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

Armazenamento a baixas temperaturas de diferentes cultivares de
bananas: efeito nos atributos de qualidade

Heliofábia Virgínia de Vasconcelos Facundo

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientador:
Prof. Titular Franco Maria Lajolo

São Paulo
2013

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

Armazenamento a baixas temperaturas de diferentes cultivares de
bananas: efeito nos atributos de qualidade

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

Heliofábia Virgínia de Vasconcelos Facundo

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientador:
Prof. Titular Franco Maria Lajolo

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.

Facundo, Heliofábia Virgínia de Vasconcelos
F147a Armazenamento a baixas temperaturas de diferentes cultivares
de bananas : efeito nos atributos de qualidade / Heliofábia
Virgínia de Vasconcelos Facundo. -- São Paulo, 2013.
180p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da
Universidade de São Paulo. Departamento de Alimentos e Nutrição
Experimental

Orientador : Lajolo, Franco Maria

1. Bromatologia de alimentos 2. Bioquímica dos alimentos
I. T. II. Lajolo, Franco Maria, orientador.

641 CDD

Heliofábia Virgínia de Vasconcelos Facundo

Armazenamento a baixas temperaturas de diferentes cultivares de
bananas: efeito nos atributos de qualidade

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Prof. Titular Franco Maria Lajolo
orientador/presidente

Carlos Alberto Labate

Carlos Tadeu dos Santos Dias

João Roberto do Nascimento

Deborah dos Santos Garruti

São Paulo, 06 de maio de 2013.

À minha mãe Wilsa de Vasconcelos, hoje, em seu aniversário, minha oferta de amor e gratidão. Por me instruir a percorrer o caminho da ética e da honestidade.

Ao meu pai Edézio Facundo, pelo cuidado, dedicação e esforço sem medidas à minha formação intelectual desde a minha mais tenra idade.

Ao meu super-bônus Edison Cunico, pelo respeito, dedicação, paciência, cuidado, cumplicidade e compreensão. Pelo amparo nos momentos mais difíceis dessa caminhada.

Ao meu irmão Eliaquim, pelo amor, saudade e compreensão pela minha ausência.

Ao sogrinho Luis Cunico e à sogrinha Elvira Cunico (*in memoriam*) por terem me recebido em sua família e em seus corações.

Aos amigos-melanina, Choc's e Lek, por serem "*amigos mais chegado que um irmão*".

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Franco Lajolo, pela proteção e bom humor em me receber e orientar neste estudo. Por não medir esforços para me ajudar, por confiar na minha capacidade e me dar liberdade nas tomadas de decisão para a realização deste projeto.

À Prof. Beatriz Cordenunsi, pela paciência (que não foi pouca), proteção, sabedoria e orientação em todos os momentos. Por apostar em mim, mesmo quando as circunstâncias pareceram contrárias. Por me ensinar a olhar a ciência com outros olhos.

Ao Prof. João Roberto, por me apresentar o mundo da proteômica, pela sua inteligência, conselhos e por me instigar a ser uma pensadora e não apenas uma repetidora de ideias. Pelo exemplo de companheirismo e postura irrepreensível.

À Dra Deborah Garruti, pelas longas conversas, disposição e preciosa ajuda desde o início dessa caminhada. Pela amizade, exemplo de leveza e bom senso científico.

À Prof. Adriana Mercadante e Poliana Gurak, pelo precioso auxílio e competência nas análises de carotenoides.

Ao Prof. Carlos Labate, por me receber e me permitir usar as instalações do laboratório Max Feffer de Genética de Plantas em Piracicaba-SP, pela atenção e incentivo nas análises de proteômica.

Ao Prof. Carlos Tadeu, pelas longas conversas e paciência em tirar as dúvidas de uma aluna apaixonada por estatística multivariada.

À Dra. Adriana Leme, Romênia e Bianca pela realização do sequenciamento dos peptídeos no Laboratório Nacional de Biociências (LNBio) em Campinas-SP, utilizando as instalações do Laboratório de Espectrometria de Massas de acordo com as propostas MAS-13925 e MAS-14008.

À Prof. Bernadette Franco, pelo exemplo de liderança, paciência e humanismo.

Aos colegas de laboratório Ana, Bruna, Claudinéia, Fernanda, Florence, Gabriela, Geovana, Jonathan, Juliana, Laís, Lorenzo, Pimentinha, Regina, Renatinha, Roberta, Sabrina e Victor, pelo companheirismo e aprendizado nesta jornada.

Aos técnicos JP Fabi, Lúcia, Marcia e Tania, pela imensa ajuda e auxílio nas análises e uso dos equipamentos do laboratório.

Aos funcionários da secretaria, Cléo, Edilson, Mônica e Roberta pelo auxílio e leveza em todos os momentos.

Aos motoristas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, João e Gérson, pela prontidão nas viagens realizadas para a CEAGESP, Piracicaba e Campinas.

Pelo apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (Edital Universal - Processo: 470813/2009-1).

À Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa (Processo 2009/14958-6, vigência 01/02/2010 a 30/04/2013), pelo orgulho de ter a melhor bolsa do país e pela reserva técnica que me auxiliou a fazer tudo que eu precisei e almejei neste período.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa durante o primeiro ano do curso.

À minha “afilhada de coração” Anna Clara Cunico Montel, pela ajuda nos desenhos da tese e dos artigos.

À minha prima Aldelane Facundo e ao “primo de coração” Zach Nichols pela ajuda e correções do inglês.

A Deus, por me guiar, iluminar os meus caminhos em todos os momentos e me fazer crer que nenhum fardo será maior do que eu possa carregar.

No outro lado do horizonte disseram-me que existia um grande tesouro. Durante a caminhada até a outra margem, encontrei seres humanos que foram como pedras preciosas em meu caminho. Com eles, me enriqueci e por eles fui impulsionado a continuar. E assim, antes da chegada percebi que eu estava "rico de muitos".

João Facundo (Teólogo)

Resumo

FACUNDO, H. V. V. **Armazenamento a baixas temperaturas de diferentes cultivares de bananas: efeito nos atributos de qualidade.** Tese de Doutorado, 2013, 172p. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Universidade de São Paulo, São Paulo.

A banana é altamente susceptível a injúrias causadas pelo frio, mas o efeito da refrigeração nos atributos que caracterizam a qualidade do fruto maduro é ainda pouco explorado. Neste trabalho, alguns desses atributos foram analisados em duas cultivares de banana escolhidas por sua diferença em relação à susceptibilidade ao frio: Nanicão e Prata. As duas cultivares foram armazenadas a baixas temperaturas (cv. Nanicão a 13 °C e cv. Prata a 13 °C e 10 °C) por 15 dias e o efeito do frio sobre os compostos voláteis responsáveis pelo aroma e sabor, índices de cor da casca, níveis de carotenoides, açúcares e amido foram analisados comparativamente durante a maturação dos frutos e o perfil de proteínas diferentemente abundantes foi analisado na cultivar Nanicão. Com o auxílio das ferramentas da estatística multivariada, verificou-se que a produção dos compostos voláteis é altamente sensível as baixas temperaturas. A cv. Prata apresentou uma maior resistência ao efeito negativo do armazenamento, mesmo armazenada a 10 °C. Na cv. Nanicão, as amostras maduras do grupo frio (13 °C) foram caracterizadas pela presença dos carotenoides majoritários devido ao fato de que as vias metabólicas que utilizam carotenoides terem sido afetadas pelo armazenamento em baixas temperaturas. Para a cv. Prata teve um efeito negativo com o armazenamento, com redução dos níveis de carotenoides tanto a 13 °C quanto a 10 °C. Em relação à cor da casca dos frutos não foi observado um efeito evidente nas amostras submetidas a baixas temperaturas. Pela análise proteômica, foi possível entender como o frio causou um impacto negativo na síntese de sacarose, uma vez que as proteínas mais afetadas foram associadas ao metabolismo de energia e de carboidratos.

Palavras-chave: banana cv. Nanicão, banana cv. Prata, estatística multivariada, frio, espectrometria de massas, tolerância.

Abstract

FACUNDO, H. V. V. **Storage at low temperatures of different banana cultivars: effect on quality attributes**. Tese de Doutorado, 2013, 172p. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Universidade de São Paulo, São Paulo.

Bananas are fruits highly susceptible to injuries caused by cold temperatures, but the effect of refrigeration on the attributes that characterize the quality of ripe fruit is still underexplored. In this work, some of these attributes were analyzed in two banana cultivars chosen for their difference in susceptibility to cold temperatures: Nanicão and Prata. Both cultivars were stored at low temperatures (cv. Nanicão at 13 °C and cv. Prata at 13 °C and 10 °C) for 15 days and the effect of the cold on the volatile compounds responsible for aroma, skin color index, levels of carotenoids, sugars, and starch were comparatively analyzed during fruit maturation and different abundant protein profiles of the Nanicão cultivar were analyzed. By using multivariate statistic tools, it was found that the production of volatile compounds is highly susceptible to low temperatures. However, cv. Prata showed greater resistance to the negative effects of storage even when stored at 10 °C. For cv. Nanicão, ripe samples from the cold group kept at 13 °C were characterized by the presence of majority carotenoids due to the fact that the metabolic pathways that use carotenoids were affected by the storage at such a low temperature. Conversely, cv. Prata experienced a negative effect with the storage, with reduced levels of carotenoids in both cold groups kept at 13 °C and 10 °C. In relation the skin color of the fruit, no effect on the samples held at low temperatures was observed. For proteomics analysis, it was possible to understand how the cold storage caused a negative impact on the synthesis of sucrose, since most of the affected proteins were associated with energy and carbohydrate metabolism.

Keywords: banana cv. Nanicão, banana cv. Prata, cold storage, multivariate statistics, mass spectrometry, tolerance.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	17
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	19
2.1. A cultura da bananeira.....	19
2.2. Alterações durante a maturação dos frutos.....	20
2.3. Compostos voláteis relacionados ao aroma e sabor.....	21
2.3.1 Compostos voláteis formados a partir de ácidos graxos.....	22
2.3.2 Compostos voláteis formados a partir do metabolismo de aminoácidos.....	24
2.3.3 Compostos voláteis derivados de terpenoides.....	25
2.3.4 Fenóis e compostos relacionados.....	26
2.4. Carboidratos.....	27
2.5. Regulação de vias metabólicas.....	30
2.6. Colorimetria.....	32
2.7. Quimiometria.....	34
3. OBJETIVOS.....	37
4. DESCRIÇÃO DOS CAPÍTULOS.....	38
5. CAPÍTULO 1.....	42
6. CAPÍTULO 2.....	64
7. CAPÍTULO 3.....	96
8. CAPÍTULO 4.....	130
9. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	158
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	160
APÊNDICES.....	166

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. As vias 9-LOX (A) e 13-LOX (B) do metabolismo do ácido linoleico. LOX = lipoxigenase; AAT = álcool aciltransferase; ADH = álcool desidrogenase; HPL = hidroperóxido liase; (Baseado em Osorio et al., 2010).....	23
Figura 2. Conversão enzimática da leucina em acetato de isoamila, composto de impacto na banana. (Baseado em Rodriguez-Amaya, 2003).....	25
Figura 3. Substratos de carotenóides (da esquerda) sofrem clivagem oxidativa para se obterem os derivados apocarotenoides (direita). (Baseado em Osorio et al., 2010).....	26
Figura 4. Representação esquemática das reações envolvidas na síntese e degradação de amido (A) no cloroplasto e sacarose (B) no citosol (Baseado em Osorio et al., 2010).....	28
Figura 5. Coordenadas do sistema espacial CIELAB (Baseado no manual Konika Minolta, com modificações).....	33
Figura 6. Interação entre as análises experimentais, estatística e o bom senso no momento da definição do planejamento experimental. (Baseado em Rodrigues e lemma, 2005, com modificações).....	35
Figura 1.1. Representação do isolamento dos compostos voláteis da banana do fruto inteiro (A) e polpa (B) pela técnica de microextração em fase sólida por <i>headspace</i> (HS-SPME).....	47
Figura 1.2. Cromatogramas previamente obtidos com o aumento da temperatura de isolamento dos voláteis por HS-SPME com fibra PDMS (polidimetilsiloxano).....	50
Figura 1.3. Superfície de resposta para o número de picos (A) e área total (B) obtida a partir do cromatograma do fruto inteiro na otimização das condições de isolamento dos voláteis da banana por HS-SPME.....	56
Figura 1.4. Superfície de resposta para o número de picos (A) e área total (B) obtida a partir do cromatograma da polpa na otimização das condições de isolamento dos voláteis da banana por HS-SPME.....	56
Figura 1.5. Cromatograma de frutos verdes (com 7 dias pós-colheita), obtido por GC-MS, com a identificação dos compostos voláteis majoritários do fruto inteiro (A) e polpa (B) de banana nas condições otimizadas.....	58
Figura 1.6. Cromatograma obtido por GC-MS, com a identificação dos compostos voláteis majoritários do fruto inteiro (A) e polpa (B) de banana madura nas condições otimizadas.....	59
Figura 2.1. Etileno e respiração (evolução de CO ₂) das bananas cv. Nanicao e cv. Prata durante o armazenamento em baixas temperaturas e maturação. Os desvios padrão da análise estão indicados pelas barras verticais (n = 4). As linhas tracejadas verticais delimitam o tempo em que os frutos do grupo frio permaneceram em baixas temperaturas.....	74

Figura 2.2. Produção de voláteis da polpa e do fruto inteiro de bananas das cultivares Nanicão e Prata durante o amadurecimento. Os desvios padrão da análise estão indicados pelas barras verticais (n = 2). As linhas tracejadas verticais delimitam o tempo em que os frutos do grupo frio permaneceram em baixas temperaturas. As setas indicam o pico de etileno.....	75
Figura 2.3. Número de compostos voláteis por grupo químico funcional nas amostras cv. Nanicão e Prata do fruto inteiro e polpa. Os desvios padrão da análise estão indicados pelas barras verticais.....	77
Figura 2.4. Análise de componentes principais dos compostos voláteis da banana cv. Nanicão. Código das amostras: PC = polpa do grupo controle (19 °C) na cor vermelha; PL = polpa do grupo frio (13 °C) na cor azul. C = fruto inteiro do grupo controle (19 °C), em cor-de-rosa; L = fruto inteiro do grupo frio (13 °C), na cor verde. Números de 1 a 24 = referem-se aos dias pós colheita (DPC). Frutos maduros (19 °C): DPC 16, 17 e 18. Frutos maduros (13 °C): DPC 22, 23 e 24. Os números das variáveis referem-se aos compostos voláteis do Apêndice 1.....	85
Figura 2.5. Análise de componentes principais dos compostos voláteis da banana cv. Prata. Código das amostras: PC = polpa do grupo controle (19 °C) na cor vermelha; PL = polpa do grupo frio (10 °C) na cor azul. C = fruto inteiro do grupo controle (19 °C), em cor-de-rosa; L = fruto inteiro do grupo frio (10 °C), na cor verde. Números de 1 a 24 = referem-se aos dias pós colheita (DPC). Frutos maduros (19 °C): DPC 16, 17 e 18. Frutos maduros (10 °C): DPC 22, 23 e 24. Os números das variáveis referem-se aos compostos voláteis do Apêndice 1.....	88
Figura 3.1. Etileno e respiração (evolução de CO ₂) das bananas cv. Nanicão e cv. Prata durante o armazenamento em baixas temperaturas e maturação. Os desvios padrão da análise estão indicados pelas barras verticais (n = 4). As linhas tracejadas verticais delimitam o tempo em que os frutos do grupo frio permaneceram em baixas temperaturas.....	106
Figura 3.2. Mudanças nos parâmetros de cor das bananas durante o amadurecimento em diferentes condições de temperatura de armazenamento. Os desvios padrão da análise estão indicados por barras verticais (n = 4). As linhas tracejadas verticais indicam o tempo de armazenamento em baixas temperaturas. (C*: croma; h: ângulo de tonalidade; N: cv. Nanicão; P: cv. Prata).....	107
Figura 3.3. Cromatograma obtido por HPLC-DAD, dos carotenoides da banana cv. Prata. Identidade dos picos: (1) all- <i>trans</i> -luteína, (2) di-epoxi- α -caroteno, (3) 13- <i>cis</i> - α -caroteno or 15- <i>cis</i> - α -caroteno, (4) 13- <i>cis</i> - α -caroteno or 13'- <i>cis</i> - α -caroteno, (5) 5,8-epoxi- α -caroteno, (6) 13- <i>cis</i> - β -caroteno, (7) all- <i>trans</i> - α -caroteno, (8) 9- <i>cis</i> - α -caroteno, (9) all- <i>trans</i> - β -caroteno e (10) 9- <i>cis</i> - β -caroteno. O perfil cromatográfico foi processado a 450 nm.....	110
Figura 3.4. Mudanças nos níveis de carotenoides das bananas durante o amadurecimento em diferentes condições de temperatura de armazenamento. Os desvios padrão da análise estão indicados por barras verticais (n = 4). As linhas tracejadas verticais indicam o tempo de armazenamento em baixas temperaturas. (N: cv. Nanicão; P: cv. Prata).....	116

Figura 3.5. Gráfico de Análise de Componentes Principais (ACP) dos carotenoides majoritários e parâmetros de cor como variáveis das amostras de bananas cv. Nanicão. L*: luminosidade; C*: croma; h: ângulo de tonalidade; Lu: all-trans-luteína; α -c: all-trans- α -caroteno; β -c: all-trans- β -caroteno. C: grupo-controle a 19 °C. F: grupo frio a 13 °C. Números 1-24 representam os dias pós colheita (DPC).....	120
Figura 3.6. Gráfico de Análise de Componentes Principais (ACP) dos carotenoides majoritários e parâmetros de cor como variáveis das amostras de bananas cv. Prata. L*: luminosidade; C*: croma; h: ângulo de tonalidade; Lu: all-trans-luteína; α -c: all-trans- α -caroteno; β -c: all-trans- β -caroteno. C: grupo-controle a 19 °C. F: grupo frio a 13 °C. T: grupo frio a 10°C. Números 1-24 representam os dias pós colheita (DPC).....	121
Figura 4.1. Esquema ilustrativo da realização dos pools para as análises de proteômica da amostra 'controle-verde'. A numeração de cada <i>pool</i> foi definido de acordo com o quadrante em que estava presente a amostra. A parte central da caixa, foi definida como <i>pool</i> 5.....	136
Figura 4.2. Etileno e respiração (A), níveis de açúcares solúveis (B) e degradação de amido (C) da banana cv. Nanicão durante o amadurecimento e armazenamento em baixa temperatura. Os desvios padrão da análise estão indicados pelas barras verticais. As linhas tracejadas verticais delimitam o tempo em que os frutos do grupo frio permaneceram a 13 °C.....	142
Figura 4.3. Classificação funcional (A) e localização celular (B) das proteínas a partir da identificação dos peptídeos sequenciados das amostras de banana durante o amadurecimento.....	144
Figura 4.4. Análise de Componentes Principais, tendo como variáveis todas as proteínas da banana identificadas durante o amadurecimento. Código das amostras: VC = amostra verde do grupo controle (19 °C); VF = amostra verde do grupo frio (13 °C); MC = amostra madura do grupo controle (19 °C); MF = amostra madura do grupo frio (13 °C). Os números das variáveis referem-se às proteínas das Tabelas dos Apêndices 4, 5, 6 e 7.....	145
Figura 4.5. Análise de Componentes Principais, tendo como variáveis somente as proteínas significativas ($p < 0,05$, teste ANOVA) da banana identificadas durante o amadurecimento. Código das amostras: VC = amostra verde do grupo controle (19 °C); VF = amostra verde do grupo frio (13 °C); MC = amostra madura do grupo controle (19 °C); MF = amostra madura do grupo frio (13 °C). Os números das variáveis referem-se às proteínas da Tabela 4.2.....	146
Figura 4.6. Contagem espectral normalizada em comparação dos níveis de proteínas significativas resultantes do teste da Anova ($p < 0,05$). Médias e desvio padrão das replicadas experimentais ($n = 5$). Os números das variáveis referem-se às proteínas da Tabela 4.2.....	149

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1. Fatores e níveis experimentais utilizados na otimização das condições de isolamento dos compostos voláteis da banana, por HS-SPME.....	48
Tabela 1.2. Condições experimentais e respostas cromatográficas do delineamento composto central rotacional utilizado para otimizar as condições de isolamento dos voláteis do fruto inteiro da banana por HS-SPME.....	51
Tabela 1.3. Condições experimentais e respostas cromatográficas do delineamento composto central rotacional utilizado para otimizar as condições de isolamento dos voláteis da polpa da banana por HS-SPME.....	52
Tabela 1.4. Análise de variância pelo método de mínimos quadrados para a variável resposta número de picos da otimização das condições de isolamento dos voláteis do fruto inteiro da banana por HS-SPME.....	53
Tabela 1.5. Análise de variância pelo método de mínimos quadrados para a variável resposta área total da otimização das condições de isolamento dos voláteis do fruto inteiro da banana por HS-SPME.....	53
Tabela 1.6. Análise de variância pelo método de mínimos quadrados para a variável resposta número de picos da otimização das condições de isolamento dos voláteis da polpa da banana por HS-SPME.....	54
Tabela 1.7. Análise de variância pelo método de mínimos quadrados para a variável resposta área total da otimização das condições de isolamento dos voláteis da polpa da banana por HS-SPME.....	55
Tabela 2.1 Estimativa dos parâmetros do modelo de regressão linear para os compostos voláteis majoritários da banana cv. Nanicão do grupo frio (13 °C) comparado com o grupo controle (19 °C).....	82
Tabela 2.2. Estimativa dos parâmetros do modelo de regressão linear para os compostos voláteis majoritários da banana cv. Prata do grupo frio (10 °C) comparado com o grupo controle (19 °C).....	83
Tabela 3.1. Estimativa dos Parâmetros do Modelo de regressão linear referente às análises de cor durante o amadurecimento das cultivares Nanicão e Prata entre os grupos controle e frio.....	108
Tabela 3.2. Características cromatográficas e espectroscópicas dos carotenoides detectados nas bananas cv. Nanicão e Prata, obtidas por HPLC-PDA-MS/MS.....	111
Tabela 3.3. Estimativa dos Parâmetros do Modelo de regressão linear referente às análises de carotenóides durante o amadurecimento das cultivares Nanicão e Prata entre os grupos controle e frio.....	117
Tabela 4.1. Dias pós-coheita (DPC) dos pools para as análises das proteínas da banana cv. Nanicão.....	135

Tabela 4.2. Proteínas significativas ($p < 0,05$) associadas às amostras (por estágio de maturação e grupo de armazenamento) resultante da Análise de Componentes Principais (Figura 4.5), identidade da proteína, processo biológico em que está relacionado e componente celular que possivelmente atua (pesquisa nas bases de dados Protonet, UniProt e Kegg).....	147
Apêndice 1. Compostos voláteis identificados em banana das cultivares Nanicao e Prata (metodologias polpa e fruto inteiro), armazenadas a 19 ° C (grupo controle), 13 °C e 10 °C (grupos frio), por GC-MS, Índices de Retenção e percentagem de área relativa nos frutos verdes e maduros.....	167
Apêndice 2. Concentração ($\mu\text{g/g}$ peso fresco) de carotenoides da banana cv. Prata armazenados em diferentes temperaturas.....	171
Apêndice 3. Concentração ($\mu\text{g/g}$ peso fresco) de carotenoides da banana cv. Nanicao armazenados em diferentes temperaturas.....	172
Apêndice 4. Lista de proteínas da banana cv. Nanicao no estágio verde do grupo controle identificadas por meio da análise proteômica <i>shotgun</i>	173
Apêndice 5. Lista de proteínas da banana cv. Nanicao no estágio verde do grupo frio identificadas por meio da análise proteômica <i>shotgun</i>	175
Apêndice 6. Lista de proteínas da banana cv. Nanicao no estágio maduro do grupo controle identificadas por meio da análise proteômica <i>shotgun</i>	177
Apêndice 7. Lista de proteínas da banana cv. Nanicao no estágio maduro do grupo frio identificadas por meio da análise proteômica <i>shotgun</i>	179

1. INTRODUÇÃO

A manutenção de uma cadeia de frio, desde a colheita até a comercialização é, sem dúvida, a principal técnica disponível para retardar a senescência dos vegetais, uma vez que a diminuição da temperatura reduz os processos enzimáticos, como a taxa respiratória (TR) e a evolução de etileno (EE) (WILLS et al., 1998), ampliando a vida útil das frutas para consumo *in natura*.

Porém, apesar da refrigeração ser um método muito eficiente no controle do amadurecimento da banana, ela parece atuar negativamente em diversos processos fisiológicos e bioquímicos do fruto (JIANG et al., 2004) possivelmente envolvidos na tolerância desta cultivar ao frio. Assim, a diminuição da temperatura, deve atingir um limite adequado para manter as células vivas, de forma a preservar a qualidade dos produtos durante o período de armazenamento e comercialização, não permitindo que ocorram danos pelo frio.

As plantas são organismos sensíveis e conhecidos por possuírem vários mecanismos regulatórios para sua defesa em condições de estresse ambiental. Porém a tolerância a esse estresse é um processo bastante complicado que não pode ser explicado pela simples ação de uma enzima ou de um mecanismo individual (VALLEURU et. al., 2008). Além disso, esses mecanismos regulatórios parecem variar bastante entre organismos pertencentes à mesma espécie de plantas, com diferenças apenas em grupos genômicos e cultivares. Por exemplo, um estudo sobre resistência de cultivares de bananas ao frio verificou a tolerância ao armazenamento ao frio de apenas uma cultivar, a banana Prata (LICHTENBERG et al., 2001).

Nesse contexto, o amadurecimento da banana é relativamente complexo e sujeito a mudanças devido à temperatura em que o fruto é armazenado, sendo altamente sensível a baixas temperaturas. Em geral, bananas armazenadas a temperaturas abaixo de 13 °C têm amadurecimento anormal, sendo notável a descoloração da casca com a presença de pontos pretos. Esses danos parecem estar associados com a capacidade de repressão do etileno, resultando em uma falha no amadurecimento dos frutos, o que causa o amolecimento da polpa (JIANG et al., 2004).

Assim, qualquer mudança agrônômica, ambiental ou de tratos pós-colheita apresenta influência fundamental nos processos fisiológicos e bioquímicos que ocorrem no amadurecimento das bananas e será inevitavelmente refletida no perfil metabólico do fruto.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. A cultura da bananeira

A banana, originária do continente asiático, é cultivada em quase todos os países tropicais, sendo cultivada de norte a sul do Brasil, indo desde a faixa litorânea até os planaltos do interior, possuindo grande relevância econômica e social, embora o seu plantio sofra restrições, devido a fatores climáticos, como temperatura e precipitação pluviométrica. A presença da banana na dieta alimentar é de grande importância, pois é supridora de energia, vitaminas e minerais, além de gerar muitos empregos diretos no país. Apesar da evolução dos cultivos comerciais em bases mais técnicas, ainda pode ser considerada como predominantemente de uso intensivo de mão-de-obra (SOUZA; TORRES FILHO, 1997).

Segundo Silva Neto e Guimarães (2011), as bananeiras estão entre as culturas agrícolas mais importantes nas regiões tropicais e subtropicais do mundo. São cultivadas numa área de cerca de 4,8 milhões de hectares, com uma produtividade média de 19 toneladas/ha/ano e produção total de 95,6 milhões de toneladas. De acordo com a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO), aproximadamente 84% da banana produzida é destinada ao consumo das populações dos países onde são produzidas e apenas 16% do total da produção é para exportação.

Atualmente, entre os maiores produtores de banana do mundo, o Brasil é o quinto colocado, com uma produção anual de 7,19 milhões de toneladas, sendo superado pela Índia (26,21 milhões de toneladas), Filipinas (9,01 milhões de toneladas), China (8,20 milhões de toneladas) e Equador (7,03 milhões de toneladas) (SILVA NETO; GUIMARÃES, 2011). A disponibilidade da banana durante

o ano inteiro no mercado brasileiro e em diversos países do mundo contribui ainda para o seu alto consumo (LICHTENBERG, 1999).

2.2. Alterações durante a maturação dos frutos

O amadurecimento da banana é um processo irreversível, caracterizado por um padrão respiratório climatérico, que é estimulado pela produção autocatalítica do etileno, e por alterações fisiológicas e metabólicas sensíveis à temperatura e ao próprio etileno. O controle da produção e ou ação do etileno é de vital importância para que a sua comercialização seja eficiente, principalmente em mercados mais distantes. A temperatura é, atualmente, o fator ambiental mais importante, já que regula as taxas dos processos de amadurecimento dos frutos, influenciando diretamente no tempo para a comercialização (SILVA, 2002).

As mudanças que ocorrem durante o amadurecimento da banana dependem da qualidade do fruto ao ser colhido, que por sua vez depende dos tratos culturais e das condições ambientais em que o fruto será armazenado. Durante o amadurecimento, o fruto sofre mudanças de cor, textura e sabor, em razão da degradação da clorofila, síntese de carotenoides, degradação do amido e dos ácidos orgânicos, produção de açúcares solúveis e compostos voláteis relacionados ao aroma (SEYMOR, 1996). Na banana, a degradação do amido acumulado durante o desenvolvimento é fundamental na síntese e acúmulo dos açúcares solúveis majoritários (sacarose, glicose e frutose) responsáveis pela doçura do fruto (CORDENUNSI; LAJOLO, 1995).

A mudança de cor, tanto na casca (epiderme) como na polpa dos frutos, se constitui em uma das alterações mais notáveis durante o amadurecimento da

maioria dos frutos. Na banana, a coloração da casca serve como um referencial para se estabelecer, com certa precisão, o estágio de maturação dos frutos.

Metabólitos de carotenoides são constituintes comuns em aromas de frutas. A formação e degradação de carotenoides afetam a cor, o valor nutricional e o perfil de aromas de frutas e vegetais. O conhecimento dos mecanismos químicos, enzimáticos e moleculares que controlam a formação desses compostos é ainda insuficiente. Apesar disso, alguns relatos descrevem a produção de compostos de aroma advindos de carotenoides em plantas. Em banana, a α -ionona é o principal composto de aroma originado a partir de carotenoides (UENOJO, 2007).

2.3. Compostos voláteis relacionados ao aroma e sabor

O metabolismo em frutas envolve a conversão de precursores de alto peso molecular para compostos menores. O aroma das frutas é geralmente determinado a partir de dezenas a centenas de constituintes, sendo a maioria deles gerado durante a fase de maturação e desenvolvimento do fruto. Assim, sabe-se que a fase de crescimento rápido em frutas envolve grandes quantidades de fotoassimilados de órgãos da fotossíntese (OSORIO et al., 2010).

O sabor da fruta é composto de açúcares, ácidos, sais, compostos amargos, tais como alcalóides e os compostos voláteis (SONG; FORNEY, 2008). Os compostos voláteis em frutas são diversos, havendo centenas de diferentes compostos químicos presentes em baixas concentrações (LARS et al., 2007). Embora estes compostos estejam presentes em mínimas quantidades, podem ser detectados pelo olfato humano.

Nos compostos voláteis produzidos por frutas frescas, predominam diversas classes químicas, incluindo ésteres, álcoois, aldeídos, cetonas, lactonas, e terpenos. Apesar de um grande número de compostos químicos serem identificados como compostos voláteis em frutas frescas, apenas uma fração desses voláteis foram identificados como compostos de impacto (que caracterizam o aroma do fruto). A biogênese dos compostos voláteis que constituem o aroma está associada a diferentes vias metabólicas durante o amadurecimento do fruto e do armazenamento pós-colheita, e dependem de muitos fatores relacionados com a espécie, variedade, clima, produção, maturidade e manejo pós-colheita. Para a maioria das frutas, a produção de voláteis está intimamente relacionada à maturação do fruto (JIANG; SONG, 2010).

Como produtos diretos de uma via metabólica ou como resultado de interações entre vias ou produtos finais, os compostos voláteis podem também ser classificados pela biogênese: ácidos graxos, aminoácidos, glicosinolatos, terpenóides, compostos fenólicos, e compostos relacionados (LARS et al., 2007).

2.3.1 Compostos voláteis formados a partir de ácidos graxos

Segundo Jiang e Song (2010) e Rodriguez-Amaya (2003), os ácidos graxos são precursores de um grande número de compostos voláteis, sendo uma rota extremamente importante para a formação do sabor característico de frutas durante o amadurecimento, produzindo compostos com “caráter de impacto”. A degradação de ácidos graxos ocorre principalmente por três diferentes vias oxidativas: α e β oxidação, oxidação pela via da lipoxigenase e auto-oxidação.

A maioria dos compostos voláteis provenientes dos lipídios surge pela via da atividade da lipoxigenase (LOX). Muitos dos ésteres alifáticos, álcoois, ácidos, e compostos carbonílicos encontrados nas frutas são derivados da degradação oxidativa dos ácidos linoléico e linolênico (REINECCIUS, 2006; RODRIGUES-AMAYA, 2003; OSORIO et al., 2010). Os intermediários e os produtos de tais reações (Figura 1) podem ser metabolizados para formar voláteis de classes químicas diversas, tais como álcoois, aldeídos, ácidos carboxílicos, ésteres, lactonas, ou cetonas (OSORIO et al., 2010).

Figura 1. As vias 9-LOX (A) e 13-LOX (B) do metabolismo do ácido linoleico. LOX = lipoxigenase; AAT = álcool aciltransferase; ADH = álcool desidrogenase; HPL = hidroperóxido liase. (Baseado em Osorio et al., 2010).

A oxidação de ácidos graxos resulta na síntese de hexanal, hexenal e hexenol. Esses compostos são sintetizados no interior de plastídeos, particularmente cloroplastos, a partir de ácidos graxos insaturados como o linolênico e o linoleico. O

sistema enzimático envolvido está localizado nas membranas tilacóides (KERBAUY, 2008).

2.3.2 Compostos voláteis formados a partir do metabolismo de aminoácidos

O metabolismo de aminoácidos ramificados produz compostos de cadeias alifáticas, aromáticas, álcoois ramificados, ácidos e ésteres que são importantes para o aroma da fruta (REINECCIUS, 2006). Alguns compostos voláteis podem ser produzidos por meio da ação de sistemas enzimáticos de aminoácidos. Os principais tipos de compostos voláteis formados a partir da interação dos aminoácidos e açúcares incluem aldeídos e pirazinas a partir da degradação de Strecker (BERGER, 1991). Os aminoácidos são precursores de alguns compostos alifáticos ramificados, tais como 2-metil-1-butanol e 3-metil-1-butanol, que são formados durante o catabolismo dos aminoácidos. Esses compostos podem ainda formar ésteres, que são importantes compostos voláteis em muitas frutas, com distinto aroma 'frutado'. Como compartilham o mesmo precursor, o piruvato, o qual é gerado a partir da glicólise, a interação entre ácidos graxos e os aminoácidos de cadeia ramificada é outro fator importante na biossíntese de voláteis de frutos (JIANG; SONG, 2010).

Diferentes vias biossintéticas estão envolvidas na formação dos compostos voláteis. As reações de descarboxilação e desaminação de aminoácidos levam à formação de compostos como 3-metilbutanal e 3-metilbutanol (KERBAUY, 2008). Segundo Rodriguez-Amaya (2003), a via de formação de ésteres de frutas maduras a partir de aminoácidos ramificados como a leucina (Figura 2), começa com uma desaminação e descarboxilação, ou seja, com a perda dos substituintes típicos de

aminoácidos. Seguidamente, é formado um aldeído, que pode ser transformado no álcool correspondente, que com a incorporação de ácido acético, produz acetato de isoamila, composto volátil de impacto em bananas maduras.

Figura 2. Conversão enzimática da leucina em acetato de isoamila, composto de impacto na banana. (Baseado em Rodriguez-Amaya, 2003).

2.3.3 Compostos voláteis derivados de terpenoides

Os terpenoides estão amplamente distribuídos entre os frutos. Existem dois tipos principais de terpenóides que podem contribuir significativamente para o aroma: monoterpenos, sesquiterpenos e os terpenos irregulares, produzidos principalmente pelas vias de auto-oxidação (LARS et al., 2007). Os monoterpenos e os sesquiterpenos são formados principalmente por processos anabólicos e, portanto, estão presentes no tecido da planta intacta. Segundo Rodriguez-Amaya (2003), os monoterpenos são responsáveis pelo sabor dos alimentos como os citros, mangas e vinho, sendo biossintetizados pela via isoprenóide.

Já a formação de alguns terpenos irregulares não pode ser explicada por vias anabólicas em alguns frutos. Esses terpenóides são principalmente produtos de degradação de oxidação dos carotenoides (JIANG; SONG, 2010) e estão presentes em baixas concentrações, mas possuem forte efeito sobre a aceitação humana (OSORIO et al., 2010). Esse grupo de compostos é gerado por uma clivagem oxidativa (Figura 3) nas moléculas de carotenoides (tetraterpenoides, C₄₀) entre as

posições C₉ e C₁₀, cujas reações são catalisadas pela proteína LeCCD1 (gene), produzindo apocarotenoides (também chamados norisoprenos) com 13 átomos de carbono.

Figura 3. Substratos de carotenóides (da esquerda) sofrem clivagem oxidativa para se obterem os derivados apocarotenoides (direita). (Baseado em Osorio et al., 2010).

Metabólitos de carotenóides são constituintes comuns em aromas de frutas. Em marmelo, carambola, nectarina e maracujá eles são considerados importantes devido ao aroma típico dessas frutas. Em banana, a α -ionona é o principal composto de aroma originado a partir de carotenoides (UENOJO et al., 2007).

2.3.4 Fenóis e compostos relacionados

Um grande número de fenóis voláteis e compostos relacionados ocorrem em frutos, alguns dos quais são compostos de aroma muito intenso (LARS et al., 2007). A maioria dos fenóis voláteis e compostos relacionados são formados principalmente por meio da via do ácido chiquímico e estão presentes como

agliconas livres ou glicosídeos ligados, que podem ser liberados por hidrólise enzimática. Geralmente, os fenóis voláteis e compostos relacionados são derivados do benzeno. Os compostos voláteis mais comuns desse grupo são eugenol e benzaldeído (JIANG; SONG, 2010).

2.4. Carboidratos

A fase de crescimento rápido em frutas envolve grandes quantidades de fotoassimilados de órgãos da fotossíntese. A translocação ocorre no floema, sendo a sacarose o açúcar mais translocado, embora em algumas espécies, outros compostos predominantes são poliálcoois, tais como manitol ou sorbitol, e ainda oligossacarídeos (OSORIO et al., 2010).

Em banana, o açúcar, ou álcool de açúcar, é convertido em amido, mas em outros alimentos, pode ser armazenado como um açúcar redutor (tomate, morango), ou armazenado como sacarose (tomate selvagem, melancia, uva), ou ainda podem ser convertidos em lipídios (oliveira) (Figura 4). A variabilidade no teor de sacarose e hexoses é o resultado da atividade das enzimas responsáveis pela sua degradação e síntese, sendo a invertase e sacarose sintase as mais estudadas (OSORIO et al., 2010).

Figura 4. Representação esquemática das reações envolvidas na síntese e degradação de amido (A) no cloroplasto e sacarose (B) no citosol (Baseado em Osorio et al., 2010).

Estudos realizados em banana pelo nosso grupo de pesquisa (Laboratório de Bioquímica de Alimentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo) revelaram que, o processo de degradação do amido é concomitante com o acúmulo de açúcares solúveis, com alterações estruturais do grânulo de amido durante o amadurecimento (PERONI-OKITA et al., 2010).

Ensaio realizado com a atividade da fosfoglicose isomerase (PGI) mostrou que na banana ocorre uma redução com o conteúdo de amido, mas aumenta com o acúmulo de sacarose, sendo que a razão da PGI_1 e PGI_2 mantiveram-se constantes, indicando que ambas as enzimas participam dos

processos de degradação de amido e síntese de sacarose (CORDENUNSI et al., 2001).

Estudo feito sobre o efeito do ácido indol-3-acético (IAA) no metabolismo de carboidratos da banana mostrou um atraso na degradação do amido, possivelmente afetando a atividade de enzimas hidrolíticas como a β -amilase (PURGATTO et al., 2001).

Com o ácido giberélico (GA_3) foi possível observar que as giberelinas podem desempenhar um papel importante durante o amadurecimento de bananas e ainda reforçam a idéia de múltiplos componentes regulatórios no amadurecimento evidenciado pelos efeitos do GA_3 (ROSSETO et al., 2003). O metabolismo amido-sacarose da banana foi afetado pelo tratamento com ácido giberélico (GA_3) tanto em relação à degradação do amido, quanto à síntese dos açúcares solúveis e à atividade de algumas enzimas que degradam o amido, possivelmente as α e β -amilases (ROSSETO et al., 2004).

Agopian et al. (2008), realizaram a identificação e quantificação de FOS (frutooligossacarídeos) durante a maturação dos frutos de diferentes cultivares de bananeira pertencentes aos grupos genômicos mais comuns cultivados no Brasil. Resultados de Agopian et al. (2009) mostraram que a atividade da frutossiltransferase em banana pode ser atribuído à invertases, em vez de outros tipos "clássicos" de frutossiltransferases.

2.5. Regulação de vias metabólicas

A identificação de enzimas e produtos intermediários envolvidos na via metabólica não é suficiente para ter um conhecimento profundo sobre seu funcionamento. O conhecimento das vias metabólicas sob condições específica, é também uma prioridade para ter um conhecimento profundo do metabolismo. Compreender a regulação exigirá, além da identificação e quantificação dos componentes estruturais (genes, enzimas e intermediários), uma estimativa das modificações e interações a que são suscetíveis. Uma vez que essas alterações ocorrem no contexto de um programa de desenvolvimento de uma parte da planta, isto significa que existe uma mudança no padrão de regulação ao longo do tempo durante o amadurecimento da fruta, e também que os fatores ambientais podem ter um efeito sobre os fluxos da via metabólica (OSORIO et al., 2010).

As alterações metabólicas observadas têm sido explicadas pelas alterações dos padrões de expressão de genes, com o benefício de identificar os principais genes e enzimas responsáveis pela produção metabólica (AHARONI et al., 2000). No entanto, o sucesso limitado em identificar os elementos essenciais da regulação em uma via utilizando transcriptômica levou à utilização de outras abordagens “ômicas”, como proteômica e metabolômica. Essas novas abordagens são, vistas como ferramentas importantes para um conhecimento profundo do metabolismo e sua regulação em tecidos, órgãos e níveis celulares (OSORIO et al., 2010).

A análise do proteoma estuda “todas” as proteínas expressas em uma amostra biológica. Segundo Valledor e Jorrín (2007) a proteômica tornou-se mais do que apenas um apêndice do genoma ou uma abordagem experimental, mas uma disciplina científica real. A proteômica oferece a possibilidade de estudar

simultaneamente o conjunto total de espécies de proteínas presentes em uma unidade biológica (de organelas subcelulares a ecossistemas), sua catalogação (proteômica descritiva), a determinação de abundâncias (proteômica quantitativa), variações genótipo-dependentes (proteômica de população), mudanças em resposta ao desenvolvimento e meio ambiente (proteômica comparativa ou diferencial), modificações pós-traducionais, interações com outras proteínas e interações moleculares (*Interactomics*). Nesse sentido, o proteoma de um organismo é extremamente dinâmico, podendo refletir de maneira clara as alterações de organismos submetidos a diferentes condições (QUIRINO et al., 2010; CHASSY, 2010, NEWTON et al., 2004).

As técnicas hoje utilizadas na proteômica foram desenvolvidas muito antes do início da proteômica. No entanto, foi o avanço na tecnologia de sequenciamento de proteínas por meio da espectrometria de massas que possibilitou o seu surgimento e desenvolvimento (TYERS; MANN, 2003). Assim, quando o objetivo do estudo compreende a produção de mapas proteômicos, a espectrometria de massas surge imperativa, permitindo o processamento de centenas de amostras em uma única análise (SALVATO; CARVALHO, 2010).

Uma técnica bastante abordada e muito utilizada nos últimos anos é a análise de proteínas por eletroforese bidimensional (2D) em gel de acrilamida. Essa técnica possibilita resolução para a análise de um mapa global, sendo capaz de separar centenas de proteínas pelos seus pontos isoelétricos e massas moleculares. Conjuntamente com a espectrometria de massas, é possível quantificar e identificar essas proteínas. O emprego do MALDI-TOF-MS (*Matrix-Assisted Laser Desorption Time of Flight Mass Spectrometry*) é muito utilizado para a caracterização dos polipeptídeos a partir de géis bidimensionais (FEY; LARSEN, 2001).

Por sua vez, a proteômica *shotgun* fornece uma robusta alternativa para a abordagem proteômica baseada em gel. De um modo geral, é uma técnica em que as amostras de proteínas de uma mistura complexa são digeridas, os peptídeos resultantes são separados por cromatografia líquida, e em seguida, analisados por espectrometria de massas, sendo identificados com o auxílio de um banco de dados. Devido à sua boa compatibilidade com a linha de detecção MS, a cromatografia líquida de fase reversa é tipicamente usada para separar os peptídeos na proteômica *shotgun*. Uma das principais vantagens dessa abordagem é que um grande número de proteínas pode ser identificada com alto rendimento (YE et al., 2007) sem a necessidade de fazer os laboriosos géis.

Segundo Salvato e Carvalho (2010), apenas a geração de dados proteômicos não resolve por si só a complexidade dos sistemas biológicos, sendo necessária a combinação de dados oriundos da proteômica com a genômica, transcritômica e metabolômica. A junção desses dados requer um rígido controle experimental e profundo conhecimento para associar os resultados estatísticos aos mecanismos moleculares da atividade celular. Assim, a proteômica está fundamentada na inserção das ferramentas de bioinformática e estatística, e também no desenvolvimento estratégico e tecnológico. Nesse sentido, a proteômica expande uma gama de informações biológicas, permitindo entender melhor os aspectos fundamentais da biologia.

2.6. Colorimetria

A colorimetria é a ciência do estudo da cor de acordo com a percepção humana, sendo o colorímetro, o equipamento utilizado para fazer a medição da cor.

O espaço de cores $L^*a^*b^*$ (CIELAB) é um dos espaços de cores mais conhecido para a medição de cores, sendo amplamente utilizado (Figura 5).

No espaço CIELAB, o L^* indica o índice de luminosidade e o a^* e o b^* são as coordenadas de cromaticidade, as quais indicam a direção da cor: $+a^*$ é a direção do vermelho, $-a^*$ é verde, $+b^*$ é amarelo e $-b^*$ é a direção do azul. O centro é acromático. Dois outros parâmetros importantes também devem ser calculados: o croma (C^*) e o ângulo de tonalidade (h). O croma dá informação sobre a intensidade da cor e o ângulo de tonalidade é o atributo usado para definir as cores, por exemplo, avermelhado, amarelado, etc. Estes parâmetros são calculados com as seguintes fórmulas: $C^* = (a^{*2} + b^{*2})^{1/2}$ e $h = \tan^{-1}(b^*/a^*)$.

Figura 5. Coordenadas do sistema espacial CIELAB (Baseado no manual Konika Minolta (2007), com modificações).

2.7. Quimiometria

“Chamar um especialista em estatística depois que o experimento foi feito pode ser o mesmo que pedir a ele para fazer um exame postmortem. Talvez ele consiga dizer de que foi que o experimento morreu”. (Sir Ronald Aylmer Fisher (1890-1962), estatístico, biólogo evolutivo e geneticista inglês, considerado o pai da Estatística Moderna).

A Quimiometria é a área da química que estuda a aplicação de métodos estatísticos multivariados, modelagem matemática e informática, que se consolidou nos últimos anos, tornando possível a resolução de problemas antes considerados impossíveis (SENA et al., 2001).

Há alguns séculos, a estatística adquiriu *status* de ciência, com aplicações em praticamente todas as áreas do conhecimento, podendo-se dizer que atualmente, não se pode realizar uma pesquisa com bases científicas sem o devido respaldo fornecido pela metodologia estatística (RODRIGUES; IEMMA, 2005).

A necessidade da otimização de processos, minimizando tempo e custo, e maximizando rendimento, produtividade e qualidade, dentre outros objetivos, tem levado profissionais de diferentes formações a buscarem técnicas sistemáticas de planejamento de experimento, minimizando o empirismo que envolve as técnicas de tentativa e erro (RODRIGUES; IEMMA, 2005).

Segundo Montgomery (2001), a Metodologia de Superfície de Resposta (MSR) pode ser definida como um método estatístico que utiliza dados quantitativos de um desenho experimental para determinar e simultaneamente solucionar equações multivariadas. Essas equações podem ser representadas graficamente como superfícies de resposta, que podem ser usadas para descrever como as

variáveis afetam as respostas, determinar as interrelações entre as variáveis e descrever efeitos combinados de todas as variáveis sobre a resposta.

A Figura 6 esquematiza a integração entre os três parâmetros necessários para que a utilização da metodologia estatística seja realizada de forma eficiente e consciente no momento da definição do planejamento experimental mais adequado para a obtenção de informações confiáveis.

Figura 6. Interação entre as análises experimentais, estatística e o bom senso no momento da definição do planejamento experimental. (Baseado em Rodrigues e lemma, 2005, com modificações).

Dentre os métodos estatísticos multivariados mais utilizados na atualidade, a Análise de Componentes Principais (PCA, do inglês, *Principal Component Analysis*) surge com uma ferramenta quimiométrica que permite extrair, de um determinado conjunto de dados, informações relevantes para o seu entendimento. Esse conjunto de dados é organizado na forma de uma matriz, sendo a análise baseada na

decomposição por valores singulares dessa matriz em autovetores e autovalores da matriz de correlação ou de covariância. Nesse sentido, com a PCA é possível efetuar uma simplificação, redução da dimensão original dos dados, modelagem, detecção de *outliers*, seleção de variáveis importantes em determinado sistema, classificação e previsão (MATOS et al., 2003).

3. OBJETIVOS

O objetivo deste estudo foi avaliar como o armazenamento de duas cultivares de banana em baixas temperaturas afeta o amadurecimento e seus atributos de qualidade.

Por meio deste estudo pretendemos responder às seguintes questões:

01. Qual o efeito das baixas temperaturas sobre o perfil de voláteis responsáveis pelo aroma dos frutos?
02. Qual o efeito das baixas temperaturas sobre a síntese de carotenoides na banana?
03. Qual o efeito das baixas temperaturas sobre a cor da casca da banana? Existe alteração nos parâmetros de cor?
04. Quais proteínas são afetadas com o armazenamento da banana a baixa temperatura e como o metabolismo é alterado?

4. DESCRIÇÃO DOS CAPÍTULOS

CAPÍTULO 1: Isolamento dos compostos voláteis da banana por HS-SPME: otimização para polpa e fruto inteiro

O objetivo deste trabalho foi otimizar as condições de isolamento dos compostos voláteis da banana pela técnica de microextração em fase sólida por *headspace* (HS-SPME), não somente da polpa, mas também do fruto inteiro, intacto, com casca. Para esse propósito, foi utilizado um Delineamento Composto Central Rotacional, baseado na Metodologia de Superfície de Resposta, incluindo dois fatores: tempo de equilíbrio e tempo de exposição da fibra (divinilbenzeno/carboxeno/polidimetilsiloxano). Os voláteis foram analisados por cromatografia gasosa – espectrometria de massas. As variáveis de resposta foram número de picos e área total do cromatograma. As análises estatísticas e as curvas de contorno foram geradas com o auxílio do programa *Statistica*, versão 7.1. As melhores condições de isolamento dos voláteis do *headspace* dos frutos inteiros foram 140 min de tempo de equilíbrio e 120 min de tempo de exposição da fibra, enquanto que para a polpa da banana as melhores condições foram 15 e 60 min, para tempo de equilíbrio e tempo de exposição da fibra, respectivamente. Os resultados sugerem também que os perfis qualitativos dos voláteis do fruto inteiro e da polpa no estágio maduro são semelhantes.

O capítulo 1 do presente estudo está publicado no *International Journal of Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics*, Vol. 3, No. 2, p. 110-115, 2013.

CAPÍTULO 2: Influência das baixas temperaturas sobre os compostos voláteis da banana de diferentes cultivares durante o amadurecimento

Este estudo investigou a composição de voláteis da banana das cultivares Nanicão e Prata oriundos da polpa e do fruto inteiro armazenados em baixas temperaturas. Os compostos voláteis foram isolados utilizando o método de microextração em fase sólida (SPME) e analisados por cromatografia gasosa - espectrometria de massas (CG-EM). O armazenamento sob baixas temperaturas modificou o perfil de voláteis em relação ao perfil do grupo controle. Os resultados da análise de componentes principais revelou que o armazenamento sob baixas temperaturas, afetou mais fortemente a cv. Nanicão que a cv. Prata. Os ésteres majoritários, como acetato de 2-pentanol, acetato de 3-metil-1-butanol, 2-metil-propil butanoato de etila, 3-metilbutil-butanoato de 2-metil-propila, 3-metilbutanoato de butila e o butanoato de etila, foram drasticamente reduzidos no grupo frio da cv. Nanicão. Os nossos resultados sugerem que o metabolismo responsável pela produção de compostos voláteis está relacionado com a capacidade da cultivar tolerar as baixas temperaturas.

O capítulo 2 do presente estudo está publicado no periódico *Food Research International*, Vol. 49, p. 626-633, 2012.

CAPÍTULO 3: Influência das baixas temperaturas sobre a cor da casca e níveis de carotenoides da banana de diferentes cultivares durante o amadurecimento

O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência do armazenamento sob baixas temperaturas na cor dos frutos durante o amadurecimento e a síntese de carotenoides em duas cultivares de bananas: Prata e Nanicão. Para esse propósito, o efeito das baixas temperaturas foi monitorado por meio da avaliação da cor por colorimetria (parâmetros CIELAB) e análise dos níveis de carotenóides por cromatografia líquida de alta eficiência com detectores de arranjo de fotodiodo e espectrometria de massas (HPLC-DAD-MS/MS). Em relação aos parâmetros de cor, não foram encontradas evidências de que esse atributo seja afetado pelas baixas temperaturas de armazenamento. Porém, por meio da análise multivariada, os frutos maduros do grupo controle da cv. Nanicão apresentaram maior associação com a luminosidade (L^*), enquanto que na cv. Prata os frutos maduros do grupo Frio (10 °C) foram mais associados com a luminosidade (L^*) e o croma (C^*). Dez carotenoides foram identificados, sendo os majoritários a *all-trans*-luteína, o *all-trans*- α -caroteno e o *all-trans*- β -caroteno, em ambas as cultivares. Na cv. Prata, os carotenoides *all-trans*- α -caroteno e *all-trans*- β -caroteno foram significativamente afetados pelas baixas temperaturas ($p < 0,01$), com tendência a ter níveis reduzidos como resposta ao frio. Na cv. Nanicão, pela análise multivariada, observou-se que as amostras maduras do grupo frio (13 °C) foram caracterizadas pela presença dos carotenoides majoritários. Esse acúmulo de carotenoides pode ter ocorrido devido às vias metabólicas que utilizam carotenoides terem sido afetadas pelo armazenamento em baixas temperaturas.

CAPÍTULO 4: Proteômica *shotgun* da banana Nanicão armazenada sob baixa temperatura

Nesse estudo, uma abordagem proteômica denominada *shotgun* foi conduzida em bananas da cultivar Nanicão para avaliar o efeito do frio (13 °C) sobre o perfil proteico comparando com amostras do grupo controle. Para as análises, foram preparados 5 *pools* de cada grupo (controle e frio) oriundos de frutos do estágio verde e do estágio maduro. As proteínas foram extraídas com fenol, digeridas com tripsina e sequenciadas em Q-TOF-MS. Com o auxílio da análise estatística multivariada (Análise de Componentes Principais), foi possível observar que as proteínas *superoxide dismutase [Cu-Zn]*, *abscisic stress-ripening protein 3*, *putative horcolin*, *stromal 70 kDa heat shock-related protein* e a *chloroplastic probable steroid-binding protein* foram correlacionados com as amostras do estágio verde do grupo controle. *Putative stress responsive protein* e *cytochrome c oxidase subunit 5B mitochondrial precursor* foram fortemente correlacionadas com as amostras verdes do grupo frio. Por outro lado, *enolase*, *malate dehydrogenase, mitochondrial*, *metallothionein-like protein type 3*, *1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase*, *defensin-like protein 5*, *endochitinase*, *heat shock cognate 70 kDa protein* e *germin-like protein* apresentaram uma forte associação com as amostras maduras do grupo controle, enquanto o grupo frio foi caracterizado pela presença das proteínas *thaumatin-like protein*, *isoflavone reductase homolog*, *granule-bound starch synthase 1*, *chloroplastic / amyloplastic*, e uma *putative lichenase dirigent protein*. O estudo sugere que nos frutos maduros, foi evidenciado um efeito sobre as proteínas que atuam no metabolismo de carboidratos como resposta ao estresse causado pelo frio.

CAPÍTULO 1

ISOLAMENTO DOS COMPOSTOS VOLÁTEIS DA BANANA POR HS-SPME: OTIMIZAÇÃO PARA POLPA E FRUTO INTEIRO

Abstract

The best conditions for the isolation of banana volatiles by headspace solid phase microextraction (HS-SPME) were determined for the intact whole fruit (with peel) and for the pulp only. Optimization of isolation conditions was carried out using a Central Composite Rotational Design based on Response Surface Methodology with two factors: time needed to reach equilibrium in the headspace and the fiber exposure time. Samples were analyzed by GC-MS. The criteria were higher number of peaks and greater total area of the chromatogram. The best conditions for isolating volatiles from the headspace of whole fruits were 140 min headspace equilibrium and 120 min fiber exposure, while for the banana pulp the best conditions were 15 and 60 min for equilibrium and exposure times, respectively. The results suggest that the whole fruit and pulp have very similar qualitative volatile profile in ripe banana.

Keywords: Central Composite Rotational Design, *Musa acuminata* L., Response Surface Methodology.

1.1 INTRODUÇÃO

A banana é uma fruta rica em nutrientes com sabor agradável, sendo amplamente consumida em todo o mundo (JÓRDAN et al., 2001). De acordo com a

Organização para a Alimentação e Agricultura das Nações Unidas (FAO), a banana é o fruto de maior comércio internacional e uma das frutas mais populares do mundo. A fruticultura é uma importante fonte de emprego, renda e receitas de exportação para os países em desenvolvimento da América Latina, Caribe, Ásia e África, sendo também responsável pela criação de empregos, tanto em áreas agrícolas e urbanas (FIORAVANÇO, 2003).

O aroma e sabor das frutas são fatores determinantes no seu consumo. Quimicamente, eles são caracterizados pela presença de compostos voláteis que impressionam os receptores olfativos. Em relação à banana, o seu sabor agradável e peculiar tem sido objeto de vários estudos ao longo dos últimos 40 anos (SHIOTA, 1993; SALMON et al., 1996; CANO et al., 1997; PEREZ et al., 1997; JORDAN et al., 2001; NOGUEIRA et al., 2003; BUGAUD et al., 2009; VERMEIR et al., 2009). Como resultado dessas pesquisas, mais de 150 compostos voláteis de várias classes químicas tem sido identificados, incluindo principalmente ésteres, cetonas, aldeídos e terpenos. Os ésteres de isoamila e isobutila, e o composto 2-pentanona são geralmente descritos como compostos identificados em maiores quantidades em amostras de banana (JÓRDAN et al., 2001).

A etapa de isolamento dos compostos voláteis do aroma é crítica, já que esses constituintes normalmente são termolábeis. Quando submetidos a um aumento da temperatura, podem sofrer uma série de reações químicas indesejáveis, como rearranjos, ciclizações e oxidações. Assim, em muitos casos, o isolado de compostos de aroma pode ter uma composição muito diferente daquela originalmente presente na amostra. Dessa forma, os métodos de isolamento devem ser eficientes e brandos (devido à quantidade, estabilidade e volatilidade dos referidos compostos), simples, rápido e de baixo custo, compreendendo, se possível,

uma única etapa que separe os componentes voláteis da matriz do alimento ao mesmo tempo em que os concentre e com a menor manipulação possível (THOMAZINI; FRANCO, 2000).

Uma técnica de isolamento bastante utilizada é a Microextração em Fase Sólida (Solid Phase Microextraction – SPME), desenvolvida por Arthur e Pawliszyn (1990). A SPME é um método livre de solvente, barato, rápido e versátil para a extração de compostos orgânicos. É constituído por uma fibra de sílica fundida, revestida com uma fase estacionária polimérica (IBÁÑEZ et al., 1998). Esse método envolve dois processos: a partição dos analitos entre o revestimento e a amostra e a dessorção térmica dos analitos no injetor do cromatógrafo, equipado com insensor apropriado (IBÁÑEZ et al., 1998; YANG; PEPPARD, 1994).

Alguns autores têm utilizado o Método de Superfície de Resposta para otimizar as condições de extração de compostos voláteis por SPME em alimentos com resultados satisfatórios (BOGUSZ JUNIOR et al., 2011; WAGNER; FRANCO, 2012). A Metodologia de Superfície de Resposta (MSR) é uma importante técnica estatística e matemática útil para a modelagem e análise de padronização em que uma resposta de interesse é influenciada por diversas variáveis e o objetivo é justamente otimizar essa resposta, utilizando poucos experimentos (MONTGOMERY, 2005).

Assim, o objetivo deste trabalho foi determinar as condições ótimas de isolamento dos compostos voláteis da banana pela técnica de microextração em fase sólida por *headspace* (HS-SPME), pela combinação dos fatores tempo de equilíbrio e tempo de exposição da fibra, não só da polpa, mas também do fruto inteiro, intacto.

1.2 MATERIAL E MÉTODOS

1.2.1 Material

Cem unidades de bananas maduras da cultivar Nanicão (*Musa acuminata* L.) foram obtidas na CEAGESP (Companhia de Entrepósitos e Armazéns Gerais de São Paulo) e armazenadas a 19 °C até o momento da realização dos ensaios.

1.2.2 Preparo da amostra e procedimento de extração

Para o isolamento dos compostos voláteis da banana foi utilizada a técnica de microextração em fase sólida (SPME) no espaço confinado (*headspace*) entre a amostra e a tampa de um frasco vedado. A fibra usada neste estudo foi de 50/30 mm de DVB/CAR/PDMS (divinilbenzeno/carboxeno/polidimetilsiloxano) da Supelco (Sigma-Aldrich, Bellefonte, PA, EUA), sendo pré-condicionada a 250 °C durante 30 minutos no injetor do cromatógrafo gasoso.

Para as análises do fruto inteiro (Figura 1.1A), 1 Kg de banana foi inserido em um recipiente de vidro (3 L). Os tempos de equilíbrio (T_{eq}) e de exposição da fibra (T_{exp}) foram baseados no delineamento experimental descrito na Seção 1.2.3.

Para as análises da polpa (Figura 1.1B), fatias de banana fresca (33,3% p/p) e cloreto de sódio (20%) foram homogeneizados com água destilada em um processador do tipo Turrax para fazer um “suco de banana” (LIU; YANG, 2002). Uma alíquota de 16 g foi transferida para um frasco de 30 mL, selado com um septo de teflon e uma tampa de plástico. Os tempos de equilíbrio e exposição também foram baseados no delineamento experimental da Seção 1.2.3, permanecendo sob

agitação com o auxílio de uma barra magnética. Todas as análises foram realizadas à temperatura ambiente ($\sim 25\text{ }^{\circ}\text{C}$).

Em ambos os experimentos, após o tempo de equilíbrio usado no delineamento, a fibra de SPME foi introduzida no frasco e exposta ao *headspace* para a adsorção dos compostos voláteis. Após o término do tempo de exposição, a fibra foi removida do frasco e inserida no injetor do cromatógrafo gasoso para dessorção térmica dos analitos.

Figura 1.1. Representação do isolamento dos compostos voláteis da banana do fruto inteiro (A) e polpa (B) pela técnica de microextração em fase sólida por *headspace* (HS-SPME).

1.2.3 Delineamento experimental

Foi utilizado um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR), baseado na Metodologia de Superfície de Resposta, onde foram empregados dois

fatores, tempo de equilíbrio (T_{eq}) e tempo de exposição da fibra (T_{exp}), tanto para a polpa como para o fruto inteiro, conforme o planejamento experimental mostrado na Tabela 1.1. As análises foram realizadas seguindo um planejamento fatorial completo 2^2 , incluindo 4 pontos axiais e três repetições no ponto central, consistindo em 11 ensaios, realizados em ordem aleatória e analisados por cromatografia gasosa, com a finalidade de se obter como resposta o perfil cromatográfico e a área total dos picos. A escolha dos níveis experimentais utilizados baseou-se em ensaios preliminares.

Tabela 1.1. Fatores e níveis experimentais utilizados na otimização das condições de isolamento dos compostos voláteis da banana, por HS-SPME.

Fatores	Níveis experimentais				
	-1,41	-1	0	1	1,41
Fruto inteiro					
Tempo de equilíbrio (min)	71,36	90,00	135,00	180,00	198,64
Tempo de exposição (min)	77,57	90,00	120,00	150,00	162,43
Polpa					
Tempo de equilíbrio (min)	0,86	5,00	15,00	25,00	29,14
Tempo de exposição (min)	3,43	20,00	60,00	100,00	116,57

1.2.4 Condições cromatográficas e de espectrometria de massas

Cada experimento foi registrado por meio de um cromatograma, gerado por um cromatógrafo gasoso (Hewlett-Packard 6890, Agilent Technologies Inc., Santa Clara, EUA) acoplado a um espectrômetro de massas. A dessorção térmica dos compostos voláteis adsorvidos na fibra de SPME foi realizada em um injetor à temperatura de 250 °C, no modo *splitless*. A fibra foi mantida no injetor por 15 min para eliminar o efeito memória. Uma coluna capilar de sílica fundida Supelcowax 10

(Supelco Inc., Bellefonte, PA, EUA) de 30 m x 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 mm de espessura de fase estacionária foi utilizada para separar os componentes voláteis. Gás hélio foi utilizado como gás de arraste a uma vazão constante de 1,0 mL.min⁻¹. A temperatura do detector de massas (MS) foi mantida a 250 °C. Na programação de temperatura do forno do cromatógrafo gasoso foi realizada uma rampa de 50 a 150 °C a 2 °C / min (LIU; YANG, 2002), com tempo total de corrida de 55 minutos. A linha de transferência MS foi mantida a 290 °C, a energia de ionização a 70 eV e faixa de massa foi de 50-550 m / z.

A produção total de voláteis foi estimada pela soma de todas as áreas dos picos detectados no cromatograma. Os índices de retenção foram calculados de acordo com a equação de *Van den Dool* e *Kratz* (MJOS et al., 2006) para uma solução de alcanos (C9-C22) injetada sob as mesmas condições no GC-MS. A identificação dos compostos foi baseada na forma de fragmentação por meio da comparação do espectro de massas do composto desconhecido com os espectros de massas da biblioteca NIST (NIST98, versão 2.0, Gaithersburg, EUA), utilizando o critério de um mínimo de 75% de similaridade.

1.2.5. Análise estatística

Foi utilizado o modelo polinomial de regressão para expressar a relação entre os níveis quantitativos dos fatores (tempo de equilíbrio e tempo de exposição) e as variáveis respostas (número de picos e área total no cromatograma). A qualidade do ajuste foi expressa pelo coeficiente de determinação (R^2) e teste para a falta de ajuste do modelo. A significância estatística a 0,10 de probabilidade foi determinada pelo teste F e a superfície de resposta foi construída a partir da equação de regressão da superfície de resposta (em que x = tempo de equilíbrio; y = tempo de

exposição; z = resposta). O programa utilizado para as análises estatísticas foi o *Statistica* versão 7.1 (Statsoft Inc., Tulsa, OK, EUA).

1.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 1.2 mostra a influência da temperatura durante o isolamento dos voláteis da polpa de banana. Observou-se que quando a temperatura foi aumentada, houve uma diminuição na abundância dos compostos voláteis. Portanto, a temperatura não foi incluída no modelo, e 25 °C foi fixada como a temperatura de isolamento.

Figura 1.2. Cromatogramas previamente obtidos com o aumento da temperatura de isolamento dos voláteis por HS-SPME com fibra PDMS (polidimetilsiloxano).

Nesse estudo, a fibra DVB/CAR/PDMS foi escolhida para o isolamento dos voláteis da banana devido à sua composição apresentar afinidade por compostos voláteis polares e apolares e sua alta sensibilidade a compostos de baixo tamanho molecular (CHIN et al., 2007)

A otimização das condições de isolamento foi fundamentada na contagem do número de picos e da área total do cromatograma atribuídos pela análise cromatográfica em cada ponto do delineamento composto central rotacional. As Tabelas 1.2 e 1.3 mostram os resultados obtidos dos onze ensaios realizados com a combinação $T_{eq} \times T_{exp}$, para o fruto inteiro e polpa, respectivamente.

Tabela 1.2. Condições experimentais e respostas cromatográficas do delineamento composto central rotacional utilizado para otimizar as condições de isolamento dos voláteis do fruto inteiro da banana por HS-SPME.

Ensaio	Fatores Codificados		Fatores Decodificados		Variáveis Resposta	
	Teq	Texp	Teq (min)	Texp (min)	Picos	Área total
1	-1,00	-1,00	90,00	90,00	35	1,41E+09
2	-1,00	1,00	90,00	150,00	43	1,17E+09
3	1,00	-1,00	180,00	90,00	33	1,08E+09
4	1,00	1,00	180,00	150,00	42	1,07E+09
5	-1,41	0,00	71,36	120,00	47	2,19E+09
6	1,41	0,00	198,64	120,00	59	2,24E+09
7	0,00	-1,41	135,00	77,57	40	2,23E+09
8	0,00	1,41	135,00	162,43	57	1,27E+09
9 (C)	0,00	0,00	135,00	120,00	55	2,77E+09
10 (C)	0,00	0,00	135,00	120,00	83	3,27E+09
11 (C)	0,00	0,00	135,00	120,00	76	3,34E+09

Teq = tempo de equilíbrio; Texp = tempo de exposição da fibra; (C) = Ponto central

Tabela 1.3. Condições experimentais e respostas cromatográficas do delineamento composto central rotacional utilizado para otimizar as condições de isolamento dos voláteis da polpa da banana por HS-SPME.

Ensaio	Fatores Codificados		Fatores Decodificados		Variáveis Resposta	
	Teq	Texp	Teq (min)	Texp (min)	Picos	Área total
1	-1,00	-1,00	5,00	20,00	23	4,75E+08
2	-1,00	1,00	5,00	100,00	42	7,32E+08
3	1,00	-1,00	25,00	20,00	15	3,82E+08
4	1,00	1,00	25,00	100,00	28	4,45E+08
5	-1,41	0,00	0,86	60,00	24	3,81E+08
6	1,41	0,00	29,14	60,00	29	4,58E+08
7	0,00	-1,41	15,00	3,43	11	2,96E+08
8	0,00	1,41	15,00	116,57	41	1,16E+09
9 (C)	0,00	0,00	15,00	60,00	59	1,99E+09
10 (C)	0,00	0,00	15,00	60,00	51	8,74E+08
11 (C)	0,00	0,00	15,00	60,00	52	8,31E+08

Teq = tempo de equilíbrio; Texp = tempo de exposição da fibra; (C) = Ponto central

Foram verificadas a significância estatística da regressão, a falta de ajuste do modelo e o coeficiente de determinação (R^2). O primeiro parâmetro foi observado a partir do valor calculado de F, determinado pela razão do quadrado médio da regressão pela do resíduo. Sendo esse valor (calculado) maior que o valor tabelado, a regressão é estatisticamente significativa. O segundo parâmetro foi também verificado pelo valor calculado de F, obtido pela razão do quadrado médio da falta de ajuste pela do erro puro. Já o coeficiente de determinação (R^2) indica o quanto a variabilidade da resposta pode ser explicada pelo modelo.

O resultado da análise de variância (ANOVA) para validação do modelo (FERREIRA et al, 2007; RODRIGUES; IEMMA, 2005) para o experimento do fruto inteiro pode ser visualizado na Tabela 1.4, referente ao número de picos e Tabela 1.5 referente à área total. Nota-se que o modelo de regressão da superfície de resposta para o número de picos ($z = -294,718 + 1,655x - 0,006x^2 + 4,024y - 0,016y^2 + 0,0002xy$) não foi estatisticamente significativo ($F_{\text{calculado}} < F_{\text{tabelado}}$), mas o

modelo obtido para a área total ($z = -15337730818,423 + 81014590,858x - 323176,631x^2 + 224417048,359y - 987252,192y^2 + 43553,285xy$) foi significativo a 10% ($F_{\text{calculado}} > F_{\text{tabelado}}$), indicando a existência de um modelo adequado para as variáveis estudadas a esse nível. Os modelos de regressão obtidos apresentaram coeficiente de determinação R^2 entre 0,7 e 0,8 e o teste para a falta de ajuste não foi significativo para ambas as variáveis respostas.

Tabela 1.4. Análise de variância pelo método de mínimos quadrados para a variável resposta número de picos da otimização das condições de isolamento dos voláteis do fruto inteiro da banana por HS-SPME.

Fonte de Variação	Soma de Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	$F_{\text{calculado}}$	$F_{\text{tabelado}} (5\%)$	$F_{\text{tabelado}} (10\%)$
Regressão	2282,51	5	456,50	2,88	5,05	3,45
Resíduos	793,22	5	158,64			
Falta de ajuste	368,55	3	122,85	0,58	19,16	
Erro puro	424,67	2	212,33			
Total	3075,73	10				
R^2	0,70					

Tabela 1.5. Análise de variância pelo método de mínimos quadrados para a variável resposta área total da otimização das condições de isolamento dos voláteis do fruto inteiro da banana por HS-SPME.

Fonte de Variação	Soma de Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	$F_{\text{calculado}}$	$F_{\text{tabelado}} (5\%)$	$F_{\text{tabelado}} (10\%)$
Regressão	7,23E+18	5	1,45E+18	4,36	5,05	3,45
Resíduos	1,66E+18	5	3,31E+17			
Falta de ajuste	1,47E+18	3	4,89E+17	5,09	19,16	
Erro puro	1,92E+17	2	9,59E+16			
Total	8,88E+18	10				
R^2	0,78					

Os resultados da ANOVA das análises do experimento com a polpa da banana pode ser visualizado nas Tabelas 1.6 e 1.7, referentes ao número de picos e área total, respectivamente. Para esse experimento, o modelo de regressão da superfície de resposta ($z = -22,124 + 4,107x - 0,135x^2 + 1,325y - 0,009y^2 - 0,004xy$) para os números de picos foi significativa a 5%, com R^2 de 0.94 e o modelo de regressão da superfície de resposta para a área total ($z = -670979111,252 + 130697757,614x - 4226227,757x^2 + 26808910,391y - 168144,760y^2 - 121632,227xy$) não foi estatisticamente significativo, com R^2 de 0,59.

Nota-se que apesar de algumas variáveis respostas não apresentarem regressão significativa (contagem de picos do fruto inteiro e área total da polpa), nos experimentos realizados, os modelos não apresentaram evidências de falta de ajuste significativo, podendo assim, serem aceitos para fornecimento de uma representação adequada dos dados (FERREIRA et al., 2007).

Tabela 1.6. Análise de variância pelo método de mínimos quadrados para a variável resposta número de picos da otimização das condições de isolamento dos voláteis da polpa da banana por HS-SPME.

Fonte de Variação	Soma de Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F _{calculado}	F _{tabelado} (5%)	F _{tabelado} (10%)
Regressão	2845,37	5	569,07	17,97	5,05	3,45
Resíduos	158,35	5	31,67			
Falta de ajuste	120,35	3	40,12	2,11	19,16	
Erro puro	38,00	2	19,00			
Total	3003,73	10				
R^2	0,94					

Tabela 1.7. Análise de variância pelo método de mínimos quadrados para a variável resposta área total da otimização das condições de isolamento dos voláteis da polpa da banana por HS-SPME.

Fonte de Variação	Soma de Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F _{calculado}	F _{tabelado} (5%)	F _{tabelado} (10%)
Regressão	1,73E+18	5	3,46E+17	1,72	5,05	3,45
Resíduos	1,01E+18	5	2,01E+17			
Falta de ajuste	1,39E+17	3	4,64E+16	0,11	19,16	
Erro puro	8,66E+17	2	4,33E+17			
Total	2,74E+18	10				
R ²	0,59					

Os gráficos de contorno das superfícies de resposta constituíram o ponto de partida para o estabelecimento dos critérios utilizados para a otimização. As condições ótimas de isolamento foram aquelas que apresentaram maior número de picos e maior área total no cromatograma. A Figura 1.3 mostra a superfície de resposta obtida do delineamento para o fruto inteiro das amostras de bananas. Analisando ambos os gráficos (A para o número de picos e B para área total no cromatograma), os valores ótimos encontrados para tempos de equilíbrio e exposição foram de 140 e 120 min, respectivamente. Para a polpa (Figura 1.4), os tempos 15 min para o tempo de equilíbrio e 60 min para o tempo de exposição da fibra foram situados na região ótima para a maior resposta da combinação dos níveis desses fatores.

Figura 1.3. Superfície de resposta para o número de picos (A) e área total (B) obtida a partir do cromatograma do fruto inteiro na otimização das condições de isolamento dos voláteis da banana por HS-SPME.

Figura 1.4. Superfície de resposta para o número de picos (A) e área total (B) obtida a partir do cromatograma da polpa na otimização das condições de isolamento dos voláteis da banana por HS-SPME.

Foi observado que, no método para o fruto inteiro, o tempo necessário para o equilíbrio dos voláteis no *headspace* foi superior ao tempo necessário para adsorver

os compostos voláteis na fibra, enquanto que na polpa aconteceu o contrário. Isso ocorreu devido ao volume do recipiente ser maior (3 L), sendo necessário um tempo superior para que se estabeleça um equilíbrio no *headspace*. Na polpa, além do volume do *headspace* ser menor, a agitação parece reduzir esse tempo, devido ao aumento no coeficiente de difusão (VALENTE; AUGUSTO, 2000; DÓREA et al., 2008) dos compostos voláteis através do suco de banana. Segundo Yang e Peppard (1994), a reprodutibilidade e sensibilidade dos compostos voláteis do *headspace* por SPME são muito influenciadas pela pressão de vapor no vial para ter um alto coeficiente de participação dos voláteis entre a fibra de SPME e o suco de banana (que tem baixo coeficiente de difusão comparado a fase gasosa do *headspace*) para alcançar o revestimento do SPME. Outro fato observado é que a abundância das áreas dos picos do fruto inteiro também é maior que da polpa. Essa diferença pode ser causada devido ao fato dos voláteis capturados do fruto inteiro serem provenientes de uma quantidade maior de amostra (1 kg).

As Figuras 1.5 e 1.6 apresentam exemplos de cromatogramas obtidos por GC-MS, com a identificação dos compostos voláteis majoritários da banana verde e madura (*Musa acuminata*), respectivamente, utilizando as condições otimizadas em ambas as metodologias: fruto inteiro e polpa. Observou-se que nos frutos do estágio verde, a polpa teve predominância de aldeídos e álcoois, enquanto que no fruto inteiro os terpenos foram predominantes. Os terpenos são biossintetizados a partir de metabolitos primários (TAIZ; ZEIGER, 2002) com o isopentenil-difosfato (IPP) como a unidade básica ativa na sua formação. O IPP pode ser formado a partir de intermediários da glicólise ou do ciclo de redução de carbono fotossintético, por meio de uma série de reações que ocorre em cloroplastos e plastídeos, os quais, no caso

da banana, estão presentes na casca. Por essa razão, apenas na análise dos frutos verdes inteiros, foi possível identificar os terpenos.

Por outro lado, a banana madura (Figura 1.6) teve predominância de ésteres, e ambas as amostras (fruto inteiro e polpa) apresentaram perfis qualitativos muito semelhantes.

Figura 1.5. Cromatograma de frutos verdes (com 7 dias pós-colheita), obtido por GC-MS, com a identificação dos compostos voláteis majoritários do fruto inteiro (A) e polpa (B) de banana nas condições otimizadas.

Figura 1.6. Cromatograma obtido por GC-MS, com a identificação dos compostos voláteis majoritários do fruto inteiro (A) e polpa (B) de banana madura nas condições otimizadas.

1.4 CONCLUSÃO

O presente método de microextração em fase sólida por *headspace* (HS-SPME), utilizando a fibra mista DVB/CAR/PDMS, demonstrou ser eficiente para extrair os compostos voláteis do *headspace* da banana. Dentro da faixa estudada, foi considerada como condição ótima para o isolamento dos voláteis do fruto inteiro,

os valores de 140 min para tempo de equilíbrio e 120 min para o tempo de exposição da fibra no *headspace*, enquanto que para a polpa de banana, as melhores condições foram 15 e 60 min para os tempos de equilíbrio e exposição, respectivamente.

1.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARTHUR, C. L.; PAWLISZYN, J. Solid-phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. **Analytical Chemistry**, v. 62, p. 2145-2148, 1990.

BOGUSZ JUNIOR, S.; MELO, A. M. T.; ZINI, C. A.; GODOY, H. T. Optimization of the extraction conditions of the volatile compounds from chili peppers by headspace solid phase micro-extraction. **Journal of Chromatography. A**, v. 1218, n. 21, p. 3345–3350, 2011.

BUGAUD, C.; ALTER, P.; DARIBO, M. O.; BRILLOUET, J. M. Comparison of the physico-chemical characteristics of a new triploid banana hybrid, FLHORBAN 920, and the Cavendish variety. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 89, p. 407–413, 2009.

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

CHIN, S. T.; NAZIMAH, S. A. H.; QUEK, S. Y.; CHE MAN, Y. B.; ABDUL RAHMAN, R.; MAT HASHIM, D. Analysis of volatile compounds from Malaysian durians

- (Durio zibethinus) using headspace SPME coupled to fast GC-MS. *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 20, p. 31–44, 2007.
- DÓREA, H. S.; GAUJAC, A.; NAVICKIENE, S. Microextração em fase sólida: aspectos termodinâmicos e cinéticos. **Scientia Plena**, v. 4, n. 7, p. 1-7, 2008.
- FERREIRA, S. L. C.; BRUNS, R. E.; SILVA, E. G. P.; SANTOS, W. N. L.; QUINTELLA, C. M.; DAVID, J. M.; ANDRADE, J. B.; BREITKREITZ, M. C.; JARDIM, I. C. S. F.; NETO, B. B. Statistical designs and response surface techniques for the optimization of chromatographic systems. **Journal of Chromatography A**, v. 1158, p. 2-14, 2007.
- FIORAVANÇO, J. C. Mercado mundial da banana: produção, comércio e participação brasileira. **Informações Econômicas**, v. 33, n. 10, p. 15-27, 2003.
- FRANCO, M. R. B.; JANZANTTI, N. S. Aroma de Frutas Tropicais: Avanços na metodologia instrumental da pesquisa do sabor. In: FRANCO, M.R.B.(Ed.). *Aroma e sabor de alimentos: Temas atuais*. São Paulo, Editora Varela, p. 17-27, 2004.
- IBÁÑEZ, E.; LÓPEZ-SEBÁSTIAN, S.; RAMOS, E.; TABERA, J.; REGLERO, G. Analysis of volatile fruit components by headspace solid-phase microextraction. **Food Chemistry**, v. 63, n. 2, p. 281-286, 1998.
- JORDAN, M. J.; TANDON, K.; SHAW, P. E.; GOODNER, K. L. Aromatic profile of aqueous banana essence and banana fruit by gas chromatography - mass spectrometry (GC-MS) and gas chromatography-olfactometry (GC-O). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 4813-4817, 2001.

- LIU, T.; YANG, T. Optimization of Solid-Phase Microextraction Analysis for Studying Change of Headspace Flavor Compounds of Banana during Ripening. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 653-657, 2002.
- MJOS, S. A.; MEIER, S.; BOITSOV, S. Alkylphenol retention indices. **Journal of Chromatography A**, v. 1123, p. 98–105, 2006.
- MONTGOMERY, D. C. Design and Analysis of Experiments: Response surface method and designs. New Jersey: John Wiley and Sons, Inc., 2005.
- NOGUEIRA, J. M.; FERNANDES, P. J.; NASCIMENTO, A. M. Composition of volatiles of banana cultivars from Madeira Island. **Phytochemical Analysis**, v. 14, p. 87–90, 2003.
- PÉREZ, A. G.; CERT, A.; RIOS, J. J.; Olias, J. M. Free and glycosidically bound volatile compounds from two banana cultivars: Valery and Pequena Enana. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, p. 4393–4397, 1997.
- RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. Planejamento de experimentos e otimização de processos. 1ª Ed. Campinas, SP: Editora Casa do Pão, p. 326, 2005.
- SALMON, B.; MARTIN, G. J.; REMAUD, G.; FOUREL, F. Compositional and Isotopic Studies of Fruit Flavours. Part I. The Banana Aroma. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 11, p. 353-359, 1996.
- SHIOTA, H. New esteric compounds in the volatiles of banana fruit (*Musa sapientum* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 41, p. 2056–2062, 1993.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. Plant physiology, 3 th ed, Sinauer Assoc., p. 690, 2002.

- THOMAZINI, M.; FRANCO, M.R.B. Metodologia para análise dos constituintes voláteis do sabor. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 34, n.1, p.52-59, 2000.
- VALENTE, A. L. P.; AUGUSTO, F. Microextração por fase sólida. **Química Nova**, v. 23, n. 4, p. 523-530, 2000.
- THOMAZINI, M. Compostos voláteis de sucos provenientes da fruta e polpa congeladas de umbu (*Spondias tuberosa*, Anacardiaceae). Dissertação de mestrado. Faculdade de Engenharia de Alimentos, Unicamp, p. 174, 1998.
- VERMEIR, S.; HERTOOG, M. L. A. T. M.; VANKERSCHAUVER, K.; SWENNEN, R.; NICOLAI, B. M.; LAMMERTYN, J. Instrumental based flavour characterization of banana fruit. **LWT - Food Science and Technology**, v. 42, p. 1647–1653, 2009.
- WAGNER, R.; FRANCO, M. R. B.. Effect of the variables time and temperature on volatile compounds extraction of salami by solid phase microextraction. **Food Analytical Methods**, v. 5, p. 1186-1195, 2012
- YANG, X.; PEPPARD, T. Solid-phase microextraction for flavor analysis. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Washington, D.C., v. 42, p. 1925 – 1930, 1994.

CAPÍTULO 2

INFLUÊNCIA DAS BAIXAS TEMPERATURAS SOBRE OS COMPOSTOS VOLÁTEIS DE DIFERENTES CULTIVARES DE BANANA DURANTE O AMADURECIMENTO

Abstract

The aroma responsible for the flavor of fruits is highly susceptible to low temperatures in storage. The present study investigated the volatile composition of the Nanicão and Prata banana cultivars by testing pulp and whole fruit under cold storage conditions. The volatile fractions were characterized using headspace solid phase micro-extraction (HS-SPME) and gas chromatography – mass spectrometry (GC-MS). The cold storage induced changes in the volatile profile relative to the profile of the control group (19 °C). The result of principal component analysis revealed that cold storage more strongly affects the Nanicão than the Prata cultivar. Esters such as 2-pentyl acetate, 3-methyl-1-butyl acetate, 2-methylpropyl butanoate, 3-methylbutyl butanoate, 2-methylpropyl 3-methylbutanoate and butyl butanoate were drastically reduced in the cold group of Nanicão cultivar. Our results suggest that the metabolism responsible for the production of volatiles compounds is related to the ability to tolerate low temperatures.

Keywords: cold storage, esters, *Musa acuminata* L., principal component analysis, tolerance.

2.1 INTRODUÇÃO

Vários estudos têm sido realizados sobre o controle de qualidade pós-colheita de bananas abordando as condições de armazenamento e os tratamentos destinados a prolongar a vida de prateleira (WENDAKOON et al., 2006; ZHANG et al., 2010; LICHTENBERG et al., 2001). A manutenção de uma cadeia de frio, desde a colheita até a comercialização é, sem dúvida, a principal técnica disponível para retardar a senescência dos vegetais, uma vez que a diminuição da temperatura reduz os processos enzimáticos, a taxa respiratória e a evolução de etileno (WILLS et al., 1998), ampliando a vida útil das frutas para consumo *in natura*. No entanto, no caso das bananas, a redução da temperatura deve ser realizada cuidadosamente, devido à injúria pelo frio que esses frutos sofrem em temperaturas inferiores a 14 °C. Essa injúria é caracterizada por alterações na fisiologia do amadurecimento dos frutos, com o aparecimento de manchas escuras na casca e manchas marrons na polpa (JIANG et al., 2004; NGUYEN et al., 2003; YANG et al., 2000).

Os sintomas de danos pelo frio variam entre as diferentes cultivares de bananas e parecem estar relacionados com o grupo genômico. Lichtemberg et al. (2001) observaram que o genoma das cultivares do grupo B (B - *Musa balbisiana*) confere maior resistência a baixas temperaturas quando comparadas com o grupo AAA (A - *Musa acuminata*). Confirmando essa observação, a cultivar Prata (grupo AAB) parece ser mais tolerante ao armazenamento sob baixas temperaturas (cerca de 12 °C) do que a cultivar Nanicão (AAA) (semelhante a Grand Naine) (LICHTENBERG et al., 2001), o que possibilita o transporte a longas distâncias sem prejudicar a qualidade do fruto. De fato, trabalhos anteriores envolvendo cultivares de Prata e Nanicão armazenadas sob baixas temperaturas mostraram que os

eventos relacionados ao amadurecimento, como degradação de amido, acúmulo de sacarose e níveis de etileno e CO₂ foram mais afetados na Nanicão do que na Prata (AGOPIAN et al., 2011). Além disso, foram encontrados níveis mais elevados de frutooligossacarídeos (FOS) na cv. Prata do que na cv. Nanicão submetidas ao frio (AGOPIAN et al., 2009). Com esses precedentes decidimos focar nosso trabalho nos compostos relacionados ao aroma e sabor da banana madura que poderiam ser afetados pelo armazenamento a baixas temperaturas, uma vez que esses atributos são importantes para a qualidade dos frutos.

Compostos voláteis de diferentes cultivares de bananas têm sido amplamente estudados por diversos autores no mundo: FLHORBAN 920 e Grand Naine (BUGAUD et al., 2009); Gran Enano, um subgrupo da Cavendish originária das Américas Central e Sul (VERMEIR et al., 2009), diferentes cultivares da Ilha da Madeira (NOGUEIRA et al., 2003); bananas de Honduras (*M. sapientum* L. var. Cavendish) e suas essências aquosas (JORDAN et al., 2001); compostos voláteis livres e ligados glicosidicamente das cultivares Valery e Pequeña Enana (PEREZ et al., 1997), frutos de banana (*Musa cavendishii* L.) das cultivares Gran Enana e Enana das ilhas Canárias e a Enana da Colômbia (CANO et al., 1997); bananas das Filipinas (Delmonte, cultivar Cavendish), bananas de Taiwan (cultivar Sen-nin) e banana Delicious (híbrido entre Filipinas e Taiwan) (SHIOTA, 1993). Voláteis provenientes dos frutos, néctares comerciais e aromas industrializados também foram investigados por Salmon et al. (1996). Geralmente os ésteres tais como acetato de butila, acetato de isoamila, acetato de etila, butanoato de butila e isobutanoato de isoamila são relatados como responsáveis pelo aroma característico de banana e constituem a principal classe de compostos presentes no perfil de voláteis da banana (SALMON et al., 1996).

Nos últimos anos, novas técnicas têm sido desenvolvidas para a análise de compostos voláteis, as quais estão atraindo a atenção de analistas e pesquisadores, uma vez que proporcionam mínima manipulação da amostra, permitindo o isolamento e enriquecimento dos compostos em uma única operação. Dentre essas técnicas, a Microextração em Fase Sólida (SPME), desenvolvida por Arthur e Pawliszyn (1990) tem como principal vantagem o bom desempenho analítico, combinada com a simplicidade e o baixo custo, sendo ideal para aplicações de espectrometria de massas (VAS; VÉKEY, 2004).

Na análise estatística multivariada, a análise de componentes principais (PCA), é uma ferramenta estatística amplamente utilizada para gerar perfis que evidenciem as diferenças entre as amostras (BRERETON, 2007). Grande ênfase tem sido dada à análise de dados multivariados, em que se pode analisar muitas variáveis simultaneamente, ao analisar uma amostra, e, é atualmente apontado como a melhor alternativa para a interpretação de dados e adquirir o máximo de informação (MANLY, 2008; BRERETON, 2007).

A maioria dos trabalhos apresentam resultados de voláteis da polpa da banana, mas aqui, com o estudo de compostos voláteis a partir de frutos inteiros mostraremos que os compostos voláteis podem ultrapassar a barreira da casca, os quais também são afetados pelas condições de armazenamento. Assim, o objetivo deste estudo foi determinar como o armazenamento sob baixas temperaturas afeta a composição de voláteis de duas cultivares de banana: 'Nanicão' e 'Prata' usando metodologias para a análise do fruto inteiro e da polpa.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1 Material

Os frutos das cultivares Nanicão (*Musa acuminata*, AAA) e Prata (*M. acuminata* X *M. balbisiana*, AAB) foram obtidos junto à CEAGESP (Companhia de Entrepósitos e Armazéns Gerais de São Paulo), no estágio verde após 1 dia de colheita. A cv. Nanicão foi colhida em uma plantação localizada no Vale do Ribeira (Estado de São Paulo, Brasil) e a cv. Prata, em Janaúba (Minas Gerais, Brasil). Os frutos foram colhidos pela manhã, transportados em caminhões baú para a CEAGESP, sendo depois conduzidos ao laboratório para os experimentos. Cerca de 1.000 unidades de frutos de cada cultivar foram utilizados para os experimentos.

2.2.2 Delineamento experimental

Os frutos de cada cultivar foram separados em dois grupos e armazenados em câmaras distintas a 19 °C (grupo controle) ou 13 °C (grupo frio). Outro grupo da cv. Prata foi armazenado a 10 °C. Após 15 dias, a temperatura dos frutos do grupo frio foi transferida para 19 °C para completar o amadurecimento. A produção de etileno e a emissão de CO₂ (respiração) foram medidas diariamente durante todo o experimento. A amostragem (com os frutos congelados para realização de análises posteriores) foi realizada de acordo com as mudanças observadas nos parâmetros de etileno e emissão de CO₂, a cada dois dias durante a fase pré-climatérica e diariamente durante a fase do climatério e pós-climatério. Com este propósito, cinco frutos foram selecionados de cada grupo (controle e frio), descascados, cortados, congelados em N₂ líquido e armazenados a -80 °C. As análises de voláteis foram

realizadas a cada três dias até atingir o pico de etileno para os grupos controle e frio. Após o pico de etileno, as análises de voláteis foram então realizadas diariamente.

Nota: Foram realizados dois conjuntos de experimentos para os grupos de armazenamento em baixas temperaturas, a primeira com as cultivares Nanicão e Prata armazenadas a 13 °C e o segundo com a cultivar Prata armazenada a 10 °C. Este procedimento foi realizado porque os resultados do primeiro experimento mostraram que o amadurecimento não foi completamente inibido em frutos da cv. Prata armazenados a 13 °C, mas o mesmo procedimento não pode ser feito para a cv. Nanicão devido aos danos causados pelo frio nessa cultivar. Portanto, neste trabalho, discutimos apenas os resultados do grupo frio obtidos para os voláteis da cv. Prata a 10 °C e cv. Nanicão a 13 °C.

2.2.3 Produção de etileno e taxas de respiração

Os frutos foram colocados em frascos de 3 L, a 25 °C durante 1 h (3 frutos por frasco, cinco frascos por tratamento). Após esse tempo, usando uma seringa do tipo *gas tight*, foi retirado um volume de 10 mL para análise de etileno e outro de 1 mL para a análise de CO₂, sendo injetados no cromatógrafo gasoso (HP-6890, Agilent Technologies). Um detector de ionização de chama (FID) foi utilizado para análise de etileno e um detector de condutividade térmica (TCD) para análise de CO₂. Para ambos os gases, foi utilizada a coluna HP-Plot Q ((30 m, D.I. 0,53 mm, 0,4 µm, Agilent Technologies). As temperaturas do injetor e detector foram mantidas a 250 °C e as corridas isotérmicas foram mantidas a 30 °C. Os fluxos de gás hélio foram de 1 mL.min⁻¹ para a análise de etileno e 4 mL.min⁻¹ para a análise de CO₂. As injeções foram feitas no modo *pulsed split* (5:1) para etileno e no modo *split* (50:1)

para análise de CO₂. A estimativa da quantidade de etileno e CO₂ foi feita em relação à curva obtida com padrão de etileno e CO₂ em ar sintético (*Air Liquid*).

2.2.4. Isolamento dos compostos voláteis

As condições de isolamento dos compostos voláteis foram realizadas de acordo com a metodologia otimizada descrita no Capítulo 1.

A técnica utilizada foi a de microextração em fase sólida (SPME) no espaço confinado (*headspace*) entre a amostra e a tampa de um frasco vedado. A fibra usada neste estudo foi de 50/30 mm de DVB/CAR/PDMS (divinilbenzeno / carboxeno / polidimetilsiloxano) da Supelco (Sigma-Aldrich, Bellefonte, PA, EUA), sendo pré-condicionada a 250 °C durante 30 minutos no injetor do cromatógrafo.

Para as análises do fruto inteiro, 1 Kg de banana foi inserido em um recipiente de vidro (3 L). Os tempos de equilíbrio e de exposição da fibra foram de 140 min e 120 min, respectivamente. Para as análises da polpa, fatias de banana fresca (33,3% p/p) e cloreto de sódio (20%) foram homogeneizados com água destilada em um processador do tipo Turrax. Os tempos de equilíbrio e exposição foram 15 e 60 minutos, respectivamente, sob agitação com o auxílio de uma barra magnética. Uma alíquota de 16 g foi transferida para um frasco de 30 mL. Todas as análises foram realizadas à temperatura ambiente (~ 25 °C), em duplicata.

2.2.5 Condições cromatográficas e de espectrometria de massas

A fibra de SPME foi injetada diretamente em um cromatógrafo gasoso (Hewlett-Packard 6890, Agilent Technologies Inc., Santa Clara, EUA) acoplado a um

espectrômetro de massas (CG-EM) e mantida durante 15 min para a dessorção total dos compostos voláteis. Uma coluna capilar de sílica fundida Supelcowax 10 (Supelco Inc., Bellefonte, PA, EUA) de 30 m x 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 mm de espessura de fase estacionária foi utilizada para separar os componentes voláteis. Gás hélio foi utilizado como gás de arraste a uma vazão constante de 1,0 mL.min⁻¹. A temperatura do injetor (no modo *splitless*) e do detector foi mantida a 250 °C. Na programação de temperatura do forno do cromatógrafo gasoso foi realizada uma rampa de 50 a 150 °C a 2 °C/min (LIU; YANG, 2002), com tempo total de corrida de 55 minutos. A linha de transferência MS foi mantida a 290 °C, a energia de ionização a 70 eV e faixa de massa foi de 50-550 m/z.

A produção total de voláteis foi estimada pela soma de todas as áreas dos picos identificados no cromatograma. Os índices de retenção foram calculados de acordo com a equação de *Van den Dool* e *Kratz* (MJOS et al., 2006) para uma solução de alcanos (C9-C22) injetada sob as mesmas condições no GC-MS. A identificação dos compostos foi baseada na forma de fragmentação por meio da comparação do espectro de massas do composto desconhecido com os espectros de massas da biblioteca NIST (NIST98, versão 2.0, Gaithersburg, EUA), utilizando o critério de um mínimo de 75% de similaridade.

2.2.6 Análise estatística

Devido a complexidade do experimento, os ésteres majoritários dos grupos controle e frio foram submetidos à análise de regressão linear utilizando somente os dados dos frutos maduros. Os dados de cada cultivar foram processados separadamente com as condições de armazenamento definidas como variáveis

preditoras (x) e a abundância dos voláteis majoritários como variáveis de resposta (y). O programa utilizado para esta finalidade foi o SAS 9.2 (SAS Institute, Cary, NC, EUA).

A análise estatística multivariada utilizada para apresentar e visualizar os dados em alta dimensão em relação à influência das baixas temperaturas sobre a produção de voláteis durante todo o amadurecimento foi a Análise de Componentes Principais (ACP) com o auxílio do programa XLSTAT-MX.

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.3.1 Respiração e etileno durante o amadurecimento

A Figura 2.1 apresenta a produção de etileno e CO₂ de ambas as cultivares sob diferentes condições de armazenamento. Observou-se que a baixa temperatura inibiu a produção de etileno e CO₂, com exceção da banana Prata armazenada a 13 °C, ou seja, a temperatura de 13 °C apenas inibiu parcialmente a produção de CO₂ e de etileno, mas não interrompeu completamente a maturação do fruto. No entanto, quando os frutos dessa cultivar foram armazenados a 10 °C, a produção de etileno e de CO₂ foram inibidas satisfatoriamente. O pico de etileno para o grupo controle (19 °C) ocorreu no 11º e 4º dia pós colheita (DPC) para as cultivares Nanicão e Prata, respectivamente (Figura 2.1). Os níveis de etileno foram mais altos na cv. Prata, com uma consequente vida pós-colheita mais curta quando comparada à cv. Nanicão. Em resposta às baixas temperaturas, os níveis basais permaneceram baixos durante todo o período sob baixas temperaturas para ambas as cultivares. O aumento do pico de etileno para o grupo frio foi semelhante para as duas cultivares e ocorreu no 18º DPC, três dias após a temperatura ter sido transferida para 19 °C. Assim, as

baixas temperaturas de armazenamento (13 °C para a cv. Nanicão e 10 °C para a cv. Prata) foram suficientes para inibir o processo de maturação com a redução dos níveis de etileno e respiração.

Figura 2.1. Etileno e respiração (evolução de CO_2) das bananas das cultivares Nanicão e Prata durante o armazenamento em baixas temperaturas e maturação. Os desvios padrão da análise estão indicados pelas barras verticais ($n = 4$). As linhas tracejadas verticais delimitam o tempo em que os frutos do grupo frio permaneceram em baixas temperaturas.

2.3.2 Voláteis em frutos de banana

A produção de compostos voláteis é, de fato, dependente da produção de etileno, o hormônio associado com o amadurecimento dos frutos (KERBAUY, 2008). Apenas três dias após o pico de etileno, verificou-se um grande aumento na

produção dos compostos voláteis (Figura 2.2). Para a cv. Nanicão a 19 °C, do 1º DPC até o 13º DPC, tanto os frutos inteiros quanto a polpa, apresentaram baixa produção de compostos voláteis, mas no 14º DPC, os compostos majoritários apareceram e aumentaram a produção até o 18º DPC. Para as amostras do grupo controle da cv. Prata (19 °C), os compostos voláteis majoritários aumentaram no 9º DPC no fruto inteiro e no 10º DPC na polpa. Nas amostras do grupo frio, após os 15 dias de armazenamento, quando a temperatura foi alterada para 19 °C, uma explosão ocorreu no 21º DPC em todas as amostras.

Figura 2.2. Produção de voláteis da polpa e do fruto inteiro de bananas das cultivares Nanicão e Prata durante o amadurecimento. Os desvios padrão da análise estão indicados pelas barras verticais ($n = 2$). As linhas tracejadas verticais delimitam o tempo em que os frutos do grupo frio permaneceram em baixas temperaturas. As setas indicam o pico de etileno.

O Apêndice 1 apresenta a tabela com a identificação dos compostos voláteis e os seus Índices de Retenção. Devido à complexidade do experimento, ao número de compostos voláteis identificados e ao objetivo do presente estudo, foram apresentados os valores das áreas dos picos obtidos por GC-MS, que não representam as quantidades verdadeiras dos voláteis nas amostras e são apenas um parâmetro utilizado para comparar os efeitos das condições do armazenamento em baixas temperaturas sobre o perfil de voláteis das amostras de banana. Para uma melhor apresentação dos resultados, as áreas relativas dos compostos foram computadas da seguinte maneira:

(i) frutos verdes: as áreas dos compostos detectados nas amostras da cv. Nanicao e cv. Prata foram tabuladas no 10º e 3º DPC, respectivamente, para o grupo controle, e no 15º DPC para o grupo frio (em ambas as cultivares);

(ii) para os frutos maduros, as áreas dos compostos voláteis do grupo controle foram tabuladas no 16º DPC (cv. Nanicao), 11º DPC (cv. Prata) e 23º DPC para amostras do grupo frio (ambas as cultivares).

No total, noventa e três compostos foram identificados na fração volátil das duas cultivares de bananas usando as duas metodologias: polpa e fruto inteiro. Para cv. Prata, 45 compostos foram identificados na polpa durante o amadurecimento e 39 no fruto inteiro. Para a cv. Nanicao, 55 e 42 compostos foram detectados na polpa e fruto inteiro, respectivamente.

Em relação à caracterização química, as frequências de todos os grupos químicos funcionais detectados nesse estudo, em cada metodologia, foram computados (Figura 2.3). Nos frutos verdes, apenas um álcool e alguns terpenos foram detectados nos frutos inteiros, enquanto que na polpa foram encontrados

aldeídos e álcoois. Nos frutos maduros, o grupo dos ésteres foi o majoritário, seguido dos álcoois, cetonas e terpenos.

Figura 2.3. Número de compostos voláteis por grupo químico funcional detectados nas bananas cv. Nanicao e cv. Prata do fruto inteiro e polpa. Os desvios padrão estão indicados pelas barras verticais.

Os **terpenos** foram os compostos predominantes nas bananas verdes nas duas cultivares, em relação aos voláteis do fruto inteiro (~ 10 terpenos) (Figura 2.3). As principais propriedades físico-químicas dos terpenos são baixa solubilidade em água, alta volatilidade e citotoxicidade (SCHRADER, 2007). Terpenos, principalmente monoterpenos, são os principais compostos que contribuem para o sabor de cítricos e outras frutas. Eles são biossintetizados pela via isoprenóide, com o ácido mevalônico como composto precursor (LINDSAY, 1996). Na cv. Nanicao

foram detectados terpenos tais como α -pineno, limoneno e uma pequena quantidade de eugenol (Apêndice 1). Esses compostos são freqüentemente encontrados em óleos essenciais e flores (HAZZIT et al., 2006; KAUL et al., 1999; TAYOUB et al., 2006) e contribuem com notas de ervas e floral (JORDAN et al., 2001; NOGUEIRA et al., 2003). O eugenol não foi detectado na cv. Prata, mas foi encontrado em um estudo realizado em várias cultivares de banana na Ilha da Madeira (NOGUEIRA et al., 2003).

O único **álcool** detectado nos frutos inteiros verdes da cv. Nanicão, foi o 2-etil-1-hexanol. Após a maturação, os compostos 3-metil-1-butanol (álcool isoamílico) e o 2-heptanol foram detectados em todas as amostras (polpa e frutos inteiros das duas cultivares). Esses compostos contribuem com notas pungentes e frutados (JORDAN et al., 2001). Os compostos 1-pentanol e 1-hexanol apareceram apenas em amostras da polpa. No entanto, o 3-hexenol, 1-heptanol, (Z)-3-octen-1-ol, (Z)-5-octen-1-ol e nonanol foram detectados apenas na polpa da cv. Nanicão. Durante a maturação, o metabolismo dos frutos desenvolve meios de converter uma parte dos ácidos graxos em ésteres, cetonas e álcoois (como o 3-metil-1-butanol), os quais são compostos voláteis importantes em muitas frutas com distintos odores (JIANG; SONG, 2010; LINDSAY, 1996; TRESSL; DRAWERTL, 1973).

Os **aldeídos** não foram detectados nos frutos inteiros. Na cultivar Nanicão, foram encontrados apenas na polpa do fruto verde (hexanal, 2-hexenal, (E)-2-heptanal, e outros) sendo o grupo funcional majoritário nesses frutos. Na cultivar Prata, esses compostos apareceram na polpa dos frutos verdes e maduros. Os aldeídos são formados pela oxidação de ácidos graxos insaturados. O nonanal e o decanal são formados pela oxidação do ácido oléico; hexanal, E-2-octenal e E-2-

nonenal pela auto-oxidação do ácido linoléico, e E-2-hexenal, E-2-heptenal e (E, Z) - 2,6-nonadienal pela auto-oxidação do ácido linolênico (BELITZ et al., 2009).

Cada aldeído tem um odor distinto, que pode afetar o aroma da banana. Por exemplo, nonanal tem um odor frutado, de gordura ou de sabão; decanal tem um odor de casca de laranja; hexanal, odor de folha, verde ou gorduroso; E-2-octenal tem um odor gorduroso e de nozes; E-2-nonenal, odor de pepino ou gorduroso; E-2-hexenal, odor de maçã; E-2-heptenal, odor gorduroso e amêndoa amarga e (E, Z)-2,6-di-nonadienal tem um odor de pepino (BELITZ et al., 2009). No entanto, os aldeídos não foram detectados em frutos inteiros, porque a sua concentração ou a volatilidade eram demasiado baixas para superar a barreira da casca da banana. Um estudo feito com maçã mostrou que existe uma relação entre a baixa produção de voláteis do aroma, os baixos níveis de ácidos graxos livres e baixos conteúdos de ATP (SONG; BANGERTH, 2003).

A **cetona** 2-pentanona foi a cetona mais abundante em todas as amostras, detectada somente nos frutos maduros. Além disso, a 2-heptanona e 2-undecanona foi detectada na cv. Nanicão e 2-nonanona na cv. Prata. A presença desses compostos é devida à oxidação de lipídios (BELITZ et al., 2009). Cetonas metiladas contribuem para o aroma com notas frutadas de banana (2-pentanona), perfumadas e herbáceas (2-heptanona), de flores ou gordura (2-nonanona) (BELITZ et al., 2009).

Ésteres foram os compostos mais abundantes detectados nas bananas maduras das duas cultivares, correspondendo a mais de 50% dos compostos identificados. Ésteres de frutas são formadas pela reação entre álcoois e Acyl-CoA derivados a partir dos ácidos graxos e do metabolismo de aminoácidos. Essa reação é catalisada pela enzima álcool acil transferase (AAT) (PEREZ et al., 1997).

O desenvolvimento de um aroma agradável durante o amadurecimento dos frutos ocorre devido ao metabolismo de aminoácidos ramificados, como leucina, por exemplo, com desaminação e descarboxilação. Em seguida, um aldeído é formado, o qual pode ser transformado no seu álcool correspondente, e, com a adição de ácido acético, produz acetato de isoamila (acetato de 3-metil-1-butanol), o qual é considerado um composto volátil de impacto em banana, pois contribui diretamente para o seu aroma característico (BERGER, 1991; JIANG; SONG, 2010; MCGORRIN, 2002; RODRIGUEZ-AMAYA, 2003).

Terpenos, álcoois, aldeídos e cetonas contribuem diretamente para o sabor da fruta madura, mas os ésteres são considerados compostos de impacto da banana. Na composição volátil e dos componentes de odores ativos de essência comercial da banana e polpa do fruto fresco (JORDAN et al., 2001), cada éster apresentou descritores distintos: acetato de 2-pentanol teve notas herbal, adocicada e floral; acetato de 3-metil-1-butanol (acetato de isoamila) teve odor adocicado e de banana madura; butanoato de butila teve odor pungente e de grama; butanoato de 3-metilbutila (butanoato de isoamila) teve odor frutal, notas florais e ácidas; e acetato de 2-metilpropil (acetato de isobutila) apresentou odores de plástico, rançoso e pungente (JORDAN et al., 2001). A maioria desses compostos foram classificados como compostos majoritários nesse estudo.

2.3.3 Compostos voláteis produzidos após o armazenamento sob baixas temperaturas

2.3.3.1 Efeito do armazenamento sobre os compostos voláteis majoritários

O efeito do armazenamento em baixas temperaturas sobre as abundâncias dos compostos majoritários foram processados por meio de regressão linear.

Na **cv. Nanicão**, os ésteres acetato de 2-pentila, acetato de 3-metil-1-butila, butanoato de 2-metilpropila, 3-metilbutanoato de 2-metilpropila, butanoato de butila, butanoato de 3-metilbutila e 3-metilbutanoato de 3-metilbutila foram os voláteis mais abundantes na banana madura de ambos os grupos (controle e frio). A análise de regressão (Tabela 2.1) revelou que, exceto para o composto 3-metilbutanoato de 3-metilbutila, todos os ésteres majoritários foram afetados ($p < 0,05$) pela baixa temperatura da polpa e de frutos inteiros, com valores dos coeficientes estimados negativos (β coeficientes) em todos os compostos, indicando que durante o armazenamento em baixa temperatura ($13\text{ }^{\circ}\text{C}$), a abundância desses compostos tende a diminuir. O coeficiente de determinação (R^2), que dá a porcentagem da variação total explicada pela regressão, foi maior quanto mais significativo foi o efeito do armazenamento.

Tabela 2.1 Estimativa dos parâmetros do modelo de regressão linear para os compostos voláteis majoritários da banana cv. Nanicão do grupo frio (13 °C) comparado com o grupo controle (19 °C).

Compostos majoritários	R ²	Equação do modelo	Valor p
Polpa			
acetato de 2-pentilal (Y ₁)	0,85	Y ₁ = 1,8E+08 - 1,7E+08x	0,0001
acetato de 3-metil-1-butila (Y ₂)	0,92	Y ₂ = 5,8E+08 - 5,6E+08x	<0,0001
butanoato de 2-metilpropila (Y ₃)	0,84	Y ₃ = 1,7E+08 - 1,6E+08x	0,0002
3-metilbutanoato de 2-metilpropila (Y ₄)	0,68	Y ₄ = 1,0E+08 - 9,1E+07x	0,0031
butanoato de butila (Y ₅)	0,72	Y ₅ = 1,65E+08 - 1,0E+08x	0,0019
butanoato de 3-metilbutila (Y ₆)	0,58	Y ₆ = 5,3E+08 - 4,5E+08x	0,0100
3-metilbutanoato de 3-metilbutila (Y ₇)	0,39	Y ₇ = 3,7E+08 - 3,2E+08x	0,0544
Fruto inteiro			
acetato de 2-pentila (Y ₁)	0,78	Y ₁ = 2,4E+08 - 2,1E+08x	0,0007
acetato de 3-metil-1-butila (Y ₂)	0,65	Y ₂ = 1,8E+08 - 1,7E+08x	0,0045
butanoato de 2-metilpropila (Y ₃)	0,78	Y ₃ = 3,8E+08 - 3,4E+08x	0,0006
3-metilbutanoato de 2-metilpropila (Y ₄)	0,55	Y ₄ = 3,9E+08 - 3,4E+08x	0,0143
butanoato de butila (Y ₅)	0,42	Y ₅ = 5,1E+08 - 3,8E+08x	0,0407
butanoato de 3-metilbutila (Y ₆)	0,85	Y ₆ = 1,8E+09 - 1,6E+09x	0,0001
3-metilbutanoato de 3-metilbutila (Y ₇)	0,31	Y ₇ = 1,5E+09 - 1,2E+09x	0,0936

Na cv. **Prata**, acetato de 2-pentila, acetato de 3-metil-1-butila, butanoato de 2-metilpropila, 2-metilpropanoato de 3-metilbutila, 2-metilpropanoato de 1-metilbutila, butanoato de 3-metilbutila e 3-metilbutanoato de 3-metil-butila foram os compostos voláteis mais abundantes. A Tabela 2.2, mostra que nenhum composto foi significativamente afetado pelo frio ($p > 0,05$), ou seja, mesmo com o armazenamento a 10 °C (abaixo da temperatura em que a cv. Nanicão foi submetida), os valores dos coeficientes estimados negativos (o que significa que a abundância diminui com o armazenamento) ou positivos (em que a abundância

aumentou com a temperatura de armazenamento) não foram estatisticamente significativos para esta cultivar.

Tabela 2.2. Estimativa dos parâmetros do modelo de regressão linear para os compostos voláteis majoritários da banana cv. Prata do grupo frio (10 °C) comparado com o grupo controle (19 °C).

Compostos majoritários	R ²	Equação do modelo	Valor p
Polpa			
acetato de 2-pentila (Y ₁)	0.0004	Y ₁ = 8.9E+07 – 2.0E+06x	0.9603
acetato de 3-metil-1-butila (Y ₂)	0.25	Y ₂ = 1.8E+08 – 9.1E+07x	0.2032
butanoato de 2-metilpropila (Y ₃)	0.21	Y ₃ = 9.6E+07 – 5.1E+07x	0.2512
2-metilpropanoato de 3-metilbutila (Y ₄)	0.37	Y ₄ = 5.2E+07 – 4.9E+07x	0.1101
2-metilpropanoato de 1-metilbutila (Y ₅)	0.1045	Y ₅ = 1.1E+08 + 9.4E+07x	0.4347
butanoato de 3-metilbutila (Y ₆)	0.30	Y ₆ = 7.3E+08 – 3.8E+08x	0.1595
3-metilbutanoato de 3-metilbutila (Y ₇)	0.47	Y ₇ = 3.5E+08 - 3.3E+08x	0.0602
Fruto inteiro			
acetato de 2-pentila (Y ₁)	0.008	Y ₁ = 2.6E+08 + 2.0E+07x	0.8329
acetato de 3-metil-1-butila (Y ₂)	0.24	Y ₂ = 3.1E+08 – 1.9E+08x	0.2214
butanoato de 2-metilpropila (Y ₃)	0.20	Y ₃ = 1.3E+08 – 7.1E+07x	0.2656
2-metilpropanoato de 3-metilbutila (Y ₄)	0.35	Y ₄ = 7.4E+07 – 6.9E+07x	0.1239
2-metilpropanoato de 1-metilbutila (Y ₅)	0.28	Y ₅ = 4.8E+08 + 3.0E+08x	0.1752
butanoato de 3-metilbutila (Y ₆)	0.0010	Y ₆ = 4.4E+08 + 2.2E+07x	0.9408
3-metilbutanoato de 3-metilbutila (Y ₇)	0.29	Y ₇ = 4.1E+08 - 3.8E+08x	0.1722

2.3.3.2 Efeito do armazenamento sobre todo o perfil de voláteis da banana durante o amadurecimento

Neste estudo, a análise de componentes principais (ACP) foi usada para explorar as interdependências entre os voláteis analisados. Os gráficos que representam as amostras estão rotulados como A e os gráficos das variáveis

(compostos voláteis) estão rotulados como B, ambos posicionados no espaço definido pelas duas primeiras componentes (F1 vs F2).

Para a **cv. Nanicão** (Figura 2.4), as duas primeiras componentes explicaram 50,95% da variabilidade entre as amostras. A primeira componente separou as amostras do início do amadurecimento, ou seja, antes do pico de etileno (no lado esquerdo do gráfico) das amostras após o pico de etileno (no lado direito do gráfico). A segunda componente separou os frutos maduros em relação à predominância de voláteis, com o grupo controle (polpa e fruto inteiro) situados na parte superior e o grupo frio no quadrante inferior do gráfico (Figura 2.4-A).

Figura 2.4. Análise de componentes principais dos compostos voláteis da banana cv. Nanicao. Código das amostras: PC = polpa do grupo controle (19 °C) na cor vermelha; PL = polpa do grupo frio (13 °C) na cor azul; C = fruto inteiro do grupo controle (19 °C), em cor-de-rosa; L = fruto inteiro do grupo frio (13 °C), na cor verde. Números de 1 a 24 referem-se aos dias pós colheita (DPC). Frutos maduros (19 °C): DPC 16, 17 e 18. Frutos maduros (13 °C): DPC 22, 23 e 24. Os números das variáveis referem-se aos compostos voláteis do Apêndice 1.

Nos frutos inteiros, observou-se que as amostras no início do amadurecimento (amostras C1 e L1) apresentaram uma elevada produção de terpenos, tais como α -pineno, m-xileno, limoneno, α -ocimeno, α -cedreno e α -cariofileno. O grupo controle manteve esse perfil até o 12º DPC e, em seguida, começou a produzir outros compostos, principalmente ésteres e álcoois, ou seja, após o pico de etileno (que ocorreu no dia 11º DPC), uma explosão da produção de voláteis começou no 14º e 15º DPC (amostras C14 e C15), as quais estão altamente correlacionados com os compostos 3-metil-1-butanol, 3-metilbutanoato de 3-metilbutila e hexanoato de butila. Os frutos maduros do grupo controle (C16 a C18) tiveram a produção de ésteres aumentados (acetato de 2-pentila, acetato de 3-metil-1-butila, butanoato de etila, hexanoato de 2-metilpropila, pentanoato de hexila, butanoato de pentila, hexanoato de pentila, pentanoato de 3-metil-butila, pentanoato de 3-metil-3-butenila, dentre outros), assim como os terpenos (β -cedreno e eugenol) e os álcoois (nonanol e 2-heptanol). No entanto, o grupo frio manteve uma predominância de terpenos até o 21º DPC (L21). Os frutos maduros (L22 a L24) se situaram próximos do centro do gráfico, que corresponde à produção de álcoois (Z)-5-octenol e (Z)-3-octenol e ésteres de hexanoato de butila e acetato de hexila. Pode-se observar que as amostras do grupo frio situaram-se distantes do grupo controle no gráfico.

A polpa dos frutos armazenados a 19 °C (grupo controle) apresentou uma elevada produção de aldeídos e álcoois (PC1 a PC7) nos primeiros dias de armazenamento. No 14º DPC, a produção de ésteres, álcoois e terpenos aumentou fortemente, mas os perfis de voláteis da polpa dos frutos no estágio maduro (PC15 a PC18) revelaram uma menor concentração de ésteres do que no fruto inteiro (C16 a C18). As amostras do grupo frio iniciaram com uma predominância de aldeídos e

álcoois, mas com uma intensidade menor do que o das amostras do grupo controle. Com a maturação, a produção desses aldeídos e álcoois foi diminuindo, e a produção de ésteres e terpenos foi aumentando. Os frutos maduros do grupo frio (PL21 a PL24) apresentaram-se com perfis pobres de compostos voláteis, sem grande variação durante o amadurecimento, e situaram-se longe das amostras do grupo controle (PC15 a PC18).

Na Figura 2.5, referente a **cv. Prata**, as duas primeiras componentes explicaram 53,34% da variabilidade entre as amostras. A primeira componente separou as amostras em relação ao grau de maturação dos frutos e a segunda componente separou-as em relação ao tipo de amostra analisada: polpa e fruto inteiro, com as amostras da polpa (grupos controle e frio) situadas no quadrante superior, que é a região de compostos com maior quantidades de voláteis, indicando que o perfil de voláteis da polpa é mais rico do que o dos frutos inteiros (localizados no quadrante inferior).

Figura 2.5. Análise de componentes principais dos compostos voláteis da banana cv. Prata. Código das amostras: PC = polpa do grupo controle (19 °C) na cor vermelha; PL = polpa do grupo frio (10 °C) na cor azul. C = fruto inteiro do grupo controle (19 °C), em cor-de-rosa; L = fruto inteiro do grupo frio (10 °C), na cor verde. Números de 1 a 24 referem-se aos dias pós colheita (DPC). Frutos maduros (19 °C): DPC 16, 17 e 18. Frutos maduros (10 °C): DPC 22, 23 e 24. Os números das variáveis referem-se aos compostos voláteis do Apêndice 1.

Para essa cultivar, o comportamento dos voláteis nos grupos controle e frio foi semelhante. Nos frutos inteiros, as amostras (C1 a C9 do grupo controle e L1 a L20 do grupo frio) iniciaram o amadurecimento com a produção de terpenos (α -pineno, β -mirceno, α -ocimeno, perileno, α -cedreno, β -cedreno, muurolene, β -farneseno) e um álcool (1-hepten-4-ol), enquanto na polpa (PC1 a PC9 e PL1 a PL20 nos grupos controle e frio, respectivamente), os voláteis eram aldeídos (2-hexenal, hexanal, nonanal, decanal) e álcoois (1-hexanol, 3-hexenol, (Z)-6-nonenol). Durante a maturação, um aumento na produção de ésteres e álcoois metilados foi observada. No final do processo de maturação, o grupo controle e as amostras do grupo frio não diferiram em relação à composição de voláteis, ou seja, as amostras dos frutos inteiros maduros de ambas as temperaturas (C10 a C13 do controle e L21 a L23 do grupo frio) apresentaram perfis muito similares, e as amostras das polpas (PC10 a PC13, PL21 a PL23) também se situaram próximas no gráfico, indicando uma forte associação entre os grupos controle e frio.

2.4 CONCLUSÃO

Em ambas as cultivares, os perfis de voláteis do fruto inteiro e da polpa são diferentes no estágio verde, mas nos frutos maduros são semelhantes, tendo os mesmos compostos majoritários responsáveis pelo aroma da banana. Nas condições de armazenamento a baixas temperaturas, o mesmo comportamento foi observado pelas análises realizadas com as duas metodologias (polpa e fruto inteiro).

Esse estudo mostrou que pela análise estatística multivariada, é possível diferenciar as amostras dos grupos controle e frio sendo que a cv. Nanicão foi bastante afetada pela temperatura de armazenamento (13 °C). Por outro lado, a cv. Prata é mais tolerante à refrigeração (10 °C), sendo observado um menor impacto em relação aos seus componentes voláteis. Uma vez que os compostos voláteis são responsáveis pelo aroma do fruto, este atributo é importante em relação à sua aceitabilidade junto aos consumidores. O conhecimento deste fato pode ser útil para a indústria e para a exportação, em que as condições de transporte acontecem em baixas temperaturas, a fim de escolher a cultivar com menos impacto na composição do aroma.

2.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGOPIAN, R. G. D.; PERONI-OKITA, F. H. G.; SOARES, C. A.; MAINARDI, J. A.; NASCIMENTO, J. R. O.; CORDENUNSI, B. R.; LAJOLO, F. M.; PURGATTO, E. Low temperature induced changes in activity and protein levels of the

enzymes associated to conversion of starch to sucrose in banana fruit.

Postharvest Biology and Technology, v. 62, p. 133–140, 2011.

AGOPIAN, R. G. D.; PURGATTO, E.; CORDENUNSI, B. R.; LAJOLO, F. M..

Synthesis of fructooligosaccharides in banana 'Prata' and its relation to invertase activity and sucrose accumulation. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 10765–10771, 2009.

ARTHUR, C. L.; PAWLISZYN, J. Solid-phase microextraction with thermal desorption

using fused silica optical fibers. **Analytical Chemistry**, v. 62, p. 2145-2148, 1990.

BELITZ, H. D.; GROSCH, W.; SCHIEBERLE, P. Food Chemistry. (4th ed.). Berlin:

Springer-Verlag, (Chapter 5), 2009.

BERGER, R. C. Fruits I. In: H. Maarse (Ed.) Volatile Compounds in Foods and

Beverages, New York: Marcel Dekker Inc, p. 283-304, 1991.

BRERETON, R. G. Applied Chemometrics for Scientists. Chinchester: John & Wiley

Sons Ltd., p. 145-248, 2007.

BUGAUD, C.; ALTER, P.; DARIBO, M. O.; BRILLOUET, J. M. Comparison of the

physico-chemical characteristics of a new triploid banana hybrid, FLHORBAN 920, and the Cavendish variety. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 89, p. 407–413, 2009.

CANO, M. P.; ANCOS, B.; MATALLANA, M. C.; CÁMARA, M.; REGLERO, G.;

TABERA, J. Differences among Spanish and Latin-American banana cultivars: morphological, chemical and sensory characteristics. **Food Chemistry**, v. 59, p. 411–419, 1997.

- HAZZIT, M.; BAALIOUAMER, A.; FALEIRO, M.L.; MIGUEL, M. G. Composition of the Essential Oils of Thymus and Origanum Species from Algeria and Their Antioxidant and Antimicrobial Activities. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 6314-6321, 2006.
- JIANG, Y.; JOYCE, D. C.; JIANG, W.; LU, W. Effects of chilling temperatures on ethylene binding by banana fruit. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 43, p. 109–115, 2004.
- JIANG, Y.; SONG, J. Fruits and Fruit Flavor: Classification and Biological Characterization. In Y. H. Hui (Ed.), Handbook of fruit and vegetable flavours, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., p. 3-24, 2010.
- JORDAN, M. J.; TANDON, K.; SHAW, P. E.; GOODNER, K. L. Aromatic profile of aqueous banana essence and banana fruit by gas chromatography - mass spectrometry (GC-MS) and gas chromatography-olfactometry (GC-O). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 4813–4817, 2001.
- KAUL, V. K.; GUJRAL, R. K.; SINGH, B. Volatile constituents of the essential oil of flowers of Rosa brunonii Lindl. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 14, p. 9-11, 1999.
- KERBAUY, G. B. Frutificação e amadurecimento. In G. B. Kerbaury (Ed.), Fisiologia vegetal. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 358-383, 2008.
- LICHTENBERG, L. A.; MALBURG, J. L.; HINZ, R. H. Cold Damage in Bananas. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 23, p. 568-572, 2001.
- LINDSAY, R. C. Flavors. In: O. W. Fenema (Ed.) Food Chemistry, New York: Marcel Dekker Inc., p. 723-765, 1996.

- LIU, T.; YANG, T. Optimization of Solid-Phase Microextraction Analysis for Studying Change of Headspace Flavor Compounds of Banana during Ripening. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 653-657, 2002.
- MANLY, B. J. F. Métodos estatísticos multivariados: uma introdução, Porto Alegre. Artmed-Bookman, p.13-46, 2008.
- MCGORRIN, R. G. Character Impact Compounds: Flavors and Off-Flavors in Foods. In: R. Marsili (Ed.), Flavor, Fragrance and Odor Analysis, New York: Marcel Dekker Inc., p. 375-413, 2002.
- MJOS, S. A.; MEIER, S.; BOITSOV, S. Alkylphenol retention indices. **Journal of Chromatography A**, v. 1123, p. 98–105, 2006.
- NGUYEN, T. B.; KETSA, S.; VAN DOORN, W. G. Relationship between browning and the activities of polyphenol oxidase and phenylalanine ammonia lyase in banana peel during low temperature storage. **Postharvest Biology and Technology**, v. 30, p. 187–193, 2003.
- NOGUEIRA, J. M.; FERNANDES, P. J.; NASCIMENTO, A. M. Composition of volatiles of banana cultivars from Madeira Island. **Phytochemical Analysis**, v. 14, p. 87–90, 2003.
- PÉREZ, A. G.; CERT, A.; RIOS, J. J.; Olias, J. M. Free and glycosidically bound volatile compounds from two banana cultivars: Valery and Pequena Enana. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, p. 4393–4397, 1997.
- RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Rotas bioquímicas e químicas para a formação de compostos voláteis em alimentos. In M. R. B. Franco (Ed.), Aroma e sabor: temas atuais São Paulo: Livraria Varela, p. 177-194, 2003.

- SALMON, B.; MARTIN, G. J.; REMAUD, G.; FOUREL, F. Compositional and Isotopic Studies of Fruit Flavours. Part I. The Banana Aroma. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 11, p. 353-359, 1996.
- SCHRADER, J. Microbial Flavour Products. In R. G. Berger (Ed.) Flavours and fragrances: chemistry, bioprocessing and sustainability, New York: Springer Berlin Heidelberg, p 507-571, 2007.
- SHIOTA, H. New esteric compounds in the volatiles of banana fruit (*Musa sapientum* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 41, p. 2056–2062, 1993.
- SONG J.; BANGERTH F. Fatty acids as precursors for aroma volatile biosynthesis in pre - climacteric and climacteric apple fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v. 20, p. 113–121, 2003.
- TAYOUB, G.; SCHWOB, I.; BESSIERE, J. M.; MASOTTI, V.; RABIER, J.; RUZZIER, M.; VIANO, J. Composition of volatile oils of *Styrax* (*Styrax officinalis* L.) leaves at different phenological stages. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 34, p. 705-709, 2006.
- TRESSL, R.; DRAWERTL, F. Biogenesis of Banana Volatiles. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 21, p. 560-565, 1973.
- VAS, G.; VÉKEY, K. Solid-phase microextraction: a powerful sample preparation tool prior to mass spectrometric analysis. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 39, p. 233–254, 2004.
- VERMEIR, S.; HERTOOG, M. L. A. T. M.; VANKERSCHAUVER, K.; SWENNEN, R.; NICOLAI, B. M.; LAMMERTYN, J. Instrumental based flavour characterization

of banana fruit. **LWT - Food Science and Technology**, v. 42, p. 1647–1653, 2009.

WENDA KOON, S. K.; UEDA, Y.; IMAHORI, Y.; ISHIMARU, M. Effect of short-term anaerobic conditions on the production of volatiles, activity of alcohol acetyltransferase and other quality traits of ripened bananas. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 86, p. 1475–1480, 2006.

WILLS, R.; MCGLASSON, B.; GRAHAM, D.; JOYCE, D.C. Postharvest: an introduction to the physiology & handling of fruit, vegetables & ornamentals. 4th ed. Wallingford: New South Wales University Press, p. 60-76, 1998.

YANG, F. S.; ASHRAFUZZAMAN, M.D.; NAKAMURA, N.; HAYASHI, N. Purification and characterization of polyphenol oxidase from banana. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 2732–2735, 2000.

ZHANG, H.; YANG, S.; JOYCE D. C.; JIANG, Y.; QU, H.; DUAN, X. Physiology and quality response of harvested banana fruit to cold shock. **Postharvest Biology and Technology**, v. 55, p. 154–159, 2010.

CAPÍTULO 3

INFLUÊNCIA DAS BAIXAS TEMPERATURAS SOBRE A COR E NÍVEIS DE CAROTENOIDES DA BANANA DE DIFERENTES CULTIVARES DURANTE O AMADURECIMENTO

Abstract

Different storage conditions can induce changes in the color and carotenoid profile in some fruits. The goal of this work was to evaluate the influence of low temperature storage on the color and carotenoid synthesis in two banana cultivars: Prata and Nanicão. For this purpose, carotenoids were determined by HPLC-DAD-MS/MS, and color was determined by a colorimeter. The color of the fruits was not negatively affected by the low temperature. Ten carotenoids were identified, of which the major ones were *all-trans*-lutein, *all-trans*- α -carotene and *all-trans*- β -carotene, in both cultivars. In cv. Prata, the carotenoids were reduced by low temperature. In cv. Nanicão, it was observed that the ripe samples from cold group (13 °C) were characterized by the presence of major carotenoids. This accumulation of carotenoids in this group may be due to metabolic pathways that use carotenoids have been affected by storage at low temperatures.

Keywords: CIELAB space, *trans*-lutein, *all-trans*- α -carotene, *all-trans*- β -carotene, principal component analysis, tolerance.

3.1 INTRODUÇÃO

As frutas contêm níveis significativos de compostos biologicamente ativos com funções fisiológicas e bioquímicas que beneficiam a saúde humana (TAVARINI et al., 2008). Banana é um fruto largamente consumido em muitos países e contém carotenoides, uma classe de compostos ativos que são importantes na saúde humana e essencial para a visão. Reconhece-se que os carotenoides são eficazes na proteção contra o câncer e doenças cardíacas, estimulando pesquisas intensivas sobre o papel desses compostos como antioxidantes biológicos (FRASER; BRAMLEY, 2004; DELGADO-VARGAS et al., 2000; YOUNG; LOWE, 2001; LIAN et al., 2006).

Já foram estudados o perfil de carotenoides em frutos de banana, a influência das cultivares, o estágio de maturação e os fatores genéticos e geográficos em suas vias biossintéticas (FRASER; BRAMLEY, 2004; DAVEY et al., 2007; WALL, 2006; ENGLBERGER et al., 2010). Os principais pigmentos encontrados em frutos de banana são α -caroteno (ENGLBERGER et al., 2003; WALL, 2006; ENGLBERGER et al., 2010), β -caroteno (SETIAWAN et al., 2001; ENGLBERGER et al., 2003; WALL, 2006; ENGLBERGER et al., 2010), luteína (ENGLBERGER et al., 2003; WALL, 2006) e zeaxantina (ENGLBERGER et al., 2003).

Há também numerosos estudos pós-colheita sobre as mudanças químicas durante o amadurecimento da banana sob diferentes condições de armazenamento (WENDAKOON et al., 2006; ZHANG et al., 2010; LICHTENBERG et al., 2001; SALVADOR et al., 2007; TAVARINI et al., 2008). De fato, a redução na temperatura de estocagem deve ser realizada cuidadosamente pois a banana é altamente susceptível a injúrias pelo frio e a cor da casca é usada como um preditor da vida de

prateleira (SALVADOR et al., 2007). Em bananas submetidas a temperaturas abaixo de 14 °C, a injúria pelo frio é caracterizada por alterações na fisiologia de maturação com o aparecimento de manchas escuras na casca e manchas marrons na polpa (JIANG et al., 2004, YANG et al., 2000, NGUYEN et al., 2003).

Em trabalhos recentes, as diferenças no metabolismo amido-sacarose (AGOPIAN et al., 2011) e de biossíntese de voláteis (FACUNDO et al., 2012) entre duas cultivares de bananas (cv. Nanicão e cv. Prata) armazenadas a baixas temperaturas, foram reportadas, sendo a cv. Nanicão mais sensível a baixas temperaturas, enquanto que a cv. Prata foi mais tolerante. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a influência da baixa temperatura de armazenamento em dois importantes atributos para a qualidade da banana Prata e Nanicão: o desenvolvimento da cor da casca e a síntese de carotenoides na polpa.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Material

Os frutos das cultivares Nanicão (*Musa acuminata*, AAA) e Prata (*M. acuminata* X *M. balbisiana*, AAB) no estágio verde, foram obtidos junto à CEAGESP (Companhia de Entrepósitos e Armazéns Gerais de São Paulo) em 1 dia após a colheita. A cv. Nanicão foi colhida em uma plantação localizada no Vale do Ribeira (Estado de São Paulo, Brasil) e a cv. Prata, em uma plantação localizada em Janaúba (Minas Gerais, Brasil). Cerca de 1.000 unidades de frutos de cada cultivar foram necessários para os experimentos.

Os frutos foram separados em dois grupos e armazenados em câmaras distintas com temperatura controlada: 19 °C, grupo controle e 13 °C, grupo frio. Para o grupo frio, após 15 dias de armazenamento, a temperatura foi transferida para 19 °C para completar o amadurecimento. Em um experimento separado, outro grupo da cv. Prata foi armazenada a 10 °C, pois observou-se que o processo de amadurecimento não foi completamente interrompido nessa cultivar quando armazenada a 13 °C. Esse tratamento foi realizado exclusivamente para a cv. Prata devido ao fato da cv. Nanicão apresentar sensibilidade às baixas temperaturas.

As amostras foram monitoradas diariamente quanto aos teores de etileno e CO₂. Em diferentes dias, foram selecionadas 5 unidades de amostras de cada grupo, sendo descascadas, cortadas e armazenadas em N₂ líquido a -80 °C para futuras análises. As amostras para análises de carotenoides foram escolhidas considerando-se os valores dos parâmetros a* da análise de cor.

Nota: O parâmetro a* da análise de cor escolhe melhor os pontos (DPC) para as análises, pois valores negativos (-a*) correspondem à cor verde dos frutos e positivos (+a*) correspondem à cor amarela. O parâmetro b* não é um bom parâmetro porque a direção da cor vai até o azul, e assim, durante a maturação não consegue detectar a mudança.

3.2.2 Produção de etileno e taxas de respiração

Os frutos foram colocados em frascos de 3 L, a 25 °C durante 1 h (3 frutos por frasco, cinco frascos por tratamento). Após esse tempo, usando uma seringa do tipo *gas tight*, foi retirado um volume de 10 mL para análise de etileno e outro de 1 mL para a análise de CO₂, sendo injetados no cromatógrafo gasoso (HP-6890, Agilent

Technologies). Um detector de ionização de chama (FID) foi utilizado para análise de etileno e um detector de condutividade térmica (TCD) para análise de CO₂. Para ambos os gases, foi utilizada a coluna HP-Plot Q ((30 m, D.I. 0,53 mm, 0,4 µm, Agilent Technologies). As temperaturas do injector e detector foram mantidos a 250 °C e as corridas isotérmicas foram mantidas a 30 °C. Os fluxos de gás hélio foram 1 mL.min⁻¹ para a análise de etileno e 4 mL.min⁻¹ para a análise de CO₂. As injeções foram feitas no modo *pulsed split* (5:1) para etileno e no modo *split* (50:1) para análise de CO₂. A estimativa da quantidade de etileno e CO₂ foi feita em relação à curva obtida com padrão de etileno e CO₂ em ar sintético (*Air Liquid*).

3.2.3 Análise de cor da casca

A análise de cor foi realizada utilizando um colorímetro (Color Quest-XE, Hunter Assoc. Laboratory, Reston, VA, EUA) com reflectância especular excluída (RSEX). Após a remoção da porção central de quatro frutos, os lados opostos da casca foram analisados, totalizando 8 análises ao longo dos dias pós colheita (DPC). No espaço CIELAB, foram medidos o índice de luminosidade (L^*) e as coordenadas de cromaticidade (a^* , b^*). Os parâmetros a^* e b^* indicam a direção da cor: $+a^*$ é a direção do vermelho, $-a^*$ é a do verde, $+b^*$ é a do amarelo e $-b^*$ é a direção do azul. Dois outros parâmetros também foram calculados: croma (C^*) e o ângulo de tonalidade (h). O croma dá informação sobre a intensidade da cor e o ângulo de tonalidade é o atributo usado para definir as cores, por exemplo, avermelhado, amarelado, etc. Esses parâmetros foram calculados com as seguintes fórmulas (baseado no manual Konika Minolta, 2007): $C^* = (a^{*2} + b^{*2})^{1/2}$ e $h = \tan^{-1}(b^*/a^*)$.

As análises foram realizadas a cada três dias até atingir o pico de etileno, e depois foram realizadas diariamente.

3.2.4 Extração de carotenoides

Os carotenóides da banana (15 a 20 g de polpa) foram exaustivamente extraídos com acetona (que é um solvente com polaridade intermediária) e transferido para um funil de separação com éter de petróleo/éter dietílico (2:1, v/v). O extrato foi lavado com água até a remoção completa da acetona e o solvente foi evaporado em evaporador rotativo ($T < 40\text{ }^{\circ}\text{C}$) (DE ROSSO; MERCADANTE, 2007). Os extratos foram secos sob uma corrente de nitrogênio, e armazenados no escuro sob atmosfera de nitrogênio (99,9% de pureza) a $-35\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o momento da análise por HPLC. Para evitar a degradação dos carotenóides durante a análise, a manipulação das amostras e dos extratos foi realizada em ambiente escuro e temperatura controlada de $22\text{ }^{\circ}\text{C}$. Todas as extrações foram realizadas em duplicata. Análises prévias mostraram que devido ao fato da banana ter baixo teor de gordura, não é necessário realizar a saponificação.

3.2.5. Análises por HPLC-DAD e HPLC-DAD-MS/MS.

Os extratos secos foram solubilizados em MeOH/MTBE (50:50) e filtrados em membrana de polietileno (Millipore, EUA) com poros de $0,22\text{ }\mu\text{m}$. A análise quantitativa foi realizada em HPLC Waters (Milford, Massachusetts, EUA), equipado com sistema de bombeamento quaternário (modelo 600), desgaseificador *on-line*, e sistema de injeção *Rheodyne* de $20\text{ }\mu\text{L}$ (Rheodyne LCC, Rohnert Park, EUA),

acoplado a um forno com controle de temperatura e um detector de arranjo de fotodiodos (DAD) (Waters, modelo 996). O processamento e aquisição dos dados foram feitos com o auxílio do programa Waters Millennium. Os espectros do UV-visível foram obtidos entre 260 e 600 nm e os cromatogramas foram processados a 450 nm.

Para as análises de espectrometria de massas (MS), foi usado um HPLC Shimadzu (Kyoto, Japão) equipado com sistema de bombeamento quaternário (modelo LC-20AD), desgaseificador *on-line* e sistema de injeção *Rheodyne* de 20 μ L. O equipamento inclui um detector DAD (Shimadzu, modelo SPDM20A) e um espectrômetro de massas (MS) com analisador *ion-trap* Bruker Daltonics (modelo Esquire 4000, Alemanha) com interface de ionização química à pressão atmosférica (APCI), operando no modo positivo. As condições de operação do MS foram idênticas às utilizadas por De Rosso e Mercadante (2007).

Em ambos os equipamentos de HPLC, Waters e Shimadzu, a separação de carotenoides foi realizada em coluna C₃₀ YMC (5 mm, 250 mm x 4,6 mm di), fase móvel com gradiente linear de MeOH com trietilamina a 0,1% (TEA)/MTBE a partir de 95:5 a 70:30 (v/v) em 20 min, seguido de 50:50 em 33 min mantendo essa proporção por 43 min, seguido de 95:5, em 60 min e a temperatura da coluna fixada em 32 °C. O fluxo foi de 1,0 mL/min quando a análise foi realizada no HPLC Waters. TEA foi adicionada à fase móvel, já que a recuperação em coluna C₃₀ melhorou 26% para a luteína e 64% para β -caroteno (EMENHISER et al., 1996b). Por outro lado, TEA foi excluída da fase móvel e a taxa de fluxo foi reduzida para 0,9 mL/min, quando a análise foi realizada pelo detector MS porque TEA apresenta alta afinidade, sendo facilmente ionizada na fonte APCI, e como resultado, o sinal do íon do carotenóide diminui (DE ROSSO; MERCADANTE, 2007).

Os resultados combinados dos seguintes parâmetros foram considerados para a identificação dos carotenoides: ordem de eluição na coluna C₃₀, características do espectro no UV-visível (comprimento de onda de absorção máxima (λ_{max}); estrutura fina espectral (% III/II) e intensidade dos picos *cis* (% AB/AII)); características do espectro de MS em comparação com padrões analisados nas mesmas condições e os dados disponíveis na literatura (BRITTON, 1995; STROHSCHNEIN; PURSCH; ALBERT, 1999; AMAN et al., 2005; DE ROSSO; MERCADANTE, 2007; FARIA et al., 2009; CHISTÉ; MERCADANTE, 2012).

Os carotenoides foram quantificados por HPLC, usando curvas de calibração externa para *all-trans*-luteína, *all-trans*- α -caroteno e *all-trans*- β -caroteno com um mínimo de dez níveis de concentração, escolhidos de modo a incluir todas as amostras. A quantificação dos carotenoides foi realizada por comparação da área do pico da amostra com a área do pico do padrão. Como alguns carotenoides estiveram presentes nas amostras em baixas concentrações ou os respectivos padrões não estavam disponíveis, como o di-epoxi- α -caroteno, 13-*cis*- α -caroteno, 15-*cis*- α -caroteno, 5,8-epoxi- α -caroteno e 9-*cis*- α -caroteno, esses compostos foram quantificados usando a curva de *all-trans*- α -caroteno. Os carotenoides 13-*cis*- β -caroteno e 9-*cis*- β -caroteno foram quantificados usando a curva do *all-trans*- β -caroteno. A precisão da análise foi avaliada pela variação do desvio padrão relativo entre as extrações.

3.2.6. Análises estatísticas

Os parâmetros de cor e os principais carotenoides dos grupos controle e frio foram submetidos à análise de regressão linear. Os dados de cada cultivar foram

processados separadamente, com as condições de armazenamento como variáveis preditoras (x) e os parâmetros de cores ou os carotenoides como variáveis de resposta (y). O programa utilizado para esse propósito foi o SAS 9.2 (SAS Institute, Cary, NC, EUA).

A análise estatística multivariada utilizada para apresentar e visualizar os dados em alta dimensão no que diz respeito à influência das baixas temperaturas sobre a cor e os níveis de carotenoides foi a Análise de Componentes Principais (ACP) com o auxílio do programa Statistica versão 7.1 (Statsoft Inc., Tulsa, OK, EUA).

3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1. Respiração e etileno durante o amadurecimento

A Figura 3.1 apresenta os gráficos referentes a leitura de etileno e CO₂ das amostras controle e frio das bananas cv. Nanicão e Prata em Dias Pós-Colheita (DPC).

Nos grupos controle, a produção de etileno começou a aumentar no 11º DPC na cv. Nanicão e no 4º DPC na cv. Prata. O armazenamento a 13 °C atrasou tanto a produção de etileno quanto a produção de CO₂ na cv. Nanicão, adiando o climatério desses frutos quando a temperatura foi transferida para 19 °C. Na cv. Prata, o armazenamento a 13 °C apenas inibiu parcialmente a produção de etileno e CO₂ mas não interrompeu completamente a maturação, apresentando um amadurecimento irregular (Figura 3.1). O climatério só foi completamente adiado na cv. Prata quando as bananas foram armazenadas a 10 °C. Nos dois grupos frio, o

aumento do pico de etileno foi semelhante em ambas as cultivares e ocorreu no 18º DPC, após a temperatura ter sido transferida para 19 °C.

Figura 3.1. Etileno e respiração (evolução de CO₂) das bananas cv. Nanicão e cv. Prata durante o armazenamento em baixas temperaturas e maturação. Os desvios padrão da análise estão indicados pelas barras verticais (n = 4). As linhas tracejadas verticais delimitam o tempo em que os frutos do grupo frio permaneceram em baixas temperaturas.

3.3.2 Cor dos frutos durante o amadurecimento

A Figura 3.2 apresenta os resultados encontrados para os parâmetros de cor C* e h das bananas cv. Nanicão e Prata. O efeito das baixas temperaturas foi analisado por regressão linear e está apresentado na Tabela 3.1. De um modo geral, a regressão não foi significativa ($p > 0,05$) para nenhum dos carotenoides quando

comparado o grupo frio ao grupo controle, porém, teve um baixo coeficiente de determinação, indicando que a mudança de cor dentro dos grupos foi pouco explicada pela regressão em ambas as cultivares.

Figura 3.2. Mudanças nos parâmetros de cor das bananas durante o amadurecimento em diferentes condições de temperatura de armazenamento. Os desvios padrão da análise estão indicados por barras verticais ($n = 4$). As linhas tracejadas verticais indicam o tempo de armazenamento em baixas temperaturas. (C^* : croma; h : ângulo de tonalidade; N: cv. Nanicão; P: cv. Prata).

Tabela 3.1. Estimativa dos Parâmetros do Modelo de regressão linear referente às análises de cor durante o amadurecimento das cultivares Nanicão e Prata entre os grupos controle e frio.

Parâmetros de cor	R ²	Modelo da equação	Valor p
Cultivar Nanicão			
Luminosidade (L*)	0,0010	$Y = 34,58 + 0,48x$	0,9358
Croma (C*)	0,0632	$Y = 21,66 + 1,62x$	0,5140
Ângulo de tonalidade (h)	0,0004	$Y = 89,32 - 0,40x$	0,9591
Cultivar Prata			
Luminosidade (L*)	0,0005	$Y = 33,34 - 0,08x$	0,9324
Croma (C*)	0,0152	$Y = 28,58 + 0,42x$	0,6255
Ângulo de tonalidade (h)	0,0007	$Y = 88,68 + 0,33x$	0,9161

O parâmetro h está associado ao ângulo de tonalidade, sendo calculado a partir dos parâmetros a^* (que indica a intensidade da cor verde da banana) e b^* (que indica a intensidade da cor amarela). Quanto mais altos os valores de h, mais verde é o fruto. Assim, à medida que ocorre o amadurecimento dos frutos, esse ângulo tende a diminuir como resposta ao etileno.

O valor h assume 0° para a cor vermelha, 90° para amarelo e 180° para cor verde. A Figura 3.2 mostra que para todas as amostras (controle e frio das duas cultivares), a cor verde da casca das cultivares de bananas mudou gradualmente de verde para amarelo durante a maturação, devido à degradação da clorofila, como indicado pelo valor h, sendo aproximadamente 105 - 110° no primeiro dia pós colheita (DPC), reduzindo para 75 - 85° quando o fruto evoluiu para o estágio maduro. No grupo controle, a cv. Prata mudou antes da cv. Nanicão pelo fato do pico de etileno ter ocorrido mais cedo, no 4º DPC, enquanto que o pico de etileno da cv. Nanicão foi no 11º DPC.

No grupo frio, em ambas as cultivares, a cor da casca permaneceu verde até o 15º DPC (durante todo o período de armazenamento em baixas temperaturas) e, em seguida, após a temperatura ser aumentada para 19 °C, os valores de *h* foram semelhantes aos encontrados nos grupos controle no final do período de armazenamento.

Além disso, a biossíntese de carotenoides foi mais evidente na casca da cv. Prata (Figura 3.2), porque a intensidade da cor aumentou, com os valores de *C** mudando de 25, no 1º DPC para 30 - 35 no fim do armazenamento sob todas as condições. Em contraste, na cv. Nanicão, os valores de *C** mantiveram-se inalterados durante o armazenamento, 21 - 22 no 1º DPC a 19 - 22, no final do armazenamento sob todas as condições.

Em um estudo com o amadurecimento de mangas, Ornelas-Paz et al. (2008) mostraram que o aumento da cor amarela da epiderme e mesocarpo foi acompanhado por um aumento do *C**, e redução de *L** e *h*. Wang et al. (2006) relataram os efeitos do armazenamento em baixas temperaturas na cor e expressão gênica em banana. Os valores de *L**, *C** e *h* diminuíram durante o armazenamento a 7 °C durante 8 dias. Nesse caso, as alterações de cor apareceram devido ao escurecimento da casca, como consequência da injúria pelo frio. Yan et al. (2008) mostraram que a temperatura e a umidade relativa do ar foram os fatores ambientais que mais influenciaram a luminosidade (*L**), índice de escurecimento (*brownness index*, BI) e aceitação da banana durante o armazenamento.

De um modo geral, neste trabalho, o armazenamento em baixas temperaturas não afetou a cor da casca dos frutos em nenhuma das cultivares estudadas.

3.3.3 Composição de carotenoides

A Figura 3.3 apresenta o cromatograma obtido por HPLC da amostra de banana cv. Prata armazenada a 13 °C. Todas as outras amostras armazenadas em diferentes temperaturas e também da cv. Nanicão mostraram perfis qualitativos de carotenoides muito semelhantes. Os carotenoides das duas cultivares de banana foram identificados com base na informação obtida a partir da eluição cromatográfica, características dos espectros de massas e dos espectros de UV/visível (Tabela 3.2).

Figura 3.3. Cromatograma obtido por HPLC-DAD, dos carotenoides da banana cv. Prata. Identidade dos picos: (1) *all-trans*-luteína, (2) di-epoxi- α -caroteno, (3) 13-*cis*- α -caroteno ou 15-*cis*- α -caroteno, (4) 13-*cis*- α -caroteno ou 13'-*cis*- α -caroteno, (5) 5,8-epoxi- α -caroteno, (6) 13-*cis*- β -caroteno, (7) *all-trans*- α -caroteno, (8) 9-*cis*- α -caroteno, (9) *all-trans*- β -caroteno, (10) 9-*cis*- β -caroteno. O perfil cromatográfico foi processado a 450 nm.

Tabela 3.2. Características cromatográficas e espectroscópicas dos carotenoides detectados nas bananas cv. Nanicão e Prata, obtidas por HPLC-PDA-MS/MS.

Pico ^a	Carotenoide	t _R (min) ^b	λ _{max} (nm) ^c	% III/II	% A _B /A _{II}	[M + H] ⁺ (m/z)	Fragmento de íon (m/z)
1	all- <i>trans</i> -luteína	12.6	410, 443, 471	69	0	569	551[M+H-18]
2	5,8:5',6'-di-epoxy-α-caroteno ou 5,6:5',8'-di-epoxy-α-caroteno ^f	19.7	309, 390, 420, 447	100	6	569	495[M+H-18-56], 477[M+H-18-18-56], 205
3	13- <i>cis</i> -α-caroteno +/- 15- <i>cis</i> -α-caroteno ^g	21.1	330, 410, 438, 465	31	45	537	481[M+H-56], 444[M-92]
4	13- <i>cis</i> -α-caroteno or 13'- <i>cis</i> -α-caroteno	22.2	329, 412, 438, 465	35	34	537	481[M+H-56], 444[M-92]
5	5,8-epoxy-α-caroteno ^f	22.8	415, 426, 451	57	0	nd ^h	Nd
6	13- <i>cis</i> -β-caroteno	24.1	336, 422, 443, 470	14	46	537	444[M-92]
7	all- <i>trans</i> -α-caroteno	25.9	418, 444, 472	59	0	537	481[M+H-56], 444[M-92]
8	9- <i>cis</i> -α-caroteno ou 9'- <i>cis</i> -α-caroteno	26.8	335, 418, 439, 467	54	5	537	481[M+H-56], 444[M-92]
9	all- <i>trans</i> -β-caroteno	29.0	425, 450, 477	20	0	537	444[M-92]
10	9- <i>cis</i> -β-caroteno	30.4	340, 420, 445, 472	25	9	537	444[M-92]

^a Numerado de acordo com a Figura 3.3.

^b Tempo de retenção na coluna C₃₀.

^c Gradiente linear de MeOH/MTBE.

^d n.c.: não calculado.

^e n.d.: não detectado.

^f Tentativa de identificação.

^g Tentativa de identificação como 13-*cis*-α-caroteno ou 15-*cis*-α-caroteno e/ou 15'-*cis*-α-caroteno, ou 13-*cis*-α-caroteno + 15-*cis*-α-caroteno.

^h A molécula protonada de epoxy-α-carotene e m/z 553 não foi detectado pelo cromatograma de íons extraídos (EIC).

As análises em MS/MS confirmaram a atribuição da molécula protonada ($[M + H]^+$) de todos os picos identificados, com exceção do pico 5, que não foi detectada por MS. Como esperado, para as colunas de fase reversa, os carotenoides polares com dois grupos hidroxilas, tais como all-*trans*-luteína (pico 1), foram eluídos antes de outros carotenoides oxigenados, tais como di-epoxi- α -caroteno (pico 2). Os carotenoides all-*trans*- α -caroteno (pico 7) e all-*trans*- β -caroteno (pico 9), foram os últimos a eluir sob essas condições.

Os espectros de UV-visível e de MS do pico 1 (all-*trans*-luteína) apresentaram dados semelhantes aos descritos na literatura, extraídos de frutos amazônicos (DE ROSSO; MERCADANTE, 2007; CHISTÉ; MERCADANTE, 2012), nêspersas (FARIA et al., 2009) e legumes (AMAN et al., 2005). Além disso a coeluição com o padrão de all-*trans*-luteína confirmou a identidade.

A identificação do pico 2 (5,8:5',6'-di-epoxy- α -caroteno ou 5,6:5',8'-di-epoxy- α -caroteno) foi baseada no espectro no UV-vis característico que mostrou um deslocamento hipsocrômico de 24 nm, quando comparados com o máximo ($\lambda_{\max}$) do all-*trans*- α -caroteno, o que indica a presença de dois grupos epóxidos, um na posição de 5,6 ou 5'-6' e outro na posição 5,8 ou 5',8' (BRITTON, 1995). O espectro de massas revelou a $[M+H]^+$ em m/z 569, e as fragmentações mostraram perdas sucessivas de 56 u de água devido à eliminação dos grupos hidroxilas e epóxidos, juntamente com um fragmento de um grupo terminal ϵ . Além disso, o fragmento de m/z 205 confirmou a presença de um grupo epoxi em um anel β ou ϵ não-substituído.

O pico 5 foi tentativamente identificado como um monoepóxido de α -caroteno, considerando a ordem de UV-vis e de eluição na coluna de C₃₀. A presença de um grupo 5,8-furanóide só foi indicado pelo seu espectro de UV-visível com λ_{max} de 18 nm menor do que do 5,6-epóxi- α -caroteno. No entanto, a $[M + H]^+$ do epóxi- α -caroteno em m/z 553 não foi detectada pelo cromatograma de íon extraído (EIC).

Os isômeros *cis* de α -caroteno (picos 3, 4 e 8) foram tentativamente identificados por comparação com os dados da literatura (AMAN et al., 2005, EMENHISER et al., 1996a). Além disso, a estrutura fina espectral (% III/II) e os valores de intensidade do pico *cis* (%A_B/A_{II}) foram considerados, uma vez que os isômeros *cis* apresentam menor % III/II e aumento do pico *cis* conforme a isomerização se aproxima do centro da molécula (ZECHMEISTER, 1944). Esses valores de λ_{max} e o deslocamento hipsocrômico sugerem a presença do 9-*cis* ou 9'-*cis* (pico 8), 13-*cis* ou 13'-*cis* (pico 4) e uma mistura de um dos 13-*cis* e 15-*cis*- α -caroteno (pico 3). Como esperado, os espectros de massas de todos os isômeros de α -caroteno mostraram a $[M + H]^+$ em m/z 537, com os fragmentos de íons mais abundantes nos espectros MS/MS de m/z 481 e 444, correspondentes às perdas do anel ϵ e de tolueno, respectivamente.

A fim de evitar erros de identificação entre os isômeros *cis* do β -caroteno e all-*trans*- α -caroteno, é necessário observar algumas características diferentes e importantes, principalmente nas suas características espectrais UV-vis. Como pode ser visto na Tabela 3.2, os espectros de UV-vis do all-*trans*- α -caroteno apresentaram maior estrutura fina espectral em comparação com os isômeros *cis* de β -caroteno. Além disso, os espectros de UV-vis dos isômeros *cis* de β -caroteno mostraram o pico *cis* localizado a 336 - 340 nm, que não aparecem no espectro UV-

vis do *all-trans-α*-caroteno. Entre os isômeros β -caroteno, os picos 6 e 9 foram identificados como 13-*cis*- e 9-*cis*- β -caroteno, respectivamente, considerando-se as características dos espectros de UV-visível (STROHSCHNEIN; PURSCH; ALBERT, 1999; DE ROSSO; MERCADANTE, 2007), o comportamento cromatográfico, a coeluição com os padrões, e os espectros de massas. Os espectros de massas de todos os isômeros de β -caroteno mostraram a $[M + H]^+$ e m/z 537 e um fragmento de íon no MS/MS de m/z 444, correspondente a uma perda de tolueno a partir da cadeia de polieno.

O *all-trans-α*-caroteno (pico 7) e *all-trans-β*-caroteno (pico 9) foram identificados por ordem de eluição na coluna C₃₀, espectros de massas característicos e UV-vis (DE ROSSO; MERCADANTE, 2007; FARIA et al., 2009). A identidade foi confirmada por comparação com padrões.

Entre os 10 carotenoides identificados nas cultivares de banana analisadas neste estudo, o *all-trans*-luteína, *all-trans-α*-caroteno, *all-trans-β*-caroteno, 13-*cis*- β -caroteno e 9-*cis*- β -caroteno foram previamente relatados em amostras de banana (BEN-AMOTZ; FISHLER, 1998; SETIAWAN et al., 2001; ENGLBERGER et al., 2003, 2006, 2010; WALL, 2006; DAVEY et al., 2006, 2009; ARORA et al., 2008; EKESA et al., 2012), enquanto os outros cinco carotenoides serão reportados pela primeira vez em polpa de banana.

Os Apêndices 2 e 3 apresentam as tabelas com a identificação dos carotenoides e as concentrações ($\mu\text{g/g}$ de peso fresco) nas bananas cv. Prata e Nanicão, respectivamente, durante o amadurecimento sob diferentes temperaturas de armazenamento.

A Figura 3.4 mostra a produção dos principais carotenoides em ambas as cultivares. Em geral, os níveis de carotenoides totais da cv. Prata foram maiores do que os encontrados na cv. Nanicão. Os níveis de carotenoides totais na cv. Prata foram menores nos frutos armazenados no frio (13 ° C e 10 ° C). Na cv. Nanicão, o contrário foi observado, os níveis de carotenoides foram maiores em frutos armazenados em baixas temperaturas em comparação com o controle. Durante o amadurecimento da cv. Prata a 19 ° C, os carotenoides *all-trans* foram acumulados, enquanto que a sua isomerização e os seus derivados de oxidação não se alteraram (Apêndice 2). Em contraste com o observado no experimento do grupo controle, as quantidades dos isômeros *cis* e epóxidos aumentaram após o armazenamento em baixas temperaturas, possivelmente devido ao estresse causado pelo frio. Em um experimento com mangas, Vásquez-Caicedo et al. (2006) observaram elevado acúmulo de isômeros *cis* durante a maturação, provavelmente devido à solubilização parcial dos pigmentos em lipídios nos cromoplastos.

Figura 3.4. Mudanças nos níveis de carotenoides ($\mu\text{g/g}$ de peso fresco) das bananas durante o amadurecimento em diferentes condições de temperatura de armazenamento. Os desvios padrão da análise estão indicados por barras verticais ($n = 2$). As linhas tracejadas verticais indicam o tempo de armazenamento em baixas temperaturas. (N: cv. Nanicão; P: cv. Prata).

A Tabela 3.3 apresenta o efeito das baixas temperaturas sobre os níveis de carotenoides analisados pela regressão linear. Os níveis de carotenoides totais, *all-trans*- α -caroteno e *all-trans*- β -caroteno na cv. Prata reduziram em frutos armazenados em baixas temperaturas (com β -coeficientes negativos), e apresentaram diferenças estatísticas quando comparadas ao grupo controle ($p < 0,05$). Na cv. Nanicão, os níveis de carotenoides totais aumentaram nos frutos do grupo frio em comparação com o controle, mas essa diferença não foi estatisticamente significativa ($p > 0,05$). Como consequência desse acúmulo, as vias metabólicas que utilizam carotenoides podem ter sido afetadas pelo armazenamento em baixas temperaturas.

Tabela 3.3. Estimativa dos Parâmetros do Modelo de regressão linear referente às análises de carotenoides durante o amadurecimento das cultivares Nanicão e Prata entre os grupos controle e frio.

Carotenóides	R ²	Equação do modelo	Valor p
Cultivar Nanicão			
<i>all-trans</i> -luteína	0,0039	$Y = 0,18 - 0,01x$	0,8739
<i>all-trans</i> - α -caroteno	0,0014	$Y = 0,87 + 0,02x$	0,9243
<i>all-trans</i> - β -caroteno	0,0432	$Y = 0,62 + 0,15x$	0,5916
Carotenóides Totais	0,0309	$Y = 1,86 + 0,27x$	0,6509
Cultivar Prata			
<i>All-trans</i> -luteína	0,0245	$Y = 0,41 - 0,04x$	0,5349
<i>All-trans</i> - α -caroteno	0,4400	$Y = 1,01 - 0,28x$	0,0027
<i>All-trans</i> - β -caroteno	0,3879	$Y = 1,02 - 0,29x$	0,0058
Carotenóides Totais	0,3484	$Y = 2,79 - 0,71x$	0,0099

Segundo Purvis e Shewfelt (1993), estresses como o resfriamento podem provocar aumento na produção de de oxigênio ativo. Os dois principais sistemas de transporte de elétrons nas células vegetais estão localizados nos cloroplastos e nas mitocôndrias e podem ser responsáveis pela geração de radicais livres de O_2 durante o resfriamento. Ainda segundo esses autores, uma diferença fundamental entre espécies de plantas sensíveis e resistentes às baixas temperaturas, deve ser na habilidade de plantas resistentes de reduzir os efeitos destrutivos de radicais livres e moléculas de O_2 ativadas produzidas durante o estresse, e para isso, utilizam antioxidantes como os carotenoides e as enzimas sequestrantes de oxigênio ativo como superóxido dismutase, catalase e peroxidase.

Nesse contexto, a cv. Prata consegue utilizar-se dos carotenoides para combater os radicais livres em condições de estresse e por esse motivo, seus níveis reduzem com a exposição ao frio. Por sua vez, na cv. Nanicão, teve o acúmulo desses carotenoides (antioxidantes), o que irá repercutir em outros processos com vias de sinalização comprometidas. A síntese de compostos voláteis (onde a degradação de alguns carotenoides é considerada chave para a formação de compostos responsáveis pelo aroma), é um bom exemplo do efeito negativo no metabolismo da cv. Nanicão a baixas temperaturas, pois foi bastante afetada, enquanto que isso não ocorreu para a cv. Prata (FACUNDO et al., 2012).

3.3.4. Análise multivariada dos dados de cor da casca e carotenoides da polpa

A análise multivariada foi realizada utilizando o método de Análise de Componentes Principais (ACP) com base na matriz de correlação para evidenciar a relação entre os carotenoides e atributos de cor das cultivares de bananas

armazenados em diferentes temperaturas (Figura 3.5 refere-se a cv. Nanicão e Figura 3.6 refere-se a cv. Prata). Os gráficos titulados como “A” representam as variáveis e “B” representam as amostras, ambos posicionados no espaço definido pelas duas primeiras dimensões (Factor 1 vs Factor 2).

Para a banana da cv. Nanicão (Figura 3.5-AB) as duas primeiras componentes foram responsáveis por 71,65% da variabilidade total entre as amostras. A primeira componente (Figura 3.5B) apresentou uma tendência em separar os frutos verdes do grupo controle (19 °C) e frio (13 °C) e frutos maduros a 19 °C (lado direito) dos frutos maduros do grupo frio (lado esquerdo). Os frutos verdes de ambos os grupos foram caracterizados essencialmente pelo ângulo de tonalidade (h), pois os frutos nesse estágio realmente têm um ângulo bem maior (cerca de 108°) e os níveis dos carotenoides mais baixos. Os frutos maduros a 19 °C (grupo controle) situaram-se no centro do gráfico, sendo caracterizados pelo parâmetro luminosidade (L^*). No entanto, os frutos maduros do grupo frio a 13 °C, nos dias 20 e 23 pós colheita (DPC) foram caracterizados pela maior concentração de all-*trans*- α -caroteno (α -c) e all-*trans*- β -caroteno (β -c), e o último DPC (F24) ficou correlacionado com as variáveis croma (C^*) e all-*trans*-luteína (Lu). No trabalho de Ornelas-Paz et al. (2008), o parâmetro L^* apresentou correlação negativa com o conteúdo de carotenoides de duas cultivares de manga. Porém, no presente estudo, a luminosidade parece estar mais associada aos frutos maduros do grupo controle.

Figura 3.5. Gráfico de Análise de Componentes Principais (ACP) dos carotenoides majoritários e parâmetros de cor como variáveis das amostras de bananas cv. Nanicao. L*: luminosidade; C*: croma; h: ângulo de tonalidade; Lu: all-trans-luteína; α-c: all-trans-α-caroteno; β-c: all-trans-β-caroteno. C: grupo-controle a 19 °C. F: grupo frio a 13 °C. Números 1-24 representam os dias pós colheita (DPC).

Na Figura 3.6 as duas primeiras componentes principais foram responsáveis por 88,63% da variação total entre as amostras de banana da cv. Prata. Os carotenoides all-trans-α-caroteno (α-c) e all-trans-β-caroteno (β-c) estão positivamente correlacionados, mas independentes (não correlacionados) das variáveis croma (C*), luminosidade (L*) e o ângulo de tonalidade (h). C* e L* estão fortemente correlacionadas, mas apresentam uma forte correlação negativa com o ângulo de tonalidade (h). Os resultados mostraram que a primeira componente (Fig. 3.6B) separou os frutos verdes (lado direito) dos frutos maduros (lado esquerdo) e mostrou uma tendência de separar os dados em quatro grupos de acordo com seu estágio de maturação e tratamentos.

O primeiro grupo é formado pelos frutos verdes dos três tratamentos do primeiro DPC ("C1" – do grupo controle a 19 °C; "F1" – do grupo frio a 13 °C; "T1" – do grupo frio a 10 °C) associados ao ângulo de tonalidade (h). Os frutos maduros da amostra do grupo controle (19 °C) apresentaram uma forte associação com os carotenoides *all-trans*- α -caroteno (α -c) e *all-trans*- β -caroteno (β -c). Os frutos armazenados em baixas temperaturas (13 °C e 10 °C) foram separados das amostras do controle pela segunda componente, sendo os frutos maduros a 13 °C caracterizados pela *all-trans*-luteína (Lu), e os frutos maduros, a 10 °C pelo croma (C^*) e luminosidade (L^*).

Figura 3.6. Gráfico de Análise de Componentes Principais (ACP) dos carotenoides majoritários e parâmetros de cor como variáveis das amostras de bananas cv. Prata. L^* : luminosidade; C^* : croma; h : ângulo de tonalidade; Lu: *all-trans*-luteína; α -c: *all-trans*- α -caroteno; β -c: *all-trans*- β -caroteno. C: grupo-controle a 19 °C. F: grupo frio a 13 °C. T: grupo frio a 10 °C. Números 1-24 representam os dias pós colheita (DPC).

Um estudo de análise da cor e carotenoides do sumo de laranja (MELÉNDEZ-MARTINEZ et al., 2010) mostrou que os carotenoides que melhor correlacionaram com a cor (por exemplo, a luteína) não são necessariamente os mesmos que melhor se correlacionam com o croma.

3.4. CONCLUSÃO

Nossos resultados mostram que o armazenamento ao frio prolongado (15 dias) a temperaturas de 10° para cv. Prata e 13 °C para a cv. Nanicão não afetam os parâmetros de cor da casca dos frutos quando maduros.

Em relação aos carotenoides da polpa, nos frutos da cv. Prata esses metabólitos foram reduzidos pelo frio apresentando níveis inferiores nos frutos do grupo frio. A cv. Nanicão, por sua vez, apresentou aumento nos níveis de carotenoides como resposta ao estresse. Esta redução ou acúmulo de carotenoides nestas cultivares podem ter ocorrido devido ao fato de que vias metabólicas que utilizam carotenoides terem sido afetadas pelo armazenamento em baixas temperaturas como resposta ao estresse.

3.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGOPIAN, R. G. D.; PERONI-OKITA, F. H. G.; SOARES, C. A.; MAINARDI, J. A.; NASCIMENTO, J. R. O.; CORDENUNSI, B. R.; LAJOLO, F. M.; PURGATTO, E. Low temperature induced changes in activity and protein levels of the enzymes associated to conversion of starch to sucrose in banana fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v. 62, p. 133–140, 2011.
- AMAN, R.; BIEHL, J.; CARLE, R.; CONRAD, J.; BEIFUSS, U.; SCHIEBER, A. Application of HPLC coupled with DAD, APCI-MS and NMR to the analysis of lutein and zeaxanthin stereoisomers in thermally processed vegetables. **Food Chemistry**, v. 92, p. 753 – 763, 2005.
- ARORA, A.; CHOUDHARY, D.; AGARWAL, G.; SINGH, V. P. Compositional variation in β -carotene content, carbohydrate and antioxidant enzymes in selected banana cultivars. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 43, p. 1913-1921, 2008.
- BEN-AMOTZ, A.; FISHLER, R. Analysis of carotenoids with emphasis on 9-cis- β -carotene in vegetables and fruits commonly consumed in Israel. **Food Chemistry**, v. 62, p. 515 – 520, 1998.
- BRITTON, G. UV/visible spectroscopy. In: Britton, G., Liaaen-Jensen, S., Pfander, H. (Eds.), Carotenoids, vol. 1B: Spectroscopy. Birkhauser, Basel, p. 13 – 62, 1995.
- CHISTÉ, R. C.; MERCADANTE, A. Z. Identification and quantification, by HPLC-DAD-MS/MS, of carotenoids and phenolic compounds from the Amazonian

fruit *Caryocar villosum*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, p. 5884 - 5892. 2012.

DAVEY, M. W; KEULEMANS, J.; SWENNEN, S. Methods for the efficient quantification of fruit provitamin A contents. **Journal of Chromatography A**, v. 1136, p. 176 – 184, 2006.

DAVEY, M. W; SAEYS, W.; HOF, E.; RAMON, H.; SWENNEN, S. L.; KEULEMANS, J. Application of visible and near-infrared reflectance spectroscopy (Vis-NIRS) to determine carotenoid contents in banana (*Musa spp.*) fruit pulp. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 57, p. 1742 – 1751, 2009.

DELGADO-VARGAS, F.; JIMÉNEZ, A. R.; PAREDES-LÓPES, O.; **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 40, p. 173, 2000.

DE ROSSO, V. V.; MERCADANTE, A.Z. Identification and quantification of carotenoids, by HPLC-PDA-MS/MS, from Amazonian fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 5062 -5072, 2007.

EKESA, A. B.; POULAERT, M.; DAVEY, M. W.; KIMIYWE, J.; DEN BERGH, I. V.; BLOMME, G.; DHUIQUE-MAYER, C. Bioaccessibility of provitamin A carotenoids in bananas (*Musa spp.*) and derived dishes in African countries. **Food Chemistry**, v. 133, p. 1471–1477, 2012.

EMENHISER, C.; SIMUNOVIC, N.; SANDER, L. C.; SCHWARTZ, S. J. Separation of geometrical carotenoid isomers in biological extracts using a polymeric C₃₀ column in reversed-phase liquid chromatography. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, p. 3887- 3893 (a), 1996.

EMENHISER, C.; ENGLERT, G.; SANDER, L. C.; LUDWIG, B.; SCHWARTZ, S. J.

Isolation and structural elucidation of the predominant geometrical isomers of α -carotene. **Journal of Chromatography A**, v. 719, p. 333 - 343 (b), 1996.

ENGLBERGER, L.; SCHIERLE, J.; MARKS, G. C.; FITZGERALD, M. H. Micronesian

banana, taro, and other foods: newly recognized sources of provitamin A and other carotenoids. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 16, n.3, p. 3 – 19, 2003.

ENGLBERGER, L.; SCHIERLE, J.; AALBERSBERG, W.; HOFMANN, P.;

HUMPHRIES, J.; HUANG, A.; LORENS, A.; LEVENDUSKY, A.; DANIELLS, J.; MARKS, G. C.; FITZGERALD, M. H. Carotenoid and vitamin content of Karat and other Micronesian banana cultivars. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 57, n.5, p. 399 – 418, 2006.

ENGLBERGER, L.; LYONS, G.; FOLEY, W.; DANIELLS, J.; AALBERSBERG, B.;

DOLODOLOTAWAKE, U.; WATOTO, C.; IRAMU, E.; TAKI, B.; WEHI, F.; WARITO, P.; TAYLOR, M. Carotenoid and riboflavin content of banana cultivars from Makira, Solomon Islands. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 23, p. 624–632, 2010.

FACUNDO, H. V. V.; GARRUTI, D. S.; DIAS, C. T. S.; CORDENUNSI, B. R.;

LAJOLO, F. M. Influence of different banana cultivars on volatile compounds during ripening in cold storage. **Food Research International**, v. 49, p. 626–633, 2012.

FARIA, A. F.; HASEGAWA, P. N.; CHAGAS, E. A.; PIO, R.; PURGATTO, E.;

MERCADANTE, A. Z. Cultivar influence on carotenoid composition of loquats

from Brazil. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 22, p. 196 – 203, 2009.

FRASER, P. D.; BRAMLEY, P. M. The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. **Progress in Lipid Research**, v. 43, p. 228–265, 2004.

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

KONICA MINOLTA SENSING, INC. 2007. Precise Color Communication. Color control from perception to instrumentation. Disponível em: <http://konicaminolta.com/instruments/about/network>. Acesso em 15 de julho de 2009.

LIAN, F. Z.; HU, K. Q.; RUSSELL, R. M.; WANG, X. D. Beta-cryptoxanthin suppresses the growth of immortalized human bronchial epithelial cells and non-small-cell lung cancer cells and up-regulates retinoic acid receptor beta expression. **International Journal of Cancer**, v. 119, n.9, p. 2084–2089, 2006.

LICHTENBERG, L. A.; MALBURG, J. L.; HINZ, R. H. Cold Damage in Bananas. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 23, 2001.

MELÉNDEZ-MARTINEZ, A. J.; BRITTON, G.; VICARIO, I. M.; HEREDIA, F. J. Relationship between the colour and the chemical structure of carotenoid pigments. **Food Chemistry**, v. 101, p. 1145–1150, 2007.

NGUYEN, T. B.; KETSA, S.; VAN DOORN, W. G. Relationship between browning and the activities of polyphenol oxidase and phenylalanine ammonia lyase in

banana peel during low temperature storage. **Postharvest Biology and Technology**, v. 30, p. 187–193, 2003.

ORNELAS-PAZ, J. J.; YAHIA, E. M.; GARDEA, A. A. Changes in external and internal color during postharvest ripening of 'Manila' and 'Ataulfo' mango fruit and relationship with carotenoid content determined by liquid chromatography – APCI+time-of-flight mass spectrometry **Postharvest Biology and Technology**, v. 50, p. 145–152, 2008.

PURVIS, A. C.; SHEWFELT, R. L. Does the alternative pathway ameliorate chilling injury in sensitive plant tissues? **Physiologia Plantarum**, v. 88, p. 712-718, 1993.

SALVADOR, A.; SANZ, T.; FISZMAN, S. M. Changes in colour and texture and their relationship with eating quality during storage of two different dessert bananas. **Postharvest Biology and Technology**, v. 43, p. 319–325, 2007.

SETIAWAN, B.; SULAEMAN, A.; GIRAUD, D. W.; DRISKELL, J. A. Carotenoid Content of Selected Indonesian Fruits. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 14, p. 169-176, 2001.

STROHSCHNEIN, S.; PURSCH, M.; ALBERT, K. Hyphenation of high performance liquid chromatography with nuclear magnetic resonance spectroscopy for the characterization of β -carotene isomers employing a C₃₀ stationary phase. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 21, p. 669 – 677, 1999.

TAVARINI, S.; DEGL'INNOCENTI, E.; REMORINI, D.; MASSAI, R.; GUIDI, L. Antioxidant capacity, ascorbic acid, total phenols and carotenoids changes

during harvest and after storage of Hayward kiwifruit. **Food Chemistry**, v. 107, p. 282–288, 2008.

WALL, M. M. Ascorbic acid, vitamin A, and mineral composition of banana (*Musa sp.*) and papaya (*Carica papaya*) cultivars grown in Hawaii. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 19, p. 434 – 445, 2006.

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 Science**, v. 170, p. 962–967, 2006.

WENDAKOON, S. K.; UEDA, Y.; IMAHORI, Y.; ISHIMARU, M. Effect of short-term anaerobic conditions on the production of volatiles, activity of alcohol acetyltransferase and other quality traits of ripened bananas. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 86, p. 1475–1480, 2006.

YAN, Z.; SOUSA-GALLAGHER, M. J.; OLIVEIRA, F. A. R. Identification of critical quality parameters and optimal environment conditions of intermediate moisture content banana during storage. **Journal of Food Engineering**, v. 85, p. 163–172, 2008.

YANG, F. S.; ASHRAFUZZAMAN, M.D.; NAKAMURA, N.; HAYASHI, N. Purification and characterization of polyphenol oxidase from banana. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 2732–2735, 2000.

YOUNG, A. J.; LOWE, G. M. Antioxidant and prooxidant properties of carotenoids. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 385, n.1, p. 20–27, 2001.

ZECHMEISTER, L. Cis–trans isomerization and stereochemistry of carotenoids and diphenylpolyenes. **Chemical Reviews**, v. 34, p. 267 – 344, 1944.

ZHANG, H.; YANG, S.; JOYCE D. C.; JIANG, Y.; QU, H.; DUAN, X. Physiology and quality response of harvested banana fruit to cold shock. **Postharvest Biology and Technology**, v. 55, p. 154–159, 2010.

CAPÍTULO 4

PROTEÔMICA *SHOTGUN* DA BANANA NANICÃO ARMAZENADA SOB BAIXA TEMPERATURA

Abstract

Storage fruit at low temperatures has been widely used to extend its postharvest life. In this study, a shotgun proteomics approach was conducted on banana cv. Nanicão from a control group stored at 19 °C compared with other group stored at 13 °C for 15 days, and after that, transferred the temperature to 19 °C for complete the maturation. Five pools of each group (control and cold) of “unripe” and “ripe” phase was prepared for analysis. The proteins were extracted with phenol and digested by trypsin. The resulting highly complex peptide mixtures were inject in an analytic column C18 and analyzed by RP-UPLC (nanoAcquity UPLC, Waters) coupled with nano-electrospray tandem mass spectrometry on a Q-ToF Premier API mass spectrometer. Databases searches for peptide identification were done with Mascot and proteins were identified by searching *musa_pep* database. Scaffold was used to validate MS/MS based peptide and protein identifications which identified 67 proteins (< 0.5% false discovery rate). Twenty-one significant proteins by Anova ($p < 0.05$) were submitted to Principal Component Analysis. The first component separated the samples by stage of maturation and the second component separated the control and cold groups, but there was a major discrimination in the cold group from ripe fruits, being farther than the control group in the graphic. The proteins superoxide dismutase [Cu-Zn], abscisic stress-ripening protein 3, putative horcolin, stromal 70 kDa heat shock-related protein and a chloroplastic probable steroid-binding protein were correlated with the unripe control samples and a putative stress responsive protein and cytochrome c oxidase subunit 5B mitochondrial precursor were strongly correlated with the unripe cold samples. On the other hand, enolase, malate

dehydrogenase, mitochondrial, metallothionein-like protein type 3, 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase, defensin-like protein 5, endochitinase, heat shock cognate 70 kDa protein and germin-like protein present a strong association with the ripe control samples while the cold group was characterized by the presence of thaumatin-like protein, isoflavone reductase homolog, granule-bound starch synthase 1, chloroplastic / amyloplastic, and a putative lichenase dirigent protein. The study suggests that in ripe fruit, evidenced an effect on proteins that act in carbohydrate metabolism in response to cold stress.

Keywords: carbohydrate metabolism, cold storage, multivariate statistics, *Musa acuminata*.

4.1 INTRODUÇÃO

O amadurecimento da banana é relativamente complexo e sujeito a mudanças por conta da temperatura a que o fruto é armazenado, sendo altamente susceptível a baixas temperaturas. Assim, para uma melhor compreensão da influência das baixas temperaturas e como ela altera a regulação do amadurecimento, optou-se por incluir nesta pesquisa a análise proteômica. Essa análise fornece a caracterização quantitativa e qualitativa do perfil protéico global, contribuindo para a compreensão dos processos fundamentais que ocorrem durante o amadurecimento e/ou para revelar proteínas que possam atuar no controle de pontos específicos do processo de amadurecimento e armazenamento dos frutos.

Nesse trabalho, abordaremos a proteômica *shotgun* (proteômica sem gel), cuja principal vantagem desta abordagem é poder identificar um grande número de proteínas com alto rendimento (YE et al., 2007). Nessa técnica, as proteínas de uma mistura complexa são digeridas; os peptídeos resultantes são separados por cromatografia líquida; em seguida, sujeitos a análises por espectrometria de massas (MS), e finalmente identificados com o auxílio de um banco de dados. Devido à sua boa compatibilidade com a linha de detecção MS, a cromatografia líquida de fase reversa é normalmente usada para separar os peptídeos na proteômica *shotgun*.

A proteômica da banana já foi realizada em trabalhos anteriores (CARPENTIER et al., 2007; TOLEDO et al., 2012) utilizando eletroforese em gel diferencial bidimensional (2D-DIGE). Já o presente estudo visa estudar pela técnica de proteômica *shotgun* como o armazenamento em baixa temperatura afeta o perfil proteico da banana cv. Nanicão.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Material

Os frutos da cultivar Nanicão (*Musa acuminata* L.) no estágio verde foram obtidos junto à CEAGESP-SP em 1 dia após a colheita. Os frutos foram separados em dois grupos e armazenados em câmaras distintas com temperatura controlada: 19 °C, grupo controle e 13 °C, grupo frio. As amostras do grupo frio permaneceram por 15 dias a 13 °C, sendo a temperatura posteriormente alterada para 19 °C, para completar o amadurecimento. As amostras foram monitoradas diariamente quanto aos teores de etileno e CO₂. As amostras selecionadas foram descascadas, cortadas, congeladas em N₂ líquido e armazenadas a -80 °C para futuras análises.

4.2.2 Caracterização do amadurecimento

A produção de etileno e CO₂ foi monitorada segundo descrito nos capítulos anteriores (ver Capítulos 2 e 3). A determinação do teor de amido foi realizada enzimaticamente como descrito por Cordenunsi e Lajolo (1995). Os açúcares solúveis (glicose, frutose e sacarose) foram determinados por cromatografia líquida (HPLC), como descrito em Agopian et al. (2008).

4.2.3 Amostras para as análises protômicas

Baseando-se nos resultados obtidos na caracterização do amadurecimento (teores de etileno e CO₂, amido e açúcares solúveis), foram definidos dois grupos de amostras a serem utilizados nas análises dos perfis de proteínas:

i) Pré-climatéricas, doravante denominadas “verdes”, apresentando baixa produção de etileno e CO₂, alto teor de amido e baixo teor de açúcares solúveis.

ii) Climatéricas, doravante denominadas “maduras”, apresentando alta produção de etileno e CO₂, baixo teor de amido e alto teor de açúcares solúveis.

Para esse propósito e para uma melhor representação amostral dos perfis proteicos dos frutos nos diferentes estádios de maturação e grupos de armazenamento, foram elaborados 5 *pools* de cada amostra (controle-verde, controle-maduro, frio-verde, frio-maduro) para serem utilizados como replicata técnica nas análises de sequenciamento. As amostras foram pulverizadas na presença de nitrogênio líquido, e armazenadas a - 80 °C.

4.2.4 Elaboração dos *pools*

Os DPCs (Dias pós-colheita) pertencentes a cada *pool* de amostras estão listados na Tabela 4.1.

Tabela 4.1. Dias pós-colheita (DPC) dos *pools* para as análises das proteínas da banana cv. Nanicão.

<i>Experimento</i>	<i>DPCs do Pool 'Verde'</i>	<i>DPCs do Pool 'Maduro'</i>
Grupo Controle (19 °C)	1, 4 e 8	11, 12, 13, 14, 15, 16 e 17
Grupo Frio (13 °C)	1, 7 e 16	17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 e 24

Os *pools* foram feitos de tal maneira que a caixa que continha as amostras congeladas em nitrogênio tivesse duas linhas imaginárias perpendiculares dividindo-a em 4 partes iguais, onde cada quadrante fez parte de um *pool*. O primeiro quadrante de cada caixa (ou cada DPC) fez parte do *pool* 1, do segundo quadrante, do *pool* 2, e assim sucessivamente. A amostra oriunda da parte central da caixa foi nomeada como *pool* 5. Assim, foram feitos 5 *pools* da amostra 'controle-verde', 5 *pools* da amostra 'frio-verde', 5 *pools* 'controle-maduro' e 5 *pools* 'frio-maduro', totalizando 20 amostras ou 20 extrações de proteínas realizadas neste experimento. A Figura 4.1 apresenta um exemplo de como foram realizados os *pools* das amostras do grupo controle no estágio verde (pré-climatérico).

Figura 4.1. Esquema ilustrativo da realização dos *pools* para as análises de proteômica da amostra 'controle-verde'. A numeração de cada *pool* foi definido de acordo com o quadrante em que estava presente a amostra. A parte central da caixa, foi definida como *pool* 5.

4.2.5 Extração de proteínas

Para a extração de proteínas totais da polpa da banana foi empregada a metodologia de extração com fenol e precipitação com acetato de amônio em metanol, baseada no protocolo de Carpentier et al. (2005), sendo realizadas algumas modificações. Foram pesados 1,0 g do tecido pulverizado e ressuspendido

em 5 mL de tampão de extração gelado (Tris-HCl 50 mM pH 8.5, EDTA 5 mM, KCl 100 mM, DTT 1%, sacarose 30%, benzamidina 1%), e agitados por 30 s. Aos extratos foram adicionados 5 mL de fenol (Sigma) tamponado com Tris-HCl (pH 8.0) gelado, com agitação em vortex durante 15 minutos a 4°C. Após centrifugação a 6.000 g por 15 min a 4°C, as fases fenólicas foram coletadas, re-extraídas com 5 mL de tampão de extração gelado e agitadas por 15 minutos a 4 °C. Após nova centrifugação, as fases fenólicas foram coletadas e então as proteínas foram precipitadas por adição de 5 volumes de metanol contendo acetato de amônio 100 mM e incubação a -20°C por 16 horas. Após centrifugação a 16.000 g por 30 min a 4°C, os sobrenadantes foram descartados e os precipitados foram lavados com acetona gelada adicionada de DTT 0,2%. Deixou-se secar os precipitados ao ar, que então foram ressuspensos por 1 h a temperatura ambiente em 1 mL de tampão de ressuspensão (uréia 7 M, tiouréia 2 M, Triton X-100 0,4% e DTT 1%).

4.2.6 Dessalinização, remoção de detergentes e quantificação de proteínas

A dessalinização dos extratos proteicos foi realizada com auxílio de concentradores da Amicon® Ultra-0.5 (Millipore Corporation, Bedford, MA, EUA), seletivos para 3000 NMWL (*Nominal Molecular Weight Limit*), de acordo com as instruções do fabricante. O tampão de amostra utilizado foi bicarbonato de amônio 50 mM.

Para a remoção do detergente, foi utilizada colunas da Pierce® Detergent Removal Spin Columns (Thermo Cientific, Rockford, IL, EUA) de acordo com as instruções do fabricante.

A concentração de proteínas foi determinada pelo método de Bradford (1976) em microplacas, utilizando o kit da BioRad®. As medições foram feitas em duplicatas, e a estimativa da concentração das proteínas foi calculada por comparação com a curva padrão de albumina de soro bovino (BSA). As leituras das absorbâncias foram realizadas em espectrofotômetro a 595 nm.

4.2.7 Digestão trípica

A digestão das proteínas foi realizada de acordo com o protocolo proposto por Murad et al. (2011). Uma alíquota de 40 µL contendo 20 µg de proteínas foi transferido para um tubo de microcentrífuga (Axygen, MCT-150-L-C), o qual foi adicionado de 25 µL de uma solução 0,2% de RapiGest SF (Waters Corporation, Milford, MA, EUA), brevemente agitado em vórtex e transferido para um bloco aquecido (80 °C) durante 15 min. Após esse tempo, foram adicionados 2,5 µL de 100 mM de ditioneitol (DTT) para abrir as proteínas e deixá-las mais acessível aos passos de alquilação e digestão. O tubo foi agitado em vórtex e novamente transferido para um bloco aquecido (60 °C) por 30 min.

Com a amostra em temperatura ambiente, foram adicionados 2,5 µL de 300 mM de iodoacetamida (IAA) para a alquilação das cisteínas. As amostras ficaram no escuro, à temperatura ambiente por 30 minutos (tempo de reação) e posteriormente foram adicionados 4,5 µL da solução de tripsina grau de sequenciamento modificada (Promega, Madison WI, USA) em 50 mM de acetato de amônio, ou seja, a proporção enzima: proteína foi 1:100. O tubo foi agitado em vórtex e incubado a 37 °C por 16 horas.

Após a digestão, para hidrolisar o RapiGest SF, foram adicionados 10 µL de uma solução de 5% de ácido trifluoracético (v:v), o tubo foi agitado em vórtex, incubado a 37 °C por 90 min e centrifugado em 18.000 g a 6 °C, por 30 min. O sobrenadante foi transferido para outro tubo de centrífuga, concentrado em evaporador a vácuo em sistema *speed vac*, e armazenado a – 80 °C até o momento das análises de sequenciamento.

4.2.8 Sequenciamento em LC-MS/MS

As proteínas digeridas foram ressuspendidas em 18 µL de ácido fórmico (0,1%). Uma alíquota (4,5 µL) foi injetada automaticamente em uma coluna Symmetry C18 (180 µm x 20 mm) para dessalinização da amostra a uma taxa de fluxo de 5 µl/min durante 2 min. Os peptídeos foram separados em uma coluna analítica C18 1,7 µM BEH 130 (100 µm x 100 mm) em um cromatógrafo RP-UPLC (*nanoACQUITY Reverse-Phase Ultra-Performance Liquid Chromatographic*, Waters Corporation, Milford, MA, EUA) acoplado a uma interface de ESI (ionização *eletrospray*) em um espectrômetro de massas do tipo Q-ToF (quadrupolo/tempo de voo) Premier API (Micromass / Waters) em um fluxo de 600 nl/min. O gradiente foi de 0-50% de acetonitrila contendo ácido fórmico a 0,1% durante 60 min. O instrumento foi operado no modo MS positivo, aquisição de dados contínuo de m/z de 100-2.000 Da com uma velocidade de varredura de 1 s. O controle do equipamento e aquisição dos dados foram realizados pelo programa *MassLynx* (versão 4.1, Waters).

4.2.9 Base de dados

Os espectros MS/MS obtidos a partir da fragmentação dos íons precursores foram processados no programa Mascot Distiller v.2.3.2.0, 2009 (Matrix Science, Boston, MA, EUA), tendo como parâmetros uma clivagem perdida pela tripsina, carbamidometilação como modificação fixa, oxidação da metionina como modificação variável e a tolerância das massas dos peptídeos e dos fragmentos MS e MS/MS de 0,1 Da. As buscas foram realizadas utilizando o banco de dados do genoma da banana (Musa_pep database, informações da sequência acessível no endereço: <http://banana-genome.cirad.fr/>).

Por meio da identificação e busca pelo programa Mascot, foram gerados arquivos de saída em formato .mgf, sendo convertidos para extensão .dat pelo próprio *software*. Esses arquivos contêm agrupamentos dos espectros dos peptídeos que obtiveram *matching* com as várias proteínas no banco de dados e foram então analisados por meio do programa Scaffold Q + v. 3,0 (Proteome Software, Portland, OR, EUA), para a quantificação de cada proteína por contagem total de espectros.

4.2.10 Análises estatísticas

Para as análises de FDR (*False Discovery Rate*), foi determinado um valor menor ou igual a 0,4%, o que representa a proporção de falsos positivos entre as proteínas analisadas, com o auxílio do programa Scaffold Q + v. 3,0 (Proteome Software, Portland, OR, EUA).

Com os dados quantitativos obtidos, foi realizada uma análise de variância (ANOVA) seguido de teste de médias (Tukey) com o auxílio do programa estatístico

XLSTAT, considerando um valor de significância de $p \leq 0,05$. Os resultados também foram submetidos à Análise Multivariada por meio do método de Análise de Componentes Principais com o auxílio do programa *Statistica*.

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1 Caracterização do amadurecimento pós-colheita

A Figura 4.2-A apresenta a produção de etileno e respiração da banana cv. Nanicão do grupo controle armazenada a 19 °C e do grupo frio armazenado a 13 °C. O pico de etileno para o grupo controle ocorreu no 11º dia pós-colheita e o pico de CO₂, 2 dias após o pico de etileno. Para o grupo frio, em resposta às baixas temperaturas, os níveis basais permaneceram baixos durante todo o período de armazenamento a 13 °C. O aumento do pico de etileno ocorreu no 18º dia pós-colheita, três dias após a temperatura ter sido transferida para 19 °C. Nesse contexto, a baixa temperatura de armazenamento foi suficiente para inibir o processo de maturação com a redução dos níveis de etileno e respiração.

Em relação à síntese de açúcares (Figura 4.2-B), observou-se que a sacarose foi o açúcar predominante neste estudo. No fim do amadurecimento, níveis menores foram encontrados no grupo frio (77 g/Kg) quando comparado ao controle (116 g/Kg). A síntese de glicose e frutose foram semelhantes em ambos os grupos, com valores máximos de 34 mg/g para a glicose e 31 g/Kg para a frutose no grupo controle e para o grupo frio foram de 30 e 25 g/Kg de glicose e frutose, respectivamente.

Figura 4.2. Etileno e respiração (A), níveis de açúcares solúveis (B) e degradação de amido (C) da banana cv. Nanicão durante o amadurecimento e armazenamento em baixa temperatura. Os desvios padrão da análise estão indicados pelas barras verticais ($n = 3$). As linhas tracejadas verticais delimitam o tempo em que os frutos do grupo frio permaneceram a 13 °C.

A produção dos açúcares ocorreu após o pico do etileno, e concomitantemente a esse evento ocorreu a degradação do amido (Figura 4.2-C). Ambos os grupos acumularam quantidades similares de amido (em torno de 20%), com total degradação no fim do amadurecimento (0%).

4.3.2 Proteínas sequenciadas

Os espectros resultantes do sequenciamento das proteínas por ESI-Q-TOF MS/MS foram analisados utilizando o programa Mascot e comparados com as sequências depositadas na base de dados do genoma da banana (D'HONT et al., 2012) acessada em 26 de novembro de 2012.

Com o auxílio desse programa, 67 proteínas comuns a todas as amostras foram identificadas e quantificadas no programa Scaffold com um filtro de probabilidade do match das proteínas de 95% e FDR de 0,4% para peptídeos. Os Apêndices 4, 5, 6 e 7 apresentam as tabelas das proteínas que foram identificadas a partir das análises por espectrometria de massas. Nelas estão relacionadas: o número de identificação da proteína, sua provável identidade, o número de acesso, a massa molecular (MM), a pontuação (score) do Mascot, o número de consultas que correspondem à proteína (Matches), o número de sequências de peptídeos correspondentes e a porcentagem da sequência total protéica coberta.

A representação percentual das funções moleculares das proteínas e a localização celular encontradas nesse estudo foram determinadas utilizando bases de dados (Protonet, UniProt e Kegg) e estão ilustradas na Figura 4.3. De um modo geral, a classe majoritária encontrada nesse estudo participa de processos celulares do metabolismo de carboidratos (39%), seguido de resposta ao estresse (24%),

outros processos metabólicos (21%), defesa da planta a patógenos (13%) e biossíntese de pigmentos (5%). Em relação ao componente celular em que as proteínas estão localizadas, 27% estão no citoplasma, 15% nas mitocôndrias e 15% nos cloroplastos, 7% no núcleo, 6% estão secretados na região extracelular, 5% no apoplasto e 25% em outros componentes celulares.

Figura 4.3. Classificação funcional (A) e localização celular (B) das proteínas a partir da identificação dos peptídeos sequenciados das amostras de banana durante o amadurecimento.

Os dados de todas as proteínas identificadas neste estudo foram submetidos à Análise Multivariada de Componentes Principais como pode ser visualizado na Figura 4.4. Com todas as proteínas presentes, não foi possível visualizar uma separação entre os tratamentos (controle e frio), sendo que a maximização da variabilidade, que foi muito baixa (38,85%) entre as amostras foi mostrada apenas com a discriminação entre os estádios de maturação pela primeira componente.

Figura 4.4. Análise de Componentes Principais, tendo como variáveis todas as proteínas da banana identificadas durante o amadurecimento. Código das amostras: VC = amostra verde do grupo controle (19 °C); VF = amostra verde do grupo frio (13 °C); MC = amostra madura do grupo controle (19 °C); MF = amostra madura do grupo frio (13 °C); números de 1 a 5 referem-se aos *pools*. Os números das variáveis referem-se às proteínas das Tabelas dos Apêndices 4, 5, 6 e 7.

Nesse contexto, para a comparação entre os grupos (controle e frio), os dados foram então submetidos à Análise de Variância (ANOVA), tendo como resultado, 21 proteínas significativas a nível de 5% de probabilidade ($p < 0,05$). Estas proteínas foram submetidas à Análise de Componentes Principais (Figura 4.5) e estão listadas na Tabela 4.2.

No gráfico de Análise de Componentes Principais pode ser visto que as duas primeiras componentes juntas explicaram 58,52% da variabilidade entre as amostras. A primeira componente separou os frutos em relação ao estágio de

maturação, com os frutos verdes à esquerda do gráfico e os frutos maduros à direita do gráfico. Já a segunda componente, separou as amostras em relação aos grupos de armazenamento, com os frutos oriundos do grupo frio nos quadrantes superiores e os frutos do grupo controle nos quadrantes inferiores.

Figura 4.5. Análise de Componentes Principais, tendo como variáveis somente as proteínas significativas ($p \leq 0,05$, ANOVA) da banana identificadas durante o amadurecimento. Código das amostras: VC = amostra verde do grupo controle (19 °C); VF = amostra verde do grupo frio (13 °C); MC = amostra madura do grupo controle (19 °C); MF = amostra madura do grupo frio (13 °C); números de 1 a 5 referem-se aos *pools*. Os números das variáveis referem-se às proteínas significativas da Tabela 4.2.

Tabela 4.2. Proteínas significativas ($p < 0,05$) associadas às amostras (por estágio de maturação e grupo de armazenamento) resultante da Análise de Componentes Principais (Figura 4.5), identidade da proteína, processo biológico em que está relacionado e componente celular que possivelmente atua (pesquisa nas bases de dados Protonet, UniProt e Kegg).

Ponto de maturação / Grupo de armazenamento	Nº	Proteínas identificadas	Processo biológico	Componente celular
Verde Frio	P35	stress responsive protein, putative, expressed	Resposta ao estresse	Outro
	P37	cytochrome c oxidase subunit 5B, mitochondrial precursor, putative, expressed	Outros processos metabólicos	Mitocondria
Verde Controle	P3	L-ascorbate peroxidase, cytosolic	Resposta ao estresse	Citoplasma
	P1	Putative Horcolin	Metabolismo de Energia e Carboidratos	Citoplasma
	P7	Superoxide dismutase [Cu-Zn]	Defesa da planta	Cloroplasto
	P12	Stromal 70 kDa heat shock-related protein, chloroplastic	Resposta ao estresse	Cloroplasto
	P25	Absciscic stress-ripening protein 3	Resposta ao estresse	Outro
	P27	Nascent polypeptide-associated complex subunit alpha-like protein	Resposta ao estresse	Citoplasma
	P53	Probable steroid-binding protein 3	Outros processos metabólicos	Nucleus
Maduro Frio	P4	Thaumatococcus-like protein	Defesa da planta	Secretado
	P5	Isoflavone reductase homolog	Metabolismo de Energia e Carboidratos	Citoplasma
	P9	Granule-bound starch synthase 1, chloroplastic/amyloplastic	Metabolismo de Energia e Carboidratos	Cloroplasto
	P19	Lichenase	Metabolismo de Energia e Carboidratos	Outro
Maduro Controle	P6	Enolase	Metabolismo de Energia e Carboidratos	Citoplasma
	P15	Endochitinase	Defesa da planta	Vacuole
	P17	Defensin-like protein 5	Defesa da planta	Secretado
	P18	Heat shock cognate 70 kDa protein	Resposta ao estresse	Outro
	P33	Germin-like protein 12-1	Defesa da planta	Apoplasto
	P38	1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase	Metabolismo de Energia e Carboidratos	Mitocondria
	P43	Malate dehydrogenase, mitochondrial	Metabolismo de Energia e Carboidratos	Mitocondria
	P57	Metallothionein-like protein type 3	Outros processos metabólicos	Outro

Os frutos verdes dos grupos controle e frio ficaram mais próximos no gráfico (Figura 4.5), sugerindo uma certa similaridade entre si. No entanto, no estágio maduro, houve uma maior discriminação entre os frutos dos grupos controle e frio (pois situaram-se mais afastados no gráfico), apontando um efeito maior da temperatura de armazenamento sobre as proteínas com o desenvolvimento da maturação. Mesmo assim, cada grupo, em cada estágio, ficou em um quadrante do gráfico, sendo associado a proteínas diferentes.

As proteínas *L-ascorbate peroxidase cytosolic* (P3), *nascent polypeptide-associated complex sub-unit alpha-like protein* (P27), *superoxide dismutase [Cu-Zn]* (P7), *abscisic stress-ripening protein 3* (P25), *putative horcolin* (P1), *stromal 70 kDa heat shock-related protein chloroplastic* (P12) e uma *probable steroid-binding protein 3* (P53) foram correlacionadas com as amostras dos frutos verdes do grupo controle e uma *stress responsive protein* (P35) e *cytochrome c oxidase subunit 5B mitochondrial precursor* (P37) foram fortemente correlacionadas com os frutos verdes do grupo frio.

Por sua vez, enolase (P6), endochitinase (P15), *defensin-like protein 5* (P17), *heat shock cognate 70 kDa protein* (P18), *germin-like protein* (P33), *1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase* (P38), *malate dehydrogenase, mitochondrial* (P43) e *metallothionein-like protein type 3* (P57), apresentaram uma forte associação com as amostras maduras do grupo controle enquanto que o grupo frio foi caracterizado pela presença da *thaumatin-like protein* (P4), *isoflavone reductase homolog* (P5), *granule-bound starch synthase 1, chloroplastic / amyloplastic* (P9), e *lichenase* (P19).

Para comparar os níveis de proteínas entre os grupos controle e frio, foi

plotado nos gráficos da Figura 4.6 a abundância espectral normalizada para cada uma das proteínas que apresentaram diferença significativa ($p \leq 0,05$, ANOVA).

Figura 4.6. Contagem espectral normalizada em comparação dos níveis de proteínas significativas resultantes do teste da Anova ($p < 0,05$). Médias e desvio padrão das replicadas experimentais ($n = 5$). Os números das variáveis referem-se às proteínas da Tabela 4.2. Amostras com a mesma letra não diferem estatisticamente.

Dentre as proteínas significativas, as que são responsáveis pela **resposta ao estresse** são em sua maioria, predominantes nos frutos verdes: *L-ascorbate peroxidase, cytosolic* (P3), *Stromal 70 kDa heat shock-related protein, chloroplastic* (P12), *Absciscic stress-ripening protein 3* (P25) e *Nascent polypeptide-associated complex subunit alpha-like protein* (P27) são as proteínas afetadas pela baixa temperatura de armazenamento com redução da abundância nas amostras do grupo frio (Figura 4.6). Exceção dada ao *stress responsive protein, putative, expressed* (P35) que aumenta com o frio.

Dentre as proteínas desse grupo, uma proteína muito importante é a *L-ascorbate peroxidase* (P3), que desempenha um papel essencial na remoção de peróxido de hidrogênio na cadeia respiratória (LU et al., 2005), apresentando atividade catalítica na seguinte reação:

Um estudo realizado com enzimas de plantas (SHIGEOKA et al., 2002) demonstrou que a atividade da *ascorbate peroxidase*, em geral, aumenta juntamente com as atividades de outras enzimas, como a catalase, superóxido dismutase, e glutathione redutase, como resposta ao estresse. Segundo Purvis e Shewfelt (1993), estresses como o resfriamento podem provocar aumento na produção de de oxigênio ativo. Uma diferença fundamental entre espécies de plantas sensíveis e resistentes às baixas temperaturas, deve ser na habilidade de plantas resistentes de reduzir os efeitos destrutivos de radicais livres e moléculas de O_2 ativadas produzidas durante o estresse, e para isso, utilizam antioxidantes enzimas sequestrantes de oxigênio ativo como superóxido dismutase, catalase e peroxidase. No presente estudo, as enzimas *L-ascorbate peroxidase* (P3) e *Superoxide*

dismutase [Cu-Zn] (P7) reduziram nos frutos maduros.

A *heat shock cognate 70 kDa protein* (P18) também atua na resposta ao estresse e está associada aos frutos maduros com redução da abundância com a exposição ao frio. A resposta ao estresse é qualquer processo que resulta em uma mudança de estado ou atividade de uma célula ou de um organismo (em termos de movimento, secreção, produção de enzima, expressão de um gene, etc), como resultado de um distúrbio na homeostase celular, mas não necessariamente, exógena (por exemplo, temperatura, umidade, radiação ionizante).

Já as proteínas responsáveis pela **defesa da planta**, foram predominantes nos frutos maduros, com exceção da *Superoxide dismutase [Cu-Zn]* (P7) que foi mais abundante nos frutos verdes e reduziu os níveis com a exposição ao frio (Figura 4.6). Nas plantas superiores, enzimas *superoxide dismutase* (SODs) atuam como antioxidantes e protegem os componentes celulares da oxidação por espécies reativas de oxigênio (ROS) (ALSCHER et al., 2002). Com essa redução nos níveis dessa enzima, pode-se inferir que pode aumentar a susceptibilidade das células durante os eventos de oxidação, podendo desencadear uma série de eventos indesejáveis, como injúrias, deficiências nutricionais, dentre outros.

Outra proteína que também atua na defesa da planta, é a *thaumatin-like protein* (P4), que aumentou como resposta ao frio. As taumatinas são proteínas relacionadas com patogênese, ação antifúngicas, sendo induzidas durante a adaptação das plantas ao stress osmótico (VIGERS et al., 1991).

As proteínas *endochitinase* (P15), *defensin-like protein 5* (P17) e *Germin-like protein 12-1* (P33) com predominância nos frutos maduros mantiveram seus níveis mesmo com o armazenamento em baixa temperatura. As *endochitinases*, além de

atuarem como defesa da planta, também participam do metabolismo de carboidratos (ROBINSON et al., 1997). A atuação dessa proteína se faz necessária para que a integridade da célula e os produtos do metabolismo não sejam prejudicados.

As proteínas que atuam no **metabolismo de carboidratos**, por sua vez, foram predominantes principalmente nos frutos maduros, com exceção de uma *Putative Horcolin* (P1), que foi mais predominante nos frutos verdes, porém, apresentou redução de seus níveis nos frutos maduros do grupo frio. As proteínas *Isoflavone reductase homolog* (P5) e *Granule-bound starch synthase 1, chloroplastic / amyloplastic* (P9) apresentaram aumento nos níveis como resposta ao frio. A *Granule-bound starch synthase 1, chloroplastic / amyloplastic* (P9) é a enzima responsável pela síntese de amilose no processo biológico de síntese do amido, localizada nos amiloplastos e cloroplastos (SALEHUZZMAN et al., 1993).

Enolase (P6), *Lichenase* (P19) e *1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase* (P38) e *Malate dehydrogenase, mitochondrial* (P43) permaneceram inalteradas com o armazenamento em baixas temperaturas, apresentando diferenças apenas em relação ao ponto de maturação, pois foram mais predominantes nos frutos maduros. A *1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase* (P38) ou ACC oxidase, catalisa o passo final na biossíntese de etileno nas plantas, sendo expresso durante o amadurecimento dos frutos (ZHANG et al., 1995).

Pode-se observar que as proteínas afetadas pelas baixas temperaturas sinalizam um efeito metabólico, em que, nos frutos maduros, foi evidenciado um maior efeito sobre o metabolismo de carboidratos. Isso explica as diferenças observadas na redução do nível de açúcares (principalmente da sacarose), como resposta ao estresse causado pelo frio (Figura 4.1).

De acordo com os resultados obtidos, pode-se observar que as proteínas do fruto verde do grupo controle apresentaram efeito fisiológico normal, com as proteínas que fazem parte do processo de maturação, e no grupo frio, essas proteínas precisam atuar de tal maneira que venham retardar o processo de maturação, daí o fato dos níveis de algumas proteínas serem reduzidos durante esse tipo de armazenamento quando comparado ao grupo controle.

Nas amostras maduras do grupo controle, observa-se a ativação do metabolismo oxidativo, com geração de ATP a partir de glicose (açúcares menores), pois tem aumento da enzima *enolase* que é da via da glicólise, e a associação com o *malate dehidrogenase* que é do ciclo de Krebs. Isso não se vê no frio porque há menos liberação de açúcares menores (glicose). Esse metabolismo mais ativado, que ocorre no grupo controle, requer mais ATP. Já no grupo frio, não é possível ver essas enzimas da via glicolítica e ciclo de Krebs tão evidentes, pois o ATP não está sendo tão necessário. Assim, nas amostras maduras do grupo frio, observa-se que as células parecem não recuperar a atividade metabólica tão rapidamente quanto a normalidade que é devida às amostras do grupo controle.

4.4 CONCLUSÃO

Com a proteômica, foi possível observar o que ocorre com os frutos quando submetidos à baixa temperatura em relação aos níveis de açúcares que foram reduzidos como resposta ao armazenamento com as proteínas oriundas do metabolismo de carboidratos que apresentaram diferenças significativas. Consequentemente, o sabor dos frutos, que é um importantíssimo atributo de qualidade e determinante na aceitação ou rejeição de um alimento, foi alterado com os níveis inferiores de sacarose nas amostras do grupo frio.

4.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGOPIAN, R. G. D.; SOARES, C. A.; PURGATTO, E.; CORDENUNSI, B. R.; LAJOLO, F. M. Identification of fructooligosaccharides in different banana cultivars. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, 56, 3305-3310, 2008.
- ALSCHER, R. G.; ERTURK, N.; HEATH, L. S. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 53 (372), p. 1331–41, 2002.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.
- CARPENTIER, S. C.; WITTERS, E.; LAUKENS, K.; DECKERS, P.; SWNNEN, R.; PANIS, B. Preparation of protein extracts from recalcitrant plant tissues: an evaluation of different methods for two-dimensional gel electrophoresis

analysis. **Proteomics**, v. 5, p. 2497–507, 2005.

CORDENUNSI, B.R.; LAJOLO, F.M. Starch transformation during banana ripening: sucrose synthase and sucrose phosphate synthase. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 43, n. 2, pp. 347-351, 1995.

D'HONT, A.; DENOEUDE, F.; AURY, J-M.; BAURENS, F-C.; CARREEL, F.; GARSMEUR, O.; NOEL, B.; BOCS, S.; DROC, G.; ROUARD, M.; DA SILVA, C.; JABBARI, K.; CARDI, C.; POULAIN, J.; SOUQUET, M.; LABADIE, K.; JOURDA, C.; LENGELLÉ, J.; RODIER-GOUD, M.; ALBERTI, A.; BERNARD, M.; CORREA, M.; AYYAMPALAYAM, S.; MCKAIN, M. R.; LEEBENS-MACK, J.; BURGESS, D.; FREELING, M.; MBÉGUIÉ-A-MBÉGUIÉ, D.; CHABANNES, M.; WICKER, T.; PANAUD, O.; BARBOSA, J.; HRIBOVA, E.; HESLOP-HARRISON, P.; HABAS, R.; RIVALLAN, R.; FRANCOIS, P.; POIRON, C.; KILIAN, A.; BURTHIA, D.; JENNY, C.; BAKRY, F.; BROWN, S.; GUIGNON, V.; KEMA, G.; DITA, M.; WAALWIJK, C.; JOSEPH, S.; DIEVART, A.; JAILLON, O.; LECLERCQ, J.; ARGOUT, X.; LYONS, E.; ALMEIDA, A.; JERIDI, M.; DOLEZEL, J.; ROUX, N.; RISTERUCCI, A-M.; WEISSENBAACH, J. The banana (*Musa acuminata*) genome and the evolution of monocotyledonous plants. **Nature**, v. 488, p. 213-217, 2012.

LU, Z.; TAKANO, T.; LIU S. Purification and characterization of two ascorbate peroxidases of rice (*Oryza sativa* L.) expressed in *Escherichia coli*. **Biotechnology letters**, v. 27, p. 63-67, 2005.

MURAD, A.; SOUZA, G.; GARCIA, J.; RECH, E. Characterisation and quantitation expression analysis of recombinant proteins in plant complex mixtures using nano UPLC mass spectrometry. **Protocol Exchange**,

doi:10.1038/protex.2011.216, 2011.

PURVIS, A. C.; SHEWFELT, R. L. Does the alternative pathway ameliorate chilling injury in sensitive plant tissues? **Physiologia Plantarum**, v. 88, p. 712-718, 1993.

ROBINSON, S. P.; JACOBS, A. K.; DRY, I. B. A class IV chitinase is highly expressed in grape berries during ripening. **Plant Physiology**, v. 114, p. 771-778, 1997.

SALEHUZZMAN, S. N. I. M.; JACOBSEN, E.; VISSER, R. G. F. Isolation and characterization of a cDNA encoding granule-bound starch synthase in cassava (*Manihot esculenta* Crantz) and its antisense expression in potato. **Plant Molecular Biology**, v. 23, p.947-962, 1993.

SHIGEOKA, S.; ISHIKAWA, T.; TAMOI, M.; MIYAGAWA, Y.; TAKEDA, T.; YABUTA, Y.; YOSHIMURA, K. Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, p. 1305–1319, 2002.

TOLEDO, T. T.; NOGUEIRA, S. B.; CORDENUNSI, B. R.; GOZZO, F. C.; PILAU, E. J.; LAJOLO, F. M.; NASCIMENTO, J. R. O. Proteomic analysis of banana fruit reveals proteins that are differentially accumulated during ripening. **Postharvest Biology and Technology**, v. 70, p. 51–58, 2012.

VIGERS, A. J.; ROBERTS, W. K.; SELITRENNIKOFF, C. P. A new family of plant antifungal proteins. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 4, p. 315-323, 1991.

YE, M.; JIANG, X.; FENG, S.; TIAN, R.; ZOU, H. Advances in chromatographic techniques and methods in shotgun proteome analysis. **Trends in Analytical**

Chemistry, v. 26, n. 1, 2007.

ZHANG, Z.; SCHOFIELD, C. J.; BALDWIN, J. E.; THOMAS, P.; JOHN, P.
Expression, purification and characterization of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase from tomato in *Escherichia coli*. **Biochemistry Journal**, v. 307, p. 77-85, 1995.

9. CONSIDERAÇÕES FINAIS

De acordo com os resultados obtidos, conclui-se que para os atributos analisados, as cultivares responderam diferentemente aos efeitos causados pelas baixas temperaturas, a saber:

- Em relação aos parâmetros fisiológicos, na cultivar Prata quando submetida a 13 °C, não foi capaz de inibir a produção de etileno nessa temperatura, sendo necessária submetê-la a 10 °C.
- Quanto aos voláteis, responsáveis pelo aroma e sabor da banana, houve uma maior influência do armazenamento à baixas temperaturas sobre a cv. Nanicão, com uma drástica redução desses compostos. A cv. Prata, porém, mostrou-se mais tolerante, sendo a cultivar mais indicada para exportação, que requer transporte refrigerado, por não sofrer grandes modificações na composição do seu aroma, atributo importante para a aceitação do consumidor;
- Em relação ao atributo cor da casca, nas amostras submetidas ao frio (ambas as cultivares), não houve evidências de efeitos negativos sobre os parâmetros de luminosidade, croma e ângulo de tonalidade;
- Quanto aos níveis de carotenoides, a redução (cv. Prata) ou acúmulo (cv. Nanicão) pode ter ocorrido como consequência de vias metabólicas que utilizam carotenoides terem sido afetadas pelo armazenamento em baixas temperaturas como resposta ao estresse.

- Com a caracterização quantitativa e qualitativa do perfil protéico global, foi possível observar que o efeito sobre algumas proteínas responsáveis pelo metabolismo de carboidratos causando a redução dos níveis de sacarose nos frutos submetidos ao frio.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGOPIAN, R. G. D.; SOARES, C. A.; PURGATTO, E.; CORDENUNSI, B. R.; LAJOLO, F. M. Identification of Fructooligosaccharides in Different Banana Cultivars. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 3305–3310, 2008.
- AGOPIAN, R. G. D.; PURGATTO, E.; CORDENUNSI, B. R.; LAJOLO, F. M.. Synthesis of fructooligosaccharides in banana ‘Prata’ and its relation to invertase activity and sucrose accumulation. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 10765–10771, 2009.
- AHARONI, A.; KEIZER, L. C.; BOUWMEESTER, H. J.; SUN, Z.; ALVAREZ – HUERTA, M.; VERHOEVEN, H.A.; BLAAS, J.; VAN HOUWELINGEN, A. M.; DE VOS, R.C.; VAN DER VOET, H.; JANSEN, R.C.; GUIJ, M.; MOL, J.; DAVIS, R. W.; SCHENA, M.; VAN TUNEN, A.J.; O’CONNELL, A. P. Identification of the SAAT gene involved in strawberry flavor biogenesis by use of DNA microarrays. **Plant Cell**, v. 12, p. 647-62, 2000.
- BERGER, R. C. Fruits I. In: H. Maarse (Ed.) Volatile Compounds in Foods and Beverages, New York: Marcel Dekker Inc, p. 283-304, 1991.
- CHASSY, B. M. Can -omics inform a food safety assessment? **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 58, p. S62-S70, 2010.
- CORDENUNSI, B. R.; LAJOLO, F. M. Starch breakdown during banana ripening: sucrose synthase and sucrose phosphate synthase. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 43, p. 347-351, 1995.

- CORDENUNSI, B. R.; NASCIMENTO, J. R. O.; MOTA, R. V.; LAJOLO, F. M. Phosphoglucose isomerase from bananas: partial characterization and relation to main changes in carbohydrate composition during ripening. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v. 65, p. 2174-2180, 2001.
- FEY, S. J.; LARSEN, P. M. 2D or not 2D. **Current Opinion in Chemical Biology**, v.5, p. 26-33, 2001.
- JIANG, Y.; SONG, J. Fruits and Fruit Flavor: Classification and Biological Characterization. In Y. H. Hui (Ed.), Handbook of fruit and vegetable flavours, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., p. 3-24, 2010.
- KERBAUY, G. B. Frutificação e amadurecimento. In G. B. Kerbaury (Ed.), Fisiologia vegetal. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 358-383, 2008.
- KONICA MINOLTA SENSING, INC. 2007. Precise Color Communication. Color control from perception to instrumentation. Disponível em: <http://konicaminolta.com/instruments/about/network>. Acesso em 15 de julho de 2009.
- LARS, P. C.; MERETE, E.; STINE, K. Fruits and Vegetables of Moderate Climate. In: BERGER, R. G. Flavours and Fragrances - Chemistry, Bioprocessing and Sustainability . Berlin: Springer – Verlag, p. 135 – 188, 2007.
- LICHTENBERG, L. A.; MALBURG, J. L.; HINZ, R. H. Cold Damage in Bananas. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 23, p. 568-572, 2001.

- MATOS, G. D.; PEREIRA-FILHO, E. R.; POPPI, R. J.; ARRUDA, M. A. Z. Análise exploratória em química analítica com emprego de quimiometria: PCA e PCA de imagens. **Revista Analytica**, n. 06, 2003.
- MONTGOMERY, D.G. Design and analysis of experiments. John Wiley & Sons, New York, 2001.
- NEWTON, R. P.; BRENTON, A. G.; SMITH, C. J.; DUDLEY, D. Plant proteome analysis by mass spectrometry: principles, problems, pitfalls and recent developments. **Phytochemistry**, v. 65, p. 1449-1485, 2004.
- OSORIO, S.; MUÑOZ, C.; VALPUESTA, V. Physiology and Biochemistry of Fruit Flavors. In Y. H. Hui (Ed.), Handbook of fruit and vegetable flavours, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., p. 25-43, 2010.
- PERONI-OKITA, F. H. G.; SIMÃO, R. A.; CARDOSO, M. B.; SOARES, C. A.; LAJOLO, F. M.; CORDENUNSI, B. R. In vivo degradation of banana starch: Structural characterization of the degradation process. **Carbohydrate Polymers**, v. 81, p. 291–299, 2010.
- PURGATTO, E.; LAJOLO, F. M.; NASCIMENTO, J. R. O.; CORDENUNSI, B. R. Inhibition of α -amylase activity, starch degradation and sucrose formation by indole-3-acetic acid during banana ripening. **Planta**, v. 212, p. 823-828, 2001.
- QUIRINO, B. F.; CANDIDO, E. S.; CAMPOS, P. F.; FRANCO, O. L.; KRUGRER, R. H. Proteomic approaches to study plant-pathogen interaction. **Phytochemistry**, v. 71, p. 351-362, 2010.

- REINECCIUS, G. Choosing the correct analytical technique in aroma analysis. In: Flavour in food. VOILLEY, A. & ETIÉVANT, P. (Eds.), CRC Press, Boca Raton, p.81-95, 2006.
- RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Rotas bioquímicas e químicas para a formação de compostos voláteis em alimentos. In M. R. B. Franco (Ed.), Aroma e sabor: temas atuais São Paulo: Livraria Varela, p. 177-194, 2003.
- RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. Planejamento de experimentos e otimização de processos. 1ª Ed. Campinas, SP: Editora Casa do Pão, p. 326, 2005.
- ROSSETTO, M. R. M.; PURGATTO, E.; NASCIMENTO, J. R. O.; LAJOLO, F. M.; CORDENUNSI, B. R. Effects of gibberellic acid on sucrose accumulation and sucrose biosynthesizing enzymes activity during banana ripening. **Plant Growth Regulation**, v. 41, p.207–214, 2003.
- ROSSETTO, M. R. M.; LAJOLO, F. M.; CORDENUNSI, B. R. Influência do ácido giberélico na degradação do amido durante o amadurecimento da banana. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, p. 076-081, 2004.
- SALVATO, F.; CARVALHO, M. C. C. G. Métodos e estratégias em proteômica e suas aplicações na área vegetal. **Ciência Rural**, v.40, p. 727-734, 2010.
- SENA, M. M.; COLLINS, C. H.; COLLINS, K. E. Aplicação de métodos quimiométricos na especiação de Cr(VI) em solução aquosa. **Química Nova**, v. 24, n. 3, p. 331-338, 2001.
- SEYMOR, G. B. Banana. In: Seymour, G. B; Taylor, J. E.; Tucker, G. A., (eds.). Biochemistry of Fruit Ripening. 2 ed. London: Chapman & Hall, 1996.

SILVA NETO, S. P. da; GUIMARÃES, T. G. Evolução da cultura da banana no Brasil e no mundo. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2011. Disponível em: <<http://www.cpac.embrapa.br/noticias/artigosmidia/publicados/287/>>.

Acesso em: 05 jan. 2013.

SILVA, E. O.; PUSCHMANN, R.; MOSQUIM, P. R.; SOARES, N. F. F.; SILVA, D. F. P. ; RIBEIRO JUNIOR, J. I.; MENDONÇA, F. V. S. ; SIMÕES, A. N. Utilização do 1-Metilciclopropeno (1-MCP) no amadurecimento controlado de banana 'Prata Anã'. In: Celso Luiz Moretti. (Org.). Iº Seminário Internacional de Pós-colheita e Processamento Mínimo. 1 ed. Brasília: Embrapa Hortaliças, v. 1, 2002.

SONG, J.; FORNEY, C. F. Flavour volatile production and regulation in fruit . **Canadian Journal of Plant Science**, v. 88, p. 537-50, 2008.

SOUZA, J. S.; TORRES FILHO, P. Aspectos socioeconômicos. In: A cultura da banana: aspectos técnicos, socioeconômicos e agroindústrias. Brasília: EMBRAPA-SPI, 585p. 1997.

TYERS, M.; MANN, M. From genomics to proteomics. **Nature**, v.422, n.6928, p.193-197, 2003.

UENOJO, M.; MARÓSTICA JUNIOR, M. R.; PASTORE, G. M. Carotenoides: propriedades, aplicações e biotransformação para formação de compostos de aroma. **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 616-622, 2007.

VALLEDOR, L.; JORRIN, J. Back to the basics: maximizing the information obtained by quantitative two dimensional gel electrophoresis analyses by an appropriate experimental design and statistical analyses. *Journal of*

Proteomics, v.74, n.1, p.1-18, 2011.

VALLEURU, R., VAN DEN ENDE, W. Plant fructans in stress environments: emerging concepts and future prospects. **Journal of Experimental Botany**, v. 59, n.1, p. 2905-2916, 2008.

WILLS, R.; MCGLASSON, B.; GRAHAM, D.; JOYCE, D.C. Postharvest: an introduction to the physiology & handling of fruit, vegetables & ornamentals. 4th ed. Wallingford: New South Wales University Press, p. 60-76, 1998.

YE, M.; JIANG, X.; FENG, S.; TIAN, R.; ZOU, H. Advances in chromatographic techniques and methods in shotgun proteome analysis. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 26, n. 1, 2007.

APÊNDICES

Apêndice 1. Compostos voláteis identificados em banana das cultivares Nanicão e Prata (metodologias polpa e fruto inteiro), armazenadas a 19 ° C (grupo controle), 13 °C e 10 °C (grupos frio), por GC-MS, Índices de Retenção e percentagem de área relativa nos frutos verdes e maduros. Continua.

Pico ^a	Compostos voláteis ^b	RI ^c	cv. Nanicão - Polpa				cv. Nanicão – Futo inteiro				cv. Prata - Polpa				cv. Prata – Fruto inteiro			
			19 °C		13 °C		19 °C		13 °C		19 °C		10 °C		19 °C		10 °C	
			V*	M*	V*	M*	V*	M*	V*	M*	V*	M*	V*	M*	V*	M*	V*	M*
1	Ethyl acetate	949	nd	0,79	nd	nd	nd	0,35	nd	nd	nd	0,34	nd	tr	nd	TR	nd	tr
2	2-Pentanone	983	nd	1,09	nd	nd	nd	0,98	nd	0,59	nd	0,69	nd	0,06	nd	0,26	nd	0,06
3	2-Methylpropyl acetate	1011	nd	3,85	nd	nd	nd	1,45	nd	nd	nd	1,44	nd	0,91	nd	2,33	nd	0,91
4	α-pinene	1018	nd	nd	nd	nd	19,37	nd	nd	nd	nd	nd	22,50	nd	17,83	nd	22,50	nd
5	2-Pentanol acetate	1082	nd	5,10	nd	6,39	nd	4,68	nd	5,36	nd	4,07	nd	15,06	nd	10,68	nd	15,06
6	Hexanal	1093	29,12	nd	9,60	nd	nd	nd	nd	nd	25,64	nd	tr	nd	nd	nd	nd	nd
7	3-Methyl-1-butanol acetate	1133	nd	16,58	nd	5,10	nd	3,48	nd	0,57	nd	9,00	nd	5,88	nd	13,37	nd	5,88
8	Butyl 2-methylpropanoate	1152	nd	nd	nd	nd	nd	0,07	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
9	2-Butyl butanoate	1156	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,09	nd	nd	nd	nd	nd	nd
10	3-Methyl-3-butenol	1157	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,09	nd	0,18	nd	0,09
11	m-Xylene	1161	nd	nd	nd	nd	19,62	nd	40,59	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
12	β-myrcene	1163	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	7,03	nd	nd	nd
13	2-methylpropyl butanoate	1166	2,25	5,79	nd	5,88	nd	nd	nd	nd	nd	4,55	nd	2,64	nd	5,83	nd	2,64
14	2-Methylpropyl 2-methylbutanoate	1180	nd	0,14	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
15	2-Heptanone	1186	nd	0,41	nd	tr	nd	nd	nd	nd	nd	0,30	nd	tr	nd	nd	nd	nd
16	2-Methylpropyl 3-methylbutanoate	1195	nd	3,84	nd	1,82	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
17	Limonene	1197	0,52	nd	nd	nd	18,95	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
18	3-Methylbutyl 2-methylpropanoate	1198	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	2,07	7,87	0,19	nd	3,03	7,87	0,19
19	3-Methyl-1-butanol	1207	nd	0,53	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	1,16	nd	0,14	nd	nd	nd	0,14
20	1-Methylbutyl 2-methylpropanoate	1218	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	4,24	nd	43,94	nd	17,59	nd	43,94
21	Butyl butanoate	1221	nd	6,22	nd	25,48	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
22	2-Hexenal	1223	49,47	nd	80,49	nd	nd	nd	nd	nd	58,35	6,27	nd	nd	nd	nd	nd	nd

Apêndice 1. Compostos voláteis identificados em banana das cultivares Nanicão e Prata (metodologias polpa e fruto inteiro), armazenadas a 19 ° C (grupo controle), 13 °C e 10 °C (grupos frio), por GC-MS, Índices de Retenção e percentagem de área relativa nos frutos verdes e maduros. Continua.

23	1-Pentanol	1250	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,33	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
24	Butyl pentanoate	1251	nd	2,35	nd	2,63	nd	3,63	nd	7,87	nd	1,13	nd	nd	nd	nd	nd
25	α-Ocimene	1253	nd	nd	nd	nd	tr	nd	tr	nd	nd	nd	nd	31,86	nd	nd	nd
26	3-methylbutyl butanoate	1270	nd	23,63	nd	32,72	nd	39,01	nd	41,50	nd	40,23	nd	22,33	nd	20,45	22,33
27	Hexyl acetate	1275	nd	tr	nd	tr	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	tr	nd	tr
28	3-Methylbutyl 2-methylbutanoate	1278	nd	1,14	nd	nd	nd	1,29	nd	1,23	nd	0,49	nd	nd	nd	0,53	nd
29	3-Methyl-2-butenol	1284	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,73	nd	0,52	nd	0,73
30	3-Methylbutyl 3-methylbutanoate	1298	nd	21,96	nd	10,85	nd	38,59	33,59	35,18	nd	18,86	11,65	1,01	nd	18,91	11,65
31	Pentyl butanoate	1303	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	1,21	nd	0,49	nd	1,21
32	(Z)-Ocimene	1303	nd	nd	nd	nd	9,13	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
33	Perillene	1307	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	14,43	nd	nd	nd
34	3-Heptenol acetate	1313	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	3,70	nd	1,89	nd	3,70
35	2-Heptanol	1318	nd	0,14	nd	nd	nd	0,21	nd	nd	nd	0,87	nd	nd	nd	0,06	nd
36	(E)-2-Heptenal	1323	1,30	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,93	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
37	Pentyl 3-methylbutanoate	1337	nd	tr	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
38	(Z)-4-Hepten-2-ol	1342	nd	0,34	nd	nd	nd	nd	nd	nd	1,14	nd	0,23	nd	0,32	nd	0,23
39	Pentyl pentanoate	1348	nd	nd	nd	nd	nd	0,06	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
40	Butyl hexanoate	1351	nd	nd	nd	nd	nd	tr	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
41	1-Hexanol	1351	10,95	0,24	2,46	nd	nd	nd	nd	4,06	0,29	nd	nd	nd	nd	nd	nd
42	4-Methyl-1-pentanol	1352	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	4,72	0,13	nd	0,14	4,72	0,13
43	2-Methylpropyl hexanoate	1352	nd	nd	nd	nd	nd	0,07	nd	0,53	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
44	3-methylbutyl pentanoate	1360	nd	0,23	nd	0,70	nd	0,26	nd	0,66	nd	0,20	nd	0,04	nd	0,11	0,04
45	3-Methyl-3-butenyl 3-methylbutanoate	1369	nd	nd	nd	nd	nd	0,07	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
46	3-Hexen-1-ol	1380	0,31	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,17	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
47	2-Nonanone	1387	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,04	nd	nd	nd	nd	nd	nd
48	Nonanal	1389	0,30	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,26	0,05	nd	nd	nd	nd	nd	nd

Apêndice 1. Compostos voláteis identificados em banana das cultivares Nanicão e Prata (metodologias polpa e fruto inteiro), armazenadas a 19 ° C (grupo controle), 13 °C e 10 °C (grupos frio), por GC-MS, Índices de Retenção e percentagem de área relativa nos frutos verdes e maduros. Continua.

49	1-Methylhexyl butanoate	1395	nd	0,97	nd	0,95	nd	5,22	nd	5,46	nd	1,32	nd	1,03	nd	2,13	nd	1,03
50	(E)-2-Hexen-1-ol	1401	3,09	nd	2,56	nd	nd	nd	nd	nd	2,18	tr	nd	nd	nd	nd	nd	nd
51	3-Ethyl-2-methyl-1,3-hexadiene	1408	tr	nd	tr	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
52	Hexyl butanoate	1412	nd	0,69	nd	1,74	nd	0,25	nd	0,36	nd	0,25	nd	0,30	nd	0,29	nd	0,30
53	4-Hexen-1-ol	1425	nd	0,04	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	tr	nd	nd	nd	nd	nd	nd
54	Hexyl 2-methylbutanoate	1425	nd	nd	nd	nd	nd	tr	nd	0,15	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
55	(E)-2-Octenal	1427	0,49	nd	tr	nd	nd	nd	nd	nd	0,95	nd	tr	nd	nd	nd	nd	nd
56	Hexyl 3-methylbutanoate	1445	nd	1,46	nd	1,40	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,09	nd	nd
57	Hexyl pentanoate	1446	nd	nd	nd	nd	nd	tr	nd	tr	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
58	3-Methylcyclohexanol	1450	nd	1,04	nd	3,61	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
59	(E)-6-Nonenal	1452	tr	nd	tr	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
60	1-Octene-3-ol	1455	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,44	nd	tr	nd	nd	nd	nd	nd
61	1-Heptanol	1457	tr	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
62	Isopentyl hexanoate	1460	nd	0,40	nd	tr	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
63	2-Methylbutyl hexanoate	1464	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,63	nd	0,24	nd	0,44	nd	0,24
64	2,4-Heptadienal	1468	tr	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,25	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
65	2-methyl-Cyclohexanol	1482	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,04	nd	tr	nd	nd	nd	nd
66	(Z)-3-hexenyl 3-methylbutanoate	1486	nd	0,06	nd	nd	nd	0,04	nd	0,37	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
67	2-Ethyl-1-hexanol	1494	tr	nd	tr	nd	10,26	nd	nd	nd	nd	nd	2,40	nd	1,39	0,04	2,40	nd
68	Decanal	1504	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,22	0,05	nd	nd	nd	nd	nd	nd
69	(E)-2-Hepten-1-ol	1515	tr	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
70	(E)-3-hexenyl butanoate	1520	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,09	nd	nd	nd	nd	nd	nd
71	(E)-2-Nonenal,	1536	1,16	nd	2,04	nd	nd	nd	nd	nd	2,48	nd	tr	nd	nd	nd	nd	nd
72	Ethyl 2-hydroxy-3-methylbutanoate	1539	nd	tr	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
73	α-Cedrene	1552	nd	nd	nd	nd	6,11	nd	25,82	nd	nd	nd	7,48	tr	4,71	0,06	7,48	tr
74	β-Cedrene	1573	nd	nd	nd	nd	12,28	0,07	nd	nd	nd	nd	28,15	0,11	11,79	0,16	28,15	0,11

Apêndice 1. Compostos voláteis identificados em banana das cultivares Nanicão e Prata (metodologias polpa e fruto inteiro), armazenadas a 19 ° C (grupo controle), 13 °C e 10 °C (grupos frio), por GC-MS, Índices de Retenção e percentagem de área relativa nos frutos verdes e maduros. Conclusão.

75	1-Hepten-4-ol	1576	nd	0,07	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
76	β-Caryophyllene	1580	nd	0,05	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	3,88	nd	2,49	nd	3,88	nd
77	(E,Z)-2,6-Nonadienal	1580	1,05	nd	2,85	nd	nd	nd	nd	3,52	nd	tr	nd	nd	nd	nd	nd
78	2-Undecanone	1591	nd	0,19	nd	tr	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
79	(Z)-3-Octen-1-ol	1593	nd	0,26	nd	0,73	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
80	(Z)-5-Octen-1-ol	1610	nd	0,07	nd	tr	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
81	α-Caryophyllene	1649	nd	nd	nd	nd	4,29	nd	tr	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
82	Nonanol	1654	tr	0,04	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
83	α-Amorphene	1656	nd	nd	nd	nd	tr	nd	tr	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
84	Murolene	1658	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	6,83	nd	3,96	0,06	6,83	nd
85	β-Farnesene	1668	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	4,53	nd	4,51	tr	4,53	nd
86	(Z)-3-Nonen-1-ol	1678	tr	0,05	tr	tr	nd	nd	nd	nd	tr	nd	tr	nd	nd	nd	nd
87	(Z)-3-Hexen-1-ol, pentanoate	1689	nd	0,08	nd	tr	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
88	(Z)-6-Nonenol	1710	tr	nd	tr	nd	nd	nd	nd	0,23	0,07	nd	nd	nd	nd	nd	nd
89	(E,Z)-3,6-Nonadienol	1750	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	tr	nd	tr	nd	nd	nd	nd	nd
90	2,4-Decadienal	1765	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	tr	nd	tr	nd	nd	nd	nd	nd
91	(E,Z)-2,6-Nonadienol	1771	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	tr	nd	tr	nd	nd	nd	nd	nd
92	3-Methylbutyl benzoate	1901	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,07	nd	tr
93	Eugenol	2114	nd	0,10	nd	nd	nd	0,21	nd	0,19	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd

^a Picos listados de acordo com seus tempos de retenção nos cromatogramas das duas metodologias: polpa e de fruto inteiro, cv. Nanicão e cv. Prata.

^b Compostos identificados por espectros MS (MS) utilizando o banco de dados NIST, comparação de índice de retenção e espectros de massas.

^c Índice de Retenção calculado, usando uma série de n-alcenos como referência.

* Área relativa de cada composto volátil (%) = área do pico do composto / área total dos picos x 100. V = fruto no estágio verde; M = fruto no estágio maduro.
nd = não detectável, presente em quantidade abaixo do limite de detecção ou não está presente. tr = traço < 0,03.

Apêndice 2. Concentração (µg/g peso fresco) de carotenoides da banana cv. Prata armazenados em diferentes temperaturas.

Carotenoides ²	Temperatura	Dias pós colheita ¹										
		1	5	6	8	10	11	18	19	21	22	24
<i>all-trans</i> -luteína	18 °C	0,02±0,00	0,11±0,03	0,21±0,01	0,79±0,01	0,53±0,04	0,80±0,09	-	-	-	-	-
	10 °C	0,02±0,00	-	-	-	-	-	0,26±0,04	0,11±0,00	0,47±0,01	0,36±0,05	0,65±0,06
	13 °C	0,01±0,00	-	-	-	-	-	0,35±0,02	0,24±0,03	0,58±0,02	0,66±0,01	0,49±0,04
<i>all-trans-α</i> -caroteno	18 °C	0,58±0,03	0,81±0,08	0,77±0,02	1,50±0,05	0,87±0,04	1,45±0,10	-	-	-	-	-
	10 °C	0,05±0,02	-	-	-	-	-	0,65±0,03	0,19±0,02	0,35±0,01	0,83±0,06	0,44±0,06
	13 °C	0,49±0,03	-	-	-	-	-	0,85±0,04	0,85±0,04	0,85±0,01	0,84±0,00	0,78±0,11
isômeros + epóxidos de <i>α</i> -caroteno	18 °C	0,14±0,02	0,21±0,05	0,21±0,03	0,09±0,01	0,09±0,01	0,17±0,03	-	-	-	-	-
	10 °C	0,04±0,01	-	-	-	-	-	0,07±0,04	0,11±0,01	0,03±0,01	0,14±0,01	0,07±0,03
	13 °C	0,14±0,10	-	-	-	-	-	0,13±0,04	0,13±0,02	0,24±0,07	0,09±0,01	0,24±0,03
<i>all-trans-β</i> -caroteno	18 °C	0,51±0,03	0,69±0,03	0,68±0,01	1,54±0,05	0,94±0,06	1,37±0,11	-	-	-	-	-
	10 °C	0,03±0,01	-	-	-	-	-	0,53±0,07	0,11±0,03	0,35±0,02	0,76±0,04	0,43±0,06
	13 °C	0,49±0,05	-	-	-	-	-	1,00±0,03	0,93±0,15	1,02±0,01	1,00±0,02	0,84±0,12
isômeros de <i>β</i> -caroteno	18 °C	0,12±0,00	0,14±0,04	0,17±0,03	0,12±0,03	0,11±0,01	0,14±0,02	-	-	-	-	-
	10 °C	0,02±0,01	-	-	-	-	-	0,05±0,03	0,04±0,01	0,04±0,02	0,12±0,02	0,04±0,03
	13 °C	0,10±0,08	-	-	-	-	-	0,11±0,01	0,18±0,01	0,26±0,08	0,11±0,02	0,21±0,01
Carotenoides totais	18 °C	1,37±0,08	1,96±0,23	2,04±0,06	4,04±0,05	2,54±0,16	3,93±0,24	-	-	-	-	-
	10 °C	0,16±0,01	-	-	-	-	-	1,56±0,00	0,56±0,05	1,24±0,01	2,21±0,19	1,63±0,12
	13 °C	1,23±0,27	-	-	-	-	-	2,44±0,10	2,33±0,21	2,95±0,13	2,70±0,00	2,56±0,23

¹ Os dias pós-colheita analisados na determinação de carotenoides foram selecionados a partir do parâmetro "a *" da análise de cor.

² Média e desvio padrão da análise em duplicata.

- Não analisado.

Apêndice 3. Concentração ($\mu\text{g/g}$ peso fresco) de carotenoides da banana cv. Nanicão armazenados em diferentes temperaturas.

		Dias pós colheita ¹								
Carotenoides ²	Temperatura	1	13	14	16	17	20	22	23	24
all- <i>trans</i> -luteína	18 °C	0,08±0,01	0,29±0,03	0,17±0,02	0,19±0,03	-	-	-	-	-
	13 °C	0,07±0,01	-	-	-	0,04±0,00	0,43±0,06	0,11±0,03	0,19±0,02	0,22±0,02
all- <i>trans</i> - α -caroteno	18 °C	0,63±0,03	1,33±0,04	0,62±0,03	0,93±0,09	-	-	-	-	-
	13 °C	0,78±0,10	-	-	-	0,28±0,03	1,62±0,00	0,77±0,12	1,08±0,08	1,06±0,16
isômeros + epóxides de α -caroteno	18 °C	0,07±0,01	0,10±0,02	0,18±0,01	0,16±0,05	-	-	-	-	-
	13 °C	0,11±0,01	-	-	-	0,36±0,05	0,16±0,03	0,21±0,09	0,11±0,03	0,14±0,04
all- <i>trans</i> - β -caroteno	18 °C	0,67±0,03	0,86±0,03	0,39±0,03	0,58±0,07	-	-	-	-	-
	13 °C	0,67±0,11	-	-	-	0,11±0,00	1,32±0,00	0,55±0,08	1,23±0,13	1,24±0,20
isômeros de β -caroteno	18 °C	0,02±0,01	0,04±0,01	0,09±0,01	0,05±0,03	-	-	-	-	-
	13 °C	0,09±0,01	-	-	-	0,07±0,01	0,11±0,01	0,18±0,11	0,03±0,02	0,12±0,04
Carotenoides totais	18 °C	1,47±0,09	2,62±0,01	1,45±0,03	1,91±0,11	-	-	-	-	-
	13 °C	1,72±0,20	-	-	-	0,86±0,04	3,64±0,08	1,82±0,01	2,64±0,18	2,78±0,18

¹ Os dias pós-colheita analisados na determinação de carotenoides foram selecionados a partir do parâmetro "a*" da análise de cor.

² Média e desvio padrão da análise em duplicata.

- Não analisado.

Apêndice 4. Lista de proteínas da banana cv. Nanicão no estágio verde do grupo controle identificadas por meio da análise proteômica *shotgun*. Continua.

Nº	Provável identidade da proteína	Número de acesso	MM (Kda)	Mascot Score	Matches	Sequências	emPAI
P1	Putative Horcolin	GSMUA_Achr9P10790_001	21	1045	30 (25)	4 (4)	1,09
P2	Abscisic stress ripening	GSMUA_Achr11P12030_001	16	132	35 (10)	4 (2)	0,46
P3	L-ascorbate peroxidase, cytosolic	GSMUA_Achr6P33120_001	27	762	38 (26)	8 (6)	1,23
P4	Thaumatococcus-like protein	GSMUA_Achr6P31470_001	20	113	7 (3)	3 (1)	0,17
P5	Isoflavone reductase homolog	GSMUA_Achr2P14320_001	34	60	5 (3)	4 (3)	0,32
P6	Enolase	GSMUA_Achr5P18810_001	48	146	10 (5)	3 (1)	0,07
P7	Superoxide dismutase [Cu-Zn]	GSMUA_Achr2P02380_001	15	258	14 (11)	3 (3)	1,23
P8	Alpha-1,4 glucan phosphorylase L isozyme, chloroplastic/amyloplastic	GSMUA_Achr4P32600_001	105	23	7 (1)	3 (1)	0,03
P10	Putative Non-specific lipid-transfer protein	GSMUA_Achr4P16630_001	12	161	6 (6)	2 (2)	0,61
P12	Stromal 70 kDa heat shock-related protein, chloroplastic	GSMUA_Achr6P28370_001	69	71	17 (7)	7 (4)	0,2
P14	Protein disulfide-isomerase	GSMUA_Achr1P16970_001	56	69	7 (4)	4 (3)	0,18
P16	Triosephosphate isomerase, cytosolic	GSMUA_Achr5P28700_001	27	19	9 (1)	4 (1)	0,12
P17	Defensin-like protein 5	GSMUA_Achr4P29670_001	8	17	5 (1)	2 (1)	0,4
P21	UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase	GSMUA_Achr9P23930_001	51	41	10 (4)	4 (2)	0,13
P22	L-ascorbate peroxidase, cytosolic	GSMUA_Achr5P07280_001	27	526	26 (16)	6 (4)	0,58
P23	Polyphenol oxidase, chloroplastic	GSMUA_Achr6P29370_001	62	81	5 (2)	2 (1)	0,05
P25	Abscisic stress-ripening protein 3	GSMUA_Achr6P25740_001	12	90	5 (3)	2 (2)	0,67
P29	late embryogenesis abundant protein, putative, expressed	GSMUA_Achr10P04300_001	21	30	1 (1)	1 (1)	0,16
P30	OSIGBa0147B06.5 protein	GSMUA_Achr8P12870_001	25	24	3 (2)	2 (2)	0,28
P31	14-3-3-like protein GF14-E	GSMUA_Achr7P10320_001	15	59	10 (3)	4 (1)	0,23
P34	Nucleoside diphosphate kinase 1	GSMUA_Achr5P18300_001	16	89	5 (4)	2 (2)	0,46
P40	Proteasome subunit alpha type-5	GSMUA_Achr10P18720_001	26	72	6 (5)	2 (1)	0,13

Apêndice 4. Lista de proteínas da banana cv. Nanicão no estágio verde do grupo controle identificadas por meio da análise proteômica *shotgun*. Conclusão.

P41	20 kDa chaperonin, chloroplastic Probable phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase	GSMUA_Achr2P00670_001	27	17	3 (1)	2 (1)	0,12
P46	6, mitochondrial	GSMUA_Achr11P04010_001	19	17	3 (1)	2 (1)	0,18
P47	Putative Polygalacturonase inhibitor	GSMUA_Achr9P12430_001	33	13	1 (1)	1 (1)	0,1
P48	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	GSMUA_Achr1P12870_001	45	45	2 (1)	2 (1)	0,07
P49	Putative Polyphenol oxidase A1, chloroplastic	GSMUA_AchrUn_randomP22740_001	67	27	3 (2)	1 (1)	0,05
P51	Ran-binding protein 1 homolog c	GSMUA_Achr11P08420_001	23	40	2 (1)	2 (1)	0,15
P52	4-alpha-glucanotransferase, chloroplastic/amyloplastic	GSMUA_Achr2P22040_001	84	30	1 (1)	1 (1)	0,04
P53	Probable steroid-binding protein 3	GSMUA_Achr6P03970_001	11	96	4 (2)	2 (1)	0,32
P54	Betaine aldehyde dehydrogenase 1, chloroplastic	GSMUA_Achr9P16120_001	55	37	3 (2)	1 (1)	0,06
P58	Probable calcium-binding protein CML7	GSMUA_Achr3P26750_001	17	34	2 (1)	1 (1)	0,2
P59	20 kDa chaperonin, chloroplastic	GSMUA_Achr3P02000_001	27	15	2 (1)	1 (1)	0,12
P60	Peroxiredoxin-2C	GSMUA_Achr10P22170_001	13	21	7 (1)	3 (1)	0,26
P62	subtilisin N-terminal Region family protein, expressed	GSMUA_Achr5P01150_001	11	115	6 (5)	2 (2)	0,74

MM = Massa Molecular

emPAI = Índice de abundância protéica exponencialmente modificado (*Exponentially Modified Protein Abundance Index*)

Apêndice 5. Lista de proteínas da banana cv. Nanicão no estágio verde do grupo frio identificadas por meio da análise proteômica *shotgun*. Continua.

Nº	Provável identidade da proteína	Número de acesso	MM (Kda)	Mascot Score	Matches	Sequências	emPAI
P1	Putative Horcolin	GSMUA_Achr9P10790_001	21	1333	28 (23)	3 (3)	0,8
P2	Abscisic stress ripening	GSMUA_Achr11P12030_001	16	325	60 (21)	6 (3)	0,77
P3	L-ascorbate peroxidase, cytosolic	GSMUA_Achr6P33120_001	27	1185	30 (26)	5 (5)	1,5
P4	Thaumatococcus-like protein	GSMUA_Achr6P31470_001	20	178	13 (9)	3 (3)	0,58
P5	Isoflavone reductase homolog	GSMUA_Achr2P14320_001	34	438	23 (18)	8 (7)	0,92
P6	Enolase	GSMUA_Achr5P18810_001	48	616	14 (14)	4 (4)	0,3
P7	Superoxide dismutase [Cu-Zn]	GSMUA_Achr2P02380_001	15	296	18 (14)	4 (3)	1,23
P8	Alpha-1,4 glucan phosphorylase L isozyme, chloroplastic/amyloplastic	GSMUA_Achr4P32600_001	105	136	18 (11)	7 (7)	0,28
P9	Granule-bound starch synthase 1, chloroplastic/amyloplastic	GSMUA_Achr1P08190_001	68	170	8 (5)	4 (3)	0,15
P10	Putative Non-specific lipid-transfer protein	GSMUA_Achr4P16630_001	12	241	10 (7)	3 (3)	1,05
P11	RuBisCO large subunit-binding protein subunit beta, chloroplastic	GSMUA_Achr3P27620_001	65	51	13 (6)	4 (4)	0,22
P12	Stromal 70 kDa heat shock-related protein, chloroplastic	GSMUA_Achr6P28370_001	69	109	14 (8)	7 (5)	0,26
P13	Polyubiquitin (Fragment)	GSMUA_Achr10P04880_001	22	105	10 (4)	2 (2)	0,32
P14	Protein disulfide-isomerase	GSMUA_Achr1P16970_001	56	151	12 (5)	6 (3)	0,18
P16	Triosephosphate isomerase, cytosolic	GSMUA_Achr5P28700_001	27	146	11 (5)	4 (2)	0,26
P17	Defensin-like protein 5	GSMUA_Achr4P29670_001	8	160	6 (5)	2 (2)	0,96
P18	Heat shock cognate 70 kDa protein	GSMUA_Achr8P20830_001	71	28	6 (2)	3 (2)	0,09
P19	Lichenase	GSMUA_Achr10P01250_001	36	67	5 (2)	3 (1)	0,09
P21	UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase	GSMUA_Achr9P23930_001	51	30	9 (2)	5 (1)	0,06
P22	L-ascorbate peroxidase, cytosolic	GSMUA_Achr5P07280_001	27	791	19 (16)	6 (5)	0,99
P23	Polyphenol oxidase, chloroplastic	GSMUA_Achr6P29370_001	62	153	7 (5)	3 (2)	0,11
P24	dirigent, putative, expressed	GSMUA_Achr10P16840_001	20	165	10 (7)	3 (2)	0,36
P25	Abscisic stress-ripening protein 3	GSMUA_Achr6P25740_001	12	295	12 (6)	2 (2)	0,67
P29	late embryogenesis abundant protein, putative, expressed	GSMUA_Achr10P04300_001	21	60	3 (2)	2 (1)	0,16
P30	OSIGBa0147B06.5 protein	GSMUA_Achr8P12870_001	25	48	9 (2)	3 (1)	0,13
P32	Cysteine proteinase inhibitor 12	GSMUA_Achr3P18480_001	23	126	13 (5)	7 (3)	0,5
P33	Germin-like protein 12-1	GSMUA_Achr9P30640_001	25	71	2 (2)	1 (1)	0,13
P34	Nucleoside diphosphate kinase 1	GSMUA_Achr5P18300_001	16	102	3 (3)	2 (2)	0,46

Apêndice 5. Lista de proteínas da banana cv. Nanicão no estágio verde do grupo frio identificadas por meio da análise proteômica *shotgun*. Conclusão.

P35	stress responsive protein, putative, expressed	GSMUA_Achr11P25060_001	32	38	7 (2)	2 (2)	0,22
P36	Glycine cleavage system H protein, mitochondrial	GSMUA_Achr3P23560_001	17	32	5 (2)	2 (1)	0,2
P40	Proteasome subunit alpha type-5	GSMUA_Achr10P18720_001	26	61	5 (3)	2 (1)	0,13
P41	20 kDa chaperonin, chloroplastic	GSMUA_Achr2P00670_001	27	21	4 (1)	2 (1)	0,12
P42	abscisic stress-ripening, putative, expressed	GSMUA_Achr6P25730_001	17	259	38 (14)	4 (2)	0,45
P46	Probable phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase 6, mitochondrial	GSMUA_Achr11P04010_001	19	61	5 (3)	2 (2)	0,39
P47	Putative Polygalacturonase inhibitor	GSMUA_Achr9P12430_001	33	13	1 (1)	1 (1)	0,1
P50	Putative Pyruvate kinase, cytosolic isozyme	GSMUA_Achr10P15400_001	58	125	7 (5)	2 (2)	0,12
P52	4-alpha-glucanotransferase, chloroplastic/amyloplastic	GSMUA_Achr2P22040_001	84	37	1 (1)	1 (1)	0,04
P53	Probable steroid-binding protein 3	GSMUA_Achr6P03970_001	11	93	7 (2)	2 (1)	0,32
P56	Catalase isozyme 2	GSMUA_Achr5P15820_001	54	56	5 (3)	2 (1)	0,06
P58	Probable calcium-binding protein CML7	GSMUA_Achr3P26750_001	17	35	5 (2)	2 (2)	0,44
P59	20 kDa chaperonin, chloroplastic	GSMUA_Achr3P02000_001	27	27	2 (2)	1 (1)	0,12
P60	Peroxiredoxin-2C	GSMUA_Achr10P22170_001	13	14	4 (1)	2 (1)	0,26
P62	subtilisin N-terminal Region family protein, expressed	GSMUA_Achr5P01150_001	11	48	3 (2)	2 (1)	0,32
P64	Alcohol dehydrogenase 1	GSMUA_Achr2P08040_001	41	29	2 (1)	1 (1)	0,08

MM = Massa Molecular

emPAI = Índice de abundância protéica exponencialmente modificado (*Exponentially Modified Protein Abundance Index*)

Apêndice 6. Lista de proteínas da banana cv. Nanicão no estágio maduro do grupo controle identificadas por meio da análise proteômica *shotgun*. Continua.

Nº	Provável identidade da proteína	Número de acesso	MM (Kda)	Mascot Score	Matches	Sequências	emPAI
P1	Putative Horcolin	GSMUA_Achr9P10790_001	21	1380	36 (34)	4 (4)	1,09
P2	Abscisic stress ripening	GSMUA_Achr11P12030_001	16	276	40 (12)	6 (4)	1,14
P3	L-ascorbate peroxidase, cytosolic	GSMUA_Achr6P33120_001	27	443	16 (12)	5 (4)	0,58
P4	Thaumatococcus-like protein	GSMUA_Achr6P31470_001	20	479	16 (11)	4 (4)	0,85
P5	Isoflavone reductase homolog	GSMUA_Achr2P14320_001	34	422	24 (17)	9 (7)	0,92
P6	Enolase	GSMUA_Achr5P18810_001	48	754	24 (20)	10 (7)	0,59
P7	Superoxide dismutase [Cu-Zn] Alpha-1,4 glucan phosphorylase L isozyme,	GSMUA_Achr2P02380_001	15	460	18 (14)	6 (5)	2,33
P8	chloroplastic/amyloplastic	GSMUA_Achr4P32600_001	105	213	12 (9)	7 (5)	0,17
P9	Granule-bound starch synthase 1, chloroplastic/amyloplastic	GSMUA_Achr1P08190_001	68	48	5 (2)	3 (1)	0,05
P10	Putative Non-specific lipid-transfer protein RuBisCO large subunit-binding protein subunit beta,	GSMUA_Achr4P16630_001	12	303	11 (10)	4 (3)	1,05
P11	chloroplastic	GSMUA_Achr3P27620_001	65	221	14 (7)	5 (3)	0,16
P12	Stromal 70 kDa heat shock-related protein, chloroplastic	GSMUA_Achr6P28370_001	69	99	11 (4)	5 (1)	0,05
P14	Protein disulfide-isomerase	GSMUA_Achr1P16970_001	56	259	18 (9)	9 (5)	0,33
P15	Endochitinase	GSMUA_Achr3P26900_001	33	237	15 (6)	5 (2)	0,2
P16	Triosephosphate isomerase, cytosolic	GSMUA_Achr5P28700_001	27	140	10 (6)	3 (2)	0,26
P17	Defensin-like protein 5	GSMUA_Achr4P29670_001	8	134	5 (5)	2 (2)	0,96
P18	Heat shock cognate 70 kDa protein	GSMUA_Achr8P20830_001	71	124	11 (4)	6 (2)	0,09
P19	Lichenase	GSMUA_Achr10P01250_001	36	187	14 (5)	6 (3)	0,3
P20	Adenosylhomocysteinase	GSMUA_Achr9P01630_001	46	138	8 (5)	5 (3)	0,23
P21	UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase	GSMUA_Achr9P23930_001	51	71	14 (5)	5 (3)	0,2
P22	L-ascorbate peroxidase, cytosolic	GSMUA_Achr5P07280_001	27	285	8 (7)	3 (3)	0,41
P23	Polyphenol oxidase, chloroplastic	GSMUA_Achr6P29370_001	62	222	6 (6)	2 (2)	0,11
P24	dirigent, putative, expressed	GSMUA_Achr10P16840_001	20	222	10 (7)	3 (2)	0,36
P26	Calmodulin	GSMUA_Achr10P00360_001	17	72	10 (3)	3 (2)	0,44
P28	Probable mitochondrial saccharopine dehydrogenase	GSMUA_Achr10P11620_001	189	71	11 (3)	5 (1)	0,03

Apêndice 6. Lista de proteínas da banana cv. Nanicão no estágio maduro do grupo controle identificadas por meio da análise proteômica *shotgun*. Conclusão.

P29	late embryogenesis abundant protein, putative, expressed	GSMUA_Achr10P04300_001	21	102	5 (5)	1 (1)	0,16
P30	OSIGBa0147B06.5 protein	GSMUA_Achr8P12870_001	25	178	8 (5)	2 (2)	0,28
P31	14-3-3-like protein GF14-E	GSMUA_Achr7P10320_001	15	141	10 (7)	3 (2)	1,02
P32	Cysteine proteinase inhibitor 12	GSMUA_Achr3P18480_001	23	55	6 (1)	4 (1)	0,15
P33	Germin-like protein 12-1	GSMUA_Achr9P30640_001	25	124	5 (4)	2 (2)	0,28
P34	Nucleoside diphosphate kinase 1	GSMUA_Achr5P18300_001	16	146	7 (4)	2 (2)	0,46
P35	stress responsive protein, putative, expressed	GSMUA_Achr11P25060_001	32	21	2 (2)	1 (1)	0,1
P36	Glycine cleavage system H protein, mitochondrial	GSMUA_Achr3P23560_001	17	59	4 (2)	2 (1)	0,2
P38	1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase	GSMUA_Achr7P18420_001	36	72	3 (3)	1 (1)	0,09
P40	Proteasome subunit alpha type-5	GSMUA_Achr10P18720_001	26	86	6 (5)	2 (1)	0,13
P42	abscisic stress-ripening, putative, expressed	GSMUA_Achr6P25730_001	17	183	24 (7)	4 (2)	0,45
P43	Malate dehydrogenase, mitochondrial	GSMUA_Achr4P08580_001	36	53	7 (4)	4 (3)	0,3
P46	Probable phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase 6, mitochondrial	GSMUA_Achr11P04010_001	19	29	2 (1)	2 (1)	0,18
P48	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	GSMUA_Achr1P12870_001	45	24	1 (1)	1 (1)	0,07
P49	Putative Polyphenol oxidase A1, chloroplastic	GSMUA_AchrUn_randomP22740_001	67	50	3 (1)	1 (1)	0,05
P51	Ran-binding protein 1 homolog c	GSMUA_Achr11P08420_001	23	33	5 (1)	4 (1)	0,15
P52	4-alpha-glucanotransferase, chloroplastic/amyloplastic	GSMUA_Achr2P22040_001	84	41	1 (1)	1 (1)	0,04
P54	Betaine aldehyde dehydrogenase 1, chloroplastic	GSMUA_Achr9P16120_001	55	30	3 (1)	1 (1)	0,06
P57	Metallothionein-like protein type 3	GSMUA_Achr3P16210_001	7	88	3 (3)	1 (1)	0,48
P59	20 kDa chaperonin, chloroplastic	GSMUA_Achr3P02000_001	27	15	1 (1)	1 (1)	0,12
P60	Peroxisome oxidin-2C	GSMUA_Achr10P22170_001	13	14	3 (1)	2 (1)	0,26

MM = Massa Molecular

emPAI = Índice de abundância protéica exponencialmente modificado (*Exponentially Modified Protein Abundance Index*)

Apêndice 7. Lista de proteínas da banana cv. Nanicão no estágio maduro do grupo frio identificadas por meio da análise proteômica *shotgun*. Continua.

Nº	Provável identidade da proteína	Número de acesso	MM (Kda)	Mascot Score	Matches	Sequências	emPAI
P1	Putative Horcolin	GSMUA_Achr9P10790_001	21	1594	32 (30)	3 (3)	0,8
P2	Abscisic stress ripening	GSMUA_Achr11P12030_001	16	428	46 (22)	7 (4)	1,14
P3	L-ascorbate peroxidase, cytosolic	GSMUA_Achr6P33120_001	27	968	21 (20)	6 (5)	0,99
P4	Thaumatococcus-like protein	GSMUA_Achr6P31470_001	20	423	23 (16)	4 (4)	0,85
P5	Isoflavone reductase homolog	GSMUA_Achr2P14320_001	34	541	25 (22)	8 (8)	1,1
P6	Enolase	GSMUA_Achr5P18810_001	48	830	25 (21)	7 (5)	0,49
P7	Superoxide dismutase [Cu-Zn]	GSMUA_Achr2P02380_001	15	495	17 (16)	4 (4)	1,72
P8	Alpha-1,4 glucan phosphorylase L isozyme, chloroplastic/amyloplastic	GSMUA_Achr4P32600_001	105	178	15 (8)	8 (5)	0,24
P9	Granule-bound starch synthase 1, chloroplastic/amyloplastic	GSMUA_Achr1P08190_001	68	543	28 (21)	9 (7)	0,39
P10	Putative Non-specific lipid-transfer protein	GSMUA_Achr4P16630_001	12	301	8 (8)	3 (3)	1,05
P11	RuBisCO large subunit-binding protein subunit beta, chloroplastic	GSMUA_Achr3P27620_001	65	176	11 (9)	4 (4)	0,22
P12	Stromal 70 kDa heat shock-related protein, chloroplastic	GSMUA_Achr6P28370_001	69	113	13 (7)	6 (4)	0,2
P14	Protein disulfide-isomerase	GSMUA_Achr1P16970_001	56	322	21 (11)	9 (6)	0,4
P15	Endochitinase	GSMUA_Achr3P26900_001	33	389	9 (8)	3 (3)	0,32
P16	Triosephosphate isomerase, cytosolic	GSMUA_Achr5P28700_001	27	192	9 (7)	3 (3)	0,41
P17	Defensin-like protein 5	GSMUA_Achr4P29670_001	8	124	5 (4)	2 (2)	0,96
P18	Heat shock cognate 70 kDa protein	GSMUA_Achr8P20830_001	71	96	17 (6)	6 (4)	0,25
P19	Lichenase	GSMUA_Achr10P01250_001	36	153	8 (3)	4 (2)	0,19
P20	Adenosylhomocysteinase	GSMUA_Achr9P01630_001	46	145	7 (4)	3 (2)	0,15
P21	UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase	GSMUA_Achr9P23930_001	51	56	3 (2)	2 (2)	0,13
P22	L-ascorbate peroxidase, cytosolic	GSMUA_Achr5P07280_001	27	533	12 (12)	4 (4)	0,58
P23	Polyphenol oxidase, chloroplastic	GSMUA_Achr6P29370_001	62	180	4 (4)	2 (2)	0,11
P24	dirigent, putative, expressed	GSMUA_Achr10P16840_001	20	182	9 (5)	2 (2)	0,36
P29	late embryogenesis abundant protein, putative, expressed	GSMUA_Achr10P04300_001	21	66	3 (3)	1 (1)	0,16
P30	OSIGBa0147B06.5 protein	GSMUA_Achr8P12870_001	25	96	3 (3)	2 (2)	0,28
P32	Cysteine proteinase inhibitor 12	GSMUA_Achr3P18480_001	23	44	3 (1)	2 (1)	0,15
P33	Germin-like protein 12-1	GSMUA_Achr9P30640_001	25	135	5 (3)	2 (1)	0,13
P34	Nucleoside diphosphate kinase 1	GSMUA_Achr5P18300_001	16	56	3 (3)	2 (2)	0,46

Apêndice 7. Lista de proteínas da banana cv. Nanicão no estágio maduro do grupo frio identificadas por meio da análise proteômica *shotgun*. Conclusão.

P35	stress responsive protein, putative, expressed	GSMUA_Achr11P25060_001	32	24	4 (4)	2 (2)	0,22
P36	Glycine cleavage system H protein, mitochondrial	GSMUA_Achr3P23560_001	17	48	4 (3)	2 (2)	0,44
P38	1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase	GSMUA_Achr7P18420_001	36	24	5 (1)	1 (1)	0,09
P40	Proteasome subunit alpha type-5	GSMUA_Achr10P18720_001	26	24	3 (1)	2 (1)	0,13
P41	20 kDa chaperonin, chloroplastic	GSMUA_Achr2P00670_001	27	41	3 (2)	2 (1)	0,12
P42	abscisic stress-ripening, putative, expressed	GSMUA_Achr6P25730_001	17	339	32 (14)	4 (2)	0,45
P43	Malate dehydrogenase, mitochondrial	GSMUA_Achr4P08580_001	36	66	5 (4)	2 (1)	0,09
P46	Probable phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase 6, mitochondrial	GSMUA_Achr11P04010_001	19	27	3 (2)	2 (2)	0,39
P47	Putative Polygalacturonase inhibitor	GSMUA_Achr9P12430_001	33	51	4 (3)	2 (2)	0,21
P48	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	GSMUA_Achr1P12870_001	45	29	5 (2)	2 (1)	0,07
P50	Putative Pyruvate kinase, cytosolic isozyme	GSMUA_Achr10P15400_001	58	23	6 (3)	2 (1)	0,06
P58	Probable calcium-binding protein CML7	GSMUA_Achr3P26750_001	17	25	2 (1)	2 (1)	0,2
P64	Alcohol dehydrogenase 1	GSMUA_Achr2P08040_001	41	32	6 (1)	3 (1)	0,08

MM = Massa Molecular

emPAI = Índice de abundância protéica exponencialmente modificado (*Exponentially Modified Protein Abundance Index*)