UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

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

Perfis de compostos voláteis de banana submetidos a diferentes tratamentos pós-colheita e suas correlações com a expressão diferencial dos receptores de etileno

Versão corrigida da Tese conforme Resolução CoPGr 5890.

O original encontra-se disponível no Serviço de Pós-Graduação da FCF/USP

Helena Pontes Chiebao

Tese para obtenção do grau de

DOUTOR

Orientador:

Prof. Dr. Eduardo Purgatto

São Paulo

2013

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.

Helena Pontes Chiebao

Perfis de compostos voláteis de banana submetidos a diferentes tratamentos pós-colheita e suas correlações com a expressão diferencial dos receptores de etileno

Comissão Julgadora

da

Tese para obtenção do grau de Doutor

Prof. Dr. Eduardo Purgatto

Orientador/Presidente

Pr. Dr. Adaucto Bellarmino de Pereira Netto (UFPR)

1°. examinador

Prof. Dr. Luciano Freschi (IB/USP)

2°. examinador

Prof. Dr. Angelo Pedro Jacomino (ESALQ/USP)

3°. examinador

Profa. Dra. Beatriz Rosana Cordenunsi (FCF/USP)

4°. examinador

São Paulo, 27 de Março de 2013.

Aos meus pais, Erli Chiebao e Sonia M. de Pontes Chiebao, por todo apoio e amor dedicados, e por terem me ensinado que tudo é possível se nos empenharmos.

Às minhas irmãs, Fernanda Pontes Chiebao L'Abatte e Daniela Pontes Chiebao, que me deram forças e acreditaram em mim.

AGRADECIMENTOS

À minha família, Erli, Sonia, Fernanda e Daniela, por todo apoio.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Eduardo Purgatto, por toda ajuda, pelas conversas, e pela oportunidade.

Ao Dr. Jeffrey K. Brecht, da Universidade da Florida, pela oportunidade de conhecer outra cultura e por abrir o seu laboratório tão prontamente.

Às amigas Maria Lucia Cocato, Renata Trommer e Eleni Pliakoni, pela amizade incondicional.

Ao CNPq pela bolsa de estudos e apoio financeiro.

Ao programa de Ciência dos Alimentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo pela oportunidade concedida.

Às amigas Mariana Faulin Foresto, Bruna Lima Gomes e Laís Moro pela ajuda tanto na bancada quanto pelas conversas.

Ás técnicas Tânia Shiga, Lúcia Helena Silva, Márcia Moraes e Aline de Oliveira pelo auxílio técnico.

Aos colegas de laboratório: Alexandra, Ana Claudia, Claudinéia, Eliana, Fernanda, Florence, Gabriela, Geovana, João Paulo, Jonathan, Juliana, Lorenzo, Regina, Renata Figueiredo, Renata Shikubo, Roberta, Sabrina, Talita, Tatiana Toledo, Vanessa, Vítor.

Á todos os funcionários, em especial Cleo, Monica, Tania, Edilson, Lurdinha e Joana pela ajuda em todos os momentos.

SUMÁRIO

Resumo	1
Abstract	2
1. Introdução	3
Expressão diferencial dos receptores de etileno	8
2. Objetivos	17
3. Materiais e Métodos	18
3.1. Nanicão	18
3.1.1. Amostragem	18
3.1.2. Tratamentos	18
3.1.3. Métodos	19
3.1.3.1. Respiração e produção de etileno	19
3.1.3.2. Medida de cor da casca	20
3.1.3.3. Quantificação dos açúcares solúveis	20
3.1.3.4. Conteúdo de amido	21
3.1.3.5. Quantificação relativa dos compostos voláteis	21
3.1.3.6. Quantificação relativa da expressão gênica dos receptores de	22
etileno	
3.1.3.6.1. Delineamento experimental	22
3.1.3.6.2. Desenho dos primers	23
3.1.3.6.3. Extração de RNA total	26
3.1.3.6.4. Síntese do DNA complementar (cDNA) fita-simples	27
3.1.2.6.5. Análise da expressão Gênica por PCR quantitativo (qPCR)	27
3.2. Grand Naine	29
3.2.1. Amostragem	29
3.2.2. Tratamentos	29
3.2.3. Métodos	31
3.2.3.1. Respiração e produção de etileno	31
3.2.3.2. Medida de cor da casca	31
3.2.3.3. Sólidos solúveis totais (%TSS)	31
3.2.3.4. Aroma	32
3.3. Análise estatística	33
4. Resultados e Discussão	34

4.1. Caracterização dos frutos		
4.1.1. Produção de etileno	34	
4.1.2. Respiração	37	
4.1.3. Coloração da casca	39	
4.1.4. Açúcares solúveis e amido	42	
4.2. Análise dos Compostos Voláteis	45	
4.2.1. Nanicão	45	
4.2.2. Grand Naine	55	
4.3. Análise da expressão gênica dos receptores de etileno	69	
5. Conclusões	74	
6. Anexo I	75	
Anexo II	76	
Anexo III	78	
Anexo IV	79	
7. Referências bibliográficas	81	

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Pág.

Figura 1: Esquema para a conversão de aminoácidos de cadeia ramificada em ésteres	4
de cadeia ramificada.	
Figura 2 – Formação de compostos voláteis a partir de ácidos graxos.	5
Figura 3: Modelo de biossíntese de etileno proposta por Yang e Hoffamn (1984).	9
Figura 4 – Modelo dos estados de receptores na ligação com etileno.	12
Figura 5: Modelo proposto para a via de sinalização do etileno.	13
Figura 6 - Pontos selecionados para as análises de qPCR baseados na curva de	23
produção de etileno.	
Figura 7 - Exemplos de curvas de dissociação dos receptores de etileno ERS1 (A),	26
ERS2 (B), ERS3 (C), ETR1 (D) e da actina (E)	
Figura 8 – Produção de etileno endógeno de bananas cv. Nanicão, grupo controle (não tratado, amadurecimento a 20°C) e tratamentos (armazenamento a 13°C e, após 15 dias, transferência para 20°C; 100ppb 1-metilciclopropeno 12 horas; 100ppm etileno por 12 horas), durante o amadurecimento. Os valores indicados são as médias e as barras de erros correspondem aos desvios-padrão (n=5).	34
Figura 9 - Produção de etileno endógeno de bananas cv. Grand Naine, grupo controle (não tratado, amadurecimento a 20°C) e tratamentos (armazenamento a 13°C e, após 15 dias, transferência para 20°C; 100ppm etileno por 12 horas; 100ppm etileno por 12 horas, armazenamento a 13°C e, após 15 dias, transferência para 20°C), durante o amadurecimento. Os valores indicados são as médias e as barras de erros correspondem aos desvios-padrão (n=3).	35

Figura 10 – Respiração de bananas cv. Nanicão, grupo controle (não tratado, amadurecimento a 20°C) e tratamentos (armazenamento a 13°C e, após 15 dias, transferência para 20°C; 100ppb 1-metilciclopropeno 12 horas; 100ppm etileno por 12 horas) (n=5), durante o amadurecimento. Os valores indicados são as médias e as barras de erros correspondem aos desvios- padrão (n=5).

Figura 11 – Respiração de bananas cv. Grand Naine, grupo controle (não tratado, amadurecimento a 20°C)e tratamentos (armazenamento a 13°C e, após 15 dias, transferência para 20°C; 100ppm etileno por 12 horas; 100ppm etileno por 12 horas, armazenamento a 13°C e, após 15 dias, transferência para 20°C), durante o amadurecimento. Os valores indicados são as médias e as barras de erros correspondem aos desvios-padrão (n=3).

Figura 12 - Coloração da casca de bananas cv. Nanicão, grupo controle (não tratado, amadurecimento a 20°C) e tratamentos (armazenamento a 13°C e, após 15 dias, transferência para 20°C; 100ppb 1-metilciclopropeno 12 horas; 100ppm etileno por 12 horas), durante o amadurecimento. Os valores indicados são as médias e as barras de erros correspondem aos desvios- padrão (n=6).

Figura 13 - Coloração da casca de bananas cv. Grand Naine, grupo controle (não tratado, amadurecimento a 20°C)e tratamentos (armazenamento a 13°C e, após 15 dias, transferência para 20°C; 100ppm etileno por 12 horas; 100ppm etileno por 12 horas, armazenamento a 13°C e, após 15 dias, transferência para 20°C), durante o amadurecimento. Os valores indicados são as médias e as barras de erros correspondem aos desvios-padrão (n=12).

Figura 14 - Degradação do amido e liberação de açúcares solúveis em bananas cv. 43 Nanicão, grupo controle (não tratado, amadurecimento a 20oC) e tratamentos (armazenamento a 13°C e, após 15 dias, transferência para 20oC; 100ppb 1metilciclopropeno 12 horas; 100ppm etileno por 12 horas), durante o amadurecimento. Os valores indicados são as médias e as barras de erros correspondem aos desviospadrão (n=3).

Figura 15 - Sólidos solúveis totais (%TSS) na casca e polpa de bananas cv. Grand Naine, grupo controle (não tratado, amadurecimento a 20oC)e tratamentos (armazenamento a 13º e, após 15 dias, transferência para 20°C; 100ppm etileno por 12 horas; 100ppm etileno por 12 horas, armazenamento a 13°C e, após 15 dias, transferência para 20°C), durante o amadurecimento. Os valores indicados são as médias e as barras de erros correspondem aos desvios-padrão (n=3).

Figura 16 - Análise de Componentes Principais (PCA) do perfil de compostos voláteis 48 dos frutos inteiros (A) e projeção das substâncias detectadas (B), representadas por códigos (tabela 1) dos grupos controle a 20°C e 13°C de bananas cv. Nanicão ao longo do amadurecimento.

Figura 17 - Concentração relativa de Isovalerato de Isoamila (IAV) e α-Cedreno (AC) 49 nos frutos inteiros de bananas cv. Nanicão dos grupos controle a 20°C e 13°C ao longo do amadurecimento (n=3). A barra de erros corresponde ao desvio padrão.

Figura 18 - Análise de componentes principais do perfil de compostos voláteis das 50 polpas (A) dos frutos dos grupos controle e frio durante o amadurecimento e projeção das substâncias detectadas (B), representadas por códigos (tabela 1)

Figura 19 – Concentração relativa de Acetato de isoamila (IAA) e (E)-2-Hexenal (2H) 50 nas polpas de bananas cv. Nanicão nos grupos controle a 20°C e 13°C ao longo do amadurecimento (n=3). A barra de erros corresponde ao desvio padrão.

Figura 20 – Análise de componentes principais do perfil de compostos voláteis em 52 frutos inteiros cv. Nanicão dos grupos controle, 1-MCP e etileno (A) durante o amadurecimento e a projeção das substâncias detectadas (B), representadas por códigos (tabela 1).

Figura 21 - Concentração relativa de Isovalerato de Isoamila (IAV) e α-Cedreno (AC) de frutos inteiros da cv. Nanicão dos grupos controle, 1-MCP e etileno ao longo do amadurecimento (n=3). A barra de erros corresponde ao desvio padrão.

Figura 22 - Análise de componentes principais do perfil de compostos voláteis das 53 polpas de bananas cv. Nanicão dos grupos controle, 1-MCP e etileno (A) durante o amadurecimento e projeção das substâncias detectadas (B), representadas por códigos (tabela 1)

Figura 23 - Concentração relativa de Acetato de Isoamila (IAA) e (E)-2-Hexenal (2H) 54 em polpas de bananas cv. Nanicão dos grupos controle, 1-MCP e etileno ao longo do

37

38

amadurecimento (n=3). A barra de erros corresponde ao desvio padrão. Figura 24 - Comparação dos métodos de preparo das amostras de polpa das amostras de bananas cv. Nanicão (homogeneização com Turrax) e cv. Grand Naine (<i>In situ</i>).	56
Figura 25 - Comparação dos métodos de preparo das amostras de polpa de bananas: <i>In situ</i> , homogeneização em Turrax no gelo seguida por congelamento em vials, e homogeneização com Turrax no gelo.	57
Figura 26 - Ánálise de componentes principais do perfil dos compostos voláteis de frutos inteiros cv. Grand Naine tratados e não-tratados, e a projeção das substancias responsável pela distribuição das amostras no gráfico.	59
Figura 27 - Análise de componentes principais do perfil dos compostos voláteis das polpas de bananas cv. Grand Naine tratados e não-tratados, e a projeção das substancias responsáveis pela distribuição das amostras no gráfico.	60
Figura 28 - Análise de componentes principais do perfil dos compostos voláteis da casca de bananas cv. Grand Naine tratados e não-tratados, e a projeção das substancias responsáveis pela distribuição das amostras no gráfico.	60
Figura 29 - Análise de componentes principais do perfil dos compostos voláteis de frutos inteiros, polpas e cascas cv. Grand Naine maduros tratados e não-tratados, e a projeção das substancias responsável pela distribuição das amostras no gráfico.	61
Figura 30 - Análise de <i>Heatmap</i> e agrupamento hierárquico dos compostos voláteis dos frutos inteiros (F), polpa (P) e cascas (C) de bananas cv. Grand Naine não tratadas armazenadas a 20°C (20C). Os números representam os dias pós-tratamento e as letras "a" "b" e "c" representam as replicatas de cada amostra analisada	63
Figura 31 - Análise de <i>Heatmap</i> e agrupamento hierárquico dos compostos voláteis dos frutos inteiros, polpa e cascas de bananas cv. Grand Naine tratadas com etileno exógeno armazenadas a 20°C (20E). Os números representam os dias pós-tratamento e as letras "a", "b" e "c" representam as replicatas de cada amostra analisada. As elipses destacam grupos de compostos e amostras com variação semelhante.	64
Figura 32 - Análise de <i>Heatmap</i> e agrupamento hierárquico dos compostos voláteis dos frutos inteiros, polpa e cascas de bananas cv. Grand Naine não-tratadas armazenadas a 13°C (13C). Os números representam os dias pós-tratamento e as letras "a", "b" e "c" representam as replicatas de cada amostra analisada. As elipses destacam grupos de	65
Figura 33 - Análise de <i>Heatmap</i> e agrupamento hierárquico dos compostos voláteis dos frutos inteiros, polpa e cascas de bananas cv. Grand Naine tratadas com etileno exógeno armazenadas a 13°C (13E). Os números representam os dias pós-tratamento e as letras "a", "b" e "c" representam as replicatas de cada amostra analisada. As	66
Figura 34 - Expressão relativa dos receptores de etileno (ERS1, ERS2, ERS3 e ETR1) ao longo do amadurecimento e quando expostos ao frio. Resultados de triplicata de extração e triplicata de análise (n=9). A barra de erros corresponde ao desvio padrão. As siglas estão descritas no item Material e métodos, figura 6, página 23	70
Figura 35 – Fluxograma esquemático da amostragem das bananas cv. Nanicão.	75
Figura 36 – Esquema com o cronograma das análises realizadas no grupo controle a 20°C de bananas cv. Nanicão.	76
a 13°C de bananas cv. Nanicão.	76
bananas cv. Nanicão.	
Figura 39 - Esquema com o cronograma das analises realizadas no grupo etileno de bananas cv. Nanicão.	77
Figura 40 – Fluxograma esquemático dos tratamentos realizados nas bananas cv. Grand Naine.	78
Figura 41 - Esquema com o cronograma das análises realizadas no grupo controle 20°C de bananas cv. Grand naine.	79
Figura 42 - Esquema com o cronograma das análises realizadas no grupo 13°C de bananas cv. Grand naine.	79
Figura 43 - Esquema com o cronograma das análises realizadas no grupo etileno de bananas cy. Grand naine	80
Figura 44 - Esquema com o cronograma das análises realizadas no grupo etileno a	80

13°C de bananas cv. Grand naine.

Tabela 1 – Pontos do amadurecimento avaliados na análise de expressão dos 23 receptores de etileno.

Tabela 2 – Seqüências dos primers forward e reverse desenhados para a amplificação24dos receptores de etileno e actina para a análise de qPCR.

Tabela 3 – Resultados da otimização da reação de qPCR.

25

Tabela 4 – Compostos voláteis analisados nas bananas cv. nanicão não-tratadas46(controle), e tratadas (baixa temperatura, 1-MCP e etileno) ao longo doamadurecimento.

Tabela 5 – Compostos voláteis adicionais analisados nas bananas cv. Grand Naine58não-tratadas e tratadas com etileno exógeno e armazenada em diferentes58temperaturas (20°C e 13 °C) ao longo do amadurecimento.

RESUMO

CHIEBAO, H.P. Perfis de compostos voláteis de banana submetidos a diferentes tratamentos pós-colheita e suas correlações com a expressão diferencial dos receptores de etileno. 2013. 91 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013

O aroma de frutos é um atributo fortemente associado à gualidade, e quaisquer alterações ambientais ou tratamentos pós-colheita podem alterar a sua composição. Acredita-se que a biossíntese de voláteis seja um dos processos regulados pelo etileno. Estudos indicam que a expressão diferencial dos elementos que compõem os receptores de etileno desempenha importante papel na sinalização dos processos ligados ao amadurecimento, entre eles a formação do aroma. Os objetivos deste trabalho são: caracterizar as alterações decorrentes de tratamentos pós-colheita no aroma de banana durante o amadurecimento, e correlacionar com as variações nos padrões de expressão gênica diferencial dos receptores de etileno. Bananas pré-climatéricas variedade Nanicão foram divididas em quatro grupos: controle (não tratado), etileno (100ppm/12h), 1-MCP (100ppb/12h), armazenados a 20°C, e grupo frio (armazenado por 15 dias a 13°C). Foram analisados diariamente a produção de etileno e de CO₂ por CG. Foram analisadas a cor da casca, acúcares solúveis e amido. Os compostos voláteis foram isolados por microextração em fase sólida (SPME) em frutos inteiros e polpas e analisados em CG-MS. Para confirmar os resultados e verificar se as alterações encontradas se repetem em outras variedades de bananas, o estudo foi repetido no Horticultural Sciences Department, na Universidade da Florida (EUA), em bananas var. 'Grand Naine'. Em paralelo, realizou-se a quantificação relativa da expressão dos receptores de etileno (ETR1, ERS1, ERS2 e ERS3) por PCR em tempo real. Com relação ao perfil de voláteis, os resultados indicam que os frutos não se diferenciam no período pré-climatérico. Porém, o perfil de voláteis do grupo controle foi significativamente diferente do grupo frio, tanto na polpa guanto no fruto inteiro no período climatérico. Esse efeito foi mais pronunciado na Nanicão do que na 'Grand Naine'. Compostos típicos como o acetato de isoamila foram drasticamente reduzidos nos frutos submetidos ao frio, e não foram encontrados na Nanicão. Não houve diferenças significativas com relação ao perfil de aromas entre o grupo controle e o grupo etileno. Com relação aos frutos tratados com 1-MCP observou-se o atraso na formação de alguns compostos sem alterar, contudo, o perfil final de voláteis. Com relação ao padrão de transcrição dos receptores de etileno, o frio reduziu o acúmulo dos transcritos do ETR1, ERS2 e ERS3 em todos os pontos. ERS1 parece estar correlacionado com a síntese de esteres. Os resultados sugerem que o mecanismo pelo qual o etileno regula o metabolismo de biossíntese de aromas parece contar com a participação relevante de determinados tipos de receptores. A correlação temporal encontrada entre as alterações no perfil de transcritos de três destes e os efeitos sobre a produção de compostos voláteis reforcam esta hipótese.

Palavras chave: aroma, Nanicão, Grand naine, armazenamento em baixa temperatura, 1-MCP, etileno.

ABSTRACT

CHIEBAO, H.P. Volatile compounds profile of bananas submitted to different post-harvest treatments and its correlations to differential expression of ethylene receptors. 2013. 91 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013

Fruit aroma is an attribute strongly associated to quality, and any change in the environment or post-harvest treatment could affect its composition. Volatile biosynthesis is a process that is believed to be regulated by ethylene. Studies demonstrate that differential expression of ethylene receptors have an important role in fruit ripening processes, including aroma synthesis. The aims of this study are: evaluate modifications due to post-harvest treatment on the aroma of banana fruit during ripening, and correlate to variations on differential expression of ethylene receptors. Pre climacteric bananas of 'Nanicão' variety were divides in four groups: control (without treatment), ethylene (100ppm/12h), 1-MCP (100ppb/12h), stored at 20°C, and cold storage group (stored for 15 days at 13°C). Daily measurements were conducted of ethylene production and respiration using GC. Peel color, soluble sugars and starch were analyzed. Volatile compounds were isolated by solid phase microextraction (SPME) in whole fruits and pulp and analyzed by GCMS. To confirm the results ant to verify if the findings repeat in another banana variety, this study was repeated at Horticultural Sciences Department, at University of Florida (EUA), under supervision of Dr. Jeffrey K. Brecht, in bananas Cavendish cv. 'Grand Naine'. Also, relative quantification of the expression of ethylene receptors (ETR1, ERS1, ERS2 and ERS3) was analyzed using real time PCR. Regarding the volatile profile, groups did not differentiated in pre-climacteric period. But the volatile profile of control group significantly differentiates from cold storage group, in both pulp and whole fruit, in post climacteric period. This effect was more pronounced in bananas 'Nanicão' than 'Grand Naine'. Typical banana aroma compounds like isoamyl acetate were drastically reduced in fruits under cold storage, and were not found in 'Nanicão'. There were not any significant differences between control group and ethylene treated. Regarding 1-MCP treated fruits, there was a delay on the synthesis of some compounds without affecting the final volatile profile. Regarding the transcription pattern of ethylene receptors, cold storage reduced mRNA of ETR1, ERS2 and ERS3 in all samples. ERS1 receptor seems to be correlated to ester synthesis. These results suggest that the mechanism whereby the ethylene regulates the biosynthesis of aroma, seems to count with relevant participation of some receptors. The temporal correlation found in the differential expression of three receptors and the effect on volatile compounds synthesis reinforces this hypothesis.

Keywords: aroma, Nanicão, Grand naine, cold storage, 1-MCP, ethylene

1. INTRODUÇÃO

A Banana (*Musa acuminata*) é um dos frutos tropicais mais consumidos no mundo (MAYR *et al.*, 2003; ADÃO; GLÓRIA, 2004). Sua composição fornece valiosa fonte de energia proveniente de açúcares solúveis resultantes da degradação de amido, fonte de minerais como potássio, vitaminas, e aroma agradável característico.

Entre os diversos processos regulados pelo etileno durante o amadurecimento de bananas e que possuem impacto direto na sua qualidade podemos ressaltar o desenvolvimento do aroma característico.

O aroma é formado por substâncias voláteis como álcoois, aldeídos, cetonas e ésteres, (UEDA *et al.*, 2004) e compreendem cerca de 70% dos compostos voláteis o odor característico dos frutos (ARVANITOYANNIS; MAVROMATIS, 2009). Os ésteres voláteis são formados pela reação entre alcoóis e acil-CoA derivados do metabolismo de ácidos graxos e aminoácidos ramificados (leucina, isoleucina e valina), dando origem a ésteres de cadeia linear e ramificada respectivamente, conforme esquematizado na Figura 1. Essas reações são catalisadas pela enzima álcool acetil transferase (JAYANTI *et al.*, 2002; WYLLIE; FELLMAN, 2000).



Figura 1: Esquema para a conversão de aminoácidos de cadeia ramificada em ésteres de cadeia ramificada. (Adaptado de WYLLIE; FELLMAN, 2000)

Na banana, uma fruta tipicamente climatérica, a maior parte dos componentes que formam o *flavor* são produzidos depois do estágio de maturação da fruta (SALMON *et al.*, 1996). Jayanti *et al.* (2002) observaram que o pico da biossíntese de estéres que compõe o aroma segue o pico da biossíntese de estéres que compõe o aroma segue o pico da biossíntese de etileno, atingindo níveis máximos após 3 a 4 dias. Macku e Jennings (1987) demostraram que a proporção do total de acetatos em relação ao total de butanoatos no perfil de aromas varia linearmente durante o amadurecimento do fruto. Porém, os diferentes cultivares de bananas apresentam composições dos perfis aromáticos qualitativa e quantitativamente diferentes, dependendo também das condições de cultivo e tratamentos póscolheita. Salmon *et al.* (1996) propuseram utilizar o perfil de compostos voláteis como identificador da origem geográfica do fruto.

As vias biosintéticas da formação dos voláteis no amadurecimento de frutos climatéricos são bem estabelecidas (PÉREZ *et al.*, 1997; TRESSL; DRAWERT, 1973). Acredita-se que haja três grandes grupos de precursores de aromas em frutos: carboidratos, aminoácidos e ácidos graxos (TRESSL *et al.*, 1975).

A partir do metabolismo de carboidratos são formados principalmente terpenos, da via de isoprenóides; e furanonas, de vias secundárias, como o ciclo das pentosesfosfato. Do metabolismo de aminoácidos são gerados alcoóis alifáticos, de cadeia ramificada ou aromáticos, carbonilas, ácidos e ésteres; sendo que os aminoácidos podem ser precursores diretos ou indiretos, ou seja, formam compostos não-voláteis que precisam de uma segunda transformação enzimática para a formação dos voláteis. Por fim, o metabolismo de ácidos graxos é considerado o maior gerador de precursores de compostos voláteis (figura 2), sendo catabolizados por duas grandes vias oxidativas: β-oxidação e a via das lipoxigenases (LOXs). A β-oxidação de ácidos graxos resulta na formação de acil-CoAs que são depois utilizados pelas álcool aciltransferases para a geração de ésteres voláteis. A maioria dos alcoóis, aldeídos, ácidos e ésteres encontrados no aroma de frutos são gerados pela degradação oxidativa dos ácidos linoléico e linolênico, principais substratos das LOXs (PÉREZ; SANZ, 2008).



Figura 2 – Formação de compostos voláteis a partir de ácidos graxos. (a) Via das lipoxigenases (LOX); β-oxidação de ácidos graxos para a formação de (b) ácidos de cadeia curta, aldeídos, álcoois, ésteres e lactona, e (c) formação de metil cetonas. (Adaptado de SCHWAB *et al.*, 2008) Legenda: AAT, álcool aciltransferase; ADH, álcool desidrogenase; AER, alcenal oxidoredutase; AOC, aleno oxido ciclase; AOS, aleno óxido síntase; HPL, hidroperoxido liase; JMT, jasmonato metil transferase; OPR, 12-oxo-fitodienóico ácido redutase; MKS, metil cetona sintase; ACP, proteína carreadora de acil.

Apesar das vias biossintéticas serem razoavelmente conhecidas, os fatores de controle da composição do perfil quantitativo e qualitativo de ésteres voláteis ainda não estão esclarecidos. Uma das hipóteses sugere que a composição de ésteres pode ser controlada tanto pela seletividade das enzimas envolvidas quanto pela disponibilidade dos substratos necessários, sendo que a composição do *pool* de substratos vai depender de vários fatores, incluindo o controle genético e o estado fisiológico do fruto (WYLLIE; FELLMAN, 2000).

A biossíntese de compostos que formam o aroma das frutas é particularmente sensível a alterações ambientais e no manejo pré ou póscolheita que culminem em mudanças nos processos fisiológicos e bioquímicos durante o amadurecimento. (ARVANITOYANNIS; MAVROMATIS, 2009).

Golding *et al.* (1998) observaram mudanças no perfil aromático quando bananas foram tratadas com 1-MCP e concluíram que poderia ser o resultado da inibição de passos do metabolismo de ácidos graxos associada a diminuição na respiração provocada pelo tratamento. Nascimento Junior *et al.,* (2008) observaram um decréscimo de 46% da produção de voláteis quando bananas da cultivar Prata foram tratadas com 1-MCP.

Zhang et al. (2011) e Xi *et al.*, (2012) demonstraram que o armazenamento de pêssegos em baixas temperaturas diminuiu a produção de compostos voláteis do aroma.

Rugkong *et al.* (2011) ao estudarem os efeitos do frio em tomates viram que o frio reduziu a expressão de vários genes, entre eles genes envolvidos no desenvolvimento de cor, genes de enzimas do aroma (ADH e AAT), genes envolvidos na síntese de etileno (ACC sintase e ACC oxidase) e na transdução do sinal (receptores), alterando a percepção e sensibilidade ao etileno.

Bauchot *et al.* (1998) mostraram que melões transgênicos que produzem pouco etileno apresentaram diminuição substancial na produção de voláteis durante o amadurecimento, e que essa diminuição foi mais pronunciada nos voláteis produzidos por vias do metabolismo de aminoácidos

Willye e Feldman (2000) observaram que a quantidade de ésteres produzido pela banana (variedade Cavendish, subgrupo Willians) é limitada pelo fornecimento do precursor alcoólico, e que este é prontamente utilizado pelo fruto não sendo limitado pela especificidade da enzima álcool acil transferase. Observaram ainda que o acetil CoA, butanoil CoA e 3-metilbutanoil CoA, juntamente com os alcoóis etanol, 2-metilpropanol, 1-butanol, 3metilbutanol e 2-pentanol eram os precursores necessários para a formação da maioria dos ésteres observados no aroma daquela variedade de banana. Para um grande número de frutas e outros tecidos vegetais sugere-se que os compostos que compõe o flavor são acumulados nos tecidos, provavelmente nos vacúolos. Além disso estão associados à glicosídeos o que resulta no aumento da sua solubilidade em água e diminuição da sua reatividade. Tais precursores de aromas glicoconjulgados não voláteis e sem odor são hidrolisados por β-glucosidases liberando a aglicona, volátil, que irá compor o aroma característico dos frutos (SARRY; GÜNATA, 2004), incluindo a banana (PÉREZ et al., 1997).

Pérez *et al.* (1997) foram um dos poucos que estudaram os precursores glicosilados de bananas das cultivares Valery e Pequeña Enana. Nestas variedades foram detectadas 25 agliconas, classificadas em dois grupos de acordo com sua via metabólica de origem: os derivados de ácidos graxos e os derivados do ácido chiquímico. Foram encontrados álcoois, como decan-1-ol e 2-feniletanol, e ácidos, como ácido 3-oxo-pentanóico, o ácido 3-metilbutanóico e o ácido benzóico. Estas foram, quantitativamente, as agliconas mais importantes dos glicosídeos isolados daquelas cultivares.

A regulação do processo de formação de aromas ainda é desconhecida, mas acredita-se que esteja relacionada ao etileno. Jayanty *et al.* (2002) demonstraram que toda a maquinaria necessária para a formação de ésteres já existe nos frutos antes do pico de etileno. O fato destes compostos não serem detectados na fase pré-climatérica, sugere uma regulação negativa do processo. Manrique-Trujillo *et al.* (2007) demonstraram que um grupo de genes diferencialmente expressos no amadurecimento da banana, como o gene que codifica a álcool desidrogenase e a orcinol O-metil-transferase, também estão envolvidos na biossíntese de compostos voláteis responsáveis pelo aroma característico.

Dessa maneira, os estudos dos processos de regulação da formação de compostos voláteis nos dará o entendimento necessário para o desenvolvimento ou adaptação de processos para a obtenção de frutos com maior qualidade sensorial para o consumidor. Para isso, é essencial a compreensão da correlação entre o etileno, mais especificamente a expressão diferencial dos receptores de etileno, com a formação de compostos voláteis e como estes são afetados por tratamentos pós-colheita.

Expressão diferencial dos receptores de etileno

A banana, por ser um fruto climatérico, é caracterizada por um aumento na produção de etileno no início da maturação (MARRIOTT; PALMER, 1980). Por este motivo, sua conservação pós-colheita é reduzida (JIANG *et al.*,1999). Nos últimos anos, agentes efetivos para bloquear os receptores de etileno têm sido descobertos, sugerindo um novo modo de controlar o amadurecimento, a senescência e outras respostas ao hormônio.

A via de biossíntese do etileno foi descrita por Yang e Hoffman (1984), cujo modelo proposto encontra-se na figura 3. O aminoácido metionina é o precursor da via que compreende vários passos com reações enzimáticas. A S-adenosil-metionina (SAM), um dos produtos do ciclo de Yang, é convertida em ácido 1-carboxílico-1-aminociclopropano (ACC) pela ação da enzima ACC sintase (ACS). O ACC é então metabolizado pela enzima ACC-oxidase (ACO), por uma reação de oxidação que necessita de O₂ e ferro, e que é ativada pelo CO₂ para produzir etileno (VERVERIDIS; JOHN, 1991). O ciclo de Yang constitui uma importante via metabólica para recuperação do enxofre e resíntese da SAM.

O etileno é capaz de regular sua própria produção, induzindo a síntese *de novo* de isoformas da ACS e da ACO. O ACC, precursor imediato do etileno, pode ser convertido ainda em malonil-ACC sob a ação da enzima N- maloniltransferase (NMT) e então transportado nessa forma para o vacúolo (THEOLOGIS et al., 1992).



Figura 3: Modelo de biossíntese de etileno proposta por Yang e Hoffamn (1984). Adaptado de Pech *et al.* (2003).

O etileno intervém na indução ou inibição da expressão de numerosos genes durante o crescimento e amadurecimento dos frutos, que parece ser regulado também por eventos etileno-independentes. De acordo com Klee e Clark (2005), genes envolvidos com a biossíntese de licopeno, compostos do aroma e metabolismo respiratório são considerados dependentes enquanto genes que codificam as enzimas clorofilase e algumas isoformas da ACC oxidase parecem ser independentes do etileno. Em frutos climatéricos o etileno promove aumento da biossíntese das enzimas da sua própria rota metabólica, levando a produção autocatalítica do hormônio.

Lohanis *et al.* (2004) verificaram tal influência no amolecimento da banana pela ação de hidrolases que atuam na degradação da parede celular, particularmente na solubilização da pectina. Concluíram que entre os hormônios que regulam esse processo, o etileno foi o principal fator na regulação positiva das atividades das enzimas envolvidas. Do mesmo modo, Hayama *et al.* (2006) que observaram que a transcrição de genes relacionados

com o amolecimento de pêssego (*Prunus persica*) é regulada pelo hormônio, sendo que o acumulo de mRNAs foi proporcional a concentração do mesmo. Marty *et al.* (2005) conseguiram correlacionar o aumento da expressão de genes da síntese de carotenóides em damasco (*Prunus ameniarca*) com o aumento do etileno.

Com estudos realizados em tomates com mutações em genes responsáveis pelo amadurecimento, muitos progressos foram obtidos quanto ao entendimento dos mecanismos de percepção ao etileno, sendo um dos principais a identificação e caracterização dos receptores de membrana, responsáveis pela sinalização do hormônio durante o amadurecimento.

Os receptores de etileno constituem-se em uma pequena família de proteínas transmembrana diméricas que guardam semelhança com os receptores de dois componentes encontrados em bactérias. Suas ações dependem da interação com um tipo de proteína quinase, denominada *Constitutive Triple Response 1* (CTR1), similar as Raf-quinases encontradas em células de mamífero,. Ambas proteínas (receptor e CTR1) formam um complexo localizado na membrana do retículo endoplasmático das células vegetais (GUO; ECKER, 2003).

Grande parte dos estudos iniciais sobre os receptores de etileno foram realizados na planta modelo *Arabidopsis thaliana*. A facilidade em gerar mutantes desta planta permitiu a identificação de progênies com respostas defectivas ao etileno. A análise destes mutantes permitiu isolar diversos componentes responsáveis pela sinalização do hormônio, e que devido a seus fenótipos deram origem aos nomes de tais componentes.

O Ethylene Responsive 1 (ETR1), primeiro receptor de etileno a ser descoberto, é semelhante ao sistema de dois componentes da histidina quinase de bactérias, que consistem de um domínio sensor com atividade de histidina quinase e um domínio regulador de resposta. No genoma de Arabidopsis foram encontrados outros quatro genes que codificam proteínas semelhantes ao ETR1, são eles *Ethylene Responsive 2* (ETR2), *Ethylene Responsive Sensor 1* (ERS1), *Ethylene Responsive Sensor 2* (ERS2) e *Ethylene Insensitve 4* (EIN4), que também funcionam como receptores de etileno (CHEN *et al.*, 2005). O etileno se liga a esses receptores em um domínio transmembrana, através de um co-fator cobre (RODRIGUEZ *et al.,* 1999).

Esses cinco receptores de etileno são codificados por famílias multigênicas. O bloqueio direcionado da atividade, por meio da produção de mutantes para os cinco receptores em Arabidopsis, revelou que eles são funcionalmente redundantes (HUA; MEYEROWITZ, 1998). Ou seja, caso haja inativação completa dos receptores, todos os cinco, a planta exibirá um fenótipo de insensibilidade ao etileno. O mesmo não ocorrerá caso apenas um dos receptores estiver ativo.

Estudos mais detalhados levaram à conclusão de que os receptores estão normalmente ativos quando na ausência de etileno e que sua função, na ausência do hormônio, é bloquear a rota de sinalização que leva à resposta. A ligação do etileno desliga os receptores, permitindo que a sinalização e a conseqüente resposta do tecido ocorram (CHEN *et al.*, 2005). A figura 4 mostra as três etapas da mudança conformacional dos receptores ocorre quando se liga com etileno.



Figura 4 – Modelo dos estados de receptores na ligação com etileno. No modelo foram sinalizadas as regiões de importância na ligação com etileno, entre elas a região de ligação cobre/etileno (em laranja), região para o desligamento do receptor (em verde), e região para a manutenção do receptor em um estado de sinalização (estado 1) em azul. Quando o etileno se liga, há a formação de um complexo intermediário de baixa estabilidade onde o receptor ainda transmite sinal (estado 2), porém é rapidamente convertido para um estado 3, onde o etileno se encontra ligado e a transmissão do sinal é interrompida. (Adaptado de BINDER, 2008).

Vários modelos de transdução de sinal para o etileno vêm sendo propostos nos últimos anos em função da descoberta de novos elementos participantes da cascata de sinalização do hormônio. O modelo mais atual e com maior consenso na literatura segue na Figura 5.



Figura 5: Modelo proposto para a via de sinalização do etileno. Na ausência de ligação com o etileno, os receptores reprimem as respostas ao hormônio através da sinalização da CTR1, proteína similar à Raf-like MAPKK quinase que regula negativamente a via. Quando o etileno se liga aos receptores, a sinalização do receptor é inativada, causando a inativação do domínio quinase do CTR1(KD), e permitindo, assim, a sinalização da via através da EIN2, que tem similaridade com a família Nramp de transportadores de íons. O elemento EIN2 é um regulador positivo da resposta ao etileno, e sua perda torna a planta completamente insensível ao hormônio. Por um mecanismo ainda não identificado, EIN2 regula a atividade dos fatores EIN3, EIL1e outros EILs, membros de uma pequena família de fatores de transcrição primários cuja seguência-alvo está na região promotora (EBS) dos fatores de transcrição secundários AP2/ERF. O ERF1 e demais membros da família são fatores que ativam ou inibem vários genes responsíveis ao etileno, após ligação à sequência denominada GCC-box dos respectivos promotores. Um passo chave na regulação da via é a degradação do EILs pela via do proteasomo 26S. A estabilidade do destes elementos é promovida pela fosforilação da T174 através de uma cascata de MAP quinases consistindo na MKK9 que sinaliza a MPK3/6, enquanto que a degradação é promovida pela fosforilação da T592, possivelmente por uma cascata de MAP quinase separada, envolvendo CTR1. Dois elementos, EBF1 e EBF2, mediam a degradação dos EILs pelo sistema Ubiquitina/Proteossomo. A expressão destes dois elementos é dependente da regulação de uma exoribonuclease codificada por EIN5/XRN4. (Adaptado de Kendrick; Chang, 2008)

Embora muitos dos componentes da cascata de sinalização do etileno tenham sido identificados principalmente em *Arapdopsis thaliana*, análogos destes vêm sendo identificados em outras plantas incluindo frutíferas comerciais, como tomate (ALEXANDER; GRIERSON, 2002) melão (KLEE; Clark, 2005) e pêras (El-Sharkawy *et al.*, 2003).

Em bananas, além de um homólogo do ETR1 foram identificados outros três receptores: ERS1, ERS2 e ERS3. Estes últimos receberam esta classificação, pois pela sequência deduzida dos aminoácidos eles não possuem um domínio na porção C-terminal denominado "receiver", ou receptáculo, a exemplo dos receptores do tipo ETR. A função deste domínio ainda é desconhecida, mas hipóteses sugerem que esta porção poderia conferir interações mais fortes com a proteína CTR1 (ARORA, 2005)

Visto que a capacidade de responder ao etileno está ligada a presença dos receptores no tecido alvo, e que cada isoforma dos receptores contribuí diferencialmente à cascata de sinalização (KENDRICK; CHANG, 2008), então é possível supor que diferenças nos níveis de expressão destes genes possam influenciar os processos regulados pelo hormônio, incluindo aqueles ligados ao amadurecimento de frutos.

Os dados da literatura sobre os padrões de expressão dos receptores de etileno indicam que estes têm sua expressão induzida pelo próprio hormônio, porém de modo diferencial (EL-SHARKAWY *et al.*, 2003). A expressão diferencial dos receptores de etileno tanto temporal quanto espacialmente é um fato observado em vários estudos (KLEE, 2002) e indica que é regulada por fatores do desenvolvimento do vegetal de natureza ainda desconhecida. A hipótese corrente sugere que este seja um dos mecanismos pelos quais as funções dos receptores são controladas, sendo que cada tipo de receptor, embora tenham o mesmo ligante, podem exercer funções diferenciadas.

O'Malley *et al.* (2005) avaliaram a capacidade de ligação e correlacionaram com os níveis de transcrição de cinco receptores de etileno identificados em tomate. Os resultados não indicaram diferenças significativas entre os receptores quanto à capacidade de retenção do etileno, porém alguns tipos de receptores apresentaram variações significativas dos níveis de

transcrição durante o amadurecimento do fruto. Estudando mutantes defectivos em um dos receptores, os autores puderam observar aumento no nível de transcrição dos demais receptores, demonstrando um mecanismo de compensação para a falta de um receptor. Porém, um dos dados mais interessantes do estudo foi a observação de que a expressão de determinados genes etileno-dependentes não era ativada nos mutantes, apesar do mecanismo de compensação.

Estas observações apontam para a necessidade de conhecer o padrão de expressão gênica dos vários receptores de etileno encontrados nos frutos, para a maior compreensão dos processos que relacionam a sinalização pelo hormônio com a expressão diferencial de genes, durante o amadurecimento.

Dados relativos à expressão gênica dos receptores de etileno em frutos tropicais ainda são escassos. No caso da banana, objeto de interesse deste projeto, foram clonados quatro receptores de etileno cujas seqüências estão depositadas no GenBank.

Os estudos com os receptores de etileno ganharam maior impulso graças ao desenvolvimento de antagonistas do hormônio, dos quais o 1metilciclopropeno (1-MCP) veio a ser o primeiro a ser produzido em escala comercial. O 1-MCP tem sido utilizado para estudar os processos regulados pelo etileno, por bloquear efetivamente os receptores, reprimindo os efeitos mediados pelo hormônio. Observou-se, por exemplo, que o 1-MCP altera a expressão de ACS1 e ACO1, havendo a subseqüente redução das atividades destas isoformas de ACC sintase e ACC oxidase, e provocando retardo no amadurecimento da banana (INABA *et al.*, 2007). Apesar do tratamento de frutos de bananeira com 1-MCP inibir a indução de etileno na fase préclimatérica, foi demonstrado que o inibidor não tem efeito na produção de etileno na fase climatérica (GOLDING *et al.*, 1998).

Esta claro que os níveis de receptores afetam a sensibilidade ao etileno. Além disso, é aparente de que as plantas tem um elaborado mecanismo ao nível de receptores que modulam as várias respostas ao etileno já que as funções das isoformas dos receptores não são inteiramente redundantes, e há uma regulação diferencial pós-transcricional dos níveis de receptores em particular (BINDER, 2008).

Essa idéia justifica a tentativa desse estudo de correlacionar a expressão diferencial de receptores de etileno com a formação de compostos voláteis do aroma de banana, já que estes são conhecidamente regulados por etileno. E verificar como os tratamentos pós-colheita afetam esses processos.

2. OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho são: caracterizar possíveis alterações devido a tratamentos pós-colheita, como conservação no frio, etileno exógeno e bloqueador de etileno 1-MCP, no perfil de compostos voláteis em bananas ao longo do amadurecimento, e sua possível correlação com mudanças no padrão de expressão gênica diferencial dos receptores de etileno.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Nanicão

3.1.1. Amostragem

Bananas (*Musa acuminata* AAA cv. Nanicão) com cerca de 110 dias pós-antese, sem tratamento com etileno, foram obtidas no CEAGESP/SP, do produtor Magário Comercio de Frutas Ltda[©], cujo cultivo se localiza na região de Sete Barras (região do Vale do Ribeira) no estado de São Paulo. A aquisição dos frutos foi limitada ao período de junho a agosto de 2009 a 2011 para minimizar as interferências por variações climáticas.

A desinfecção dos frutos foi realizada no laboratório através da imersão dos cachos em solução de 1% de hipoclorito de sódio por 1 minuto, seguido de lavagem em água corrente e secagem com papel absorvente.

Um fluxograma esquemático da amostragem se encontra no anexo I.

3.1.2. Tratamentos

- Grupo controle: os frutos foram armazenados em câmaras climatizadas a temperatura de 20°C(±2°C), com umidade a 90%.
- Grupo frio: os frutos foram armazenados a temperatura de 13°C por 15 dias com umidade a 90%, com o objetivo de simular condições empregadas para a exportação. Essa temperatura Tem sido adotada na literatura como sendo eficiente em retardar o amadurecimento dos frutos sem causar lesões pelo frio (JIANG *et al.*, 2004a). Ao final do período de tratamento, a temperatura foi ajustada para 20°C(±2°C).
- Grupo 1-MCP: uma estrutura formada por canos e conexões de PVC recoberto por plástico, de dimensões de 1,35 x 1,58 x 1,78 m foi montada para o tratamento com 1-MCP. Para gerar 1-MCP *in situ* foi utilizado o produto Ethylbloc[®] em pó na concentração de 0,14%. Levando-se em consideração o volume da tenda, o pó foi dissolvido em uma quantidade de água calculada para que a concentração final de 1-MCP disperso no ar fosse de 100 nL/L. Os frutos foram expostos ao tratamento por 12 horas, e então mantidos em câmaras climatizadas a 20°C(±2°C) com umidade a 90%.

Grupo etileno: os frutos foram distribuídos em caixas plásticas com capacidade para 100L, respeitando um limite de metade do volume das caixas. Foi injetada uma mistura de etileno e ar sintético na concentração de 100μL/L, forçando a troca do ar contido nas caixas com o auxílio de uma bomba à vácuo, com a velocidade ajustada para ser equivalente a velocidade de entrada da mistura de etileno. Levando-se em consideração o volume das caixas, foi calculado o tempo necessário para garantir que todo o ar tenha sido trocado pela mistura de gases do tratamento. Após esse período, as caixas foram seladas com fita plástica e os frutos mantidos por 12 horas. Ao final do tratamento, os frutos foram colocados em câmaras climatizadas a 20°C(±2°C) com umidade a 90%.

Esquemas com a cronologia das análises realizadas durante o amadurecimento dos frutos encontra-se no anexo II.

Para as análises de conteúdo de amido, açúcares solúveis e expressão relativa dos receptores de etileno foram congelados em nitrogênio líquido de 5 a 6 frutos de cada grupo em dias estabelecidos. Os frutos foram descascados e a polpa fatiada, congelada e armazenada a –80°C para realização das análises em um outro momento. Para estas análises cerca de 100g de fatias congeladas foram maceradas em nitrogênio líquido, e os ensaios foram realizados a partir desse macerado.

3.1.3. Métodos

3.1.3.1. Respiração e produção de etileno

Foram realizadas análises diárias da respiração e da produção de etileno pelas bananas para acompanhar e caracterizar o amadurecimento.

Cerca de 500g (de 3 a 5 bananas), foram escolhidas aleatoriamente, pesadas e colocadas em frascos tampados (quintuplicata de frasco) para o acumulo de gases por um período mínimo de 1 hora.

A estimativa de CO₂ foi realizada pela injeção de amostras de ar do interior dos frascos em um cromatógrafo a gás da Hewlett-Packard® modelo GC-6890 equipado com detector de condutividade térmica. A coluna utilizada foi a HP-Plot Q (30m, D.I. 0,53mm). As condições cromatográficas foram:

injeção com divisor de amostra (*split*) em taxa de 50:1 e temperatura de 250°C; volume de injeção 1ml; corrida isotérmica a 30°C empregando hélio como gás carreador em fluxo constante de 4ml/min; temperatura do detector em 250°C utilizando como referência fluxo de hélio a 7ml/min. A estimativa da quantidade de CO₂ foi feita em relação a injeção de 1 mL de padrão de CO₂ 300ppm em ar sintético da Air Liquid®.

Na análise de etileno, foi empregado o mesmo equipamento e a mesma coluna cromatográfica, porém com detecção por ionização de chama. O volume de injeção foi de 10mL e foi empregado o modo de injeção *pulsed splitless*, desenvolvido pela Hewlett-Packard®. As condições de injeção foram: pressão de 20psi por 2 minutos, fluxo de ventilação de 5 ml/min após 30 segundos de injeção e temperatura do injetor em 200°C. As demais condições cromatográficas empregadas foram: corrida isotérmica a 30°C empregando hélio como gás carregador em fluxo constante de 1ml/min; temperatura do detector em 250°C, fluxo de ar e hidrogênio no detector em 450ml/min e 50ml/min, respectivamente. A estimativa da quantidade de etileno produzida pelos frutos foi em relação à injeção de um padrão de 1ppm de etileno em ar sintético da Air Liquid®.

3.1.3.2. Medida de cor da casca

Foram avaliadas diariamente a cor da casca de 3 frutos de cada grupo escolhidos aleatoriamente dentro do grupo, sendo que foram mensurados dois lados de cada fruto, totalizando seis replicatas por dia de análise. Foi utilizado um colorímetro de bancada Color Quest[®] XE (HunterLab[™]), em modo RSEX (reflectancia especular excluída) e a área limitada a 0,375in.

3.1.3.3. Quantificação dos açúcares solúveis

A partir das amostras congeladas, os açúcares solúveis dos frutos foram mensurados extraíndo 3 vezes com etanol 80% a 80°C em triplicata. Os sobrenadantes combinados para um volume final de 25mL. Foi retirada uma alíquota de 1mL, e desta o etanol foi evaporado em *Speed Vac*[®] a 45°C e o volume reconstituído com água milli-Q, filtrados (0,22µm), com posteriores diluições quando necessário. Os conteúdos de sacarose, frutose e glicose

foram quantificados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detector de pulso-amperométrico, utilizando coluna CarboPac PA (4mm X 250mm, HPAE-PAD – Dionex, Sunnyvale, CA, USA) em análise isocrática com fase móvel 18mM NaOH durante 25 minutos, utilizando fluxo de 1mL/min. A quantificação dos açucares se deu pela comparação dos cromatogramas e curvas dos respectivos padrões externos.

3.1.3.4. Conteúdo de amido

A quantificação de amido foi determinada enzimaticamente pelo método descrito por Arêas e Lajolo (1981). Em alíquotas das amostras congeladas e maceradas, o amido foi extraído com hidróxido de sódio 0,5N, neutralizado com ácido acético 0,5N, precipitado com etanol 80%, hidrolisado com amiloglicosidase, e a glicose liberada determinada pelo sistema glicose oxidase/peroxidase/ABTS, segundo método de Bergmeyer e Bernt (1974). Para o cálculo foi utilizado uma curva-padrão de glicose.

3.1.3.5. Quantificação Relativa dos compostos voláteis

O método de extração de voláteis utilizou a técnica de microextração em fase sólida (*Solid Phase Micro Extraction* - SPME) com fibra 50/30µm DVB/Carboxen[™]/PDMS StableFlex[™] (Supelco[®]) empregando o aparato da mesma empresa para este tipo de extração. Esta combina amostragem e préconcentração dos analíticos num único processo, além de possibilitar a dessorção direta no sistema cromatográfico. Foram realizadas medidas nas polpas e nos frutos inteiros em triplicata de extração, com análises ao longo do período de amadurecimento dos frutos, ou seja, com amostras frescas.

Polpa

Aproximadamente 12,5g de polpa dos frutos foi homogeneizada em Turrax[®] com 10,4g de NaCl e 29g de água destilada. Em seguida, 16g deste homogenato foram transferidos para frascos de aproximadamente de 25mL tampados, e colocados sob agitação constante por 15min para o equilíbrio da composição do espaço aéreo. Em seguida, a fibra de SPME foi introduzida no frasco e exposta ao ar do interior do frasco por 1 hora. Uma vez recolhida a amostra, esta foi dessorvida da fibra pela exposição ao calor do injetor do

cromatógrafo (200°C) por 2 minutos. Foi utilizado o cromatógrafo Hewlett-Packard modelo 6890 acoplado a um detector seletivo de massas da mesma empresa (modelo 5973). A coluna cromatográfica empregada foi a SulpelcoWAX 10 (tamanho 30mts, 0,25mm de diam. interno, 0,25µm de espessura do filme). O programa de temperatura que utilizado foi: 35°C por 0,5 minuto, rampa de temperatura de 5°C/min até 250°C, permanecendo por 1 minuto, seguida de nova rampa a 20°C/min até 310°C e permanecendo por 2 minutos. A temperatura da interface entre o cromatógrafo e o detector seletivo de massas foi de 230°C e a ionização feita por impacto de elétrons (70 eV) com a fonte de íons mantida a 150°C. As análises foram realizadas em triplicata de extração. Os espectros de massa obtidos foram comparados com os da biblioteca NIST versão 1.6 e considerado como identificação positiva aqueles com índice de similaridade acima de 70%.

• Frutos Inteiros

Cerca de 1Kg de frutos coletados randomicamente foram colocados em frascos tampados por um período de 2h e 20 min para o equilíbrio da atmosfera interna. Posteriormente, a fibra foi exposta para adsorção dos compostos voláteis por um período de 2h. Para a dessorção e injeção foram utilizados os mesmos parâmetros descritos para a polpa.

3.1.3.6. Quantificação relativa da expressão gênica dos receptores de etileno

3.1.3.6.1. Delineamento experimental

Foram selecionados 6 pontos ao longo do amadurecimento para a análise da expressão gênica, levando em consideração a produção de etileno. Assim, foram selecionados 3 pontos pré-climatéricos, um ponto climatérico correspondente ao ponto de máxima produção de etileno, e dois pontos pósclimatéricos, como demonstrado na figura 6 abaixo, utilizando uma curva de etileno hipotética.



Figura 6 - Pontos selecionados para as análises de qPCR baseados na curva de produção de etileno

Os dias pós-tratamento selecionados em cada grupo se encontram na tabela 1 abaixo.

Grupos -	PC-I	PC-II	PC-III	CI	PO-I	PO-II
	Dias pós-tratamento (DPT)					
Controle	1	4	8	13	14	16
Frio	1	7	16	19	23	27
1-MCP	1	8	19	22	25	27
Etileno	1	2	3	5	9	10

Tabela 1 – Pontos do amadurecimento avaliados na análise de expressão dos receptores de etileno.

3.1.3.6.2. Desenho dos primers

A partir das sequencias parciais e completas dos receptores de etileno de banana depositados no GenBank, foram desenhados *primers* para a amplificação dos transcritos por qPCR utilizando dois programas disponíveis na internet: Primer3Plus (UNTERGASSER *et al.*, 2007) e Primer-Blast (ROZEN; SKALETSKY, 2000). O critério de seleção dos *primers* foi baseado nos seguintes parâmetros:

- Temperatura de dissociação (Tm) de aproximadamente 60°C;
- Diferença entre a Tm dos primers forward e reverse de no máximo 1°C;

- Tamanho do amplicon entre 80 e 250pb;
- Conteúdo de C/G em 50%;
- Nos 5 últimos pares de bases da terminação 3', o conteúdo de C/G não ultrapassar 3 bp, e não devendo ser em seqüência;
- Ausência de dímeros de primers e hairpins (avaliados pelo programa Operon – Oligo Analysis Tool (EUROFINS, 2011)

Depois de obtidos os possíveis pares de *primers*, foram avaliados as seqüências dos *amplicons* pelo programa MFOLD (ZUCKER *et al.*, 2003) para que o pareamento *amplicon-primer* não fosse afetado por interações intermoleculares do próprio *amplicon* (*hairpins*) nas extremidades 5' e 3'.

As seqüências obtidas estão descritas na Tabela 2.

Receptores		Seqüência	Amplicon	№ acesso GenBank	
ERS1	Forward	5'-CGGTGCCTTCATTGTTCTTTG-3'	228nh	AB266315.1	
LINGT	Reverse	5'-CCCATCTCCCTATCAAGTTC-3'	22000	AD200313.1	
ERS2	Forward	5'-CTATGGGTTACCTTAGCAGCA-3'	86pb	86nh AB266316	AB266316 1
Rev	Reverse	5'-CTGACTGAGAGCTCTTTCTC-3'		7.0200010.1	
EB S3	Forward	5'-CGCACTTGCTTACTTCTCCA-3'	151pb	AB266317.1	
LINGS	Reverse	5'-CACGGTAAAGGTCCACAAG-3'			
FTR1	Forward	5'-AGGAGAAAGAGCTCTCAGTC-3'	QOph	ΔE1137/8 1	
	Reverse	5'-GGTTGGACGCAGCAAGAAT-3'	0000	/11107-0.1	
Actina	Forward	5'-TGACGACATTCAGCCTCTTG-3'	134nh	ΔF246288 1	
	Reverse	5'-TTCCGACCATCACACCAGTA-3'	10400	711 240200.1	

Tabela 2 – Seqüências dos *primers forward* e *reverse* desenhados para a amplificação dos receptores de etileno e actina para a análise de qPCR.

Foram realizados os testes para verificação da viabilidade dos *primers* desenhados e otimização das reações. A partir da curva de diluição do *pool* de cDNA foi possível calcular a eficiência de amplificação e a concentração ideal de cDNA a ser adicionada nas reações de qPCR. Com a curva de diluição de *primers*, realizada com a quantidade de cDNA otimizada, foi possível

estabelecer as concentrações otimizadas a serem adicionadas a reação (Tabela 3).

Pacantaras Eficiência		Equação da reta	Concentração	Concentração
Receptores	Eliciencia	(r ²)	cDNA	primers
ERS1	1,98	y= -3,3778x+22,5 (0,9987)	1,25ng/µL	100nM
ERS2	1,88	y= -3,6471x+27,6 (0,9913)	2,5ng/µL	100nM
ERS3	1,87	y= -3,68x+25,249 (0.9956)	1,25ng/µL	100nM
ETR1	1,79	y= -3,9731x+28,66 (0,95)	8,33ng/µL	100nM
Actina	2,13	y= -3,0546x+21,45 (0,9847)	0,83ng/µL	200nM

Tabela 3 – Resultados da otimização da reação de qPCR

As eficiências obtidas foram consideradas satisfatórias para a continuidade das análises.

Foram analisadas as curvas de dissociação dos *amplicons* gerados, e em todas as reações foram amplificados somente um produto. As temperaturas de dissociação foram de 82°C, 76,3°C, 77,8°C, 78,2°C e 83,5°C para ERS1, ERS2, ERS3, ETR1 e actina respectivamente. Um exemplo das curvas de dissociação para cada receptor se encontra na Figura 21. Apesar das curvas de dissociação indicarem que as reações foram específicas, os *amplicons* serão seqüenciados.





3.1.3.6.3. Extração de RNA total

Foram utilizados dois métodos de extração de RNA total. Em um primeiro momento, a extração foi realizada conforme descrito por López-Gómez e Gómez-Lim (1992), com modificações, utilizando cerca de 3g de polpa para a extração. Depois foi utilizado o método descrito no protocolo de isolamento em pequena escala do PureLink Plant RNA Reagent (Invitrogen[®]) utilizando 80mg da polpa para extração.

A qualidade dos ácidos nucléicos extraídos foi feita por espectrofotometria utilizando o aparelho BioTek Synergy MX[®] com base na razão da leitura das absorbâncias a 260nm/280nm, considerando que os
valores de amostras puras devem ser de 2,0 para RNA (SAMBROOK *et al.,* 1989). A análise da integridade dos ácidos nucléicos foi feita por eletroforese em gel de agarose 1%, contendo corante fluorescente GelRedTM em tampão Tris-acetato, pH 8,0 (SAMBROOK *et al.,* 1989), realizada a 80V durante 20min.

A quantificação foi realizada por espectrofotometria utilizando o aparelho BioTek Synergy MX[®], tendo como referencia o fato de que a absorbância de uma amostra de 40µg/mL de RNA a 260nm deve ser igual a 1 (SAMBROOK *et al.*, 2000).

O RNA total foi tratado com "DNA-free kit" (Ambion[®]) para garantir que não houvesse contaminação com DNA nas amostras e possíveis reagentes residuais que pudessem interferir com as próximas etapas.

3.1.3.6.4. Síntese do DNA complementar (cDNA) fita-simples
Foi utilizada a reação de transcrição reversa utilizando o kit "Improm II"
(Promega[®]), combinando o RNA purificado extraído com *primer* Oligo (dT₁₅).

3.1.3.6.5. Análise da expressão gênica por PCR quantitativo (qPCR)

Antes das quantificações foram realizadas reações de otimização dos primers desenhados, ajustando, assim, as quantidades de primers forward e reverse e quantidade de cDNA a serem adicionadas nas reações.

- Otimização dos primers e eficiência da reação

Para cada receptor analisado foi traçada uma curva de eficiência da reação de PCR, cujo valor corresponde a proporção de moléculas do gene-alvo que foram duplicadas em cada ciclo. Para isso foram realizadas qPCRs de curvas de diluição do cDNA, e os valores de Ct obtidos foram plotados em um gráfico em escala logarítmica. Ct, ou *cycle threshold*, é definido como o número de ciclos necessários para que o sinal da fluorescência, produzido pela ligação do corante com ácido nucléico, cruze o *threshold* (limiar) estabelecido. O valor de Ct é inversamente proporcional a concentração de ácido nucléico na amostra. O cDNA utilizado foi um *pool* de 3 amostras em pontos diferentes de maturação do fruto. A partir da inclinação da reta obtida foi realizado o seguinte calculo:

Slope = -1/ -a, sendo que 'a' é a inclinação da reta obtida

Com o valor de *slope* é calculado a eficiência utilizando o seguinte calculo:

Eficiencia = \log^{Slope}_{10}

O valor de eficiência ideal é igual a 2, o que significa uma eficiência de 100%..

A partir dos gráficos obtidos na curva de diluição do cDNA foram estabelecidas as concentrações ideais de cDNA a serem adicionadas na reação de qPCR para cada receptor, sendo que a concentração escolhida foi aquela em que a fase *log* da amplificação estivesse entre 20 e 25 ciclos.

Para a otimização da concentração dos primers foram realizadas reações de qPCR utilizando a concentração otimizada de cDNA porem variando as concentrações dos *primers forward* e *reverse*. Para a escolha das concentrações foi escolhida a menor concentração que a fase *log* da amplificação estivesse entre 20 e 25 ciclos.

- qPCR

A expressão dos receptores de etileno foram analisados por qPCR utilizando o método de detecção de fluorescência em tempo real. Foi utilizado o kit "Platinum[®] SYBR[®] Green gPCR SuperMix – UDG (Invitrogen[™]) adicionando o corante de referencia ROX, para a normalização das reações. As análises foram feitas em quadruplicata, e conduzidas em termociclador RotorGene RG-3000 da Corbett[®], e os resultados analisados utilizando o software do equipamento. Para cada conjunto de reações foi efetuado um controle negativo, o gual continha todos os reagentes exceto o cDNA (No template Control, NTC), e um padrão interno de corrida, que consistiu na amplificação da actina (gene constitutivo) do pool de cDNA. As condições da corrida foram: 50°C por 2min para atividade da enzima UDG, 95°C por 2min para inativação da enzima UDG e ativação da enzima Taq polimerase, 40 ciclos a 95°C por 15s para desnaturação, 60°C por 30s para o pareamento dos primers e 72°C por 30s para extensão, seguido pela determinação da temperatura da curva de dissociação (melting curve, Tm) dos amplicons. A temperatura da curva de dissociação do amplicon gerado, que deve ser a mesma para todas as reações, mostra a pureza dos produtos formados.

A comparação da expressão gênica foi feita de forma relativa entre os valores de concentração dos receptores no ponto PC-I do grupo controle 1, considerado como "amostra calibradora", e os demais pontos do controle e amostras tratadas, após a normalização com o gene constitutivo (actina).Para a análise dos resultados foram utilizados dois métodos de cálculo da expressão relativa: o método do $\Delta\Delta$ Ct (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001), no qual assume-se que a eficiência da amostra e do controle sejam iguais, e o método de REST (PFAFFL *et al.*, 2002), que leva em consideração a eficiência real da amostra e do controle.

3.2. Grand Naine

Devido aos resultados encontrados na produção de compostos voláteis do aroma de bananas armazenadas em baixas temperaturas (12°C), decidiu-se realizar uma amostragem com bananas de outra variedade para verificar se as alterações encontradas na Nanicão se reproduzem.

Sob a supervisão do Dr. Jeffrey K. Brecht, do Horticultural Sciences Department, da University of Florida (FL/EUA), o estudo foi repetido com bananas da variedade Grand Naine.

3.2.1. Amostragem

Bananas (*Musa acuminata* AAA, cv. Cavendish, var. 'Grand Naine') não tratadas foram doadas pela empresa Chiquita[©] para a Universidade da Flórida, na cidade de Gainesville, FL (EUA) para o ensaio. Os frutos cultivados no Panamá foram enviados em caixas de papelão, sob refrigeração, e com a casca totalmente verde. Não foi necessário realizar uma higienização da casca, pois a empresa fez a lavagem antes do envio.

3.2.2. Tratamentos

Os frutos foram separados inicialmente em dois grupos:

- Não tratados
- Tratados com etileno: os frutos foram dispostos em caixas plásticas vedadas. Com auxílio de uma seringa foi injetado um volume de etileno

100% para que, levando em consideração o volume de ar livre dentro das caixas, resultasse em uma concentração final de 100ppm de etileno. Uma alíquota do ar foi coletada de um ponto diferente daquele em que o gás foi injetado, e a concentração final de etileno foi verificada em cromatógrafo a gás (ver condições de corrida no item métodos/medida de etileno). As caixas foram mantidas fechadas a temperatura ambiente por 12h.

Cada grupo foi dividido em 2 grupos para armazenamento a diferentes temperaturas, resultando assim nos seguintes grupos:

- Grupo controle a 20°C (20C): bananas não tratadas, armazenadas em câmara com ventilação forçada, umidade a 90%, e temperatura controlada a 20°C(±2°C) até o amadurecimento total dos frutos.
- Grupo frio a 13°C (13C): bananas não tratadas, armazenadas em câmara com ventilação forçada, umidade a 90%, e temperatura controlada a 13°C(±2°C) por um período de 15 dias, sendo então a temperatura ajustada a 20°C(±2°C), até o amadurecimento total dos frutos.
- Grupo etileno a 20°C (20E): bananas tratadas com etileno exógeno, armazenadas em câmara com ventilação forçada, umidade a 90%, e temperatura controlada a 20°C(±2°C) até o amadurecimento total dos frutos.
- Grupo etileno a 13°C (13E): bananas tratadas com etileno exógeno, armazenadas em câmara com ventilação forçada, umidade a 90%, e temperatura controlada a 13°C(±2°C) por um período de 15 dias, sendo então a temperatura ajustada a 20°C(±2°C), até o amadurecimento total dos frutos.

Um fluxograma esquemático do tratamento dos frutos se encontra no anexo III. Além disso, esquemas com a cronologia das análises realizadas em cada grupo, ao longo do amadurecimento, se encontram no anexo IV.

3.2.3. Métodos

3.2.3.1. Respiração e produção de etileno

Foram realizadas análises diárias da respiração e da produção de etileno pelas bananas para acompanhar e caracterizar o amadurecimento.

Frutos foram escolhidos aleatoriamente dentro de cada grupo, pesados e distribuídos em 3 frascos, sendo 3 frutos por frasco. Os frascos foram fechados por uma hora para o acumulo dos gases, e mantidos nas câmaras climatizadas. Alíquotas do ar do interior dos frascos foram colhidas com seringas fechadas com rolha de silicone.

As amostras foram injetadas em um cromatógrafo à gas Varian CP 3800, para análise simultânea de etileno e CO_2 . O etileno foi detectado com detector do tipo PDHID, e coluna de 0,5m x 1/8" ultimetal Hayesep Q 80-100. CO_2 foi detectado com detector do tipo TCD e coluna de 1m x 1/8" ultimetal Hayesep Q. Para a quantificação foram injetados padrões comerciais em triplicata diariamente.

3.2.3.2. Medida de cor da casca

Para a medida de cor da casca foram usados os mesmos frutos da análise de CO₂ e etileno. Para cada fruto foram feitas duas leituras na parte mediana, de lados diametralmente opostos. Foi utilizado o colorímetro Chroma Meter CR-310 Minolta[®]. Os resultados foram expressos como ângulo Hue (H°).

3.2.3.3. Sólidos solúveis totais (%TSS)

Foram medidos sólidos solúveis totais na polpa e na casca pelo método descrito em PESIS *et al.*, 2005. Foram retiradas rodelas da parte central de 3 frutos, sendo separado a polpa da casca, e congelados em tubos de centrifuga de 50mL a -20°C até o momento da análise. Para a medida as amostras foram descongeladas, e no exudato formado foi medido ^oBrix utilizando um refratômetro digital (Atago[®]).

3.2.3.4. Aroma

Foram analisados os compostos voláteis do fruto inteiro, polpa e casca separadamente.

Frutos inteiros: em frascos herméticos (triplicata), foram colocados três frutos por frasco escolhidos aleatoriamente no grupo. Os frascos foram fechados para acúmulo dos compostos voláteis por 1 hora. Para adsorção, foi exposta fibra de microextração em fase sólida (SPME) revestida de polímeros 50/30µm DVB/CarboxenTM/PDMS StableFlexTM (Supelco Co.). O tempo de adsorção foi de 15min. Então a fibra foi inserida manualmente no injetor do cromatógrafo a gás Agilent 7890 com espectrômetro de massas acoplado MSD Agilent 5975C (CG/MS). Tempo de dessorção de 10min. Foi utilizada coluna capilar HP5MS Agilent (30m X 0,25 mm X 0,25µm), gás carreador hélio à uma velocidade de fluxo de 0,8mL/min. A temperatura de corrida foi inicial de 40°C por 2 min, com aumento da temperatura até 150°C com rampa de 6°C/min, seguido de aumento até 260°C com rampa de 15°C/min, e por fim 260°C por 2min. Os espectros de massa obtidos foram comparados com os da biblioteca NIST (2008) e considerado como identificação positiva aqueles com índice de similaridade acima de 70% e com mesmo índice de retenção.

• Polpas e cascas: a análise de voláteis da polpa e da casca separadamente foi realizada de acordo com PESIS *et al.*(2009) com modificações e chamada pela Dra. Edna Pesis de método *In situ*. A parte central de frutos foi cortada e separada a casca da polpa. Na polpa foram cortados discos de aproximadamente 1 cm de espessura. Com o auxílio de um furador de rolhas de aço-inox, com abertura de aproximadamente 1 cm de diâmetro, foram cortados discos da amostra (polpa ou casca). Em balança analítica, pesou-se 1g de amostra (casca ou polpa), e esta foi colocada em *vials* âmbar de 20 ml com tampa magnetizada e septo de silicone, específicos para *autosampler*. Nos *vials* foi adicionado solução de NaCl 20% e NaCl cristal de maneira a concentração final ser de 30%m/v. Os *vials* com amostra foram congelados a -20°C. Para a leitura dos compostos voláteis, os *vials* foram descongelados em banho-maria a 30°C por 1h. Para a leitura foi utilizado o sistema de *autosampler* para SPME acoplado ao CG/MS. Os parâmetros de injeção automática foram: 15 minutos a 30°C para acúmulo dos voláteis, 15

minutos de exposição da fibra para adsorção e 10 minutos para dessorção no injetor. As condições de corrida foram as mesmas descritas para o fruto inteiro. Os resultados foram obtidos a partir de triplicata de extração de casca e polpa.

3.3. Análise estatística

Para as análises do perfil dos compostos voláteis das polpas e dos frutos inteiros foram realizadas análises de componentes principais (PCA) utilizando os programas Origin Pro8 e Statistica 8.0 para a conversão dos dados e a confecção das figuras respectivamente.

Para as análises de heatmap foi utilizado o programa estatístico *on line* MetaboAnalyst 2.0 (XIA *et al.*, 2012; XIA *et al.*, 2009).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Caracterização dos frutos

4.1.1. Produção de etileno

Foram realizadas análises diárias da produção de etileno para caracterizar o amadurecimento dos frutos e, também, para delinear as análises posteriores (Figuras 8 e 9)



Figura 8 – Produção de etileno endógeno de bananas cv. Nanicão, grupo controle (não tratado, amadurecimento a 20°C) e tratamentos (armazenamento a 13°C e, após 15 dias, transferência para 20°C; 100ppb 1-metilciclopropeno 12 horas; 100ppm etileno por 12 horas), durante o amadurecimento. Os valores indicados são as médias e as barras de erros correspondem aos desvios-padrão (n=5).

Como bananeiras não são sazonais, tendo frutos o ano inteiro, as amostragens com a variedade Nanicão foram limitadas ao período de junho a agosto para minimizar as variações que ocorrem nos frutos pela exposição a diferentes condições de temperatura, oferta de água e fotoperíodo que ocorrem em diferentes estações do ano. As limitações de tempo das amostragens e o grande número de frutos por grupo impediram que todas as amostragens fossem feitas simultaneamente. Assim, os grupos controle, exposta a baixas temperaturas, tratados com 1-MCP e tratado com etileno da cv. Nanicão (figura 8) foram feitos de julho/agosto de 2009, em julho de 2010, e junho de 2011, enquanto que a amostragem com a cv. Grand Naine (figura 9) foi realizada em abril de 2012, conforme descrito no material e métodos.



Figura 9 - Produção de etileno endógeno de bananas cv. Grand Naine, grupo controle (não tratado, amadurecimento a 20°C) e tratamentos (armazenamento a 13°C e, após 15 dias, transferência para 20°C; 100ppm etileno por 12 horas; 100ppm etileno por 12 horas, armazenamento a 13°C e, após 15 dias, transferência para 20°C), durante o amadurecimento. Os valores indicados são as médias e as barras de erros correspondem aos desvios-padrão (n=3).

A produção de etileno endógeno dos grupos da cv. Grand Naine seguiram o mesmo padrão encontrado para a Nanicão, porém com concentrações mais baixas. Entretando é sabido que as diferentes variedades de bananas produzem diferentes concentrações de etileno endógeno, e as encontradas em nosso estudo são as mesmas encontradas por Golding *et al.* (1998) com bananas Cavendish cv Williams.

No grupo exposto a baixas temperaturas (13°C) tanto da cultivar Nanicão quanto Grand Naine houve inibição da produção de etileno endógeno, que começou assim que os frutos foram ajustados à temperatura de 20°C, tendo o máximo de produção no 19°DPT e 21°DPT, respectivamente. Dentre as possíveis causas, além da diminuição do metabolismo devido à conservação em baixas temperaturas, sugere-se que o tratamento com frio inibe o amadurecimento de bananas por diminuir a capacidade de ligação do etileno com seus receptores (JIANG *et al.*, 2004b), além de reduzir a produção de etileno por diminuir a síntese de precursores do ciclo de Yang como foi demonstrado por Choudhury *et.al* (2008) que também observou uma diminuição dos transcritos de *Ma*ACS1 e *Ma*ACO1, e respectivo conteúdo protéico de ACS e atividade de ACO reduzidas em polpas de banana.

O grupo tratado com 1-MCP da cultivar Nanicão (figura 8) foi o que teve um maior deslocamento da curva de etileno em relação com controle, tendo início somente no 19°DPT e pico ao 22°DPT. Esse resultado condiz com os encontrados anteriormente por Golding *et al.* (2008) e Jiang *et al.* (2004a) porém, somente o primeiro também observou uma produção de etileno maior do que a do controle.

Tratamentos que reduziram a produção de etileno temporariamente, como o 1-MCP e conservação em baixas temperaturas, apresentaram maior produção de etileno do que os respectivos controles, resultados também observados por Moya-Léon *et al.* (2006) e Inaba *et al.* (2007).

Os frutos tratados com etileno apresentaram produção endógena do hormônio já no primeiro dia pós tratamento, com concentração ascendente até o 5°DPT em ambas cultivares, e a partir desse momento as concentrações permaneceram altas até o final da amostragem, porém na cultivar Nanicão não houve a formação de um pico como nos demais grupos. A concentração de etileno endógeno do grupo tratado com etileno na cultivar Nanicão foi a menor em relação a todos os grupos, resultados também observados por Domínguez e Vendrell (1994). Na cultivar Grand Naine (figura 9), a produção máxima de etileno endógeno do grupo tratado com etileno exógeno foi a mesma do grupo não tratado.

O grupo tratado com etileno e mantido a baixa temperatura (Etileno a 13°C) da cultivar Grand Naine (figura 9) não atingiu o nível deprodução de etileno endógeno, após a alteração de temperatura de armazenamento, como verificado no grupo 13°C e no grupo 13°C da cultivar Nanicão (figura 8), mesmo com o estímulo do etileno exógeno. Esse resultado demostra que a temperatura de 13°C efetivamente inibe a produção de etileno endógeno pelo fruto. Não foi encontrado na literatura nenhum tratamento semelhante para comparação dos resultados desse grupo.

4.1.2. Respiração

Após o aumento na produção de etileno pelas bananas, um dos parâmetros que caracteriza a mudança do estágio pré-climatérico para o estágio climatérico do fruto, há o aumento típico na respiração (produção de CO_2 – Figuras 10 e 11).



Figura 10 – Respiração de bananas cv. Nanicão, grupo controle (não tratado, amadurecimento a 20°C) e tratamentos (armazenamento a 13°C e, após 15 dias, transferência para 20°C; 100ppb 1-metilciclopropeno 12 horas; 100ppm etileno por 12 horas) (n=5), durante o amadurecimento. Os valores indicados são as médias e as barras de erros correspondem aos desvios- padrão (n=5).



Figura 11 – Respiração de bananas cv. Grand Naine, grupo controle (não tratado, amadurecimento a 20°C) e tratamentos (armazenamento a 13°C e, após 15 dias, transferência para 20°C; 100ppm etileno por 12 horas; 100ppm etileno por 12 horas, armazenamento a 13°C e, após 15 dias, transferência para 20°C), durante o amadurecimento. Os valores indicados são as médias e as barras de erros correspondem aos desvios-padrão (n=3).

Observou-se o adiantamento do pico respiratório nos frutos tratados com etileno em ambas as cultivares, conforme o esperado em comparação com estudos anteriores (MAINARDI *et al.*, 2006) e atraso na produção de CO₂ nos grupos armazenados em baixas temperaturas (grupo 13C de ambas cultivares) e tratados com 1-MCP. Esse atraso corresponde ao mesmo deslocamento obtido com o aumento de produção de etileno nos respectivos grupos.

No grupo Etileno a 13°C (figura 11) da cultivar Grand Naine houve um pico respiratório no 10° DPT. Após discussões e análises de outros dados, concluiu-se que menores leituras do padrão de CO₂ durante as análises deste dia em específico, podem ter sido a verdadeira causa de tal variação, e não uma possível resposta endógena do fruto. Apesar das flutuações encontradas neste grupo, pode-se verificar que o frio foi capaz de impedir um aumento precoce da produção de etileno endógeno, apesar do tratamento com etileno exógeno.

4.1.3. Coloração da casca

A coloração da casca é um parâmetro muito usado para o acompanhamento do amadurecimento, sendo inclusive utilizada para a classificação dos frutos no mercado varejista.

Medidas de reflectância foram realizadas nas cascas dos frutos ao longo da amostragem (Figuras 12 e 13).

Com exceção do grupo tratado com 1-MCP, pode-se observar que não houve diferença na coloração inicial e final dos grupos, havendo somente um deslocamento de tempo entre os eventos, o que pode significar que todos os grupos atingiram estágios similares de amadurecimento ao fim dos experimentos, pelo menos no que se refere ao metabolismo de pigmentos na casca dos frutos, com alguma exceção para o grupo 1-MCP. Neste grupo, não houve desaparecimento total da cor verde, mesmo ao final de 27 dias, o que poderia ser atribuído a degradação incompleta da clorofila na casca do fruto. Outra característica que pode ser observada na figura é a grande dispersão dos resultados do grupo 1-MCP após o 20 ° DPT, momento em que coincide com o aumento da produção de etileno. O atraso na mudança da cor da casca com bananas tratadas com 1-MCP também foi observado por Pelayo et al. (2003). Tal atraso faz com que a amostra de frutos tratados apresente alta heterogeneidade, provocando a dispersão de valores de matiz observada na Figura 12. Essa alta heterogeneidade e a incapacidade de atingir a coloração atribuída à um típico fruto maduro são fortes indícios do porquê o tratamento com 1-MCP ainda não é utilizado em larga escala para bananas pelo comercio varejista.



Figura 12 - Coloração da casca de bananas cv. Nanicão, grupo controle (não tratado, amadurecimento a 20°C) e tratamentos (armazenamento a 13°C e, após 15 dias, transferência para 20°C; 100ppb 1-metilciclopropeno 12 horas; 100ppm etileno por 12 horas), durante o amadurecimento. Os valores indicados são as médias e as barras de erros correspondem aos desvios- padrão (n=6).



Figura 13 - Coloração da casca de bananas cv. Grand Naine, grupo controle (não tratado, amadurecimento a 20°C)e tratamentos (armazenamento a 13°C e, após 15 dias, transferência para 20°C; 100ppm etileno por 12 horas; 100ppm etileno por 12 horas, armazenamento a 13°C e, após 15 dias, transferência para 20°C), durante o amadurecimento. Os valores indicados são as médias e as barras de erros correspondem aos desvios-padrão (n=12).

Na cultivar Grand Naine, os resultados do grupo Etileno a 13°C chamaram a atenção, pois os frutos apresentaram um perfil muito diferente dos frutos não tratados também conservados a 13°C, atingindo uma coloração amarelada antes da mudança de temperatura no 15°DPT. Os resultados demostram que o tratamento com etileno exógeno foi suficiente para iniciar a cascata bioquímica que leva a degradação da clorofila, mesmo que o fruto não tenha aumentado a produção de etileno endógeno, característica tida como essencial para mudança do fruto de um estágio pré-climatérico para o climatérico. O fato também chama a atenção para a existência de possíveis componentes etileno-independentes nas vias metabólicas de pigmentos em bananas.

4.1.4. Açúcares solúveis e amido

Bananas possuem uma grande quantidade de carboidratos não estruturais na forma de amido. Este é convertido a açúcares solúveis por um processo enzimático em um curto período de tempo (CORDENUNSI; LAJOLO, 1995; PURGATTO *et al.*, 2002). As curvas de degradação de amido e a respectiva conversão nos açúcares nas amostras dos grupos: controle a 20°C, 13°C, 1-MCP e etileno se encontram na figura 14.

Os resultados se encontram de acordo com a literatura (CORDENUNSI; LAJOLO, 1995; PURGATTO *et al.*, 2001; MOTA *et al.*, 2002; BIERHALS *et al.*, 2004; MAINARDI *et al.*, 2006; SHIGA *et al.*, 2011)

Com exceção do conteúdo inicial de amido do grupo 1-MCP (29,70 <u>+</u> 0,93g/100g), as amostras apresentaram conteúdos iniciais de amido em torno dos 25g/100g conforme descrito anteriormente (CORDENUNSI; LOJOLO, 1995). A degradação do amido foi concomitante ao pico de etileno em todos os grupos, sendo que no grupo 1-MCP o teor remanescente foi bastante significativo (aprox. 8g/100g), resultado também encontrado em estudos anteriores do grupo (MAINARDI *et al.,* 2006).

O açúcar solúvel predominante em todos os grupos foi a sacarose, resultado que também se encontra de acordo com os trabalhos anteriores do grupo (CORDENUNSI; LAJOLO, 1995).



Figura 14 - Degradação do amido e liberação de açúcares solúveis em bananas cv. Nanicão, grupo controle (não tratado, amadurecimento a 20°C) e tratamentos (armazenamento a 13°C e, após 15 dias, transferência para 20°C; 100ppb 1-metilciclopropeno 12 horas; 100ppm etileno por 12 horas), durante o amadurecimento. Os valores indicados são as médias e as barras de erros correspondem aos desvios- padrão (n=3).

Na amostragem com as bananas cv. Grand Naine não foi possível dosar o conteúde de áçucares solúveis e amido da mesma maneira que a cv. Nanicão. Assim, foi medido o conteúdo de sólidos solúveis totais (%TSS) já que se sabe que altos níveis de %TSS na polpa indicam hidrólise do amido e acumulo de açúcares características de um amadurecimento caracteristico (MARRIOTT *et al.*, 1981). Os resultados da análise de %TSS na polpa e na casca de bananas cv. Grand Naine se encontram na Figura 15.



Figura 15 - Sólidos solúveis totais (%TSS) na casca e polpa de bananas cv. Grand Naine, grupo controle (não tratado, amadurecimento a 20oC)e tratamentos (armazenamento a 13º e, após 15 dias, transferência para 20°C; 100ppm etileno por 12 horas; 100ppm etileno por 12 horas, armazenamento a 13°C e, após 15 dias, transferência para 20°C), durante o amadurecimento. Os valores indicados são as médias e as barras de erros correspondem aos desvios-padrão (n=3).

Os valores de sólidos solúveis totais (%TSS) na polpa estão de acordo com a literatura (JESUS *et al.*, 2004; Pesis *et al.*, 2005) onde foram encontrados valores de 20% a 25% em bananas armazenadas a 20°C no final do amadurecimento. O mesmo ocorreu para os resultados na casca, onde para o grupo armazenado a 20 °C foram relatados valores entre 7,5%, com excessão para o grupo 13E, que apresentaram valores maiores na casca (9,5%). Este resultado demostra que o tratamento com etileno exógeno associado ao armazenamento em baixa temperatura afetou diferencialmente a casca, aumentndo a taxa de quebra do amido em açúcares somente neste tecido.

Os diversos tratamentos afetaram estes parâmetros da caracterização (açúcares solúveis, amido e sólidos solúveis totais) de forma temporal. Do ponto de vista do resultado final, exceto por algumas diferenças no 1-MCP na cv. Nanicão e 20E na Cavendish cv. Grand Naine, todos os grupos atingiram valores semelhantes ao final dos experimentos. Assim, no que tange os parâmetros analisados, o amadurecimento ocorreu para os frutos independente do tratamento.

4.2. Análise dos Compostos Voláteis 4.2.1. Nanicão

Foram analisados a composição dos compostos voláteis liberados pelos frutos inteiros e pelas polpas das bananas controle e tratadas ao longo do amadurecimento. Embora os cromatogramas em cada análise revelem um grande número de compostos voláteis, boa parte não contribue para o aroma do fruto, por não possuírem notas aromáticas. A partir dos cromatogramas obtidos foram selecionadas 10 substâncias reconhecidas pela literatura como sendo características do aroma de banana (TRESSL; DRAWERT, 1973; MACKU; JENNINGS, 1987; SHIOTA, 1993; SALMON *et al.*, 1996; JÓRDAN *et al.*, 2001; BOUDHRIOUA *et al.*, 2003), e que apresentassem alta concentração ao final do amadurecimento. Foram também selecionadas substâncias que estivessem presentes no fruto verde inteiro e na polpa para acompanhar a mudança do perfil ao longo do amadurecimento. Além disso, foram

45

selecionados compostos presentes nos cromatogramas dos grupos tratados que tivessem uma concentração alta no final do amadurecimento, mas que não necessariamente fossem características da banana. A lista com os compostos voláteis escolhidos se encontra na tabela 4.

Substância selecionada	Sigla	nº CAS ¹	Fórmula Molecular	Descrição aromática ²
Ésteres				
Butirato de Isobutila	IBB	000539-90-2	Lof	Frutado, doce, banana, abacaxi
Isovalerato de isoamila	IAV	000659-70-1	\o¶	Frutado, doce, maçã, manga
Acetato de isoamila	IAA	000123-92-2	Y~°¢°	Frutado, banana, pêra
Butirato de isoamila	IAB	000106-27-4	\sim	Banana, fresco, verde, pêra
Acetato de etila	EA	000141-78-6	070-	Conhaque, etéreo, fruta senescente
Acetato de isobutila	IBA	000110-19-0	Toto	Doce, etéreo, maçã, banana
Butirato de heptan- 2-ila	B1M	039026-94-3		Frutado, fresco, castanha
lsovalerato de isobutila	IBV	000589-59-3	Y Jour	Maçã, frutado, doce
n-Valerato de hexila	HNV	001117-59-5		Oleoso, frutado
3-metilbutil 2-metil- butanoato	B23	27625-35-0		Fresco, frutado, doce
Butirato n-amila	AB	000540-18-1	$\sim 10^{\circ}$	Doce, frutado, banana, abacaxi
Butirato de isopentila	B3B	000109-19-3	$\mathbf{h}_{\mathbf{o}}$	Banana, fresco, pêra, verde
Álcool				
Álcool isoamílico	IAO	000123-51-3	ОН	Alcoólico, conhaque, frutado

Tabela 4 – Compostos voláteis analisados nas bananas cv. Nanicão nãotratadas (controle), e tratadas (baixa temperatura, 1-MCP e etileno) ao longo do amadurecimento.

46

Substância selecionada	Sigla	nº CAS ¹	Fórmula Molecular	Descrição aromática ²
1-Hexanol	1H	000111-27-3	HO	Doce, verde, herbáceo, amadeirado
Áldeído				
(E)-2-Hexenal	2H	006728-26-3	0	Aldeídico, maçã, frutado, verde
Hexanal	н	000066-25-1	0	Graxo, verde, gramado
Cetona				
2-Pentanona	2P	000107-87-9	°	Doce, etéreo, frutado
Terpeno			,	
α-Pineno	AP	000080-56-8		Pinho, resinoso
α-Cedreno	AC	000546-28-1	Hum	Amadeirado, cedro, doce, fresco

¹Número CAS é um número de registro único no banco de dados do Chemical Abstracts Service, uma divisão da Chemical American Society.² Descrições obtidas em GSC – The Good Scents Company (2012).

A partir das concentrações relativas das substâncias selecionadas foram feitas analises estatísticas para a diferenciação do perfil como um todo, através da Análise de Componentes Principais (PCA). Foram agrupados os resultados de acordo com o tipo de amostra (frutos inteiros ou polpas) e de acordo com os tratamentos. Através da PCA também foi possível determinar quais compostos mais influenciaram a distribuição das amostras nos gráficos. Os gráficos obtidos encontram-se nas figuras 16, 18, 20 e 22.

.



Figura 16 - Análise de Componentes Principais (PCA) do perfil de compostos voláteis dos frutos inteiros (A) e projeção das substâncias detectadas (B), representadas por códigos (tabela 1) dos grupos controle a 20°C e 13°C de bananas cv. Nanicão ao longo do amadurecimento.

Foi observado o aumento na concentração relativa das substâncias selecionadas ao longo do amadurecimento no grupo controle, com exceção daquelas relacionadas com frutos verdes (AC, AP, 2H, 1H, H) que tiveram suas concentrações diminuídas. O aumento no conteúdo de voláteis em bananas também foi observado por Boudhrioua *et al.* (2003) e Salmon *et al.*, 1996. Esse aumento foi atribuído a biossíntese de compostos voláteis a partir de aminoácidos como valina e leucina e a β -oxidação, que é o principal processo de degradação de ácidos graxos durante o amadurecimento (BOUDHRIOUA *et al.*, 2003).

Na figura 16, encontra-se a análise entre os frutos inteiros não-tratados (controle) e os frutos expostos ao frio. Observa-se 2 agrupamentos, separando os pontos pré-climatéricos e os pós-climatéricos, mas não separando os tratamentos (controle e frio), indicando assim que houve pouca diferença global na evolução dos compostos voláteis selecionados. Houve, porém, uma diminuição da concentração relativa de alguns compostos, conforme mostra a figura 17. As substâncias que mais contribuíram para essa separação entre os frutos foram AC para o agrupamento pré-climatérico e IAV para o agrupamento pós-climatérico.



Figura 17 - Concentração relativa de Isovalerato de Isoamila (IAV) e α -Cedreno (AC) nos frutos inteiros de bananas cv. Nanicão dos grupos controle a 20°C e 13°C ao longo do amadurecimento (n=3). A barra de erros corresponde ao desvio padrão.

Nos gráficos das substâncias relacionadas ao aroma de frutos verdes das figuras 17, e mais adiante nas figuras 19, 21 e 23 (AC e 2H) pode-se observar que a concentração inicial não é a mesma nos diferentes tratamentos. Consistentemente, compostos no grupo frio apresentaram concentrações muito menores do que as do grupo controle, ao contrário do que ocorreu no grupo tratado com etileno, onde a concentração era maior do que do grupo controle e tratado com 1-MCP (dados não apresentados). Esses resultados evidenciam a rapidez com que os tratamentos pós-colheita alteram a produção de compostos voláteis que compõem o aroma da banana. Assim, a exposição ao frio alterou o perfil de compostos associados ao aroma do fruto maduro, mas também aos compostos do fruto verde, evidenciado pela diminuição da concentração de 2H um dia após o tratamento (figura 19). Da mesma maneira, o tratamento com etileno exógeno afetou a produção de compostos com notas verdes, apresentando concentrações maiores do que o controle.

Nos frutos inteiros, as alterações causadas pelo armazenamento em baixas temperaturas não foi o suficiente para causar uma diferenciação no perfil pela análise de PCA, porém as alterações nas polpas foram tão marcantes (figura 18), que as amostras se deferenciaram em 3 grupamentos constituídos das amostras pré-climatéricas (sem diferenciação no tratamento), pós-climatéricas do grupo frio e pós-climatéricas do grupo controle.



Figura 18 - Análise de componentes principais do perfil de compostos voláteis das polpas (A) dos frutos dos grupos controle e frio durante o amadurecimento e projeção das substâncias detectadas (B), representadas por códigos (tabela 1)

A partir deste resultado podemos indicar uma alteração do perfil de aromas pela exposição ao frio de impacto significativo para a qualidade final dos frutos, já que observou-se a ausência de compostos conhecidamente importantes no aroma de banana como acetato de isoamila, butirato de isobutila entre outros. As substancias que mais contribuíram para a distribuição dos grupamentos na PCA foram 2H para o grupamento pré-climatérico, IAA para o grupamento pós-climatérico controle e AB para o grupamento pósclimatérico frio. A concentração relativa de IAA e 2H nas polpas ao longo do amadurecimento se encontra na figura 19.



Figura 19 – Concentração relativa de Acetato de isoamila (IAA) e (E)-2-Hexenal (2H) nas polpas de bananas cv. Nanicão nos grupos controle a 20°C e 13°C ao longo do amadurecimento (n=3). A barra de erros corresponde ao desvio padrão.

Na figura 19, assim com na figura 21 adiante, as concentrações relativas de compostos voláteis dos grupos controle e frio em frutos inteiros e em polpas,

mostram exemplos de concentração relativa reduzida em todos os voláteis no grupo frio. IAV e IAA tem concentração crescente a partir do climatério, demonstrando uma relação com o aumento da produção de etileno.

O armazenamento de frutos em baixas temperaturas é um procedimento comumente utilizado para estender a vida de prateleira. E por esta razão, também tem sido estudado para entender as alterações provocadas pelo mesmo. Bai *et al.* (2011) verificaram que o resfriamento regulou negativamente a expressão de genes que codificam enzimas ligadas a produção de voláteis em tomates, resultando em diminuição de compostos voláteis importantes, entre eles hexanal, E-2-hexanal e hexanol, também avaliados no presente estudo. Rugkong *et al.* (2011) observaram que não somente a expressão de genes ADH2 e AAT relacionados ao aroma tiveram a expressão diminuída pelo armazenamento em baixas temperaturas, mas também genes envolvidos na produção de etileno e transdução de sinal, alterando assim o amadurecimento de tomate como um todo.

No presente estudo, nos frutos tratados com 1-MCP, foi observado o atraso nas mudanças típicas do perfil de compostos voláteis do estágio préclimatérico para o estágio pós-climatérico (figuras 20A e 22A), independente de se tratatrem de frutos inteiros ou polpas. O mesmo efeito foi observado em outros trabalhos com frutos tratados com 1-MCP, incluindo maçãs (DEFILIPPI *et al.,* 2005), e peras (MOYA-LÉON *et al.,* 2006). Os resultados estão em concordância com os relatos encontrados na literatura e indicam que o etileno é um importante regulador da produção de ésteres.

Não houve diferenciação do perfil dos compostos voláteis entre o grupo controle e tratado com etileno, havendo somente a separação esperada em amostras pré-climatéricas e pós-climatéricas nos frutos inteiros (figura 20A).



Figura 20 – Análise de componentes principais do perfil de compostos voláteis em frutos inteiros cv. Nanicão dos grupos controle, 1-MCP e etileno (A) durante o amadurecimento e a projeção das substâncias detectadas (B), representadas por códigos (tabela 1).

Os voláteis que mais contribuíram para as distribuições dos perfis de voláteis quando comparados os grupos controle, etileno e 1-MCP foram, nos frutos inteiros, AC e AP nas amostras pré-climatéricas, IAV e IAB nas amostras pós-climatéricas (Figura 20B). A concentração de AC e IAV ao longo do amadurecimentos dos frutos inteiros tratados com etileno exógeno e 1-MCP e não-tratados encontra-se na figura 21 abaixo.



Figura 21 - Concentração relativa de Isovalerato de Isoamila (IAV) e α -Cedreno (AC) de frutos inteiros da cv. Nanicão dos grupos controle, 1-MCP e etileno ao longo do amadurecimento (n=3). A barra de erros corresponde ao desvio padrão.

Observa-se que a concentração de IAV em frutos inteiros tem um aumento na concentração relativa concomitante com o aumento da produção de etileno no grupo controle e tratado com etileno, enquanto que o aumento foi atrasado em dois dias em relação a produção máxima de etileno pelo grupo 1-MCP.



Figura 22 - Análise de componentes principais do perfil de compostos voláteis das polpas de bananas cv. Nanicão dos grupos controle, 1-MCP e etileno (A) durante o amadurecimento e projeção das substâncias detectadas (B), representadas por códigos (tabela 1)

Não houve diferenciação entre o grupo controle e o grupo tratado com etileno no perfil de compostos voláteis nas polpas dos frutos (figura 22A), assim como já havia sido observado nos frutos inteiros (figura 20A), havendo somente a separação em grupos pré-climatéricos e pós-climatéricos.

Pode-se observar nas polpas de amostras tratadas com 1-MCP (figura 20A) um atraso na transição do perfil de voláteis de pré-climatéricos para pósclimatéricos, havendo amostras intermediárias as dois grupamentos (replicadas do 24ºDPT, por exemplo).

Nas polpas, os voláteis que mais contribuíram para as distribuições na PCA dos grupos tratados com etileno e 1-MCP comparadas ao controle foram 2H nas amostras pré-climatéricas, IAA, IAB e IBV nas amostras pósclimatéricas (figura 22B)

Na figura 23, que mostra as concentrações relativas de IAA e 2H nas polpas de frutos tratados com etileno e 1-MCP em relação ao controle, é possível observar que a concentração de IAA foi maior do que o controle, enquanto que no grupo 1-MCP a concentração foi igual a do controle, porém havendo um atraso na produção de 2 dias em relação ao pico de etileno. Com relação a 2H, um composto típico do aroma de frutos verdes, no grupo tratado com 1-MCP, não foi observado uma diminuição da produção, como aconteceu

no grupo controle e tratado com etileno, mas sim, uma produção constante até o final do amadurecimento.



Figura 23 - Concentração relativa de Acetato de Isoamila (IAA) e (E)-2-Hexenal (2H) em polpas de bananas cv. Nanicão dos grupos controle, 1-MCP e etileno ao longo do amadurecimento (n=3). A barra de erros corresponde ao desvio padrão.

O atraso na produção de voláteis após tratamento com 1-MCP também foi observado por Golding *et al.* (1998). E Ortiz *et al.* (2010) observou em pêssegos que o tratamento com 1-MCP alterou a produção de ésteres através da inibição da atividade enzimática de lipoperoxidase e hidroperóxido liase.

As moléculas alifáticas que constituem os principais componentes do aroma de banana são biossintetizadas a partir de ácidos graxos de cadeia longa provenientes do metabolismo de ácidos graxos e do metabolismo de aminoácidos. Os diferentes alcoóis e ésteres observados no aroma de banana são produzidos em uma série de rações consecutivas que freqüentemente envolvem precursores bem definidos (SALMON *et al.*, 1996) Essas reações são catalisadas por enzimas, das quais as principais são as lipoxigenases, álcool acetil-transferase, álcool dehidrogenase e hidroperóxido liase. Essas enzimas participam de uma ou mais vias de biossíntese de aromas, e acreditase que o etileno possa regular as suas atividades (GONZÁLEZ-AGÜERO *et al.*, 2009; PÉREZ; SANZ, 2008; DEFILIPPI *et al.*, 2005; FLORES *et al.*, 2002; GRIFFITHS *et al.*, 1999).

Assim, os resultados observados em bananas cv. Nanicão demonstraram que o armazenamento em baixas temperaturas alterou o perfil de compostos voláteis do aroma, principalmente na polpa, diminuindo a qualidade dos frutos. O tratamento com o bloqueador de receptores de etileno

1-MCP atrasou a formação do perfil aromático de fruto maduro em relação a curva de etileno, porém ao final do amadurecimento não houve diferenciação em relação ao controle, e, portanto, não prejudicando a qualidade do fruto. O tratamento com etileno exógeno aumentou a concentração dos compostos de uma maneira geral, porém não alterando o perfil de compostos voláteis, que não se diferenciou do controle.

4.2.2. Grand Naine

Para verificar se as alterações no aroma provocadas por tratamentos pós-colheita, em especial o armazenamento em baixas temperaturas, que ocorreram nas bananas cv.Nanicão se repetem em bananas de outro cultivar, o ensaio foi parcialmente repetido com bananas do subgrupo Grand Naine, cv. Grand Naine, cultivadas no Panamá.

Com a supervisão do Dr. Jeffrey K. Brecht, da Universiade de Flórida, e o auxílio da professora visitante Dra. Edna Pesis, do Volcani Center de Israel, foi sugerido a utilização de um novo método para obtenção de compostos voláteis das amostras de polpa e casca da banana.

Para as amostras de polpa da cv. Nanicão, e assim como encontrado na literatura, a polpa era homogeneizada com Turrax em um bécker contendo NaCl e água. A desvantagem desse método é a grande perda de voláteis para o meio externo durante a homogeneização, diminuindo a concentração dos mesmos, e diminuindo a sensibilidade do método.

Pensando nisso, a Dra. Edna Pesis desenvolveu um método, o qual denominou de método *In situ*, onde o processo de congelamento e descongelamento provoca a ruptura do tecido, liberando os voláteis para o ambiente interno de frascos fechados onde os compostos voláteis podem ser acumulados para análises de aromas sem a perda para o meio externo. Esse método foi utilizado para a análise de maçã (PESIS *et. al.*, 2009) e maracujá (GOLDENBERG *et al.*, 2012).

Para adaptar o método para a polpa e a casca de banana foram realizadas diversas análises variando a concentração da solução de NaCl adicionada, a concentração de NaCl em cristal adicionado e as condições de descongelamento da amostra. Por fim, as melhores condições foram aquelas descritas em Material e Métodos.

Também foi comparado o método *In situ* com o método utilizado anteriormente nas amostras da cv. Nanicão, cujo resultado pode ser visualizado na figura 24



Figura 24 - Comparação dos métodos de preparo das amostras de polpa das amostras de bananas cv. Nanicão (homogeneização com Turrax) e cv. Grand Naine (*In situ*)

No método *In situ* foi obtido um número muito maior de picos no cromatograma, além de uma intensidade muito mais pronunciada dos mesmos, confirmando que com a homogeneizaçãom em Turrax (utilizada no método anterior) havia uma grande perda de compostos voláteis da polpa.

Também foram analisados outros métodos de preparação da polpa: um primeiro onde a polpa foi homogeneizada em Turrax da mesma maneira como com as amostras da cv. Nanicão, porém o homogeneizado foi colocado em *vials* e congelado; e no último onde a polpa foi homogeneizada em Turrax mas com a amostra em banho de gelo para tentar diminuir a perda de voláteis. Os cromatogramas resultantes podem ser vistos na figura 25.



Figura 25 - Comparação dos métodos de preparo das amostras de polpa de bananas: *In situ,* homogeneização em Turrax no gelo seguida por congelamento em vials, e homogeneização com Turrax no gelo.

Nos três métodos foram obtidos um maior número de picos em relação ao método anterior, porém a resolução dos picos principalmente no começo da corrida foi melhor no método *In situ*.

Para avaliar o efeito dos tratamentos na banana, especialmente na casca, foram selecionados compostos adicionais para serem avaliados na análise de componentes principais (PCATabela 5).

Tabela 5 – Compostos voláteis adicionais analisados nas bananas cv. Grand Naine não-tratadas e tratadas com etileno exógeno e armazenada em diferentes temperaturas (20°C e 13°C) ao longo do amadurecimento.

Substância selecionada	Sigla	nº CAS ¹	Fórmula Molecular	Descrição aromática ²
Ésteres Ácido butanóico, butil éster Fenol	BBE	000109-21-7	\sim $^{\circ}$	Frutado, banana, abacaxi, doce
Eugenol	E	000097-53-0	$\begin{array}{c} CH_2OR_1 \\ H_2O \\ H_2O \\ OR_2 $	Doce, especiaria, cravo, amadeirado
Alcano n-Hexano	НХ	000110-54-3	\sim	não descrito

¹Número CAS é um número de registro único no banco de dados do Chemical Abstracts Service, uma divisão da Chemical American Society.² Descrições obtidas em GSC – The Good Scents Company (2012).

A análise de PCA do perfil dos compostos voláteis dos frutos inteiros grupos 20C, 20E, 13C e 13E da cv. Grand Naine se encontra na figura 26. Não houve a separação de grupamentos tão nítidos como ocorreu com as amostras do cv. Nanicão nas quais os frutos pré-climatéricos e pós-climatéricos de diferenciaram de maneira mais clara. Pelo contrário, não houve diferenciação da maioria das amostras, independente de tratamento, com exceção dos últimos dias (evidenciado por setas), equivalentes aos períodos PO-I e PO-II em relação a curva de etileno, conforme descrito em Material e Métodos.



Figura 26 - Análise de componentes principais do perfil dos compostos voláteis de frutos inteiros cv. Grand Naine tratados e não-tratados, e a projeção das substancias responsável pela distribuição das amostras no gráfico.

Nas amostras do último dia (evidenciado por setas), as bananas estavam totalmente amarelas, com manchas nas cascas, mas ainda sem sinais de contaminação microbiológica. Na análise dos frutos inteiros há a diferenciação entre os tratamentos neste ponto, sendo que as amostras do grupo Etileno a 13°C (13E) são as que mais se diferenciaram já que se encontram em outro quadrante do gráfico do que os demais tratamentos. Diferentemente das análises com a cv. Nanicão em que um ou dois compostos eram responsáveis pela diferenciação dos grupos, na análise de frutos inteiros vários compostos contribuíram para a distribuição das amostras.

O mesmo quadro se repete com a análise da polpa (figura 27), e da casca (figura 28) onde somente as amostras mais maduras (do último dia de análise, evidenciada por setas na figura) se diferenciaram em grupos, sendo que os dois grupos armazenados a 13°C (13C e Etileno a 13°C - 13E) não se diferenciaram entre si.



Figura 27 - Análise de componentes principais do perfil dos compostos voláteis das polpas de bananas cv. Grand Naine tratados e não-tratados, e a projeção das substancias responsáveis pela distribuição das amostras no gráfico.



Figura 28 - Análise de componentes principais do perfil dos compostos voláteis da casca de bananas cv. Grand Naine tratados e não-tratados, e a projeção das substancias responsáveis pela distribuição das amostras no gráfico.

A partir dos resultados das figuras 26, 27 e 28, decidiu-se refazer as analises de PCA somente com as amostras bem maduras (do último dia de análises). O resultado encontra-se na figura 29 abaixo. Em todas as amostras, frutos inteiros, polpas e cascas, os grupos Controle a 20°C (20C) e Etileno (20E) se diferenciaram dos demais e entre si. Somente nas análises de frutos inteiros os grupos 13°C (13C) e Etileno a 13°C (13E) se diferenciaram.



Figura 29 - Análise de componentes principais do perfil dos compostos voláteis de frutos inteiros, polpas e cascas cv. Grand Naine maduros tratados e não-tratados, e a projeção das substancias responsável pela distribuição das amostras no gráfico.

Entre os muitos estudos encontrados na literatura avaliando o aroma de banana, a maioria estudou somente a polpa ou somente o fruto inteiro. Alguns avaliaram o fruto inteiro e a polpa. Porém, nenhum trabalho avaliou a contribuição da casca para o aroma final da banana.

Avaliando as amostras do grupo Controle a 20°C (20C), a maioria dos compostos analisados foram encontrados tanto na casca quanto na polpa, porém IBA foi encontrado somente na polpa e HNV foi encontrado somente na casca. Em ambos os compostos, a concentração relativa foi a mesma encontrada no fruto inteiro. Para os compostos IAA, 2P, 2H, 1H, H e B23, a casca aparentemente atuou como barreira para a liberação dos mesmos, já que as concentrações relativas foram maiores na polpa do que no fruto inteiro. Porém, a casca também foi o principal contribuinte dos compostos IAO, B1M, HNV e AB, voláteis cujas concentrações relativas foram maiores na maiores nas amostras de casca.

Esses resultados podem indicam uma contribuição diferencial entre casca e polpa para o aroma final do fruto.

Além disso, o efeito negativo do armazenamento em baixas temperaturas tanto na casca tanto na polpa não foram revertidos ou prevenidos pelo tratamento inicial com etileno exógeno, como pode ser visto nos resultados das amostras do grupo Etileno a 13°C (13E). Esse resultado demonstra que, no que concerne ao aroma, somente o tratamento com etileno não é suficiente para impedir os efeitos deletérios do armazenamento a 13°C, indicando outros fatores de regulação da biossíntese de aromas além do etileno.

Na tentativa de identificar outros padrões de alterações dos compostos voláteis pelos tratamentos, foram realizadas análises de *heatmap* e de agrupamentos hierárquicos. Os mapas formados se encontram nas figuras 30 a 33.

Houve a formação de grupamentos entre amostras do último dia de analise (região pós-climatérico II em relação à curva de etileno endógeno conforme descrito no Materias e Métodos) de fruto inteiro, casca e polpa; seguida da formação de grupamentos de amostras de frutos inteiros, grupamentos de amostras de casca e grupamentos de amostras de polpas. Esses resultados podem significar que houve uma contribuição diferencial da casca e da polpa para o aroma do fruto inteiro mais pronunciada em frutos verdes e durante o climatério, do que em frutos maduros.




Com relação ao grupo Controle a 20°C (figura 30), houve formação de grupamento com maior similaridade entre IAO, EA e B1M, evidenciado na figura com uma seta, devido a sua maior expressão no grupamento de amostras mais maduras (último dia de analise) Os compostos com menor similaridade significando um comportamento diferente dos demais foram 1H e H, similares entre si, e HX. Essa menor similaridade se deve a expressão somente nos períodos pré-climatéricos dos frutos inteiros para 1H e H, e também na casca para HX.





No grupo Etileno (20E) da figura 31, os compostos que se agruparam por variação semelhante foram B3B, B1M, E, HNV e AP. Com exceção de AP que teve maior expressão em frutos inteiros pré-climatérios, os demais mostraram maior expressão no grupamento de amostras do último dia de análise, que formou um agrupamento de maior similaridade. Os compostos com menor similaridade, apresentando padrão de expressão diferenciado dos demais foram IAB e IAA, semelhantes entre si, e H, 1H, 2H, e HX, que formaram um grupamento por terem maior expressão em casca e polpa préclimatéricas.





Com relação a formação de grupamentos no grupo 13°C (Figura 32), os voláteis que se agruparam com maior similiaridade entre si foram B3B, B1M, HNV, E, AP, EA e B23, apresentando menor expressão na casca. Os compostos com menor similaridade com os demais foram IAA, BBE e IBB, com similaridade entre si, por apresentarem maior expressão em amostras mais maduras (último dia de análise), e H e HX.



Figura 33 - Análise de *Heatmap* e agrupamento hierárquico dos compostos voláteis dos frutos inteiros, polpa e cascas de bananas cv. Grand Naine tratadas com etileno exógeno armazenadas a 13°C (13E). Os números representam os dias pós-tratamento e as letras "a", "b" e "c" representam as replicatas de cada amostra analisada. As elipses destacam grupos de compostos e amostras com variação semelhante.

E por fim, a análise de *heatmap* e de formação de grupamentos hierárquicos do grupo Etileno a 13°C (13E) na figura 30 mostrou uma maior similaridade entre os voláteis AP, E, EA, B3B, B23 e IBV; e menor similaridade com os demais AB, H e HX.

A formação de grupamentos entre os compostos pode indicar que os compostos de um mesmo grupamento podem ser regulados por uma via, ou até mesmo por um mesmo receptor de etileno. Os compostos H, 1H, 2H e HX constantemente aparecem agrupados entre si, e apresentando menor similaridade entre os demais. Isso porque são compostos associados ao aroma de frutos verdes, e tem a sua expressão diminuída no início do climatério.

Aldeídos C6 como hexanal (H) e (E)-2-hexenal (2H) resultam da atividade da enzima LOX em 13-hidroperóxido de ácido linolênico e linoleico (GALLIARD; MATTHEW, 1977). A expressão de *Ban*LOX declina durante o amadurecimento do fruto (YANG *et al.*, 2011b) assim como com a produção de aldeídos C6.

Comparando os resultados obtidos com as análises dos aromas das bananas cv. Grand Naine com os resultados anteriores obtidos com os frutos da cv. Nanicão observou-se que o armazenamento em baixas temperaturas não teve o mesmo efeito na cv. Grand Naine. O frio reduziu a concentração relativa dos compostos na cv. Grand Naine assim como na cv. Nanicão, e alguns não foram detectados, como B1M e HNV, porém estes são ésteres que não são considerados na literatura como essenciais para o aroma característico da banana.

Com relação ao éster acetato de isoamila (IAA) e seu precursor álcool isoamílico (IAO), ambos foram detectados nas amostras dos grupos armazenados a 13°C do cv. Grand Naine, apesar de suas concentrações relativas terem sido menores em relação às amostras armazenadas a 20°C. Esse resultado indica que as bananas do cv. Grand Naine devem ser menos susceptíveis ao frio do que as bananas do cv. Nanicão, no que concerne a produção de compostos voláteis.

A disponibilidade de substrato tem sido considerada o fator determinante na composição de ésteres de cadeia ramificada a partir do metabolismo de aminoácidos e ácidos graxos durante o amadurecimento (WYLLIE; FELLMAN, 2000), e foi demonstrado que antes do início natural da formação dos ésteres, o fruto já apresenta toda a maquinaria necessária para a sua síntese (JAYANTI *et al.*, 2002). Assim, é possível que o frio possa afetar a produção do precursor do acetato de isoamíla, o álcool isoamílico, podendo ter afetado as enzimas envolvidas na sua síntese, suprimindo a expressão do gene. Em tomate, baixas temperaturas reduziram a expressão da enzima álcool desidrogenase (ADH) e álcool aceti-Itransferase (AAT) (RUGKONG *et al.*, 2011). O gene BanAAT é um importante ponto de regulação transcripcional do etileno para a produção do aroma de banana, sendo considerado um gene relacionado ao estresse (YANG *et al.*, 2011b). Da mesma maneira a ADH atua na formação de álcoois, seguido pela via da LOX ou glicólise, e, portanto, também pode ser um ponto de regulação da produção de compostos voláteis (DEFILIPPI *et al.*, 2009) afetado pelo armazenamento com baixas temperaturas. Porém, os resultados encontrados neste estudo, principalmente os da cv. Nanicão, não podem ser explicados somente com a diminuição da expressão do gene AAT, já que após a supressão antisense do gene da AAT em melões, o conteúdo de ésters do aroma diminuiu drasticamente (78%), porém com aumento do conteúdo de aldeído e álcool (SHAN *et al.*, 2012), o que não ocorreu nas bananas, que apresentaram ambos éster e álcool diminuídos.

A biossíntese de ésteres foi correlacionada temporalmente a biossíntese de etileno endógeno (JAYANTI *et al.*, 2002). Temperaturas de armazenamento abaixo de 11°C podem diminuir a capacidade de ligação do etileno aos receptores de membrana em banana, devido a alterações da permeabilidade da membrana (JIANG *et al.*, 2004b). Assim, uma possível explicação para os resultados com a cv. Nanicão é de que uma percepção diminuída do etileno pode ocorrer em temperaturas consideradas seguras, como o armazenamento a 13°C para bananas. Essa percepção diminuída não seria tão drástica como na lesão por frio, quando há uma perda da função das proteínas associadas da membrana, mas somente causando uma dessincronia de eventos essenciais para a biossíntese dos aromas voláteis. Essa dessincronia não seria limitada a biossíntese de aromas, mas também a outros processos relacionados ao amadurecimento, como foi verificado na mudança de cor da casca no grupo 13E antes do aumento da síntese de etileno endógeno.

Além disso, a partir dos resultados encontrados há a indicação de que os diferentes tratamentos pós-colheita afetam diferentemente a biossíntese de voláteis, já que diferentes compostos foram afetados por diferentes tratamentos. Assim, apesar do etileno ser um importante fator na produção e regulação do aroma, deve haver outros fatores que desempenham o mesmo trabalho. Essa ultima hipótese também foi levantada por Griffiths *et al.* (1999) estudando a modulação da expressão de LOX em tomates.

4.3. Análise da Expressão Gênica dos Receptores de Etileno

O amadurecimento de frutos é um processo geneticamente programado, envolvendo a expressão diversos genes e a coordenação de mudanças bioquímicas e fisiológicas. Esse processo é estreitamente regulado (GIOVANONNI, 2001) e provavelmente envolve a indução ou inibição da expressão de genes específicos (MANRIQUE-TRUJILLO *et al.,* 2007).

Para entender melhor os processos envolvidos no amadurecimento de frutos climatéricos, como a banana, as mudanças no perfil de transcrição de genes relacionados ao amadurecimento tem sido analisadas em diferentes situações fisiológicas, pré-climatérico e pós-climatérico, assim como expondo os frutos a tratamentos pós-colheita.

Como gene constitutivo, para a normalização dos resultados foi escolhido o transcrito do gene da actina. Outros grupos que estudaram a expressão gênica em bananas também escolheram este mesmo gene para esta função na análise por qPCR (CHOUDHURY *et.al.*, 2008).

Até o momento foram analisados somente a expressão dos receptores de etileno nos vários estágios de amadurecimento nas amostras do grupo controle e do grupo frio (Figura 31). As análises das amostras dos outros grupos (etileno e 1-MCP) terão de ser repetidas por problemas nas análises que até o momento não foram solucionados.



Figura 34 - Expressão relativa dos receptores de etileno (ERS1, ERS2, ERS3 e ETR1) ao longo do amadurecimento e quando expostos ao frio. Resultados de triplicata de extração e triplicata de análise (n=9). A barra de erros corresponde ao desvio padrão. As siglas estão descritas no item Material e métodos, figura 6, página 23.

Com a técnica de qPCR é possível somente avaliar o acúmulo relativo de transcritos de mRNA de genes, não significando uma avaliação da expressão real dos mesmos, já que podem ocorrer regulações pós transcricionais que não resultam na efetiva presença dos produtos da tradução, que no caso deste estudo são os receptores de etileno. Para uma melhor idéia do nível dos receptores de etileno presente no tecido seria necessário analisar, por exemplo, o nível protéico de cada receptor. Porém, para tal identificação são necessários anticorpos que reconheçam cada um dos receptores especificamente, 0 que ainda não há disponível no mercado. Ο desenvolvimento destes anticorpos para as variedades de receptores de etileno em banana são objetivos futuros do grupo de pesquisa no qual este estudo esta inserido.

A análise do acumulo de transcritos de mRNA possibilita avaliar mudanças na transcrição dos genes que ocorrem no processo de amadurecimento ou ocasionadas pelos tratamentos, podendo assim levar a esclarecimentos sobre o mecanismo que regula a percepção ao etileno.

Ao analisar o acúmulo de transcritos dos receptores, deve-se levar em consideração o modelo inverso de transdução do sinal que prevê que a resposta do etileno em magnitude e sensibilidade aumenta quando o numero de receptores diminui, e da mesma maneira, quando o numero de receptores aumenta há uma perda de sensibilidade (BINDER, 2008)

No grupo controle, todos os receptores apresentaram padrões diferentes de amplificação. ERS2 e ETR1 apresentaram um aumento no acumulo de transcritos nos estágios pós-climatéricos, porém com aumento mais expressivo no estágio pós-climatérico–II. Esse resultado pode indicar que ERS1 esteja envolvido com processos ligados a processos mais tardios do amadurecimento, já que a sensibilidade a etileno dos outros receptores está diminuída. Manrique-Trujillo *et al.*(2007) encontrou que genes relacionados a processos de morte celular programada, como degradação protéica, que tem maior expressão antes do estágio de maior maturação e queda de expressão no ultimo ponto analisado.

O ERS2 e ETR1 apresentaram o mesmo perfil de expressão no grupo controle, com redução no acumulo de mRNA nos estágios pré-climatéricos e climatérico e um acumulo maciço no estágio pós-climatérico – II. Possivelmente eles possam apresentar a formação de um agrupamento, ou sobreposição funcional. Ambos apresentam maior resposta ao etileno nos estágios pré-climatéricos e climatérico, sugerindo uma maior participação nos processos envolvidos no amadurecimento.

Binder (2008) sugere que uma resposta ao etileno pode ocorrer quando 0,1% dos receptores estejam ligados.

Sabe-se que o resfriamento pode provocar mudanças em membranas celulares, por alterar a sua fluidez, primariamente. Como os receptores de etileno estão predominantemente localizados na membrana do retículo endoplasmático (CHEN *et al.,* 2002; WANG *et al.,* 2006b; ZHONG *et al.,* 2008),

mudanças nas propriedades fisiológicas das membranas celulares podem afetar a percepção e sensibilidade ao etileno (RUGKONG *et.al.*, 2011).

Rugkong *et al.* (2011) observaram que o armazenamento de tomates sob refrigeração alterou a expressão de diversos genes relacionados ao amadurecimento, inclusive os receptores de etileno.

Tanto Wang et al. (2006a) quanto Choudhury et al. (2008) observaram uma diminuição no acumulo de transcritos de mRNA de genes relacionados ao amadurecimento em períodos pré-climatéricos, quando os frutos foram expostos ao frio. É possível que tal comportamento esteja associado a diminuição da expressão de receptores de etileno como a observada nesse estudo, uma vez que esta redução terá implicações na sensibilidade ao hormônio.

As alterações temporais observadas no padrão de expressão dos receptores podem estar correlacionadas também a modificações na produção dos compostos voláteis formadores do aroma da banana.

A possível diminuição da sensibilidade ao etileno observada em função do aumento de ERS1 e de ERS3 no período climatérico do grupo frio, evidenciados pelo aumento da transcrição dos receptores em relação ao controle, sugere que um dos dois receptores, ou os dois, possam estar ligados a regulação da via de biossíntese de acetato de isoamila, já que este composto foi o mais afetado.

Além da diminuição da expressão no climatério (CI) para os genes ERS1 e ERS3, o frio também afetou a resposta ao etileno no período PO-I através do aumento de expressãpo do recpetor ERS2, porém não foi possível relacionar a nenhum evento em específico da produção de aromas, apesar de sua clara participação nos processos envolvidos no amadurecimento, reforçando a ideia de sobreposição de função entre o ERS2 e ETR1.

Além disso, o frio diminuiu o acumulo de transcritos de uma maneira geral, causando assim um aumento a sensibilidade ao etileno em momentos em que a sensibilidade deveria estar diminuída. Esse resultado corrobora com a idéia de uma dessincronia de eventos no amadurecimento causado pelo armazenamento em baixas temperaturas. Apesar do aumento da sensibilidade ao etileno, os frutos armazenados em baixas temperaturas não amadurecem. Isso indica a possibilidade de outros fatores estarem funcionando como inibidores do amadurecimento além do etileno. Um desses fatores é a expressão do fator de transcrição RIN, que parece ser central para a regulação do amadurecimento, e atua na regulação da expressão de genes tanto dependentes de etileno quanto independentes de etileno (FUJISAWA *et al.*, 2012). Sabe-se que o fator de transcrição RIN regula positivamente a expressão de LOX (FUJISAWA *et al.*, 2012), ADH e HPL (QIN *et al.*, 2012), e Rugkong *et al.* (2011) observou em tomates uma diminuição da expressão de RIN quando os frutos foram armazenados em baixas temperaturas.

El-Sharkawy *et al.* (2003) estudou a expressão diferencial dos receptores do etileno em pêras, que necessitam da exposição ao frio para apressar o amadurecimento, e observou um aumento da expressão de ETR1 pelo tratamento com frio.

Yang *et al.* (2011a) estudou a expressão diferencial dos receptores de etileno em bananas com o aumento de temperatura e quando tratadas com 1-MCP, e verificou que o aumento da temperatura aumentou a expressão de ERS2 e ERS3, e o tratamento com 1-MCP diminuiu a expressão dos mesmos.

Não foram encontrados estudos correlacionando os receptores de etileno com a biossíntese de compostos voláteis em frutos, evidenciando a importância deste estudo para o entendimento da regulação da biossíntese do aroma.

5. CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos foi possível observar que tratamentos pós-colheita afetam processos relacionados ao amadurecimento, entre eles a biossíntese do aroma.

Observou-se uma mudança no perfil aromático dos frutos ao longo do amadurecimento, havendo uma significativa diferença entre as amostras préclimatéricas e pós-climatéricas, reforçando a ideia de que o etileno é um dos fatores que regulam os processos ligados a biossíntese de aromas de banana.

A exposição ao frio diminuiu a produção de compostos voláteis, porém afetou diferentemente duas variedades de bananas estudadas. Especificamente em relação a biossíntese de aromas, bananas da cv. Nanicão apresentaram uma maior susceptibilidade ao frio, não sendo detectados compostos importantes como acetato de isoamíla, álcool isoamílico e butirato de isobutila, entre outros. O mesmo não ocorreu com bananas da cv. Grand Naine, onde esses compostos foram detectados embora em menor quantidade do que nos frutos controle.

No estudo da expressão diferencial dos receptores de etileno, ERS1 e ERS3 podem estar correlacionados com a biossíntese de ésteres, como acetato de isoamila, ou ainda relacionado a biossíntese de precursores como álcool isoamílico, pois apresentaram um acumulo de transcritos aumentado pelo frio no período climatérico.

O tratamento com etileno adiantou o amadurecimento dos frutos, porém não se diferenciando do perfil de compostos voláteis do grupo controle das bananas cv. Nanicão, e nos frutos da cv. Grand Naine se diferenciando somente no último dia, quando as amostras estavam completamente maduras.

O tratamento com 1-MCP provocou um atraso na formação dos compostos voláteis em relação ao aumento da produção endógena de etileno, porém o perfil final observado foi similar ao do grupo controle.



Figura 35 – Fluxograma esquemático da amostragem das bananas cv. Nanicão.

ANEXO II



Figura 36 – Esquema com o cronograma das análises realizadas no grupo controle a 20°C de bananas cv. Nanicão.



Figura 37 - Esquema com o cronograma das análises realizadas no grupo armazenado a 13°C de bananas cv. Nanicão.



Figura 38 - Esquema com o cronograma das análises realizadas no grupo 1-MCP de bananas cv. Nanicão.



Figura 39 - Esquema com o cronograma das análises realizadas no grupo etileno de bananas cv. Nanicão.



Figura 40 – Fluxograma esquemático dos tratamentos realizados nas bananas cv. Grand Naine.



Figura 41 - Esquema com o cronograma das análises realizadas no grupo controle 20°C de bananas cv. Grand naine.



Figura 42 - Esquema com o cronograma das análises realizadas no grupo 13°C de bananas cv. Grand naine.



Figura 43 - Esquema com o cronograma das análises realizadas no grupo etileno de bananas cv. Grand naine



Figura 44 - Esquema com o cronograma das análises realizadas no grupo etileno a 13°C de bananas cv. Grand naine.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADÃO, R.C.; GLÓRIA, B.A. Bioactive amines and cabohydrate changes during ripening of 'Prata' banana (*Musa acuminata* X *M. balbisiana*). Food Chem.
 V. 90, n. 4, p. 705-711, 2005)
- AGRIANUAL 2000. Anuário da Agricultura Brasileira. São Paulo:FNP Consultoria & Comércio. Ed. Argos. 516p.
- AGRIANUAL 2012. Anuário da Agricultura Brasileira. São Paulo : FNP Consultoria & Comércio. Ed. Argos. 512p.
- ALEXANDER, L., GRIERSON, D. Ethylene biosynthesis and action in tomato: a model for climacteric fruit ripening. J. Exp. Bot., v.53, n.377, p.2039-2055, 2002.
- ARÊAS, J.A.G., LAJOLO, F.M. Starch transformation during banana ripening .1.
 The phosphorylase and phosphatase behavior in *Musa acuminata*. J. Food
 Biochem., Trumbull, v.5, n.1, p.19-37, 1981.
- ARORA, A. Ethylene receptors and molecular mechanism of ethylene sensitivity in plants. **Current Science**, V. 89, n. 8, 25, 2005
- ARVANITOYANNIS, I.S., MAVROMATIS, A. Banana cultivars, cultivation practices, and physicochemical properties. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. V.49, n.2, p.113-135, 2009.
- BAI, J.; BALDWIN, E.A.; IMAHORI, Y.; KOSTENYUK, I.; BURNS, J.; BRECHT, J.K. Chilling and heating may regulate C6 volatile aroma production by different mechanisms in tomato (*Solanum lycopersicum*) fruit. Postharvest Biology and Technology, v. 60, p. 111-120, 2011.
- BAUCHOT, A. D.; MOTTRAM, D. S.; DODSON, A. T.; JOHN, P. Effect of Aminocyclopropane-1-carboxylic Acid Oxidase Antisense Gene on the Formation of Volatile Esters in Cantaloupe Charentais Melon (Cv. Vedrandais). J. Agric. Food Chem. 1998, v. 46, 4787-4792.
- BERGMEYER, H.U., BERNT, E. D-glucose. Determination with glucose oxidase and peroxidase. In: BERGMEYER, H.U., GAWEHN, K., eds.

As referências bibliográficas estão de acordo com a norma NBR6023/2002 preconizada pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT).

Methods of enzymatic analysis. 2.ed. New York: Academic Press, 1974, v.2, p.1212-1215.

- BIERHALS, J.D.; LAJOLO, F.M.; CORDENUNSI, B.R.; NASCIMENTO, J.R.O. Activity, cloning and expression of an isoamylase-type starch-debranching enzyme from banana fruit. J. Agric. Food. Chem. V.52, p.7412-7418, 2004.
- BINDER, B.M. The ethylene receptors: Complex perception for a simple gas. **Plant Science**, v.175, p.8-17, 2008.
- BOUDHRIOUA, N.; GIAMPAOLI, P.; BONAZZI, C. Changes in aromatic components of banana during ripening and air-drying. Lebensm.-Wiss. u.-Technol. V. 36, p. 633–642, 2003.
- CHEN,Y.; RANDLETT, M. D.; FINDELL, J. L.; SCHALLER, G. E. Localization of the Ethylene Receptor ETR1 to the Endoplasmic Reticulum of Arabidopsis.
 J. Biol. Chem., v. 277, n.22, p. 19861-19866, 2002.
- CHEN, Y., ETHERIDGE, N., SCHALLER, G.E. Ethylene signal transduction. Annals Bot. v.95, n.6, p. 901-915, 2005.
- CHOUDHURY, S.R.; ROY, S.; SENGUPTA, D.N. Characterization of transcriptional profiles of MA- ACS1 and MA-ACO1 genes in response to ethylene, auxin, wounding, cold and different photoperiods during ripening in banana fruit. **J. Plant Physiol**. V. 165, p. 1865-1878, 2008.
- CORDENUNSI, B.R.; LAJOLO, F.M. Starch breakdown during banana ripening: sucrose synthase and sucrose phosphate synthase. J. Agric. Food Chem. V. 43, p.347-351, 1995.
- DEFILIPPI, B.G.; KADER, A.A.; DANDEKAR, A.M. Apple aroma: alcohol acyltransferase, a rate limiting step for ester biosynthesis, is regulated by ethylene. **Plant Science**, v. 168, p. 1199-1210, 2005.
- DOMÍNGUEZ, M.; VENDRELL, M. Effect of ethylene treatment on ethylene production, EFE activity and ACC levels in peel and pulp of banana fruit. **Postharvest Biology and Technology** v. 4, p.167-177, 1994.
- EL-SHARKAWY, I., JONES, B., LI, Z.G., LELIEVRE, J.M., PECH, J.C., LATCHE, A. Isolation and characterization of four ethylene perception

elements and their expression during ripening in pears (*Pyrus communis* L.) with/without cold requirement. **J. Exp. Bot.**, v.54, n.387, p.1615-1625, 2003.

- EUROFINS. MWG OPERON. Oligo Analysis Tool. Disponível em: http://www.operon.com/technical/toolkit.aspx? Acesso em: 01 de Setembro de 2011.
- FLORES, F.; YAHYAOUI, F.E.; BILLERBECK, G.; ROMOJARO, F.; LATCHÉ, A.; BOUZAYEN, M.; PECH, J.; AMBID, C. Role of ethylene in the biosynthetic pathway of aliphatic ester aroma volatiles in Charentais Cantaloupe melons. J. Exp. Bot. v.53, n.367, p.201-206, 2002.
- FUJISAWA, M.; SHIMA, Y.; HIGUCHI, N.; NAKANO, T. KOYAMA, Y.; KASUMI, T.; ITO, Y. Direct targets of the tomato-ripening regulator RIN identified by transcriptome and chromatin immunoprecipitation analyses. **Plant**, v. 235, p.1107-1122, 2012.
- GALLIARD, T.; MATTHEW, J.A. Lipoxygenase-mediated cleavage of fatty acids to carbonyl fragments in tomato fruits. Phytochemistry, v.16, n.3. p.339-343, 1977.
- GIOVANNONI, J. Molecular biology of fruit maturation and ripening. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.**, v.52, p. 725-749, 2001
- GOLDENBERG, L.; FEYGENBERG, O.; SAMACH, A.; PESIS, E. Ripening attributes of new passion fruit line featuring seasonal non-climacteric behavior. J. Agric. Food Chem., vol.60, p.1810-1821, 2012
- GOLDING, J.B.; SHEARER, D.; WYLLIE, S.G.; McGLASSON, W.B. Application of 1-MCP and propylene to identify ethylene-dependent ripening processes in mature banana fruit. **Postharvest Biol. Technol**, v.14, p.87-98, 1998.
- GONZÁLEZ-AGËRO, M.; TRONCOSO, S.; GUDENSCHWAGER, O.; CAMPOS-VARGAS, R.; MOYA-LÉON, M.; DEFILLIPI, B. Differential expression levels of aroma-related genes during ripening of apricot (*Prunus armeniaca* L.) **Plant Physiol. Biochem**. V. 47, p.435-440, 2009.

- GRIFFITHS, A.; BARRY, C.; ALPUCHE-SOLIS, A.G.; GRIERSON, D. Ethylene and developmental signals regulate expression of lipoxygenase genes during tomato fruit ripening. J. Exp. Bot. v. 50, n.335, p.793-798, 1999.
- GSC. The Good Scents Company. Disponível em: <u>http://www.thegoodscentscompany.com/index.html</u>. Acesso em 01 de dezembro de 2012.
- GUO, H., ECKER, J. R. The ethylene signaling pathway: new insights. **Curr. Opin. Plant. Biol.**, v.7, p.1-10, 2003
- HAYAMA, H.; SHIMADA, T.; FUJII, H.; ITO, A.; KASHIMURA, Y. Ethyleneregulation of fruit softening and softening-related genes in peach. J. Exp. Bot., v.57, n.15, p.4071-4077, 2006.
- HUA, J., MEYEROWITZ, E.M. Ethylene responses are negatively regulated by a receptor gene family in *Arabidopsis thaliana*. **Cell**, v.94, n.2, p.261-271, 1998.
- INABA, A.; LIU, X.; YOKOTANI, N.; YAMANE, M.; LU, W.; NAKANO, R.; KUBO, Y. Differential feedback regulation of ethylene biosynthesis in pulp and peel tissues os banana fruit. J. Exp. Bot. v.58, n.5, p.1047-1057, 2007.
- JAYANTY, S.; SONG, J.; RUBISNTEIN, N.M.; CHONG, A.; BEAUDRY, R.M. Temporal relationship between ester biosynthesis and ripening events in bananas. J. Am. Soc. Hort. Sci. v. 127, n.6, p.998-1005, 2002.
- JESUS, S.C.; FOLEGATTI, M.I.S.; MATSUURA, F.C.A.; CARDOSO, R.L. Caracterização física e química de frutos de diferentes genótipos de bananeira. Bragantia, v.63, n.3, p.315-323, 2004.
- JIANG, Y.M., JOYCE, D.C., MACNISH, A.J. Extension of the shelf life of banana fruit by 1-methylcyclopropene in combination with polyethylene bags. **Postharvest Biol. Technol.**, v.16, n.2, p.187-193, 1999.
- JIANG, W.; ZHANG, M.; HE, J.; ZHOU, L. Regulation of 1-MCP-treated banana fruit quality by exogenous ethylene and temperature. Food Sci. Technol. Int. v. 10, p.15-20, 2004a.

- JIANG, Y.; JOYCE, D.C.; JIANG, W.; LU, W. Effects of chilling temperatures on ethylene binding bu banana fruit. Plant Growth Regulation. V.43, p.109-115, 2004b.
- JORDÁN, M.J.; TANDON, K.; SHAW, P.E.; GOODNER, K.L. Aromatic profile of aqueous banana essence and banana fruit by gás chromatography-mass spectrometry (CG-MS) and gas chromatography-olfactometry (CG-O). J. Agric. Food Chem. V. 49, p.4813-4817, 2001.
- KENDRICK, M.D.; CHANG, C. Ethylene signaling: new levels of complexity and regulation. **Current Opinion in Plant Biology** V:11, p. 479-485, 2008.
- KLEE, H.J. Control of ethylene-mediated processes in tomato at the level of receptors. J. Exp. Bot., v.53, n. 377, p.2057-2063, 2002.
- KLEE, H.J., CLARK, D.G. Ethylene signal transduction in fruit and flowers. In: Plant Hormones: Biosynthesis, Signal Transduction and Action! Ed. Peter J. Davies, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, p. 369-390, 2005.
- LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C}_{t}$ method. **Methods** v.25, p.402-408, 2001.
- LOHANIS,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 Bol. Technol**., v.31, p.119-126, 2004.
- LÓPEZ-GÓMEZ, R., GÓMEZ-LIM, M.A. A method for extracting intact RNA from fruits rich in polysaccharides using ripe mango mesocarp. **Hortscience**, v.27, n.5, p.440-442, 1992.
- MACKU, M.; JENNINGS, W.G. Production of volatiles by ripening bananas. J. Agric. Food. Chem. V. 35, p.845-848, 1987.
- MAINARDI, J.A.; PURGATTO, E.; VIEIRA JR., A.; BASTOS, W.A.; CORDENUNSI, B.R.; NASCIMENTO, J.R.; LAJOLO, F.M. Effects of ethylene and 1-methylciclopropene (1-MCP) on gene expression and activity of α-1,4-glucan-phosphorylase during banana ripening. J. Agric. Food Chem. V.54, p.7294-7299, 2006.

- MANRIQUE-TRUJILLO, S.M.; RAMÍREZ-LÓPEZ, A.C.; IBARRA-LACLETTE, E.; GÓMEZ-LIM, M.A. identification of genes differentially expressed during ripening of banana. J. Plant Physiol. V. 164, p.1037-1050, 2007.
- MARRIOTT, J., PALMER, J.K. Bananas physiology and biochemistry of storage and ripening for optimum quality. Crit. Rev. Food Sci. Nutr., v.13, n.1, p.41-88, 1980.
- MARRIOTT, J. ROBINSON, M., KARIKARI, K. Starch and sugar transformation during the ripening of plantains and bananas. J. Sci. Food. Agric. V.32, n.10, p.1021-1026, 1981.
- MARTY, I.; BUREAU, S.; SARKISSIAN, G.; GOUBLE, B.; AUDERGON, J.M.; ALBAGNAC, G. Ethylene regulation of carotenoid accumulation and carotenogenic gene expression in colour-contrasted apricot varieties (*Prunus armeniaca*). J. Exp. Bot., v.56, n.417, p.1877-1886, 2005.
- MAYR, D.; MARK, T.; LINDINGER, W.; BREVARD, H.; YERETZIAN, C. Breathby-breath analysis of banana aroma by proton transfer reaction mass spectrometry. **Int. J. Mass Spect**. V.223-224, p.743-756, 2003.
- MOTA, R.V.; CORDENUNSI, B.R.; NASCIMENTO, J.R.O.; PURGATTO, E.; ROSSETO M.R.M.; LAJOLO, F.M. Activity and expression of banana starch phosphorylases during fruit development and ripening. Planta, v.216, p.323-333, 2002.
- MOYA-LÉON, M.A.; VERGARA, M.; BRAVO, C.; MONTES, M.E.; MOGGIA, C. 1-MCP treatment preserves aroma quality of 'Packham's Triumph' pears during long term storage. **Postharvest Biology and Technology** v. 42, p. 185-197, 2006.
- NASCIMENTO JUNIOR, B.B.; REZENDE, C.M.; SOARES, A.G.; FONSECA, M.J.O. Efeito do 1-metilciclopropeno sobre a emissão dos ésteres voláteis de bananas ao longo do amadurecimento. Quim. Nova, v. 31, n.6, p.1367-1370, 2008.
- O'MALLEY, R.C., RODRIGUEZ, F.I., ESCH, J.J., BINDER, B.M., O'DONNELL, P.O., KLEE, H.J., BLEECKER, A.B. Ethylene-binding activity, gene

expression levels, and receptor system output for ethylene receptor family members from Arabidopsis and tomato. **Plant J.**, v.41, p.651–659, 2005

- ORTIZ, A.; GRAELL, LÓPEZ, M.L.; ECHEVERRÍA, G.; LARA, I. Volatile ester synthesising capacity in 'Tardibelle' peach fruit in response to controlled atmosphere and 1-MCP treatment. **Food Chem**. V. 123, p.698-704, 2010.
- PELAYO, C.; VILAS-BOAS, E.V.B.; BENICHOU, M.; KADER, A.A. Variability in responses of partially ripe bananas to 1-methylcycloprpene.**Postharvest Biology and Technology.** V. 28, p. 75-85, 2003.
- PÉREZ, A.G.; CERT, A.; RÍOS, J.J.; OLÍAS, J.M. Free and glycosidically bound volatile compounds from two banana cultivars: valery and pequeña enana.
 J. Agric. Food Chem., v.45, p.4393-4397, 1997.
- PÉREZ, A.G.; SANZ, C. Formation of fruit flavor. In: Brückner, B.; Wyllie, S. G.
 Fruit and Vegetable Flavour Recent Advances and Future Prospects.
 Woodhead Publishing. 2008. Cap. 4, pag. 41-70.
- PESIS, E.; ARIE, R.B.; FEYGENBERG, O.; VILLAMIZAR, F. Ripening of ethylene-pretreated bananas is retarded using modified atmosphere and vacuum packaging. HortScience, v.40, n.3, p.726-731, 2005.
- PESIS, E.; IBAÑEZ, A.M.; PHU, M.L.; MITCHAM, E.J.; EBELER, S.E.; DANDEKAR, A.M. Superficial Scald and bitter pit development in coldstored transgenic apples suppsuppressed ethylene biosynthesis. J. Agric. Food Chem. V.57, p.2786-2792, 2009
- PFAFFL, M.W.; HORGAN, G.W.; DEMPFLE, L. Relative expression software tool (REST[©]) for group comparision and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. Nucleic Acids Research, v.30, n. 9, 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.
- PURGATTO, E.; NASCIMENTO, J.R.O.; LAJOLO, F.M.; CORDENUNSI, B.R. The onset of starch degradation during banana ripening is concomitant to

changes in the content of free and conjugated forms of indole-3-acetic acid. **J. Plant Physiol**. V.159, p.1105-1111, 2002.

- QIN, G.; WANG, Y.; CAO, B.; WANG, W.; TIAN, S. Unraveling the regulatory network of the MADS box transcription factor RIN in fruit ripening. The Plant Journal, v.70, p.243-255, 2012.
- RODRIGUEZ, F.I., ESCH, J.J., HALL, A.E., BINDER, B.M., SCHALLER, G.E., BLEECKER, A.B. A copper cofactor for the ethylene receptor ETR1 from Arabidopsis. **Science**, v.283, n.5404, p.996-998, 1999.
- ROZEN, S.; SKALETSKY, H.J. In: Krawetz S, Misener S (eds) Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology. Humana Press, Totowa, NJ, pp 365-386, 2000. Disponível em : <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/</u> Acesso em: 01 de setembro de 2011.
- RUGKONG, A.; MCQUINN, R.; GIOVANNONI, J.J.; ROSE, J.K.C.; WATKINS,
 C.B. Expression of ripening-related genes in cold-stored tomato fruit.
 Postharvest Biology and Technology, v. 61; p. 1–14, 2011.
- SALMON, B.; MARTIN, G.J.; REMAUD, G.; FOUREL, F. Compositional and Isotopic studies of fruit flavours. Part I. The Banana aroma. Flavour and Flagrance Journal. V. 11, p.353-359, 1996
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F., MANIATIS, T. In: **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2.ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989, v.3.
- SARRY, J.; GÜNATA, Z. Plant and microbial glycoside hydrolases: volatile release from glycosidic aroma precursors. Food. Chem. V. 87, p.509-521, 2004.
- SCHWAB, W.; DAVIDOVICH-RIKANATI, R.; LEWINSOHN, E. Biosynthesis of plant-derived flavor compounds. **The Plant Journal**, v.54, p.712-732, 2008
- SHAN, W.; ZHAO, C.; FAN, J.; CONG, H.; LIANG, S.; YU, X. Antisense suppression of alcohol acetyltransferase gene in ripening melon fruit alters volatile composition. Scientia Horticulturae, v.139, p.96-101, 2012.

- 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. J. Sci. Food Agric. V.91, p.1511-1516, 2011.
- SHIOTA, H. New esteric components in the volatiles of banana fruit (*Musa sapientum* L.). J. Agric. Food Chem. V.41, p.2056-2062, 1993.
- THEOLOGIS, A., ZAREMBINSKI, T.I., OELLER, P.W., LIANG, X.W., ABEL, S. Modification of fruit ripening by suppressing gene-expression. Plant Physiol., v.100, n.2, p.549-551, 1992.
- TRESSL, R.; DRAWERT, F. Biogenesis of banana volatiles. J. Agr. Food Chem., vol.21, n.4, p. 560-565, 1973.
- TRESSL, R.; HOLZER, M.; APETZ, M. Biogenesis of volatiles in fruit and vegetables. 1975. Apud: PÉREZ, A.G.; SANZ, C. Formation of fruit flavor. In: Brückner, B.; Wyllie, S. G. Fruit and Vegetable Flavour - Recent Advances and Future Prospects. Woodhead Publishing. 2008. Cap. 4, pag. 41-70.
- UEDA, Y., WENDAKOON, S.K., IMAHORI, Y., ISHIMARU, M. Inibition of acetate ester biosynthesis in banana (*Musa sapientum* L.) fruit pulp under anaerobic conditions. J. Agric. Food Chem. V.52, n. 6, p.1615-1620, 2004.
- UNTERGASSER, A.; NIJVEEN, H.; RAO, X.; BISSELING, T.; GEURTS, R.; LEUNISSEN, J.A.M. Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3 Nucleic Acids Research 2007 35: W71-W74; doi:10.1093/nar/gkm306 Disponível em: . Acesso em: 01 de setembro de 2011.
- VERVERIDIS, P.; JOHN, P. Complete recovery *in vitro* of ethylene-forming enzyme activity. **Phytochemistry**, v.30, n.3, p.725-727, 1991.
- XI, W.; ZHANG, B.; SHEN, J.; SUN, C.; XU, C.; CHEN, K. Intermittent warming alleviated the loss of peach fruit aroma-related esters by regulation of AAT during cold storage. **Post. Bio. Tech.**, vol.74, p.42-48, 2012.

- XIA, J., MANDAL, R., SINELNIKOV, I., BROADHURST, D., AND WISHART, D.S. MetaboAnalyst 2.0 - a comprehensive server for metabolomic data analysis . Nucl. Acids Res., 2012. Disponível em : <u>http://www.metaboanalyst.ca/MetaboAnalyst/faces/Home.jsp</u> Acesso em 07 de janeiro de 2013.
- XIA, J., PSYCHOGIOS, N., YOUNG, N. AND WISHART, D.S. MetaboAnalyst: a web server for metabolomic data analysis and interpretation. Nucl. Acids Res. V. 37, W652-660. 2009.
- YANG, S.; CHEN, J.; YU, W.; KUANG, J.; CHEN, W.; LI, X.; LU, W. Expression of genes associated with ethylene-signalling pathway in harvested banana fruit in response to temperature and 1-MCP treatment. J. Sci. Food Agri., v.91, p.650-657, 2011a.
- YANG, X.; SONG, J.; FILLMORE, S.; PANG, X.; ZHANG, Z. Effect of high temperature on color, chlorophyll fluorescence and volatile biosynthesis in green-ripe banana fruit. Post. Bio. Tech. v.62, p.246-257, 2011b
- YANG, S.F., HOFFMAN, N.E. Ethylene biosynthesis and its regulation in higher-plants. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol., v.35, p.155-189, 1984.
- WANG, Y.; LU, W.; JIANG, Y.; LUO, Y.; JIANG, W.; JOYCE, D. Expression of ethylene-related expansin genes in cool-stored ripening banana fruit. Plant Sci. v. 170, p.962-967, 2006a.
- WANG, W.; ESCH, J.J.; SHIU, S.; AGULA, H.; BINDER, B.M.; CHANG, C.; PATTERSON, S.E.; BLEECKER, A.B. Identification of important regions for ethylene binding and signaling in the transmembrane domain of the ETR1 ethylene receptor of *Arabidopsis*. **The Plant Cell**, V. 18, P. 3429-3442, 2006b.
- WYLLIE, S.G., FELLMAN, J.K. Formation of volatile branched chain esters in bananas (Musa sapientum L.). J. Agric. Food. Chem. V.48, n.8, p.3493-3496, 2000.
- ZHANG, B.; XI, W.; WEI, W.; SHEN, J.; FERGUSON, I.; CHEN, K. Changes in aroma-related volatiles and gene expression during low temperature

storage and subsequent shelf-life of peach fruit. **Post. Bio. Tech**., v.60, p.7-16, 2011.

- ZHONG, S.; LIN, Z.; GRIERSON, D. Tomato ethylene receptor-CTR1 interactions: visualization of NEVER-RIPE interactions with multiple CTRs at the endoplasmic reticulum. **J. Exp. Bot.**, v. 59, p.965-972, 2008.
- ZUKER, M. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. Nucleic Acids Res. V. 31 n. 13, p.3406-3415, 2003. Disponível em: <u>http://mfold.rna.albany.edu/?q=mfold/RNA-Folding-Form</u>. Acesso em: 01 de setembro de 2011.