímetro, estando distante a mais de 200 m de qualquer remanescente florestal. Escala aproximada. Fonte: *Software Google Earth v 7.0*.

Para os ensaios de desenvolvimento da técnica foi coletada a porção central da terceira folha de bananeiras (*Musa acuminata* AAA cv. Nanicão) ($n = 16$) provenientes das duas parcelas experimentais, a contar do ápice da planta, conforme descrito por Borges (2004). Foram realizadas duas sessões de coleta entre os meses de novembro e dezembro de 2012 e selecionadas quatro porções de aproximadamente 5 cm^2 da porção interna mediana da lâmina de cada folha, eliminando-se a nervura central.

Após a coleta das folhas, as amostras foram acondicionadas individualmente em sacos de papel, armazenadas em caixas térmicas com gelo e encaminhadas para o Laboratório de Química, Bioquímica e Biologia Molecular de Alimentos (FCF-USP), onde foram higienizadas em água corrente, congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ para as análises subsequentes. Para cada ensaio de otimização, as amostras foram maceradas em nitrogênio líquido, formando um *pool* representativo de todas as bananeiras coletadas ($n = 16$). Para a comparação das diferentes parcelas experimentais, utilizou-se a metodologia otimizada para extração dos CFST em um *pool* de lâminas de folhas de cada parcela experimental ($n = 8$).

Quadro 1. Características das parcelas “biodiversidade” e “controle”. As parcelas apresentavam o mesmo histórico de tratos culturais e espaçamento entre plantas. Além disso, as mesmas apresentavam relevo semelhante e a relativa proximidade entre estas permitia inferir regime de chuvas iguais.

Características	Parcela "biodiversidade"	Parcela "controle"
Proximidade com o fragmento florestal	60% de fragmento florestal no entorno da parcela	Distância maior que 200 m do fragmento florestal
Tipo de solo	Latossolo amarelo	Latossolo amarelo
Macro e micronutrientes no solo e na folha	Níveis adequados*	Níveis adequados*
Índice de severidade de sigatoka negra**	11,7 ± 7,8% (colheita)	46,0 ± 8,5% (colheita)

* Níveis dentro da faixa considerada normal para a bananeira (*Musa acuminata* cv. AAA Nanicão) segundo Borges (2004), Borges et al. (2009) e Teixeira, Van Raij e Bettiol Neto (2008); ** Segundo metodologia descrita por Stover (1971) e modificada por Gahul (1993) (n = 8) (Resultados da tese de Florence Polegato Castelan, dados ainda não publicados).

Métodos

Extração e quantificação dos compostos fenólicos solúveis totais (CFST)

Para obtenção dos CFST foi utilizada como base a técnica de ESL para análise de raízes e folhas de bananeiras, descritas por Ascensao e Dubery (2003) e Companioni et al. (2005), respectivamente. Foi utilizado aproximadamente 250 mg do *pool* de lâminas de folhas frescas trituradas para cada análise. Cada ciclo de extração foi definido como: a adição de 800 µL de um solvente extrator a amostra em um microtubo âmbar, seguido de homogeneização (3000 rpm; 15 s) e centrifugação (14000 g; 4 °C; 15 min) do material para obtenção do extrato, conforme ilustrado na **Figura 3**.

A quantificação dos compostos fenólicos foi realizada conforme descrito por Swain e Hillis (1959), utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu. Na reação, foram adicionados 2 mL de água destilada, 250 µL do extrato obtido na ESL e 250 µL do reagente de Folin-Ciocalteu diluído (1:1) em água deionizada, seguido de homogeneização e incubação (3 min) a temperatura ambiente. Após este período, foram adicionados 250 µL de solução aquosa saturada de Na₂CO₃ e o material foi

novamente homogeneizado e incubado (30 min; 37°C), sendo a sua absorbância determinada a 765 nm. Os CFST foram calculados a partir da construção de uma curva padrão de ácido gálico (AG, 1 a 100 mg.g⁻¹), sendo os resultados expressos como miligrama equivalente de AG por grama de folha fresca (mg AG.g⁻¹).

Figura 3. Procedimento de coleta das folhas e metodologia de extração sólido-líquido (ESL) para obtenção dos compostos fenólicos solúveis totais (CFST) em lâmina de folhas de bananeiras cv. Nanicão.

Otimização da técnica de extração sólido-líquido

Os ensaios de otimização da ESL foram realizados em seis etapas: a) determinação da melhor concentração de extração de cada solvente; b) combinação de diferentes solventes para avaliação da melhor solução extratora; c) determinação do número ideal de ciclos de extração; d) teste de esgotamento; e) verificação de interferências; f) remoção do excesso de clorofilas. A **Figura 4** ilustra as características das seis etapas.

Na primeira etapa foram avaliados três solventes (metanol, etanol e acetona), cada um nas concentrações de 70, 80 ou 90% (v/v) em água ou no seu estado puro ($\geq 99,5\%$), totalizando doze tipos diferentes de soluções extratoras.

A quantidade de CFST do *pool* de lâminas de folhas foi determinada nos doze grupos, que se diferenciavam apenas pela natureza e/ou concentração da solução

extratora. Em todos os grupos padronizou-se a realização de dois ciclos de extração utilizando um único tipo de solvente. As concentrações de cada solvente (metanol, etanol e acetona) que obtiveram os melhores resultados de CFST foram então selecionadas para a etapa posterior.

Figura 4. Etapas de otimização da metodologia de extração sólido-líquido (ESL) para extração de compostos fenólicos solúveis totais (CFST) em lâminas de folhas de bananeiras cv. Nanicão. Primeira etapa: determinação da melhor concentração de extração de cada solvente; Segunda etapa: combinação de diferentes solventes para avaliação da melhor solução extratora; Terceira etapa: determinação do número de ideal de ciclos de extração; Quarta etapa: teste de esgotamento; Quinta etapa: verificação de interferências; Sexta etapa: remoção do excesso de clorofilas.

A segunda etapa consistiu na combinação de diferentes solventes para a extração das amostras. Para tal, foram utilizadas as concentrações de etanol,

metanol e acetona que obtiveram os maiores valores de CFST na primeira etapa. Diferentes solventes no primeiro e segundo ciclo de extração foram utilizados para uma mesma amostra. Os CFST destas extrações foram quantificados e comparados com o grupo que obteve os maiores valores na primeira etapa (controle). Desse modo, o solvente ou a combinação de solventes que obteve melhor desempenho (maior valor de calculado de CFST) na primeira e segunda etapa foi selecionado para a etapa seguinte.

A terceira etapa consistiu na determinação do número ideal de ciclos de extração. Os CFST foram quantificados após a obtenção de extratos provenientes de um até quatro ciclos de extração. O número ideal foi determinado como o menor número de ciclos capaz de provocar o esgotamento da amostra.

Determinada a solução extratora ideal e o número de ciclos de extração para a amostra, foi realizada a quarta etapa da otimização. Este teste consistiu na realização de um ciclo de extração adicional utilizando um dos três solventes escolhidos na primeira etapa. A comparação destes grupos com a metodologia definida na terceira etapa definiu se havia necessidade de inclusão de um ciclo de extração adicional, que permitisse um maior rendimento na extração de compostos fenólicos.

A quinta etapa consistiu na avaliação da interferência de açúcares redutores e ácido ascórbico (AA) na determinação dos CFST pelo método de Swain e Hillis (1959).

Para determinar a influência de açúcares redutores, foram comparadas extrações em que as folhas foram submetidas à metodologia otimizada, porém, adicionadas ou não de excesso (50 mg) de glicose (açúcar redutor) antes do primeiro ciclo de extração. No mesmo ensaio também foi verificado o efeito da adição de excesso de açúcar sobre a solubilização dos CFST durante o teste. Para tal, foi realizada a extração de amostras de folhas adicionadas de excesso (50 mg) de sacarose, um açúcar não redutor, que pode interferir somente na solubilização dos CFST, e não na quantificação pelo método de Folin-Ciocalteu. Além disso, foi realizada a extração utilizando a metodologia de ESL otimizada na quarta etapa para amostras sem folhas contendo somente glicose ou sacarose (50 mg) para determinação da capacidade de solubilização e consequente extração destes compostos.

No que diz respeito à interferência de AA na quantificação de CFST foi empregada uma estratégia semelhante à descrita por FORD et al. (2010a), que utilizou a ascorbato oxidase (AOx) (L-ascorbato oxigênio oxirredutase; EC 1.10.3.3) para reduzir os níveis de AA na amostra. Primeiramente, foi avaliada a capacidade da AOx comercial (Ascorbate oxidase from *Cucurbita* sp.; A0157; Sigma Aldrich®), nas condições pré-estabelecidas pelo fabricante, em reduzir os níveis de AA. Para tal, amostras contendo somente AA em diferentes concentrações (250, 500 e 1000 µM) foram incubadas em tampão fosfato (pH 5,6) contendo 100 mM KH₂PO₄, 4 mM Na₂PO₄ e 5 mM EDTA. Após agitação (1000 rpm), as amostras nas três concentrações foram adicionadas ou não com 30 µL da enzima AOx (1 U/µL; pH 5,6) e incubadas durante 15 ou 20 min (1000 rpm; 25 °C) e quantificadas pelo método de Folin-Ciocalteu. Desse modo, foi possível determinar o nível de interferência do AA no método de quantificação, bem como a influência da AOx sobre esta determinação.

Em seguida, foi realizado o teste de interferência do AA utilizando estratégia semelhante à utilizada para verificação da interferência de açúcares. Foram comparadas amostras de folhas extraídas pelo método otimizado, com amostras de folhas contendo excesso de AA, incubadas ou não com a enzima AOx, nas condições determinadas no teste anterior. Nesta etapa, antes da adição da AOx, foram utilizadas fitas indicadoras de pH (Merck® *pH-indicator strips*; faixa 0-14, resolução 1,0) para verificar se o pH de todas as amostras se encontravam na faixa de atividade ótima da enzima (pH 5,5-7,0) (CARVALHO et al., 1981; PORTO et al., 2006; PORTO, 2008).

A sexta e última etapa avaliou duas estratégias diferentes para remoção do excesso de clorofilas. A primeira estratégia consistiu na tentativa de extrair o excesso de clorofilas utilizando um ciclo de ESL (1000 rpm; 45 min; 20 °C) com 800 µL de dimetilsulfóxido, éter dietílico, clorofórmio ou hexano em 250 mg do *pool* de folhas, anteriormente à aplicação da técnica de ESL otimizada para extração dos CFST (**Figura 5**).

Figura 5. Estratégia de remoção do excesso de clorofila por extração sólido-líquido (ESL). Tentativa de extração do excesso de clorofila utilizando um ciclo de extração com dimetilsulfóxido, éter etílico, clorofórmio ou hexano antes da execução da metodologia otimizada para extração dos compostos fenólicos solúveis totais (CFST). O extrato obtido após tentativa de remoção do excesso de clorofila foi comparado com o extrato final da metodologia otimizada quanto ao seu teor de CFST e sua coloração.

Já a segunda estratégia visou remover o excesso de clorofilas com hexano ou clorofórmio utilizando uma técnica de extração líquido-líquido (ELL) no extrato de CFST obtido após emprego da metodologia otimizada (**Figura 6**). Para tal, foi adicionado 500 μL de clorofórmio ou hexano no extrato de CFST e, após a homogeneização (3000 rpm; 15 s) e centrifugação (14000 g; 15 min; 4 °C) do extrato, a fração clorofórmica ou hexânica foi separada da fração aquosa. Nas duas estratégias, a quantificação de CFST nos extratos utilizados para remoção do excesso de clorofilas foi realizada após evaporação do solvente utilizando fluxo de nitrogênio e posterior ressuspensão em acetona 80%. Além disso, foi realizada a comparação da intensidade da cor verde entre os diferentes extratos obtidos, o que permitiu inferir a eficiência em remover o excesso de clorofila (pigmento verde).

Figura 6. Estratégia de remoção do excesso de clorofila por extração líquido-líquido (ELL). Tentativa de extração do excesso de clorofila utilizando um ciclo de extração com clorofórmio ou hexano após a execução da metodologia otimizada para extração dos compostos fenólicos solúveis totais (CFST). Foi adicionado hexano ou clorofórmio ao extrato obtido a partir da metodologia otimizada e, após centrifugação da mistura, a fase aquosa foi comparada com a orgânica quanto ao seu teor de CFST e sua coloração.

Após determinação da melhor técnica, foi verificada a eficiência de remoção do excesso de clorofila a partir da determinação do espectro de absorbância dos extratos em faixa luz visível (450-700 nm). Para os cálculos foi empregada a equação de Arnon (1949) ($\text{clorofila}_{a+b} = 17,76.A^{646,6\text{nm}} + 7,34.A^{663,6\text{nm}} \mu\text{g.mL}^{-1}$), utilizando os fatores de correção desenvolvidos por Porra, Thompson e Kriedemann (1989).

Avaliação do teor de compostos fenólicos solúveis totais (CFST) em folhas de diferentes parcelas experimentais

Primeiramente, foi verificado o efeito de diferentes períodos de colheita nas quantidades de CFST. Amostras de uma mesma área, porém coletadas em momentos diferentes, foram comparadas quanto ao teor de CFST.

Além disso, foi avaliado se quantidades diferentes de AA poderiam influenciar na determinação dos CFST no *pool* de folhas das diferentes áreas. Para isso, as amostras da parcela “biodiversidade” e “controle” foram incubadas ou não com a enzima AOX, nas condições pré-determinadas no ensaio de interferência do AA, e avaliadas quanto a quantidade de CFST.

Finalmente, foi utilizada a técnica de extração otimizada em lâminas de folhas proveniente dos *pools* das diferentes áreas, a fim de determinar os níveis de CFST nas diferentes parcelas experimentais. Tais resultados foram comparados com os valores de IS observados nas bananeiras analisadas e com os perfis cromatográficos dos *pools* de extratos das diferentes parcelas obtidos por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas com ionização por *eletrospray* (CLAE-ESI-EM).

O *screening* dos perfis cromatográficos por CLAE-ESI-EM dos *pools* de extratos de CFST das diferentes parcelas foi realizado em um sistema *Agilent 1290 Infinity*, acoplado ao ESI-EM 6460 *Triple Quad* (*Agilent Technologies*®, Santa Clara, CA, EUA), equipado com coluna C18(2) (150 x 2 mm, 3 μm) (*Phenomenex*®, Torrance, CA, EUA). Foi utilizado um sistema de eluição gradiente composto por água e ácido fórmico (0,1%) (solvente A) e acetonitrila (solvente B) na proporção A:B de 90:10 a 10:90 em 25 min, utilizando fluxo de 0,2 mL.min⁻¹, através de ionização por *eletrospray* (90 V) nos modos positivo e negativo.

Análise estatística

Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão (DP). Para verificação do cumprimento dos pressupostos de normalidade (distribuição normal dentro de um conjunto de dados) e homogeneidade das variâncias (distribuição homogênea entre os diferentes conjuntos de dados) foi utilizado o teste de Shapiro-Wilk (SHAPIRO; WILK, 1965) e Levene (LEVENE, 1960), respectivamente. Para dados paramétricos, foi realizada a comparação entre grupos utilizando o teste t (pareado ou não pareado) ou a análise de variância (ANOVA), utilizando como *post hoc* o teste de Tukey (para comparação entre todos os grupos) ou o teste de Dunnett (para comparação do controle com os demais grupos). Para avaliar dados não paramétricos foi utilizado o teste U de Mann-Whitney (MANN; WHITNEY, 1947). Foi empregado o coeficiente de correlação de Spearman (SPEARMAN, 1904) para verificar a correlação entre o IS das bananeiras e os CFST das folhas coletadas. As análises foram realizadas com auxílio dos programas *GraphPad Prism 5.0* (*Graph Pad Software*®, La Jolla, CA, EUA) e *IBM SPSS Statistics 20* (*IBM*®, New York, NY, EUA). O critério de significância utilizado foi de $p < 0,01$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Determinação e otimização da técnica de extração sólido-líquido (ESL)

Após a realização de todas as etapas de otimização foi observado que a extração utilizando acetona 80% em dois ciclos rápidos obteve o melhor rendimento em termos de quantificação de CFST e que o protocolo de extração otimizado não é capaz de extrair quantidades significativas açúcares redutores e ácido ascórbico, compostos que interferem no método de Folin-Ciocalteu. Além disso, foi verificado que a utilização de um ciclo adicional de ELL utilizando hexano é capaz de remover parte do excesso de clorofila sem interferir significativamente na quantidade de CFST no extrato.

A primeira etapa de otimização, que visou a determinação da melhor concentração de extração de cada solvente indicou que os extratos que continham acetona obtiveram o maior rendimento médio de extração ($5,12 \pm 0,81$ mg AG.g⁻¹) quando comparado ao metanol ($2,82 \pm 0,68$ mg AG.g⁻¹) e ao etanol ($2,24 \pm 0,53$ mg

AG.g⁻¹). Apesar de não ter sido observada diferenças estatisticamente significantes entre a utilização de acetona nas contrações de 80, 90 e 100% (ANOVA, Tukey como *post hoc*; $p < 0,01$), a concentração que obteve melhor rendimento nos dois ensaios foi a de acetona 80% (v/v) em água ($5,96 \pm 0,64$ mg AG.g⁻¹) (**Figura 7**).

Figura 7. Primeira etapa da otimização: determinação da melhor concentração de extração de cada solvente. Compostos fenólicos solúveis totais (CFST) de lâminas de folhas de bananeiras cv. Nanicão após dois ciclos de extração sólido-líquido utilizando metanol, etanol ou acetona (70, 80, 90 ou 100%). Valores na região superior da figura indicam a média $\pm$ DP das extrações com as diferentes concentrações de metanol, etanol ou acetona. AG: equivalente em ácido gálico. ^a: diferença significativa em relação ao grupo que obteve maiores valores médios de CFST (acetona 80%) (#) (ANOVA, Dunnett como *post hoc*; $p < 0,01$). Valores expressos como média $\pm$ DP (mg AG.g⁻¹) de dois experimentos (n = 6).

Apesar dos resultados mostrarem um rendimento médio de extração maior quando utilizada acetona comparado aos demais solventes, é importante ressaltar mais uma vez que os compostos fenólicos podem apresentar características de solubilidade bastante distintas entre si. Desse modo, faz-se necessário avaliar a extração utilizando ciclos com diferentes solventes.

Por este motivo, a segunda etapa consistiu na verificação da extração de uma mesma amostra utilizando ciclos com diferentes solventes. Para tal, foram utilizadas as soluções contendo metanol, etanol e acetona que obtiveram os melhores rendimentos na primeira etapa: metanol 90% ($3,43 \pm 0,64$ mg AG.g⁻¹), etanol puro ($2,48 \pm 0,89$ mg AG.g⁻¹) e acetona 80% ($5,96 \pm 0,64$ mg AG.g⁻¹).

Para cada amostra foi avaliado o rendimento da extração utilizando combinações de diferentes solventes nos dois ciclos de extração. Estes resultados foram comparados com a extração utilizando dois ciclos com acetona 80% (controle), a extração de melhor rendimento na primeira etapa.

Os resultados indicaram que a metodologia controle obteve rendimento significativamente maior do que as combinações testadas. Portanto, nas condições utilizadas, o emprego de acetona 80% nos dois ciclos de extração é capaz extrair uma quantidade significativamente maior de CFST quando comparado com as demais combinações de solventes utilizadas (**Tabela 1**).

No entanto, também deve ser verificado se a utilização de dois ciclos de extração é realmente suficiente para extrair de maneira significativa os componentes fenólicos das lâminas das folhas. Nesse sentido, a terceira etapa da otimização consistiu na verificação do número ideal de ciclos de extração. Comparou-se os resultados de CFST em lâminas de folhas de bananeiras submetidas de um até quatro ciclos de extração com acetona 80%, solução extratora escolhida após a primeira e segunda etapa da otimização.

Foram observadas diferenças significativas no teor de CFST em amostras submetidas a um ciclo de extração quando comparadas com amostras submetidas a mais ciclos. Também foi verificado que, a partir de dois ciclos, a quantidade de CFST não sofre alteração significativa, indicando que não é necessária a adição de mais de dois ciclos de extração com o mesmo solvente (**Tabela 2**).

Portanto, ao final da terceira etapa do processo de otimização, foi possível determinar que, dentre todas as combinações de solventes avaliadas, a que parece obter maior rendimento na ESL é a utilização de acetona em dois ciclos de extração. O emprego de ciclos de extração adicionais com este solvente foi incapaz no sentido de aumentar o rendimento da técnica. Pelo contrário, por aumentar o tempo de análise, estes ciclos adicionais parecem induzir uma diminuição na quantidade de CFST, uma vez que os valores de média das extrações utilizando três e quatro ciclos foram aproximadamente 5% menores do que a média de CFST obtida para dois ciclos de extração.

Com o intuito de verificar se o tempo total de extração era capaz de influenciar na quantificação de CFST, os extratos submetidos a dois ciclos de extração foram armazenados a temperatura ambiente (20 ± 2 °C) ou a frio (-20 ± 2 °C) e quantificados após 24 h e 48 h.

Tabela 1. Segunda etapa da otimização: combinação de diferentes solventes para avaliação da melhor solução extratora. As combinações um, dois e três foram comparadas com o controle, a extração de melhor rendimento na primeira etapa (dois ciclos de extração utilizando acetona 80%). Após a extração, foram quantificados os compostos fenólicos solúveis totais (CFST) nos extratos de lâmina de folhas de bananeiras da cv. Nanicão.

Grupo	1º ciclo de extração	2º ciclo de extração	CFST (mg AG.g ⁻¹)	% vs. Controle
controle	acetona 80%	acetona 80%	6,04 ± 0,14 [#]	100,00 ± 2,33 [#]
combinação um	acetona 80%	metanol 90%	5,40 ± 0,11 ^a	89,47 ± 1,83 ^a
combinação dois	acetona 80%	etanol puro	4,81 ± 0,84 ^a	79,62 ± 1,39 ^a
combinação três	metanol 90%	etanol puro	4,12 ± 0,41 ^a	68,27 ± 6,87 ^a

AG: equivalente em ácido gálico; % vs. Controle: valores percentuais de CFST considerando o controle como 100%; ^a: diferença significativa em relação ao grupo controle (#) (ANOVA, Dunnett como *post hoc*; p<0,01). Valores expressos como média ± DP (mg AG.g⁻¹) de dois experimentos (n = 6).

Tabela 2. Terceira etapa da otimização: determinação do número ideal de ciclos de extração. Compostos fenólicos solúveis totais (CFST) nos extratos de lâminas de folhas de bananeiras cv. Nanicão submetidas de um até quatro ciclos de extração utilizando acetona 80% como solvente.

Grupo	Descrição do grupo	CFST (mg AG.g ⁻¹)	% vs. Controle
controle	dois ciclos de extração utilizando acetona 80%	6,06 ± 0,11 [#]	100,00 ± 1,88 [#]
um ciclo	um ciclo de extração utilizando acetona 80%	4,16 ± 0,19 ^a	68,72 ± 3,18 ^a
três ciclos	três ciclos de extração utilizando acetona 80%	5,81 ± 0,09	95,85 ± 1,52
quatro ciclos	quatro ciclos de extração utilizando acetona 80%	5,82 ± 0,12	96,02 ± 1,96

AG: equivalente em ácido gálico; % vs. Controle: valores percentuais de CFST considerando o controle como 100%; ^a: diferença significativa em relação ao grupo controle (#) (ANOVA, Dunnett como *post hoc*; p<0,01). Valores expressos como média ± DP (mg AG.g⁻¹) de dois experimentos (n = 6).

Foi verificado um decréscimo significativo na quantidade de CFST após 24 h e 48 h (**Figura 8**), ressaltando a necessidade de rapidez no processo de extração e quantificação. Neste teste também foi possível demonstrar a importância da utilização de baixas temperaturas, visto que há uma redução significativa na quantificação dos CFST em amostras armazenadas a temperatura ambiente quando comparadas com amostras armazenadas a frio.

A redução no conteúdo de CFST observada é bastante elevada quando comparado ao estudo realizado por Sikwese (2005), que verificou que o extrato aquoso com acetona 75% (v/v) do grão de sorgo (*Sorghum vulgare*) sofre uma redução na quantidade de CFST de aproximadamente 3% após 10 dias de armazenamento a temperatura ambiente. Dezashibi et al. (2013) também verificaram um decréscimo menor do que 5% no conteúdo de CFST em extrato metanólico de folhas de Henna (*Lawsonia inermis*) armazenados por 10 dias a temperatura ambiente ou a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ sob proteção de luz.

Figura 8. Efeito do tempo e da temperatura de armazenamento sobre a quantificação de compostos fenólicos solúveis totais (CFST) em extratos de lâminas de folhas de bananeira cv. Nanicão. Amostras foram armazenadas a frio (○) (T_{frio} : $-20 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$) ou a temperatura ambiente (●) (T_{ambiente} : $20 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$) e quantificadas após 24 e 48 h. CFST relativo: quantidade relativa de CFST em relação ao tempo inicial (0 h); ^a: estatisticamente significativo em relação ao tempo anterior no mesmo grupo (teste t pareado; $p < 0,01$); ^b: estatisticamente significativo em relação ao mesmo tempo do grupo T_{frio} (teste t não pareado; $p < 0,01$). Valores expressos como CFST relativo $\pm$ DP (%) de um experimento ($n = 3$).

Entretanto, Begic-Akagic et al. (2011) verificaram um decréscimo de até 24% no CFST de soluções aquosas de diferentes cultivares de maçãs (*Mallus domestica*)

após duas horas de armazenamento a temperatura ambiente. Portanto, a estabilidade dos extratos de CFST de diferentes matrizes vegetais varia amplamente em função dos compostos fenólicos presentes no extrato, do tempo e temperatura de armazenamento e também do solvente empregado. Sendo assim, é de fundamental importância a avaliação da estabilidade dos CFST durante processos de desenvolvimento ou otimização de metodologias.

A quarta etapa (teste de esgotamento) foi realizada com base na premissa de que existe um espectro muito grande de substâncias fenólicas em matrizes vegetais (RYAN et al., 1999; AJILA et al., 2011) e que estas, como citado anteriormente, apresentam características de solubilidade distintas (AJILA et al., 2011; KHODDAMI; WILKES; ROBERTS, 2013). Portanto, o teste de esgotamento foi utilizado para verificar a necessidade de incluir um ciclo adicional de extração utilizando um solvente de natureza diferente do que foi determinado nas etapas anteriores (acetona 80%), a fim de verificar se seria possível extrair mais CFST da amostra.

Não houve diferenças significativas entre o grupo controle (dois ciclos de extração com acetona) e os grupos onde foram utilizados um ciclo de extração adicional com metanol 90% ou o etanol puro. Os resultados de CFST observados para a extração com os métodos em que foi utilizado um ciclo extra de extração com metanol 90% ($5,81 \pm 0,11$ mg AG.g⁻¹) ou etanol puro ($5,81 \pm 0,15$ mg AG.g⁻¹) não diferiram significativamente (ANOVA, Tukey como *post hoc*; $p < 0,01$) entre si e também com a metodologia utilizando três ciclos com acetona 80% ($5,80 \pm 0,13$ mg AG.g⁻¹), grupo omitido na **Figura 9**, uma vez que já havia sido avaliado na terceira etapa de otimização. Portanto, não parece ser necessária a adição de ciclos adicionais de extração com o intuito de aumentar o rendimento da extração.

Desse modo é possível concluir que, dentre todas as combinações de solvente avaliadas, a que apresenta melhor rendimento de extração é a metodologia utilizando dois ciclos de extração com acetona 80%. Geralmente, o metanol é descrito na maioria dos estudos como o solvente capaz de obter melhor rendimento na extração de CFST de baixo peso molecular, que comumente incluem compostos mais polares, enquanto a acetona é capaz solubilizar polifenóis de maior peso molecular que apresentam, de um modo geral, menor solubilidade (DAI; MUMPER, 2010; GUYOT; MARNET; DRILLEAU, 2001; LABARBE et al., 1999).

A desvantagem técnica na utilização da acetona quando comparado ao metanol ou etanol para a extração de CFST de matrizes vegetais é o fato de que o

mesmo possui venda controlada, enquanto os alcoóis não necessitam de autorização especial para compra (BRASIL, 2013). No entanto, como o objetivo da utilização de acetona é obter um extrato para a quantificação de CFST que serão utilizados somente para fins de pesquisa, e não comercial, não há desvantagem técnica no emprego deste solvente em relação aos demais avaliados.

Figura 9. Quarta etapa da otimização: teste de esgotamento. O método para extração de compostos fenólicos solúveis totais (CFST) de folhas de bananeira cv. Nanico utilizanddo dois ciclos de extração com acetona 80% foi comparado com métodos em que foi adicionado um terceiro ciclo de extração, utilizando metanol 90% ou etanol puro. AG: equivalente em ácido gálico; E1, E2 e E3: solventes utilizados no primeiro, segundo e terceiro ciclo de extração. Grupos não mostram diferenças significativas em relação ao controle (#) (ANOVA, Dunnett como *post hoc*; $p < 0,01$). Valores expressos como média $\pm$ DP (mg AG.g⁻¹) de dois experimentos (n = 6).

Entretanto, ainda não se pode afirmar que a acetona 80% é realmente a solvente mais eficiente na extração de CFST dentre as diferentes técnicas avaliadas, pois substâncias não fenólicas que interferem na quantificação dos CFST pelo método de Folin-Ciocalteu (SWAIN; HILLIS; 1959), utilizado no presente estudo, apresentam a possibilidade de terem sido extraídas durante a ESL.

Conforme já foi descrito anteriormente, os açúcares redutores e o ácido ascórbico (AA) são os principais interferentes na quantificação pelo método de Folin-Ciocalteu (OLIVEIRA et al., 2009b; SUN et al. 2002). Nesse sentido, a quinta etapa de otimização foi realizada com o intuito de verificar se ocorria a interferência de açúcares redutores e AA na determinação dos CFST pelo método de Swain e Hillis (1959), após utilização da metodologia de ESL definida na quarta etapa.

Primeiramente, foi determinada a interferência de açúcares redutores na quantificação dos CFST em um *pool* de lâminas de folhas adicionadas ou não de excesso de açúcares. Segundo Oliveira et al. (2007), a bananeira cv. Nanica apresenta aproximadamente 16 g de açúcares para cada 100 g da lâmina da folha. Portanto, para avaliar a interferência de açúcares redutores utilizou-se 50 mg de glicose em aproximadamente 250 mg de lâmina de folhas, o que equivale a cerca de 16% do peso total. A glicose foi escolhida por ser o açúcar redutor mais comumente encontrado na lâmina da folha de bananeiras (SHUKLA et al., 1973).

No mesmo ensaio também foi verificado o efeito da adição de excesso de açúcar sobre a solubilização dos CFST durante o teste. Para isso, foi realizada a extração de amostras de folhas adicionadas de excesso (50 mg) de um açúcar não redutor (sacarose), que pode interferir na solubilização dos CFST, mas não na quantificação pelo método de Folin-Ciocalteu.

Além disso, também foi realizada a extração de amostras contendo somente sacarose ou glicose (50 mg) a fim de determinar o grau de solubilização e a consequente extração destas substâncias a partir da metodologia otimizada.

Não foi verificada diferenças significativas na extração com folhas quando comparadas a extração com o mesmo material contendo açúcar (sacarose ou glicose) em excesso. A extração de amostras contendo somente 50 mg de sacarose ou glicose não foram capazes de serem quantificadas pelo método utilizado (**Figura 10**).

De fato, estes resultados eram esperados, uma vez que açúcares, de um modo geral, são pouco solúveis em solventes orgânicos como a acetona (BUDAVARI et al., 1996). Para comprovar esta hipótese, um ensaio de solubilidade permitiu concluir que os dois ciclos de extração com acetona 80% foram capazes de extrair somente $35,2 \pm 2,0\%$ da glicose e $51,0 \pm 1,2\%$ da sacarose adicionada ($n = 3$).

Para avaliar a influência do AA sobre a quantificação dos CFST pelo método de Folin-Ciocalteu foi empregado um ensaio semelhante ao descrito por FORD et al. (2010a), que utilizou a enzima ascorbato oxidase (AOx) promovendo a oxidação do AA e a consequente formação de ácido dehidroascórbico (ADA), que apresenta apenas cerca de 10 a 20% da capacidade redutora do AA (AKYILMAZ; DINÇKAYA, 1999; FORD et al., 2010b; SEREIKAITÉ et al., 1993).

Figura 10. Quinta etapa da otimização: verificação de interferências (açúcares solúveis). A extração de compostos fenólicos solúveis totais (CFST) de folhas de bananeira cv. Nanicão foi comparada com extrações em que foi adicionado excesso (50 mg) de açúcares (glicose ou sacarose). AG: equivalente em ácido gálico; SAC: sacarose; GLI: glicose; nd: não detectado. Grupos em que foi possível a quantificação de CFST não mostram diferenças significativas em relação ao controle (#) (ANOVA, Dunnett como *post hoc*; $p < 0,01$). Valores expressos como média $\pm$ DP (mg AG.g⁻¹) de dois experimentos ($n = 6$).

Quanto a AOx, estudos visando o seu isolamento e purificação são desenvolvidos desde a década de 1950 (DUNN; DAWSON, 1951; LEE; DAWSON, 1973). Atualmente esta enzima, já identificada em diversas espécies de fungos (DUPLESSIS et al., 2011; O'CONNELL et al., 2012) e vegetais (ESAKA et al., 1990; KATO; ESAKA, 1996; OHKAWA et al., 1989), se encontra comercialmente disponível, permitindo a utilização da mesma em ensaios ou técnicas que necessitem de uma etapa de oxidação do AA.

A verificação da interferência do AA foi realizada a partir de dois ensaios utilizando a AOx comercial. No primeiro ensaio, foi possível determinar o nível de interferência do AA no método de quantificação, bem como a influência da AOx sobre a redução dos níveis de AA. Amostras contendo somente AA em diferentes concentrações (250, 500 e 1000 μ M) foram adicionadas ou não com a enzima AOx (1000 rpm; 25 °C) durante 15 ou 20 min e posteriormente quantificadas pelo método de Folin-Ciocalteu.

Os resultados mostram que, quando a AOx foi incubada com o AA nas concentrações de 250 e 500 μ M, não foi verificado nenhuma interferência no método

de Folin-Ciocalteu. Portanto, nestas concentrações, não foi possível estimar a porcentagem de redução da interferência do AA promovida pela AOx. Somente na concentração de 1000 μM de AA é que foi possível verificar que, em relação ao grupo controle (AA 1000 μM : $8,28 \pm 1,08 \text{ mg AG.g}^{-1}$), o grupo em que foi incubada a enzima AOx (AA 1000 μM + AOx 30 U: $1,97 \pm 0,77 \text{ mg AG.g}^{-1}$) foi capaz de reduzir a interferência do AA em $76,26 \pm 9,25\%$ (**Figura 11A**). Tal resultado é semelhante aos 80-90% de redução descrito por FORD et al. (2010b). Possivelmente, um aumento na temperatura de incubação da AOx para 35 °C poderia reduzir ainda mais a interferência do AA na quantificação, uma vez que esta é a temperatura ótima de atividade da enzima. No entanto, a utilização de 25 °C na incubação ainda é capaz de manter grande parte da atividade da enzima (PORTO, 2008; PORTO et al., 2006).

No que diz respeito ao tempo de incubação com a enzima, não houve diferenças significativas entre os mesmos grupos quando houve a incubação por 15 ou 20 min (teste t não pareado; $p < 0,01$). Portanto, na etapa seguinte, foi utilizada a incubação da AOx por 15 min.

Em seguida, para verificação da interferência do AA na quantificação dos CFST em extratos de folhas, foi utilizada uma estratégia semelhante à empregada para determinação da interferência de açúcares. Foram comparadas amostras de folhas com e sem adição de excesso de AA (1000 μM), incubadas ou não com a enzima AOx (30 U), nas condições descritas anteriormente. Não houve diferenças significativas entre o grupo controle (folhas: $7,16 \pm 0,49 \text{ mg AG.g}^{-1}$) e o grupo onde foi utilizado a enzima AOx (folhas + AOx 30U: $6,96 \pm 0,50 \text{ mg AG.g}^{-1}$) (**Figura 11B**). Nesta etapa, antes da adição da AOx, utilizou-se fita de pH para verificar se as amostras se encontravam com valores de pH na faixa considerada para a atividade da enzima (pH 5,5-7,0) (CARVALHO et al., 1981; PORTO, 2008; PORTO et al., 2006). Todas as amostras apresentaram valores de pH próximo a 6, não sendo necessário o ajuste de pH.

A sexta etapa consistiu na remoção do excesso de clorofilas da amostra. As clorofilas são os pigmentos naturais mais abundantes em vegetais. Estes fornecem a pigmentação verde para os diferentes tecidos das plantas e estão presentes em maior quantidade nos cloroplastos das folhas, apresentando como principal função a absorção de energia luminosa para o processo de fotossíntese do vegetal. Estas moléculas apresentam uma estrutura macrocíclica assimétrica instável, constituída

por quatro anéis de pirrólicos e um átomo central de magnésio, apresentando ou não um grupo fitol que confere maior hidrofobicidade a molécula (STREIT et al., 2005).

Figura 11. Quinta etapa da otimização: verificação de interferências (ácido ascórbico). Foi realizada a verificação da interferência do ácido ascórbico (AA) na determinação dos compostos fenólicos solúveis totais (CFST) de folhas de bananeira cv. Nanicação em duas etapas. **(A)** Determinação da concentração de AA e do tempo de incubação com ascorbato oxidase (AOx) nos ensaios de interferência. O ensaio onde foram utilizados 20 min de incubação foi omitido visto que não houve diferenças significativas entre os grupos em que foi utilizada a incubação por 15 min (teste t não pareado; $p < 0,01$). **(B)** A quantificação de CFST de folhas (controle) foi comparada com a quantificação onde foi incubado a enzima AOx (30 U; 15 min). AG: equivalente em ácido gálico; ^a: diferença significativa em relação ao grupo controle (#) (ANOVA, Dunnett como *post hoc*) ($p < 0,01$). Valores expressos como média $\pm$ DP (mg AG.g⁻¹) de dois experimentos ($n = 6$).

Em meio ácido, as clorofilas tendem a perder o átomo central de magnésio, levando a formação de feofitinas que, por sua vez, podem sofrer reações de hidrólise, formando feoforbídeos, substâncias mais hidrofílicas. Em meio básico as clorofilas também podem ser degradadas, levando a formação de clorofilinas (HU; TANAKA; TANAKA, 2013; INANÇ, 2011).

No entanto, apesar das clorofilas apresentarem relativa instabilidade, estas não interferem na determinação dos CFST pelo método de Folin-Ciocalteu, visto sua baixa capacidade redutora (ENDO, USUKI, KANEDA, 1985; FERRUZZI et al., 2002; HU; TANAKA; TANAKA, 2013; INANÇ, 2011; WANASUNDARA; SAHIDI, 1998). Porém, a obtenção de um extrato com quantidades reduzidas destes compostos é importante para a quantificação ou identificação dos CFST por métodos cromatográficos. Assim, a última etapa da otimização teve como objetivo a criação de um procedimento para remoção do excesso de clorofilas das folhas, com o intuito de obter um extrato de CFST com menos interferentes.

Foram avaliadas duas estratégias diferentes para remoção do excesso de clorofilas. A primeira consistiu na tentativa de extrair o excesso destas substâncias nas folhas, utilizando um ciclo de ESL anterior à extração dos CFST pela metodologia otimizada. Já a segunda estratégia consistiu na tentativa de remoção do excesso de clorofila por ELL no extrato obtido a partir da metodologia otimizada.

No método de ESL foram selecionados solventes com diferentes graus de polaridade, já utilizados em métodos de extração de clorofilas previamente descritos por outros autores. Segundo a literatura disponível, os solventes mais comumente empregados para extração das clorofilas em folhas são o metanol e a acetona (BRAHMI et al., 2012; COSTACHE; CAMPEANU; NEATA, 2012; HU; TANAKA; TANAKA, 2013; JU et al., 2010; WHITTENBERG et al., 2014). Entretanto, estes não foram utilizados para tal função, uma vez que já foi observado no presente estudo que os mesmos são capazes de extrair uma quantidade significativa de CFST. Particularmente, a acetona 80% (v/v) em água, o solvente que apresentou maior eficiência na extração de CFST, é também apontado em diversos trabalhos como o solvente de escolha para a extração de clorofilas (INSKEEP; BLOOM, 1985; XUE; YANG, 2009).

Desse modo, foi necessário avaliar a utilização de outros solventes para a remoção do excesso de clorofilas sem a dissolução concomitantemente dos CFST das lâminas de folhas. Os solventes avaliados na estratégia de ESL foram o dimetilsulfóxido (BARBIERI JUNIOR, 2010; BARNES et al., 1992; TAIT; HIK, 2003), o éter etílico (COSTACHE; CAMPEANU; NEATA, 2012; MILEKOVIC et al., 2012; SUZUKI, SAITOH; ADACHI, 1987; WELLBURN, 1994), o clorofórmio (BIDEL et al., 2007; BRAHMI et al., 2012; WELLBURN, 1994) e o hexano (GRACIA et al., 2011; GÜLLER; TUNÇ, 1992; HUANG et al., 2008).

Após o ciclo de extração utilizando um destes solventes, o sobrenadante foi separado por centrifugação, evaporado em fluxo de nitrogênio e o material foi posteriormente ressuspenseado com acetona 80% para a quantificação dos CFST pelo método de Folin-Ciocalteu. Já o precipitado resultante da centrifugação foi submetido à metodologia otimizada (dois ciclos de extração utilizando acetona 80%), sendo posteriormente quantificado quanto aos teores de CFST. O ideal seria a obtenção do primeiro extrato (onde foi utilizado dimetilsulfóxido, éter etílico, clorofórmio ou hexano) com baixos níveis de CFST e elevada intensidade de coloração verde, indicando que o solvente utilizado foi capaz de remover as clorofilas sem extrair concomitantemente substâncias fenólicas solúveis. Já o segundo extrato obtido (a partir da metodologia otimizada) não deveria possuir a coloração verde e apresentar um teor de CFST semelhante ao controle, onde não foi realizada a etapa de remoção do excesso de clorofila.

A análise visual dos extratos obtidos permitiu inferir que o clorofórmio e o hexano foram os solventes mais efetivos na extração das clorofilas, enquanto o extrato obtido com dimetilsulfóxido ou éter etílico apresentaram intensidade de coloração verde igual ou superior quando comparados com o extrato obtido pela metodologia otimizada (controle).

Após remoção dos solventes utilizados para extração das clorofilas, as folhas foram submetidas à metodologia otimizada para a obtenção dos extratos em acetona 80%. Mais uma vez, foi possível inferir visualmente que o clorofórmio e o hexano foram os solventes mais eficazes, visto que os extratos produzidos com folhas que foram previamente extraídas com estes solventes apresentaram coloração verde menos intensa quando comparado ao grupo controle. Observando os valores relativos de CFST em relação ao controle nos extratos obtidos, é possível observar que o hexano e o clorofórmio foram os solventes que menos influenciaram nos teores finais de CFST (**Figura 12**).

O extrato obtido com a metodologia otimizada após remoção do excesso de clorofilas com hexano apresentou $7,24 \pm 0,16$ mg AG.g⁻¹, o equivalente a $93,30 \pm 2,05\%$ do resultado obtido no grupo controle. O clorofórmio apresentou uma capacidade maior de solubilizar os CFST e, portanto, o extrato das folhas obtido após remoção do clorofórmio apresentou valores de CFST ($6,14 \pm 0,18$ mg AG.g⁻¹) significativamente menores do que o controle. O éter etílico pareceu apresentar menor eficiência na remoção do excesso de clorofila e, além disso, solubilizou uma

quantidade significativa ($1,56 \pm 0,08 \text{ mg AG.g}^{-1}$) de CFST das folhas. Já o dimetilsulfóxido foi o solvente capaz de solubilizar maior quantidade de CFST ($5,93 \pm 0,15 \text{ mg AG.g}^{-1}$)

	Controle	Dimetilsulfóxido	Éter etílico	Clorofórmio	Hexano
		①	②	③	④
Extrato obtido no processo de remoção do excesso de clorofilas	Não foi realizada a etapa de remoção do excesso de clorofilas no grupo controle
Quantidade relativa de CFST no extato (%)		76,39 ± 0,58	20,14 ± 1,06	14,01 ± 1,44	1,29 ± 0,46

	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
Extrato obtido a partir da metodologia otimizada, obtido após utilização do procedimento de remoção do excesso de clorofilas
Quantidade relativa de CFST no extato (%)	100,00 ± 1,63 (#)	25,19 ± 1,94 ^a	77,32 ± 2,36 ^a	79,09 ± 2,35 ^a	93,30 ± 2,05

Figura 12. Remoção de clorofila por extração sólido-líquido (ESL). Imagem dos extratos obtidos na remoção do excesso de clorofila utilizando dimetilsulfóxido (1), éter etílico (2), clorofórmio (3) ou hexano (4) e extratos obtidos pela metodologia otimizada após utilização do solvente para a remoção de clorofilas (6, 7, 8 e 9). Abaixo das imagens encontram-se os percentuais de compostos fenólicos solúveis totais (CFST) em relação ao extrato controle (5). ^a: diferença significativa em relação ao grupo controle (#) (ANOVA, Dunnett como *post hoc*; $p < 0,01$). Valores expressos como média $\pm$ DP (%) de dois experimentos ($n = 6$).

Apesar de não ser o objetivo da utilização desta metodologia, é possível afirmar que o dimetilsulfóxido parece ser um solvente relativamente eficiente para a extração de CFST em folhas de bananeiras nas condições avaliadas visto que, em um único ciclo de extração, o mesmo foi capaz de extrair quase 80% de CFST quando comparado com a metodologia otimizada. No entanto, a capacidade deste solvente solubilizar substâncias interferentes como a clorofila é extremamente variável, uma vez que sua eficiência depende das condições estruturais da matriz

(NIKOLOPOULOS et al., 2008; RICHARDSON; DUGAN; BERLYN, 2002). Desse modo, a adaptação de uma metodologia que utilize DMSO para a extração de CFST em determinada espécie requer a avaliação de diversas amostras em diferentes condições, uma vez que o grau de queratinização e consequente espessura da folha parecem ter mais efeito no rendimento de extração do que o tamanho de partícula da amostra (BARNES et al., 1992; NIKOLOPOULOS et al., 2008).

Em resumo, é possível afirmar visualmente que o clorofórmio parece extrair com mais eficiência o pigmento. Entretanto, a análise de CFST dos diferentes extratos indica que o hexano remove parte das clorofilas sem afetar significativamente os níveis de CFST do extrato final.

A segunda estratégia utilizada para remoção do excesso de clorofilas foi baseada no fato de que o hexano e o clorofórmio são solventes geralmente empregados em técnicas de ELL para remoção de compostos pouco polares como lipídios, carotenoides e clorofilas, em extratos vegetais obtidos a partir da utilização de solventes orgânicos mais polares, como o etanol, o metanol e a acetona (DAI; MUMPER, 2010). Sendo assim, o hexano ou o clorofórmio foram adicionados diretamente ao extrato obtido a partir metodologia otimizada e não as folhas conforme realizado na primeira estratégia. Os resultados, assim como na primeira estratégia, foram avaliados quanto à intensidade de cor verde e os níveis de CFST na fase mais aquosa (FA; fração com maior quantidade de acetona e água) e na fase mais orgânica (FO; fração contendo maior quantidade de clorofórmio ou hexano).

A utilização da técnica de ELL empregando o clorofórmio foi capaz de remover a clorofila com relativa eficiência. No entanto, assim como na ESL, ele é capaz de extrair uma quantidade relativamente alta de CFST quando é empregado na remoção do excesso de clorofilas, indicando que o mesmo solubiliza parte dos CFST presentes no extrato ($21,66 \pm 3,43\%$). Já o emprego do hexano como o solvente majoritário da fase orgânica foi eficaz na remoção do excesso de clorofila, sem afetar significativamente a quantificação de CFST na fração aquosa. A quantificação da FO indicou que o hexano foi capaz de extrair menos de 2% dos CFST quando comparados ao controle, de modo que não houve diferenças significativas da FA em relação ao controle (**Figura 13**).

A menor capacidade de extração de compostos fenólicos solúveis pelo hexano pode ser explicada pela natureza apolar deste solvente e as características

químicas dos CFST extraídos utilizando acetona 80%. A distribuição homogênea de cargas na molécula de hexano e seu consequente momento dipolar nulo confere característica apolar ao composto, o que também facilita a separação da FA e FO na ELL. O clorofórmio, apesar de ser considerada uma molécula apolar, possui momento dipolar e constante dielétrica maior do que o hexano, o que confere maior capacidade de solubilização de moléculas mais polares, de modo que parte do CFST presente anteriormente na FA foi solubilizado na FO.

Figura 13. Remoção de clorofila por extração sólido-líquido (ELL). Na região superior da figura é possível observar o aspecto dos extratos controle e dos que foram utilizados clorofórmio ou hexano para a remoção do excesso de clorofilas. Abaixo das imagens encontra-se o gráfico com os valores de compostos fenólicos solúveis totais (CFST) dos diferentes extratos da fase aquosa (FA) e orgânica (FO) em relação ao controle. AG: equivalente em ácido gálico; nr: não realizado; ^a: diferença significativa em relação ao grupo controle (#) (ANOVA, Dunnett como *post hoc*; $p < 0,01$). Valores expressos como média $\pm$ DP (%) de dois experimentos ($n = 6$).

Os resultados são semelhantes ao observado para o emprego dos mesmos solventes na estratégia de remoção por ESL. Entretanto, a ELL é uma técnica mais simples, rápida e requer menor quantidade de solvente quando comparada a ESL. Desse modo, foi observado que o emprego de ELL utilizando hexano após obtenção do extrato pela metodologia otimizada é capaz de remover, pelo menos em parte, a

clorofila presente no extrato, sem afetar significativamente a quantidade de CFST extraído na fase aquosa.

Como uma forma de estimar a quantidade removida de clorofilas pela técnica de ELL utilizando hexano, foi realizada a leitura do espectro de absorbância em faixa de luz visível (450-700 nm) das fases orgânica e aquosa do extrato.

O espectro de luz visível das clorofilas apresentam geralmente dois picos principais de absorção, um maior localizado próximo à região do espectro ultravioleta (UV), entre 400 e 450 nm, e um pico menor localizado entre 600 e 700 nm. Entretanto, devido a grande sobreposição de picos de clorofilas próxima a região do espectro UV, recomenda-se o emprego de equações que utilizem os picos entre 600 e 700 nm. Além disso, a presença de alguns compostos fenólicos (p.ex. antocianinas) poderia interferir no espectro visível das clorofilas próximo a região UV (LATTANZIO; LATTANZIO; CARDINALI, 2006; PORRA, 2002).

Sendo assim, foi empregada a equação de Arnon (1949) ($\text{clorofila}_{a+b} = 17,76.A^{646,6\text{nm}} + 7,34.A^{663,6\text{nm}} \mu\text{g.mL}^{-1}$), utilizando os fatores de correção desenvolvidos por Porra, Thompson e Kriedemann (1989). Para uma avaliação mais precisa, o extrato da FO foi evaporado e ressuspenso em acetona 80%, o mesmo solvente da FA.

O extrato da FO, utilizado para a remoção do excesso de clorofilas, foi capaz de remover $80,72 \pm 4,43\%$ do conteúdo destes pigmentos, restando apenas $19,28 \pm 1,86\%$ na FA. Além disso, os espectros de absorção dos extratos da FO na faixa de 450 a 700 nm são semelhantes aos descritos por Milenkovic et al. (2012) para a clorofilas, onde é observado um pico maior em 662 nm e pequenos picos que aumentam de acordo com a elevação do comprimento de onda próximo a 534, 581 e 616 nm. Já no extrato de FA só foi observado uma pequena elevação no espectro entre 600 e 620 nm e um pico característico de clorofilas em 662 nm (**Figura 14**), o que não permite a diferenciação entre clorofilas e seus produtos de degradação. É possível que a FA apresente maiores quantidades de clorofilida, um produto de degradação da clorofila que possui a mesma pigmentação do seu precursor, porém não apresenta o grupamento fitol em sua composição (MILENKOVIC et al., 2012).

A ausência do grupo fitol na molécula de clorofilida torna esta mais polar, o que pode explicar o fato da sua solubilização na FA. Além disso, foi demonstrado recentemente que a enzima clorofilase, em meio contendo acetona e água, é capaz de catalisar a formação da clorofilida durante processos de extração de pigmentos

em vegetais (HU; TANAKA; TANAKA, 2013). Ainda assim, apesar da quantidade remanescente de clorofilas ou seus produtos de degradação na FA, o método de ELL empregando hexano pareceu ser eficiente na remoção de maior parte destes pigmentos.

Figura 14. Espectro de absorção em intervalo de faixa de luz visível (450-700 nm) das frações aquosa (FA) e orgânica (FO) do extrato obtido após utilização da extração líquido-líquido (ELL) com hexano para remoção do excesso de clorofilas. Setas indicam os picos utilizados na tentativa de caracterização das amostras. UA: unidades de absorbância. Espectros de absorção referentes a três extrações de um *pool* de lâminas de folhas.

Assim, observa-se que técnicas simples como a descrita no presente estudo podem ser adequadas para a quantificação de CFST em lâminas de folhas de bananeiras. Tal resultado contraria o que foi descrito por Kalpana et al. (2008) e Aspé e Fernández (2011), que concluíram que a ESL não é um técnica adequada para extração de CFST após observarem diferentes métodos para a extração em trevo de cinco folhas (*Potentilla atrosanguinea*) e casca de pinheiro (*Pinus radiata*), respectivamente. Para cada matriz vegetal é importante levar em consideração os diferentes parâmetros a serem analisados na ESL, bem como as possíveis interferências na quantificação dos CFST.

De fato, não existe uma técnica universal capaz de extrair de maneira eficiente os CFST de todos os tipos de matrizes vegetais. No entanto, o emprego de técnicas simples, rápidas e de custo relativamente baixo, como a descrita neste estudo, podem ser uma alternativa para a extração de CFST e, conseqüentemente, para a investigação de diferentes condições ambientais no cultivo de vegetais.

Avaliação do teor de compostos fenólicos solúveis totais (CFST) em folhas de diferentes parcelas experimentais

Para avaliar a eficiência do método utilizado foram comparados os valores de CFST de duas parcelas experimentais próximas e com o mesmo histórico de tratamentos culturais, onde a principal diferença entre estas era a presença de biodiversidade no entorno de 60% de uma das parcelas. Após todos os ensaios, foi observado que folhas de bananeiras provenientes de áreas próximas a fragmentos florestais apresentam cerca de 35% a mais de compostos fenólicos quando comparadas a áreas que não são influenciadas pela presença da floresta nativa próxima. Esta diferença entre as áreas parece ser decorrente de alterações quantitativas no teor de CFST, uma vez que o perfil dos cromatogramas (CLAE-ESI-EM) dos extratos das parcelas analisados são semelhantes.

Como uma forma de caracterização das plantas das diferentes áreas, foram avaliados os IS de Sigatoka negra nas bananeiras selecionadas para a coleta de folhas. Os resultados de caracterização mostraram que a área “biodiversidade” apresentou um IS de $11,71 \pm 7,84\%$ no momento da coleta das folhas, valor significativamente menor do que os $46,00 \pm 8,50\%$ da “controle”.

Para análise dos CFST nas lâminas de folhas das diferentes parcelas foi utilizada a metodologia otimizada no presente estudo. Primeiramente, foi verificado se plantas provenientes de uma mesma área, mas coletadas em tempos diferentes, apresentavam diferenças no teor de CFST. Foi observado que folhas da mesma área coletadas em períodos distintos não apresentavam diferença significativa (teste U de Mann-Whitney; $p < 0,01$). Tais resultados eram esperados, uma vez que os dois períodos de coleta foram realizados em um intervalo relativamente curto de tempo (aproximadamente vinte dias). Além disso, foram selecionadas folhas provenientes de plantas em estágios semelhantes de desenvolvimento, já que os frutos das diferentes bananeiras apresentavam a mesma idade fisiológica no momento da coleta.

Após verificação da uniformidade das coletas de folhas nos diferentes períodos, os *pools* das diferentes áreas foram submetidos à técnica de ESL desenvolvida, sendo quantificados com ou sem a adição da AOx, a fim de verificar se havia níveis de AA distintos nas folhas das diferentes parcelas capaz de interferir na quantificação dos CFST. Foram utilizados dois grupos para verificação da

atividade da AOx. Em um deles, foi feita a quantificação de AA (1000 μ M), enquanto no outro o AA foi incubado com a AOx. Foi utilizado um tempo de incubação de 15 min com a enzima nas condições descritas no ensaio de otimização e, antes da adição da mesma, foi verificado que todas as amostras se encontravam com o pH dentro da faixa ótima de atividade da AOx.

O grupo “biodiversidade”, que apresentava menor IS de Sigatoka negra, apresentou uma quantidade significativamente maior (aproximadamente 35%) de compostos fenólicos quando comparado a área “controle”. Também foi observado que não houve diferenças significativas nas amostras das áreas quando submetidas ou não ao ensaio com a AOx, indicando que não havia quantidade suficiente de AA nas amostras que interferisse no método, ou que já havia quantidade suficiente de AOx no extrato capaz de oxidar o AA presente na amostra (BARBEHENN et al., 2008) (**Figura 15**).

Figura 15. Análise dos compostos fenólicos solúveis totais (CFST) nas lâminas de folhas de bananeira cv. Nanicão de diferentes parcelas experimentais. BIO: parcela experimental com fragmento florestal em 60% do seu perímetro (influenciada pela biodiversidade no entorno); CON: monocultivo de banana a mais de 200 m de qualquer remanescente florestal (sem a influência da biodiversidade no entorno). AA: ácido ascórbico; AOx: ascorbato oxidase; AG: equivalente em ácido gálico; ^a: diferença significativa em relação ao grupo COM (#) (ANOVA, Dunnett como *post hoc*; $p < 0,01$). Valores expressos como média $\pm$ DP (mg AG.g⁻¹) de dois experimentos (n = 6).

A análise por CLAE-ESI-EM indicou que a diferença observada parece ser decorrente principalmente de alterações na quantidade dos CFST presentes na

amostra, uma vez que o perfil cromatográfico dos *pools* de extratos de CFST das diferentes parcelas foi semelhante (**Figura 16**).

Figura 16. Perfil cromatográfico obtido por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas com ionização por *eletrospray* (CLAE-ESI-EM) dos *pools* de extratos das áreas “biodiversidade” e “controle” nos modos de ionização (ESI) positivo e negativo.

Contrariando os resultados observados no presente estudo, compostos fenólicos geralmente acumulam-se mais em tecidos onde há um maior ataque de fungos (CHÉRIF; ARFAOUI; RHALEM, 2007). Entretanto, existem três hipóteses que podem explicar os resultados obtidos.

A primeira hipótese relaciona os resultados de CFST com os dados de infestação de *Sigatoka* negra nas bananeiras das diferentes parcelas. Como todas as amostras foram coletadas após a emissão das folhas e o desenvolvimento da fruta, é possível que o resultado possa ser explicado pelo fato de que as plantas já estavam em um estágio avançado de defesa contra o fungo, com extensa atividade de enzimas como a peroxidase (PER) e a polifenoloxidase (PFO). A PER catalisa a condensação de alguns CFST em lignina, composto que juntamente com o ácido hidroxicinâmico são consideradas as principais substâncias fenólicas associadas a polissacarídeos de parede celular, apresentando um papel importante na defesa mecânica da planta contra patógenos e diferentes formas de estresse abiótico

(MADHUJITH; SHAHIDI, 2009; NACZK; SHAHIDI, 2004). Já a PFO oxida os CFST gerando quinonas, isômeros da ciclohexadiona que apresentam atividade antibactericida e antifúngica (EWANÉ et al., 2012; PASSARDI; PENEL; DUNAND, 2004; ZHAO et al., 2005). Sendo assim, as atividades da PER e da PFO podem reduzir a quantidade de CFST podendo, desse modo, explicar uma quantidade menor destes em áreas mais infestadas por patógenos.

Nesse sentido, a análise da correlação de Spearman verificou que existe uma relação moderada inversa ($p = -0,677$) e significativa ($p < 0,01$) entre os resultados de IS de Sigatoka negra nas bananeiras e a quantidade de CFST nas folhas coletadas (Figura 17).

Figura 17. Gráfico de dispersão (*scatter plot*) apresentando o índice de severidade (IS) de Sigatoka negra observado nas bananeiras das parcelas “biodiversidade” (■) e “controle” (□) (eixo x) e os níveis de compostos fenólicos solúveis totais (CFST) nas folhas coletadas destas bananeiras (eixo y). O cálculo do coeficiente de correlação de Spearman (p) indicou uma correlação significativa ($p < 0,01$), inversa e moderada ($p = -0,677$) entre os parâmetros avaliados, indicando que quanto maiores os valores de IS, menores os valores de CFST e vice-versa. AG: equivalente em ácido gálico. Valores expressos como média dos parâmetros analisados.

A segunda hipótese está relacionada aos efeitos de diferentes componentes da biodiversidade nas bananeiras dentro das parcelas. As áreas, apesar de estarem próximas entre si, podem apresentar características de fauna edáfica distintas. A presença de biodiversidade no entorno de 60% do perímetro da parcela “biodiversidade” pode exercer influência direta sobre a parcela de cultivo, o que não ocorre com a área “controle”, distante a mais de 200 m de qualquer remanescente florestal (ALTIERI et al., 1981). Desse modo, as características distintas na

população de micro-organismos, nematóides e outros parasitas nas parcelas podem induzir mecanismos de defesa diferentes nas bananeiras, refletindo na composição de fenólicos nas folhas (EWANÉ et al., 2012).

Por fim, a última hipótese está relacionada com o fato de que as alterações observadas nas folhas das diferentes parcelas podem ser resultados dos efeitos do ataque de pragas nas plantas pertencentes ao fragmento florestal adjacente. Um dos mecanismos de defesa de plantas contra pragas é a produção de substâncias que atuam diretamente no combate do organismo que provoca o estresse. O ataque também pode induzir a produção de compostos que atuam indiretamente, estimulando respostas de defesa nos organismos próximos visando à proteção contra pragas (**Figura 18**).

Dentre estas substâncias, os aldeídos e alcoóis voláteis de seis carbonos - e seus respectivos ésteres -, sintetizados através da via da lipoxigenase (LOX), parecem apresentar um importante papel na sinalização do tecido submetido a estresse com outros tecidos, plantas e organismos ao seu redor (ENGELBERTH et al., 2004; GAQUEREL; BALDWIN, 2013; MATSUI, 2006; SCALA et al., 2013). Nesse sentido, já foi observado que estes voláteis induzem uma série de enzimas da via dos fenilpropanóides, principal rota de síntese de compostos fenólicos em vegetais (ARIURA; MATSUI; TAKABAYASHI, 2009; BATE; ROTHSTEIN, 1998).

Resultados recentes do nosso grupo de pesquisa fornecem suporte a esta hipótese, uma vez que foi observado que somente bananas colhidas em áreas próximas à floresta nativa apresentam compostos voláteis classificados como aldeídos e alcoóis de seis carbonos quando maduras (dados ainda não publicados). Portanto, no caso da parcela “biodiversidade”, pragas naturais das plantas do fragmento florestal próximo podem estar induzindo a síntese de compostos voláteis de seis carbonos. Estes, por sua vez, podem ser dispersos pelo vento e estimular as bananeiras próximas a produzir compostos fenólicos.

De fato, o mais provável é que os três mecanismos citados acima estejam ocorrendo. A interação dos vegetais com parasitas e outros organismos, de maneira direta ou indireta, é complexa e geralmente envolve diferentes tecidos e diversas vias de sinalização (MORRIS et al., 2009).

Assim, foi possível observar no presente estudo que bananeiras em condições de cultivo padronizadas podem apresentar diferenças quantitativas nos níveis de CFST nas folhas devido a influencia da floresta nativa em seu entorno.

Apesar de não ter sido avaliado as diferentes hipóteses a fim de explicar as alterações nos CFST em bananeiras influenciadas ou não pelo fragmento florestal próximo, é possível inferir que a análise de CFST em folhas parece ser útil na comparação de plantas submetidas a diferentes condições ambientais.

Figura 18. Biossíntese de voláteis em resposta ao ataque de uma praga e mecanismos de sinalização do vegetal com o meio ambiente. O ataque de uma praga induz rapidamente a biossíntese de compostos voláteis na porção da planta submetida ao estresse. Estes compostos sintetizados, por sua vez, podem ser capazes de induzir genes relacionados à defesa em tecidos e plantas próximas ou até mesmo atrair inimigos naturais da praga. Adaptado de Matsui (2006).

CONCLUSÃO

Dentre as diversas possibilidades de extração de CFST descritas no presente estudo, a extração utilizando dois ciclos rápidos com acetona 80% (v/v) em água

obteve o maior rendimento. Além disso, o emprego de hexano foi capaz de remover grande parte do excesso de clorofilas no extrato.

Também foi demonstrado que lâminas de folhas de bananeiras cultivadas próximas à floresta nativa apresentam níveis significativamente maiores de CFST quando comparadas a plantas em áreas sem a influência do fragmento florestal. Desse modo, a avaliação dos CFST em folhas parece ser uma ferramenta útil para a comparação de bananeiras submetidas a diferentes condições ambientais.

REFERÊNCIAS

- AJILA, C. M.; BRAR, S. K.; VERMA, M.; TYAGI, R. D.; GODBOUT, S.; VALÉRO, J. R. Extraction and analysis of polyphenols: recent trends. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 31, p. 227-249, 2011.
- AKYILMAZ, E.; DINÇKAYA, E. A new enzyme electrode based on ascorbate oxidase immobilized in gelatin for specific determination of L-ascorbic acid. **Talanta**, v. 50, p. 87-93, 1999.
- ALTIERI, M. A.; TODD, J. W.; HAUSER, E. W.; PATTERSON, M.; BUCHANAN, G. A.; WALKER, R. H. Some effects of weed management and row spacing on insect abundance in soybean fields. **Protection Ecology**, v. 3, n. 4, p. 339-343, 1981.
- ARIURA, G.; MATSUI, K.; TAKABAYASHI, J. Chemical and molecular ecology of herbivore-induced plant volatiles: proximate factors and their ultimate functions. **Plant Cell and Physiology**, v. 50, p. 911-923, 2009.
- ARNON, D. I. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. **Plant Physiology**, v. 24, p. 1-15, 1949.
- ASCENSAO, A. R. F. D. C.; DUBERY, I. A. Soluble and wall-bound phenolics and phenolic polymers in *Musa acuminata* roots exposed to elicitors from *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. **Phytochemistry**, v. 63, p. 679-686, 2003.
- ASPÉ, E.; FERNÁNDEZ, K. The effect of different extraction techniques on extraction yield, total phenolic, and anti-radical capacity of extracts from *Pinus radiata* Bark. **Industrial Crops and Products**, v. 34, p. 838-844, 2011.
- BARBEHENN, R. V.; JAROS, A.; YIP, L.; TRAN, L.; KANELIS, A. K.; CONSTABEL, C. P. Evaluating ascorbate oxidase as a plant defense against leaf-chewing insects using transgenic poplar. **Journal of Chemical Ecology**, v. 10, p. 1331-1340, 2008.
- BARBIERI JUNIOR, E.; ROSSIELLO, R. O. P.; MORENZ, M. J. F.; RIBEIRO, R. C. Comparação de métodos diretos de extração e quantificação dos teores de clorofilas em folhas do capim-Tifton 85. **Ciência Rural**, v. 40, p. 633-636, 2010.

BARNES, J. D.; BALAGUER, L.; MANRIQUE, E.; ELVIRA, S.; DAVIDSON, A. W. A reaprasial of the use of DMSO for the extraction and determination of chlorophylls a and b in lichens and higher plants. **Environmental and Experimental Botany**, v. 32, p. 85-100, 1992.

BATE, N. J.; ROTHSTEIN, S. J. C6-volatiles derived from the lipoxygenase pathway induce a subset of defense-related genes. **The Plant Journal**, v. 16, p. 561-569, 1998.

BEGIC-AKAGIC, A.; SPAHO, N.; ORUCEVIC, S.; DRKENDA, P.; KURTOVIC, M.; GASI, F.; KOPJAR, M.; PILIZOTA, V. Influence of cultivar, storage time, and processing on the phenol content of cloudy apple juice. **Croatian Journal of Food Science and Technology**, v. 3, p. 1-8, 2011.

BENDICH, A.; MACHLIN, L. J.; SCANDURRA, O.; BURTON, G. W.; WAYNER, D. D. M. The antioxidant role of vitamin C. **Advances in Free Radical Biology and Medicine**, v. 2, p. 419-444, 1986.

BEVERAGGI, A.; MOURICHON, X.; SALLÉ, G. Étude compare des premières étapes de l'infection chez des bananiers sensible et résistants infectés par *Cercospora fijiensis*, agent de la maladie des raies noires. **Canadian Journal of Botany**, v. 73, p. 1328-1337, 1995.

BIDEL, L. P. R.; MEYER, S.; GOULAS, Y.; CADOT, Y.; CEROVIC, Z. G. Responses of epidermal phenolic compounds to light acclimation: *in vivo* qualitative and quantitative assessment using chlorophyll fluorescence excitation spectra in leaves of three woody species. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 88, p. 163-179, 2007.

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.; SILVA, A. L.; BATISTA, D. G.; MOREIRA, F. R. B.; FLORI, J. E.; OLIVEIRA, J. E. M.; ARAÚJO, J. L. P.; PINTO, J. M.; CASTRO, J. M. C.; MOURA, M. S. B.; AZOUBEL, P. M.; CUNHA, T. J. F.; SILVA, S. O.; CORDEIRO, Z. J. M. **Sistema de produção da bananeira irrigada**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2009. (Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, Sistemas de Produção, 4).

BRAHMI, F.; MECHRI, B.; DABBOU, S.; DHIBI, M.; HAMMAMI, M. The efficacy of phenolics compounds with different polarities as antioxidants from olive leaves depending on seasonal variations. **Industrial Crops and Products**, v. 38, p. 146-152, 2012.

BRASIL. Ministério da Justiça. **Submete a controle e fiscalização os produtos químicos relacionados no anexo da portaria**. Portaria n. 1274, de 25 de agosto de 2003. Disponível em: <<http://portal.mj.gov.br/>>. Acesso em: 25 jul. 2013.

BUDAVARI, S.; O'NEIL, M.; SMITH, A.; HECKELMAN, P. E.; KINNEARY, J. F. K. **The Merck index: an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals**. 12 ed. New Jersey: Merck & Co., 1996. 2542 p.

CARVALHO, L. B.; LIMA, C. J.; MEDEIROS, P. H. Ascorbate oxidase from *Cucurbita maxima*. **Phytochemistry**, v. 20, p. 2423-2424, 1981.

CASTELAN, F. P.; SARAIVA, L. A.; LANGE, F.; LAPEYRE DE BELLAIRE, L.; CORDENUNSI, B. R.; CHILLET, M. Effects of black leaf streak 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.

CAVALCANTE, M. J. B. Investigação histológica da interação *Mycosphaerella fijiensis* x Banana (*Musa acuminata*) com ênfase no "burst" oxidativo. **Tropical Plant Pathology**, v. 37 (Supl.), p. 1-5, 2012.

CHÉRIF, M.; ARFAOUI, A.; RHAÏEM, A. Phenolic compounds and their role in bio-control and resistance of chickpea to fungal pathogenic attacks. **Tunisian Journal of Plant Protection**, v. 2, p. 7-22, 2007.

COMPANIONI, B.; MORA, N.; DÍAZ, L.; PÉRE, A.; ARZOLA, M.; ESPINOSA, P.; HERNÁNDE, M.; VENTURA, J.; PÉREZ, M. C.; SANTOS, R.; LORENZO, J. C. Identification of discriminant factors after treatment of resistant and susceptible banana leaves with *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* culture filtrates. **Plant Breeding**, v. 124, p. 79-85, 2005.

COSTACHE, M. A.; CAMPEANU, G.; NEATA, G. Studies concerning the extraction of chlorophyll and total carotenoids from vegetables. **Romanian Biotechnological Letters**, v. 17, p. 7702-7708, 2012.

DAI, J.; MUMPER, R. J. Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. **Molecules**, v. 15, p. 7313-7352, 2010.

DEUTSCH, J. C. Ascorbate acid oxidation by hydrogen peroxide. **Analytical Biochemistry**, v. 225, p. 1-7, 1998.

DEUTSCH, J. C.; SANTOSH-KUMAR, C. R. Dehydroascorbic acid undergoes hydrolysis on solubilization which can be reversed with mercaptoethanol. **Journal of Chromatography A**, v. 724, p. 271-278, 1990.

DEZASHIBI, Z.; SAMARIN, A. M.; HEMATYAR, N.; KHODAPARAST, M. H. Phenolics in Henna: extraction and stability. **European Journal of Experimental Biology**, v. 3, p. 38-41, 2013.

DIXON, R. A.; PAIVA, N. L. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell*, v. 7, p. 1085-1097, 1995.

DOMINGUES, A. R. **Produção de banana 'Nanicão' (Musa sp. AAA) em clima Cwa**. 2010. 79 f. Dissertação (Mestrado em Ciências), Escola Superior de

Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, São Paulo, 2011.

DUNN, F. J.; DAWNSON, C. R. On the nature of ascorbate oxidase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 189, p. 485-497, 1951.

DUPLESSIS, S.; CUOMO, C. A.; LIN, Y. C.; AERTS, A.; TISSERANT, E.; VENEULT-FOURREY, C.; JOLY, D. L.; HACQUARD, S.; AMSELEM, J.; CANTAREL, B.; CHIU, R.; COUTINHO, P. M.; FEAU, N.; FIELD, M.; FREY, P.; GELHAYE, E.; GOLDBERG, J.; GRABHERR, M. G.; KODIRA, C. D.; KOHLER, A.; KÜES, U.; LINDQUIST, E.A.; LUCAS, S. M.; MAGO, R.; MAUCELI, E.; MORIN, E.; MURAT, C.; PANGILINAN, J. L.; PARK, R.; PEARSON, M.; QUESNEVILLE, H.; ROUHIER, N.; SAKTHIKUMAR, S.; SALAMOV, A. A.; SCHMUTZ, J.; SELLES, B.; SHAPIRO, H.; TANGUAY, P.; TUSKAN, G. A.; HENRISSAT, B.; VAN DE PEER, Y.; ROUZÉ, P.; ELLIS, J. G.; DODDS, P. N.; SCHEIN, J. E.; ZHONG, S.; HAMELIN, R. C.; GRIGORIEV, I. V.; SZABO, L. J.; MARTIN, F. Obligate biotrophy features unraveled by the genomic analysis of rust fungi. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, p. 9166-9171, 2011.

ENDO, T.; USUKI, R.; KANEDA, T. Antioxidant effects of chlorophyll and pheophytin on the autoxidation of oils in the dark. II. The mechanism of antioxidative action of chlorophyll. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 62, p. 1387-1389, 1985.

ENGELBERTH, J.; ALBORN, H. T.; SCHMELZ, E. A.; TUMLINSON, J. H. Airborne signals prime plants against insect herbivore attack. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, p. 1781-1785, 2004.

ESAKA, M.; HATTORI, T.; FIJISAWA, K.; SAKAJO, S.; ASAH, T. Molecular cloning and nucleotide sequence of full-length cDNA for ascorbate oxidase from cultured pumpkin cells. **European Journal of Biochemistry**, v. 191, p. 537-541, 1990.

EWANÉ, C. A. **Study of the physiological component involved in the development of crown rot in bananas and the role of phenolics in susceptibility variation mechanisms**. 112 p. Docteur (Sciences Agronomiques et Ingénierie Biologique), Faculté Universitaire des Sciences Agronomiques, Gembloux, Belgique, 2012.

FERRUZZI, M. G.; BÖHM, V.; COURTNEY, P. D.; SCHWARTZ, S. J. Antioxidant and antimutagenic activity of dietary chlorophyll derivatives determined by radical scavenging and bacterial reverse mutagenesis assays. **Food Chemistry and Technology**, v. 67, p. 2589-2595, 2002.

FORD, B. L.; BAI, J.; MANTHEY, J.; BALDWIN, E. A. Improved removal of ascorbate interference in the Folin-Ciocalteu assay of “total phenolic content”. **Proceedings of Florida State Horticultural Society**, v. 123, p. 220-222, 2010a. Disponível em: <<http://www.ars.usda.gov/pandp/people>>. Acesso em: 25 mai. 2013a.

FORD, B. L.; BAI, J.; MANTHEY, J.; BALDWIN, E. A. **Toward a facile method to remove ascorbate interference in the Folin-Ciocalteu assay of “total phenolic**

content", 2010b. Disponível em: <<http://www.ars.usda.gov/pandp/people>>. Acesso em: 25 mai. 2013b.

GAUHL, F.; PASBERG-GAUHL, F.; VUYLSTEKE, D.; ORTIZ, R. 1993. **Multilocal evaluation of black sigatoka resistance in banana and plantain**. IITA Research Guide n. 47. IITA: Ibadan, 59p.

GAQUEREL, E.; BALDWIN, I. T. Honing in on phenotypes: comprehensive two-dimensional gas chromatography of herbivory-induced volatile emissions and novel opportunities for system-level analyses. **AoB Plants**, v. 5, p. 1-10, 2013.

GARRUTI, D. S.; MATIAS, M. L.; FACUNDO, H. V. V.; SILVA, E. O.; COSTA, J. N.; SILVA, M. A. A. P. Acceptance of banana cultivars resistant to black Sigatoka by the consumer market of northeast Brazilian region. **Ciência Rural**, v. 42, p. 948-954, 2012.

GRACIA, I.; RODRÍGUEZ, J. F.; LUCAS, A.; FERNANDEZ-RONCO, M. P.; GARCÍA, M. T. Optimization of supercritical CO₂ process for the concentration of tocopherol, carotenoids and chlorophylls from residual olive rusk. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 59, p. 72-77, 2011.

GÜLLER, Ç.; TUNÇ, F. Chlorophyll adsorption on acid-activated clay. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 69, p. 948-950, 1992.

GUYOT, S.; MARNET, N.; DRILLEAU, J. Thiolytic-HPLC characterization of apple procyanidins covering a large range of polymerization states. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 14-20, 2001.

HOSS, R.; HELBIG, J. BOCHOW, H. Function of host and fungal metabolites in resistance response of banana and plantain in the black Sigatoka disease pathosystem (*Musa* spp. - *Mycosphaerella fijiensis*). **Journal of Phytopathology**, v. 148, p. 387-394, 2000.

HU, X.; TANAKA, A.; TANAKA, R. Simple extraction methods that prevent the artifactual conversion of chlorophyll to chlorophyllide during pigment isolation from leaf samples. **Plant Methods**, v. 9, p. 1-13, 2013.

HUANG, J.; ZHANG, Z. Microwave-assisted extraction of quercetin and acid degradation of its glycosides in *Psidium guajava* leaves. **Analytical Sciences**, v. 20, p. 395-397, 2004.

İNANÇ, A. L. Chlorophyll: structural properties, health benefits and its occurrence in virgin olive oils. **Academica Food Journal**, v. 9, p. 26-32, 2011.

INSKEP, W. P.; BLOOM, P. R. Extinction coefficients of chlorophyll a and b in N,N-dimethylformamide and 80% acetone. **Plant Physiology**, v. 77, p. 483-485, 1985.

JU, C. H.; TIAN, Y. C.; YAO, X.; CAO, W. X.; ZHU, Y.; HANNAWAY, D. Estimating leaf chlorophyll content using red edge parameters. **Pedosphere**, v. 20, p. 633-644, 2010.

KALPANA, K.; KAPIL, S.; HARSH, P. S.; BIKRAM, S. Effects of extraction methods on phenolic contents and antioxidant activity in aerial parts of *Potentilla trosanguinea* Lodd. and quantification of its phenolic constituents by RP-HPLC. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 10129-10134, 2008.

KÄRKOËN, A.; FRY, S. C. Effect of ascorbate and its oxidation products on hydrogen peroxide production in cell-suspension cultures of *Picea abies* and in the absence of cells. *Journal of Experimental Botany*, v. 57, p. 1633-1644, 2006.

KATO, N.; ESAKA, M. cDNA cloning and gene expression of ascorbate oxidase in Tobacco. **Plant Molecular Biology**, v. 30, p. 833-837, 1996.

KHODDAMI, A.; WILKES, M. A.; ROBERTS, T. H. Techniques for analysis of plant phenolics compounds. **Molecules**, v. 18, p. 2328-2375, 2013.

LABARBE, B.; CHEYNIER, V.; BROSSAUD, F.; SOUQUET, J. M.; MOUTOUNET, M. Quantitative fractionation of grape proanthocyanidins according to their degree of polymerization. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, p. 2719-2723, 1999.

LATTANZIO, V.; LATTANZIO, V. M. T.; CARDINALI, A. **Role of phenolics in the resistance mechanisms of plants against fungal pathogens and insects**. In: IMPERATO, P. (Ed). *Phytochemistry: Advances in Research*. Research Signpost, 2006. p. 23-67.

LEE, M. H.; DAWSON, C. R. Ascorbate Oxidase: further studies on the purification of the enzyme. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 248, p. 6590-6602, 1973.

LEVENE, H. Robust tests for equality of variances. In: OLKIN, I.; GHURYE, S. G.; HOEFFDING, W.; MADOW, W. G.; MANN, H. B. (Ed). **Contributions to probability and statistics: essays in honor of harold hotelling**. Stanford: Stanford University Press, 1960. p. 278-292.

MADHUJITH, T.; SHAHIDI, F. Antioxidant potential of barley as affected by alkaline hydrolysis and release of insoluble-bound phenolics. **Food Chemistry**, v. 117, p. 615-620, 2009.

MANN, H. B.; WHITNEY, D. R. On a test of whether one of two random variables is stochastically larger than the other. **Annals of Mathematical Statistics**, v. 18, p. 50-60, 1947.

MATSUI, K. Green leaf volatiles: hydroperoxide lyase pathway of oxylipin metabolism. **Current Opinion on Plant Biology**, v. 9, p. 274-280, 2006.

MILENKOVIC, S. M.; ZVEZDANOVIC, J. B.; ANDELKOVIC, T. D.; MARKOVIC, D. Z. The identification of chlorophyll and its derivatives in the pigment mixtures: HPLC-chromatography, visible and mass spectroscopy studies. **Advanced Technologies**, v. 1, p. 16-24, 2012.

MORAES, W. S.; SILVA, S. H. M.; FUKUDA, E.; SILVA, C. M. Técnica de monitoramento da Sigatoka negra na cultura da banana. **Pesquisa e Tecnologia**, v. 8, p. 29-36, 2011.

MORRIS, C. E.; BARDIN, M.; KINKEL, L. L.; MOURY, B.; NICOT, P. C.; SANDS, D. C. Expanding the paradigms of plant pathogen life history and evolution of parasitic fitness beyond agricultural boundaries. **PLoS Pathogens**, v. 5, art. e1000693, p. 1-7, 2009.

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Review: extraction and analysis of phenolics in foods. **Journal of Chromatography A**, v. 1054, p. 95-111, 2004.

NIGGEWEG, R.; MICHAEL, A.J.; MARTIN, C. Engineering plants with increased levels of the antioxidant chlorogenic acid. **Nature Biotechnology**, v. 22, p. 746-754, 2004.

NIKOLOPOULOS, D.; KORGIOPOULOU, C.; MAVROPOULOS, K.; LIAKOPOULOS, G.; KARABOURNIOTIS, G. Leaf anatomy affects the extraction of photosynthetic pigments by DMSO. **Talanta**, v. 76, p., 1265-1268, 2008.

O'CONNELL, R. J.; THON, M. R.; HACQUARD, S.; AMYOTTE, S. G.; KLEEMANN, J.; TORRES, M. F.; DAMM, U.; BUIATE, E. A.; EPSTEIN, L.; ALKAN, N.; ALTMUELLER J.; ALVARADO-BALDERRAMA, L.; BAUSER, C. A.; BECKER, C.; BIRREN, B. W.; CHEN, Z.; CHOI, J.; CROUCH, J. A.; DUVICK, J. P.; FARMAN, M. A.; GAN, P.; HEIMAN, D.; HENRISSAT, B.; HOWARD, R. J.; KABBAGE, M.; KOCH, C.; KRACHER, B.; KUBO, Y.; LAW, A. D.; LEBRUN, M. H.; LEE, Y. H.; MIYARA, I.; MOORE, N.; NEUMANN, U.; NORDSTROEM, K.; PANACCIONE, D. G.; PANSTRUGA, R.; PLACE, M.; PROCTOR, R. H.; PRUSKY, D.; RECH, G.; REINHARDT, R.; ROLLINS, J. A.; ROUNSLEY, S.; SCHARDL, C. L.; SCHWARTZ, D. C.; SHENOY, N.; SHIRASU, K.; SIKHAKOLLI, U. R.; STUEBER, K.; SUKNO, S. A.; SWEIGARD, J. A.; TAKANO, Y.; TAKAHARA, H.; TRAIL, F.; VAN DER DOES, H. C.; VOLL, L. M.; WILL, I.; YOUNG, S.; ZENG, Q.; ZHANG, J.; ZHOU, S.; DICKMAN, M. B.; SCHULZE-LEFERT, P.; VER, L.; VAN THEMAAT, E.; MA, L. J.; VAILLANCOURT, L. J. Lifestyle transitions in plant pathogenic *Colletotrichum* fungi deciphered by genome and transcriptome analyses. **Nature Genetics**, v. 44, p. 1060-1065, 2012.

OHKAWA, J.; OKADA, N.; SHINMYO, A.; TAKANO, M. Primary structure of cucumber (*Cucumis sativus*) ascorbate oxidase deduced from cDNA sequence: homology with blue copper proteins and tissue-specific expression. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 86, p. 1239-1243, 1989.

OLIVEIRA, A. C.; VALENTIM, I. B.; GOULART, M. O. F.; SILVA, C. A.; BECHARA, E. J. H.; TREVISAN, M. T. S. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. **Química Nova**, v. 32, p. 689-702, 2009a.

OLIVEIRA, A. C.; VALENTIM, I. B.; SILVA, C. A.; BECHARA, E. J. H.; BARROS, M. P.; MANO, C. M.; GOULART, M. O. F. Total phenolic content and free radical scavenging activities of methanolic extract powders of tropical fruit residues. **Food Chemistry**, v. 115, p. 469-475, 2009b.

PASSARDI, F.; PENEL, C.; DUNAND, C. Performing the paradoxical: how plants peroxidases modify the cell wall. **Trends in Plant Science**, v. 9, p. 236-246, 2004.

PORRA, R. J. The chequered history of the development and use of simultaneous equations for the accurate determination of chlorophylls a and b. **Photosynthesis Research**, v. 73, p. 149–156, 2002.

PORRA, R. J.; THOMPSON, W. A.; KRIEDEMANN, P. E. Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 975, p. 384-394, 1989.

PORTO, T. S. **Extração da ascorbato oxidase de *Cucurbita maxima* por processo descontínuo e contínuo em coluna de discos rotativos perfurados utilizando sistemas de duas fases aquosas**. 123 p. 2008. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas), Universidade de São Paulo, São Paulo-SP, 2008.

PORTO, T. S.; PORTO, C. S.; CAVALCANTI, M. T. H.; FILHO, J. L. L.; PEREGO, P.; PORTO, A. L. F.; CONVERTI, A.; PESSOA JR., A. Kinetic and thermodynamic investigation on ascorbate oxidase activity and stability of a *Cucurbita maxima* extract. **Biotechnology Progress**, v. 22, p. 1637-1642, 2006.

RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 20, p. 933-956, 1996.

RICHARDSON, A. D.; DUIGAN, S. P.; BERLYN, G. P. An evaluation of noninvasive methods to estimate foliar chlorophyll content. **New Phytologist**, v. 153, p. 185-194, 2002.

RYAN, D.; ROBAR, D. K.; ENZIER, P.; ANTOLOVICH, M. Applications of mass spectrometry to plant phenols. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 18, p. 362-372, 1999.

SANDSTRÖM, J. **Interference during analysis of polyphenols in fruit juices**. 27 p. 2010. Master's thesis (Msc in Horticulture), Swedish University of Agricultural Sciences, Alnarp, 2010.

SCALA, A.; MIRABELLA, R.; MUGO, C.; MATSUI, K.; HARING, M. A.; SCHUURINK, R. C. E-2-hexenal promotes susceptibility to *Pseudomonas syringae* by activating jasmonic acid pathways in *Arabidopsis*. **Frontiers in Plant Science**, v. 4, art. 74, 2013.

SELMAR, D.; KLEINWACHTER, M. Influencing the product quality by deliberately applying drought stress during the cultivation of medicinal plants. **Industrial Crops and Products**, v. 42, p. 558-566, 2013b.

SELMAR, D.; KLEINWACHTER, M. Stress enhances the synthesis of secondary plant products: the impact of stress-related over-reduction on the accumulation of natural products. **Plant and Cell Physiology**, v. 54, p. 817-826, 2013a.

SEREIKAITĖ, J.; ILJASEVICIENĖ, D.; DIENYS, G.; DANILCENKO, H.; GAVRILOVA, V. Ascorbate oxidase. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 43, p. 153-160, 1993.

SHAPIRO, S. S.; WILK, M. B. An analysis of variance test for normality (complete sample). **Biometrika**, v. 52, n. 3, p. 591-611, 1965.

SHUKLA, R. N.; SINGH, S.; DAS, N.; BAIJAL, M.; SANWAL, G. G. Carbohydrate metabolism in *Musa paradisiaca*. **Phytochemistry**, v. 12, p. 979-985, 1973.

SIKWESE, F. E. **Shorgum phenolic extracts: their storage stability and antioxidant activity in sunflower oil**. 148 p. 2005. Master's thesis (Msc in Food Science and Technology), University of Pretoria, Pretoria, 2005.

SPEARMAN, C. The proof and measurement of association between two things. **The American Journal of Psychology**, v. 15, N. 1, p. 72-101, 1904.

STREIT, N. M.; CANTERLE, L. P.; CANTO, M. W.; HECKTHEUER, L. H. H. As clorofilas. **Ciência Rural**, v. 35, p. 748-755, 2005.

SUN, J.; CHU, Y. F.; WU, X.; LIU, R. H. Antioxidant and antiproliferative activities of common fruits. **Journal of Agricultural Food and Chemistry**, v. 50, p. 7449-7454, 2002.

SUZUKI, , N.; KOUSSEVITZKY, S.; MITTLER, R.; MILLER, G. ROS and redox signalling in the response of plants to abiotic stress. **Plant Cell and Environment**, v. 35, p. 259-270, 2012.

SWAIN, T.; HILLIS, W. E. The phenolics constituents of *Prunus domestica*. The quantitative analysis of phenolic constituents. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 10, p. 63-68, 1959.

TAIT, M. A.; HIK, D. S. Is dimethylsulfoxide a reliable solvent for extracting chlorophyll under field conditions? **Photosynthesis Research**, v. 78, p. 87-91, 2003.

TEIXEIRA, L. A. J.; VAN RAIJ, B.; BETTIOL NETO, J. E. Estimativa das necessidades nutricionais de bananeiras do subgrupo Cavendish cultivadas no Estado de São Paulo. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 30, p. 540-545, 2008.

TRAORE, S.; KOBENAN, K.; KENDIA, K. E.; KONE, D.; TRAORE, D. Relationship between stomatal density and the response to black leaf streak disease in different genotypes of banana and banana plantain. **Agronomie Africaine**, v. 1, p. 37-47, 2008.

WANASUNDARA, U.N.; SAHIDI, F. Antioxidant and prooxidant activity of green tea extracts in marine oils. **Food Chemistry**, v. 63, p. 335-342, 1998.

WELLBURN, A. R. The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. **Journal of Plant Physiology**, v. 144, p. 307-313, 1994.

WÍDEN, C.; EKHOLM, A.; COLEMAN, M. D.; RENVERT, S.; RUMPUNEN, K. Erythrocyte antioxidant protection of Rose Hips (*Rosa* spp.). **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2012, p. 1-8, 2012.

WHITTENBERG, S. V.; ALONSO, L.; VERRELST, HERMANS, I.; VALCKE, R.; VEROUSTRAETE, F.; MORENO, J.; SAMSOM, R. A field study on solar-induced chlorophyll fluorescence and pigment parameters along a vertical canopy gradient of four tree species in an urban environment. **Science of the Total Environment**, v. 466-467, p. 185-194, 2014

WU, F.; JIANG, W.; WU, B. Methodological aspects about determination of plant defensive phenolics in response to stress. **Current Analytical Chemistry**, v. 9, p. 360-367, 2013.

WUYTS, N.; LOGNAY, G.; VERSCHEURE, M.; MARLIER, M.; DE WAELE, D.; SWENNEN, R. Potential physical and chemical barriers to infection by the burrowing nematode *Radopholus similis* in roots of susceptible and resistant banana (*Musa* spp.). **Plant Pathology**, v. 56, p. 878-890, 2007.

XUE, L.; YANG, L. Deriving leaf chlorophyll content of green-leafy vegetables from hyperspectral reflectance. **ISPRS Journal of Photogrammetry and Remote Sensing**, v. 64, p. 97-106, 2009.

ZHAO, H.; EANG, B. C.; ZHAO, H. C.; EANG, J. B. Stress stimulus induced resistance to *Cladosporium cucumerinum* in cucumber seeding. **Colloids and Surfaces - Biointerfaces**, v. 44, p. 36-40, 2005.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos nas diferentes abordagens utilizadas no presente estudo permitiram responder questões acerca das respostas de aclimação da bananeira e do seu fruto à diferentes condições ambientais. Desse modo, foi possível levantar hipóteses e possíveis estratégias de estudos visando a elucidação dos mecanismos de resposta da planta e do fruto ao meio ambiente a partir das seguintes observações:

- Bananas colhidas em áreas próximas a remanescentes florestais de Mata Atlântica parecem apresentar uma vida verde aproximadamente 70% maior quando comparadas a frutas colhidas com a mesma idade fisiológica, no entanto sem a influência do fragmento florestal próximo. Estes resultados parecem ser decorrentes dos efeitos dos hormônios ácido abscísico e ácido indol-3-acético sobre o etileno e o metabolismo amido sacarose durante o amadurecimento da banana, parâmetro que apresenta uma influência direta na qualidade da fruta;

- A extração utilizando dois ciclos rápidos com acetona 80% (v/v) em água parece ser eficiente na extração de compostos fenólicos solúveis totais em folhas de bananeiras (CFST) e o emprego de hexano é capaz de remover grande parte do excesso de clorofilas no extrato, possibilitando a utilização deste em ensaios cromatográficos;

- Folhas de bananeiras cultivadas próximas à floresta nativa e com menores índices de Sigatoka negra apresentam níveis significativamente maiores de CFST quando comparadas a plantas em áreas sem a influência do fragmento florestal (Mata Atlântica). Desse modo a avaliação dos CFST em folhas parece ser uma ferramenta útil para a comparação de bananeiras submetidas a diferentes condições ambientais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AUORE, G.; PARFAIT, B.; FAHRASMANE, L. Bananas, raw materials for making processed food products. **Trends in Food Science and Technology**, v. 20, p. 78-91, 2009.
- AL-HARTHI, K.; AL-YAHYAI, R. Effect of NPK fertilizer on growth and yield of banana in Northern Oman. **Journal of Horticulture and Forestry**, v. 1, p. 160-167, 2009.
- ALTIERI, M. A.; NICHOLLS, C. I. Conversión agroecológica de sistemas convencionales de producción: teoría, estrategias y evaluación. **Ecosistemas**, v. 16, n. 1, 2007.
- ALTIERI, M. A.; NICHOLLS, C. Optimizando el manejo agroecológico de plagas através de la salud del suelo. **Agroecologia**, v. 1, p. 29-36, 2006.
- ALTIERI, M. A.; SILVA, E. N.; NICHOLLS, C. I. **O papel da biodiversidade no manejo de pragas**. 1ª ed. Ribeirão Preto: Holos, 2003. 226 p.
- ANDERSON, J. P.; BADRUZSAUFARI, E.; SCHENK, P. M.; MANNERS, J. M.; DESMOND, O. J.; EHLERT, C.; MACLEAN, D. J.; EBERT, P. R.; KAZAN, K. Antagonist interaction between abscisic acid and jasmonate-ethylene signaling pathways modulates defense gene expression and disease resistance in Arabidopsis. **The Plant Cell**, v. 16, p. 3460-3479, 2004.
- ANDERSON, J. V.; DROGAMACI, M.; HORVATH, D. P.; FOLEY, M. E.; CHAO, W. S.; SUTTLE, J. C.; THIMMAPURAN, J.; HERNANDEZ, A. G.; ALI, S.; MIKEL, M. A. Auxin and ABA acts as central regulators of developmental networks associated with paradormancy in Canada thistle (*Cirsium arvense*). **Functional and Integrative Genomics**, v. 3, p. 515-531, 2012.
- ANDREA, R. G. P.; GERARDO, C. Efecto de *Mycosphaerella fijiensis* sobre la fisiología de la hoja de banano. **Agronomía Colombiana**, v. 26, p. 256-265, 2008.
- ANTICO, C. J.; COLON, C.; BANKS, T.; RAMONELL, K. M. Insights into the role of jasmonic acid-mediated defenses against necrotrophic and biotrophic fungal pathogens. **Frontiers in Biology**, v. 7, p. 48-56, 2012.
- ASSELBERGH, B.; VIEESSCHAUWER, D.; HOFTE, M. Global switches and fine-tuning-ABA modulates plant pathogen defense. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 21, p. 709-719, 2008.
- ASSELBERGH, B.; DE VIEESSCHAUWER, D.; HOFTE, M. Global switches and fine-tuning ABA modulates plant pathogen defense. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 21, p. 709-719, 2008.
- ATKINSON, N. J.; URWIN, P. E. The interaction of plant biotic and abiotic stresses: from genes to the field. **Journal of Experimental Botany**, v. 63, p. 3523-3543, 2012.

AUORE, G.; PARFAIT, B.; FAHRASMANE, L. Bananas, raw materials for making processed food products. **Trends in Food Science and Technology**, v. 20, p. 78-91, 2009.

BAILEY, A.; DEASY, C.; QUINTON, J.; SILGRAM, M.; JACKSON, STEVENS, C. Determining the cost of in-field mitigation options to reduce sediment and phosphorous loss. **Land Use Policy**, v. 30, n. 1, p. 234-242, 2013.

BALASUNDRUM, N.; SUNDRUM, K.; SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: antioxidant activity, occurrence and potential uses. **Food Chemistry**, v. 99, p. 191-203, 2006.

BASHI, D. S.; MORTAZAVI, S. A.; REZAEI, K.; RAJAEI, A.; KARIMKHANI, M. M. Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from Yarrow (*Achillea beibrestinii*) by response surface methodology. **Food Science and Biotechnology**, v. 21, p. 1005-1111, 2012.

BELIN, C.; MEGIES, C.; HAUSEROVÁ, E.; LOPEZ-MOLINA, L. Absciscic acid represses growth of the Arabidopsis embryonic axis after germination by enhancing auxin signaling. **The Plant Cell**, v. 21, p. 2253-2268, 2009.

BENNETT, R. N.; SHIGA, T. M.; HASSIMOTO, N. M. A.; ROSA, E. A. S.; LAJOLO, F. M.; CORDENUNSI, B. R. Phenolics and antioxidant properties of fruit pulp and cell wall fractions of postharvest banana (*Musa acuminata* Juss.) cultivars. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 7991-8003, 2010.

BEVERAGGI, A.; MOURICHON, X.; SALLÉ, G. Étude compare des premières étapes de l'infection chez des bananiers sensible et résistants infectés par *Cercospora fijiensis*, agent de la maladie des raies noires. **Canadian Journal of Botany**, v. 73, p. 1328-1337, 1995.

BHATTACHARYYA, R. K.; RAO, V. N. M. Water requirement, crop coefficient and water-use efficiency of 'Robusta' banana under different soil covers and soil moisture regimes. **Scientia Horticulturae**, v. 25, p. 263-269, 1985.

BOWER, J. P.; ROBINSON, J. P. Transpiration characteristics of banana leaves (cultivar 'Williams') in response to progressive depletion of available soil moisture. **Scientia Horticulturae**, v. 30, p. 289-300, 1987.

BRADY, S. M.; SARKAR, S. E.; BONETTA, D.; MCCOURT, P.. The ABSCISIC ACID INSENSITIVE 3 (ABI3) gene is modulated by farnesylation and is involved in auxin signaling and lateral root development in Arabidopsis. **Plant Journal**, v. 34, p. 67-75, 2003.

BRANDT, K.; LEIFERT, C.; SANDERSON, R.; SEAL, C. J. Agroecosystem management and nutritional quality of plant foods: The case of organic fruits and vegetables. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 30, p. 177-197, 2011.

BRAT, P.; YAHIA, A.; CHILLET, M.; BUGAUD, C.; BAKRY, F.; REYNES, M.; BRILLOUET, J. M. Influence of cultivar and growth altitude on banana volatile compounds distribution. **Fruits**, v. 59, p. 75-82, 2004.

BROOKS, T. M.; MITTERMEIER, R. A.; DA FONSECA, G. A. B.; GERLACH, J.; HOFFMAN, M.; LAMOREUX, J. F.; MITTERMEIER, C. G.; PILGRIM, J. D.; RODRIGUES, A. S. L. Global biodiversity conservation priorities. **Science**, v. 303, p. 58-61, 2006

BUGAUD C.; CHILLET, M; BEAUTE, M. P.; DUBOIS, C. Physicochemical analysis of mountain bananas from the French West Indies. **Scientia Horticulturae**, v. 108, p. 167–172, 2006.

BUGAUD, C.; DARIBO, M. O.; DUBOIS, C. Climatic conditions affect the texture and colour of Cavendish bananas (Grande Naine cultivar). **Scientia Horticulturae**, v. 113, p. 238–243, 2007.

CABANI, M.; AFIF, D.; HAWKINS, S. Chapter 7 - Lignins and abiotic stress. **Advances in Botanical Research**, v. 61, p. 219-262, 2012.

CACACE, J. E.; MAZZA, G. Mass transfer process during extraction of phenolic compounds from milled berries. **Journal of Food Engineering**, v. 59, p. 379-389, 2003.

CANO, M. P.; ANCOS, B.; MATALLANA, M. C.; CÁMARA, M.; REGLER, G.; TABERA, J. Differences among Spanish and Latin-American banana cultivars: morphological, chemical and sensory characteristics. **Food Chemistry**, v. 59, p. 411-419, 1997.

CARDOSO, P. C.; TOMAZINI, A. P. B.; STRIMGHETA, P. C.; RIBEIRO, S. M. R.; PINHEIRO-SANT'ANA, H. M. Vitamin C and carotenoids in organic and conventional fruits grown in Brazil. **Food Chemistry**, v. 126, p. 411-416, 2011.

CASTELAN, F. P.; SARAIVA, L. A.; LANGE, F.; LAPEYRE DE BELLAIRE, L.; CORDENUNSI, B. R.; CHILLET, M. Effects of black leaf streak 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.

CASTRO-ALVES, V. C.; PEREIRA, G. S.; PINTO, N. O.; PENHA, M. F. A.; GARRUTI, D. S. Sensory and volatile compounds profile of Thap Maeo banana: An option for the replacement of pest-susceptible cultivars. **The Natural Products Journal**, v. 2, p. 205-211, 2012a.

CASTRO-ALVES, V. C.; PENHA, M. F. A.; PINTO, N. O.; GARRUTI, D. S. Volatile compounds profile of Musa Fhia 02: an option to counter losses by black Sigatoka. **The Natural Products Journal**, v. 2, p. 55-60, 2012b.

CHAN, Z. Expression profiling of ABA pathway transcripts indicates crosstalk between abiotic and biotic stress responses in Arabidopsis. **Genomics**, v. 100, p. 110-115, 2012.

CHEN, J.; WEN, P.; KONG, W.; PAN, Q.; ZHAN, J.; LI, J.; WAN, S.; HUANG, W. Effect of salicylic acid on phenylpropanoids and phenylalanine ammonia-lyase in harvested grape berries. **Postharvest Biology and Technology**, v. 40, p. 64-72, 2006.

CHEYNIER, V.; COMTE, G.; DAVIES, K. M.; LATTANZIO, V.; MARTENS, S. Plant phenolics: recent advances on their biosynthesis, genetics and ecophysiology. **Plant Physiology and Biochemistry**, in press (corrected proof), 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.plaphy.2013.05.009>. Acesso em: 17 mai 2013.

CHOENG, Y. H.; CHANG, H. S.; GUPTA, R.; WANG, X.; ZHU, T.; LUAN, S. Transcriptional profiling reveals novel interactions between wounding, pathogen, abiotic stress and hormonal responses in Arabidopsis. **Plant Physiology**, v. 129, p. 661-77, 2002.

CHUC-UC, J.; BRITO-ARGÁEZ, L.; CANTO-CANCHÉ, B.; TZEC-SIMÁ, M.; RODRÍGUEZ-GARCIA, C.; PERAZA-ECHEVERRÍA, L.; PERAZA-ECHEVERRÍA, S.; JAMES-KAY, A.; CRUZ-CRUZ, C. A.; PEÑA-RODRÍGUEZ, L.M.; ISLAS-FLORES, I. The in vitro secretome of *Mycosphaerella fijiensis* induces cell death in banana leaves. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 49, p. 572-578, 2011.

COELHO, V. S. P. Questioning the relationship between participation and development: a case study of the Vale do Ribeira, Brazil. **World Development**, v. 36, p. 2937-2952, 2008.

CORDENUNSI, B. R.; LAJOLO, F. M. Starch breakdown during banana ripening: Sucrose synthase and sucrose phosphate synthase. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 43, p. 347-351, 1995.

COSTA, F. S. **Variáveis de crescimento, produção e qualidade de frutos da bananeira 'Galil 18' (*Musa* spp., AAAB) sob níveis de água e de potássio em tabuleiro costeiro**. 67 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias), Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas-BA, 2011.

CRAMPTON, B. G.; HEIN, I.; BERGER, D. K. Salicylic acid confers resistance to a biotrophic rust pathogen, *Puccinia substriata*, in pearl millet (*Pennisetum glaucum*). **Molecular Plant Pathology**, v. 10, p. 291-304, 2009.

DAI, J.; MUMPER, R. J. Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. **Molecules**, v. 15, p. 7313-7352, 2010.

DE LANGHE, E.; VRYDAGHS, L.; DE MARET, P.; PERRIER, X.; DENHAM, T. Why bananas matter: an introduction to the history of banana domestication. **Ethnobotany Research and Applications**, v. 7, p. 165-177, 2009.

DE SMET, I.; SIGNORA, L.; BEECKMAN, T.; INZÉ, D.; FOYER, C. H.; ZHANG, H. An abscisic acid-sensitive checkpoint in lateral root development of Arabidopsis. **Plant Journal**, v. 33, p. 543-55, 2003.

DELAZAR, A.; NAHAR, L.; HAMEDEYAZDAN, S.; SARKER, S. D. Microwave-assisted extraction in natural products isolation. **Methods in Molecular Biology**, v. 864, p. 864-889, 2012.

DELSART, C.; GHIDOSSO, R.; POUPOT, C.; CHOLET, C.; GRIMI, N.; VOROBIEV, E.; MILISIC, V.; MIETTON, M. P. Enhanced extraction of phenolic compounds from Merlot grapes by pulsed electric field treatment. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 63, p. 205-211, 2012.

DJIGAL, D.; CHABRIER, C.; PIERRE-FRANÇOIS, D.; ACHARD, R.; QUÉNÉHERVÉ, P.; TIXIER, P. Cover crops alter the soil nematode food web in banana agroecosystems. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 48, p. 142-150, 2012.

DOMINGUES, A. R. **Produção de banana 'Nanicão' (Musa sp. AAA) em clima Cwa**. 2010. 79 f. Dissertação (Mestrado em Ciências), Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, São Paulo, 2011.

DOWD, C.; WILSON, I. W.; MCFADDEN, H. Gene expression profile changes in cotton root and hypocotyl tissues in response to infection with *Fusarium oxysporum* f. sp. vasinfectum. **Molecular Plant-Microbe Interaction**, v. 17, p. 654-667, 2004.

DU, F. Y.; XIAO, X. H.; LI, G. K. Application of ionic liquids in the microwave-assisted extraction of trans-resveratrol from *Rhizma Polygoni Cuspidati*. **Journal of Chromatography A**, v. 1140, p. 56-62, 2007.

DUNLAP, J. R.; ROBACKER, K. M. Absciscic acid alters the metabolism of indole-3-acetic acid in senescing flowers of *Cucumis melo* L. **Plant Physiology**, v. 94, p. 870-874, 1990.

DUYCK, P. F.; DORTEL, E.; VINATIER, F.; GAUJOUX, E.; CARVAL, D.; TIXIER, P. Effect of environment and fallow period on *Cosmopolites sordidus* population dynamics at the landscape scale. **Bulletin of Entomological Research**, v. 12, p. 1-6, 2012.

ENGELBERTH, J.; ALBORN, H. T.; SCHMELZ, E. A.; TUMLINSON, J. H. Airborne signals prime plants against insect herbivore attack. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, p. 1781-1785, 2004.

EWANÉ, C. A. **Study of the physiological component involved in the development of crown rot in bananas and the role of phenolics in susceptibility variation mechanisms**. 112 p. Docteur (Sciences Agronomiques et Ingénierie Biologique), Faculté Universitaire des Sciences Agronomiques, Gembloux, Belgique, 2012.

FACUNDO, H. V. V.; GARRUTI, D. S.; CORDENUNSI, B. R.; LAJOLO, F. M. Influence of different banana cultivars on volatile compounds during ripening in cold storage. **Food Research International**, v. 49, p. 626-633, 2012.

FAN, J.; HILL, L.; CROOKS, C.; DOERNER, P.; LAMB, C. Absciscic acid has a key role in modulating diverse plant-pathogen interactions. **Plant Physiology**, v. 150, p. 1750-1761, 2009.

FAOSTAT - Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Food and agricultural commodities production** - Final 2011 data, 2012. Disponível em: <<http://faostat3.fao.org/home/index.html>>. Acesso em: 29 jul 2013.

FERREYRA, M. L.; RIUS, S. P.; CASATI, P. Flavonoids: biosynthesis, biological functions, and biotechnological applications. **Frontiers in Plant Science**, v. 3, art. 222, 2012.

FORESTO, M. F. **Influência da aplicação de ácido indol-3- acético na expressão dos receptores de etileno e na atividade de duas enzimas relacionadas ao metabolismo de amido em bananas**. 62 f. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Alimentos), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo-SP, 2012.

FRAGNIÈRE, C.; SERRANO, M.; ABOU-MANSOUR, E.; MÉTRAUX, J. P.; L'HARIDON, F. Salicylic acid and its location in response to biotic and abiotic stress. **FEBS Letters**, v. 585, p. 1847-1852, 2011.

FURLANETO, F. P. B.; MARTINS, A. N.; ESPERANCINI, M. S. T. Viabilidade econômica de manejos nutricionais na cultura de banana. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 41, p. 205-212, 2011.

GALETTI, M.; GIACOMINI, H. C.; BUENO, R. S.; BERNARDO, C. S. S.; MARQUES, R. M.; BOVENDOP, R. S.; STEFFLER, C. E.; RUBIM, P.; GOBBO, S. K.; DONATTI, C. I.; BEGOTTI, R. A.; MEIRELLES, F.; NOBRE, R. A.; CHIARELLO, A. G.; PERES, C. A. Priority areas for conservation of Atlantic Forest large mammals. **Biological Conservation**, v. 142, p. 1229-1241, 2009.

GAQUEREL, E.; BALDWIN, I. T. Honing in on phenotypes: comprehensive two-dimensional gas chromatography of herbivory-induced volatile emissions and novel opportunities for system-level analyses. **AoB Plants**, v. 5, p. 1-10, 2013.

GARRUTI, D. S.; MATIA, M. L.; FACUNDO, H. V. V.; SILVA, E. O.; COSTA, J. N.; SILVA, M. A. A. P. Aceitação de cultivares de bananas resistentes à Sigatoka negra junto ao consumidor da região nordeste do Brasil. **Ciência Rural**, v. 42, p. 948-954, 2012.

GELMEZ, N.; KINCAL, N. S.; YENER, M. E. Optimization of supercritical carbon dioxide extraction of antioxidants from roasted wheat germ based on yield, total phenolic and tocopherol contents, and antioxidant activities of the extracts. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 48, p. 217-224, 2009.

GIL, S. S.; TUJELA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 48, p. 909-930, 2010.

GINI, R.; HAMADA, E.; GONÇALVES, R. V.; GASAROTTO, L.; PEREIRA, J. C. Análise de risco das mudanças climáticas globais sobre a Sigatoka-negra da bananeira no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, v. 32, p. 197-204, 2007.

GLAZE BROOK, J. Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, v. 43, p. 205-227, 2005.

GONZAGA NETO, L.; SOARES, J. M.; CRISTO, A. S.; NASCIMENTO, T. Avaliação de cultivares de bananeira na região do submédio São Francisco. I. Primeiro ciclo de produção. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 15, p. 21-25, 1995.

GRAHAM, T. L.; GRAHAM, M. Y. Signaling in soybean phenylpropanoid responses (dissection of primary, secondary, and conditioning effects of light, wounding, and elicitor treatments). **Plant Physiology**, v. 110, p. 1123-1133, 1996.

GUO, J. P.; GAO, S. H. The experimental study on impacts of high temperature and high CO₂ concentration on crops. **Chinese Journal of Eco-Agriculture**, v. 10, p. 17-20, 2002.

HALLMAN, E. The influence of organic and conventional cultivation systems on the nutritional value and content of bioactive compounds in selected tomato types. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 92, p. 2840-2848, 2012.

HAMMOND-KOSACK; JONES, J. D. G. **Response to plant pathogens**. In: BUCHANNAN, B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. (Ed). Biochemistry and molecular biology of plants. Rockville: American Society of Plant Physiologists, 2000. p. 1102-1157.

HARDISSON, A.; RUBIO, C.; BAEZ, A.; MARTIN, M.; ALVAREZ, R.; DIAZ, E. Mineral composition of the banana (*Musa acuminata*) from the island of Tenerife. **Food Chemistry**, v. 73, p. 153-161, 2001.

HE, F.; MU, L.; YAN, G.; LIANG, N.; PAN, Q.; WANG, J.; REEVES, M. J.. DUAN, C. Biosynthesis of anthocyanins and their regulation in colored grapes. **Molecules**, v. 15, p. 9057-9091, 2010.

HERMS, D. A.; WATSON, W. J. The dilemma of plants - to grow or defend. **Quarterly Review of Biology**, v. 67, p. 283-335, 1992.

HESLOP-HARRISON, J. S.; SCHWARACHER, T. Domestication, genomics and the future for banana. **Annals of Botany**, v. 100, p. 1073-1084, 2007.

HONFO, F. G.; TENKOUANO, A.; COULIBALY, O. Banana and plantain-based foods consumption by children and mothers in Cameroon and Southern Nigeria: A comparative study. **African Journal of Food Science**, v. 5, p. 287-291, 2011.

HONFO, F. G.; KAYODÉ, A. P. P.; COULIBALY, O.; TENKOUANO, A. Relative contribution of banana and plantain products to the nutritional requirements for iron,

zinc and vitamin A of infants and mothers in Cameroon. **Fruits**, v. 62, p. 267-277, 2007.

HUANG, J.; ZHANG, Z. Microwave-assisted extraction of quercetin and acid degradation of its glycosides in *Psidium guajava* leaves. **Analytical Sciences**, v. 20, p. 395-397, 2004.

HUI, Y. H. **Handbook of fruit and vegetable flavors**. 1 ed. New Jersey: John Wiley and Sons, 2010. 1095 p.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Levantamento sistemático da produção agrícola**. LSPA - Pesquisa Mensal de Previsão e Acompanhamento de safras agrícolas. Jan 2011. Disponível em: <www.ibge.gov.br>. Acesso em: 12 out 2013.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção Agrícola Municipal de 2009**. Out 2010. Disponível em: <www.ibge.gov.br>. Acesso em: 16 set 2013.

IBRAF - Instituto Brasileiro de Frutas. **Produção brasileira de frutas 2009 - 2010**. Disponível em: <http://www.ibraf.org.br/estatisticas/est_frutas.asp>. Acesso em: 29 jul 2013.

INCE, A. E.; SAHIN, S.; SÜMNÜ, S. G. Extraction of phenolic compounds from Melissa using microwave and ultrasound. **Turkish Journal of Agriculture and Forestry**, v. 37, p. 69-75, 2013.

ISRAELI, Y.; PLAUT, Z.; SCHWARTZ, A. Effect of shade on banana morphology, growth and production. **Scientia Horticulturae**, v. 62, p. 45-56, 1995.

JEANDET, P.; DELAUNOIS, B.; CONREUX, A.; DONNEZ, D.; NUZZO, V.; CORDELIER, S.; CLÉMENT, C.; COUOT, E. Biosynthesis, metabolism, molecular engineering, and biological functions of stilbene phytoalexins in plants. **BioFactors**, v. 36, p. 331-341, 2010.

JIANG, Y.; JOYCE, D. C.; JIANG, W.; LU, W. Effects of chilling temperatures on ethylene binding by banana fruit. **Journal of Plant Growth Regulators**, v. 43, p. 109-115, 2004.

JONES, D. R. Disease and pest constrains to banana production. **Acta Horticulturae**, v. 828, p. 21-36, 2009.

KADIOGLU, A.; TERZI, R.; SAHURAN, N.; SAGLAM, A. Current advances in the investigation of leaf rolling caused by biotic and abiotic stress factors. **Plant Science**, v. 182, p. 42-48, 2012.

KAGEYAMA, P. Y.; OLIVEIRA, R. S.; FERRAZ, P. A.; FURTADO, E. L.; SOUZA, A. D.; SEBBENN, A. M. Genetic gains in the selection for latex productivity in natural populations of *Hevea brasiliensis* in Chico Mendes reserve. A case study of the IAPs (Islands of High Productivity). **Scientia Forestalis**, v. 61, p. 79-85, 2002.

KEFELI, V. I.; KALEVITCH, M. V.; BORSARI, B. Phenolic cycle in plants and environment. **Journal of Cell and Molecular Biology**, v. 2, p. 13-18, 2003.

KHAN, M. K.; ABERT-VIAN, M.; FABIANO-TIXIER, A. S.; DANGLES, O.; CHEMAT, F.; Ultrasound-assisted extraction of polyphenols (flavanone glycosides) from orange (*Citrus sinensis* L.) peel. **Food Chemistry**, v. 119, p. 851-858, 2010.

KHODDAMI, A.; WILKES, M. A.; ROBERTS, T. H. Techniques for analysis of plant phenolics compounds. **Molecules**, v. 18, p. 2328-2375, 2013.

KLEIJN, D.; RUNDLÖF, M.; SCHEPER, J.; SMITH, H. G.; TSCHARNTKE, T. Does conservation on farmland contribute to halting the biodiversity decline? **Trends in Ecology and Evolution**, v. 26, n. 9, p. 474-481, 2011.

KOFFI, E.; PHILLIPS, R.; WICKER, L. Characterization of cloud components from selected tropical fruits. **Journal of Food Quality**, v. 30, p. 797-812, 2007.

KONG, J. M.; CHIA, L. S.; GOH, N. K.; CHIA, T. F.; BROUILLARD, R. Analysis and biological activities of anthocyanins. **Phytochemistry**, v. 64, p. 923-933, 2003.

KOORNNEEF, A.; LEON-REYES, A.; RITSEMA, T.; VERHAGE, A.; DEN OTTER, F. C.; VAN LOON, L. C.; PIETERSE, M. J. Kinetics of salicylate-mediated suppression of jasmonate signaling reveal a role for redox modulation. **Plant Physiology**, v. 147, p. 1358-1368, 2008.

KRAUSE, M.; LOTZE-CAMPEN, H.; POPP, A.; DIETRICH, J. P.; BONDSCH, M. Conservation of undisturbed natural forests and economic impacts on agriculture. **Land Use Policy**, v. 30, p. 344-354, 2013.

KSOURI, R.; MEGDICHE, W.; FALLEH, H.; TRABELSI, N.; BOULAABA, M.; SMAOUI, A.; ABDELLY, C. Influence of biological, environmental and technical factors on phenolic content and antioxidant activities of Tunisian halophytes. **Comptes Rendus Biologies**, v. 11, p. 865-873, 2008.

KYAMUHANGIRE, W.; KREKLING, T.; REED, E.; PEHRSON, R. The microstructure and tannin content of banana fruit and their likely influence on juice extraction. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 86, p. 1908-1915, 2006.

LAHAV, E.; TURNER, D. W. Temperature influences the composition of diagnostic samples used to assess the nutrient status of banana plants. **Scientia Horticulturae**, v.27, p. 275-283, 1985.

LAPORNIK, B.; PROSEK, M.; WONDRA, A. Comparison of extracts prepared from plants by products using different solvent and extraction time. **Journal of Food Engineering**, v. 71, p. 214-222, 2005.

LATTANZIO, V.; LATTANZIO, V. M. T.; CARDINALI, A. **Role of phenolics in the resistance mechanisms of plants against fungal pathogens and insects.** In: IMPERATO, P. (Ed). *Phytochemistry: Advances in Research*. Research Signpost, 2006. p. 23-67.

LEE, B. R.; KIM, K. Y.; JUNG, W. J.; AVICE, J. C.; OURRY, A.; KIM, T. H. Peroxidases and lignification in relation to the intensity of water-deficit stress in white clover (*Trifolium repens* L.) **Journal of Experimental Botany**, v. 58, p. 1271-1279, 2007.

LEIVA-MORA, M. Mejoramiento genético tradicional y empleo de técnicas biotecnológicas en la búsqueda de resistencia frente a los principales patógenos fúngicos de *Musa* spp. Biotecnología Mejoramiento genético tradicional y empleo de técnicas biotecnológicas en la búsqueda de resistencia frente a los principales patógenos fúngicos de *Musa* spp. **Biotechnología vegetal**, v. 6, p. 131-147, 2006.

LESHEM, Y.; GOLANI, Y.; KAYE, Y.; LEVINE, A. Reduced expression of the v-SNAREs AtVAMP71/AtVAMP7C gene family in *Arabidopsis* reduces drought tolerance by suppression of abscisic acid-dependent stomatal closure. **Journal of Experimental Botany**, v. 61, p. 2615-2622, 2010.

LI, H.; CHEN, B.; NIE, L.; YAO, S. Solvent effects on focused microwave assisted extraction of polyphenolic acids from *Eucommia ulmoides*. **Phytochemical Analysis**, v. 15, p. 306-312, 2004.

LIAZID, A.; PALMA, M.; BRIGUI, J.; BARROSO, C. G. Investigation on phenolic compounds stability during microwave-assisted extraction. **Journal of Chromatography A**, v. 1140, p. 29-34, 2007.

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

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.

LÓPEZ, A.; FENOLL, J.; HELLÍN, P.; FLORES, P. Physical characteristics and mineral composition of two pepper cultivars under organic, conventional and soilless cultivation. **Scientia Horticulturae**, v. 150, p. 259-266, 2013.

LÓPEZ, N.; PUÉRTOLAS, E.; CONDÓN, S.; ÁLVAREZ, I.; RASO, J. Effects of pulsed electric fields on the extraction of phenolic compounds during the fermentation of must of Tempranillo grapes. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 9, p. 477-482, 2008.

LUNA, E.; PASTOR, V.; ROBERT, J.; FLORS, V.; MAUCH-MANI, B.; TON, J. Callose deposition: a multifaceted plant defense response. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 169, p. 695-703, 2011.

MA, Y. Q.; CHEN, J. C.; LIU, D. H.; YE, X. Q. Simultaneous extraction of phenolic compounds of citrus peel extracts: Effect of ultrasound. **Ultrasound Sonochemistry**, v. 16, p. 57-62, 2009.

MACIEL, R. C. G. **Ilhas de Alta Produtividade: inovação essencial para a manutenção do seringueiro nas reservas extrativistas**. 80f. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento Econômico), Instituto de Economia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP, 2003.

MANDAL, S. M.; CHARKRABORTY, D.; DEY, S. Phenolics acid act as signaling molecules in plant-microbe symbioses. **Plant Signaling and Behavior**, v. 5, p. 359-368, 2010.

MATSUI, K. Green leaf volatiles: hydroperoxide lyase pathway of oxylipin metabolism. **Current Opinion on Plant Biology**, v. 9, p. 274-280, 2006.

MATTIVI, F.; VRHOVSEK, U.; MALACARNE, G.; MASUERO, D.; ZULINI, L.; STEFANINI, M.; MOSER, C.; VELASCO, R.; GUELLA, G. Profiling of resveratrol oligomers, important stress metabolites, accumulating in the leaves of hybrid *Vitis vinifera* (Merzling × Teroldego) genotypes infected with *Plasmopara viticola*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 5364-5375, 2011.

MELOTTO, M.; UNDERWOOD, W.; HE, S. Y. Role of stomata in plant innate immunity and foliar bacterial diseases. **Annual Review of Phytopathology**, v. 46, p. 101-122, 2008.

MELOTTO, M.; UNDERWOOD, W.; KOCZAN, J.; NOMURA, K.; HE, S. Y. Plants stomata function in innate immunity against bacterial invasion. **Cell**, v. 126, p. 969–980, 2006.

MENGISTE, T. Plant immunity to necrotrophs. **Phytopathology**, v. 50, p. 267-294, 2012.

MISHRA, R. P.; SINGH, R. K.; JAISWAL, H. K.; KUMAR, V.; MAURYA, S. Rhizobium-mediated induction of phenolics and plant growth promotion in rice (*Oryza sativa* L.). **Current Microbiology**, v. 52, p. 383-389, 2006.

MITTLER, R.; BLUMWALD, E. Genetic engineering for modern agriculture: challenges and perspectives. **Annual Review of Plant Biology**, v. 61, p. 443-462, 2010.

MOHR, P. G.; CAHILL, D. M. Absciscic acid influences the susceptibility of *Arabidopsis thaliana* to *Pseudomonas syringae* pv. tomato and *Peronospora parasitica*. **Functional Plant Biology**, v. 30, p. 461-469, 2003.

MORAES, G. I. Estratégias para a comercialização da banana no Vale do Ribeira. **Cadernos de Economia**, v. 20, p. 119-128, 2007.

MORAES, W. S.; SILVA, S. H. M.; FUKUDA, E.; SILVA, C. M. Técnica de monitoramento da Sigatoka negra na cultura da banana. **Pesquisa e Tecnologia**, v. 8, p. 29-36, 2011.

MORRIS, C. E.; BARDIN, M.; KINKEL, L. L.; MOURY, B.; NICOT, P. C.; SANDS, D. C. Expanding the paradigms of plant pathogen life history and evolution of parasitic

fitness beyond agricultural boundaries. **PLoS Pathogens**, v. 5, art. e1000693, p. 1-7, 2009.

MOSER, T.; FÖSTER, B.; FRANKENBACH, S.; MARQUES, R.; RÖMBKE, J.; SCHMIDT, P.; HÖFER, H. Nematode assemblages in banana (*Musa acuminata*) monocultures and banana plantations with Juçara palms (*Euterpe edulis*) in the southern Mata Atlântica, Brazil. **Nematology**, V. 14, P. 371-374, 2012.

MUÑIZ-MÁRQUEZ, D. B.; MARTÍNEZ-ÁVILA, G. C.; WONG-PAZ, J. E.; BELMARES-CERDA, R.; RODRÍGUEZ-HERRERA, R.; AGUILAR, C. N. Ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from *Laurus nobilis* L. and their antioxidant activity. **Ultrasonics sonochemistry**, v. 20, p. 1149-1154, 2013.

MYERS, N.; MITTERMEIER, R. A.; MITTERMEIER, C. G.; FONSECA, G. A. B.; KENT, J. Biodiversity for conservation priorities. **Nature**, v. 403, p. 853-858, 2000.

NAVARRO, L.; DUNOYER, P.; JAY, F.; ARNOLD, B.; DHARMASIRI, N.; ESTELLE, M.; VOINET, O.; JONES, J. D. G. A plant miRNA contributes to antibacterial resistance by repressing auxin signaling. **Science**, v. 312, p. 436-439, 2006.

NEUMANN, K.; HILDEBRAND, E. Early bananas in Africa: The state of the art. **Ethnobotany Research and Applications**, v. 7, p. 353-362, 2009.

OLIVEIRA, A. C.; VALENTIM, I. B.; GOULART, M. O. F.; SILVA, C. A.; BECHARA, E. J. H.; TREVISAN, M. T. S. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. **Química Nova**, v. 32, p. 689-702, 2009a.

OLIVEIRA, A. C.; VALENTIM, I. B.; SILVA, C. A.; BECHARA, E. J. H.; BARROS, M. P.; MANO, C. M.; GOULART, M. O. F. Total phenolic content and free radical scavenging activities of methanolic extract powders of tropical fruit residues. **Food Chemistry**, v. 115, p. 469-475, 2009b.

PAYÉS, A. C. L. M.; PAVÃO, T.; SANTOS, R. F. 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.

PERRIER, X.; DE LANGHE, E.; DONOHUE, M.; LENTFER, C.; VRYDAGHS, L.; BAKRY, F.; CARREEL, F.; HIPPOLYTE, I.; HORRY, J.; JENNY, C.; LEBOT, V.; RISTERUCCI, A.; TOMEPEKE, K.; DOUTRELENPONT, H.; BALL, T.; MANWARING, J.; DE MARET, P.; DENHAM, T. Multidisciplinary perspectives on banana (*Musa spp.*) domestication. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, p. 11311-11318, 2011.

PORTER-BOLLAND, L.; ELLIS, E. A.; GUARIGUATA, M. R.; RUIZ-MALLÉN, I.; NEGRETE-YANKELEVICH, S.; REYES-GARCÍA, V. Community managed forests and forest protected areas: An assessment of their conservation effectiveness across the tropics. **Forest Ecology and Management**, v. 268, p. 6-17, 2012.

PURGATTO, E. **Efeito do ácido 3-indol 3-acético no metabolismo amido-sacarose da banana**. 133f. Tese (Doutorado em Ciências dos Alimentos),

Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo-SP, 2001.

PURGATTO, E.; LAJOLO, F. M.; NASCIMENTO, J. R. O.; CORDENUNSI, B. R. The onset of starch degradation is concomitant to changes in the content of free and conjugated forms of indole-3-acetic acid. **Journal of Plant Physiology**, v. 158, p. 1105-1111, 2002.

PURGATTO, E.; LAJOLO, F. M.; NASCIMENTO, J. R. O.; CORDENUNSI, B. R. Inhibition of β -amylase activity, starch degradation and sucrose formation by indole-3-acetic acid during banana ripening. **Planta**, v. 212, p. 823-828, 2001.

RAMAKRISHNA, A.; RAVISHANKAR, G. A. Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. **Plant Signaling and Behavior**, v. 6, p. 1720-1731, 2011.

RAO, S. R.; RAVISHANKAR, G. A. Plant cell cultures: chemical factors of secondary metabolites. **Biotechnology Advances**, v. 20, p. 101-153, 2002.

RATNADASS, A.; FERNANDES, P.; AVELINO, J.; HABIB, R. Plant species diversity for sustainable management of crop pests and diseases in agroecosystems: a review. **Agronomy for Sustainable Development**, v. 32, p. 273-303, 2012.

RIBEIRO, M. C.; MARTENSEN, A. C.; METZGER, J. P.; TABARELLI, M.; SCARANO, F.; FORTIN, M. **The Brazilian Atlantic Forest: a shrinking biodiversity hotspot**. In: ZACHOS, F. E.; HARBEL, J. C. (Ed.). Biodiversity hotspots: distribution and protection of conservation priority areas. New York: Springer, 2011. p. 405-434.

RIBEIRO, M. C.; METZGER, J. P.; MARTENSEN, A. C.; PONZONI, F. J.; HIROTA, M. M. The Brazilian Atlantic forest: how much is left, and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation. **Biological Conservation**, v. 142, p. 1141-1153, 2009.

RIOV, J.; DAGAN, E.; GOREN, R.; YANG, S. F. Characterization of abscisic Acid-induced ethylene production in citrus leaf and tomato fruit tissues. **Plant Physiology**, v. 92, p. 48-53, 1990.

RIZHISKY, L.; LIANG, H. G.; SHUMAN, J.; SHULAEV, V.; DAVLETOVA, S.; MITTLER, R. When defense pathways collide. The response of Arabidopsis to a combination of drought and heat stress. **Plant Physiology**, v. 134, p. 1683-1696, 2004.

ROBINSON, J. C.; ALBERTS, A. J. Growth and yield responses of banana (cultivar 'Williams') to drip irrigation under drought and normal rainfall conditions in the subtropics. **Scientia Horticulturae**, v. 30, p. 187-202, 1986.

ROBINSON, J. C.; ALBERTS, A. J. Growth and yield responses of banana (cultivar 'Williams') to drip irrigation under drought and normal rainfall conditions in the subtropics. **Scientia Horticulturae**, v. 30, p. 187-202, 1986.

ROSTAGNO, M. A.; PALMA, M.; BARROSO, C. G. Microwave assisted extraction of soy isoflavones. **Analytical Chimica Acta**, v. 588, p. 274-282, 2007.

ROZANE, D. E.; LIMA, J. D.; SILVA, S. H. M.; MENDONÇA, J. C.; GOMES, E. N.; MODENESE, J. F. **Influência climática em cultivares de bananas colhidas após o inverno**. In: XX Reunião Internacional da Associação para a Cooperação em Pesquisa e Desenvolvimento Integral das Musáceas (Bananas e Plátanos), 2013, Fortaleza-CE. Resumos... Acorbat Brasil, 2013, 1p. Disponível em: <<http://www.cnpmf.embrapa.br/publicacoes/ACORBAT2013/Fisiologia/FP021.pdf>>. Acesso em: 23 set 13.

SÁNCHEZ-VALLET, A.; LÓPEZ, G.; RAMOS, B.; DELGADO-CEREZO, M.; RIVIERE, M. P.; LLORENTE, F.; FERNÁNDEZ, P. V.; ESTEVEZ, J. M.; GRANT, M.; MOLINA, A. Disruption of abscisic acid signaling constitutively activates Arabidopsis resistance to the necrotrophic fungus *Plectosphaerella cucumerina*. **Plant Physiology**, v. 160, p. 2109-2124, 2012.

SANTANA, C. M.; FERRERA, Z. S.; TORRES PADRÓN, M. E.; SANTANA RODRÍGUEZ, J. J. Methodologies for the extraction of phenolic compounds from environmental samples: New approaches. **Molecules**, v. 14, p. 298-320, 2009.

SANTOS-BUELGA, C.; GONZALEZ-MANZANO, S.; DUEÑAS, M.; GONZALEZ-PARAMAS, A. M. Extraction and isolation of phenolic compounds. **Methods in Molecular Biology**, v. 864, p. 427-464, 2012.

SARAIVA, L. A.; CASTELAN, F. P.; SHITAKUBO, R.; HASSIMOTO, N. M. A.; PURGATTO, E.; CHILLET, M.; CORDENUNSI, B. R. Black leaf streak disease affects starch metabolism in banana fruit. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, p. 5582-5589, 2013.

SCALA, A.; MIRABELLA, R.; MUGO, C.; MATSUI, K.; HARING, M. A.; SCHUURINK, R. C. E-2-hexenal promotes susceptibility to *Pseudomonas syringae* by activating jasmonic acid pathways in Arabidopsis. **Frontiers in Plant Science**, v. 4, art. 74, 2013.

SCARPARE FILHO, J. A.; KLUGE, R. A. Produção de bananeira 'Nanicão' em diferentes densidades de plantas e sistemas de espaçamento. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 36, p. 105-113, 2001.

SCHAFFER, B.; ANDRESEN, P. C. (Ed.). **Handbook of environmental physiology of fruit crops**. Boca Raton: CRC Press, 1994. 320p.

SCHROTH, G. ; KRAUSS, U. ; GASPAROTTO, L. ; DUARTE AGUILAR, J. A.; VOHLAND, K. Pests and diseases in agroforestry systems of the humid tropics. **Agroforestry Systems**, v. 50, n. 3, p. 199-241, 2000.

SELLI, S.; GUBBUK, H.; KAFKAS, E.; GUNES, E. Comparison of aroma compounds in Dwarf Cavendish banana (*Musa* spp. AAA) grown from open-field and protected cultivation area. **Scientia Horticulturae**, v. 141, p. 76-82, 2012.

SELMAR, D.; KLEINWACHTER, M. Stress enhances the synthesis of secondary plant products: the impact of stress-related over-reduction on the accumulation of natural products. **Plant and Cell Physiology**, v. 54, p. 817-826, 2013.

SHAO, H. B.; CHU, L. Y.; JALEEL, C. A.; ZHAO, C. X. Water-deficit stress-induced anatomical changes in higher plants. **Comptes Rendus Biologies**, v. 331, p. 215-225, 2008.

SHEN, Z.; ZHONG, S.; WANG, Y.; WANG, B.; MEI, X.; LI, R.; RUAN, Y.; SHEN, Q. Induced soil microbial suppression of banana fusarium wilt disease using compost and biofertilizers to improve yield and quality. **European Journal of Soil Biology**, v. 57, p. 1-8, 2013.

SHY, Y.; WANG, Z.; MENG, P.; TIAN, S.; ZHANG, X.; YANG, S. The glutamate carboxypeptidase AMP1 mediates abscisic acid and abiotic stress responses in Arabidopsis. **New Phytologist**, v. 199, p. 135-150, 2013.

SHIGA, T. M.; SOARES, C. A.; NASCIMENTO, J. R. O.; PURGATTO, E.; LAJOLO, F. M.; CORDENUNSI, B. R. Ripening-associated changes in the amounts of starch and non-starch polysaccharides and their contributions to fruit softening in three banana cultivars. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 91, n. 8, p. 1511-1516, 2011.

SHOUQIN, Z.; JUN, X.; CHANGZHENG, W. High hydrostatic pressure extraction of flavonoids from propolis. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 80, p. 50-54, 2005.

SILVA, L. B.; NASCIMENTO, J. L.; NAVES, R. V.; FERREIRA, P. H. Comportamento vegetativo de cultivares de banana sob diferentes lâminas de irrigação. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 34, p. 93-98, 2004.

SINGH, R. K.; ALI, S. A.; NATH, P.; SANE, V. A. Activation of ethylene-responsive p-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase leads to increased tocopherol levels during ripening in mango. **Journal of Experimental Botany**, v. 62, p. 3375-3385, 2011.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTOS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. **Methods in Enzymology**, v. 299, p. 152-178, 1999.

SOSMA (Fundação S.O.S. Mata Atlântica). **Atlas dos remanescentes florestais da Mata Atlântica: período 2008-2010**. 122 p. Relatório anual 2011. São Paulo, SP. Disponível em: <<http://www.inpe.br/noticias/arquivos/pdf/atlasrelatoriofinal.pdf>>. Acesso em: 22 jun 2013.

SOUZA, H. N.; GOEDE, R. G. M.; BRUSSAARD, L.; CARDOSO, I. M.; DUARTE, E. M. G.; FERNANDES, R. B. A.; GOMES, L. C.; PULLEMAN, M. M. Protective shade, tree diversity and soil properties in coffee agroforestry systems in the Atlantic Rainforest biome. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 146, p. 179-196, 2012.

SUN, J.; CHU, Y. F.; WU, X.; LIU, R. H. Antioxidant and antiproliferative activities of common fruits. **Journal of Agricultural Food and Chemistry**, v. 50, p. 7449-7454, 2002.

SUZUKI, N.; KOUSSEVITZKY, S.; MITTLER, R.; MILLER, G. ROS and redox signalling in the response of plants to abiotic stress. **Plant Cell and Environment**, v. 35, p. 259-270, 2012.

TAHA, F. S.; MOHAMED, G. F.; MOHAMED, S. H.; MOHAMED, S. S.; KAMIL, M. M. Optimization of the extraction of total phenolic compounds from sunflower meal and evaluation of the bioactives of chosen extract. **American Journal of Food Technology**, v. 6, p. 1002-1020, 2011.

TEALE, W. D.; DITENGOU, F. A.; DOVZHENKO, A. D.; LI, X.; MOLENDJIK, A. N.; RUPERTI, B.; PAPONOV, I.; PALM, K. Auxin as a model for integration of hormonal signal processing and transduction. **Molecular Plant**, v. 1, p. 229-237, 2008.

TIXIER, P.; MALÉZIEUX, E.; DOREL, M.; WERY, J. SIMBA, a model for designing sustainable banana-based cropping systems. **Agricultural Systems**, v. 97, p. 139-150, 2008.

TOMAS, F. L. A. **Influencia da biodiversidade florestal na ocorrência de insetos-praga e doenças em cultivos de tomate no município de Apiaí-SP**. 92f. Dissertação (Mestrado em Ciências), Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, São Paulo, 2010.

TOMICH, T. P.; BRODT, S.; FERRIS, H.; GALT, R.; HOWART, W. R.; KEBREAB, E.; LEVEAU, J. H. J.; LIPTZIN, D.; LUBELL, M.; MEREL, P.; MICHELMORE, R.; ROSENSTOCK, T.; SCOW, K.; SIX, J.; WILLIAMS, N.; YANG, L. Agroecology: a review from a global-change perspective. **Annual Review of Environment and Resources**, v. 36, p. 193-222, 2011.

TON, J.; FLORS, V.; MAUCH-MANI, B. The multifaceted role of ABA in disease resistance. **Trends in Plant Science**, v. 14, p. 310-317, 2009.

TORRES, M. A. ROS in biotic interactions. **Physiology Plantarum**, v. 138, p. 414-429, 2010.

TREUTTER, D. Managing phenol contents in crop plants by phytochemical farming and breeding-visions and constraints. **International Journal of Molecular Science**, v. 11, p. 807-857, 2010.

TREWAVAS, A. Urban myths of organic farming. **Nature**, v. 410, p. 409-410, 2001.

TSCHARNTKE, T.; CLOUGH, Y.; WANGER, T. C.; JACKSON, L.; MOTZKE, I.; PERFECTO, I.; VANDERMEER, J.; WHITBREAD, A. Global food security, biodiversity conservation and the future of agricultural intensification. **Biological Conservation**, v. 151, n. 1, p. 53-59, 2012.

TURNER, D. W.; FORTESCUE, J. A.; THOMAS, D. S. Environmental physiology of the bananas (*Musa spp.*). **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 19, p. 463-484, 2007.

TURNER, D. W.; LAHAV, E. The growth of banana plants in relation to temperature. **Australian Journal of Plant Physiology**, v. 10, p. 43-53, 1983.

TUTEJA, N. Absciscic Acid and Abiotic Stress Signaling. **Plant Signaling and Behavior**, v. 2, p. 135-138, 2007.

VAN HASTEN, P. J. A.; FERMONT, A. M.; TAULYA, G. Drought is a major yield loss factor for rainfed East African highland banana. **Agricultural Water Management**, v. 98, p. 541-552, 2011.

VANELLI, T.; WEI, Q. W.; SWEIGARD, J.; GATENBY, A. A.; SARIASLANI, F. S. Production of p-hydroxycinnamic acid from glucose in *Saccharomyces cerevisiae* and *Escherichia coli* by expression of heterologous genes from plants and fungi. **Metabolic Engineering**, v. 9, p. 142-151, 2007.

VARGA, B.; JANDA, T.; LÁSZLÓ, E.; VEISZ, O. Influence of abiotic stresses on the antioxidant enzyme activity of cereals. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 34, p. 849-858, 2012.

VERDE-MENDEZ, C. D. M.; FORSTER, M. P.; RODRÍGUEZ-DELGADO, M. A.; RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ, E. M.; ROMERO, C. D. Content of free phenolic compounds in bananas from Tenerife (Canary Islands) and Ecuador. **European Food Research and Technology**, v. 217, p. 287-290, 2003.

VINATORU, M. An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 8, p. 303-313, 2001.

WANG, L.; WELLER, C. L. Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. **Trends in Food Science and Technology**, v. 17, p. 300-312, 2006.

WANG, W. X.; VINOCUR, B.; ALTMAN, A. Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. **Planta**, v. 218, p. 1-14, 2003.

WOODWARD, A. W.; BARTEL, B. Auxin: regulation, action, and interaction. **Annals of Botany**, v. 95, p. 707-735, 2005.

WUYTS, N.; LOGNAY, G.; VERSCHEURE, M.; MARLIER, M.; DE WAELE, D.; SWENNEN, R. Potential physical and chemical barriers to infection by the burrowing nematode *Radopholus similis* in roots of susceptible and resistant banana (*Musa spp.*). **Plant Pathology**, v. 56, p. 878-890, 2007.

YAO, L.; LI, G.; YANG, B.; TU, S. Optimal fertilization of banana for high yield, quality, and nutrient use efficiency. **Better Crops**, v. 93, p. 10-11, 2009.

YASHUDA, M.; ISHIKAWA, A.; JIKUMARU, Y.; SEKI, M.; UMEZAWA, T.; ASAMI, T.; MARUYAMA-NAKASHITA, A.; KUDO, T.; SHINOZAKI, K.; YOSHIDA, S.; NAKASHITA, H. Antagonistic interaction between systemic acquired resistance and the abscisic acid-mediated abiotic stress response in Arabidopsis. **The Plant Cell**, v. 20, p. 1678-1692, 2008.

YE, W.; HOSSAIN, M. A.; MUNEMASA, S.; NAKAMURA, Y.; MORI, I. C.; MURATA, Y. Endogenous abscisic acid is involved in methyl jasmonate-induced reactive oxygen species and nitric oxide production but not in cytosolic alkalization in Arabidopsis guard cells. **Journal of Plant Physiology**, v. 170, p. 1212-1215, 2013.