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

**EFEITO DO ÁCIDO GIBERÉLICO NO METABOLISMO AMIDO-
SACAROSE DURANTE O AMADURECIMENTO DA BANANA (*Musa*
acuminata var. Nanicão)**

MARIA ROSECLER MIRANDA ROSSETTO

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:

Prof^a. Dr^a. Beatriz Rosana Cordenunsi

SÃO PAULO
2001

MARIA ROSECLER MIRANDA ROSSETTO

EFEITO DO ÁCIDO GIBERÉLICO NO METABOLISMO AMIDO-SACAROSE DURANTE O AMADURECIMENTO DA BANANA (*Musa acuminata* var. Nanicão)

Comissão Julgadora

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Prof.ª. Dr.ª. Beatriz Rosana Cordenunsi
Orientador

Prof.ª. Dr.ª. Giuseppina Pace Pereira Lima
1º Examinador

Prof. Dr. João Roberto Oliveira do Nascimento
2º Examinador

São Paulo, 01 de junho 2001

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço à Deus pela vida e por ter me dado a oportunidade de estudar, haja vista esta ser privilégio de poucos. Por me dar saúde, paz, harmonia e perseverança, não só nos momentos mais difíceis deste trabalho, mas durante toda minha vida.

Agradeço especialmente à minha mãe Marlene, pela sua grande dedicação e amor para com minha irmã Andréa e eu, esquecendo, muitas vezes, de si mesma para nos oferecer o melhor, sem a qual não teria seguido a diante, ao meu pai Miguel (in memorian) que sentiria muito orgulho de sua filha. Aos meus avós Pedro e Lourdes que me ensinaram que para ter felicidade era preciso, antes, ser humilde. Um agradecimento especial ao meu tio Edvaldo que me devolveu o ânimo na época do vestibular e faculdade, enchendo meu coração de energia e vontade, contagiando-me com seu positivismo. À minha tia Rita pelas constantes orações. Ao meu noivo pelo carinho, afeto e conforto nos momentos difíceis. E a toda minha família que esteve sempre presente no amor e união. Gostaria também de agradecer a minha amiga Daniele, pela amizade e paciência.

Agradeço à Professora Dr^a Giuseppina P. Pereira e ao Professor José Pedro S. Valente, pela amizade, dedicação, positivismo, orientação na iniciação científica e por tudo que fizeram por mim, quando ainda era iniciante.

Ao Professor Dr. Rogério L. Vieites, pela grande amizade, pela orientação, pelas aulas maravilhosas e incentivo na área de Alimentos.

Agradeço especialmente à minha orientadora Professora Dr^a Beatriz Rosana Cordenunsi, pela amizade, paciência, pela grande oportunidade, por acreditar em meu trabalho, pela sua grande dedicação e ajuda, por estar sempre presente em todos os momentos

deste trabalho e principalmente preocupando-se com o bem estar de todos os seus orientados. Agradeço, também, ao Prof. Dr. João R. Nascimento, pela amizade, orientações e conselhos. Ao Prof. Dr. Franco Maria Lajôlo pela amizade e oportunidade de fazer parte de sua equipe.

Agradeço especialmente ao Eduardo Purgatto e Renata V. Mota, sendo estas linhas insuficientes para traduzir a minha gratidão pela imensa ajuda, dedicação, amizade e o conhecimento que me forneceram. Deixando claro que sem a dedicação dos mesmos este trabalho teria sido muito mais difícil e moroso.

Os meus agradecimentos aos amigos do laboratório: Priscila (pela grande amizade), Tânia, Selene, Jacqueline, Ana Paula, Maria Luiza, Guilherme, Anderson, Adair, ao técnico superior Alberto (pela grande amizade e dedicação nas análises de HPLC e CG), à Marcia, à técnica Lúcia e à prof. Inês. Às meninas da secretaria, Isabel, Angela e Mônica e ao pessoal da secretaria de pós-graduação meus agradecimentos pela atenção despendida. E a todos o meu carinho especial.

Gostaria de agradecer especialmente, ao Professor Gerival da Universidade de Viçosa que nos fez a gentileza de fornecer as bananas utilizadas neste trabalho.

Meus agradecimentos especiais também à FAPESP, órgão financiador desta pesquisa, a qual tem acreditado em meu trabalho desde a iniciação científica, me fornecendo sempre muito apoio, tanto financeiro como técnico científico.

Dedico este trabalho à minha mãe Marlene

" Não entendo. Isto é tão vasto que ultrapassa qualquer entender. Entender é sempre limitado. Mas não entender pode não ter fronteiras. Sinto que sou muito mais completa quando não entendo. Não entender, de modo como falo, é um dom. Não entender, mas não como um simples de espírito. O bom é ser inteligente e não entender. É uma benção estranha, como ter loucura sem ser doída. É um desinteresse manso, é uma doçura de burrice. Só que de vez em quando vem a inquietação: quero entender um pouco. Não demais: mas pelo menos entender que não entendo."

(Clarice Lispector)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	2
1.1 AMADURECIMENTO DOS FRUTOS: RESPIRAÇÃO E ETILENO	4
1.2 DEGRADAÇÃO DO AMIDO E SÍNTESE DE SACAROSE EM BANANAS	8
2. OBJETIVOS	20
3. MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1 MATERIAL	21
3.2 MÉTODOS	21
3.2.1 Infiltração do ácido giberélico em fatias de banana	21
3.2.2 Análise de amido	26
3.2.3 Determinação de açúcares solúveis	26
3.2.4 Preparo dos extratos enzimáticos	26
3.2.5 Atividade da Sacarose-fosfato sintase (EC 2.4.1.14) e sacarose sintase (EC 2.4.1.13)	27
3.2.7 Atividade Amilásica total	28
3.2.8 Atividade das α -amilases (1,4 α -D-glicano glicanohidrolase, EC 3.2.1.1)	28
3.2.9 Atividade da β -amilase	29
3.2.10 Atividade das Fosforilases (α -1,4-D-glucana: orthofosfato α -glicosil transferase, EC 2.4.1.1)	29
3.2.11 Quantificação de Proteínas	30
3.2.12 Medidas de CO ₂ e etileno	31
3.2.13 Extração de proteína total para Western Blot	32
3.2.14 Eletroforese de proteína em gel de poliacrilamida	32
3.2.15 Western Blot	33
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
4.1 PERFIS DE RESPIRAÇÃO E DE ETILENO DURANTE O AMADURECIMENTO DA BANANA	34
4.2 PERFIS DE AMIDO E AÇÚCARES SOLÚVEIS DURANTE O AMADURECIMENTO DA BANANA	37
4.3 ATIVIDADE HIDROLÍTICA TOTAL	40
4.4. ATIVIDADE DE α -AMILASE	42
4.5 PERFIL DE ATIVIDADE DE β -AMILASE	44
4.6 PERFIS DE ATIVIDADE DAS FOSFORILASES	46
4.7 PERFIL DE ATIVIDADE DA SACAROSE FOSFATO SINTASE	50
4.8 PERFIL DE ATIVIDADE DA ENZIMA SS	54
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	56
6. CONCLUSÕES	57
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58

EFEITO DO ÁCIDO GIBERÉLICO NO METABOLISMO AMIDO-SACAROSE DURANTE O AMADURECIMENTO DA BANANA

1. INTRODUÇÃO

O amadurecimento é uma etapa do desenvolvimento que é exclusiva dos frutos, sendo iniciado após a maturidade fisiológica, período relativo à maturação da semente. Este evento envolve um grande número de transformações metabólicas complexas. Embora essas reações sejam em grande parte de natureza degenerativa, as mudanças ocorridas parecem fazer parte do processo natural de senescência do vegetal. Como consequência, ocorrem mudanças na cor, aroma, textura e sabor, tornando o fruto aceitável para o consumo (Seymour et al., 1996). Estas alterações se processam de maneira altamente coordenada e estão relacionadas à atividade de enzimas, contando com a participação dos fitohormônios na iniciação e desenvolvimento desses processos (Tucker e Grierson, 1984; Speirs e Brady, 1991).

Um dos principais eventos bioquímicos que ocorre durante o amadurecimento dos frutos é a mobilização dos carboidratos de reserva que pode ser na forma de amido, ácidos orgânicos ou sacarose fornecida pela própria planta, levando ao acúmulo de açúcares. Este último, se encaixa no caso dos frutos não-climatéricos, onde a maior parte da formação e acúmulo dos açúcares responsáveis pelo adoçamento, depende da mobilização de sacarose proveniente da fotossíntese, adoçando muito pouco depois de colhido (Seymour et al., 1996).

Na banana, o amido armazenado é a principal fonte de reserva, sendo reduzido durante o climatério de teores que variam de 12 a 20 %, dependendo da cultivar de banana, sendo reduzido após o climatério respiratório a menos de 1%, quando a fruta está amadurecida. Concomitante à hidrólise do amido, o teor de sacarose aumenta aproximadamente 12 vezes podendo chegar a 15% (Arêas e Lajolo, 1981; Mota et al., 1997).

Durante esta fase, a atividade da sacarose-fosfato sintase (SPS), enzima responsável pela síntese de sacarose em bananas, aumenta cerca de 3 vezes e permanece alta até a senescência com uma alta correlação com a síntese e acúmulo de sacarose (Cordenunsi, 1989; Hubbard et al., 1990; Mota, 1997). Esta correlação também foi observada em manga (Hubbard et al., 1991) e kiwi (Macrae et al., 1992). Por outro lado, a atividade da sacarose sintase (SS), enzima também ligada ao metabolismo da sacarose, começa a decair no pré-climatério por ocasião da colheita, chegando a níveis quase indetectáveis no pós-climatério. Já que sua atividade máxima ocorre durante a formação do fruto, deduz-se que a enzima esteja mais envolvida na degradação da sacarose do que na sua síntese, fornecendo substrato (UDP-glicose ou ADP-glicose) para a síntese de parede celular e de amido (Cordenunsi, 1989; Hubbard et al., 1990; Nascimento et al., 1997).

No entanto, quando a fruta amadurece ligada à planta, estes eventos se processam com velocidades diferentes. Foi observado por Cordenunsi e Lajolo (1995) que os frutos demoram mais para amadurecer e as mudanças nas atividades da SS e SPS ocorrem mais lentamente, alcançando no caso desta última, apenas 50% do valor máximo obtido após a colheita. A razão mais provável é de que haja alguma relação destes eventos com a veiculação de fitohormônios da planta para a fruta, os quais atuariam como inibidores do amadurecimento.

O amadurecimento dos frutos é controlado por várias classes de hormônios vegetais num processo pouco conhecido ainda. O etileno é de longe o hormônio mais estudado devido à sua importância como responsável pela maturação e senescência dos frutos. Sabe-se que estes processos dependem em parte do aumento da sensibilidade ou da diminuição da resistência do fruto à ação do etileno e também do desaparecimento ou inativação de inibidores, como por exemplo, os fitoreguladores (Davies, 1995). Vendrell (1969) observou que quando fatias de banana foram infiltradas com auxinas, o amadurecimento da fruta foi retardado. Purgatto et al. (2001) demonstraram que fatias de banana infiltradas com ácido indolacético (AIA) tiveram seu amadurecimento retardado e algumas

enzimas, assim como a β -amilase, tiveram seu perfil de atividade durante o amadurecimento, alterado. As giberelinas, auxinas e citocininas têm sido estudadas com particular interesse por funcionarem total ou parcialmente como retardadores da senescência dos frutos. Em geral, as giberelinas apresentam efeito oposto ao ácido abscísico (ABA) com relação ao aumento na síntese de hidrolases, responsáveis pelos processos degradativos de folhas e tecidos de frutos (Cohen, 1996).

Neste trabalho, o objetivo foi estudar a possível influência do ácido giberélico no processo de adoçamento pós colheita da banana. Foram focalizados os teores de amido-açúcares solúveis e algumas enzimas relacionadas à degradação do amido e síntese da sacarose.

1.1 Amadurecimento dos frutos: respiração e etileno

Para entender o amadurecimento é necessário que se faça uma associação resumida dos principais eventos que estão ocorrendo na maquinaria celular do fruto. Pode-se dizer que a maior parte dos processos bioquímicos relativos ao amadurecimento dos frutos climatéricos, ocorre a partir da sinalização promovida pelo etileno e após o pico de respiração (Seymour et al., 1996). Pouco se relata na literatura sobre a ação dos outros fitohormônios, assim como auxina, giberelinas ou citocinina. Portanto, o fato destas substâncias agirem como retardadoras da senescência é muito atrativo.

A respiração pode ser resumida como a oxidação de carboidratos pela remoção de hidrogênio, que são canalizados para a cadeia respiratória, gerando um quociente respiratório entre CO_2 e O_2 . Os principais substratos utilizados neste processo são os carboidratos, lípides e proteínas (Seymour et al., 1996).

A banana e outros frutos classificados como climatéricos, apresentam um pico de respiração, descrito como climatério respiratório, a partir do qual grande parte dos eventos relativos ao amadurecimento se processam. O climatério, portanto, é caracterizado pela subida rápida do etileno e CO_2 . Vendrell (1970)

verificou um aumento de CO₂ na banana por volta de 4 a 10 vezes. Na banana Marmelo, foi observado um aumento de aproximadamente 5 vezes na produção de CO₂, sendo que essa atividade respiratória foi paralela à elevação de temperatura (Chitarra, 1979). Assim como observado, existem variações dentro de uma mesma cultivar, nos teores de gás carbônico e etileno no momento do pico climatérico. Algumas enzimas da via glicolítica como a fosfofrutoquinase (EC 2.7.1.11) e a frutose 1,6-bisfosfatase (EC 3.1.3.11) tem sua atividade aumentada neste período (Salminen e Young, 1975; Nair e Darak, 1981). Os autores Bal et al. (1991) sugerem que a ativação da piruvato quinase (EC 2.7.1.40) e/ou fosfoenolpiruvato carboxilase (EC 4.1.1.31) é a resposta inicial da glicólise no climatério.

A atual natureza dos eventos que iniciam o aumento da biossíntese de etileno também não está inteiramente elucidada. Entretanto, foi observado que alguns mRNAs são transcritos e traduzidos independentemente do etileno. Adams e Yang (1979), sugeriram que o etileno, em tecidos de maçã, é sintetizado a partir da metionina via S-adenosilmetionina (SAM) e um aminoácido de 4 carbonos, o ácido 1-aminociclopropano carboxílico (ACC), isto é:

Em 1980, Yang propôs esta via como sendo atuante em todos os vegetais superiores. Nesta conversão, o carbono 1 da metionina é convertido em CO₂, o carbono 2 para ácido fórmico e os carbonos 3 e 4 para etileno. O átomo de enxofre (S) é retido no tecido.

O controle da biossíntese do etileno é regulado por sua produção endógena que, em determinados frutos, é causado pela exposição do tecido ao etileno exógeno. Este aumento considerável de produção de etileno endógeno, é chamado de efeito autocatalítico, onde o próprio etileno estimula a ação de suas enzimas de síntese: ACC sintase e ACC oxidase. Supõe-se que os inibidores endógenos existentes no estágio pré-climatérico, sejam destruídos pela exposição

ao etileno. Assim, a produção de etileno aumenta no estágio climatérico e o amadurecimento do fruto ocorre mais rapidamente (Abeles et al., 1992).

Dois sistemas reguladores da biossíntese do etileno são propostos: o primeiro controla os níveis de etileno basal e a produção relativa ao estresse. Ele está presente tanto em frutos climatéricos como nos não-climatéricos. O segundo sistema regula a produção autocatalítica do etileno e atua somente nos frutos climatéricos.

Uma família gênica de enzimas ACC sintase e a ACC oxidase estão envolvidas neste processo, junto das proteínas receptoras, as quais formam um complexo mecanismo de transdução de sinal dentro do tecido, atuando nos genes destas enzimas (McKeon et al., *In*: Davies, 1995). Tanto a formação do ACC, quanto sua subsequente conversão em etileno são inibidas pelas poliaminas, pois ambos utilizam um precursor comum (SAM) e também um subproduto comum (MTA) (Page & Willians-Ashman, 1969; Sagee et al., 1980; Biondi et al., 1990). A SAM pode ser utilizada na biossíntese de poliaminas ou etileno, ou ainda ambos, dependendo das condições que regulam sua via metabólica, apesar da função do metabolismo dessas substâncias no vegetal serem diferentes (Even-Chen et al, 1982).

O processo regulado pelo etileno no amadurecimento dos frutos tem sido exaustivamente estudado com o objetivo de prolongar o tempo de armazenamento e melhorar a qualidade dos frutos. Através de pesquisas com as enzimas responsáveis pela síntese deste hormônio já foi possível bloquear a transcrição gênica destas enzimas em tomates e melões, através da técnica do RNA antisense (Hamilton et al., 1990; Oeller et al., 1991). No entanto, foi observado que as alterações no metabolismo dos frutos não parecem estar relacionadas à ação isolada de um só fitohormônio, mas sim ser a consequência de um balanço hormonal (Gillaspy et al., 1993; Cordenunsi e Lajolo, 1995). Os efeitos mais importantes do mecanismo de regulação do etileno nos frutos podem ser visualizados no esquema da figura 1.

Figura 1: Representação esquemática do mecanismo de ação do etileno em frutos climatéricos.

Notificação:

ETR (proteína): receptor de etileno que desencadeia através da transdução de sinal uma cascata de eventos bioquímicos no tecido

1.2 Degradação do amido e síntese de sacarose em bananas

O metabolismo amido-sacarose é um dos principais eventos observados durante o amadurecimento na banana. A degradação do amido (cerca de 20%) e o acúmulo de açúcares solúveis, principalmente sacarose (cerca de 15%), inicia-se no climatério da banana concomitante ao aumento da respiração e etileno.

O amido é um polissacarídeo único nos vegetais por se constituir de grânulos que podem ser isolados. Eles estão organizados dentro de plastídeos específicos: os amiloplastos. Após a ruptura e a dissolução desses grânulos, a maior parte do amido pode ser fracionada em duas macromoléculas, que são homopolissacarídeos de glicose, definidos como amilose e amilopectina. Elas apresentam propriedades diferenciadas quanto à solubilidade, tipo de ligações, tamanho da cadeia, poder de complexação com iodo, grau de retrogradação e peso molecular. Técnicas analíticas e microscópicas possibilitaram uma boa visualização dos diferentes níveis de organização destes grânulos (Gallant et al., 1997).

Em células intactas de banana os grânulos de amido mostram-se heterogêneos, diferenciam-se no tamanho e formato, dependendo da cultivar. Eles se mostram irregulares ao microscópio óptico, sendo os pequenos esféricos e os grandes ovais ou alongados (Lii et al., 1982; Garcia e Lajolo, 1988; Motta, 1997). Propõe-se que existam duas formas de iniciar a degradação do amido: a endo e a exocorrosão dos grânulos, porém ambas podem ocorrer juntas. Garcia e Lajolo (1988) observaram que com o avanço do amadurecimento da banana, aumentava o número de grânulos pequenos em detrimento dos grandes, preferencialmente degradados. Eles observaram também que a superfície dos grânulos da banana verde era lisa, enquanto que os grânulos da banana madura apresentaram estriações, formulando a hipótese de que o ataque das enzimas ocorreria por um processo de exocorrosão. Estas estriações podem ser observadas em grânulos de

várias cultivares, sugerindo que a ação das amilases se inicia bem antes do início do climatério (Mota, 1997).

A degradação do amido é realizada através de um complexo processo enzimático (figura 2). As enzimas envolvidas neste metabolismo podem coexistir em múltiplas formas e estar localizadas fora do plastídeo, o que dificulta o estabelecimento da via metabólica (Steup, 1988).

As α -amilases (EC 3.2.1.1) hidrolisam, ao acaso, as ligações α -1,4 da amilose e da amilopectina, produzindo uma mistura de oligossacarídeos, denominados dextrinas. Garcia e Lajolo (1988) detectaram a atividade de 3 α -amilases, 4 β -amilases e α -1,4 e α -1,6-glicosidases durante o amadurecimento da banana, e observaram que a atividade destas enzimas aumentou na fase climatérica, formulando a hipótese de que elas estariam diretamente relacionadas com a degradação do amido. Já se sabe que a α -amilase de banana parece ter um peso molecular por volta de 66 kDa (trabalhos em publicação), enquanto a maioria das endoamilases de outras plantas, apresentam subunidades que variam de 42 a 45 kDa (Witt e Sauter, 1996). Sabe-se também que todas as formas de α -amilases tem um átomo de Ca^{2+} por molécula, o que confere estabilidade para a enzima (Whitaker, 1994).

A β -amilase (EC 3.2.1.2) atua somente na penúltima ligação da extremidade não redutora da amilose e da amilopectina, liberando somente maltose. Na banana a ausência de maltose como açúcar comum sugere uma atuação sincronizada da β -amilase com a α -(1,4)-glicosidase (Garcia, 1983). Foi proposto também que as enzimas α e β -amilases atuam juntas para dar início à quebra do amido, já que a β -amilase não apresenta atividade sobre grânulos de amido que não foram anteriormente hidrolisados pela α -amilase (Dunn, 1974). A maioria das β -amilases são monoméricas, com exceção da batata doce que apresentou ser um tetrâmero de 215 kDa, com subunidades por volta de 55 a 64 kDa (Monroe & Preiss, 1990; Wong, 1995). A β -amilase da banana parece ser um dímero composto de subunidades de 56 kDa e tem um aumento pronunciado de

atividade e de expressão durante a fase de degradação do amido (Purgatto et al., 2001).

Os produtos de degradação das α e β -amilases que possuem ligações glicosídicas α -1,6, são metabolizados pelas enzimas desramificadoras (EC 3.2.1.41; EC 3.2.1.10 e EC 3.2.1.68) até maltotriose, maltose e oligossacarídeos. A maltose pode ser hidrolisada à glicose pela ação das α -glicosidases (EC 3.2.1.20). Não foi identificado ainda nenhuma enzima desramificadora em frutos, mas as glicosidases já foram estudadas em banana, algumas isoformas de α -glicosidases, na forma solúvel, as quais estão ligadas à parede celular, foram purificadas e caracterizadas. Observou-se que a forma solúvel da enzima é uma maltase típica e sua atividade demonstrou ser estável na fase climatérica, atuando em pH ótimo de 4,5, com peso molecular por volta de 70KDa (Konishi et al., 2001).

As fosforilases em conjunto com as amilases e glicosidases, participam do metabolismo do amido na banana, tanto produzindo glicose-1-fosfato à partir da ligação α -1,4 do terminal não redutor na presença de Pi, quanto no sentido inverso, liberando fósforo inorgânico (Arêas e Lajolo, 1981). Foram observados na banana duas formas da enzima com características semelhantes às formas citosólica e plastidial descritas na literatura para outros tecidos vegetais (Mota, 2001). A forma plastidial da enzima parece atuar sobre o grânulo de amido e a forma citosólica, por estar afastada do substrato não se sabe ao certo qual seria sua função (Buchner et al., 1996). Muito pouco se conhece sobre a regulação das formas desta enzima, entretanto, sabe-se que a amido fosforilase é inibida por metais pesados, assim como Hg^{2+} , Ag^+ , Cu^{2+} , Fe^{2+} , Zn^{2+} . Em folhas de banana foi observado que a adenosina trifosfato (ATP) também pode inibir a sua atividade. A faixa ótima de pH encontrada para a enzima, tanto em animais como vegetais, foi em torno de 6,0 a 7,0, sendo rapidamente inativada na faixa de pH abaixo de 4,9 (Nighojkar e Kumar, 1997).

Os produtos finais da degradação do amido, glicose e glicose-1P, podem ser convertidos a glicose-6-fosfato e frutose-6P pela ação da fosfoglicomutase (EC 5.4.2.5) e hexoquinase (EC 2.7.1.1), respectivamente. Os produtos da ação destas enzimas serão utilizados na síntese de sacarose, sendo que a glicose pode

ser utilizada para dar início ao ciclo de respiração na glicólise. A utilização destes produtos de degradação ocorre especialmente no citoplasma (Tucker, 1993).

A enzima responsável pela interconversão da glicose-6P em frutose-6P é a fosfoglicose isomerase (PGI) (D-glicose-6-fosfato-cetol-isomerase) (EC 5.3.1.9), sua atuação garante a liberação de frutose-6P que é o substrato da sacarose fosfato sintase (SPS). Em paralelo, as enzimas fosfoglicomutase e a UDPG pirofosforilase são ativadas para produzir UDPG, um açúcar nucleotídeo que é utilizado para formação da sacarose (Ap Rees, 1980). Segundo Kruckeberg et al. (1991) a PGI ocorre nos plastídeos e no citosol. A PGI do plastídeo seria essencial na síntese de amido, enquanto que a PGI do citosol atuaria na conversão de triose-fosfatos a sacarose. Mota (1997) verificou que o pico de atividade da PGI coincidiu com o acúmulo de sacarose na banana.

A síntese de sacarose é mediada basicamente por duas enzimas que parecem estar localizadas de forma homogênea por toda a polpa da banana (Bassinello et al., 1999), através de dois caminhos alternativos: o primeiro pela ação da sacarose fosfato sintase (SPS), produzindo sacarose-6P a partir de UDP-Glicose e frutose-6P: ($\text{UDPG} + \text{F-6P} \rightarrow \text{sacarose-6P} + \text{UDP}$), seguida da sacarose fosfatase (EC 3.1.3.24) que retira o grupamento fosfato da molécula, gerando sacarose. O segundo seria pela ação da sacarose sintase (SS), que produz a sacarose a partir de UDP-Glicose e frutose: ($\text{UDPG} + \text{frutose} \rightleftharpoons \text{sacarose} + \text{UDP}$). Na banana foi observado que a SS apresenta uma atividade bem mais baixa após desligada da planta, estando mais envolvida na fase de desenvolvimento da fruta. A SS da banana é um tetrâmero, encontrada em duas isoformas que se diferenciam pelo ponto isoelétrico (4.59 e 4.77). Cada subunidade da enzima apresenta um peso molecular por volta de 90 kDa e o controle da sua atividade é baseado no nível de proteína SS e na modificação pós-traducional, a qual envolve a transcrição gênica da enzima (Nascimento et al., 1997; Cordenunsi e Lajolo, 1995; Nascimento et al., 2000). A sacarose também pode sofrer hidrólise pela ação das invertases (EC 3.2.1.26) e direcionar para síntese *de novo* de glicose e frutose (Leloir e Cardini, 1955).

A enzima chave para síntese de sacarose na banana é a SPS, já que sua atividade/expressão aumenta em paralelo com a degradação do amido e síntese de sacarose (Cordenunsi e Lajolo, 1995; Nascimento et al., 1997). A atividade da SPS em plantas superiores parece ser regulada por dois mecanismos distintos. O primeiro parece estar relacionado com a regulação alostérica através do balanço entre ativadores e inibidores da atividade enzimática. À semelhança da banana, foi observado em folhas de espinafre que a SPS era ativada por glicose-6P, por aumentar a velocidade da reação e a afinidade da enzima por frutose-6P (Doehlert e Huber, 1983 (a, b); Nascimento et al., 1997). Entretanto, verificou-se que essa ativação está sujeita à inibição por Pi (fósforo inorgânico), o qual pode atuar como um inibidor parcial competitivo da enzima.

Um segundo mecanismo regulatório proposto é que a mudança na atividade da enzima pode ocorrer por alterações nas suas propriedades cinéticas, ou seja, a enzima pode sofrer uma modificação covalente por fosforilação reversível ou ainda alterar os níveis da proteína SPS. Foi proposto que a SPS da banana é ativada pelo mecanismo de fosforilação (Hubbard et al., 1990) e por aumento de proteína (Nascimento et al., 1997). O peso molecular da SPS da banana é por volta de 420 kDa, com subunidades de 116 kDa, valores próximos aos encontrados para o espinafre (Sonewald et al., 1993), o milho (Bruneu, et al., 1991) e a beterraba (Hesse et al., 1995).

Figura 2: Provável via metabólica da transformação amido-sacarose nos vegetais superiores, parcialmente proposta por Hubbard et al.(1990), onde: (1):Frutose 1,6 bifosfatase; (2): ATP fosfofrutoquinase;(3): Fosfofrutoquinase -dependente de pirofosfato; (4) fosforilase; (5) α - e β -amilases e α -1,6 glicosidase; (6) Sacarose fosfato sintase; (7): Sacarose fosfato fosfatase; (8) Invertase (9) UDP pirofosforilase.

1.3 Mecanismo de ação do ácido giberélico

Os fitohormônios são substâncias orgânicas que ocorrem naturalmente nas plantas e influenciam o processo fisiológico sob baixas concentrações. As giberelinas foram descobertas pelo japonês Kurosawa em 1926, que estudava uma doença causada pelo fungo *Gibberella fujikurai*, o qual provocava um alongamento anormal do caule do arroz (Fosket, 1994). Elas são uma família de hormônios vegetais que apresentam mais de 100 compostos já identificados, sendo poucas delas ativas. Todas tem uma estrutura de anel comum "*ent-giberellane*", de ácidos diterpenóides tetracíclicos, diferenciando-se pelas posições e rearranjos espaciais de suas hidroxilas. Na sua biossíntese utilizam o precursor comum de todos os diterpenóides: o geranyl geranyl difosfato (GGPP; C=20) que é convertido a ácidos kaurenóicos pela ação da ent-kaureno sintase e quinases específicas, originando a giberelina GA₁₂ precursora de todas as demais giberelinas, inclusive do ácido giberélico (Davies 1995; Garcia-Martínez e Hedden, 1997).

A via de síntese comum é direcionada para a formação de carotenóides pela ação da fitoeno sintase, ou para formação de esteróis, substâncias essenciais da membrana celular. Portanto, as giberelinas são substâncias que serão produzidas pelo metabolismo secundário das plantas e podem ser biossintetizadas também pelos fungos (Fernández-Martín et al., 2000). A produção comercial destas substâncias é realizada pelo fungo *Gibberella fujikurai* e foi descoberto que o *Fusarium moniliforme* também pode produzi-las (Fernández-Martín et al., 2000).

A planta inteira é capaz de biossintetizar giberelinas, mas a principal produção é nas sementes, onde a maioria dos hormônios são sintetizados em quantidades (baixas) consideráveis (Davies, 1995). Dentro do tecido, o nível de giberelinas é controlado pela conjugação com moléculas de glicose, ésteres e éteres. Essas substâncias se ligam inativando momentaneamente a giberelina endógena, mas quando a conjugação é feita com aminoácidos e proteínas (menos comum) ocorre a inativação quase definitiva dessas substâncias, pois o

rompimento desses grupamentos é muito mais difícil (Martínez e Hedden, 1997). Em mutantes anão de *Arabidopsis* foi observado que as giberelinas são catabolizadas dentro do tecido pela GA₂₀-oxidase. As giberelinas podem substituir o fenótipo anão em algumas plantas, pois elas têm como principal função no tecido o alongamento e a expansão celular. Observou-se que mesmo contendo uma alta quantidade de giberelinas em plantas mutantes, essa não foi suficiente para substituir o nanismo quando a enzima GA₂₀-oxidase estava presente (Harberd et al., 1998).

Foi observado que ovários de diferentes frutos partenocárpicos continham uma quantidade muito maior de giberelina endógena quando comparados aos frutos normais, além de não apresentar semente, estes frutos estavam mais firmes e com maior teor de sólidos solúveis (Gillaspy et al., 1993). Os mesmos autores, ao estudar o balanço hormonal do tomate demonstraram que as giberelinas estavam presentes somente nas três primeiras fases principais do desenvolvimento do fruto. Entretanto, quando o fruto atingiu a maturidade fisiológica, os fitohormônios presentes eram somente a auxina e o etileno, notando que a giberelina endógena tinha desaparecido. Já na fase de desenvolvimento da semente, as citocininas e o ácido abscísico foram os mais importantes, tendo menor relevância a auxina e a giberelina. Assim, supõe-se que a giberelina endógena poderia contribuir para o aumento das auxinas, assim como já observado anteriormente por Henry et al. (1967), essa auxina seria responsável por ajudar a manter a juvenilidade do tecido (Gillaspy et al., 1993).

Algumas giberelinas ativas, atuam isoladamente, ou em conjunto com as auxinas, com um efeito retardador da senescência. As giberelinas mantêm firme a textura dos frutos, promovem alterações na cor, pelo retardo na degradação da clorofila e no acúmulo de carotenóides e antocianinas. O ácido giberélico é uma das formas ativas, de baixo custo e muito utilizado na agricultura. Um esquema parcial da via de síntese do ácido giberélico pode ser visto na figura 3.

Figura 3: Representação esquemática, parcial, da biossíntese do ácido giberélico
(Davies, 1995)

1.4 Efeito do ácido giberélico nos frutos

Frutas cítricas tratadas com GA_3 podem ser mantidas na árvore e a colheita adiada por várias semanas, pois tem a degradação da clorofila retardada. Isto faz com que tecidos jovens da casca ofereçam melhor proteção contra desordens fisiológicas e/ou patológicas, visando principalmente a proteção contra a mosca das frutas (Biale, 1978; Abdel - Gawad e Romani, 1974; Marur et al., 1999). A aplicação de produtos a base de ácido giberélico em citrus é uma prática comum e apresenta um efeito importante não somente por retardar a maturação, mas também por torná-la uniforme. Esses são fatores determinantes para a programação do escalonamento da colheita e obtenção de melhores preços do produto no mercado (Marur et al., 1999).

Foi demonstrado, tanto em experimentos com fatias quanto em frutos inteiros de morangos, que a aplicação exógena deste hormônio provocou um decréscimo significativo na taxa respiratória, atrasando a síntese de antocianinas e a degradação da clorofila, diminuindo a atividade das enzimas relacionadas, assim como a clorofilase, fenilalanina amonioliase (PAL) e as peroxidases (Martínez et al., 1996).

Os vitivinicultores do Rio Grande do Sul estão utilizando a aplicação de produtos à base de ácido giberélico e GA_1 com o objetivo de promover o alongamento e o aumento celular das bagas (Zabadal e Dittmer, 2000). Com isso, elas ficam mais espaçadas impedindo a formação de microclimas favoráveis aos fungos, além de promover maior firmeza dos frutos junto ao pedicelo, onde evita-se a queda precoce dos frutos (Peres e Morales, 1999).

O ácido giberélico parece ter papel especialmente importante como regulador das enzimas hidrolíticas (glicosidases, amilases e enzimas desramificadoras) (Varner e Ho *in*: Smith, 1977). Foi observado que o balanço entre os níveis de GA e ABA endógenos controla principalmente a expressão gênica das α -amilases de sementes em germinação e no caso da cevada, aumenta a transcrição dos genes e a atividade das α -amilases (Davies, 1997; Loreti, 1998).

A partir dos estudos de aumento da transcrição gênica de α -amilases em cereais, alguns autores propuseram uma via de transdução de sinal para giberelinas. É interessante notar que somente algumas células desenvolvem a capacidade de aumentar a expressão gênica, como foi o caso das células da camada de aleurona em cereais. Essa competência celular vai sendo adquirida ao longo do desenvolvimento, e parece não ser dependente dos hormônios (Fosket, 1994).

A via de transdução na camada de células de aleurona foi proposta por alguns autores, que assumem que o receptor, ainda não identificado, está localizado na membrana plasmática, e relatam que a proteína-G (heterotrimérica) é boa candidata a ser receptora do sinal. Os mensageiros secundários, assim como o cálcio, calmodulina, inositol trifosfato, diacilglicerol, GMPcíclico, ativam quinases dentro das células promovendo a fosforilação de proteínas e mudança favorável do pH citossólico. Os mensageiros são aptos para conduzir o sinal até o fim no citossol, para agir no núcleo e induzir o fator de transcrição do gene *GaMyb*, aumentando a síntese de RNAm de α -amilases (Gubler et al., 1995; Rogers e Rogers, 1999; Thornton et al., 1999). A cinética da expressão do gene *GAMyb* indica que ele é um fator que regula a expressão gênica da α -amilase sinalizada pela giberelina. Há uma hipótese de que este fator de transcrição seja uma parte do mecanismo de resposta à indução dessas enzimas (Gubler et al., 1995).

Uma redução na atividade das amilases e peroxidases, induzida por GA_3 , foi observada em manga. A aplicação pós-colheita do hormônio neste modelo, atrasou significativamente o amadurecimento, por retardar a degradação do ácido ascórbico e da clorofila da casca. Observou também, uma redução na atividade de α -amilases durante o armazenamento (Khader et al., 1988; Khader, 1992). O ácido giberélico foi responsável por inibir também o climatério respiratório em pêssegos (Abdel - Gawad and Romani, 1974) e tomates (Babbitt et al., 1973). Essas observações confirmam outras as quais sugerem que a sensibilidade do tecido ao etileno pode ser controlada por outras classes de fitohormônio,

bloqueando ou aumentando a síntese do etileno durante a abscisão, amadurecimento e senescência (Abeles et al., 1992)

Pouco se conhece sobre a influência dos hormônios no amadurecimento da banana. Vendrell (1970) trabalhando com fatias e frutos inteiros de banana, infiltrou diferentes concentrações de ácido giberélico, à vácuo, e observou que fatias tratadas tiveram a produção de etileno, conteúdo de sólidos solúveis, amolecimento da polpa e a presença de voláteis, normais. No entanto, observou que houve atraso na degradação da clorofila e no pico de respiração por cerca cinco dias, quando infiltrou 0,1 mM de ácido giberélico nos frutos inteiros. O autor, juntamente com outros (Henry et al., 1967), formularam a hipótese de que o ácido giberélico poderia agir no tecido da banana de duas maneiras: 1) no sistema hormonal, contribuindo no aumento da síntese de auxina e 2) possivelmente no sistema enzimático.

2. OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivo:

Estudar o possível envolvimento de giberelinas, em particular do ácido giberélico, no atraso do amadurecimento da banana, verificar a influência deste fitohormônio no metabolismo amido-sacarose e a atividade/expressão de algumas enzimas correlacionadas neste processo.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material

As bananas (*Musa acuminata* (AAA) Cv. Nanicão) utilizadas nos experimentos foram obtidas na Universidade Federal de Viçosa (MG) e no CEASA (SP). No primeiro caso, as bananas foram transportadas até o laboratório por ônibus, e estavam acondicionadas em caixa de papelão. Todas as bananas foram adquiridas com aproximadamente 110 dias pós antese (dpa), no ponto de colheita comercial. As bananas do CEASA, vindas do Vale do Ribeira (SP), foram transportadas em caixas de madeira por caminhão. As frutas utilizadas nos ensaios não foram submetidas à climatização com etileno.

3.2 Métodos

3.2.1 Infiltração do ácido giberélico em fatias de banana

As frutas foram lavadas e depois imersas em solução de hipoclorito de sódio (1%) durante três minutos, para diminuir a contaminação superficial. Em seguida foram secas com papel absorvente e cortadas na porção central com lâmina de aço inoxidável, em fatias de aproximadamente 6 mm de espessura e selecionadas por peso.

Todo material utilizado nas infiltrações foi autoclavado ou esterilizados com etanol 70 %. As infiltrações foram feitas em condições assépticas na capela de fluxo laminar, submergindo as fatias tratadas em solução de manitol 120 mM com 0,1 mM de ácido giberélico (Sigma), as fatias controle foram submersas em solução de manitol 120 mM. O manitol foi colocado para manter a osmolaridade da célula, com o objetivo de diminuir o estresse do tecido. As infiltrações foram controladas pelo aumento de peso, considerado satisfatório entre 6 a 10%.

O amadurecimento foi monitorado através da medida de respiração (CO_2) e de etileno nas fatias de banana, e também pela coloração da casca e aroma de fruta madura. Com base na curva de respiração, as amostras foram selecionadas e coletadas em intervalos de três dias até o pico climatérico, à partir do qual as coletas foram feitas todos os dias, até o completo amadurecimento das fatias controle. Fatias contaminadas com fungos foram descartadas. Em seguida, as amostras foram congeladas e pulverizadas em nitrogênio líquido e armazenadas em ultrafreezer -80°C até a utilização.

3.2.1.1 PRIMEIRO EXPERIMENTO:

No primeiro ensaio foram utilizadas bananas do CEASA (SP). As fatias feitas e infiltradas como descrito acima, foram acondicionadas em dessecadores (figura 5) e mantidas em fluxo ($3,0\text{l/h}$) de ar úmido (85-90% UR) livre de CO_2 , pela passagem em solução de KOH 20% em respirômetro (figura 4). O fundo dos dessecadores continha água suficiente para manter a umidade relativa do ar em torno de 90% e as fatias foram isoladas do contato direto com a água com esferas de vidro. As medidas de respiração foram realizadas em fatias separadas especialmente para este fim, e acondicionadas em triplicata de frascos (volume = 1 L), seguindo os mesmos procedimentos das fatias utilizadas para coleta. O amadurecimento foi monitorado pela medidas de CO_2 , cor da casca, aroma de banana madura e análise de amido. Este experimento teve por objetivo otimizar condições de trabalho para os dois ensaios definitivos.

3.2.1.2 *SEGUNDO EXPERIMENTO:*

Utilizou-se fatias de bananas, com aproximadamente 110 dpa, vindas da Universidade de Viçosa (MG). O amadurecimento foi monitorado com o auxílio de cromatografia gasosa, através das medidas de respiração e etileno. O ensaio foi montado como descrito para o primeiro experimento. Entretanto, o volume dos frascos de respiração foi otimizado para 500 ml, onde uma parte desse foi ocupado com esferas de vidro, ficando com um volume útil de 400 ml, utilizado nos cálculos. A umidade do ar foi mantida. O fluxo de ar foi reduzido a 1 l/h para induzir um pequeno acúmulo de etileno e promover o amadurecimento normal da fruta, pois observou-se nas fatias controle do primeiro experimento que elas demoraram muito para amadurecer, talvez o etileno basal não tenha sido suficiente para promover o amadurecimento normal da fruta. Os gases (CO₂ e o etileno) foram coletados diretamente dos frascos de respiração. As fatias para análise, neste segundo experimento, foram mantidas nos dessecadores, nas mesmas condições dos frascos de respiração.

3.2.1.3 *TERCEIRO EXPERIMENTO*

As condições experimentais utilizadas para esse ensaio foram exatamente as mesmas do segundo, com o objetivo de obter mais amostras para dar continuidade ao trabalho. As bananas foram adquiridas no CEASA com aproximadamente 110 dpa (ponto de colheita comercial).

Figura 4: Respirômetro

Figura 5: Dessecadores de coleta (lado direito) e frascos (vol=1L) de respiração (para coleta dos gases: CO_2 e etileno) (à esquerda)

3.2.2 ANÁLISE DE AMIDO

Os teores de amido foram determinados enzimaticamente pelo método descrito por Arêas e Lajolo (1981). O amido foi extraído com hidróxido de sódio 0,5N, precipitado com etanol 80%, hidrolisado com amiloglicosidase e a glicose liberada determinada pelo sistema glicose oxidase/peroxidase/ABTS, segundo método de Bergmeyer (1974).

3.2.3 DETERMINAÇÃO DE AÇÚCARES SOLÚVEIS

Os açúcares solúveis (glicose, frutose e sacarose) foram extraídos com etanol 80% a 80°C por três vezes, os sobrenadantes foram combinados, o etanol evaporado por sistema a vácuo a baixas temperaturas (speed vac) e o volume reconstituído com água.

Os açúcares foram estimados por HPLC por cromatografia de troca iônica utilizando um cromatógrafo da DIONEX modelo DX500 acoplado com detector amperométrico de pulso, modelo ED40. A coluna utilizada foi a CARBOPAC PA 1 (4x250 mm). A fase móvel foi constituída 100% de NaOH 18 mM em fluxo de 1,0 ml/min.

3.2.4 PREPARO DOS EXTRATOS ENZIMÁTICOS

Os extratos enzimáticos, para doseamento das atividades da SS e SPS, foram feitos seguindo metodologia otimizada por Cordenunsi (1989), onde cerca de 0,5g de polpa de banana foi homogeneizada em 2,0 ml de meio extrator, em homogeneizador Brinkman (tipo Turrax), por cerca de 30 segundos em velocidade média. Os homogenatos foram centrifugados a 7650xg por 5 minutos e os sobrenadantes dessalinizados em mini-colunas de Sephadex (Pharmacia). A

solução extratora era composta de tampão Tris-HCl 100mM (pH 8,0) contendo EDTA 20mM; cisteína 20mM; PVP (40000) 1% e benzamidina 1mM.

A extração das amilases foi realizada de acordo com Garcia (1988), onde cerca de 0,5g de amostra congelada de banana foi homogeneizada em 1,25 ml de solução extratora, no Turrax por 30 segundos em velocidade média. Os homogenatos foram centrifugados a 12000 x g durante 30 minutos e as atividades foram medidas no sobrenadante. O meio extrator era composto por tampão Tris-HCl 100 mM (pH 7,0) contendo cisteína 20 mM, benzamidina 1mM e PVP (40000) 1%. O tampão Tris-HCl foi utilizado também por inibir as glicosidases, evitando assim, a interferência dessas enzimas sobre a atividade amilásica. A extração da β -amilase foi realizada sob as mesmas condições, sendo que o tampão foi trocado por Hepes-KOH 50 mM (pH 7,0), devido ao método específico para a atividade que age sobre as enzimas α -glicosidases, o extrato foi centrifugado a 8000 rpm e atividade medida no sobrenadante, no extrato bruto.

As fosforilases foram extraídas segundo o método descrito por Arêas e Lajolo (1981), onde cerca de 0,5 g de banana foi homogeneizada em 3,0 ml de solução extratora, em Turrax, por cerca de 30 segundos em velocidade média e posteriormente centrifugado a 8000 rpm durante 50 minutos. A atividade das fosforilases foi medida no sobrenadante. O meio extrator era composto por um tampão Hepes-KOH 50 mM (pH 7,5) contendo EDTA 20 mM, cisteína 20 mM, PVP (40000) 1%.

3.2.5 ATIVIDADE DA SACAROSE-FOSFATO SINTASE (EC 2.4 1.14) E SACAROSE SINTASE (EC 2.4.1.13)

A atividade da SPS foi medida no sentido de síntese de sacarose. O meio de atividade foi composto de 25 μ l do extrato e tampão Hepes-KOH 176 mM (pH 7,5), contendo NaF 33 mM, frutose-6-P 50 mM, glicose-6-P 150 mM, UDPG 100 mM, $MgCl_2$ 500 mM, num volume final de 50 μ l. O meio de atividade foi incubado a 30°C. A reação foi interrompida com a adição de 200 μ l de NaOH 0,1 M e fervura

por 10 minutos. A sacarose formada foi determinada pelo método do ácido tiobarbitúrico (Percheron, 1962).

A atividade da SS foi determinada no sentido de hidrólise da sacarose, onde 25 μ l do extrato enzimático foi incubado em meio composto por tampão Tris-HCl 330 mM (pH 7,6) contendo NaF 33mM, frutose 100 mM, UDPG 50mM e $MgCl_2$ 500mM num volume final de 50 μ l. O meio de atividade foi incubado a 30°C. A reação foi interrompida com a adição de 200 μ l de NaOH 0,1 M e fervura por 10 minutos. A sacarose formada foi determinada pelo método do ácido tiobarbitúrico (Percheron, 1962).

3.2.7 ATIVIDADE AMILÁSICA TOTAL

A atividade das amilases foi medida de acordo com o método de Caraway (1959), o qual mede a atividade hidrolítica total. Foi utilizada uma solução de amido 0,01N como substrato. O meio de atividade continha 100 μ l de extrato enzimático e 1 ml de amido em água. Após a incubação da amostra /substrato a 37°C por 30 minutos a reação foi interrompida com 1 ml da solução de iodo 0,01N em meio fortemente ácido (HCl), 4 ml de água foi adicionado na solução para possibilitar a leitura. A atividade amilásica foi estimada através da cor formada pela solução de iodeto e o amido remanescente a 660 nm. Uma unidade (1U) de atividade amilásica foi arbitrariamente definida como a quantidade de enzima necessária para hidrolisar 1 mg de amido em 15 minutos à 37°C em 1 ml de amostra.

3.2.8 ATIVIDADE DAS α -AMILASES (1,4 α -D-GLICANO GLICANOHIDROLASE, EC 3.2.1.1)

A atividade α -amilásica foi medida de acordo com o método de Hagenimana et al., (1992) específico para α -amilase, utilizando como substrato amilose azure (Sigma) (36 mg amilose-azure / ml) em tampão Tris-HCl 0,02 M (pH 7,0), na proporção de 1:1 do extrato enzimático/substrato a 37°C por 1 hora.

A reação foi interrompida com 160 μ l de ácido acético 18% (v/v) e as amostras centrifugadas a 8000 x g durante 15 minutos. O sobrenadante foi lido à 595 nm. Uma unidade (1U) de atividade α -amilásica foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 μ g de corante solúvel (remazol brilliant blue - RBB), por grama de polpa de banana em 1 minuto de reação nas condições descritas, com base na curva padrão de RBB (Sigma).

3.2.9 ATIVIDADE DA β -AMILASE

A atividade da β -amilase foi medida segundo McCleary e Codd (1989), utilizando um substrato específico, o p-nitrofenil-maltopentaosídeo (PNPG5, 5 mM). A reação ocorre na presença da enzima α -glicosidase, a qual libera o composto p-nitrofenol que desenvolve uma coloração amarela em pH elevado. Foi utilizado o Betamyl (Megazyme), que contém uma mistura de α -glicosidase (1000 U/vial) e PNPG5 (47,5 mg/vial). A reação foi realizada em meio contendo 50 μ l do extrato bruto e 50 μ l do substrato (α -glicosidase 20 U + PNPG5 5 mM), à 30°C por 20 minutos. A reação foi interrompida com 750 μ l Trizma-base 1% (pH > 10). A leitura, de acordo com a metodologia, foi feita a 410 nm. Uma unidade (1U) de atividade β -amilásica foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 μ mol de p-nitrofenol por minuto. Os cálculos foram feitos com base na curva padrão do corante p-nitrofenol.

3.2.10 ATIVIDADE DAS FOSFORILASES (α -1,4-D-GLUCANA: ORTHOFOSFATO α -GLICOSIL TRANSFERASE, EC 2.4.1.1.):

A atividade pode ser medida no sentido de síntese (liberação de fosfato) ou da degradação do amido (liberação de glicose-1-P), como descrito por Arêas e Lajolo (1981). Dados experimentais em nosso laboratório mostraram que não existem diferenças significativas no perfil de atividade entre síntese e degradação

do amido pelas fosforilases. Neste trabalho a atividade das fosforilases foi medida no sentido de síntese de amido, por ser um método colorimétrico, rápido e mais barato quando comparado ao enzimático, segundo Lowry e Lopez (1946). A reação foi realizada em um meio contendo 300 µl de tampão Mes-NaOH 50 mM pH 6,0, 50 µl de NaF 50 mM, 50 µl de uma solução de amido (dissolvido no mesmo tampão de reação) e 50 µl de extrato bruto, num volume final de 450 µl. As amostras foram incubadas à 30°C durante 10 minutos, juntamente com glicose 1-fosfato 150 mM. A reação foi interrompida com uma solução gelada de ácido tricloroacético (TCA) a 5% precipitando as proteínas. Em seguida adicionou-se 4 volumes de acetato de sódio 0,1 M para elevar o pH para 4,0.

O fosfato formado foi determinado pela ação de um agente redutor para o fósforo, ou seja, 0,1 volume (500 µl) de ácido ascórbico (1%), seguido da adição de 0,1 volume (500 µl) de molibdato de amônio (1%), as amostras foram novamente incubadas à 37 °C durante 15 minutos. O fosfomolibdato formado foi determinado por espectrofotometria a 700 nm, sendo que 1U de atividade enzimática corresponde a 1µ mol de PO_4^{3-} liberado por minuto.

3.2.11 QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS

A determinação de proteínas foi realizada em extrato bruto segundo método de Bradford (1976), para obtenção da atividade específica das enzimas em estudo. A proteína soro albumina bovina (BSA) foi usada como padrão. No caso específico de quantificação de proteínas para as eletroforeses foi utilizado o método de Lowry et al., (1951).

3.2.12 MEDIDAS DE CO₂ E ETILENO

O CO₂ e o etileno foram medidos por cromatografia gasosa acoplado com detector de ionização de chama para etileno (FID) e detector de condutividade térmica para CO₂ (TCD). A coluna utilizada para medida dos gases foi a HP-PLOT a qual apresenta um comprimento de 30 m, espessura do filme: 40.0 µm, e diâmetro interno de 0.53 mm. A injeção dos gases foi manual e realizada com uma seringa GAS *Tigth*, própria para injeção de gases. As amostras foram retiradas de frascos fechados com septo, onde os mesmos ficaram no fluxo do respirômetro durante uma hora, até que todo ar fosse substituído pelos gases liberados das fatias dos frascos, que continham em média, 60 g de banana. O gás de arraste utilizado para ambas análises foi o hélio.

3.2.12.1 Condições cromatográficas para o CO₂:

Temperatura isotérmica (forno): 30°C

Temperatura do injetor e do detector: 250°C

Fluxo: 4 ml/min

Modo de injeção: *split*, Taxa de *split*: 50:1

Volume de injeção: 1 ml

3.2.12.2 Condições cromatográficas para o etileno:

Temperatura isotérmica (forno): 30°C

Temperatura do injetor: 200°C, detector: 250°C

Fluxo: 1 ml/min

Modo de injeção: *pulsed split*, Taxa: 12,5:1

Volume de injeção: 5 ml

3.2.12.3 Cálculos de CO₂ e etileno

As medidas de CO₂ e etileno foram calculadas com base no volume livre do frasco, levando em consideração a massa de banana contida nos frascos de respiração e o fluxo de ar, as quais são dadas em mg de CO₂.Kg⁻¹ PF. h⁻¹ e µl de etileno. Kg⁻¹ PF.h⁻¹, respectivamente.

3.2.13 EXTRAÇÃO DE PROTEÍNA TOTAL PARA WESTERN BLOT

Cerca de 0,5g de banana foi homogeneizada em 2,5 ml de meio extrator, composto por tampão Tris-HCl 0,25 M (pH 8,4), glicina 0,2 M, SDS 0,4% (p/v) e β-mercaptoetanol 10% (v/v), segundo Laemmli (1970). O homogenato foi centrifugado a 12000 x g por 20 min.

As proteínas do sobrenadante foram precipitadas com TCA 12% e incubadas em banho com gelo durante a noite toda. O extrato foi novamente centrifugado a 12000 x g por 20 min e o sobrenadante descartado. O precipitado foi submetido à lavagens sucessivas em mistura gelada de etanol- éter etílico-clorofórmio (2:2:1); em seguida com acetona e finalmente com éter etílico.

Após evaporação do éter, as proteínas foram ressuspensas em tampão Laemmli (1970) e submetidas à fervura por pelo menos 10 minutos.

3.2.14 ELETROFORESE DE PROTEÍNA EM GEL DE POLIACRILAMIDA

As eletroforeses foram realizadas em géis de poliacrilamida (7,5%) sob condições dissociantes (SDS-PAGE) segundo Laemmli (1970), em tampão tris 25 mM glicina 192 mM (pH 8,3), contendo SDS 0,1%. O perfil de proteínas foi revelado por coloração com Comassie Blue-R em dois géis, um deles contendo amostras controle e outro amostras tratada, utilizado-se 20 µg de proteína em cada gel.

3.2.15 WESTERN BLOT

Quatro géis feitos nas condições do item 3.2.14, foram utilizados para Western blot. Sendo que dois foram usados para fosforilases, constituindo um de amostras controle e outro com amostras tratadas, com 5 µg de proteína em cada um dos géis. Outros dois foram utilizados para SPS (controle e tratado) contendo 10 µg de proteína.

Os géis foram pressionados sobre membrana de nitrocelulose em tampão 25 mM tris 192 mM glicina (pH 8,3). A voltagem foi fixada em 30 V e a transferência foi conduzida durante toda noite a 4°C. As membranas foram coradas para proteína com Ponceau-S 0,2 %/ TCA 3%, para verificar se as proteínas tinham sido transferidas e marcar os padrões.

As membranas foram bloqueadas por incubação durante uma hora em solução tampão TBS que é constituído por Tris-HCl 50 mM (pH 7,5) e NaCl 150 mM, adicionado de leite desnatado (5%). Em seguida, as membranas foram novamente incubadas com anti-soro de coelho contra SPS (Nascimento, 1997) e o anti-soro de coelho contra fosforilase (Mota, 2001) nas diluições 1:1000 e 1:500, respectivamente. Estas membranas foram mantidas em agitação por duas horas à temperatura ambiente e posteriormente lavadas por três vezes no tampão TBS. Após a lavagem, as membranas foram incubadas com o anticorpo conjugado (horseradish peroxidase) no meio contendo TBS e leite desnatado 5%, na diluição 1:3000. Após nova série de lavagens as membranas foram reveladas segundo o método descrito para peroxidase em Sambrook, et al.(1989).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Perfis de Respiração e de Etileno durante o amadurecimento da banana

As medidas de respiração (CO_2) e de etileno foram feitas em dois experimentos independentes, cujos resultados estão apresentados nas figuras 6 e 7. O terceiro experimento confirmou os resultados obtidos no segundo onde pode-se verificar que não houve diferenças entre os perfis das amostras tratadas com GA_3 e o controle, tanto em relação à respiração quanto ao etileno. Estes resultados foram diferentes dos obtidos por Vendrell (1970) que observou um atraso no pico respiratório quando infiltrou GA_3 (0,1 mM) em bananas inteiras. Entretanto, as metodologias de infiltração podem explicar a diferença encontrada: Vendrell (1970) utilizou a infiltração de fatias e bananas inteiras pelo sistema à vácuo (66 cm de Hg/minuto), mas verificou um aumento na produção de etileno nas primeiras 24h após a infiltração, demonstrando que a infiltração à vácuo causou um estresse muito maior no tecido do que o sistema por imersão utilizado neste trabalho. Os resultados apresentados na figura 7 deixam claro que não houve aumento significativo do etileno em consequência do corte e infiltração, o que depõe à favor do método de infiltração por imersão.

Em outros sistemas modelo, como a suspensão de células em frutos de pêra, por exemplo, foi observada uma redução de 33% no nível de etileno basal no meio de cultura, nas que foram tratadas com GA_3 (1mM), após 3h de incubação a 25°C (Bem-Arie e Ferguson, 1991). Esse resultado deixa alguma evidência de que a própria giberelina endógena poderia ser a sinalizadora no atraso do amadurecimento da fruta e não o efeito causado pela inibição do etileno, ou pico de respiração.

Figura 6: Curvas de respiração (mg de CO₂.Kg⁻¹PF.h⁻¹) em fatias de banana, tratadas com GA₃ (0,1 mM+120 mM manitol) comparadas ao controle (manitol 120 mM)

Figura 7: Perfís de etileno (μl de etileno. $\text{Kg}^{-1}\text{PF.h}^{-1}$) em fatias de banana, tratadas com GA_3 (0,1mM+120mM manitol) e controle (manitol 120 mM). Média de triplicata de extração $\pm$ desvio padrão

4.2 Perfis de amido e açúcares solúveis durante o amadurecimento da banana

O atraso no amadurecimento foi visível pela ausência do aroma de banana madura e pela cor da casca que foi mantida verde por mais tempo nas amostras tratadas em relação ao controle. O retardo na degradação da clorofila, causado pelo tratamento com ácido giberélico, também foi observado em frutas cítricas (Biale, 1978; Abdel-Gawad & Romani, 1974), em manga (Khader, 1992), em morangos (Martínez e col., 1996) e salsa (Lers et al., 1998).

Os resultados mostrados nas figuras 8 e 9, indicam que as amostras tratadas com a giberelina A₃ tiveram um atraso de pelo menos três dias no início da degradação do amido e no acúmulo de açúcares solúveis e, por consequência, no processo de amadurecimento da banana. Porém, uma vez iniciada, a degradação do amido/acúmulo de açúcares transcorreu normalmente como nas fatias controle. Este é um resultado inédito, já que não existem relatos na literatura relacionando ácido giberélico e degradação de amido.

Khader, (1991) demonstrou que altas concentrações de ácido giberélico diminuem o conteúdo de sólidos solúveis totais em manga. Porém, em frutos como o mirtilo, onde o ácido giberélico é responsável pela indução da parternocarpia, o acúmulo de hexoses não foi influenciado e o desenvolvimento do fruto foi atrasado quando comparado a frutos polinizados (Medrano et al., 1997). Em nectarina, o amadurecimento foi atrasado com a aplicação de ácido giberélico, em relação à coloração da casca e manutenção da textura, mas o conteúdo de sólidos solúveis foi mantido, os frutos, portanto apresentaram melhor qualidade pós-colheita, aumentando também o tempo de armazenamento por evitar desordens fisiológicas e/ou patológicas (Zilkah et al., 1997). Em tangerinas o teor de sólidos solúveis também não foram afetados, e a qualidade do produto foi também melhorada (Marur et al., 1999). Diferentemente de alguns dados encontrados na literatura, foi observado neste trabalho que o ácido giberélico atrasou o acúmulo de açúcares, entretanto no estágio amadurecido da fruta chegou a teores normais. O atraso na degradação do amido e do acúmulo de

sacarose, observado nas amostras tratadas, sugere que a atividade das enzimas que degradam o amido (amilases e fosforilases) e/ou as enzimas que sintetizam sacarose (SPS e SS) podem ter sido afetadas pelo ácido giberélico. Por isso foram medidas as atividades destas enzimas.

Figura 8: Perfil de amido em fatias de banana tratadas com giberelina A_3 (0,1 mM de GA_3 + manitol 120 mM) e controle (manitol 120 mM). Média de triplicata de extração $\pm$ desvio padrão.

Figura 9: Teor de glicose, frutose e sacarose em fatias de banana controle e tratadas, medidas por HPLC. Média de triplicata de extração $\pm$ desvio padrão.

4.3 Atividade Hidrolítica total

Não se sabe ainda se as enzimas iniciadoras da degradação do amido da banana são as fosforilases ou as amilases. De acordo com a literatura, α -amilases, β -amilase, as fosforilases, α -1,4 glicosidase e enzimas desramificadoras, como as isoamilases, participam da degradação do amido (Arêas e Lajolo, 1981; Garcia e Lajolo, 1988). Entretanto, acredita-se que apenas as α -amilases conseguem iniciar a degradação dos grânulos de amido intactos (Halmer, 1985; Oates e Powell, 1996), e as demais enzimas complementarizam a sua atividade (Cardemil e Varner, 1984). Sabe-se também que todas estas enzimas estão presentes e tem atividade na banana por ocasião do amadurecimento (Garcia e Lajolo, 1988).

Como pode ser visto na figura 10, não foram observadas diferenças a nível significativo na atividade hidrolítica total entre as amostras controle e tratadas. O perfil de atividade das amostras controle foi o normalmente encontrado em bananas inteiras, com um pequeno pico de atividade no 10º e 17º dias e uma ligeira queda de atividade um pouco antes do início da degradação do amido. O hormônio parece não ter afetado (significativamente) o comportamento normal das enzimas consideradas hidrolíticas. Também não se sabe se os níveis basais de atividade destas enzimas seriam suficientes para degradar o amido, ou se um aumento de atividade/expressão seria necessário para a degradação ocorrer.

A literatura mostra que a atividade amilásica em frutos de abacate foi mais elevada em frutos jovens que maduros. Após a colheita observou-se um aumento na atividade amilásica junto do pico climatérico, com redução paralela no conteúdo de amido da polpa, sugerindo que este perfil está diretamente correlacionado aos processos de amadurecimento, tais como o aumento na respiração, aumento no teor de etileno e aumento do amolecimento (Pesis et al., 1978). A hidrólise do amido durante o amadurecimento de frutos por enzimas hidrolíticas tem sido estudada também em pêras (Pech e Latchke, 1972); mangas (Mattoo e Modi,

1969) abacates (Pesis et al., 1978) tomates (Davis e Cocking, 1967), mamões (Pal e Selvaraj, 1987).

Figura 10: Perfis de atividade hidrolítica total(amilases totais: α e β -amilases, glicosidases e desramificadoras) em fatias de banana relativa ao 3º experimento. Média de triplicata de extração $\pm$ desvio padrão

4.4. Atividade de α -amilase

Os dados ilustrados na figura 11 mostram que não existe um aumento expressivo de atividade da α -amilase associado à degradação do amido e acúmulo de açúcares solúveis, tanto nas amostras controle como nas tratadas. Resultado diferente do encontrado no tomate (Davies e Cocking, 1965) e no kiwi (Wergzyn e Macrae, 1995) onde foi observado um aumento de atividade dessa enzima, associado ao período de rápida hidrólise do amido.

Apesar de terem perfis muito semelhantes, as amostras tratadas com a giberelina A₃ tiveram uma atividade inicial cerca de 2,5 vezes mais baixa que as amostras controle (1U), e o máximo de atividade foi 1,5 U. As amostras controle tiveram sempre, no mínimo, o dobro da atividade α -amilásica que as amostras tratadas com ácido giberélico. Esta diferença poderia, em parte, explicar o retardo no início da degradação do amido nas fatias tratadas com ácido giberélico e que por diferenças de métodos para atividade, não reflete na atividade hidrolítica total (amilases, glicosidases e desramificadoras) como mostrado no parágrafo anterior.

Khader (1992), observou resultados semelhantes em manga, o que demonstra que os frutos podem ter comportamento bem diferentes, em relação à α -amilase, quando comparadas aos cereais, por exemplo, onde a literatura fartamente demonstra que o ácido giberélico causa o aumento da expressão gênica das isoformas de α -amilase (Davies, 1997; Perata et al., 1997; Loreti, 1998; Rogers e Rogers, 1999). Foi observado em células de arroz, que além do ácido giberélico, também a concentração de açúcar pode regular a síntese da proteína e a indução pós-traducional de α -amilase, através do controle dos canais de cálcio (Mitsui et al., 1999).

Figura11: Perfil de atividade α -amilásica específica em fatias de bananas, relativa ao 3º experimento. Média de triplicata de extração $\pm$ desvio padrão.

4.5 Perfil de atividade de β -amilase

Através dos dados da figura 12 pode-se observar que o tratamento com giberelina A₃ causou um atraso significativo no aumento da atividade da β -amilase em relação à fatias controle, a partir do 18º dia. Este atraso de pelo menos três dias coincide com o atraso na degradação de amido nas amostras tratadas. Embora a β -amilase não seja fundamental na hidrólise do amido é significativo que ela tenha sido afetada pelo tratamento com ácido giberélico juntamente com a α -amilase. Os resultados aqui encontrados são diferentes dos encontrados para cereais como o arroz, onde foi observado que a aplicação de ácido giberélico não aumenta a atividade da β -amilase dos grãos em germinação, porém pode reverter a atividade da enzima, quando a mesma é inibida pelo ácido abscísico (Wang et al., 1996). Os dados observados na figura 12 são similares aos encontrados por Purgatto et al. (2001), que infiltrou AIA em fatias de banana.

A β -amilase, está presente e parece ter um papel importante na mobilização do amido durante o processo de germinação e na produção do malte em alguns cereais, assim como sorgo (Uriyo e Eigel, 1999) e cevada (Kihara et al., 2000). Entretanto, estudos com *Vigna unguiculata*, demonstraram que esta enzima não estava presente na fase de germinação, e que a α -amilase foi a enzima responsável por esse processo (Uriyo, 2001). Em figos, que contém uma quantidade baixa de amido, a β -amilase, junto da α -amilase, também parece ter um papel importante no metabolismo de carboidratos, sendo encontrado um pico de atividade 10 dias antes da maturação quando a fruta se encontrava ligada à planta (Yoshioka, 1995).

Figura12: Perfil de atividade β-amilásica específica em fatias de bananas, relativa ao 2º experimento. Média de triplicata de extração ± desvio padrão.

4.6 Perfis de Atividade das Fosforilases

A enzima amido fosforilase (EC 2.4.1.1., α -1,4-D-glucana: orthofosfato α -glicosil transferase) catalisa a conversão reversível do amido em G-1P na presença de ortofosfato, hidrolisando a ligação α -1,4 terminal. Ela está amplamente distribuída nos vegetais como forma única ou múltipla (Nighojkar e Kumar, 1997). Foram encontrados altos teores de atividade da fosforilase em frutos de kiwi, indicando significativa atividade da enzima durante o desenvolvimento e amadurecimento do fruto. Um nível relativamente constante de atividade amilolítica e fosforolítica foi observado durante o período em que o conteúdo de amido aumentava, diminuindo significativamente depois, (Wegrzyn e Macrae, 1995).

Já foi observado que em banana a atividade das fosforilases tem um discreto aumento antes do início da hidrólise do amido, decrescendo durante o climatério e aumentando novamente durante a senescência (Arêas e Lajolo, 1981, Mota, 2001). Apesar de serem variações discretas, os perfis são confiáveis à medida que se repetiram várias vezes. Outros estudos com banana realizados por Goswami e Borthakur (1996) também mostraram um aumento da atividade fosforolítica na direção de síntese do amido.

Os dados obtidos no presente trabalho mostrados nas figuras 13.a e 13.b, mostram que os perfis de atividade das fosforilases das amostras controle e tratadas não se diferenciaram e foram semelhantes ao normalmente já observado por Arêas e Lajolo (1981), Mota (2001). Os dados obtidos com o terceiro experimento confirmaram os resultados do segundo. Estes resultados são reforçados por Western blot contra anticorpo anti-fosforilase de banana (Mota, 2001), ilustrados nas figuras 14 e 15 onde pode-se verificar que realmente não parece existir diferenças entre amostras controle e tratadas em relação à expressão de proteína.

Os resultados os quais demonstram que as amilases parecem ser afetadas pelo ácido giberélico e as fosforilases não, reforçam a idéia de que são as amilases e não as fosforilases que iniciam a degradação do amido na banana.

Fig.13.a: Atividade fosforolítica em fatias de banana, relativa ao 2^o experimento, em relação à curva de amido. Média de três extrações $\pm$ desvio padrão

Fig.13.b: Atividade fosforolítica em fatias de banana, relativa ao 3º experimento, em relação à curva de amido. Média de três extrações $\pm$ desvio padrão.

Figura 14: Western blot revelado com antisoro anti-Fosforilase em fatias de banana controle (120 mM manitol) durante o amadurecimento.

Figura 15: Western blot revelado com antisoro anti-Fosforilase em fatias de banana tratada (0,1 mM GA₃ + 120 mM manitol) durante o amadurecimento.

4.7 Perfil de atividade da Sacarose fosfato sintase

O perfil de atividade da SPS nas amostras controle foi semelhante ao encontrado por Cordenunsi (1989) e Nascimento et al (1997), onde há uma correlação entre o aumento de atividade da enzima com o aumento no teor de sacarose. Porém, a atividade da SPS das amostras tratadas com GA₃ parece ter sido afetada pelo hormônio, uma vez que teve uma diminuição na atividade, cerca de duas vezes menor no 20º e 21º dia após a infiltração. Através dos dados obtidos por Western blot (figuras 17 e 18) foi possível observar uma quantidade menor de proteína relativa ao 21º dia nas amostras tratadas, coincidindo com a menor atividade observada no período analisado. Mas, em função dos géis corado para proteína (figuras 19 e 20), não foi possível descartar que tenha sido aplicada uma quantidade menor de proteína neste ponto.

Nascimento et al. (1997) observaram que existe um aumento de expressão da SPS ao longo do amadurecimento que começa antes da colheita e se estende por todo o processo de amadurecimento da banana, concomitante ao aumento de atividade e ao acúmulo de sacarose. Pelos resultados do Western blot (figuras 19 e 20), contra os anticorpos de SPS (Nascimento et al., 1997), não foi possível verificar um aumento na expressão da SPS com o amadurecimento, em função de que o período analisado foi a partir da queda do amido, neste período não há um aumento de expressão da enzima significativo.

Não existem muitos registros relacionando níveis de ácido giberélico e atividade da SPS, mas Cheikh et al., (1992) identificaram um possível sinal na regulação de atividade da SPS pelo ácido giberélico, o qual estaria agindo indiretamente, modificando os níveis de glicose-6-P e Pi, considerados reguladores alostéricos da enzima.

Figura 16: Atividade da sacarose fosfato sintase, relativa ao 2º experimento, em bananas tratadas com ácido giberélico comparadas à fatias controle e ao perfil de sacarose. Média de triplicata de extração $\pm$ desvio padrão

dias após infiltração

Figura 17: 'Western blot revelado com antisoro anti-SPS em fatias de banana controle (120 mM manitol) durante o amadurecimento

dias após infiltração

Foto 18: 'Western blot revelado com anti soro anti-SPS em fatias de banana tratadas (0,1 mM GA₃ + 120 mM manitol) durante o amadurecimento

Figura 19: Eletroforese em gel dissociante (SDS-PAGE) em fatias de banana controle (120 mM manitol). Padrões de peso molecular: anidrase carbônica (29 kD), ovoalbumina (45 kD), soroalbumina bovina (66 kD), fosforilase (97,4 kD), b-galactosidase (116 kD) e miosina (205 kD).

Figura 20: Eletroforese em gel dissociante (SDS-PAGE) em fatias de banana tratadas (0,1 mM ácido giberélico + 120mM de manitol). Padrões de peso molecular: anidrase carbônica (29 kD), ovoalbumina (45 kD), soroalbumina bovina (66 kD), fosforilase (97.4 kD), b-galactosidase (116 kD) e miosina (205 kD)

4.8 Perfil de atividade da enzima SS

A sacarose sintase (SS) atua reversivelmente na síntese e hidrólise da sacarose (Geigenberger e Stitt, 1993). Na banana ela tem alta atividade no período de formação do fruto, que praticamente desaparece durante o amadurecimento, período de síntese e acúmulo da sacarose. Parece, portanto mais ligada à hidrólise da sacarose no período de formação do fruto, para formação de parede celular e amido (Cordenunsi e Lajolo, 1995). Neste trabalho foi medida a atividade da SS para ver se o ácido giberélico poderia deter esta perda de atividade. Os resultados mostraram que os perfis de atividade (figura 15) foram muito semelhantes em fatias tratadas com giberelina A₃ e controle. Entretanto, à semelhança da SPS, foi observada uma atividade inicial relativamente maior no caso das fatias tratadas. Assim como descrito por Cordenunsi e Lajolo (1995) o ácido giberélico poderia estar agindo como um dos inibidores do amadurecimento, por manter a atividade da SS elevada; também à semelhança da SPS, esta atividade se iguala ao redor do 10º dia após a infiltração e aumenta no 20º dia. Esses resultados podem ser comparados aos resultados obtidos com mirtilo, onde os autores observaram um aumento de atividade da SS na fase de amadurecimento (aos 85 dias após a antese) (Medrano et al., 1997).

Figura 21: Atividade da sacarose sintase em bananas tratadas com ácido giberélico comparadas à fatias controle e ao perfil de sacarose. Média de triplicata de extração $\pm$ desvio padrão

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O modelo de estudo em fatias se mostrou adequado, pois a atividade respiratória, a produção de etileno, e os perfis de carboidratos: amido e açúcares, foram semelhantes aos perfis já obtidos com a banana inteira. Através das análises de respiração e etileno, observou-se que a infiltração na ausência de vácuo não parece ter causado um estresse relevante no tecido.

Foi observado que o ácido giberélico não afetou o climatério respiratório e não interferiu na produção de etileno.

Através de três experimentos independentes é possível afirmar que o ácido giberélico provoca um retardo no amadurecimento, observados pelo atraso de dois a três dias na degradação do amido e no acúmulo de açúcares solúveis.

A atividade de algumas das enzimas que degradam o amido e sintetizam a sacarose parecem ter sido afetadas pelo ácido giberélico. A atividade da α -amilase foi cerca de duas vezes menor em fatias tratadas com GA₃ quando comparadas às do controle e a β -amilase apresentou um atraso de pelo menos três dias em amostras tratadas. Esta diminuição poderia, em parte, explicar o atraso na degradação do amido. Tanto a atividade como a expressão das fosforilases no tratamento, não parecem ter sido afetadas de modo significativo. A atividade da SPS foi cerca de duas vezes menor no 20° e 21° dpi em fatias tratadas, porém não foi verificado uma diminuição na expressão da proteína desta enzima.

6. CONCLUSÕES

- O amadurecimento das fatias de bananas infiltradas com ácido giberélico, foi retardado por pelo menos três dias em relação à degradação do amido e acúmulo de açúcares solúveis na polpa;
- As α e β amilases foram afetadas pelo tratamento com o ácido giberélico mas a atividade hidrolítica total e as fosforilases não;
- A atividade da sacarose-fosfato-sintase foi menor no 20 e 21º dia em fatias tratadas, mas não houve mudança na expressão da sua proteína. A sacarose sintetase manteve-se alta por um curto período em fatias tratadas, mas não foram observadas diferenças entre os perfís.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABELES, F. B; MORGAN, P. W.; SALTVEIT, M. E. **Ethylene in plant biology**. London: Academic Press, 2^a ed., 414p., 1992.

ADAMS, D.O., YANG, S.F. Ethylene biosynthesis: identification of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid as an intermediate in the conversion of methionine to ethylene. **Proc. Natl. Acad. Sci., USA**, v.76, p.170-4, 1979.

ARÊAS, J. A. G., LAJOLO, F. M. Starch transformation during banana ripening: I- The phosphorylase and phosphatase behavior in *Musa acuminata*. **J. Food Biochem.**, Wesport, v.5, p.19-37, 1981.

AP REES, T. Integration of pathways of synthesis and degradation of hexose phosphates. In: **The biochemistry of Plants**. New York: Academic Press, v.3, p.1-42, 1980.

BALL, K. L; GREEN, J.H.; Ap Rees, T. Glycolysis at the climateric in bananas. **Eur. J. Biochem.**, Berlin, v.177, p.637-641, 1991.

BASSINELLO, P. Z.; FIORAVANTE, A. P.; CORDENUNSI, B. R.; LAJOLO; F. M.; NASCIMENTO, J.R.O. Distribuição da sacarose-fosfato-sintase e sacarose sintase em bananas durante o amadurecimento. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v.19, n.1, p.102-106, 1999.

BEN-ARIE, R.; ROISMAN, YA'LA, ZUTHI, Y. and BLUMENFELD, Agricultural Research Organization, The Volcani Center, Bet Dagan, Israel. Gibberellic acid reduces sensitivity of persimmon fruits to ethylene. In: **Biochemical and Physiological Aspects of Ethylene Production in Lower and Higher Plants**. Boston: Kluwer Academic Publishers, p.165-171, 354p., 1989.

BEN-ARIE, R. & FERGUSON, B. Ian. Ethylene production by growing and senescing pear fruit cell suspensions in response to gibberellin. **Plant Physiol.**, Rockville, v.95, p. 943-947, 1991.

BERGMEYER, H. U. **Methods of enzymatic analysis**, New York: Academic Press, 2ed., v.3, p.1212-1215, 1974.

BIONDI, S., DIAZ, T., IGLESIAS, I., GAMBERINI, G., BAGNI, N. Polyamines and ethylene in relation to adventitious root formation in *Prunus avium* shoot cultures. **Physiol. Plant.**, Kobenhavn, v.78, p.474-83, 1990.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, Baltimore, v.72, p.248-54, 1976.

BRUNEU, J. M.; WORRELL, A. C., CAMBON, B.; LANDO, D.; VOELKER, T. A. Sucrose phosphate synthase, a key enzyme for sucrose biosynthesis in plants. **Plant Physiol.**, Kobenhavn, v.96, p.473-478, 1991.

BUCHNER, P. BORISJUK, L., WOBUS, U. Glucan phosphorylases in *Vicia faba* L.: cloning, structural analysis and expression patterns of cytosolic and plastidic forms in relation to starch. **Planta**, Berlin, v.199, p.64-73, 1996.

CARAWAY, W. T. A stable starch substrate for the determination of amylase in serum and other body fluids. **American Journal of Clinical Pathology**, Baltimore, v.32, n.1, p.97-99, 1959.

CARDEMIL, L.; VARNER, J.E. Starch degradation metabolism towards sucrose synthesis in germinating *Araucaria araucana* seeds. **Plant Physiol.**, Rockville, v. 76, p.1047-1054, 1984.

CORDENUNSI, B. R.; LAJOLO, F. M. Starch breakdown during banana ripening: sucrose synthase and sucrose phosphate synthase. **J. Agric. Food Chem.** Washington, v.43, n.2, p.347-351, 1995.

CORDENUNSI, B. R. **Síntese da sacarose no amadurecimento da banana. Envolvimento da sacarose sintase e sacarose fosfato sintase.** São Paulo, 1989. 87p. (Tese de Doutorado- Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP).

CHITARRA, A. B. **Contribuição ao estudo da fisiologia e bioquímica pós-colheita da banana "Marmelo".** São Paulo, 1979. 110p. (Tese de Doutorado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP)

DAVIES, J. W.; COCKING, E. C. Changes in carbohydrate, proteins and nucleic acids during cellular developments in tomato fruit locule tissue. **Planta**, Berlin, v.67, p. 242-253, 1965.

DAVIES, J. W.; COCKING, E. C. Protein synthesis in tomato fruit locule tissue; the sites of synthesis and the pathway of carbon into protein. **Planta**, Berlin, v.76, p.285-305, 1967.

DAVIES., P. J. **Plant Hormones: Physiology, biochemistry and molecular biology.** Boston: Kluwer Academic Publishers, 833p., 1995.

DAVIES, C.; BOSS, P.K.; ROBINSON, S.P. Treatment of grape berries, a nonclimacteric fruit with a synthetic auxin, retards ripening and alters the expression of developmentally regulated genes. **Plant Physiol.**, København, v.115, p.1155-1161, 1997.

DEY, P. M.; DIXON, R. A. **Biochemistry of Storage Carbohydrates in Green Plants**, London : Academic Press, 378p., 1985.

DOEHLET, D. C. HUBER, S. C. Spinach leaf sucrose phosphate synthase. Activation by glucose 6-phosphate and interaction with inorganic phosphate. **FEBS Lett.**, Amsterdam, v.153, n.2, p.293-297, 1983 (a).

DOEHLET, D. C. HUBER, S. C. Regulation of spinach leaf sucrose phosphate synthase by glucose6-phosphate, inorganic phosphate and pH. **Plant Physiol.**, Bethesda, v.73, p.989-994, 1983 (b).

DUNN, G. A model for starch breakdown in higher plants. **Phytochemistry**, Kiel, v.13, p.1341-1346, 1974.

EVEN-CHEN, Z., MATOO, A.K., GOREN, R. Inhibition of ethylene biosynthesis by aminoethoxyvynilglycine and by polyamines shunts label from 3,4-[¹⁴C] methionine into spermidine in aged peel discs. **Plant Physiol.**, Bethesda, v.69, p.385-88, 1982.

FOSKET, D. E. **Plant growth and development: a molecular approach**. San Diego: Academic Press, 580p., 1994.

GALLANT, D.J.; BOUCHET, B.; BALDWIN, P. M. Microscopy of starch: evidence of a new level of granule organization. **Carbohyd. Polym.**, Barking, v.32, p.177-191, 1997.

GARCIA, E. **Transformações do amiloplasto e participação de enzimas amilolíticas no amadurecimento da banana**. São Paulo, 1983. 72p. (Dissertação de Mestrado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, USP).

GARCIA, E. & LAJOLO, F.M. Starch transformation during banana ripening: the amylase and glucosidase behavior. **J. of Food Sci.**, Chicago, v.53, n.4, p.1181-1186, 1988.

GARCIA-MARTÍNEZ, L. J & HEDDEN, P. Gibberellins and fruit development. In: TOMÁS-BARBERÁN, F. A., ROBINS, R. J., ed. **Phytochemistry of Fruit and Vegetables**. New York: Oxford University Press Inc., 1997, p. 263-285.

GEINGENBERGER, P. & STTIT, M. Sucrose synthase catalyses a readily reversible reaction in vivo in developing potato tubers and other plant tissues. **Planta**, Berlin, v.189, p.329-339, 1993.

GILLASPY, G.; HILLA, B.D.; GRUISSEM, W. Fruits: a developmental perspective. **The Plant Cell**, Baltimore, v.5, p.1439-1451, 1993.

GUBLER, F.; KALLA, R.; ROBERTS, K. J; JACOBSEN, V. J. Gibberellin-regulated expression of a Myb gene in barley aleurone cells: evidence for Myb transactivation of a high-pl α -amylase gene promoter. **The Plant Cell**, Baltimore, v.7, p.1879-1891, 1995.

HAGENIMANA, V.; VÈZINA, L. SIMARD, R.E. Distribution of amylases within sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) root tissue. **J. Agric. Food Chem.**, Easton, v.40, p.1777-1783, 1992.

HALMER, P. The mobilization of storage carbohydrates in germinated seeds. **Physiol. Veg.**, Belmont, v.23, p.107-125. 1985.

HAMILTON, A. J.; LYCETT, G. W; GRIERSON, D. Antisense gene inhibits synthesis of the hormone ethylene in plant transgenic. **Nature**, London, v.346, p.284-287, 1990.

HARBERD, P. N.; KING, E. K.; CAROL, P.; COWLING, J. R.; PENG, J.; RICHARDS, E. D. Gibberellin: inhibitor of na inhibitor of...?. **BioEssay**, Cambridge, v.20, p. 1001-1008, 1998.

HESSE, H.; SONNEWALD, U.; WILLMITZER, L. Cloning and expression analysis of sucrose phosphate synthase from sugar beet (*Beta vulgaris* L). **Mol. Gen. Genet.**, Berlin, v.247, p. 515-520, 1995.

HUBBARD, N. L., PHARR, D. M., HUBER, S. C. Role of sucrose phosphate in sucrose biosynthesis in ripening bananas and its relationship to the respiratory climacteric. **Plant Physiol.**, Bethesda, v.94, p.201-208, 1990.

HUBBARD, N. L., PHARR, D. M., HUBER, S. C. Sucrose phosphate synthase and other metabolizing enzymes in fruits of various species. **Physiol. Plant.** Copenhagen, v.82, p.191-196, 1991.

KAYISU, K.; HOOD, L. F., VANSOEST, P. J. Characterization of starch and fiber of banana fruit. **J. Food Sci.**, Chicago, v.46, p.1875-1890, 1981.

KHADER, S. E. S. A.; SINGH, B. P., KHAN, S. A. Effect of GA₃ as a post-harvest treatment of mango fruit on ripening, amylase and peroxidase activity and quality during storage. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.36, p.261-266, 1988.

KHADER, S. E. S. A. Effect of preharvest application of GA₃ on postharvest behavior of mango fruits. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.47, p.317-321, 1991

KHADER, S. E. S. A. Effect of gibberellic-acid and vapor guard on ripening, amylase and peroxidase-activities and quality of mango fruits during storage. **J. of Hortic. Sc.**, London, v. 67, n.6, p. 855-860, 1992.

KRUCKEBERG, A. L.; NEUHAUS, H. E.; FEIL, R.; GOTTLIEB, L. D., STITT, M. Decreased-activity mutants of phosphoglucose isomerase in the cytosol and chloroplast of *Clarkia xantiana*- Impact on mass action ratios and fluxes to sucrose and starch, and estimation of flux control coefficients and elasticity coefficients. **Biochem. J.**, London, v.261, p.457-467, 1989.

KONISHI, Y.; HARADA, M.; D' INNOCENZO, M.; LAJOLO, M. F. Purification and characterization of soluble and cell wall-bound acid α -glucosidases of ripe yellow banana pulp. **J. Appl. Glycosci.**, v.48, n.1, p.19-25, 2001.

KUMAR, A. & SANWAL, G. G. Purification and physicochemical of starch phosphorylase from young banana leaves. **Biochemistry**, Washington, v.21, p.4152-4159, 1982.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during assembly of the bacteriophage T4. **Nature**, London, v. 94, p. 201-208, 1970.

LEHAV, E. Value of K-Ca+Mg ration for determination of nutritional-status of banana sucker. **Fruit**, Paris, v.33 , n.1, p.3-6, 1978.

LELOIR, L. F.; CARDINI, C.E. The biosynthesis of sucrose phosphate. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v.214, p.157-165, 1955

LEERS, A.; JIANG, W.B.; LOMANIEC, E.; AHARONI, N. Gibberellic acid and CO₂ additive effect in retarding postharvest senescence of parsley. **J. Food Sci.**, Chicago, v.63, n.1, p. 66-68, 1998.

LORETI, E.; GUGLIELMINETTI, L.; YAMAGUCHI, J.; GONZALI, S. Effect of anoxia on gibberellic acid-induced protease and α -amylase processing in barley seeds. **J. Plant Physiol.**, Jena, v.152, p.44-50, 1998.

LOWRY, H. O. & LOPEZ, A. J. The determination of inorganic phosphate in the presence of labile phosphate esters. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v.162, p.421-428, 1946.

LOWRY, O.H.; ROSENBROUGH, N. J.; RANDHALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v.193, p.265-275, 1951.

MACRAE, E., QUICK, W. P., BENKER, C., STITT, M. Carbohydrate metabolism during postharvest ripening in kiwifruit. **Planta**., Berlin, v.188, p.314-323, 1992.

MATOO, A. K.; MODI, V. V. Ethylene and ripening of mangoes. **Plant Physiol.**, Bethesda, v.44, p.308-310, 1969.

MARTÍNEZ, G. A.; CHAVES, A. R.; and AÑÓN, M. C. Effect of Exogenous Application of Gibberellic Acid on Color Change and Phenylalanine Ammonia-lyase, Chlorophyllase, and Peroxidase Activities during Ripening of Strawberry Fruit. **J. Plant Growth Regul.**, New York, v.15, p.139-146, 1996.

MARUR, C.J.; STENZEL, N.M.C.; RAMPAZZO, E.F.; SCHOLZ, M.B.S. Gibberellic acid (GA3) and ripening of Ponkan and Montenegrina mandarin fruits. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v.56, n.3, 1999.

McCLEARY, B. V.; CODD, R. Measurement of β -amylase in cereal flours and commercial enzyme preparations. **J. Agric. Food Chem.**, Easton, v.9, p.17-33, 1989.

McKEON, T.S., FERNANDEZ-MACULET, J.C., YANG, S.F. Biosynthesis and metabolism of ethylene. In: DAVIES, P.J. Ed. **Plant hormones, physiology, biochemistry and molecular biology**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, p.118-204, 1995.

MENDICINO, J. Sucrose-phosphate synthesis in wheat germ and green leaves. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v.235, n.12, p.3347-3352, 1960.

MEDRANO, C. R. & DARNELL, L. R. Sucrose metabolism and fruit growth in parthenocarpic vs seeded blueberry (*Vaccinium ashei*) fruits. **Physiol. Plant.**, Bethesda, v. 99, p. 439-446, 1997

MITSUI, T.; LOBODA, T.; ITOH, A.; IKARASHI, T. Sugar-controlled Ca^{2+} uptake and alpha-amylase secretion in cultured cells of rice (*Oryza sativa* L.). **Plant and Cell Physiology**, Tokyo, v.40, n.8, p.884-893, 1999.

MOTA, R. V; LAJOLO, F.M. & CORDNUNSI, B.R. Composição em carboidratos de alguns cultivares de banana (*Musa* spp.) durante o amadurecimento. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v.17, n.2, p.94-9, 1997.

MOTA, R. V. **Metabolismo amido-sacarose e determinação de açúcares solúveis em alguns cultivares de banana (*Musa* spp).** São Paulo, 1997. 75p. (Tese de Mestrado- Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP).

MOTA, R. V. **Identificação, purificação e caracterização parcial da enzima amido fosforilase em bananas Nanicão (*Musa acuminata* Grupo Cavendish).** São Paulo, 2001. (Tese de Doutorado-Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP).

MONROE, J. D.; PREISS, J. Purification of a β -amylase that accumulates in *Arabidopsis thaliana* mutants defective in starch metabolism. **Plant Physiol.**, Bethesda, v.94, p.1033-1039, 1990.

NASCIMENTO, J. R. O; CORDENUNSI, B.R.; LAJOLO, F.M. and ALCOCER, M.J.C. Banana sucrose-phosphate synthase gene expression during fruit ripening. **Planta**, Berlin, v.203, p.283-288, 1997.

NASCIMENTO, J. R. O; CORDENUNSI, B.R.; LAJOLO, F.M. Sucrose synthase activity and expression during development and ripening in banana. **J. Plant Physiol.**, Jena, v. 156, p. 605-611, 2000.

NIGHOJKAR, K.; KUMAR, A. Starch phosphorylase: biochemical, molecular and biotechnological aspects. **The Genetic Engineer and Biotechnologist.**, Wales, v.17, n.4, p.189-202, 1997.

OATES, C. G; POWEL, A. D. Bioavailability of carbohydrate material stored in tropical fruit seeds. **Food Chem.**, London, v.56, n.4, p.405-414, 1996.

OELLER, P.A.; MIN-WONG, L.; TAYLOR, L.; PIKE, D.A.; THEOLOGIST, A. Reversible inhibition of tomato fruit senescence by antisense RNA. **Science**, Washington, v.254, p.437-439, 1991.

PAGE, A.E.; WILLIAMS-ASHMAN, H.G On the role of S-adenosyl-L-methinine in the biosynthesis of spermidine by rat protoplast. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v.244, p.682-93, 1969.

PECH, J. C.; LATCHKE, A. Activities of enzymes involved in sugar metabolism in Passe-Crassane pears during cold storage. **J. Sci. Food Agric.**, London, v.23, p.1499-1502, 1972.

PERATA, P.; MATSUKURA, C.; VERNIERI, P.; YAMAGUCHI, J. Sugar repression of a gibberellin-dependent signaling pathway in barley embryos. **American Society of Plant Physiologists**, Rockville, v.9, p.2197-2208, 1997.

PERCHERON, F. Dosage colorimetric des fructose et des fructofuranosides par l'acide thiobarbiturique. **C. R. Acad. Scien.**, Paris, v.255, n.19, p.2521, 1962.

PERES, F. J.; MORALES, V. A basic peroxidase isoenzyme from de grape pedicel is induced by gibberellic acid. **Australian Journal of Plant Physiology**, Melbourne, v.26, n.4, p.387-390, 1999.

PESIS, E.; FUCHS, Y.; ZAUBERMAN, G. Starch content and amylase activity in avocado fruit pulp. **J. Amer. Soc. Hort. Sci.**, Geneva, v.103, n.5, p.673-676, 1978.

PETERSON, G. L. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. wich is more generally applicable. **Anal. Biochem.**, Baltimore, v.83, p.346-356, 1977.

PIJLS, L. T. G.; TIMMER, A. A. m; WOLDEGEGBRIEL, Z. Cultivation, preparation and consumption of enset (ensete vitricosun) in Ethiopia. **J. Sci. Food Agric.**, London, v.49, n.2, p.107-111, 1995.

PURGATTO, E.; LAJOLO, F. M; NASCIMENTO, J. R. O.; CORDENUNSI, B. R. Inhibition of β -amylase activity, starch degradation na sucrose formation by IAA during banana ripening. **Planta**, Berlim, v. 212, n.5-6, p.823-828, 2001.

ROGERS, S. W., ROGERS, J. C. Cloning and characterization of a gibberellin-induced Rnase expressed in barley aleurone cells. **Plant Phisiol.**, Bethesda, v.119, p.1457-1464, 1999.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. Detection and Analysis of Proteins Expressed from Cloned Genes. In: SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T . **Molecular Cloning: a laboratory manual**.2.ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, v.3, cap.18, p.75, 1989.

SEYMOUR G. B. Banana. In: Seymour G. B., Taylor J. E., Tucker G. A. **Biochemistry of Fruit Ripening**, London: Chapman & Hall ed.2 ,p. 83-101, 1996.

SONNEWALD, V.; QUICK, W. P.; MACRAE, E.; KRAUSE, K. P.; STITT, M. Purification, cloning and expression of sucrose phosphate synthase in *E. coli*. **Planta**, Berlin, v.189, p.174-181, 1993.

SPEIRS, J., BRADY, C. J. Modification of gene expression in ripening fruit. **Aust. J. Plant Physiol.**, Melbourne, v.18, p. 519-32, 1991.

STEUP, M. Starch degradation. In: Sumpf, P. K and Conn E. E. (eds). **Carbohydrates, in The biochemistry of plants. A comprehensive treatise.**, San Diego: Academic Press. v.14, p. 255-296, 1988.

THORNTON, T. M.; SWAIN, S. M.; OLSZEWSKI, N. E. Gibberellin signal transduction presents ... the SPY who O-GlcNAc" D me. **Trends in Plant Science**, Kidlington, v. 4, n.11, p.424-428, 1999.

TUCKER, G. A., GRIERSON, D. Fruit ripening. In: Daves, D.D., ed. **The Biochemistry of Plants: A comprehensive treatise**. San Diego: Academic Press, v.12, p. 265-318, 1984.

URIO, M.; EIGEL, W. E. Duration of kilning treatment on α -amylase, β -amylase and endo (1,3) (1,4)- β -D-glucanase activity of malted sorghum (*Sorghum bicolor*). **Process Biochemistry**, Oxford, v.35, p.433-436, 1999.

URIO, M.G. Changes in enzyme activities during germination of cowpeas (*Vigna unguiculata*, cv. California blackeye). **Food Chem.**, London, v.73, n.1, p.7-10, 2001.

VARNER, J.E & HO, D.T-H. Hormonal control of enzyme activity in higher plants. In: SMITH, H.Ed. **Regulation of enzyme synthesis and activity in higher plants**. London: Academic Press, 388p., 1977.

VENDRELL, M. Reversion of senescence: effects of 2,4-dichlorophenoxyacetic and indoleacetic acid on respiration, ethylene production, and ripening of banana fruit slices. **Aust. J. Biol. Sci.**, Melbourne, v.22, p.601-610, 1969.

VENDRELL, M. Acceleration and delay of ripening in banana fruit tissue by gibberellic acid. **Aust. J. Biol. Sci.**, Melbourne, v. 23, p. 553-559, 1970.

WANG, F.; SANZ, A.; BRENNER, M. L.; SMITH, A. Sucrose synthase, starch accumulation, and tomato sink strength. **Plant Physiol.**, Bethesda, v.101, p.321-327, 1993.

WANG, S. M.; LUE, W. L.; EIMERT, K.; CHEN, J. C. A phytohormone-regulated beta-amylase gene expression in rice. **Plant Mol. Biol.**, Bélgica, v.31, n.5, p.975-982, 1996.

WEGRZYN, T.; MACRAE, E. Alpha-amylase and starch degradation in kiwifruit. **J. Plant Physiol.**, Bethesda, v.147, p.19-28, 1995.

WHITAKER, J. R. **Principles of enzymology for the food sciences**. 2ed., New York: Marcel Dekker, 1994, 625p.

WONG, D. W. S. Amilolitic Enzymes in **Food Enzymes: Structure na Mechanism**, cap. 3, p. 37, USA: Chapman and Hall, 1995. 390p.

YANG, S.F. Regulation of ethylene biosynthesis. **Hortsci.**, St. Joseph, v.15, p.238-43, 1980.

YOSHIOKA, K. Changes in saccharides and enzyme-activities related to carbohydrate-metabolism during growth and development of fig (*Ficus carica* L) fruit on the tree **Journal of the Japanese Society for Food Science and Technology-Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaiashi**, Ibaraki-ken, v.42, n.4, p.219-224, 1995.

YOUNG, R.E., SALMINEN, S., and SORNSRIVICHAI, P. Enzyme regulation associated with ripening in banana fruit. **Coll. Int. Centre National Recherche Scientifique**, Paris, n. 238, p. 271, 1974.

YU, S. M.; KUO, Y. H.; SHEU, G.; SHEU, Y. J.; LIU, L. F. Metabolic depression of α -amylase genes expression in suspension-cultured cells of rice. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v.266, n.31, p.21131-21137, 1991.

YU, S. M.; LEE, Y. C.; FANG, S. C.; CHAN, M. T.; HWA, S. F.; LIU, L. F. Sugars act as signal molecules and osmotica to regulate the expression of α -amylase genes and metabolic activities in germinating cereal grains. **Plant Mol. Biol.**, Bélgica, v. 30, p. 1277-1289, 1996.

ZABADAL, T.G.; DITTMER, T. W. Gibberellic acid spray increase berry size and reduce shot berry of "Vanessa" grapevines. **Journal America Pomological Society.**, Michigan, v.54, n.3, p.130-133, 2000.

RESUMO

O amadurecimento é uma etapa exclusiva do estágio de desenvolvimento dos frutos, que envolve uma série de transformações metabólicas a partir de diferentes fontes de energia. Ele é mediado por um dinâmico complexo enzimático, resultando em síntese/degradação e conversão de compostos que tornarão o fruto aceitável para o consumo. Dependendo do tipo de fruto, essa fonte de energia pode ser na forma de ácidos orgânicos, sacarose vinda da própria planta e na forma de amido. A banana (*Musa acuminata*) é uma fruta de comportamento climatérico que utiliza como principal fonte de carbono o amido, que é reduzido durante o climatério de teores que variam de 12 a 20% a menos de 1%. Concomitante à esta degradação, o teor de sacarose pode atingir até 15%, dependendo da cultivar. O ácido giberélico (GA₃) é um fitohormônio da família das giberelinas que tem sido muito estudado em cereais por aumentar a transcrição gênica das α -amilase. Em frutos, ele é responsável por manter a textura firme e o teor de sólidos solúveis, e atrasar o amadurecimento. Ao estudar a influência do GA₃ no metabolismo amido-sacarose em fatias de banana, observou-se neste trabalho que o fitohormônio não alterou o pico respiratório nem a síntese de etileno. Entretanto, atrasou a degradação do amido e o acúmulo de açúcares solúveis por três dias. Este atraso foi acompanhado pela diminuição/atraso na atividade das enzimas que degradam o amido e sintetizam sacarose, α e β -amilase e sacarose fosfato sintase, respectivamente, sendo que não foi observada uma diferença no aumento de expressão gênica da sacarose fosfato sintase e das fosforilases.

ABSTRACT

The ripening is an exclusive stage of fruit development, that involves a serie of metabolic transformation from different energy source. It is mediated by a dynamic enzymatic complex, resulting in formation/degradation of different coumpouds that will render fruit acceptable for the consumption. Depending on the type of fruit, this energy source can be in the form of organic acid, sucrose of the plant or starch. Banana (*Musa acuminata*) is a climateric fruit that uses starch as main carbon source, which is reduced during banana ripening of levels that vary from 12 to 20% to less than 1%. Concomitant to the this degradation, the levels of sucrose can reach up to 15%, depending of the cultivar. The gibberellic acid, GA₃-mediated is a plant growth regulation of the giberellins family, that has been studied in cereals because of their enhancing effect of gene expression of α -amylase. In fruits, it is responsible for keeping the texture firm and the soluble solid levels, and delaying the ripening. The influence of the GA₃ in the starch-sucrose metabolism in banana slices, were observed. That the phytohormone did not modify the respiratory peak nor the synthesis of ethylene. However, it delayed the starch degradation and the soluble sugars accumulation for about three days. This delay was followed by decrease and/or delay in the activity of the enzymes related to starch degradation: the α and β -amylases; and sucrose synthesis the sucrose phosphate synthase (SPS). However, was not observed a difference in the increase of gene expression of SPS and phosphorilase