

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS GENÉTICOS
CURSO DE MESTRADO**

**EXTRATOS FLORAIS DE BANANEIRA E SUA INFLUÊNCIA NA
GERMINAÇÃO IN VITRO DE GRÃOS DE PÓLEN**

MARCOS MACHADO DA ROCHA

**CRUZ DAS ALMAS – BAHIA
Julho 2014**

**EXTRATOS FLORAIS DE BANANEIRA E SUA INFLUÊNCIA NA
GERMINAÇÃO IN VITRO DE GRÃOS DE PÓLEN**

MARCOS MACHADO DA ROCHA

Biólogo
Universidade do Estado da Bahia, 2008

Dissertação submetida ao Colegiado de Curso do Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia e Embrapa Mandioca e Fruticultura, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Recursos Genéticos Vegetais.

Orientadora: Prof. Dra. Janay de Almeida dos Santos-Serejo
Coorientador: Prof. Dr. Fábio de Souza Dias
Coorientadora: Dra. Taliane Leila Soares

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA
MESTRADO EM RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS
CRUZ DAS ALMAS - BAHIA – 2014

FICHA CATALOGRÁFICA

R672m	<p>Rocha, Marcos Machado da. Extratos florais de bananeira e sua influência na germinação <i>in vitro</i> de grãos de pólen / Marcos Machado da Rocha. Cruz das Almas, BA, 2014. 69f.; il.</p> <p>Orientadora: Janay Almeida dos Santos-Serejo. Coorientador: Fabio de Souza Dias.</p> <p>Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas.</p> <p>1.Banana – Cultivo <i>in vitro</i>. 2.Banana – Melhoramento genético. 3.Germinação – Análise. I.Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas. II.Título.</p> <p style="text-align: right;">CDD: 634.772</p>
-------	---

Ficha elaborada pela Biblioteca Universitária de Cruz das Almas - UFRB.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS GENÉTICOS
CURSO DE MESTRADO

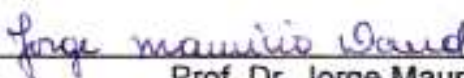
COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE
MARCOS MACHADO DA ROCHA



Profa. Dra. Janay Almeida dos Santos-Serejo

Embrapa Mandioca e Fruticultura - CNPMF

(Orientadora)



Prof. Dr. Jorge Mauricio David

UFBA – Instituto de Química



Prof. Dr. Edson Perito Amorim

Embrapa Mandioca e Fruticultura - CNPMF

Dissertação homologada pelo Colegiado do Curso de Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais em..... Conferindo o Grau de Mestre em Recursos Genéticos Vegetais em

DEDICATÓRIA

Dedico a Deus pela oportunidade concedida;

Aos meus pais por mais uma conquista, em especial a minha mãe pelo seu tempo e dedicação incondicional ao seu filho;

Aos meus irmãos que sempre de uma maneira ou outra estiveram ao meu lado;

Aos queridos sobrinhos e afilhada que este trabalho sirva de inspiração para seus próprios sonhos;

À Ednalva Alves do Nascimento, mi niña, esposa e companheira, pelo amor, carinho, incentivo e compreensão mesmo nos momentos que fiquei ausente para poder escrever este trabalho.

“Na história da humanidade (e dos animais também) aqueles que aprenderam a colaborar e improvisar foram os que prevaleceram”.

Charles Darwin

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que, de alguma forma, me auxiliaram na execução deste trabalho. Agradeço a Deus pela saúde, a minha família, amigos e apoio dado durante minha caminhada até aqui.

A Prof^a. Dra. Janay Almeida dos Santos-Serejo, pela orientação neste trabalho e pela dedicação despendida à minha formação profissional e paciência pelos momentos difíceis numa caminhada árdua que é orientar na pesquisa científica;

Ao Prof. Dr. Fabio de Souza Dias, pela orientação, pelo incentivo, pela paciência dada durante a realização deste trabalho e pela amizade que sem sua orientação teria sido muito mais difícil;

A Dra. Taliane Leila Soares pelo acompanhamento nas atividades práticas de laboratório e compartilhamento de parte dos seus conhecimentos e pelo apoio dado nas revisões dos trabalhos;

À Universidade Federal do Recôncavo da Bahia ao Programa de Pós Graduação em Recursos Genéticos Vegetais e a Embrapa Mandioca e Fruticultura pela oportunidade de me qualificar profissionalmente.

A coordenação do curso de Recursos Genéticos Vegetais e secretaria que sem eles tudo seria mais difícil;

Aos professores do curso de Recursos Genéticos Vegetais em especial aos que tive contato pela oportunidade de troca de experiências e conhecimentos e pelos bons conselhos;

Ao pessoal do Núcleo de Apoio Técnico Específico - NUATE/CETEC da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia/UFRB pelo apoio nos momentos de estresse e em que tive que me ausentar para poder fazer esse trabalho;

Ao pessoal dos laboratórios de cultura de tecidos, tecnologia de alimentos, biologia celular e molecular e pessoal de campo da EMBRAPA onde passei vários momentos de trabalho árduo. Não citarei nomes para não cometer nenhuma injustiça;

À CAPES e ao CNPq pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	
ABSTRACT	
INTRODUÇÃO.....	12
Capítulo 1	
EFEITO DE EXTRATO AQUOSO DE TECIDOS FLORAIS NA GERMINAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE GRÃOS DE PÓLEN	24
Capítulo 2	
ANÁLISE QUÍMICA DOS EXTRATOS AQUOSOS DE ESTIGMA E PORÇÃO DISTAL DO OVÁRIO DE BANANEIRA.....	42
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	69

EXTRATOS FLORAIS DE BANANEIRA E SUA INFLUÊNCIA NA GERMINAÇÃO IN VITRO DE GRÃOS DE PÓLEN

Autor: Marcos Machado da Rocha

Orientadora: Janay de Almeida dos Santos-Serejo

Co-orientador: Fábio de Souza Dias

Co-orientadora: Taliane Leila Soares

RESUMO: As cultivares de bananeira são em sua maioria triploides, desenvolvem os frutos por partenocarpia e apresentam níveis de esterilidade diferenciados, fatores que dificultam o melhoramento genético por hibridação. Estudos preliminares mostram que em cultivares do subgrupo Cavendish os grãos de pólen germinam na superfície do estigma, aparentemente sem que ocorra penetração do tubo polínico, e na porção distal do ovário há a presença de uma necrose, fatos que podem estar relacionados à esterilidade destas cultivares. O objetivo deste trabalho foi investigar o efeito de extratos florais na germinação *in vitro* do pólen e determinar os tipos de compostos presentes nestas regiões que possam representar possíveis barreiras químicas da fertilização em bananeira. No experimento 1, grãos de pólen de bananeira diploide foram inoculados em meio de cultura suplementado com extratos florais de 'Grande Naine' nas concentrações de 5%, 10%, 15%, 20%, 25% e 30%, avaliado-se o efeito destes sobre a germinação *in vitro* do pólen. No experimento 2 foi avaliado o percentual de germinação *in vitro* dos grãos de pólen de 20 diploides na presença do extrato floral na concentração de 5%. A concentração de 5% e 10% proporcionaram maior germinação de pólen para ambos os genótipos avaliados no experimento 1, sendo que nestas concentrações, o extrato do estigma foi significativamente superior ao do ovário. Em comparação com o controle, quando se utilizou extrato de estigma de Grande Naine a 5% ocorreu um aumento de cerca de 3 e 7 vezes na germinação *in vitro* do pólen dos diploides 042052-04 e 089087-01, respectivamente. Análises químicas foram realizadas a fim de identificar os possíveis compostos presentes nos extratos aquosos do estigma e da porção distal do ovário de bananeiras triploides e diploides. Os triploides mostraram uma concentração de fenóis total elevada em relação aos diploides

principalmente nos estigmas. O sequestro do radical livre (% SRL) nos estigmas também mostrou alta atividade antioxidante. Em contra partida a concentração de flavonoides totais é baixa em todas as amostras testadas. Nas análises cromatográficas conseguiu-se identificar espectros que indicam a possibilidade de encontrar compostos fenólicos nas amostras de estigma e porção distal do ovário de 'Grande Naine' (AAA), 'Prata Anã' (AAB); '089087-01' (AA) e 'TH03-01' (AA). Os compostos identificados foram extraídos dos tecidos em água. Possivelmente compostos não solúveis em água devem estar presentes nestes tecidos, sendo necessária a utilização de outros solventes a fim de se determinar outros compostos presentes no extrato bruto de tecidos florais que podem estar influenciando na germinação dos grãos de pólen e crescimento do tubo polínico.

Palavras-chave: Esterilidade, germinação *in vitro* de pólen, compostos fenólicos.

COMPOSITION OF BANANA FLOWER EXTRACTS AND ITS INFLUENCE ON IN VITRO GERMINATION OF POLLEN GRAINS

Author: Marcos Machado da Rocha

Advisor: Janay de Almeida Santos-Serejo

Co-Advisor: Fábio de Souza Dias

Co-Advisor: Taliane Leila Soares

SUMMARY: The banana cultivars are mostly triploid, develop the fruit by parthenocarpy and feature levels of differentiated sterility, factors that hinder breeding by hybridization. Preliminary studies show that in the Cavendish subgroup cultivars of pollen grains germinate on the stigma surface seemingly devoid of pollen tube penetration occurs, and the distal portion of the ovary is the presence of necrosis, facts that can be related to sterility of these cultivars. The aim of this study was to investigate the effect of floral extracts *in vitro* pollen germination and determine the types of compounds present in these regions that may represent potential chemical fertilization barriers. In experiment 1, banana diploid pollen grains were inoculated in the culture medium supplemented with floral extracts 'Grand Nine' in concentrations of 5%, 10%, 15%, 20%, 25% and 30%, assessed the effect of these on *in vitro* pollen germination. In experiment 2, was rated the percentage of *in vitro* germination of pollen grains of 20 diploides in the presence of floral extract at a concentration of 5%. The concentration of 5% and 10% have provided greater pollen germination for both genotypes evaluated in experiment 1, being that in these concentrations, the stigma extract was significantly superior to the ovary. In comparison with the control, when using large stigma extract Grand Nine to 5% there was an increase of about 3 and 7 times on *in vitro* pollen germination of diploid 089087-01 and 042052-04, respectively. Chemical analyzes were performed in order to identify the possible compounds present in aqueous extracts of the stigma and the distal portion of the ovary of banana trees triploides and diploides. The triploid showed a high concentration of total phenolics in relation to diploid mainly concentrated in stigmata. The % FRL (sequestration of free radical) in stigmata also showed high activity antioxidant. In against the concentration of total flavonoids is low in all samples tested.

Chromatographic analysis were able to identify spectra which indicate the possibility of finding phenolic compounds present in samples of stigma and distal portion of the ovary of 'Grande Naine' (AAA), 'Prata Anã' (AAB); '089087-01' (AA) and 'TH03-01' (AA). Identified compounds were extracted from tissues in water. Possibly not-soluble compounds in water should be present in these tissues, requiring the use of other solvents in order to determine other compounds present in the crude extract of floral fabrics that may influencing the germination of pollen grains and pollen grains and pollen tube growth.

Keywords: Sterility, *in vitro* germination of pollen, phenolic compounds.

INTRODUÇÃO

A banana (*Musa spp.*) é uma das principais frutas consumidas no mundo devido ao seu alto valor nutricional, cultivada principalmente em regiões tropicais e subtropicais. É a segunda fruta mais consumida no país perdendo apenas para a laranja. Possui uma importância social, pois a cultura é explorada por pequenos empresários rurais o que permite a fixação de mão de obra no campo, constituindo-se uma fonte de renda contínua para esses agricultores (MASCARENHAS, 1997).

O Brasil é um dos maiores produtores mundiais de bananas, com 7,3 milhões de toneladas produzidas em 2014, em uma área aproximada de 493 mil hectares (IBGE, 2014). Mesmo sendo um dos maiores produtores mundiais, as exportações brasileiras são menores quando comparadas com outros países produtores, como o Equador (LESSA *et al.*, 2010). A baixa exportação banana brasileira está associada ao elevado consumo *per capita* e, principalmente, ao fato de que variedades de maior preferência dos consumidores brasileiros serem do tipo Prata (AAB).

A baixa disponibilidade de variedades comerciais de banana que sejam produtivas, com porte adequado, adaptadas a diferentes ecossistemas, resistentes às principais doenças e com boas características de pós-colheita, são fatores que limitam a produtividade (SILVA *et al.*, 2002b; LESSA *et al.*, 2010).

A FLOR DA BANANEIRA

A inflorescência da bananeira é uma espécie de espiga simples que emerge do centro das bainhas foliares, apresentando brácteas ovaladas, distribuídas em espiral pela ráquis, em cujas axilas se formam as flores (DANTAS *et al.*, 1999; BORGES & SOUZA, 2004) O eixo floral, completamente formado, apresenta as regiões distintas: a parte compreendida entre o ápice do rizoma e a base da primeira bráctea vazia, sem glomérulos florais; o engaço, que se estende desde a primeira bráctea vazia até a primeira

bráctea com glomérulo de flores femininas; e a parte que se estende desde a primeira penca até o ápice do “coração” ou mangará (SOTO BALLESTERO, 1992). As primeiras pencas da ráquis são constituídas de flores femininas, com ovário bem desenvolvido, que darão origem aos frutos (Figura 1A). No restante do eixo da inflorescência, aparecem grupos de flores masculinas caracterizadas por ovário reduzido e estames desenvolvidos, são as que produzem pólen (Figura 1B). As flores são irregulares e constituídas de três grupos de peças florais: perianto, androceu e gineceu, os quais são inseridos no ponto de conexão do estilete com o ovário, formando a flor epígina, visto que o ovário é ínfero.

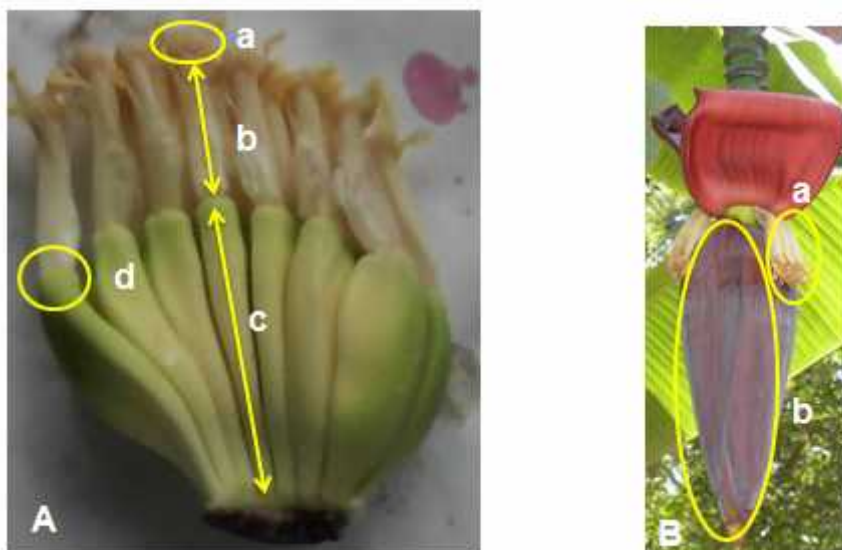


Figura 1. Estruturas florais de bananeira. A) Flores femininas: a) estigma, b) estilete, c) ovário, d) Porção distal do ovário. B) Inflorescência masculina: a) flores masculinas, b) coração

FERTILIDADE EM BANANEIRA

O gênero *Musa* apresenta duas seções: a seção *Musa* com 33 espécies que apresentam número básico de cromossomos igual a 11, englobando as antigas seções *Eumusa* e *Rhodochlamys*, e a seção *Callimusa* com 37

espécies com $n = 10$ e $n = 9$, incorporando a antiga seção *Australimusa* (HÄKKINEN, 2013).

As espécies silvestres são diploides ($2n = 22$ cromossomos), seminíferas, geralmente alógamas e apresentam sementes férteis, das quais dependem para sua dispersão e regeneração, enquanto as cultivares comerciais são triploides, com ($2n = 33$ cromossomos) e não produzem sementes (SILVA *et al.*, 2011). A ausência de sementes pode estar relacionada a intensa seleção agrônômica para esse fator, devendo ser um reflexo do processo de domesticação da espécie. Assim, as bananeiras comestíveis normalmente são propagadas vegetativamente, por meio de mudas desenvolvidas a partir de gemas do seu caule subterrâneo ou rizoma (SHEPHERD *et al.*, 1986).

As cultivares do subgrupo Cavendish (AAA), que são as de maior interesse no mercado internacional, apresentam alto grau de esterilidade, o que dificulta a transferência de características de interesse dos diploides para estes triploides mediante hibridações. Assim é importante o uso de metodologias alternativas para a obtenção de híbridos com características desejáveis (SOARES, 2011). Em decorrência das limitações do melhoramento convencional, relacionados com os diferentes níveis de esterilidade das cultivares triploides, outras técnicas, como engenharia genética, mutação, variação somaclonal, hibridação somática e duplicação de cromossomos vêm sendo usadas no melhoramento da bananeira (PANIS *et al.*, 1995; SANTOS-SEREJO *et al.*, 2006; SILVA *et al.*, 2005; AMORIM *et al.*, 2013).

Para que se possam conhecer os mecanismos que envolvem a esterilidade em *Musa* spp. são necessários estudos sobre barreiras pré-zigóticas, interação pólen-pistilo, estudos químicos e bioquímicos que visem tentar elucidar ou mesmo ajudar a compreender os fatores que inibem a fertilidade das musáceas.

INTERÇÃO PÓLEN-PISTILO

A reprodução sexuada das plantas depende de interações altamente específicas entre pólen e pistilo, o gametófito masculino e o órgão reprodutivo feminino, respectivamente (KNOX, 1984., MASCARENHAS, 1993). O pistilo é

composto de três grandes peças estruturais: o estigma, o estilete e o ovário. O estigma tem uma superfície receptiva ao pólen e várias camadas subjacentes de células secretoras. O estilete conecta o estigma, basalmente localizado no ovário contendo os óvulos. Dentro de cada óvulo, uma célula-ovo se desenvolve dentro do saco embrionário. Na polinização compatível, o grão de pólen germina após o contato com a superfície do estigma. Cada tubo polínico penetra as camadas de células do estigma e alonga-se dentro de um tecido especializado no estilete chamado de tecido transmissor, eventualmente alcançando o ovário, onde entra em um óvulo e penetra o saco embrionário. A ponta do tubo polínico estoura o saco embrionário para liberar as células germinais masculinas para fertilização. Pólen incompatível não se movimenta no estigma, ou em qualquer lugar ao longo da via do alongamento do tubo polínico. O pólen tem uma alta capacidade para suportar esta atividade durante a germinação e crescimento do tubo (STEER & STEER, 1988; HESLOP-HARRISON, 1987).

Acredita-se que os tecidos do pistilo fornecem meios físicos, suporte químico e orientação direcional para o processo de crescimento de tubo polínico (KNOX, 1984., MASCARENHAS, 1993., STEER & STEER, 1988). Observações citológicas e bioquímicas (KNOX, 1984., MASCARENHAS, 1993) sugerem que o pólen e a matriz extracelular do pistilo (LORD & SANDERS, 1992) e o citoesqueleto do pólen (PIERSON & CRESTI, 1992) são importantes para o processo de polinização. Experiências demonstram alguns desses componentes e muitas moléculas candidatas que podem participar de interações-compatíveis no pólen-pistilo. Dentre essas moléculas, encontra-se descrita uma proteína específica da matriz extracelular do pólen de milho, Pex-1. (RUBINSTEIN, et. al., 1995). Conhecer melhor a estrutura química das regiões florais de musáceas podem fornecer subsídios para discussão de novos paradigmas relacionados à fertilidade ou infertilidade do gênero *Musa*.

COMPOSIÇÃO QUÍMICA

Os compostos fenólicos ocorrem em todos os frutos como um grupo diverso de metabolitos secundários (ROBARDS, 1999). Metabólitos secundários de plantas atualmente é objeto de muito interesse na pesquisa,

mas sua extração, como parte fitoquímica ou investigações biológicas apresenta desafios específicos que devem ser abordadas durante todo o processo de extração do solvente. Com uma extração bem sucedida começa a cuidadosa seleção e preparação das amostras da planta e profunda revisão de literatura apropriada para indicações de quais protocolos são adequados para uma classe particular de compostos ou espécies de plantas. Durante a extração de material vegetal, minimizando a interferência de compostos que podem ser coextraídos com os compostos alvos, e evitando a contaminação do material extraído, bem como evitando a decomposição de metabolitos importantes (JONES, 2006).

Metabolitos vegetais secundários referem-se a compostos que são essenciais para a sobrevivência da planta inteira ou de algumas partes da planta. Eles são caracterizados por um número de aspectos, incluindo a diversidade estrutural e síntese, a partir de um conjunto limitado de precursores biossintéticos, tipicamente fosfoenolpiruvato, piruvato, acetato e um pouco de aminoácidos, acetil-CoA e a malonil-CoA. Várias hipóteses têm sido propostas para explicar a produção de metabólitos secundários, mas nenhuma é inteiramente satisfatória (ROBARDS, 1999). Como a proposta do trabalho é tentar elucidar possíveis metabólitos secundários, produzidos em estruturas femininas das musáceas, torna-se necessário a busca de compostos fenólicos, pois é um grupo altamente representativo em plantas.

Os compostos fenólicos são extremamente diversificados (Figura 2). Por exemplo, fenólicos diterpenos, como carnosol e rosmanol foram identificados em ervas e especiarias (HOULIHAN, 1984). Enquanto o principal fenólico constituinte da soja são isoflavonas glicosídeos (ELDRIDGE & KWOLEK, 1983; NAIM, GESTETNER, ZILKAH, BIRK & BONDI, 1973), além de diversos ácidos fenólicos (PRATT & BIRAC, 1979), incluindo ácidos clorogênico, caféico e ferúlico. Estes mesmos compostos fenólicos são encontrados na maioria das frutas e legumes.

Os métodos tradicionais para a determinação de componente fenólico são baseados na medição de fenóis totais ou, em alguns casos, o 1,2-difenóis (NERGIZ & UNAL, 1991) por causa de sua associação com reações de escurecimento. Na necessidade de criação de perfis e identificar duplos compostos fenólicos foram necessários substituir métodos tradicionais

baseados em colorimetria por análises cromatográficas líquidas de alto desempenho (HPLC) e atualmente por novos métodos incluindo cromatografia a gás (CG).

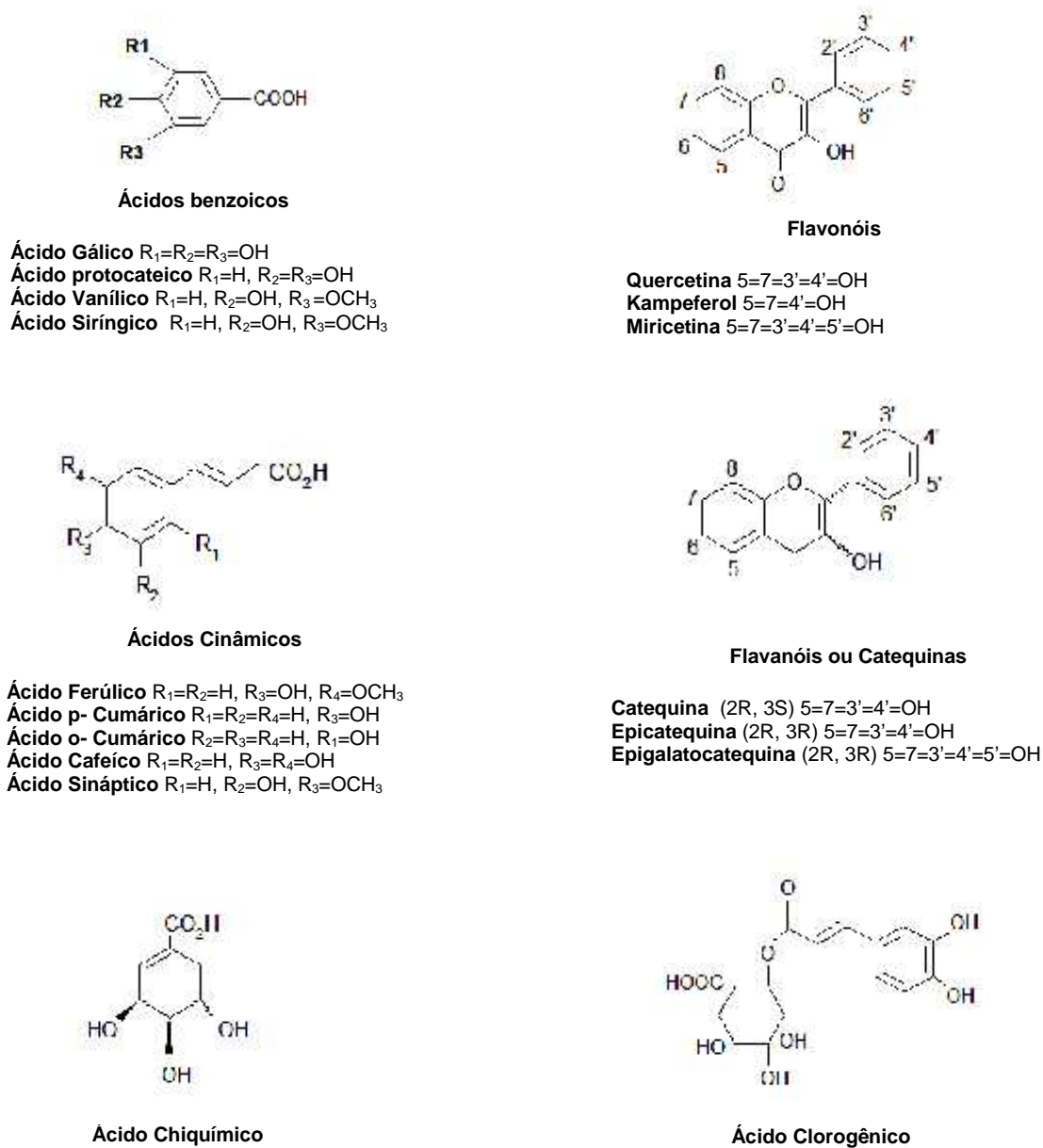


Figura 2. Estrutura química de compostos fenólicos.

Fonte: ROBARDS, 1999.

Um dos primeiros relatórios (WULF & NAGEL, 1976) sobre cromatografia (HPLC) de compostos fenólicos, diferentes misturas de ácido acético, água e metanol foram usados para separar os membros de várias classes de fenóis, e o efeito da modificação orgânica sobre seletividade foram deduzidos. Desde então, numerosas fases móveis têm sido empregadas com diferentes modificações (geralmente metanol, acetonitrilo ou tetra-hidrofurano), ácidos (ácido acético, ácido trifluoroacético e fórmico) e sais (fosfato de amônio).

A detecção é geralmente baseada na absorção de radiação ultravioleta ou, menos comumente, a radiação visível em vários comprimentos de onda, características da classe de compostos fenólicos compostos (BENGOECHEA, 1995). A maioria dos flavonoides exibem duas grandes bandas de absorção; Banda I na gama de 320 ± 385 nm, que representa o anel B e Banda de absorção II, no intervalo de 250 ± 285 nm, representando a absorção A-anel. Um desvio para o vermelho é induzido, aumentando o número de grupos hidroxilo, por exemplo, a partir de 367 nm em kaempferol, a 71 nm em quercetina e 374 nm, em miricetina. Por esta razão, Banda I em flavonas está sempre em flavonóis, um comprimento de onda mais curto por 20 ± 30 nm do que nos equivalentes flavonóis.

Portanto, a busca da elucidação dos compostos fenólicos e demais compostos presentes na porção distal do ovário e estigma de bananeiras para o entendimento dos possíveis impedimentos na fertilização em *Musa* ssp. torna-se um caminho longo e com muitos obstáculos a serem superados pela pesquisa científica.

REFERÊNCIAS

- AMORIM, E. P.; SANTOS-SEREJO, J. A.; AMORIM, V. B. O.; FERREIRA, C. F.; SILVA, S. O. Banana breeding at Embrapa Cassava and Fruits. **Acta Horticulturae**, v. 986, p. 171-176, 2013.
- BENGOECHEA, L.; HERNÁNDEZ, T.; QUESADA, C.; BARTOLOMÉ, B.; ESTRELLA, I.; GÓMEZ-CORDOVÉS, C. Structure of hydroxycinnamic acid derivatives established by high-performance liquid chromatography with photodiode-array detection. **Chromatographia**, v. 41, p. 94-98, 1995.
- BORGES, A. L.; SOUZA, L. DA S. **O cultivo da bananeira**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2004. 279 p.
- CHRISTELOVÁ, P.; MIROSLAV, V.; HRIBOVÁ, E.; DE LANGHE, E.; DOLEZEL, J. A. multi gene sequence-based phylogeny of the Musaceae (banana) family. **BMC Evolutionary Biology**, v. 11, p. 103, 2011.
- CRONQUIST, A. The divisions and classes of plants. **Botanical Review**, v. 26, p. 425-82, 1981.
- DANTAS, A. C. V. L.; DANTAS, J. L. L.; ALVES, E. J. Estrutura da planta. In: ALVES, E. J. **A cultura da banana**. Brasília: Embrapa-SPI/ Cruz das Almas: Embrapa- CNPMF, pp. 47-60, 1999.
- ELDRIDGE, A. C.; KWOLEK, W. F. Soybean isoflavones: effect of environment and variety on composition. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.31, p. 394-396, 1983.
- HÄKKINEN, M. Reappraisal of sectional taxonomy in *Musa* (Musaceae). **Taxon**, v. 62, p. 809–813, 2013.
- HESLOP-HARRISON, J. Pollen germination and pollen tube growth. **International Review of Cytology**, v. 107, p.1-78, 1987.

HOULIHAN, C. M.; HO, C. T., CHANG, S. S. Elucidation of the chemical structure of novel antioxidant, rosmaridiphenol, isolated from rosemary. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.61, p.1036-1039, 1984.

HIPPOLYTE, I.; JENNY, C.; GARDES, L.; BAKRY, F.; RIVALLAN, R.; POMIES, V.; CUBRY, P.; TOMEKPE, K.; RISTERUCCI, A. M.; ROUX, N.; ROUARD, M.; ARNAUD, E.; KOLESNILKOVA-ALLEN, M.; PERRIER, X. Foundation characteristics of edible Musa triploids revealed from allelic distribution of SSR markers. **Annals of Botany**, v. 109, p. 937-951, 2012.

IBGE. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. LSPA, **Levantamento sistemático da Produção Agrícola**. 2014. Acesso em 20 de Julho de 2014.

JONES, W. P.; KINGHORN, A. D. Extraction of plant secondary metabolites. In: **Methods in biotechnology – Natural Products Isolation**, 2nd. Humana Press. Totowa, New Jersey. 2006.

KNOX R. B.; SHIVANNA, K. R.; TAYLOR, P.; XU, H. Isolation of sperms from the pollen tubes of flowering plants during fertilization. **Plant Physiology**, v.87, p. 647-650, 1988.

LESSA, L.S.; LEDO, C.A.S.; SILVA, S.O.; AMORIM, E.P.; OLIVEIRA, T.K.O. Características agrônômica de híbridos diploides de bananeira em três ciclos de produção em Cruz das Almas, Bahia. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 32, p. 213-221, 2010.

LI, L. F.; HAKKINEN, M.; YUAN, Y. M.; HAO, G.; GE, X. J. Molecular phylogeny and systematics of the banana family (Musaceae) inferred from multiple nuclear and chloroplast DNA fragments, with a special reference to the genus Musa. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 51, p. 1-10, 2010.

LOPES, M. A.,; FÁVERO, A. P.; FERREIRA, M. A. J. F.; FALEIRO, F. G.; FOLLE, S. M., GUIMARÃES, E. P. **Pré-melhoramento de plantas: estado de**

arte e experiências de sucesso. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2011. 614 p.

LORD, E. M.; SANDERS, L. C. Roles for the extracellular matrix in plant development and pollination: A special case of cell movement in plants. **Developmental Biology**, v. 153, p. 16–28, 1992.

MASCARENHAS, G. Análise do mercado brasileiro de banana. **Preços Agrícolas**, Piracicaba, n. 134, p. 4-12, 1997.

MASCARENHAS, J. P. Molecular Mechanisms of Pollen Tube Growth and Differentiation. **The Plant Cell**, v. 5, p.1303-1314, 1993.

NAIM, M.; GESTETNER, B.; KIRSON, I.; BIRK, Y.; BONDI, A. A new isoflavone from soybean. **Phytochemistry**, v.12, p.169-170, 1973.

NERGIZ, C.; UNAL, K. Effect of method of extraction on the total polyphenol, 1,2-diphenol content and stability of virgin olive oil. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 56, p. 79-84, 1991.

PANIS, B.; COTE, F.; ESCALANT, J. V.; SAGI, L. Aspects of genetic engineering in banana. In: FRISON, E. A., HORRY, J. P., WAELE, D. De. **New fronteirs in resistance breeding for nematode: fusarium and sigatoka.** Montpellier: IPAGRI: CIRAD: ARDI: INIBAP, 1995. P. 182-183.

PIERSON, E. S.; CRESTI, M. **International Review of Cytology**, v. 140, 73-125, 1992.

PRATT, D. E.; BIRAC, P. Source of antioxidant activity of soy-bean and soy products. **Journal of Food Science**, v.44, p.1720-1722, 1979.

ROBARDS, K.; PRENZLER, P. D.; TUCKERB, G.; SWATSITANGB, P.; GLOVERA, W. Phenolics compounds and their role in oxidative processes in fruits. **Food Chemistry**, 1999, v. 66, p. 401-436.

RUBINSTEIN, A. L.; BROADWATER, A. H.; LOWREY, K. B.; BEDINGER, P. A. Pex1, a pollen-specific gene with an extensin-like domain. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 92, p. 3086-3090, 1995.

SANTOS-SEREJO, J.; SOUZA, A. S.; MORAIS LINO, L. S.; SOARES, T. L.; SOUZA, F. V. D.; KOBAYASHI, A. K.; FERREIRA, C. F.; SILVA, S. O. Biotecnologia: algo mais que plantas transgênicas. In: REUNIÃO INTERNACIONAL ACORBAT, 17., 2006, Joinville. **Anais...** Joinville: Acorbat, 2006.

SHEPHERD, K.; DANTAS, J. L. L.; ALVES, E. J. Melhoramento genético da bananeira. **Revista informe Agropecuário**, São João Del Rey, v.12, p. 11-19, 1986.

SILVA, S. O.; ALVES, E. J.; LIMA, M. B.; SILVEIRA, J.R.S. Bananeira. In: BRUCKNER, C. H. **Melhoramento de Fruteiras Tropicais**. Viçosa: Editora da Universidade Federal de viçosa, 2002. p. 101-157.

SILVA, S. O.; MORAIS, L. S.; SANTOS-SEREJO, J. A. Melhoramento genético de bananeira para resistência às doenças. In: ROMANO, R.; RAMOS, R. R. S. (ed.). **Recursos Genéticos Vegetais no Estado da Bahia**. Feira de Santana: Editora da Universidade Federal da Fronteira Sul, 2005. p. 49-67.

SIMMONDS, N. W. **Los Plátanos**. Barcelona: Blume, 1973. 539 p.

SOARES, T. L. **Eficiência do Sistema reprodutivo de bananeira**. Tese (Doutorado)- Universidade Federal do Recôncavo da Bahia. Centro de Ciências Agrárias Ambientais e Biológicas, Área de concentração: Fitotecnia. Cruz das Almas, BA. 2011.

SOTO BALLESTERO, M. **Banana: Cultivo e comercialización**. San José: Litografía e Imprensa, 1992. p.170-240.

STEER, M. W.; STEER, J. M. Pollen tube tip growth. **New Phytologist**, v. 111, p. 323-358, 1989.

WULF, L. W.; NAGEL, C. W. Analysis of phenolic acids and favonoids by high pressure liquid chromatography. **Journal of Chromatography**, v. 116, p. 271-279, 1976.

CAPITULO 1

EFEITO DO EXTRATO AQUOSO DE TECIDOS FLORAIS DE BANANEIRA NA GERMINAÇÃO IN VITRO DE PÓLEN

EFEITO DO EXTRATO AQUOSO DE TECIDOS FLORAIS DE BANANEIRA NA GERMINAÇÃO IN VITRO DE PÓLEN

RESUMO: Embora sejam relatados na literatura diferentes fatores que podem ser responsáveis pela ausência ou baixa produção de sementes em cultivares de bananeira, existem poucas informações que revelam quais as barreiras físicas e/ou bioquímicas que limitam ou impedem a produção de sementes. O objetivo do presente estudo foi investigar a ação de extratos aquosos de estigma e porção distal de ovário, em concentrações variadas, na germinação e crescimento do tubo polínico de variedades de bananeira. No experimento 1 os grãos de pólen de híbridos diploides bananeira (AA), 089087-01 e 042052-04, foram inoculados em meio de cultura básico acrescido de extratos florais (estigma e ovário) de 'Grande Naine' nas concentrações (5%, 10%, 15%, 20%, 25% e 30%). As concentrações de 5% e 10% proporcionaram maior germinação de pólen para ambos os genótipos avaliados. Em contrapartida, houve efeito negativo para a germinação à medida que adicionou-se extrato: em concentrações maiores que 10%, indicando a presença de substâncias que em concentrações mais elevadas limitam a germinação do pólen. No experimento 2 foi testada a melhor concentração do extrato aquoso de estigma que promoveu melhor germinação *in vitro* e crescimento do tubo polínico. O extrato do estigma do diploide (AA) 089087-01, que produz muitas sementes, e triploide Grande Naine (AAA) que é estéril, foi adicionado ao meio de cultura para a germinação do pólen a 5%. Como doadores de pólen foram avaliados 20 genótipos de diploides que produzem alto número de sementes. O diploide 089087-01 apresentou maior porcentagem de germinação *in vitro* do grão de pólen em extrato bruto a 5% de Grande Naine (95,86%). O extrato bruto a 5% do diploide 089087-01 mostrou-se menos efetivo que o de Grande Naine, sendo que a maior porcentagem de germinação do pólen foi obtida no genótipo 013019-01 (55,57%). A adição de extrato aquoso a 5% do estigma de Grande Naine e do diploide 089087-01 ao meio de cultura aumentou em média em 196,21% e 141,22%, respectivamente, a porcentagem de germinação *in vitro* do pólen dos genótipos analisados.

Palavras-chave: Extrato floral, infertilidade, germinação de pólen *in vitro*.

EFFECT OF CRUDE EXTRACT OF FLORAL TISSUES OF BANANA IN VITRO POLLEN GERMINATING

SUMMARY: There are few literature about physical and / or biochemical barriers limiting or preventing seed production. The literature reports the existence of that may be responsible for the absence or low seed production in banana cultivars. The aim of the present study was to investigate the action of aqueous extracts of stigma and distal portion of the ovary, in different concentrations, in the germination and pollen tube's growth of banana varieties. In experiment 1, the pollen grains of diploid banana hybrids (AA), 089087-01 and 042052-04 were inoculated in basic culture medium and was adictioned floral extracts (stigma and ovary) of 'Grande Naine' 5%, 10%, 15%, 20%, 25% and 30% concentrations of 5% and 10% provided higher pollen germination for both genotypes. In contrast, there was negative for germination as above extract: in concentrations greater than 10% effect, indicating the presence of substances in higher concentrations limited to pollen germination. In experiment 2 we tested the best concentration of the crude extract of stigma that best promoted twinning *in vitro* and pollen tube growth. The extract from the stigma of diploid (AA) 089087-01, which produces many seeds, Grand Naine and triploid (AAA) which is sterile, was added to the culture medium for pollen germination to 5%. As pollen donors 20 diploid genotypes that produce large numbers of seeds were evaluated. The diploid 089087-01 showed higher germination *in vitro* pollen grain crude 5% of Grand Naine (95.86%) extract. The aqueous extract 5% of the diploid 089087-01 was less effective than the Grand Naine, with the highest percentage of pollen germination was obtained in the genotype 013019-01 (55.57%). The addition of 5% of gross stigma extract and Grand Naine diploid 089087-01 to the culture medium increased on average by 196.21% and 141.22%, respectively, the percentage of *in vitro* germination of pollen genotypes analyzed.

Key words: Aqueous extract, infertility, *in vitro* germination of pollen

INTRODUÇÃO

A banana é uma das frutas mais consumidas em todas as regiões do globo, sendo uma fruta de importância significativa nos países tropicais. Além do sabor, são vários os atrativos nutricionais de estímulo ao seu consumo; é rica em vitaminas A e C, além de fibras e potássio. Esta fruta assume importância social e econômica em mais de 80 países, principalmente em pequenas propriedades (SILVA *et al.* 2002a., SENA, 2011). O Brasil é um dos maiores produtores mundiais de bananas, com 7,3 milhões de toneladas produzidas em 2014, em uma área aproximada de 493 mil hectares (IBGE, 2014). Apesar de o Brasil ser um dos principais produtores mundiais perde em produtividades para países como a Índia, devido à baixa disponibilidade de variedades comerciais de banana que sejam produtivas, com porte adequado, adaptadas a diferentes ecossistemas, resistentes às principais doenças e com boas características de pós-colheita, são fatores que limitam a produtividade (SILVA *et al.*, 2002b; LESSA *et al.*, 2010).

As cultivares de bananeira são triploides e apresentam diferentes níveis de fertilidade. Cultivares do subgrupo Prata produz poucas sementes quando cruzadas com diploides (AA). Por outro lado as cultivares do subgrupo Cavendish (Grande Naine, Williams, Nanica, Nanicão, etc.) apresentam alto nível de esterilidade, dificultando a obtenção de híbridos mediante cruzamentos.

O melhoramento genético convencional de bananas e plátanos é dificultado, devido principalmente a diferentes graus de esterilidades das cultivares triploides. A maioria dos programas de melhoramento convencional se baseia na obtenção de diploides melhorados, os quais são utilizados como parentais em cruzamentos com outros diploides ou alguns triploides que conservam certa fertilidade feminina (ESCALANT e SANDOVAL, 1992, SILVA *et al.*, 2001).

Novas técnicas biotecnológicas, a exemplo, a indução da duplicação de cromossomos *in vitro*, a duplicação cromossômica de diploides promissores permite a produção de plantas autotetraploides possivelmente férteis, que podem ser utilizadas em cruzamentos com diploides melhorados para geração

de triploides secundários (AAA) com resistência a doenças e frutos com boas características agronômicas (BAKRY *et al.*, 2007; AMORIM *et al.*, 2013).

Estudos preliminares visando investigar a esterilidade em cultivares do subgrupo Cavendish (Grande Naine, Nanicão e Nanica) mostraram que na antese as flores femininas apresentam um escurecimento (oxidação) na região distal do ovário, no qual poderia ocorrer devido à produção de substâncias que contribuiriam para dificultar a penetração e o crescimento do tubo polínico (SOARES *et al.*, 2014). Além disso, em condições de campo, quando os grãos de pólen são depositados sobre o estigma de Grande Naine é observado o crescimento do tubo polínico, mas aparentemente não ocorre a penetração no estigma (SOARES *et al.*, 2014). Estas observações sugerem a ocorrência de alguma barreira química ou física que limita a fertilização em cultivares do subgrupo Cavendish.

Desse modo, o objetivo do presente estudo foi avaliar a influência dos extratos de estigma e da porção distal do ovário na germinação *in vitro* de grãos de pólen e crescimento do tubo polínico em bananeiras diploides.

MATERIAL E MÉTODOS

Experimento 1 – Efeito do extrato de estigma e da porção distal do ovário na germinação *in vitro* de grãos de pólen de bananeira

Material Vegetal

Os Genótipos que forneceram o extrato floral feminino: Grande Naine (AAA), utilizando o estigma, parte floral feminina. Os genótipos utilizados como doadores de pólen foram os diploides (AA) melhorados 042052-04 (M53 x Sowmuk) e 089087-01 [(Malaccensis x Sinwobogi) x (Calcutta x Heva)], que produzem elevada quantidade de grãos de pólen viáveis.

Metodologia

Teste de germinação *in vitro* de grãos de pólen de bananeira em meio contendo extrato aquoso de tecidos florais

Para o preparo do extrato aquoso foram coletadas flores femininas de Grande Naine, em fase de antese, e acondicionados dentro de sacos plásticos, isolados, em caixa de isopor com gelo. Os estigmas e o segmento da porção distal do ovário foram excisados, e sem tratamento para desinfestação, foram macerados em nitrogênio líquido ($N_{2(l)}$). O material vegetal transformado em pó foi pesado em balança analítica seguindo a proporção de 0,150 mg do tecido em pó para dissolução em 1,5 mL de água destilada. Esse material acondicionado em tubos tipo falcon foi agitado em agitadores de tubos tipo “vortex” por 1 minuto em seguida centrifugado a 11.000 rpm por 15 minutos. Após essa etapa, os extratos florais (estigma e ovário) de ‘Grande Naine’ foram filtrados com filtro estéril de 45 μ m e adicionados nas concentrações (5%, 10%, 15%, 20%, 25% e 30%) (v/v) ao meio de cultura proposto por Soares *et al.* (2008) já autoclavado a 121 °C por 20 minutos, composto de 15% de sacarose, 0,01% de ácido bórico, 0,01% de nitrato de potássio, 0,03% de nitrato de cálcio e 0,02% de sulfato de magnésio, solidificado com 0,08% de Agar, pH ajustado em 7,0.

Para a germinação *in vitro* os grãos de pólen, sem qualquer processo de desinfestação, foram inoculados em placas de Petri estéreis (60 X 50 mm) contendo aproximadamente 12,5 mL do meio de cultura.

Grãos de pólen foram distribuídos no meio com auxílio de um pincel para promover a distribuição homogênea do pólen. Utilizou-se para cada placa um mix de pólen oriundo de cinco anteras/flor. Após a inoculação, as placas foram mantidas em condições controladas de $27 \pm 1^\circ\text{C}$ no escuro, antes de se realizar a contagem dos grãos de pólen germinados e a medição do comprimento do tubo polínico após 24 horas de incubação, mediante observação em um estereomicroscópio binocular com objetiva 10x.

Para a percentagem de germinação foram contabilizados todos os grãos da placa de Petri e para o comprimento do tubo polínico foram mensurados 40 tubos polínicos, com auxílio de uma ocular micrométrica, com dados convertidos em milímetros (mm). Foram considerados germinados os grãos de pólen que possuíam tubo polínico com tamanho igual ou superior ao diâmetro do próprio pólen.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em esquema fatorial (2 genótipos x 2 extratos x 6 concentrações do extrato). Os dados de

porcentagem foram transformados para arc sen ($x / 100$) antes da análise estatística para o comprimento de tubo polínico, e as médias obtidas foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade para os meios e Scott-K para os genótipos avaliados. Utilizou-se o programa computacional SISVAR para análise dos dados.

Experimento 2 – Comparação da eficiência do meio de cultura sem e com 5% de extrato de estigma na germinação in vitro de pólen de bananeira

Material Vegetal

Genótipos que forneceram o extrato floral feminino: Diploide (AA) 089087-01 e triploide Grande Naine (AAA), utilizando o estigma, parte floral feminina. Os genótipos que ofereceram os grãos de pólen foram: 010016-01; 013019-01; 017041-01; 028003-01; 3004-02; 030023-03; 041054-08; 042049-09; 042052-04; 042079-06; 042085-02; 042252-0; 086079-09; 086094-15; 086094-20; 089087-01; 091087-01; 091094-04; 097079-03; TH03-01.

Metodologia

Teste de germinação in vitro de grãos de pólen de bananeira-extrato bruto

Para a germinação in vitro os grãos de pólen, sem qualquer processo de desinfestação, foram inoculados em placas de Petri estéreis acondicionando aproximadamente 12,5mL do meio de cultura proposto por Soares *et al.* (2008), composto de 15% de sacarose, 0,01% de ácido bórico, 0,01% de nitrato de potássio, 0,03% de nitrato de cálcio e 0,02% de sulfato de magnésio, solidificado com 0,08% de Agar, pH ajustado em 7,0 e autoclavado a 121 °C por 20 minutos, acrescido ou não de 5% de extrato de estigma de Grande Naine e do diploide 089087-01.

Os grãos de pólen foram distribuídos no meio com auxílio de um pincel para promover a distribuição homogênea do pólen. Utilizou-se para cada placa um mix de pólen oriundo de cinco anteras/flor. Após a inoculação, as placas foram mantidas em condições controladas de $27 \pm 1^\circ\text{C}$ no escuro, antes de se

realizar a contagem dos grãos de pólen germinados e a medição do comprimento do tubo polínico após 24 horas de incubação, mediante observação em um estereomicroscópio binocular com objetiva 10x.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 2x20 (extrato florais x genótipos) com oito repetições, sendo cada uma representada por uma placa de Petri. Para a percentagem de germinação foram contabilizados todos os grãos da placa de Petri e para o comprimento do tubo polínico foram mensurados 40 tubos polínicos, com auxílio de uma ocular micrométrica, com dados convertidos em milímetros (mm). Foram considerados germinados os grãos de pólen que possuíam tubo polínico com tamanho igual ou superior ao diâmetro do próprio pólen.

Os dados de porcentagem foram transformados para $\arcsin(x/100)$ antes da análise estatística para o comprimento de tubo polínico, e as médias obtidas foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade para os meios e Scott-K para os genótipos avaliados. Utilizou-se o programa computacional SISVAR para análise dos dados.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Experimento 1 – Efeito do extrato de estigma e da porção distal do ovário na germinação *in vitro* de grãos de pólen de bananeira

O percentual de germinação do pólen *in vitro* de bananeira foi influenciado pela presença do extrato floral no meio de cultura (Figura 1). A concentração de 5% e 10% proporcionou maior germinação de pólen para ambos os genótipos avaliados, sendo que nestas concentrações, o extrato do estigma foi significativamente superior ao do ovário. Em comparação com o controle, quando se utilizou extrato de estigma de Grande Naine a 5% ocorreu um aumento de cerca de 3 e 7 vezes na germinação *in vitro* do pólen dos diploides 042052-04 e 089087-01, respectivamente.

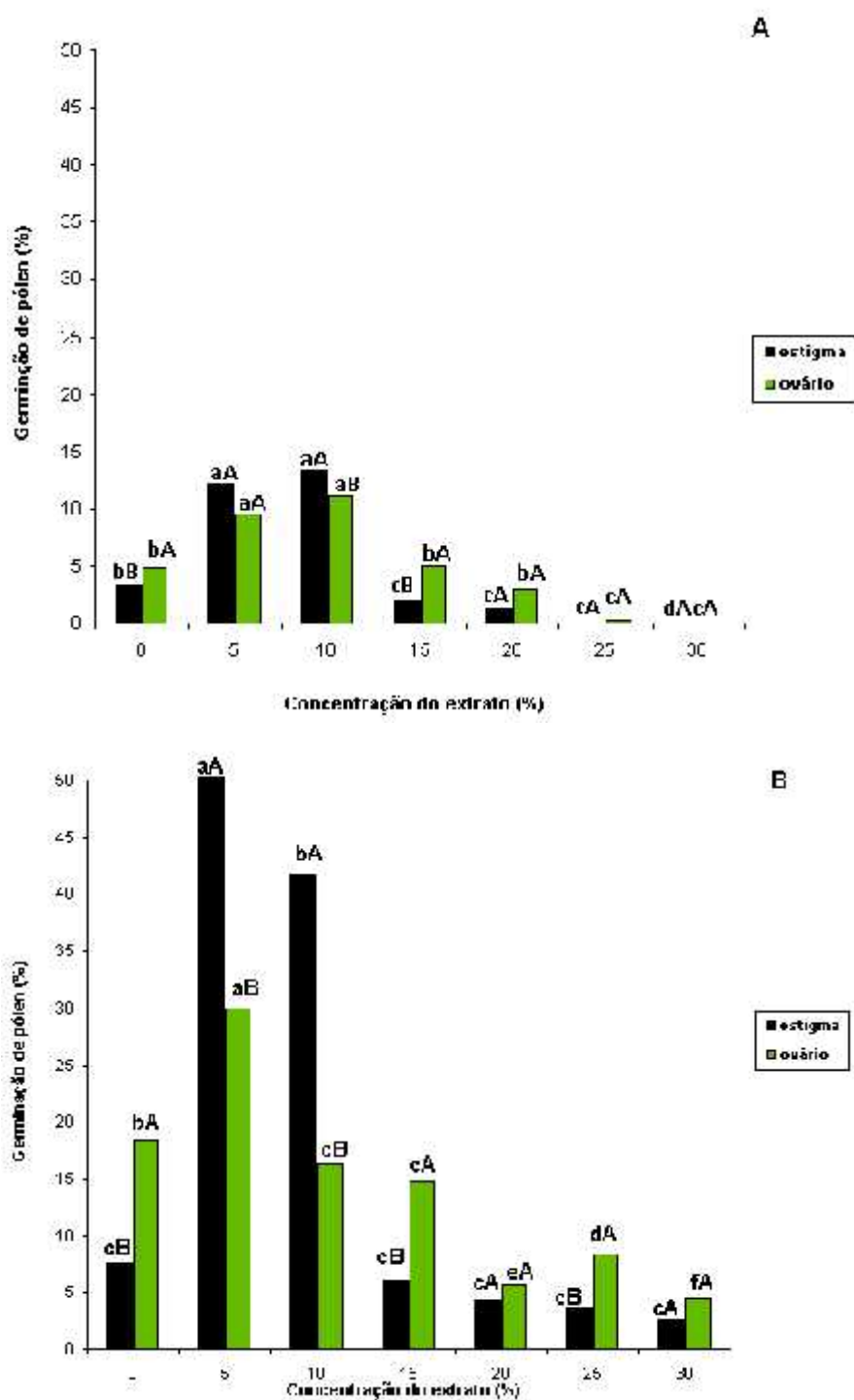


Figura 1. Germinação *in vitro* de pólen de diploides de bananeira em meio de cultura contendo diferentes concentrações de extratos florais de ‘Grande Naine’. A) 042052-04 e B) 089087-01 (Médias seguidas de letras iguais, minúsculas e maiúsculas nas barras, não diferem entre si pelo teste de Scott & Knott e Tukey, respectivamente, a 5% de probabilidade).

Em contrapartida, houve efeito negativo para a germinação à medida que se adicionou extrato acima de 10%. Considerando a interação genótipo x meio, o diploide 089087-01 foi que apresentou maior percentual de grãos de pólen germinados com 52,44% em meio acrescido a 5% de extrato de estigma (Figura 2a). O diploide 042052-04 não apresentou germinação de pólen *in vitro* em meio de cultura acrescido de 30% de extrato de estigma (Figura 2b). No estigma e no estilo encontram-se substâncias que estimulam a adesão, hidratação e germinação dos grãos de pólen, e que regulam o crescimento do tubo polínico (HIGASHIYAMA, 2003; BOAVIDA, 2011).

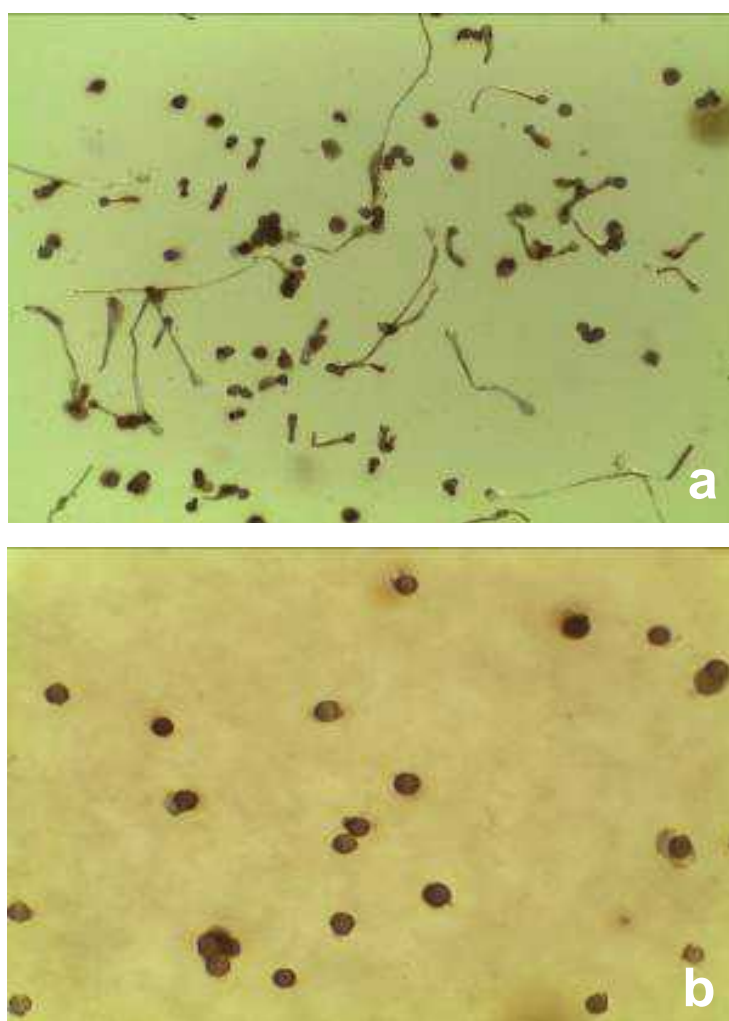


Figura 2. Germinação de pólen *in vitro* de bananeira. a) 089087-01 – alta germinação de pólen em meio contendo 5% de extrato de estigma; b) 042052-04 - ausência de grãos de pólen germinados em meio acrescido de 30% de extrato de estigma.

A germinação de pólen *in vitro* permite a análise da capacidade de emissão do tubo polínico e uma correlação dessa taxa com a viabilidade do grão de pólen. A germinação *in vitro* é a técnica mais utilizada para estimar a viabilidade dos grãos de pólen, já que simula as condições do estilo/estigma, induzindo a germinação do tubo polínico (MARCELLÁN e CAMADRO, 1996).

Com base nos dados obtidos para os dois genótipos avaliados nas concentrações de 0%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25% e 30% pode-se dizer que para os extratos brutos de estigmas a 5% em meio de cultura dos genótipos Grande Naine e diploide 089087-01 podem ser utilizados para indução de crescimento de tubo polínico e germinação *in vitro*.

O uso de extratos do estigma e do ovário de flores de bananeira 'Grande Naine', em uma concentração de 5% no meio de cultura, promove a germinação *in vitro* de grãos de pólen de bananeira. Concentrações destes extratos acima de 10% promovem efeito negativo para a germinação à medida que adicionado o extrato aquoso.

A identificação dos compostos presentes nos extratos florais poderá elucidar o processo de germinação do pólen e fertilização em bananeira.

Experimento 2 – Comparação da eficiência do meio de cultura sem e com 5% de extrato de estigma na germinação *in vitro* de pólen de bananeira

O percentual de germinação do pólen (%GP) *in vitro* de bananeira foi influenciado pela presença do extrato floral bruto da cultivar Grande Naine no meio de cultura na concentração de 5% proporcionou 95,86% de germinação do pólen para o diploide 089087-01 (Figura 3A, Figura 4b). Este valor de porcentagem de germinação de pólen está próximo dos dados obtidos por Soares (2008). Os grãos de pólen do diploide TH-0301 não germinaram. Na avaliação da porcentagem do comprimento do tubo polínico (CTP) o diploide 089087-01 apresentou 2,07 mm (Figura 3B).

Para percentual de germinação do pólen (%GP) *in vitro* de bananeira no extrato floral aquoso do diploide 089087-01 no meio de cultura pela análise do teste F a concentração de 5% proporcionou uma (%GP) de 62,79% para o diploide 089087-01 e de 55,57% para o diploide 013019-01 (Figura 5A e Figura 6b). Os grãos de pólen do diploide TH03-01 também não germinaram neste

extrato. Na avaliação da porcentagem do comprimento do tubo polínico (CTP), o diploide 089087-01 apresentou 1,70 mm e o TH03-01 apresentou 0,0mm (Figura 5B).

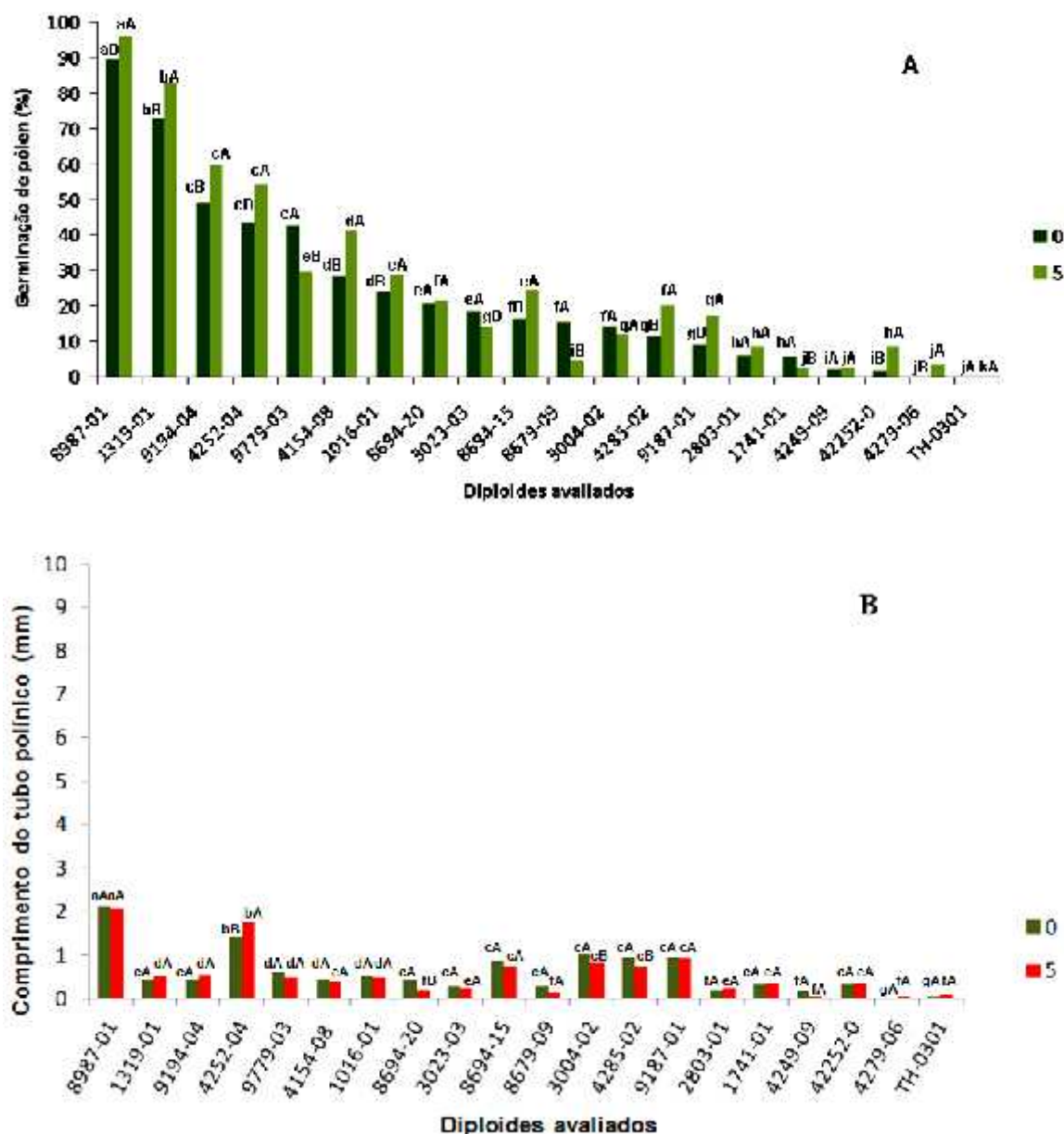


Figura 3. Porcentagem de germinação *in vitro* de pólen (%GP) (A) e comprimento do tubo polínico (CTP) (B) de 20 diploides de bananeira (AA) em meio sem e com extrato de estigma de Grande Naine a 5% (Médias seguidas de letras iguais, minúsculas e maiúsculas nas barras, não diferem entre si pelo teste de Scott & Knott e Tukey, respectivamente, a 5% de probabilidade).

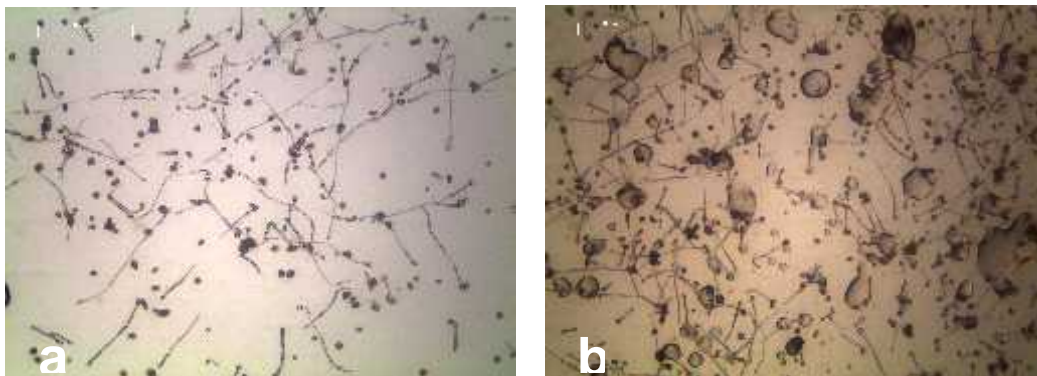
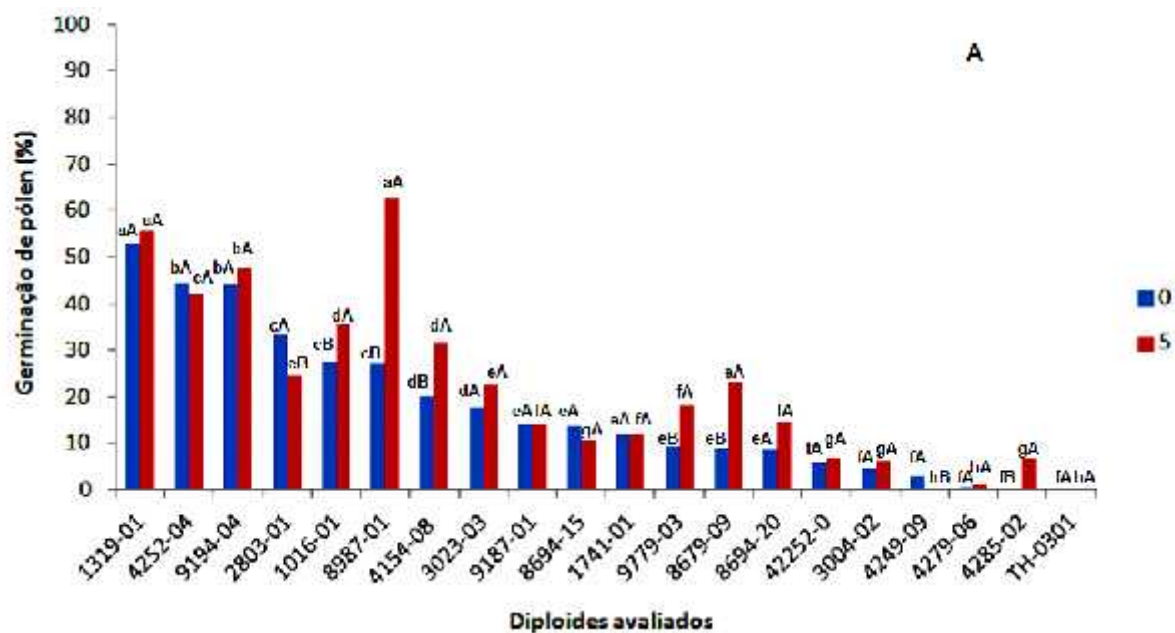


Figura 4. Germinação *in vitro* de grãos de pólen do híbrido diploide de bananeira 087089-01 em meio contendo extrato bruto de estigma de Grande Naine (AAA). a) Meio contendo 0% de extrato bruto. b) Meio contendo 5% de extrato bruto.



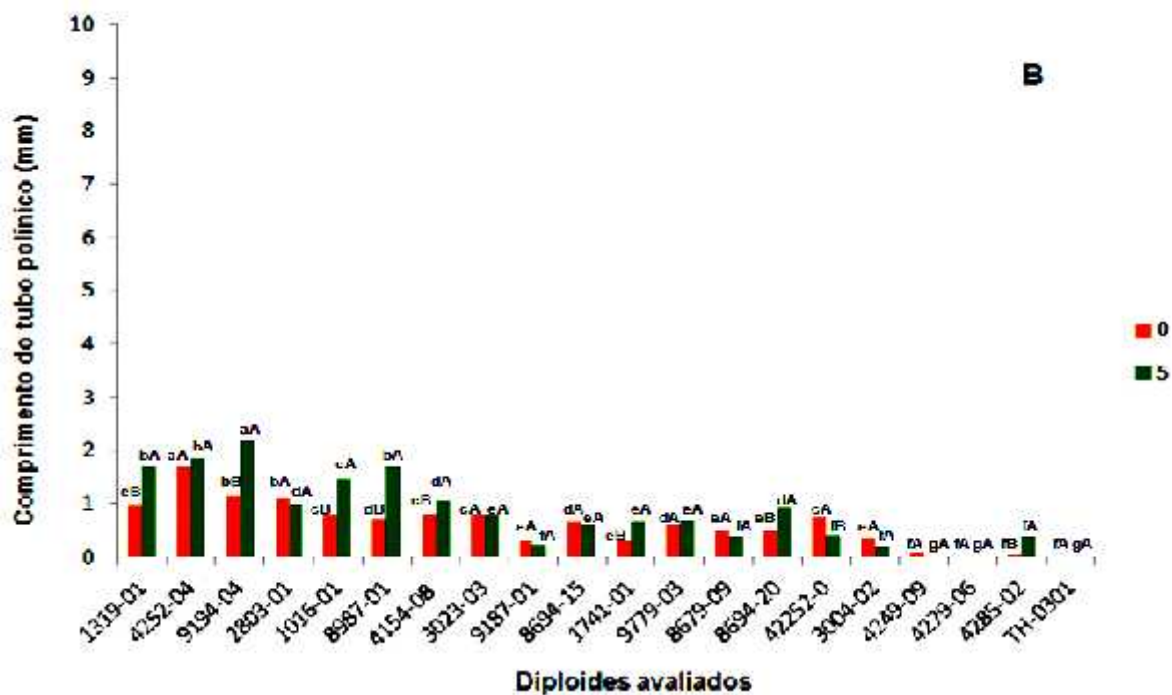


Figura 5. Porcentagem de germinação *in vitro* de pólen (%GP) (A) e comprimento do tubo polínico (CTP) (B) de 20 diploides de bananeira (AA) em meio contendo extrato de estigma do diploide 089087-01 a 5% (Médias seguidas de letras iguais, minúsculas e maiúsculas nas barras, não diferem entre si pelo teste de Scott & Knott e Tukey, respectivamente, a 5% de probabilidade).

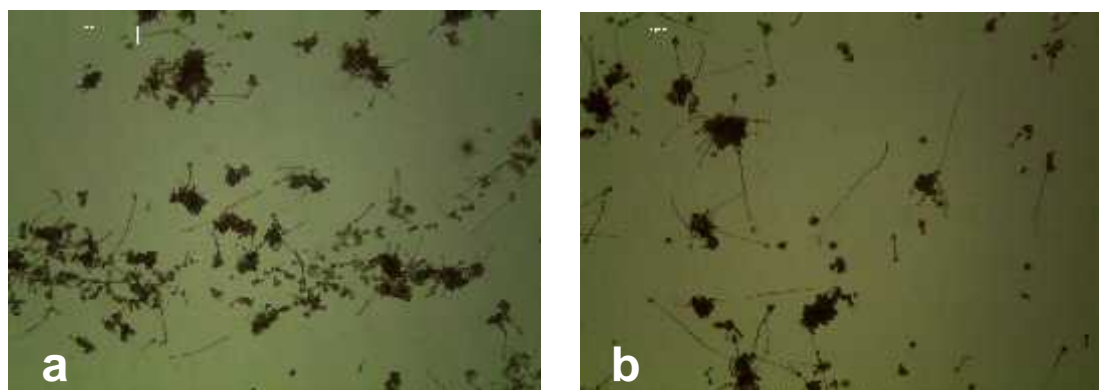


Figura 6. Germinação *in vitro* de grãos de pólen do híbrido diploide (AA) de bananeira 089087-01 em meio contendo extrato bruto de estigma de diploide 089087-01. a) Meio sem adição de extrato aquoso. b) Meio contendo 5% de extrato aquoso.

O diploide melhorado 013019-01 apresentou (%GP) *in vitro* de 82,61% no extrato aquoso de estigma de Grande Naine apresentou diferença significativa em relação ao controle (Figura 3A), sendo que o CTP não (Figura 3B).

No extrato de estigma do diploide 089087-01 a 5%, o pólen do diploide 089087-01 apresentou um valor de 62,79%, superior ao controle (Figura 5A). O CTP 1,70 mm a 5% de extrato aquoso adicionado ao meio de cultura (Figura 5B).

A germinação de pólen *in vitro* permite a análise da capacidade de emissão do tubo polínico e uma correlação dessa taxa com a viabilidade do grão de pólen. A germinação *in vitro* é a técnica mais utilizada para estimar a viabilidade dos grãos de pólen, já que simula as condições do estilo/estigma, induzindo a germinação do tubo polínico (MARCELLÁN e CAMADRO, 1996). Com base nos dados obtidos para os vinte genótipos avaliados pode-se dizer que para os extratos aquosos de estigmas a 5% em meio de cultura com os genótipos Grande Naine e diploide 089087-01 podem ser utilizados para indução de crescimento de tubo polínico e germinação *in vitro*.

CONCLUSÃO

O aumento na percentagem de germinação *in vitro* de pólen inoculado em meio com extrato indica que existe no extrato aquoso de estigma de Grande Naine e do diploide melhorado 089087-01 algum fator químico e/ou bioquímico que induz o crescimento do tubo polínico alguns dos genótipos avaliados.

No estigma provavelmente contém substâncias que estimulam a adesão, hidratação e germinação dos grãos de pólen, e que regulam o crescimento do tubo polínico. A identificação dos compostos presentes nos extratos florais poderá elucidar o processo de germinação do pólen e fertilização em bananeira. É importante salientar a necessidade de caracterizações a nível celular como identificação de enzimas, proteínas e outras espécies químicas com uso de marcadores para uma completa caracterização, permitindo obter as rotas bioquímicas, sinalização celular e

detalhamento do funcionamento fisiológico das estruturas florais nas musáceas.

REFERÊNCIAS

AMORIM, E. P.; SANTOS-SEREJO, J. A.; AMORIM, V. B. O.; FERREIRA, C. F.; SILVA, S. O. Banana Breeding at Embrapa Cassava and Fruits. **Acta Horticulturae**, v. 986, p. 171-176, 2013.

BAKRY, F.; REBERDIERE, N. P.; PICHOT, S.; JENNY, C. In liquid medium colchicines treatment induce non chimerical doubled-diploids in a wide range of mono- and interspecific diploid banana clones. **Fruits**, v. 62, p. 3-12, 2007.

BOAVIDA, L.C.; BORGES, F.; BECKER, J.D.; FEIJO, J.A. Whole genome analysis of gene expression reveals coordinated activation of signaling and metabolic pathways during pollen-pistil interactions in Arabidopsis. **Plant Physiology**, v.155, p.2066–2080, 2011.

ESCALANT, J. V.; SANDOVAL, J. A. **El cultivo in vitro en el mejoramiento genético del plátano y del banano**. Turrialba: Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñaza, 1992. 18p.

FAO. **FAO statistical databases: Banana Market Review and Banana Statistics 2012-2013**. Em: <http://www.fao.org/docrep/019/i3627e/i3627e.pdf>

HIGASHIYAMA, T.; KUROIWA, H.; KUROIWA, T. Pollen-tube guidance: beacons from the female gametophyte. **Current Opinion in Plant Biology**, v.6, p.36-41, 2003.

IBGE. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. LSPA, Levantamento sistemático da Produção Agrícola. 2014. Disponível em: < http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/lspa_201212.pdf>. Acesso em 15 de dezembro de 2013.

LESSA, L.S.; LEDO, C.A.S.; SILVA, S.O.; AMORIM, E.P.; OLIVEIRA, T.K.O. Características agrônômica de híbridos diploides de bananeira em três ciclos

de produção em Cruz das Almas, Bahia. **Revista Brasileira de Fruticultura**, São Paulo, v. 32, n1, p. 213-221, 2010.

MARCELLÁN, O. N.; CAMADRO, E. L. The viability of asparagus pollen after storage at low temperatures. **Scientia Horticulturae**, v. 67, p. 101-104, 1996.

SENA, J.V.C.; Aspectos da produção e mercado da banana no Nordeste. **Informe Rural Etene**. Escritório Técnico de Estudos Econômicos do Nordeste – ETENE Ambiente de Estudos, Pesquisas e Avaliação – AEPA Ano V, N°10, 2011.

SILVA, S.O.; ALVES, E.J.; LIMA, M.B.; SILVEIRA, J.R.S. Bananeira. In Bruckner, C.H. **Melhoramento de Fruteiras Tropicais**. UFV, Viçosa, p. 101-157, 2002b.

SILVA, S.O.; FLORES, J.C. de O.; LIMA NETO, F.P. Avaliação de cultivares e híbridos de bananeira em quatro ciclos de produção. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 37, n.11, p.1567-1574, 2002a.

SILVA, S. O; SOUZA-JUNIOR, M. T.; ALVES, E. J.; SILVEIRA, J. R. S.; LIMA, M. B. Banana Breeding Program at Embrapa. **Crop Breeding Applied Biotechnology**, v. 1, p. 399–436, 2001.

SOARES, T. L.; SOUZA, E. H.; COSTA, M. A. P. C.; SOUZA, A. S.; SILVA, S. O.; SANTOS-SEREJO, J. A. *In vivo* fertilization of banana. **Ciência Rural**, v.44, p.37-42, 2014.

CAPITULO 2

ANÁLISE QUÍMICA DOS EXTRATOS AQUOSOS DE ESTIGMA E PORÇÃO DISTAL DO OVÁRIO DE BANANEIRA

ANÁLISE QUÍMICA DOS EXTRATOS AQUOSOS DE ESTIGMA E PORÇÃO DISTAL DO OVÁRIO DE BANANEIRA

RESUMO: Com o objetivo de identificar possíveis compostos presente em extratos florais de estigma e porção distal de ovário de triploides (AAA) e diploides (AA), realizou-se, inicialmente, um estudo do tempo de extração por ultrassom de 10 minutos, sendo que a água se comportou como o melhor solvente para extração, comparando-se com metanol e etanol. Isto ocorre devido à polaridade da água nos extratos e a grande presença de grupos fenólicos com grupos hidroxilas (OH) que facilitam a solubilidade das amostras. O conteúdo de fenóis totais variou de $30,8 \pm 0,28$ a $37,5 \pm 5,9$ mg GAE.g⁻¹ para porção distal do ovário de Prata Anã e em Grande Naine a concentração do estigma variou de $75,3 \pm 11,2$ a $158,2 \pm 25,7$ mg GAE.g⁻¹. Para as variedades diploides o conteúdo de fenóis totais encontrado foi de $1,41 \pm 0,03$ para $3,50 \pm 0,01$ mg GAE.g⁻¹ para porção distal do ovário das amostras de 089087-01 e TH03-01 e a concentração do estigma variou de $5,0 \pm 0,3$ à $8,6 \pm 1,0$ mg GAE.g⁻¹. A atividade antioxidante em % SRL foi significativa em estigmas de triploides 92,00% a 89,74% para Grande Naine e Prata Anã respectivamente e 92,39% a 86,47% para TH03-01 e 089087-01 respectivamente. No teste de flavonoides totais os estigmas apresentaram baixas concentrações: $0,0058 \pm 0,0004$ a $0,0055 \pm 0,0013$ mg.g⁻¹ para Prata Anã e Grande Naine, respectivamente e $0,0037 \pm 0,0008$ a $0,0041 \pm 0,0013$ mg.g⁻¹ para 089087-01 e TH03-01. Para porção distal do ovário encontramos $0,0062 \pm 0,0020$ a $0,0055 \pm 0,0007$ mg.g⁻¹ para Grande Naine e Prata Anã e $0,0022 \pm 8,65 \times 10^{-5}$ a $0,0030 \pm 0,0006$ mg.g⁻¹ para TH03-01 e 089087-01 respectivamente. A baixa concentração de flavonoides totais indica que outras substâncias fenólicas, que não os flavonoides, são os compostos bioativos presentes no extrato aquoso. Nas análises por HPLC-DAD os espectros no UV gerados indicam a presença de compostos fenólicos nos extratos.

Palavras-chave: Fenólicos, antioxidantes, HPLC-DAD, biocompostos

CHEMICAL ANALYSIS OF AQUEOUS EXTRACTS OF STIGMA AND OVARIAN DISTAL PORTION OF BANANA

SUMMARY: In order to identify possible compounds present in floral extracts of stigma and distal ovary triploid (AAA) and diploid (AA) was held, initially, a study of ultrasound extraction time of 10 minutes, that water behaved as the best solvent for extraction, compared with methanol and ethanol. This is due to the polarity of the water extracts and the presence of large groups with phenolic hydroxyl groups (OH) that facilitate solubility of the samples. The content of total phenols ranged from 30.8 ± 0.2 to 37.5 ± 5.9 mg GAE.g⁻¹ to the distal portion of the ovary 'Prata Anã' and 'Grande Naine' concentration of stigma varied from 75.3 ± 11.2 to 158.2 ± 25.7 mg GAE.g⁻¹. For varieties diploid content of total phenols was found to be 1.41 ± 0.03 to 3.50 ± 0.01 mg GAE.g⁻¹ to the distal portion of the ovary samples 089087-01 and TH03-01 and concentration of stigma ranged from 5.0 ± 0.3 to 8.6 ± 1.0 mg GAE.g⁻¹. The antioxidant activity was significant in FRL% stigmata of triploid 92.00% to 89.74% for 'Grande Naine' and Prata Anã' and 92.39% respectively to 86% and 47% for TH03-01 089087-01 respectively. In total flavonoid test stigmas: 0.0058 ± 0.0004 to 0.0055 ± 0.0013 mg g⁻¹ for 'Prata Anã' and 'Grande Naine', respectively, and 0.0037 ± 0.0008 to 0.0041 ± 0.0013 mg.g⁻¹ for 089087-01 and TH03-01. Distal portion of the ovary found ± 0.0062 from 0.0020 to 0.0055 ± 0.0007 mg.g⁻¹ for 'Grande Naine' and 'Prata Anã' and 0.0022 ± 0.0030 to $8.65 \times 10^{-5} \pm 0.0006$ mg.g⁻¹ for TH03-01 and 089087-01, respectively. The low concentration of the total flavonoid indicates that other phenolic compounds other than flavonoids are the bioactive compounds present in the aqueous extract. In the analysis by HPLC-DAD UV spectra generated indicating the presence of phenolic compounds in the extracts.

Keywords: Phenolic antioxidants, HPLC-DAD, biocompounds

INTRODUÇÃO

O melhoramento genético é uma importante ferramenta para a sociedade, contribuindo com programas de melhoramento genético de plantas e garantindo, em parte, com a descoberta de novos genes e conseqüentemente com a segurança alimentar e outras necessidades básicas das gerações atuais e futuras (PEREIRA *et. al.*, 2010).

A pesquisa em recursos genéticos assume importância crescente em relação ao melhoramento de plantas. O controle de pragas e doenças, por exemplo, requer a identificação de linhagens ou de cultivares resistentes a determinadas pragas e doenças para as quais outros tipos de controle são ineficientes ou onerosos demais com relação ao produto das culturas afetadas. O aproveitamento de recursos genéticos ainda não explorados torna possível lançar no mercado novos produtos com qualidades antes desconhecidas e valorizar o patrimônio genético até então não explorados (PEREIRA *et al.*, 2010).

O Brasil é um dos maiores produtores mundiais de bananas, com 7,3 milhões de toneladas produzidas em 2014, em uma área aproximada de 493 mil hectares (IBGE, 2014). Apesar destas grandes proporções esta cultura tem uma demanda crescente de produção, novos produtos e cultivares encaixando-se perfeitamente na pesquisa de recursos genéticos vegetais por apresentar aspectos negativos em sua produção como ataque de pragas e grau elevado de esterilidade para as cultivares comerciais.

Conhecimentos dos metabólitos secundários na cultura da banana são de interesse na pesquisa científica por auxiliarem no processo de descoberta de novos compostos naturais que possam ser utilizados nos diversos setores da indústria química e/ou farmacêutica, como servem de base para ampliar o conhecimento de novas rotas bioquímicas nesta espécie, podendo revelar novas possibilidades no melhoramento genético de plantas (JONES, 2006).

Apesar de existirem vários estudos, sobre a fitoquímica dos diferentes órgãos da bananeira (BORGES, *et al.*, 2012; NGO *et al.*, 2009; DAVEY, *et al.*, 2006) há poucos registros das inflorescências femininas com destaque para composição química de partes específicas como região distal do ovário e

estigma, estruturas vegetais envolvidas na reprodução desta espécie, onde futuramente possa auxiliar programas de melhoramento (FINGOLO, *et al.*, 2010).

Estudos preliminares visando investigar a esterilidade em cultivares do subgrupo Cavendish (Grande Naine, Nanicão e Nanica) mostraram que na antese as flores femininas apresentam um escurecimento (oxidação) na região distal do ovário, o qual poderia ocorrer devido à produção de substâncias que contribuiriam para dificultar a penetração e o crescimento do tubo polínico (SOARES *et al.*, 2014).

Desse modo, o objetivo desse trabalho foi identificar possíveis compostos presentes nos extratos aquosos florais de estigma e porção distal de ovário em triploides 'Grande Naine' (AAA) e 'Prata Anã' (AAB); e diploide '089087-01' (AA) e 'TH03-01' (AA).

MATERIAL E MÉTODOS

Material Vegetal

Genótipos que forneceram o extrato floral de estigma e porção distal do ovário: Diploides (AA) 089087-01 e TH03-01, triploides, Grande Naine (AAA) e Prata Anã (AAB).

Avaliação do tempo/solvente para extração das amostras

Foi determinado o melhor tempo e o melhor solvente para a extração de compostos nas amostras de diploide e triploide. Para determinar o tempo necessário de extração foi pesado de 25mg da amostra de estigma e porção distal do ovário de Grande Naine e adicionados em tubos separados em triplicata juntamente com 5 mL de H₂O. Após, colocavam-se as amostras em banho ultrassônico pelo período de 0 a 60 minutos, sendo que a cada 5 minutos, retirava-se a amostra, filtrava-se e determinava o teor de fenólicos pelo método de Folin-Ciocalteu (SINGLETON, 1999). Num balão de 25 mL foram adicionados: 250 µL da amostra, 12,5 mL de H₂O, 1250 µL reagente de Folin-Ciocalteu, 5 mL de solução de carbonato de sódio a 20% (m/v),

avolumando-se para 25 mL. Agitou-se e após 30 minutos foi realizada a leitura em espectrofotômetro. As leituras espectrofotométricas foram realizadas no espectrofotômetro INSTRUTERM UV-Vis 2000A. Determinou-se a absorvância no comprimento de onda de 750nm com cubeta de 1 cm de passo óptico com as amostra de estigma e porção distal do ovário em triplicada para cada material analisado. A calibração realizou-se com dissoluções de ácido gálico entre 0 a 100 mg.L⁻¹ (0, 0,9, 1,8, 2,7, 3,6, 4,5 e 5,4 mg.L⁻¹). Os resultados foram expressos como equivalentes de ácido gálico (Galic Acid Equivalents, GAE), obtendo-se uma área de calibração com um $r^2 = 0,999$ aproximadamente. A equação da reta será $Y(\text{Abs}) = 0,001 (\text{conc.}) - 0,0046$.

Para a avaliação do melhor solvente utilizamos a mesma metodologia da extração, porém utilizamos água, metanol e etanol como solventes em vez de usar somente água.

Teste de fenóis totais

Para o preparo das amostras foram coletados, em fase de antese, estigmas e porção distal do ovário de triploides 'Grande Naine' (AAA) e 'Prata anã' (AAB); e diploide '089087-01' (AA) e 'TH03-01' (AA). As partes femininas foram levadas dentro de sacos plásticos, isolados, em caixa de isopor com gelo para o laboratório. Os estigmas e porção distal do ovário sem tratamento foram retirados, congelado a -20°C, posteriormente liofilizados em liofilizador da Liobras-liotop L101 e posteriormente macerados no almofariz e pistilo em nitrogênio líquido (N₂). De acordo com o fluxograma abaixo (Figura 1).

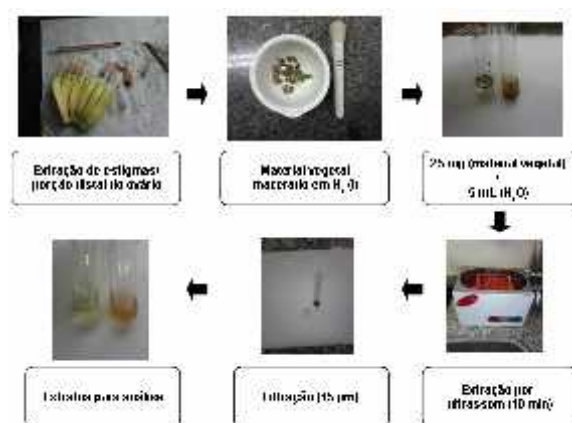


Figura 1. Fluxograma de preparo das amostras de porção distal das amostras e estigma

De pose dos extratos para análise os mesmos em triplicata foram submetidos ao teste de fenóis totais seguindo a metodologia de Folin-Ciocalteu, visando estudo de atividades em extratos polifenólicos onde se calcula o índice de polifenóis totais (IPT), medindo-se a quantidade de compostos polifenólicos presente nas amostras.

Teste de atividade antioxidante total (AAT)

Para o preparo das amostras foram coletados, em fase de antese, estigmas e porção distal do ovário de triploides 'Grande Naine' (AAA) e 'Prata anã' (AAB); e diploide '089087-01' (AA) e 'TH03-01' (AA). As partes femininas foram levadas dentro de sacos plásticos, isolados, em caixa de isopor com gelo para o laboratório. Os estigmas e porção distal do ovário sem tratamento foram retirados, congelado a -20°C , posteriormente liofilizados em liofilizador da Liobras-liotop L101 e posteriormente macerados no almofariz e pistilo em nitrogênio líquido N_2 (1). De acordo com o fluxograma de preparo das amostras de porção distal das amostras e estigma (Figura 1).

A metodologia utilizada para determinação de atividade antioxidante total foi a mesma descrita em Rufino (2007), com algumas adaptações. Foram preparadas 4 soluções:

- Solução hidroalcoólica com metanol a (50%).
- Solução de acetona a 70%
- Solução controle de álcool metílico, acetona e água (2:2:1).
- Solução de DPPH• (2,2-difenil-1-picrilhidrazila), 0,06 mM -.Preparada e usada apenas no dia da análise.

Para a leitura dos resultados construiu-se uma curva de calibração inicial a partir da solução de DPPH 0,06 mM preparando em balões de 10 mL, soluções variando a concentração 10 μM a 50 μM . Em ambiente escuro, transferir uma alíquota de, aproximadamente, 4 mL de cada solução de DPPH (10 μM , 20 μM , 30 μM , 40 μM , 50 μM e 60 μM) para cubetas de vidro e realizou-se a leitura em espectrofotômetro a 515 nm. Utilizamos álcool metílico, como branco, para calibrar o espectrofotômetro (RUFINO, 2007).

A partir do extrato obtido de acordo com o fluxograma de preparo das amostras de porção distal e estigma das amostras (Figura 1), prepararam-se

em tubos de ensaio no mínimo três diluições diferentes em triplicata. Em ambiente escuro, transferiu-se uma alíquota de 0,1 mL de cada diluição do extrato para tubos de ensaio com 3,9 mL do radical DPPH 0,06 mM e homogeneizou em agitador de tubos. Utilizou-se 0,1 mL da solução controle de álcool metílico, acetona e água com 3,9 mL do radical DPPH e homogeneizou-se. Utilizou-se álcool metílico, como branco, para calibrar o espectrofotômetro. As leituras (515 nm) foram monitoradas a cada minuto, onde foi observada a redução da absorbância até sua estabilização. A leitura da absorbância final para o cálculo do EC50 só foi feita após a estabilização da absorbância (tempo EC50) (RUFINO, 2007).

O percentual de sequestro do radical livre DPPH (%SRL), foi calculado como:

$$\% \text{ SRL} = [(C-A)/C] \times 100$$

Onde:

C é a absorbância do controle

A é a absorbância da amostra em solução.

O tempo de medida de reação entre o radical e a amostra de 30 minutos é suficiente embora alguns autores determinem 20 minutos (SOARES, 2008). Neste trabalho, determinou-se a capacidade antioxidante (% SRL) no tempo de 20 minutos.

Para o preparo das amostras foram coletados, em fase de antese, estigmas e porção distal do ovário de triploides 'Grande Naine' (AAA) e 'Prata anã' (AAB); e diploide '089087-01' (AA) e 'TH03-01' (AA). As partes femininas foram levadas dentro de sacos plásticos, isolados, em caixa de isopor com gelo para o laboratório. Os estigmas e porção distal do ovário sem tratamento foram retirados, congelado a -20°C , posteriormente liofilizados em liofilizador da Liobras-liotop L101 e posteriormente macerados no almofariz e pistilo em nitrogênio líquido (N_2). Fluxograma de procedimentos para preparo das amostras na Figura 1.

Determinação de flavonoides totais

A determinação de flavonoides seguiu a metodologia proposta por Woisky e Salatino (1998), onde foram pipetados 2,0 mL do extrato para análise Figura 1 em tubos de ensaio em triplicata para cada amostra. Após a adição do extrato para análise, adicionou-se aos tubos 1 mL de solução aquosa de cloreto de alumínio 5% m/v em metanol e 2 mL de metanol. Preparou-se o branco utilizando 4 mL de metanol e 1 mL de cloreto de alumínio. A utilização do cloreto de alumínio deve-se a propriedade do cátion alumínio formar complexos estáveis com a hidroxila dos flavonoides, originando um composto de cor amarela. Aguardou-se 30 minutos no escuro e procedeu-se à leitura no espectrofotômetro (INSTRUTERM UV-Vis 2000A) a 425 nm. Utilizou-se como padrão a quercetina nas concentrações de 0,05, 0,01, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6 para a construção da curva de calibração. Os dados dos resultados foram expressos em mg de quercetina/g de amostra. Os valores foram expressos como média \pm desvio padrão de três repetições.

Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

No preparo das amostras foram coletados, em fase de antese, estigmas e porção distal do ovário de triploides 'Grande Naine' (AAA) e 'Prata Anã' (AAB); e diploide '089087-01' (AA) e 'TH03-01' (AA). As partes femininas foram levadas dentro de sacos plásticos, isolados, em caixa de isopor com gelo para o laboratório. Os estigmas e porção distal do ovário sem tratamento foram retirados, congelado a -20°C , posteriormente liofilizados em liofilizador da Liobras-liotop L101 e posteriormente macerados no almofariz e pistilo em nitrogênio líquido (N_2).

Os solventes de grau HPLC utilizados foram: metanol, acetonitrila (J. T. Backer) e ácido acético (Merk). Água mili-Q ultrapura com condutividade de $0,05 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ foi utilizada para fazer os experimentos. Foi utilizado coluna C18 fase reversa (50x7,6, 5 μm), Varian com coluna-guarda. O cromatografo utilizado para as leituras de comprimento de onda e espectros foi um Agilent série 1260 infinity possuindo, duas bombas de pressão, auto-injetor, DAD (UV-Vis), forno de aquecimento e coletor de fração. As corridas cromatográficas

foram feitas em sistema de gradiente com as configurações apresentadas na Tabela 1. Esse sistema esta de acordo com a metodologia proposta por Dias (2013), para identificação de compostos fenólicos em vinho com adaptações. O fluxo da fase móvel foi de 0,8 mL.min⁻¹. A temperatura do forno foi de 30 °C. O comprimento de onda utilizado foi 280 e 320 nm. A quantidade de amostra injetada foi de 25 µL por corrida em triplicada para cada material analisado. As fases móveis foram preparadas usando as proporções seguintes: Fase A (aquoso): Metanol: Ácido acético: água (5:2:93), Fase B (solvente): Acetonitrila: ácido acético: água (88:2:10).

Tabela 1. Gradiente das fases móveis

Gradiente das fases móveis		
Tempo (min)	A (%)	B (%)
0,00	95	5
6,00	85	15
8,00	30	70
10,00	30	70
12,00	95	5

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Avaliação do tempo/solvente para extração das amostras

As amostras de estigma e porção distal do ovário dos triploides Grande Naine e Prata Anã apresentaram um tempo ótimo de extração de 10 minutos para ambas as amostras (figura 2). A figura 3 mostra que o melhor solvente foi a água.

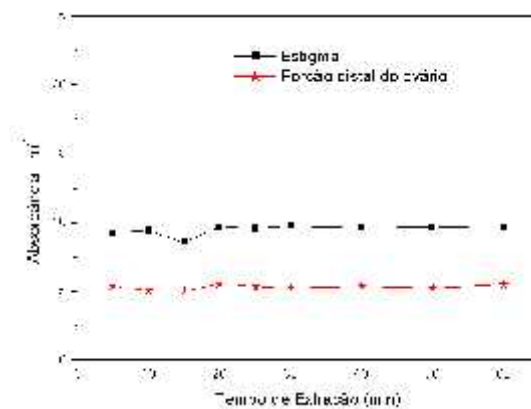


Figura 2. Tempo de extração para as amostras de estigma e porção distal do ovário de Grande Nine e Prata Anã.

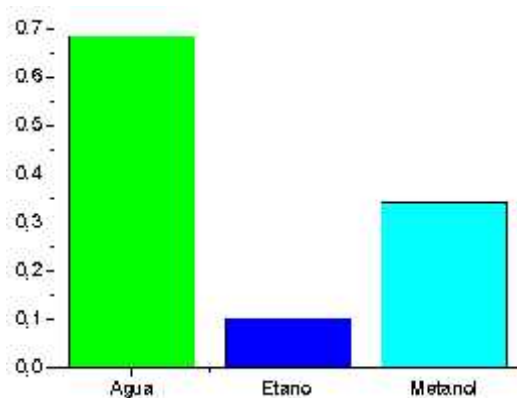


Figura 3. Teste do melhor solvente para as amostras de estigma e porção distal do ovário para triploides

Teste de fenóis totais

Os valores de fenólicos totais encontrados nos extratos aquosos para as amostras de estigmas e porção distal do ovário de triploides 'Grande Naine' (AAA) e 'Prata anã' (AAB); e diploide '089087-01' (AA) e 'TH03-01' (AA) podem ser visualizados respectivamente nas Figuras 4, 5 e a curva de calibração respectivamente na Figura 6.

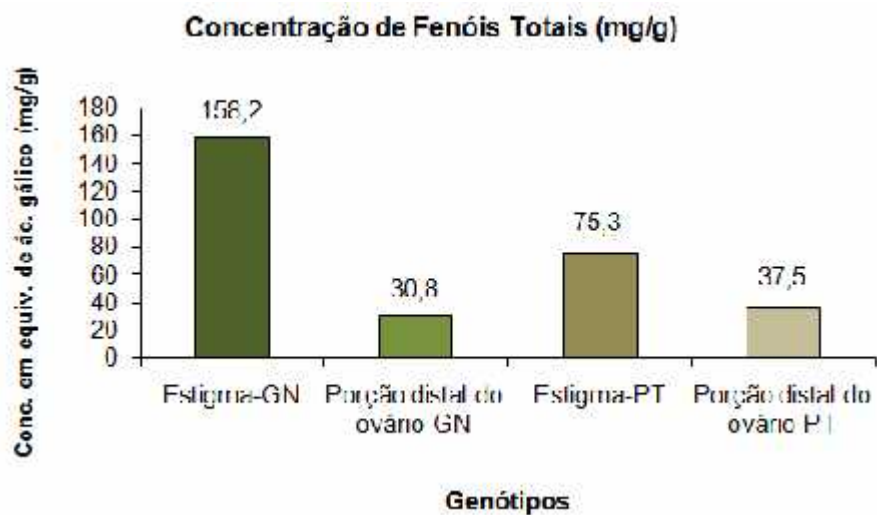


Figura 4. Concentração de fenóis totais em amostras triploides

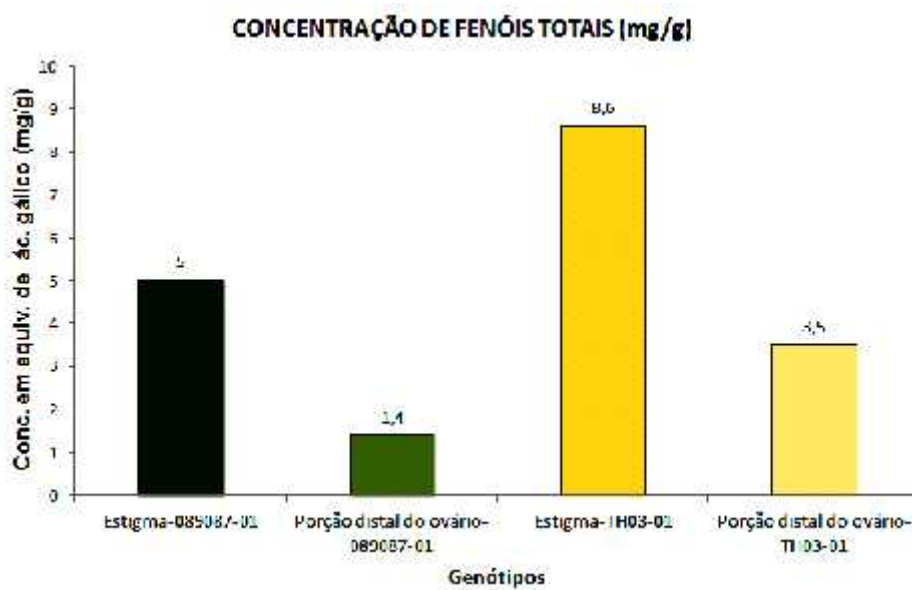


Figura 5. Concentração de fenóis totais em amostras diploides

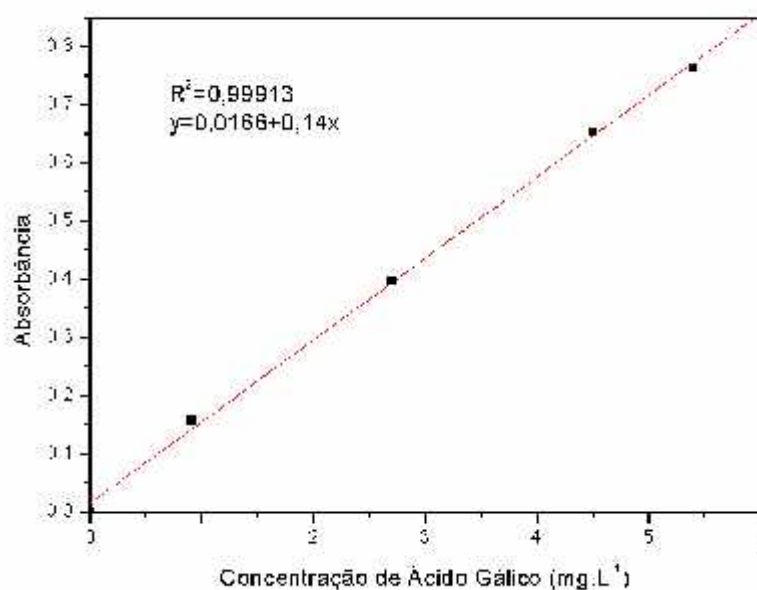


Figura 6. Curva de calibração para fenóis totais em amostras triploides e diploides

As amostras dos triploides apresentaram uma concentração de fenóis totais mais elevada que as dos diploides principalmente nos estigmas. Os valores para triploides encontrados são bem superiores aos encontrados por Sheng, 2011 em flores de variedades Baxijiao (AAA) e Paradisiaca (AAB). Nos diploides a concentração de fenóis totais é mais baixa principalmente para as amostras de porção distal do ovário.

A maioria dos compostos fenólicos não é encontrada no estado livre na natureza, mas sob a forma de ésteres ou de heterosídeos sendo, portanto, solúveis em água e em solventes orgânicos polares (MELLO, 2001). São metabólitos secundários das plantas e são muito importantes na quelação de íons metálicos redox-ativo, inativando lipídios livre de cadeias radicais, e evitando conversões de hidroperóxidos em oxiradicais. São reguladores vegetais não hormonais encontrados em maiores concentrações endógenas (mM) onde o precursor é o ácido chiquímico sintetizado em qualquer parte verde da planta podendo formar: taninos hidrolisáveis, ácido cinâmico, dando origem a fenólicos simples, cumarinas e flavonoides.

Uma das explicações para as altas concentrações de fenóis totais no teste pode ser devido à escolha do método Folin-Ciocalteu que embora seja

um dos métodos mais utilizado para quantificação de compostos fenólicos, tal reagente pode interagir com outros constituintes químicos não fenólicos como carotenoides, aminoácidos, açúcares e vitamina C, podendo ocorrer resultados superestimados de fenóis totais (OLIVEIRA, 2009).

Os fenóis podem ser divididos em três grupos quimicamente distintos: terpenos, compostos fenólicos e compostos contendo nitrogênio. Os fenólicos são um grupo quimicamente heterogêneo de cerca de 10.000 compostos individuais: alguns são apenas solúvel em solventes orgânicos, alguns são ácidos carboxílicos, solúveis em água e glicosídeos, e outros são grandes polímeros insolúveis.

De acordo com a sua diversidade química, compostos fenólicos têm uma variedade de papéis na planta. Muitos servem como compostos de defesa contra herbívoros e patógenos. Outros funcionam em suporte mecânico, na atração de polinizadores e dispersores de frutos, na absorção de radiação ultravioleta, ou em reduzir o crescimento de plantas vizinhas concorrentes (TAIZ e ZEIGER, 2006).

Atividade sequestro de radicais (AAT)

A atividade antioxidante total encontrada nos extratos aquosos para as amostras de estigmas e porção distal do ovário de triploides 'Grande Naine' (AAA) e 'Prata Anã' (AAB); e diploide '089087-01' (AA) e 'TH03-01' (AA) podem ser visualizados respectivamente nas Figuras 7 e 8, os valores foram expressos em % SRL (porcentagem do sequestro do radical livre) e a curva de calibração respectivamente na Figura 9.

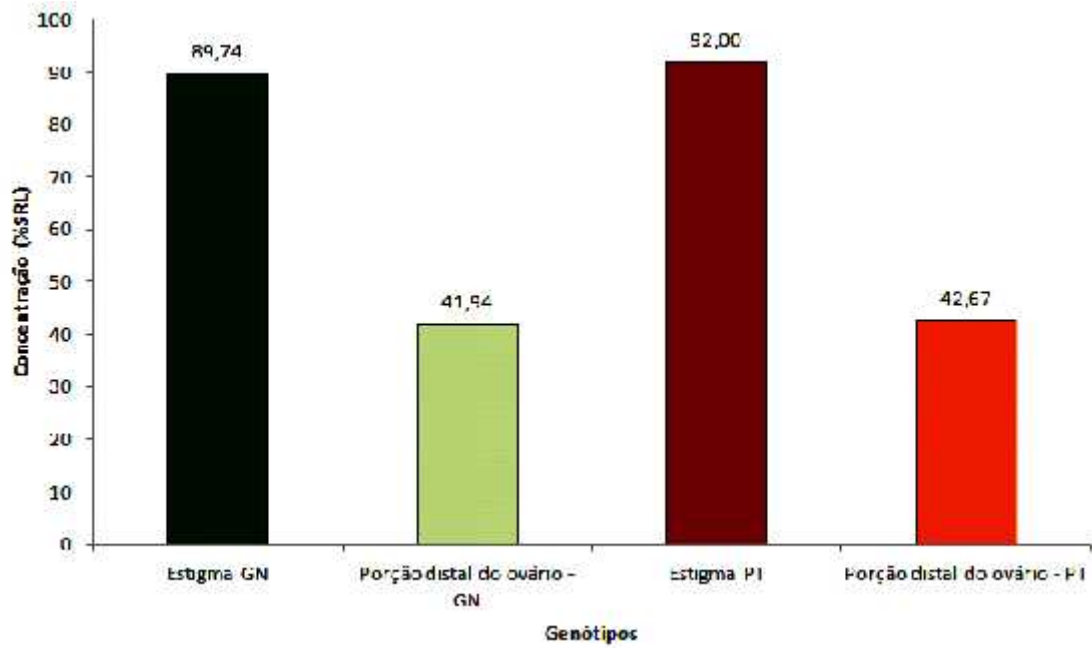


Figura 7. Concentração em % SRL em amostras triploides

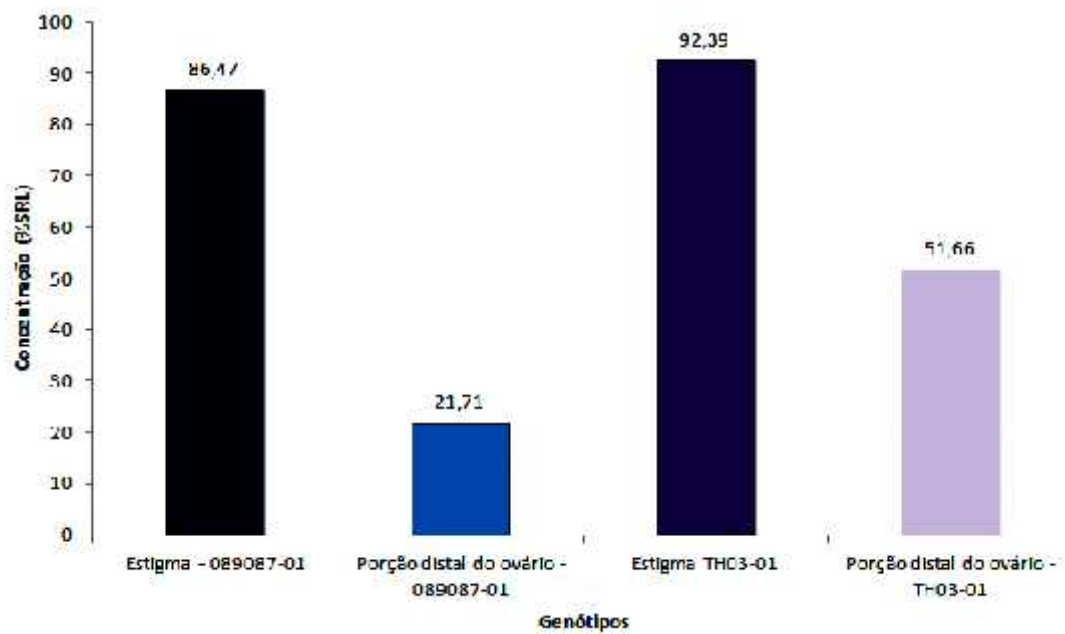


Figura 8. Concentração em % SRL em amostras diploides

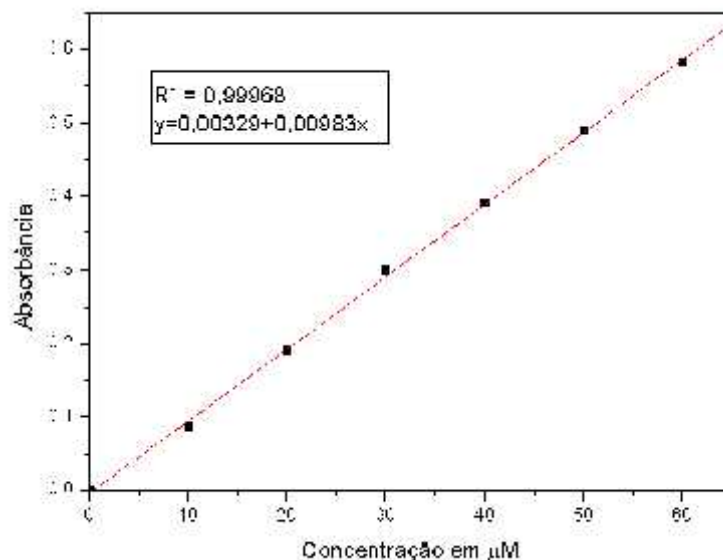


Figura 9. Curva de calibração para amostras triploides e diploides

A atividade antioxidante através do método do seqüestro de radicais livres (DPPH•) baseia-se na transferência de elétrons de um composto antioxidante para um radical livre, o DPPH• (2,2-difenil-1-picrilhidrazila), que ao se reduzir perde a sua coloração púrpura. Desta forma, avalia apenas o poder redutor do antioxidante, que ao doar um elétron se oxida, e por este motivo não detecta substâncias pró-oxidantes (DUARTE-ALMEIDA, *et al.*).

Compostos antioxidantes estão naturalmente presentes em frutas, sendo que algumas apresentam altas concentrações de determinados grupos (HARBORNE e WILLIAMS, 2000). Nas amostras de estigmas tanto para diploides como triploides apresentam uma alta % SRL. Comparando-se com o teste de fenóis totais que também apresentaram uma alta concentração de fenóis totais, podemos inferir que são fontes reais de fenóis e não de interferentes presentes nas amostras de estigmas. As amostras de porção distal do ovário mostraram uma menor % SRL, corroborando com a afirmação por Harborne e Williams (2000).

A atividade de sequestrar o radical livre DPPH também pode ser expressa em termos de CE_{50} (concentração mínima necessária para o antioxidante reduzir em 50% a concentração inicial do DPPH). Os valores de CE_{50} foram calculados por regressão linear dos gráficos em que o eixo das abscissas representou a concentração dos extratos e o eixo das ordenadas o

percentual de sequestro de radical livre (% SRL). Desta forma, quanto menor o valor de CE_{50} , maior é a capacidade antioxidante dos compostos presentes. Na Tabela 2 os dados do EC_{50} para as amostras dos tecidos florais dos triploides 'Grande Naine', 'Prata Anã' e dos diploides '089087-01' e 'TH03-01'.

Tabela 2. EC_{50} nos tecidos florais em amostras de triploides e diploides

Amostra dos tecidos florais	CE_{50} (g amostra/g DPPH)
Estigma-Grande Naine	1,2151
Porção distal do ovário- Grande Naine	0,5814
Estigma-Prata Anã	0,1009
Porção distal do ovário- Prata Anã	0,1162
Estigma-089087-01	0,3481
Porção distal do ovário-089087-01	0,6049
Estigma-TH03-01	0,4601
Porção distal do ovário- TH03-01	1,2054

Determinação de flavonoides totais

O teor de flavonoides total encontrada nos extratos aquosos para as amostras de estigmas e porção distal do ovário de triploides 'Grande Naine' (AAA) e 'Prata anã' (AAB); e diploide '089087-01' (AA) e 'TH03-01' (AA) podem ser visualizados respectivamente na Figura 10.

A concentração de flavonoides nas amostras de diploides e triploides encontradas é baixa em relação à de outras espécies vegetais. Em amostras de pólen apícola na região de Maceió (AL) o valor encontrado para flavonoides total encontrada de 4,68 mg de quercetina.g⁻¹ (NEVES, 2009).

A alta atividade antioxidante e a significativa concentração de compostos totais em contrapartida com a baixa concentração de flavonoides totais nas amostras de estigmas e porção distal do ovário de triploides 'Grande Naine' (AAA) e 'Prata anã' (AAB); e diploide '089087-01' (AA) e 'TH03-01' (AA), indicam que outras substâncias fenólicas, que não os flavonoides, são os compostos bioativos presentes nestas amostras.

O teor de flavonoides totais baseia-se na propriedade do cátion alumínio formar complexos estáveis com a hidroxila dos flavonoides, originando um complexo de cor amarela (ALMEIDA et. al., 1997; FUNARI e FERRO, 2006) Este teste permite determinar a quantidade de flavonoides presentes na

amostra evitando-se a interferência de outras classes de substâncias fenólicas, sobretudo os ácidos fenólicos (FUNARI e FERRO, 2006).

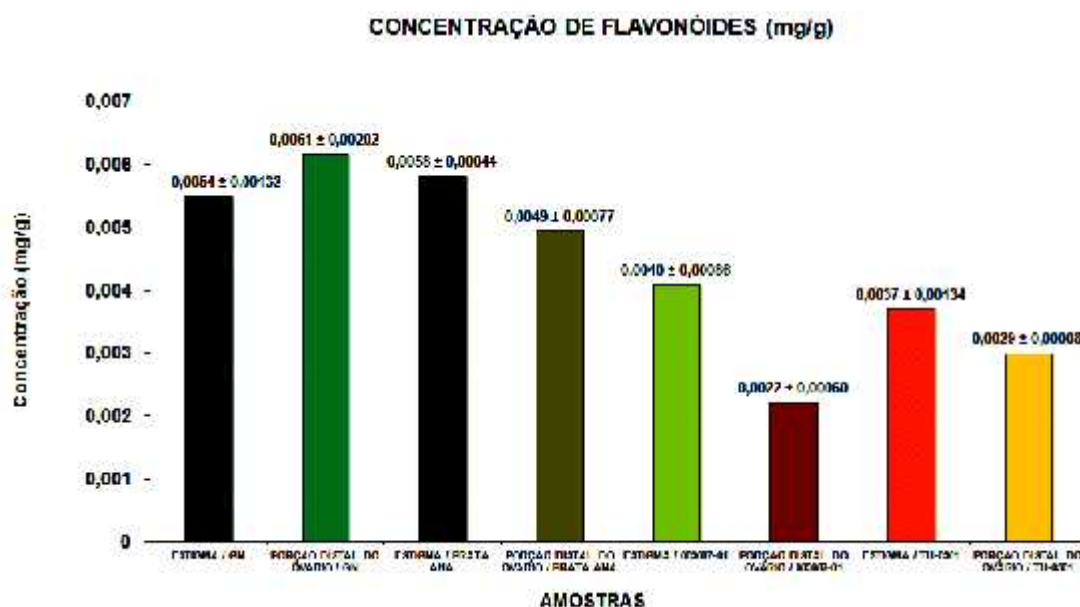


Figura 10. Concentração de flavonoides totais em amostras de diploides e triploides

Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC-DAD)

Fenólicos das regiões distal do ovário e estigma em triploides (AAA) e diploides (AA) por tentativa foram caracterizados por HPLC-DAD. Não ocorreu a identificação de compostos específicos, porém pode-se sugerir a ocorrência da natureza dos compostos por comparação com o espectro na região do UV-Vis encontrado na literatura como o de OBREQUE-SLÍER, 2009; em que determina, via caracterização química, dez agentes de curtimento comerciais derivados de plantas de uso enológico, onde se encontram taninos enológicos e foram analisados por espectrofotometria (fenóis totais, taninos totais e índice de gelatina) com Cromatografia Líquida de Alto Desempenho com Arranjo de Fotodiodo (HPLC-DAD). Este trabalho demonstra uma possibilidade de comparação do perfil cromatográfico e de absorção obtido para amostras de estigmas de 'Grande Naine' (AAA), 'Prata anã' (AAB); '089087-01' (AA) e 'TH03-01' (AA). A figura 11 demonstra um perfil cromatográfico para os estigmas dos diplóides e triploides avaliados. Na Figura 12, comparando-se

com a Figura 15-I pela análise do perfil cromatográfico via HPLC-DAD do espectro de absorvância, nos estigmas, acredita-se que sejam taninos hidrolisáveis, devido à natureza polar das extrações obtidas no teste do melhor solvente para as amostras de estigma.

Na Figura 13 temos o perfil cromatográfico para as amostras de porção distal do ovário de triploides e diploides. Comparando-se o perfil dos espectros de absorvância A, B, C, D, E e F da Figura 14, com os da análise via (HPLC-DAD) da porção distal dos ovários de 'Grande Naine' (AAA), 'Prata anã' (AAB); '089087-01' (AA) e 'TH03-01' (AA) com os encontrados por LIIMATAINEN (2013) (Figura 16), podemos sugerir que esses compostos são fenólicos, porém não podemos afirmar a natureza fenólica.

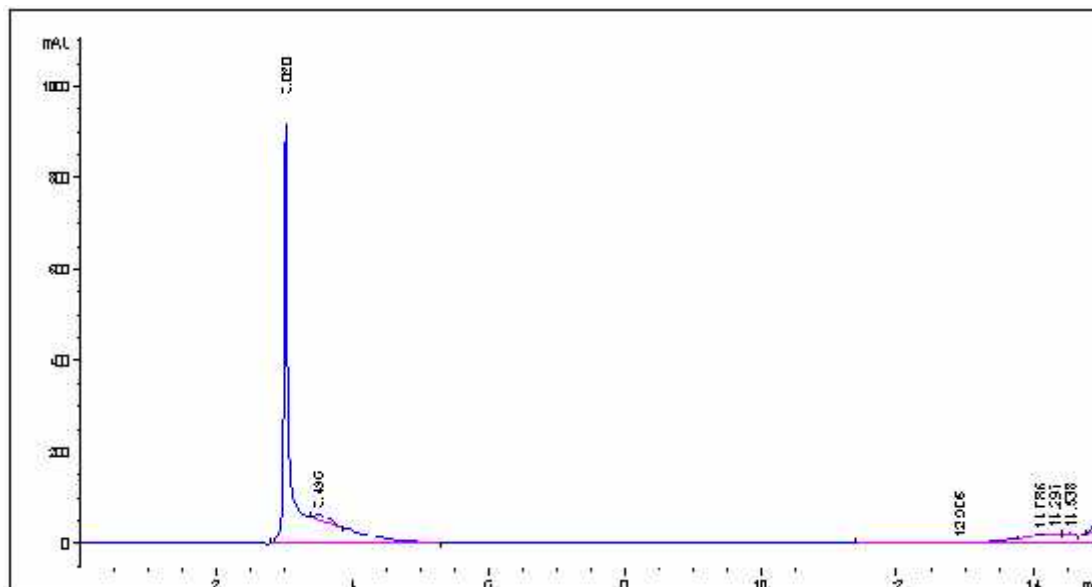


Figura 11. Perfis cromatográficos obtidos da amostra de estigma de triploide (AAA/AAB) e diplóides (AA)

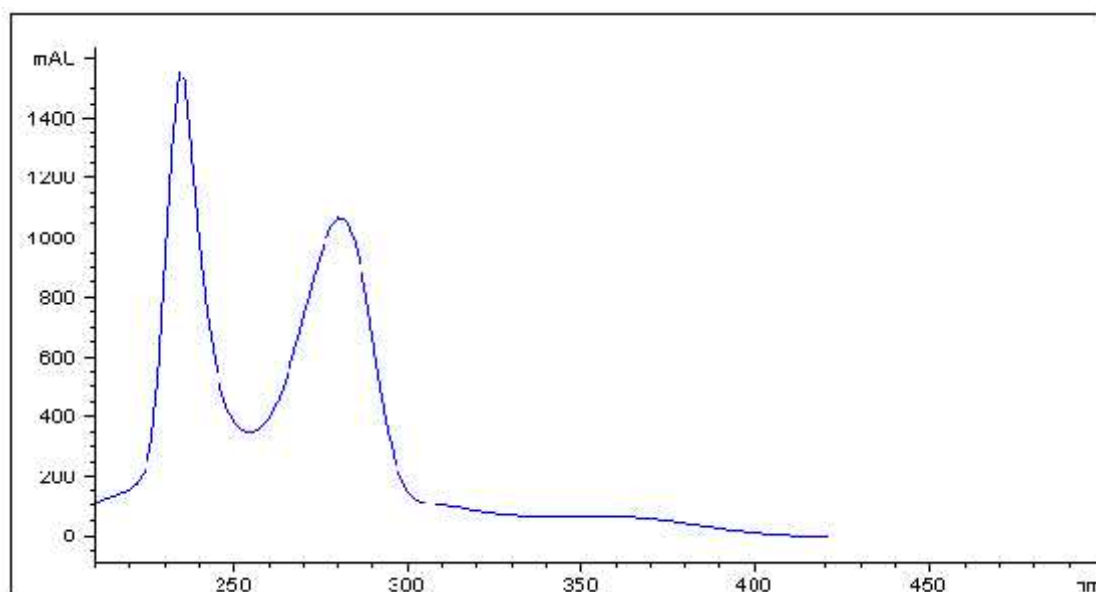


Figura 12. Espectro de absorção encontrado para a amostra de estigma triploides (AAA/AAB) e diplóides (AA)

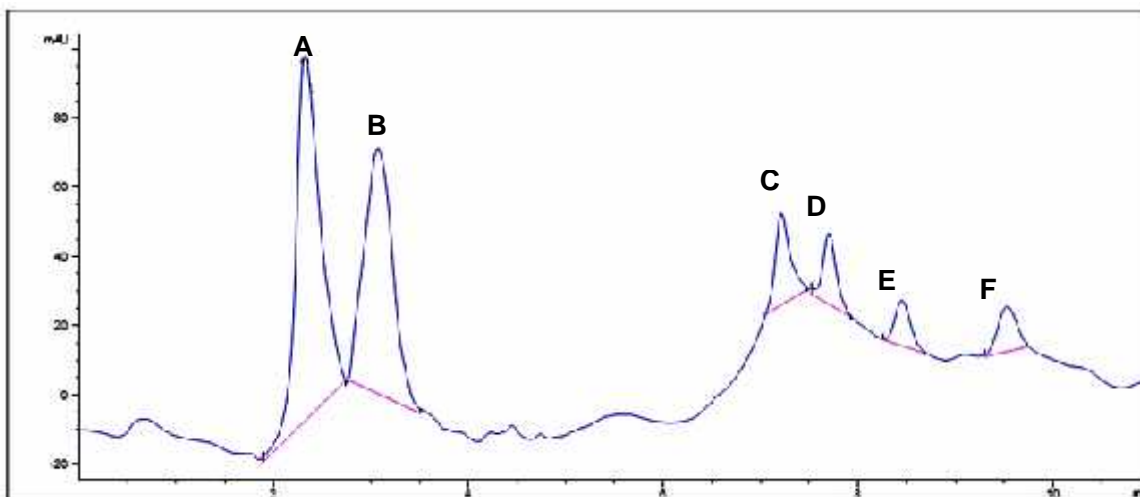


Figura 13. Perfil cromatográfico da encontrado para as amostra de porção distal do ovário de triploides (AAA/AAB) e diploides (AA)

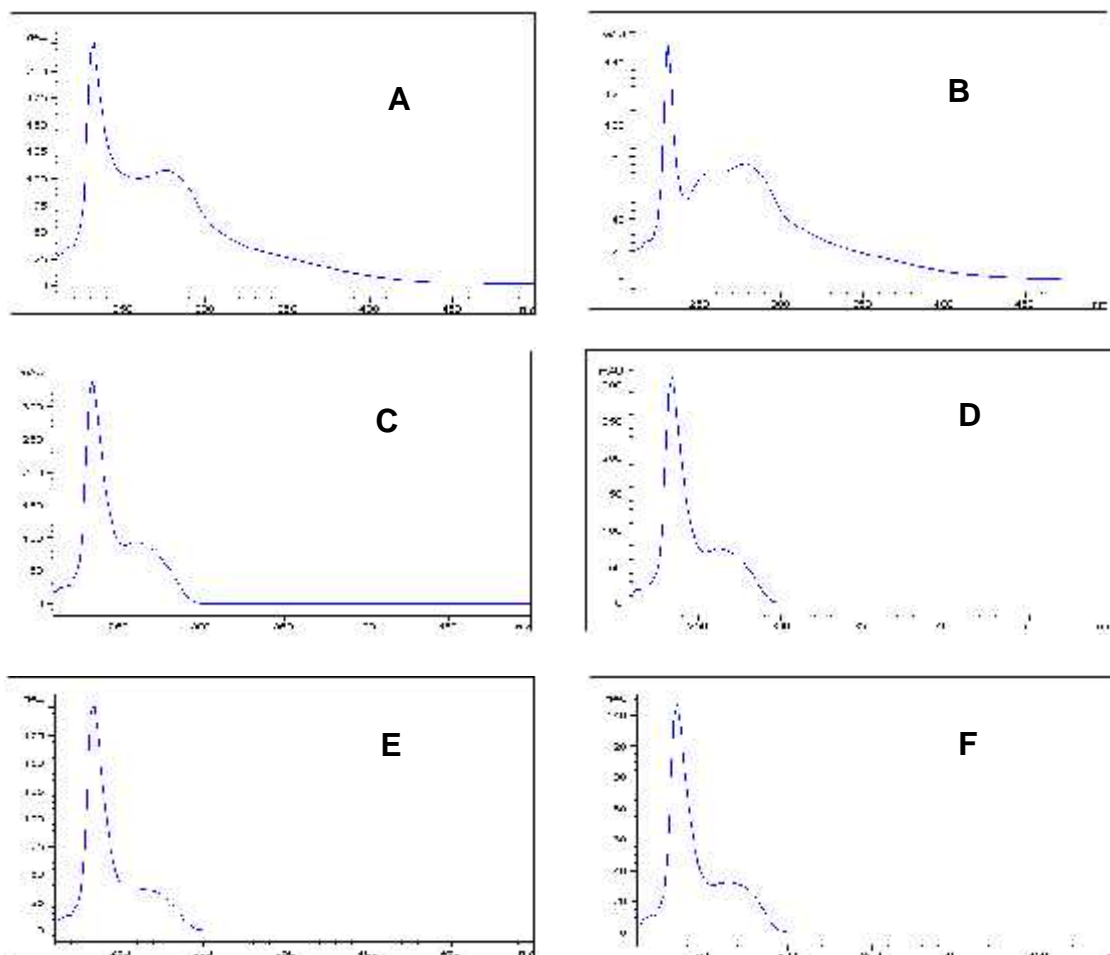


Figura 14. Espectros de absorção encontrados para as amostra de porção distal do ovário de triploides (AAA/AAB) e diploides (AA)

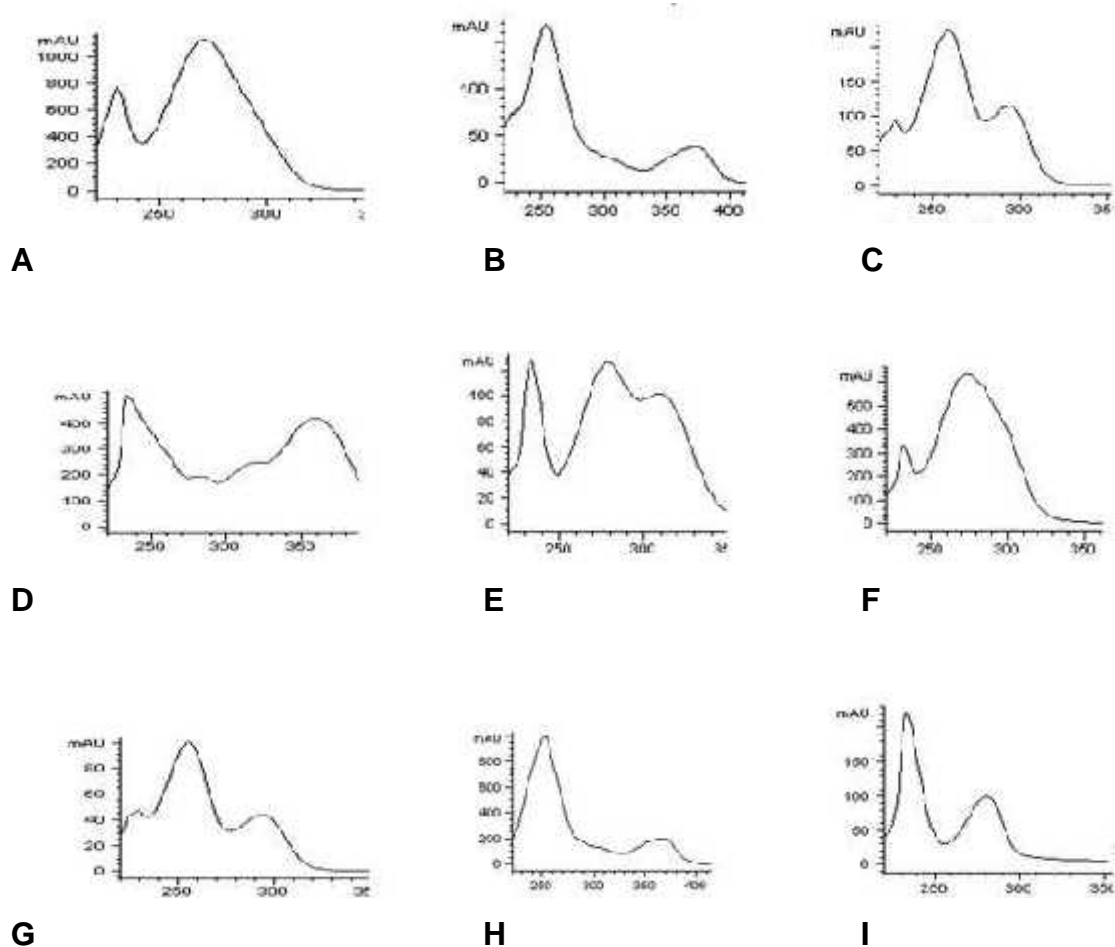


Figura 15. Espectros de absorção na região do UV-Vis encontrados em amostras de 10 taninos etnológicos (adaptado de OBREQUE-SLÍER, 2009). A) Ácido Gálico; B) Elagitaninos; C) Ácido protocateico; D) Flavonol glicosídeo; E) Aldeído protocateico; F) Galotanino; G) Ácido Vanílico; H) Ácido Elágico; I) Flavan-3-ol (catequina).

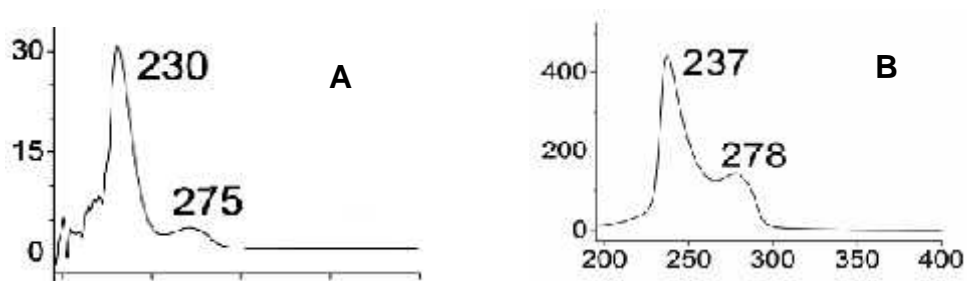


Figura 16. Espectros de absorção dos compostos fenólicos identificados a partir da casca interna de bétula (Adaptado de LIIMATAINEN, 2013). A) Galatocatequina; B) (*E*)-1,7-bis(4-hidroxi-fenil)hept-4-en-3-one.

Para uma determinação mais precisa de compostos bioativos nas estruturas florais de musáceas torna-se necessário o uso de técnicas de identificação estrutural por ressonância magnética nuclear que devido à melhoria tecnológica dos equipamentos utilizados atualmente na análise espectroscópica, permite analisar amostras cada vez menores podendo reconhecer um grande número de compostos orgânicos mais refinadamente. Conhecer a estrutura química presente nos tecidos florais de bananeira pode permitir um avanço no melhoramento de técnicas de fertilização *in vitro* e *in vivo* auxiliando programas de melhoramento genético da cultura. Outra ferramenta que poderia auxiliar na busca da elucidação do comportamento químico em tecidos florais é a espectrometria de massa que auxilia na determinação de massa molecular com elevada exatidão, inclusive de biomoléculas e materiais poliméricos e/ou identificação de substâncias, mesmo em misturas complexas.

CONCLUSÃO

Nos estigmas e porção distal do ovário de triploides encontramos valores altos para a presença de compostos fenólicos confirmando a presença de metabólicos secundários. Em contrapartida para as amostras diploides esses valores são pequenos, porém ainda presentes. Este estudo mostrou que porção distal do ovário e do estigma é uma poderosa fonte de compostos fenólicos.

As amostras mostraram um valor elevado para a % SRL tanto para diploides quanto triploides, indicando uma região com presença de compostos que protegem os sistemas biológicos contra efeitos nocivos em processos e ações que podem causar oxidação excessiva. A presença de oxidação excessiva na região distal de ovário tanto para diploide quanto para triploides deve estar relacionados a outros processos biológicos ainda não explicados.

É importante salientar a necessidade de caracterizações a nível celular como identificação de enzimas, proteínas e outras espécies químicas com uso de marcadores para uma completa caracterização, permitindo obter as rotas bioquímicas, sinalização celular e detalhamento do funcionamento fisiológico das estruturas florais nas musáceas.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, R. B.; CAMARATO, J. L.; NAVARRO, D. F.; PARKER, Y. K.; IKEGAKI, M.; JUNIOR, V. A. K. Determinação de flavonoides totais em amostras de própolis. **Ciências Biológicas e da Saúde**, v.3, p. 33-41, 1997.

BORGES, C. V.; DONATO, M.; KUHNEN, S.; MARASCHIN, M.; AMORIM, E. P.; LEDO, C. A. DA S. **Compostos fenólicos em frutos de bananeira**. Em: <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/72786/1/COMPOSTOS-FENOLICOS-EM-FRUTOS-4XYJ.pdf>. Acesso em: 15.05.2014.

CIOLA, R. **Fundamentos da cromatografia a líquido de alto desempenho: HPLC**. São Paulo: Edgard Blüncher, 2003.

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

DIAS, F. S., SILVA, M. F., DAVID, J. M. Determination of Quercetin, Gallic Acid, Resveratrol, Catechin and Malvidin in Brazilian Wines Elaborated in the Vale do São Francisco Using Liquid-Liquid Extraction Assisted by Ultrasound and GC-MS. **Food Analytical Methods**, v. 6, p. 963-968, 2013.

DUARTE-ALMEIDA, J. M.; SANTOS, R. J.; GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema β -caroteno/ácido linoléico e método de seqüestro de radicais DPPH•. **Ciências e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, p. 446-452, 2006.

FAO. **FAO statistical databases: Banana Market Review and Banana Statistics 2012-2013**. Em: <http://www.fao.org/docrep/019/i3627e/i3627e.pdf>

FRIGOLO, C. E.; SOARES, R.C.O.; KAPLAN, M.A.C. Estudo químico de *Musa acuminata* Colla (Musaceae). **Revista Fitos**, v.5, p. 58-63, 2010.

FUNARI, C. S.; FERRO, V.O. Análise de própolis. **Ciência e Tecnologia de alimentos**, v. 26, p. 171-178, 2006.

HARBORNE, J.B.; WILLIAMS, C.A. Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry**, v. 55, p. 481-504, 2000.

IBGE. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. LSPA, Levantamento sistemático da Produção Agrícola. 2014. Disponível em: < http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/lspa_201304.pdf>. Acesso em: 19.04.2014.

JONES, W. P., KINGHORN, A. D. Extraction of plant secondary metabolites. In; **Methods in biotechnology – Natural Products Isolation**. 2nd ed. Humana press. Totowa, New Jersey. 2006.

LIIMATAINEN, J. **Phenolics of the inner bark of silver birch: characterization and intraspecific variation**. Tese (doutorado) - Universidade de Turku. Turku, Finlândia. 2013.

SOARES, T. L. **Eficiência do Sistema reprodutivo de bananeira**. Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Recôncavo da Bahia. Centro de Ciências Agrárias Ambientais e Biológicas, Área de concentração: Fitotecnia. Cruz das Almas, BA. 2011.

NEVES, L. C., ALENCAR, S. M., CARPES, S. T. Determinação de atividade antioxidante e do teor de compostos fenólicos e flavonoides totais em amostras de pólen apícola de *Apis mellifera*. **Brazilian Journal of Food Technology**, VII BMCFB, 2009.

NGO, P.; DVORKIN, L.; WHELAN, J. *Musa paradisiaca*. Herbal Index, Boston healing landscape project. Em: http://www.bu.edu/bhlp/pages/herbs/herb_monographs/musa_paradisiaca.htm. Acesso em: 09.07.2014.

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

OBREQUE-SLÍER, E., PEÑA-NEIRA, A., LÓPEZ-SOLÍS, R., RAMÍREZ-ESCUADERO, C., ZAMORA-MARÍN, F. Phenolic Characterization of Commercial Enological Tannins. **European Food Research and Technology**, V. 229, p. 859-866, 2009.

PEREIRA, T. N. S., *et al.* Recursos Genéticos Vegetais e o Melhoramento de Plantas. In: **Germoplasma: conservação, manejo e uso no melhoramento de plantas**. Editora: Viçosa, MG: Arca, 2010.

RUFINO *et al.* Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre DPPH. **Embrapa - Comunicado Técnico on line 127**, Fortaleza, CE, 2007. Disponível em: <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/426953/1/Cot127.pdf>

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

SHENG, Z., *et al.* Antioxidant properties of banana flower of two cultivars in China using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) reducing power, 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzthiazoline-6- sulphonate (ABTS) and inhibition of lipid peroxidation assays. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, p. 4470-4477, 2011.

SOARES, M., WELTER, L., GONZAGA, L., LIMA, A., MANCINI-FILHO, J., FETT, R. Avaliação da atividade antioxidante e identificação dos ácidos fenólicos presentes no bagaço de maçã cv. Gala. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, p. 727-732, 2008.

SOARES, T. L. **Eficiência do Sistema reprodutivo de bananeira**. Tese (Doutorado)- Universidade Federal do Recôncavo da Bahia. Centro de Ciências

Agrárias Ambientais e Biológicas, Área de concentração: Fitotecnia. Cruz das Almas, BA. 2011.

SOARES, T. L.; SOUZA, E. H.; COSTA, M. A. P. C.; SOUZA, A. S.; SILVA, S. O.; SANTOS-SEREJO, J. A. *In vivo* fertilization of banana. **Ciência Rural**, v.44, p.37-42, 2014.

TAIZ, L., ZEIGER, E. TAIZ, **Fisiologia vegetal**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2006. 719 p.

WOISKY, R. G.; SALATINO, A. Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. **Journal of Apicultural Research**, v. 37, p. 99-105, 1998.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho disponibilizou novos conhecimentos sobre o comportamento dos extratos florais de estigma e porção distal do ovário dos genótipos Grande Naine e do diploide 089087-01 em relação a 20 genótipos melhorados e buscou elucidar a composição química dos compostos presentes nas amostras de extrato aquoso, contribuindo para o programa de melhoramento genético da cultura da banana.

A identificação dos compostos fenólicos nas amostras serve de estímulo para futuras caracterizações funcionais e bioquímicas nas regiões onde ocorre a necrose nos genótipos estéreis.

O isolamento dos compostos e o teste do efeito de cada um deles sobre a germinação do pólen permitirão a identificação mais precisa daqueles que estão envolvidos diretamente na germinação do pólen e crescimento do tubo polínico em bananeira. De posse de resultados, mais sofisticados, pode-se traçar planos futuros no melhoramento deste cultivar ampliando a oferta de produto tanto para o mercado interno quanto para o externo.