

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

Estrutura do grânulo de amido de banana e sua relação com as enzimas
que atuam no metabolismo amido-sacarose

Fernanda Helena Gonçalves Peroni

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientadora:
Profa. Associada Beatriz Rosana Cordenunsi

São Paulo
2007

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

Estrutura do grânulo de amido de banana e sua relação com as enzimas
que atuam no metabolismo amido-sacarose

Fernanda Helena Gonçalves Peroni

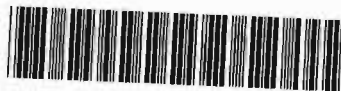
Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientadora:
Profa. Associada Beatriz Rosana Cordenunsi

São Paulo
2007

18.932

DEDALUS - Acervo - CQ



30100013032

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Peroni, Fernanda Helena Gonçalves
P453e Estrutura do grânulo de amido de banana e sua relação com as
enzimas que atuam no metabolismo amido-sacarose / Fernanda
Helena Gonçalves Peroni. -- São Paulo, 2007.
152p.

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

Orientador: Cordenunsi, Beatriz Rosana

1. Bioquímica dos alimentos 2. Banana : Bioquímica dos
alimentos I. T. II. Cordenunsi, Beatriz Rosana, orientador.

641.1 CDD

Fernanda Helena Gonçalves Peroni

Estrutura do grânulo de amido de banana e sua relação com as enzimas
que atuam no metabolismo amido-sacarose

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Profa. Associada Beatriz Rosana Cordenunsi
Orientadora/Presidente

Prof. Dr. Eduardo Purgatto
1º examinador

Dra. Renata Vieira da Mota
2º examinador

Profa. Dra. Célia Maria Landi Franco
3º examinador

Prof. Dr. Ricardo Pereira Louro
4º examinador

São Paulo, 27 de setembro de 2007.



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Relatório de Defesa

Relatório de defesa pública de Tese do(a) Senhor(a) Fernanda Helena Gonçalves Peroni no Programa: Ciência dos Alimentos, do(a) Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

Aos 27 dias do mês de setembro de 2007, no(a) Anfiteatro realizou-se a Defesa da Tese do(a) Senhor(a) Fernanda Helena Gonçalves Peroni, apresentada para a obtenção do título de Doutor em Ciência dos Alimentos - Área: Bromatologia, intitulada:

"Estrutura do grânulo de amido de banana e sua relação com as enzimas que atuam no metabolismo amido-sacarose"

Após declarada aberta a sessão, o(a) Sr(a) Presidente passa a palavra aos examinadores para as devidas arguições que se desenvolvem nos termos regimentais. Em seguida, a Comissão Julgadora proclama o resultado:

Nome dos Participantes da Banca	Vínculo do Docente	Sigla da Unidade	Resultado
Beatriz Rosana Cordenunsi	Presidente	FCF - USP	APROVADA
Eduardo Purgatto	Titular	FCF - USP	Aprovado
Renata Vieira da Mota	Titular	EPAMIG - Externo	Aprovado
Célia Maria Landi Franco	Titular	UNESP - Externo	APROVADO
Ricardo Pereira Louro	Titular	UFRJ - Externo	APROVADO
Resultado Final:			
Parecer da Comissão Julgadora *			

Comentários da Defesa (opcional)

Eu, Monica Dealis Perussi, Secretária, lavrei a presente ata, que assino juntamente com os(as) Senhores(as). São Paulo, aos 27 dias do mês de setembro de 2007.

Eduardo Purgatto
Eduardo Purgatto

Renata Vieira da Mota
Renata Vieira da Mota

Célia Maria Landi Franco
Célia Maria Landi Franco

Ricardo Pereira Louro
Ricardo Pereira Louro

Beatriz Rosana Cordenunsi
Beatriz Rosana Cordenunsi
Orientador(a)

Comissão de Pós-Graduação
HOMOLOGADO
27 SET. 2007
[Signature]
Presidente

* Obs: Se o candidato for reprovado por algum dos membros, o preenchimento do parecer é obrigatório.

Nos termos do artigo 110, do RG-USP, encaminhe-se o presente relatório à CPG, para homologação

Dedico este trabalho

Aos meus amados pais, Vitor e Lúcia,

***Aos meus queridos irmãos,
Hugo Leonardo e Carlos Henrique,***

Ao amor da minha vida, Alex.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Professora Beatriz R. Cordenunsi. Obrigada pela confiança que depositou em mim, pelo carinho, incentivo e apoio em todos os momentos. Sua amizade e sabedoria foram fundamentais para o desenvolvimento e enriquecimento deste trabalho.

Ao Professor Eduardo Purgatto, por todo auxílio prestado durante os tratamentos dos frutos e na realização dos experimentos.

Ao Professor João Roberto O. do Nascimento, pela atenção e por me ensinar a fazer as primeiras eletroforeses.

Ao Professor Ricardo P. Louro, do Laboratório de Ultraestrutura Vegetal, do Departamento de Botânica do Instituto de Biologia da UFRJ, pelas 14 horas diárias dedicadas em auxiliar-me nas análises microscópicas e por disponibilizar a estrutura de seu laboratório.

Em especial agradeço a Márcia de Moraes, a Lúcia Justino e a Tânia Shiga, pelo auxílio técnico, por facilitar o trabalho diário e pelos bons momentos de descontração.

À Doutora Janaina Mainardi, pela grande ajuda com os tratamentos dos frutos e pelos vários ensaios que fizemos juntas. Minha grande amiga de todas as horas. Obrigada pelo carinho e pelos bons momentos compartilhados.

Ao Doutor Adair Vieira Júnior, pelos anticorpos, pela ajuda nos primeiros *Western blots* e pela amizade.

À doutoranda Claudinéia Soares, pela incansável ajuda no laboratório, pela amizade e pela agradável companhia nas várias viagens em que fizemos juntas ao Rio de Janeiro e aos Congressos.

A todos os amigos do Laboratório de Química, Bioquímica e Biologia Molecular de Alimentos, de ontem e de hoje. Agradeço a companhia diária, o carinho e a amizade.

Aos demais Professores, funcionários e colegas do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental. Em especial, agradeço à Mônica, à Cléo e ao Edílson, da Secretaria do Departamento, e à Elaine e ao Jorge, da Secretaria de Pós-Graduação, pela amizade, eficiência, facilidades e atenção.

Ao João Luiz Brandão Martins Junior, da Frutaleve, por fornecer gentilmente as bananas.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa, e à FAPESP pelo apoio financeiro ao laboratório.

Às minhas queridas amigas, já Doutoradas, Adriana, Amanda, Ana Paula, e às doutorandas Milana e Roberta. Obrigada pela amizade, pelos bons momentos compartilhados, por cada palavra de carinho e incentivo.

À minha família. Meus pais, Vitor e Lúcia, pelo amor, incentivo e apoio em todos os momentos de minha vida. Ao Alex, pelo amor, dedicação, paciência e por apoiar-me e estar ao meu lado em todos os momentos. Aos meus irmãos, Hugo Leonardo e Carlos Henrique, pela torcida e pelos auxílios prestados. Aos meus sogros, Joaquim e Hirome, pelo carinho e apoio.

Ao meu Deus, pela vida abençoada.

RESUMO

A banana é considerada um bom modelo para o estudo da transformação amido-sacarose, já que acumula um alto teor de amido durante o desenvolvimento que é rapidamente degradado durante o amadurecimento. Várias enzimas e provavelmente mais de uma via metabólica estão envolvidas neste processo. Com isso, o objetivo deste trabalho foi estudar as características estruturais dos grânulos, bem como, a atuação das enzimas envolvidas em sua degradação. Os grânulos de amidos foram isolados de bananas controle (não tratadas) e submetidas a diferentes tratamentos: etileno, 1-MCP, frutos mantidos a 13°C e frutos tratados com etileno e mantidos a 13°C. Os resultados obtidos mostraram alta atividade de enzimas α e β -amilases ligadas ao grânulo tanto por ensaios *in vitro* como por géis de eletroforese contendo amilopectina como substrato. Os resultados obtidos para *Western blot* utilizando anticorpos produzidos contra essas enzimas, indicaram que a α -amilase atua no início da degradação enquanto a β -amilase foi encontrada no momento em que o amido estava em pleno processo de degradação. Nos estudos de imunolocalização observou-se que as proteínas associadas aos grânulos de amido e em cortes do fruto demonstraram que estas enzimas estão localizadas na superfície do grânulo. As técnicas utilizadas para observação dos grânulos de amido foram a de Microscopia Óptica, Microscopia Eletrônica de Varredura e Microscopia de Varredura Confocal a Laser. Os grânulos apresentaram um padrão de degradação diferenciado para cada tratamento realizado nos frutos. O teor de amilose encontrado para os amidos foi ao redor de 15%, não variando durante a degradação. O padrão de difração de Raios-X foi do tipo B em amidos de banana

recém-colhidas e tipos A e B foram encontrados em amidos degradados. O grau de cristalinidade aumentou de 15% para 17% nos amidos em degradação.

Palavras-chave: Banana. Degradação do grânulo de amido. α e β -amilases. Microscopia. Imunolocalização.

ABSTRACT

Banana fruit is considered a good example for studying the starch-sucrose transformation, accumulating high starch content during the development being rapidly degraded during the ripening. Several enzymes and, probably more than one metabolic way are involved in this process. Then, the aim of this work was to study the structural characteristics of starch granules and the action of the enzymes involved in its degradation. Starch granules were isolated from bananas control (fruits without treatment), and exposed to different treatments, such as: ethylene, 1-MCP, stored fruits to 13°C and stored fruits to 13°C + ethylene. Results obtained showed high activities of enzymes α and β -amylases associated to starch granules, measured by in vitro assay and native PAGE containing amylopectin like substrate. Results obtained by Western blot using antibodies against these enzymes, indicated that α -amylase is responsible for the initial attack on the starch, and β -amylase was localized at moment that starch was in degradation process. Results of the immunolocalization of proteins associated on starch granule and proteins on banana tissue confirmed that these enzymes are localized on granule surface. When techniques of microscopy were used to starch, such as Optical Microscopy, Scanning Electron Microscopy and Confocal Laser Scanning Microscopy, was observed that granules showed a different degradation pattern, for each treatment made on fruits. Amylose content obtained for starch was around 15%, not changing during degradation. B-type diffraction pattern was found for green banana starch, and A and B-type patterns for degraded starch. Degree of crystallinity increased from 15% to 17% for starches during degradation.

Key-words: Banana. Starch granule degradation. α and β -amylases. Microscopy. Immunolocalization.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Fração de uma molécula de amilose, com destaque para as ligações $\alpha(1-4)$ da molécula.....25
- Figura 2:** Ligações $\alpha(1-4)$ e $\alpha(1-6)$ da molécula de amilopectina.....26
- Figura 3:** Representação esquemática dos três tipos de cadeias presentes na estrutura ramificada da amilopectina: A: cadeias laterais curtas da amilopectina sem grupos OH no C₆ comprometidos; B: cadeias com um ou mais grupos OH no C₆ comprometidos; C: cadeia com grupo redutor.....27
- Figura 4:** Estrutura da molécula da amilopectina e sua organização dentro do grânulo de amido. A) ligações $\alpha-1,4$ e $\alpha-1,6$ na molécula de amilopectina. B) representação da estrutura de um cluster. C) Representação de um bloquete. D) Formação dos anéis de crescimento no grânulo de amido.....29
- Figura 5:** Medidas da produção de gás carbônico (A) e produção de etileno (B) em frutos dos grupos controle (-■-), tratados com 100-ppm de etileno (-○-) e tratados com 1-MCP (-△-). As medidas foram realizadas durante todo o período de amadurecimento dos frutos. Resultados expressos como média da quadruplicata de análise mais o erro padrão da média.....68
- Figura 6:** Teores de amido (A) e açúcares solúveis totais (B) durante o amadurecimento dos frutos controle (-■-), tratados com etileno (-○-) e tratados com 1-MCP (-△-). Resultados expressos como média da triplicata de análise mais o erro padrão da média.....71
- Figura 7:** Atividade hidrolítica total através de eletroforese não-desnaturante em géis de poliácridamida (6%) contendo amilopectina (0,1%) (proteína extraída de acordo com o método descrito no item 3.2.8.5). Os géis foram incubados em tampão Tris-HCl 100 mM, pH 7,0, contendo MgCl₂ 1 mM, DTT 1 mM e CaCl₂ 1 mM a 20°C por (A) 12 horas e (B) 3 horas, e em seguida corados com solução aquosa de iodeto (I₂ 13 mM e KI 40 mM). As amostras usadas foram bananas C: controle; E: tratadas com 100 ppm de etileno; 0, 3 e 15: dias pós-colheita (dpc). EB: extrato bruto de banana; 20-80%: extrato bruto de banana concentrado com (NH₄)₂SO₄ nesta faixa de concentração. Foram aplicadas 10 µg de proteína para cada amostra.....74

Figura 8: Atividade hidrolítica em eletroforese não-desnaturante em gel de poliacrilamida (6%) contendo amilopectina (0,3%) (proteína extraída de acordo com o método descrito no item 3.2.8.1). O gel foi incubado em tampão Tris-HCl 100 mM, pH 7,0, contendo MgCl₂ 1 mM, DTT 1 mM e CaCl₂ 1 mM a 20°C *overnight* e em seguida corado com solução aquosa de iodeto (I₂ 13 mM e KI 40 mM). Amostras: C: controle; E: tratadas com 100 ppm de etileno; 0, 1, 3, 9, 15, 16: dias pós-colheita (dpc).....75

Figura 9: (A) Atividade enzimática em PAGE-nativo (6%) contendo amilopectina (0,3%) revelada por coloração com solução aquosa de iodeto (I₂ 13 mM e KI 40 mM). Proteínas ligadas à superfície do grânulo de amido de banana zero dpc foram extraídas como descrito no item 3.2.8.1. **(B)** Perfil protéico em SDS-PAGE (7,5%) bidimensional revelado por coloração com prata. PM: padrão de peso molecular variando de 29-205 kDa. As elipses apontam para o padrão de migração das proteínas contidas no PAGE-nativo para o SDS-PAGE.....77

Figura 10: Atividade hidrolítica em eletroforese não-desnaturante em gel de poliacrilamida (8%) contendo amilopectina (0,1%). O gel foi incubado em tampão Tris-HCl 100 mM, pH 7,0, contendo MgCl₂ 1 mM, DTT 1 mM e CaCl₂ 1 mM a 20°C *overnight* e em seguida corado com solução aquosa de iodeto (I₂ 13 mM e KI 40 mM). As amostras usadas foram amidos de bananas C: controle; E: tratadas com 100 ppm de etileno; M: tratadas com 1-MCP. 0, 1, 3, 15, 28: dias pós-colheita (dpc). Foram aplicados diretamente ao gel 30 mg de amido de banana em 50 µL de tampão HEPES-KOH 50 mM, pH 7,0 contendo CaCl₂ 1 mM e benzamida 1 mM, como descrito no item 3.2.8.2.....79

Figura 11: (A) PAGE-nativo contendo amilopectina 0,2% e corado com solução aquosa de iodeto (I₂ 13 mM e KI 40 mM); **(B)** PAGE nativo corado com Coomassie G-250 antes da transferência. Amostra utilizada: amido de banana tratada com etileno 1 dpc. Proteína extraída de acordo com o método descrito no item 3.2.8.1.....82

Figura 12: (A) PAGE-nativo contendo amilopectina (0,2%) e corado com solução aquosa de iodeto (I₂ 13 mM e KI 40 mM); **(B)** Perfil protéico em SDS-PAGE bidimensional corado com prata. PM: padrão de peso molecular variando de 29-205 kDa. **(C)** e **(D)** PAGE nativo corado com Coomassie G-250 antes e depois da transferência, respectivamente. Amostra utilizada: amido de banana tratada com etileno 1 dpc. Proteína extraída de acordo com o método descrito no item 3.2.8.1..83

Figura 13: Atividade enzimática das isoformas de fosforilases através de eletroforese não-desnaturante em géis de poliacrilamida (6%) contendo como substrato **(A)** 250 µg de glicogênio por mL de gel; **(B)** 100 µg de glicogênio por mL de gel. Após a corrida o gel foi incubado por 2 horas a 30°C em tampão Tris-maleato 20 mM, pH 6,0 contendo glicose-1-fosfato 15 mM, NaF 5 mM e amido solúvel 1% e em seguida corados com solução aquosa de iodeto (I₂ 13 mM e KI 40 mM). As

amostras usadas foram bananas C: controle; E: tratadas com 100 ppm de etileno; 0, 3 e 15: dias pós-colheita (dpc). EB: extrato bruto de banana; 20-80% e 80-100%: extrato bruto de banana concentrado com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ nestas faixas de concentrações. Foram aplicadas 10 μg de proteína para cada amostra. Proteína extraída de acordo com o método descrito no item 3.2.8.5.....85

Figura 14: Atividade enzimática das isoformas de fosforilases através de eletroforese não-desnaturante em gel de poliacrilamida (7,5%) contendo como substrato glicogênio (1%). Após a corrida o gel foi incubado overnight a 30°C em tampão Tris-HCl 100 mM, pH 7,0 contendo glicose-1-fosfato 20 mM, MgCl_2 1 mM, CaCl_2 1 mM e DTT 1 mM e em seguida corados com solução aquosa de iodeto (I_2 13 mM e KI 40 mM). As amostras usadas foram amidos de bananas C: controle; E: tratadas com 100 ppm de etileno; M: 1-MCP. 0, 3, 15, 28: dias pós-colheita (dpc). Foram aplicados diretamente ao gel 30 mg de amido de banana em 50 μL de tampão HEPES-KOH 50 mM, pH 7,0 contendo CaCl_2 1 mM e benzamidina 1 mM de acordo com a metodologia descrita no item 3.2.8.2.....86

Figura 15: Perfil de amido e (-*-) e perfis de atividade das enzimas α -amilase (-■-) e β -amilase (-○-) aderidas ao grânulo de amido de bananas (A) Controle e (B) tratadas com etileno 100 ppm, em diferentes fases de amadurecimento. Amostras: controle e tratadas com 100 ppm de etileno; 0, 1, 3, 9, 15, 16: dias pós-colheita (dpc). Resultados representam a média de três determinações mais o erro padrão da média.....88

Figura 16: SDS-PAGE (8%) corado com Coomassie Blue R-250 de (A) proteínas totais do grânulo de amido de banana; (B) proteína ligada à superfície do grânulo; (C) proteína interna ao grânulo. PM: padrão de peso molecular variando de 29-205 kDa. Amostras: C: controle; E: tratadas com 100 ppm de etileno; 0, 1, 3, 9, 15, 16: dias pós-colheita (dpc). Eletroforese realizada a 200 V. As proteínas foram extraídas de acordo com o método descrito no item 3.2.8.3.....90

Figura 17: SDS-PAGE (8%) corado com prata de (A) proteínas totais do grânulo de amido de banana; (B) proteína ligada à superfície do grânulo; (C) proteína interna ao grânulo. PM: padrão de peso molecular variando de 29-205 kDa. Amostras: C: controle; E: tratadas com 100 ppm de etileno; 0, 1, 3, 9, 15, 16: dias pós-colheita (dpc). Eletroforese realizada a 200 V. As proteínas foram extraídas de acordo com o método descrito no item 3.2.8.3.....90

Figura 18: *Western blotting* (esquerda) para imunodeteção das bandas de α -amilase (A) e β -amilase (B). SDS-PAGE (8 %) (direita) de proteínas extraídas do grânulo de amido de banana. Gel corado com prata. PM: padrão de peso molecular variando de 29-205 kDa. Amostras: C: controle; E: tratadas com 100 ppm de etileno; 0, 1, 3, 9, 15, 16: dias pós-colheita (dpc). Eletroforese realizada a 200 V. Transferência eletroforética para membrana de nitrocelulose realizada a 30 V

overnight. As proteínas foram extraídas de acordo com o método descrito no item 3.2.8.4.....93

Figura 19: Medidas da produção de gás carbônico (A) e produção de etileno (B) em frutos dos grupos controle (-■-) (armazenados a 18°C), grupo frio (-○-) (armazenados a temperatura de 13°C por 17 dias e submetidos em seguida a temperatura de 18°C até o completo amadurecimento) e grupo etileno + frio (-Δ-) (armazenados a temperatura de 13°C por 17 dias e submetidos à temperatura de 18°C até o completo amadurecimento). As medidas foram realizadas durante todo o período de amadurecimento dos frutos. Resultados expressos como média da quintuplicata de análise mais o erro padrão da média.....97

Figura 20: Teores de amido (A) e açúcares solúveis (B) determinados em bananas dos grupos controle (18°C -■-), frio (13°C -○-) e etileno + frio (etileno + 13°C -Δ-). Resultados expressos como média da triplicata de análise mais o erro padrão da média.....98

Figura 21: SDS-PAGE (7,5%) revelado com prata de proteínas totais extraídas da polpa da banana (como descrito em 3.2.8.6). Amostras: Frutos controle (0, 10, 15 e 20 dpc); Frutos armazenados a 13°C (10, 15, 20 e 21 dpc); Frutos tratados com 100 ppm de etileno e armazenados a 13°C (10, 15 e 20 dpc); PM: padrão de peso molecular variando de 29-205 kDa. Foi aplicado 30 µg de proteína por amostra. As setas indicam os pesos moleculares estimados de diferentes enzimas.....100

Figura 22: *Western-Blotting* contra (A) α-amilase (1:100) e (B) β-amilase (1:125). Anticorpo secundário usado para fosfatase alcalina (1:30000). Amostras: Frutos controle (0, 10, 15 e 20 dpc); Frutos armazenados a 13°C (10, 15, 20 21 dpc); Frutos tratados com 100 ppm de etileno e armazenados a 13°C (10, 15 e 20 dpc). Foi aplicado 30 µg de proteína por amostra. As proteínas foram extraídas da polpa da banana de acordo com o método descrito no item 3.2.8.6. As bandas protéicas foram reveladas por método cromogênico segundo Sambrook (1989).....102

Figura 23: Difractogramas de Raios-x de amidos isolados de bananas Controle zero, 12 e 15 dpc.....109

Figura 24: Microscopia óptica com contraste diferencial de interferência de grânulos de amido isolados de banana. Amostras: controle zero e 17 dpc. As setas indicam o início da corrosão superficial em alguns grânulos aos 17 dpc.....112

Figura 25: Microscopia óptica com contraste diferencial de interferência de grânulos de amido isolados de banana. Amostras: controle 20 e 21 dpc.....113

Figura 26: Microscopia óptica com contraste diferencial de interferência de grânulos de amido isolados de banana. Amostras: 13°C 10 e 17 dpc. As setas indicam as pequenas depressões circulares na superfície dos grânulos..... **114**

Figura 27: Microscopia óptica com contraste diferencial de interferência de grânulos de amido isolados de banana. Amostras: 13°C 20 e 21 dpc. As setas indicam as depressões circulares tornando-se mais alargadas na superfície dos grânulos..... **115**

Figura 28: Microscopia óptica com contraste diferencial de interferência de grânulos de amido isolados de banana. Amostras: Etileno + 13°C 10 e 20 dpc. As setas apontam para as rachaduras na superfície de alguns grânulo..... **116**

Figura 29: Microscopia Eletrônica de Varredura de grânulos de amido isolados de banana. Amostras: controle zero (19,54% amido) e 20 dpc (13,98% amido). As setas apontam para as camadas de amido em formação na amostra zero dpc..... **119**

Figura 30: Microscopia Eletrônica de Varredura de grânulos de amido isolados de banana. Amostras: 13°C 10 (20,73% amido) e 21 dpc (9,70% amido). As setas indicam as depressões circulares na superfície dos grânulos de amido..... **120**

Figura 31: Microscopia Eletrônica de Varredura de grânulos de amido isolados de banana. Amostras: Etileno + 13°C 10 (21,38% amido) e 20 dpc (10,73% amido)..... **121**

Figura 32: Microscopia de Fluorescência (à esquerda) e Microscopia Óptica (à direita) realizadas em amidos isolados de bananas Controle zero e 15 dpc. Foi usado anticorpo específico produzido contra α -amilase de banana..... **128**

Figura 33: Microscopia de Fluorescência (à esquerda) e Microscopia Óptica (à direita) realizadas em amidos isolados de bananas tratadas a 13°C 10 dpc e 13°C + Etileno 20 dpc. Foi usado anticorpo específico produzido contra α -amilase de banana..... **129**

Figura 34: Microscopia de Fluorescência (à esquerda) e Microscopia Óptica (à direita) realizadas em amidos isolados de bananas Controle zero e 15 dpc. Foi usado anticorpo específico produzido contra β -amilase de banana..... **130**

Figura 35: Microscopia de Fluorescência (à esquerda) e Microscopia Óptica (à direita) realizadas em amidos isolados de bananas tratadas a 13°C 10 dpc e 13°C + Etileno 20 dpc. Foi usado anticorpo específico produzido contra β -amilase de banana..... **131**

Figura 36: Microscopia de Fluorescência (à esquerda) e Microscopia Óptica (à direita) realizadas em cortes de bananas controle zero e 15 dpc, tratadas a 13°C 10 e 20 dpc e etileno + 13°C 20 dpc. Foi usado anticorpo específico produzido contra α -amilase de banana..... **134**

Figura 37: Microscopia de Fluorescência (à esquerda) e Microscopia Óptica (à direita) realizadas em cortes de bananas controle zero e 15 dpc, tratadas a 13°C 10 e 20 dpc e etileno + 13°C 20 dpc. Foi usado anticorpo específico produzido contra β -amilase de banana..... **135**

Figura 38: Microscopia Confocal de Varredura a Laser (CLMS) realizada em cortes de bananas controle zero e 15 dpc, tratadas a 13°C 20 dpc e etileno + 13°C 20 dpc. Foi usado anticorpo específico produzido contra α -amilase de banana..... **136**

Figura 39: Microscopia Confocal de Varredura a Laser (CLMS) realizada em cortes de bananas controle zero e 15 dpc, tratadas com etileno + 13°C 20 dpc. Foi usado anticorpo específico produzido contra β -amilase de banana..... **137**

LISTA DE TABELAS

Tabela I: Tratamentos e formas de armazenamento que os frutos foram submetidos.....	48
Tabela II: Condições de análise.....	63
Tabela III: Condições experimentais.....	64
Tabela IV: Amostras selecionadas para o isolamento do grânulo de amido.....	72
Tabela V: Diâmetro médio calculado através do volume dos grânulos de amido. Porcentagem de distribuição realizada de acordo com os tamanhos de grânulos encontrados. Amostras: amidos isolados de bananas controle obtidas no Primeiro Experimento (ver item 3.1.2 e Tabela IV) nos dias zero, 6, 12 e 15 dpc.....	105
Tabela VI: Teor de amido, teor de amilose, padrão de difração de Raios-X e grau de cristalinidade dos grânulos de amido isolados de banana. Amostras: Controle (zero, 12 e 15 dpc).....	108
Tabela VII: Padrão de difração de Raios-X e grau de cristalinidade obtidos de grânulos de amido fracionados em peneiras de diferentes tamanhos. Amostras: amido isolado de banana controle (zero dpc).....	124

LISTA DE ABREVIATURAS

ABTS	2,2'-azino-di-(3-etilbenzotiazolina)-6-sulfonato
AMP	5'-Monofosfato de adenosina (Adenosine 5'-monophosphate)
ATP	5'-Trifosfato de adenosina (Adenosine 5'-triphosphate)
B.O.D.	Demanda bioquímica de oxigênio
BPNPG7	p-Nitrofenil-maltoheptaosideo bloqueado (Blocked p-nitrophenyl-maltoheptaoside)
BSA	Albumina de soro bovino
CEAGESP	Central de Entrepósitos e Armazéns Gerais do Estado de São Paulo
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
ConA	Concanavalin A
DBE	Enzimas desramificadoras (Debranching enzymes)
DIC	Contraste diferencial de interferência
DPC	Dias pós-colheita
DTT	Ditiotreitol (tio-1,4-dimercapto-2,3-butanodiol)
EB	Extrato bruto
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético (ethylenediaminetetraacetic acid)
FID	Detector de ionização de chama (Fire ionization detector)
FITC	Fluorescein isothiocyanate
GWD	α -glicano-água-diquinase (Glucan-Water Dikinase)
HEPES	N-[2-hidroxietil]-piperazina-N'-[ácido 2-etanosulfônico] (N-[2-hidroxyethyl]-piperazine-N'-[2-ethanesulphonic acid])
ICDD	International Centre for Diffraction Data.

kDa	Quilodalton
1-MCP	1-Metil-ciclopropeno
ppm	parte por milhão
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida (polyacrylamide gel electrophoresis)
PBS	Tampão fosfato salino
PM	Peso molecular
PNPG5	p-Nitrofenil-maltopentaosideo bloqueado (Blocked p-nitrophenyl-maltopentaoside)
PVP-40	Polivinilpirrolidona de peso molecular médio de 40.000 g/mol
SBE	Enzimas ramificadoras (starch branching enzymes)
SDS	Dodecil sulfato de sódio (sodium dodecyl sulfate)
SEM	Microscopia Eletrônica de Varredura (Scanning electron microscopy)
SGAPs	Proteínas associadas ao grânulo de amido (Starch granule-associated proteins)
SGBSS I	Isoforma I da amido-sintase ligada ao grânulo de amido (Starch granule bound starch synthase isoform 1)
SSS	Amido-sintase solúvel (soluble starch synthases)
TCA	Ácido tricloro-acético (Trichloro acetic acid)
TCD	Detector de condutividade térmica (Thermal conductivity detector)
TEM	Microscopia Eletrônica de Transmissão (Transmission electron microscopy)
TRIS	(Hidroximetil) aminometano (Hydroxymethylaminomethane)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	19
1.1 Amadurecimento de frutos.....	19
1.2 O grânulo de amido.....	23
1.3 Outros constituintes do grânulo de amido.....	33
1.4 A degradação enzimática do amido na banana.....	36
1.4.1 α -amilase.....	37
1.4.2 β -amilase.....	39
1.4.3 Glicosidases, enzimas fosforolíticas e desramificadoras.....	40
1.4.4 Modelos de degradação.....	42
2 OBJETIVO.....	45
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	46
3.1 Material.....	46
3.1.2 Primeiro experimento: Efeito do etileno e do 1-MCP no amadurecimento da banana.....	46
3.1.3 Segundo experimento: Efeito da baixa temperatura e do Etileno x baixa temperatura sobre o amadurecimento de bananas.....	47
3.2 Métodos.....	48
3.2.1 Determinação de CO ₂ e etileno.....	48
3.2.2 Determinação de carboidratos.....	49
3.2.2.1 Açúcares solúveis.....	49
3.2.2.2 Determinação de Amido.....	50
3.2.3 Isolamento dos grânulos de amido.....	50
3.2.4 Determinação do teor de proteína.....	51
3.2.5 Eletroforese em condições não-desnaturantes (PAGE nativo)	51
3.2.5.1 Utilizando amilopectina como substrato.....	51
3.2.5.2 Utilizando glicogênio como substrato.....	52
3.2.5.3 Géis sem substrato para transferência eletroforética.....	53
3.2.6 Eletroforese em condições desnaturantes (SDS-PAGE).....	53
3.2.7 <i>Western-blot</i>	54
3.2.8 Extração de proteínas.....	55
3.2.8.1 Do grânulo de amido para determinação de atividade “ <i>in vitro</i> ”	55

3.2.8.2 Do grânulo de amido para determinação de atividade em gel de poliacrilamida.....	56
3.2.8.3 Do grânulo de amido para eletroforese desnaturante.....	56
3.2.8.4 Do grânulo de amido para <i>Western Blot</i>	57
3.2.8.5 Totais da polpa da banana para determinação de atividade em gel de poliacrilamida.....	58
3.2.8.6 Totais da polpa da banana para <i>Western Blot</i>	58
3.2.9 Determinação de atividade <i>in vitro</i> das enzimas α e β -amilases ligadas à superfície do grânulo de amido.....	59
3.2.10 Análises microscópicas.....	60
3.2.10.1 Microscopia óptica.....	60
3.2.10.2 Microscopia Eletrônica de Varredura.....	61
3.2.10.3 Microscopia de Imunofluorescência.....	61
3.2.11 Análise por Difratomia de Raios-X.....	63
3.2.12 Grau de cristalinidade do grânulo de amido.....	63
3.2.13 Análise de Distribuição de Tamanho de Partículas.....	64
3.2.14 Determinação do Teor de Amilose.....	64
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	67
4.1 Efeito do etileno e do seu antagonista 1-MCP sobre o amadurecimento da banana: grânulo de amido e enzimas correlacionadas.....	67
4.1.1 Respiração, produção de etileno, teor de amido e produção de açúcares.....	67
4.1.2 Perfil de atividade hidrolítica em PAGE nativo.....	73
4.1.3 Perfil de atividade fosforolítica em PAGE nativo.....	84
4.1.4 Atividades " <i>in vitro</i> " de α e β -amilases extraídas do grânulo de amido.....	86
4.1.5 Perfil em SDS-PAGE de proteínas ligadas ao grânulo de amido.....	89
4.1.6 <i>Western blot</i> de proteínas associadas ao grânulo de amido.....	91
4.2 Efeito da baixa temperatura sobre o amadurecimento da banana: grânulo de amido e enzimas correlacionadas.....	95
4.2.1 Respiração, produção de etileno, teor de amido e síntese de açúcares.....	95
4.2.2 Perfil em SDS-PAGE e <i>Western blot</i> de proteínas extraídas de extrato bruto de banana.....	99
4.3 Caracterização do grânulo de amido de banana.....	104

4.3.1 Análise de distribuição de tamanho de partículas, análise de difração de Raios-X, grau de cristalinidade do grânulo de amido e teor de amilose.....	104
4.3.2 Análises Microscópicas.....	110
4.3.2.1 Microscopia Óptica.....	110
4.3.2.2 Microscopia Eletrônica de Varredura.....	117
4.3.2.3 Microscopia de Imunofluorescência.....	124
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	139
6 CONCLUSÕES.....	142
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	143
8 ANEXOS.....	152

1 INTRODUÇÃO

1.1 Amadurecimento de frutos

O amadurecimento dos frutos é um evento altamente coordenado e geneticamente programado que ocorre através de uma série de transformações bioquímicas, fisiológicas e organolépticas, que resultam em alterações de cor, sabor, aroma e textura, tornando-os aptos para o consumo (SEYMOUR; TAYLOR; TUCKER, 1993; CORDENUNSI; LAJOLO, 1995; NASCIMENTO et al., 1997; PURGATTO et al., 2002; MOTA et al., 2002; NASCIMENTO et al., 2006; PRASANNA; PRABHA; THARANATHAN, 2007).

Os frutos podem ser classificados em climatéricos e não-climatéricos sendo diferenciados com base no padrão de produção de etileno e padrão respiratório durante o amadurecimento. Frutos climatéricos, como banana, tomate, abacate, maçã, pêra, apresentam picos característicos de respiração e produção de etileno seguidos do amadurecimento do fruto. Já os frutos não-climatéricos exibem um declínio constante ou gradual na respiração, e níveis de etileno muito baixos durante o amadurecimento. Podem ser citados como frutos não-climatéricos uva, morango, limão, etc (BIALE, 1960; SEYMOUR; TAYLOR; TUCKER, 1993).

Naturalmente a maioria dos frutos e tecidos vegetais produz etileno em níveis relativamente baixos ($0,01-0,05 \mu\text{L}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$), durante o desenvolvimento. No entanto, a quantidade deste hormônio produzida em frutos climatéricos é muito maior que nos frutos não-climatéricos uma vez que a concentração do etileno nestes frutos muda muito pouco durante o desenvolvimento e amadurecimento. Além disso, a síntese do

etileno nos frutos climatéricos pode ocorrer de maneira autocatalítica, onde o próprio hormônio induz a expressão das enzimas responsáveis por sua produção (SEYMOUR; TAYLOR; TUCKER, 1993; PRASANNA; PRABHA; THARANATHAN, 2007). Estas observações fizeram com que McMurchie (1972) postulasse dois sistemas de produção do hormônio: o Sistema 1, responsável pela produção de etileno a níveis basais tanto nos frutos climatéricos como nos frutos não-climatéricos, e o Sistema 2, exclusivo de frutos climatéricos, caracterizado pela produção de níveis muito altos de etileno, superiores aos basais.

Embora o etileno tenha um papel muito importante para que todos os eventos bioquímicos ocorram durante o amadurecimento, o envolvimento de outros hormônios não pode ser ignorado. Existem evidências de que hormônios como ácido indol-3 acético e o ácido giberélico podem também atuar como reguladores do metabolismo de amido em bananas, ocasionando mudanças na atividade e na expressão de genes de várias enzimas responsáveis por essas transformações durante o amadurecimento de frutos (SEYMOUR; TAYLOR; TUCKER, 1993; PURGATTO et al., 2001, 2002; ROSSETTO et al., 2003).

Além da produção endógena de etileno, o amadurecimento pode ser induzido pela exposição dos frutos verdes ao etileno exógeno, antecipando alguns eventos relacionados ao amadurecimento, conseqüentemente levando ao encurtamento da vida pós-colheita do fruto. Frutas como banana, kiwi e manga amadurecem rapidamente quando expostas ao gás, tornando-as aptas a comercialização e consumo. Em bananas, esta técnica é frequentemente usada com o objetivo de uniformizar o amadurecimento dos frutos.

No entanto, quando o objetivo é o de estender a vida de prateleira de frutos, flores e hortaliças preservando sua qualidade, o 1-metilciclopropeno (1-MCP),

considerado um antagonista do etileno, tem sido adicionado a uma lista de técnicas que se destinam a este fim. Dependendo da concentração empregada e do tempo de exposição dos frutos ao gás, o 1-MCP se liga aos receptores de etileno e impede a ação do mesmo (WATKINS, 2006). Os efeitos do 1-MCP aplicados em frutos também podem variar dependendo da cultivar utilizada e do estágio de maturidade.

A aplicação do 1-MCP em frutos climatéricos tem sido considerada uma importante ferramenta para identificar e diferenciar os processos do amadurecimento que são dependentes de etileno. Golding et al. (1998) relataram que o 1-MCP já havia sido aplicado em bananas por outros pesquisadores, e os resultados foram positivos quanto aos efeitos inibitórios à ação do etileno, como o atraso da produção de voláteis e desenvolvimento de cor.

No entanto, quando o 1-MCP ($450 \mu\text{L.L}^{-1}$ por 6 horas) foi aplicado em bananas (Golding et al., 1998), foi verificado que houve atraso na produção e redução nas taxas de CO_2 e etileno, comparados aos frutos controle. Os frutos tratados somente com etileno ($500 \mu\text{L.L}^{-1}$) apresentaram antecipação na obtenção dos picos de respiração e etileno, sendo que para este último, o valor máximo foi 4 vezes menor que o obtido para os frutos controle. Concluiu-se que a maioria das mudanças bioquímicas associadas ao amadurecimento, são dependentes de etileno durante as primeiras 24 horas pós tratamento com o hormônio.

Bagnato et al. (2003) realizaram estudos com bananas em que os frutos foram previamente tratados com etileno, e em seguida com 1-MCP, tendo como objetivos verificar a qualidade e o aumento da vida pós-colheita dos frutos tratados. Os resultados mostraram que, em frutos tratados com 300nL.L^{-1} de 1-MCP, a ação do etileno foi bloqueada, atrasando o amadurecimento, sem comprometer a qualidade e a aparência da polpa e casca. Quando baixas concentrações (abaixo de

3 nL.L⁻¹) foram aplicadas, a vida de prateleira das bananas não foi prolongada, ao mesmo tempo que altas concentrações (30 µL.L⁻¹) tornaram os frutos impróprios para o consumo.

Watkins (2006) verificou as respostas que diferentes frutos apresentaram quando tratados com 1-MCP. Em bananas, o 1-MCP inibiu os eventos relacionados ao amadurecimento, como o desenvolvimento da cor, as mudanças de textura e a produção de voláteis. A taxa respiratória nos frutos tratados foi reduzida quando comparada aos frutos não-tratados, enquanto que o teor de açúcares no fruto maduro não foi alterado.

O 1-MCP pode também ser aplicado em frutas minimamente processadas com o objetivo de estender a vida de prateleira. O corte em frutos pode promover um aumento na produção de etileno levando a perda de textura da polpa devido à ação das enzimas que degradam a parede celular. Em bananas, os cortes na polpa tendem a amolecer rapidamente após a manipulação. Uma das técnicas utilizadas por Vilas-Boas e Kader (2006) foi a de submeter fatias de banana a 1 µL.L⁻¹ de 1-MCP por 6 horas a 14°C. Este tratamento retardou o amolecimento da polpa por 3 dias mantidas a 10°C, uma vez que as taxas de respiração foram diminuídas.

A banana, sendo uma fruta climatérica, tem seu metabolismo influenciado pela presença de etileno, com aumento pronunciado na síntese do hormônio precedendo o amadurecimento. O amadurecimento do fruto ligado à planta ou pós-colheita ocorre através de uma série de transformações bioquímicas, sendo a degradação do amido e a síntese e acúmulo de açúcares solúveis, um dos eventos mais importantes a serem considerados (CORDENUNSI; LAJOLO, 1995; NASCIMENTO et al., 1997; PURGATTO et al., 2002; MOTA et al., 2002; NASCIMENTO et al., 2006). Esta fruta é considerada um bom modelo de estudo da

transformação amido-sacarose, já que acumula um alto teor de amido durante o desenvolvimento (~12 a 25% do peso fresco da polpa), que é praticamente todo degradado durante o amadurecimento, restando apenas 1-10% na fruta completamente madura. Concomitantemente, o teor total de açúcares solúveis aumenta de 1-2% para 12-22% no final do amadurecimento, dependendo da cultivar (SEYMOUR; TAYLOR; TUCKER, 1993; CORDENUNSI; LAJOLO, 1995; MOTA; LAJOLO; CORDENUNSI, 1997).

As mudanças fisiológicas, ultra-estruturais e bioquímicas que ocorrem no processo de amadurecimento, são altamente coordenadas. Várias enzimas, e provavelmente mais de uma via metabólica estão envolvidas neste processo, entre elas estão enzimas hidrolíticas (CORDENUNSI; LAJOLO, 1995; PURGATTO, et al., 2001; NASCIMENTO et al., 2006) e fosforolíticas (MOTA et al., 2002). No entanto, o mecanismo que desencadeia a degradação do grânulo e o processo de degradação em si, não são ainda totalmente conhecidos (SEYMOUR; TAYLOR; TUCKER, 1993; RITTE et al., 2000b; MOTA et al., 2002). Também, a arquitetura do grânulo de amido é ainda pouco conhecida.

1.2 O grânulo de amido

O amido é a principal substância de reserva nas plantas superiores, fornecendo de 70 a 80% das calorias consumidas pelo homem. É considerado um dos principais componentes da maioria dos vegetais onde os depósitos permanentes de amido ocorrem principalmente nos órgãos de reserva como é o caso de grãos em cereais (arroz, milho), tubérculos e raízes (batata, mandioca), leguminosas (feijão, ervilha) e frutos (banana, maçã) (LEONEL; CEREDA, 2002).

O amido apresenta características físicas e químicas e qualidade nutricional superiores quando comparado com outros carboidratos (WHISTLER; BeMILLER, 1997). Suas características físico-químicas e funcionais estão diretamente relacionadas às características estruturais do grânulo as quais dependem da fonte botânica, local e condições de crescimento (HERMANSSON; SVEGMARK, 1996; SLATTERY; KAVAKLI; OKITA, 2000).

O amido é um polissacarídeo de reserva que se compacta na forma de grânulos com estrutura interna bem organizada, e com formato e tamanho dependentes da espécie vegetal. Ele é composto basicamente por dois tipos de macromoléculas, amilose e amilopectina, que se apresentam em proporções relativamente constantes de 20:80; porém podem apresentar quantidades relativas de 1% de amilose em amidos cerosos, até cerca de 80% de amilose, no "amilomilho". A proporção entre amilose e amilopectina é variável, assim como a organização física das mesmas dentro da estrutura granular (BILIADERIS, 1991; BULÉON et al., 1998). A disposição de amilose e amilopectina dentro do grânulo de amido, ainda não é completamente compreendida. O empacotamento desses dois polímeros no grânulo de amido nativo não parece ser ao acaso e sim, bem organizado. (YUAN; THOMPSON; BOYER, 1993; THOMAS; ATWELL, 1999; GLARING; KOCH; BLENNOW, 2006).

A amilose pode ser definida como uma molécula essencialmente linear, formada por unidades de α -D-glicose unidas entre si por ligações $\alpha(1-4)$, tendo sido encontrado, porém, um certo grau de ramificação [$\alpha(1-6)$] em sua estrutura (Figura 1) (FRENCH, 1973; BULÉON et al., 1998; HOOVER, 2001).

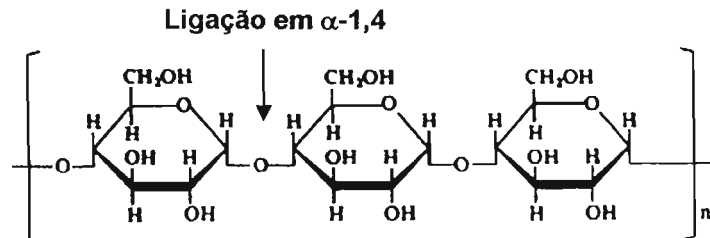


Figura 1: Fração de uma molécula de amilose, com destaque para as ligações α (1-4) da molécula.

Fonte: THOMAS e ATWELL (1999).

As ligações glicosídicas na configuração α , conferem à amilose uma estrutura helicoidal, na qual os grupos hidroxil-hidrofóbicos estão voltados para o interior da molécula e os grupos hidroxil-hidrofílicos voltados para o exterior. Essa conformação permite a complexação da amilose com moléculas apolares, como álcoois, lipídeos, e iodeto. Os átomos de iodo complexados com a amilose formam um composto de cor azul com absorção máxima a comprimentos de onda entre 620 e 680 nm. Esta reação é usada na determinação quantitativa do teor de amilose, e como indicador da presença de amido (HOOVER, 2001).

A amilopectina, por sua vez, é uma molécula muito grande e altamente ramificada, com peso molecular médio da ordem de 10^7 - 10^9 , formada por várias cadeias curtas constituídas de unidades de D-glicose ligadas em α (1-4). Essas cadeias são interligadas por ligações glicosídicas em α (1-6) perfazendo um total de até 6% das ligações na molécula (Figura 2) (WHISTLER; BeMILLER, 1997; BULÉON et al., 1998). Em presença de iodo a amilopectina apresenta coloração avermelhada em função do pequeno tamanho das cadeias helicoidais em α (1-4).

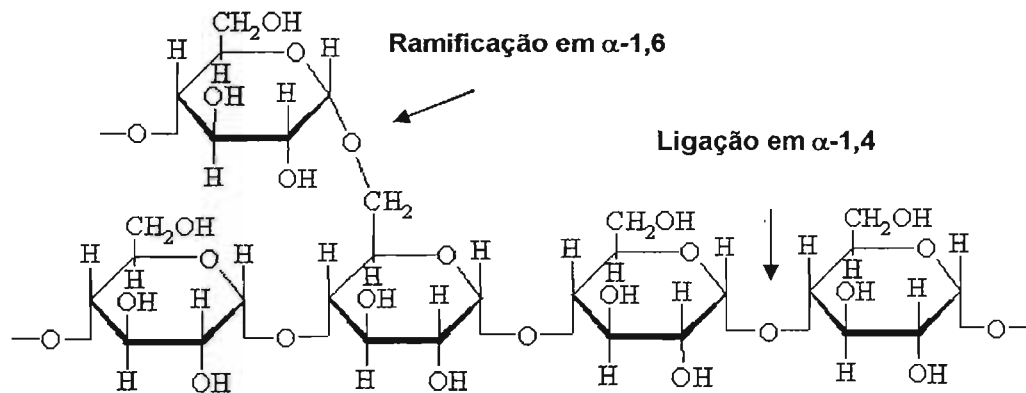


Figura 2: Ligações $\alpha(1-4)$ e $\alpha(1-6)$ da molécula de amilopectina.
 Fonte: MYERS et al. (2000).

A molécula de amilopectina consiste de uma cadeia principal, denominada cadeia C, que carrega o grupo redutor da molécula, e numerosas cadeias ramificadas denominadas A e B. As cadeias A são conectadas às cadeias B ou C por ligações $\alpha(1-6)$, e não possuem qualquer ramificação. As cadeias B, são aquelas conectadas às outras cadeias por ligações $\alpha(1-6)$ e possuem uma ou mais cadeias A ou B ligadas a ela através de ligações $\alpha(1-6)$ (Figura 3) (MYERS et al., 2000; HOOVER, 2001).

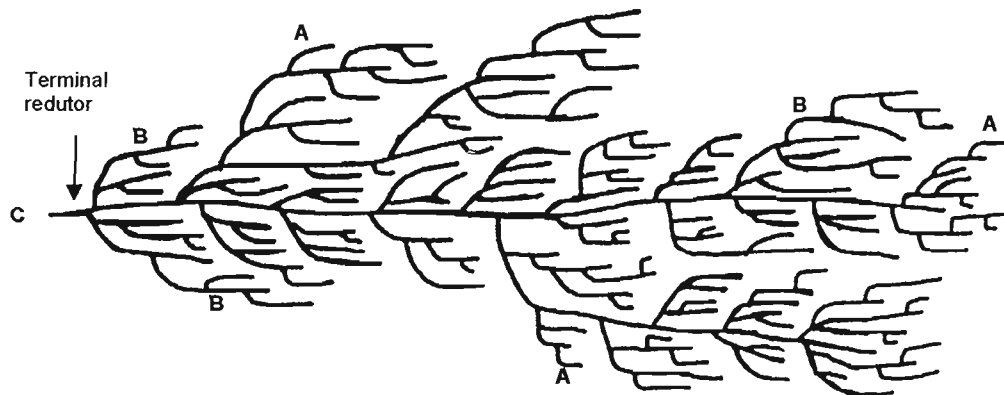


Figura 3: Representação esquemática dos três tipos de cadeias presentes na estrutura ramificada da amilopectina: A: cadeias laterais curtas da amilopectina sem grupos OH no C₆ comprometidos; B: cadeias com um ou mais grupos OH no C₆ comprometidos; C: cadeia com grupo redutor.
Fonte: Adaptado de MANNERS (1989).

A estrutura fina da amilopectina tem sido assunto de pesquisas durante os últimos anos. Vários modelos estruturais têm sido propostos para explicar a maneira como as cadeias unitárias agregam-se para proporcionar estrutura altamente ramificada (WANG et al., 1993; MYERS et al., 2000).

De acordo com Buléon et al. (1998), o conceito mais aceito sobre a estrutura da amilopectina foi o proposto por Robin et al. (1974) e French (1973). Eles propuseram um modelo em que os *clusters* associados por cadeias A passariam a constituir uma camada cristalina resistente à hidrólise ácida (WHISTLER; BeMILLER, 1997; PARKER; RING, 2001). Já as áreas alternadas entre os sucessivos *clusters* conteriam a maior parte das ramificações em $\alpha(1-6)$ e seriam bem mais susceptíveis à hidrólise, sendo denominadas de camadas amorfas (Figura 4B). Repetidas camadas cristalinas e amorfas apresentam uma espessura de 9-10 nm. No entanto, existem outros modelos propostos (MANNERS; MATHERSON,

1981; HIZUKURI, 1985; BERTOFT, 1989) e ainda não está claro se ele é aplicado a todas as estruturas de amilopectina independente da espécie vegetal.

Gallant, Bouchet e Baldwin (1997) sugeriram que estas camadas cristalinas e amorfas da amilopectina são organizadas dentro de estruturas esféricas, chamadas bloquetes (Figura 4C). O diâmetro desses bloquetes pode variar de 20 a 500 nm dependendo do tipo de amido e sua localização no grânulo e teria um papel importante na maior ou menor resistência dos amidos à ação enzimática.

O próximo nível de organização estrutural dentro do grânulo de amido seria a existência de características regiões cristalinas e semi-cristalinas, variando entre 120 a 500 nm de espessura, alternando-se repetidamente, formando os chamados anéis de crescimento (GALLANT; BOUCHET; BALDWIN, 1997). Cada região pode ser formada por 2 ou 3 camadas de bloquetes, que variam em tamanho e com o tipo de empacotamento (Figura 4D). Nas regiões cristalinas, os bloquetes seriam maiores (50-500 nm) do que nas semi-cristalinas (20-50 nm) e, nesta última, a cristalinidade da amilopectina seria reduzida, principalmente devido a seu maior envolvimento com a amilose.

Tang, Mitsunaga e Kawamura (2006) fizeram uma correlação entre bloquetes e os componentes do amido. De acordo com vários estudos realizados com amidos isolados de diferentes espécies vegetais encontrados na literatura, concluíram que os bloquetes apresentam formatos semelhantes, porém diferem em tamanho de acordo com a planta.

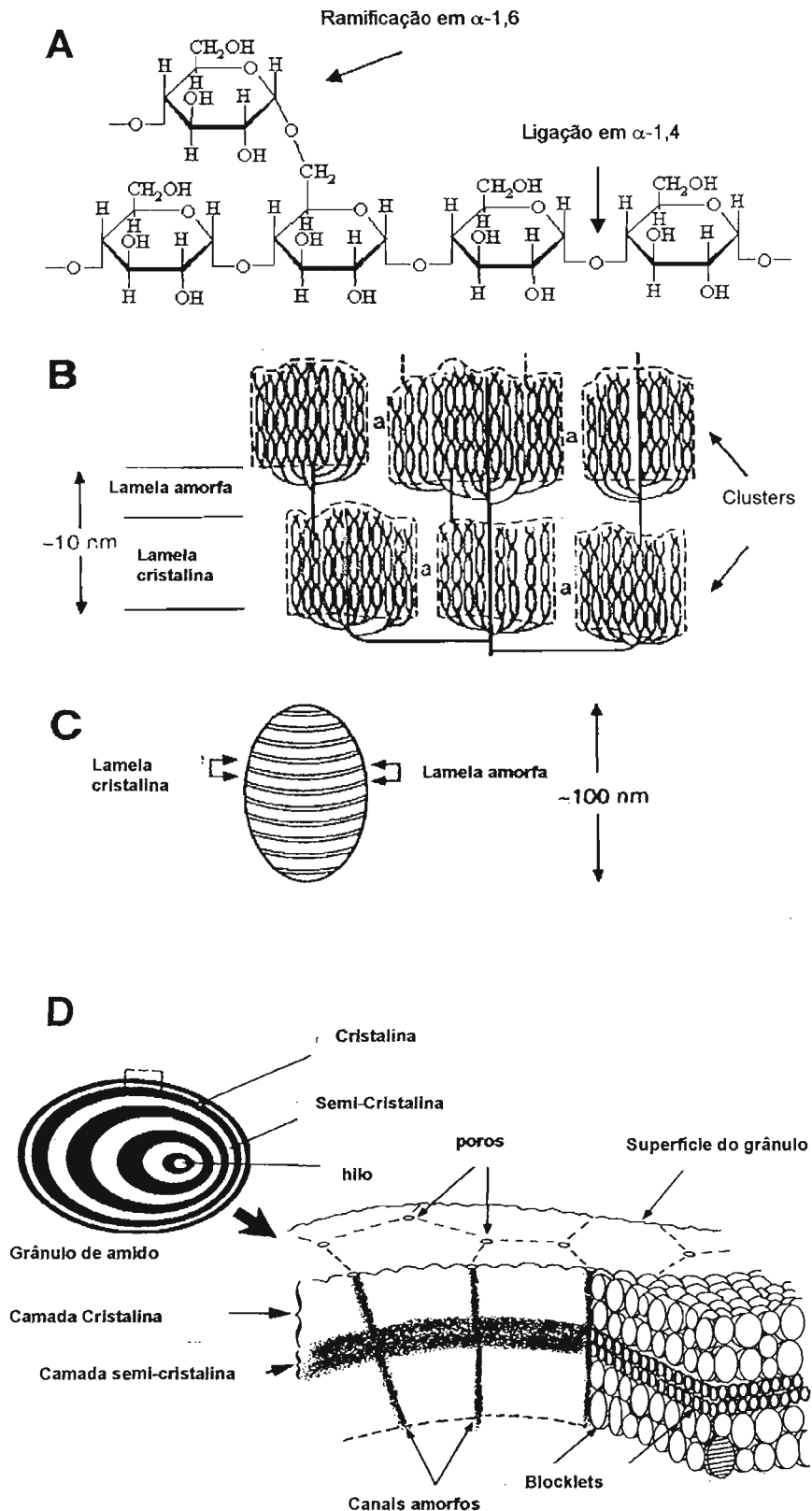


Figura 4: Estrutura da molécula da amilopectina e sua organização dentro do grânulo de amido. A) ligações α -1,4 e α -1,6 na molécula de amilopectina. B) representação da estrutura de um cluster. C) Representação de um bloquete. D) Formação dos anéis de crescimento no grânulo de amido.

Fonte: Adaptado de MYERS et al. (2000) e GALLANT; BOUCHET; BALDWIN (1997).

Estudos de degradação enzimática nos grânulos de amido feitos por Gallant et al. (1992) usando Microscopia Eletrônica de Varredura (SEM), indicaram que grânulos de amido mais resistentes apresentam bloquetes maiores do que os amidos menos resistentes.

De acordo com Gallant et al. (1982) e Glaring, Koch e Blennow (2006), a constituição estrutural das regiões amorfas e cristalinas do grânulo de amido nativo podem ser estudadas por Difractometria de Raios-X, sendo este o melhor método para investigação das regiões cristalinas. Por este método, o grânulo de amido pode ser dividido em dois grupos: amidos do tipo A e amidos do tipo B. No primeiro encontram-se os amidos de cereais que, em geral, são constituídos por baixos teores de fósforo e cadeias curtas de amilopectina. Amidos desta classe apresentam um padrão de Raios-X tipo A, consistindo de duplas hélices dispostas em arranjo monocíclico, ou seja, moléculas de amilopectina densamente empacotadas resultando em alta cristalinidade. No segundo grupo estão classificados os amidos de tubérculos como a batata, com altos níveis de fosfato e cadeias longas de amilopectina, e amidos com alto teor de amilose, como o amido da banana. Estes amidos produzem padrões de Raios-X tipo B, consistindo de uma estrutura aberta e altamente hidratada, com duplas hélices dispostas em arranjo hexagonal (GALLANT; BOUCHET; BALDWIN, 1997; WHISTLER; BeMILLER, 1997; KOSSMANN; LLOYD, 2000; BLENNOW et al., 2000a, b; PARKER; RING, 2001; GLARING; KOCH; BLENNOW; 2006). Amidos de leguminosas exibem um padrão tipo C, considerado por alguns autores como uma mistura dos tipos A e B.

Grânulos de amido de diferentes espécies vegetais podem apresentar grau de cristalinidade variando de 15 a 45%. A cristalinidade tem um papel fundamental na arquitetura do grânulo e nas propriedades físico-químicas, principalmente quanto à

susceptibilidade do amido a ação enzimática (TANG; MITSUNAGA; KAWAMURA, 2006).

Parece existir correlação entre a distribuição de comprimento de cadeias de amilopectina e o grau de cristalinidade do amido (McPHERSON; JANE, 1999; YOO; JANE, 2002; GLARING; KOCH; BLENNOW, 2006). Amidos do tipo A apresentam cadeias ramificadas mais curtas de amilopectina e estas são espalhadas e localizadas em regiões cristalinas e amorfas enquanto que em amilopectinas de amido tipo B há poucas ramificações curtas sendo a maioria *clusters* em regiões amorfas, e mais ramificações longas. Amidos do tipo C contêm amilopectinas com ambos os comprimentos de ramificações, longas e curtas.

Já é consenso que a amilopectina é a responsável pela cristalinidade do amido, não existindo evidências de que a amilose tenha participação nessa característica, uma vez que, em amidos cerosos (compostos de aproximadamente 100% de amilopectina), apresentam o mesmo padrão de difração de Raios-X que os amidos normais (CUI; OATES, 1999; PARKER; RING, 2001).

Os grânulos de amido têm sido submetidos a investigações estruturais por um longo período. A microscopia aparece como uma ferramenta importante nos estudos destas características estruturais nos grânulos de amido. Uma variedade de técnicas microscópicas tem sido utilizada e novas metodologias vêm sendo desenvolvidas na tentativa de um melhor entendimento da estrutura do grânulo de amido. Entre elas podemos destacar a microscopia óptica, microscopia eletrônica de varredura e de transmissão, microscopia de varredura confocal a laser, microscopia eletrônica de alta resolução, microscopia de força atômica, que são utilizadas no estudo da morfologia e estrutura do grânulo (GALLANT; BOUCHET; BALDWIN, 1997).

A Microscopia Óptica é muito utilizada na identificação do tipo de amido, no formato e tamanho dos grânulos. Com o uso da Microscopia Eletrônica de Varredura (SEM) é possível obter uma caracterização morfológica detalhada da superfície do grânulo. Quando esta técnica é usada em conjunto com a Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM), a visualização da estrutura dos bloquetes no amido torna-se possível (GLARING; KOCH; BLENNOW, 2006).

Baker, Miles e Helbert (2001) relataram que estudos realizados por SEM com amido de trigo, revelaram que o diâmetro dos bloquetes variava de acordo com a região em que estava localizado, sendo que bloquetes pequenos com tamanho de aproximadamente 25 nm foram encontrados nas camadas semi-cristalinas do amido, e estruturas maiores com tamanhos de 80-120 nm nas regiões cristalinas. Já no amido de batata foram visualizados bloquetes com tamanhos variando de 200–500 nm. A Microscopia de Força Atômica é uma técnica recente e tem sido utilizada na obtenção de imagens da superfície dos grânulos. Com o emprego desta técnica, os mesmos amidos citados anteriormente foram visualizados sendo possível observar depressões de 10–50 nm no amido de trigo, e depressões maiores e esféricas na superfície do amido de batata (200–500 nm). Essas dimensões observadas são consistentes com a idéia de que as depressões na superfície e os bloquetes observados anteriormente no grânulo apresentam as mesmas estruturas.

Observações feitas por FRENCH em 1973, utilizando amido de batata, relataram que ao redor do hilo existia uma série de camadas concêntricas semicristalinas e amorfas, de alto e baixo índice refrativo, densidade, cristalinidade, e resistência aos ataques químico e enzimático, denominadas anéis de crescimento. Segundo o autor, a região do hilo é menos organizada que o resto do grânulo. Pilling e Smith (2003) também observaram estes anéis após tratamento do grânulo de

amido com ácido ou enzimas degradativas. Anos mais tarde, com o uso da Microscopia de Varredura Confocal a Laser puderam ser visualizados com maior clareza: a forma como os anéis de crescimento estavam dispostos radialmente, o tipo de corrosão e o teor de proteína. Glaring, Koch e Blennow (2006) utilizaram esta técnica, utilizando um corante fluorescente para visualização da distribuição de amilose e da amilopectina nos grânulos de amido obtidos de diferentes espécies vegetais. Os resultados mostraram que, para o amido de batata, os anéis de crescimento estavam localizados ao redor do hilo excêntrico. Quando o estudo foi feito em amido de batata com alto teor de amilose, as imagens revelaram um hilo rodeado por espessos anéis de crescimento seguindo em direção à superfície. O mesmo amido com alto teor de amilopectina mostrou que os anéis de crescimento não foram vistos com facilidade no grânulo, exceto ao redor do hilo, sugerindo que a amilose está localizada no centro do grânulo.

Segundo Glaring, Koch e Blennow (2006), o teor de amilose no amido parece ser um fator determinante na integridade e estrutura do grânulo, já que em amido de milho ceroso foram observadas rachaduras, principalmente radiais, sugerindo menor estabilidade nas interações entre as moléculas de amilopectina arranjadas radialmente.

1.3 Outros constituintes do grânulo de amido

Além dos componentes macromoleculares, a amilose e a amilopectina, podem aparecer outros constituintes associados que, embora estejam presentes em quantidades muito pequenas, exercem grande influência nas propriedades físicas e químicas do amido. Os mais comuns são água, lipídios, cinzas, proteínas e minerais

(fósforo). A presença de fósforo em amidos desempenha um importante papel nas suas propriedades funcionais e na utilização do amido para determinados fins. Os grupos fosfatos geralmente encontram-se ligados à molécula de amilopectina (LIM; KASEMSUWAN; JANE, 1994). As proteínas e os lípidos são bem mais abundantes e, tecnologicamente, mais importantes, sendo que a quantidade exata destes componentes associados ao amido é variável e dependente da espécie vegetal analisada, da metodologia de extração e do grau de purificação do amido (BALDWIN, 2001). Os lípidios, quando associados ao grânulo de amido, são responsáveis pela fixação de cor, pelo desenvolvimento de aromas e pela formação de complexos com a amilose.

As proteínas associadas aos grânulos de amido são hoje classificadas em dois tipos: proteínas de reserva (ex. glúten e gliadina, com PM < 20 kDa) que podem estar aderidas a superfície do grânulo em decorrência do processo de extração, e as proteínas associadas ao grânulo de amido (SGAPs-starch granule-associated proteins), que são biologicamente distintas das proteínas de armazenamento das plantas e podem estar ligadas tanto a superfície quanto presentes no interior do grânulo de amido. As proteínas associadas ao grânulo podem ainda ter atividade enzimática e estar associadas à síntese e/ou à degradação do amido (BALDWIN, 2001).

Uma das mais importantes e mais abundantes proteínas associadas ao amido é uma isoforma da amido-sintase (SGBSS I – starch granule bound starch synthase isoform 1), de aproximadamente 60 kDa. Inicialmente, foi encontrada somente ligada ao grânulo sendo considerada a responsável pela síntese de amilose no amido, já que sua ausência resultava na biossíntese de grânulos contendo somente amilopectina (BALDWIN, 2001; HAN; HAMAKER, 2002; PENG et al., 2004). No

entanto, estudos de imunolocalização revelaram que esta proteína estava localizada tanto na superfície quanto no interior do grânulo, em um padrão similar ao dos anéis concêntricos do amido. Outra isoforma da amido-sintase (~70 kDa), encontrada no amiloplasto, uma amido sintase solúvel (SSS – soluble starch synthases), agindo conjuntamente com as enzimas ramificadoras do amido (SBE – starch branching enzymes), são responsáveis pela síntese de amilopectina (BALDWIN, 2001; BORÉN et al., 2004). Outra abundante proteína de 30 kDa, inicialmente considerada como SGAP de superfície, foi posteriormente encontrada também em grandes quantidades distribuídas aleatoriamente no interior do grânulo (BALDWIN, 2001).

Ritte et al. (2000b), identificaram uma proteína de 160 kDa, denominada Proteína-R1, em folhas e tubérculos de batata. Em folhas, esta proteína foi encontrada ligada somente à superfície do grânulo tendo participação na degradação do amido. Em batata, a Proteína-R1 foi encontrada internamente ao grânulo sendo considerada a responsável pela fosforilação da amilopectina no amido. A repressão da expressão da Proteína-R1 na batata mostrou uma considerável redução na quantidade de fosfato ligado ao amido. A repressão genética da R1 em *Arabidopsis* diminuiu o grau de fosforilação do amido e aumentou o teor de amido das folhas (LORBERT et al., 1998). À época, o conjunto de resultados permitiu aos pesquisadores de afirmar que a R1 seria uma enzima envolvida na fosforilação do grânulo de amido e que talvez a fosforilação fosse importante no processo de degradação do amido (YU et al., 2001). Em 2002, Ritte et al. demonstraram que a Proteína-R1 catalisa a transferência do β -fosfato proveniente do ATP para os resíduos de glicose da amilopectina na posição C₆, na presença de água, numa reação do tipo diquinase. A Proteína-R1 foi então denominada de α -glicano-água-diquinase (EC 2.7.9.4 – Glucan Water Dikinase,

GWD), que catalisa a reação tendo como substratos um α -poliglicano, ATP e H₂O, produzindo α -poliglicano-P, AMP e ortofosfato.

Através de pesquisas realizadas para tentar identificar proteínas capazes de se ligar ao grânulo de amido já fosforilado, uma segunda enzima foi identificada, capaz de fosforilar exclusivamente a posição C₃ da amilopectina, sendo denominada de PWD (phosphoglucan, water dikinase), já que para se tornar ativa, é necessário que a GWD já tenha atuado anteriormente.

Recentemente Zeeman, Smith e Smith (2007) relataram que, em *Arabidopsis*, a fosforilação do amido é essencial para que outras enzimas como exoamilases e enzimas desramificadoras atuem. Embora a enzima tenha sido encontrada ligada ao grânulo do amido, Ritte et al. (2000) detectaram também, através de imunofluorescência, a enzima solúvel no citosol. Eles verificaram, em cortes de tubérculo de batata incubados com o anticorpo produzido contra R1, que a marcação fluorescente estava localizada ao redor dos grânulos. No entanto, a intensidade da fluorescência foi maior para a proteína solúvel. Deste modo, pode-se afirmar que dependendo da localização desta proteína, ligada à superfície do grânulo de amido em folhas de batata ou em *Arabidopsis*, encontrada internamente ao grânulo de amido de batata, ou ainda, encontrada solúvel no plastídio deste, ela pode ter funções específicas.

1.4 A degradação enzimática do amido na banana

As características estruturais do grânulo de amido como tipo de cristalinidade, porosidade da superfície, material adsorvido ao amido, estrutura e tamanho, lipídeos

e proteínas são as principais responsáveis pelas variações de susceptibilidade do grânulo a ação de enzimas degradativas.

Entre as enzimas cujas atividades já foram detectadas em extratos de banana, em vários estágios de amadurecimento, estão as amilases (α e β -amilases, isoamilases), as glicosidases (α ,1-4 e α ,1-6), as fosforilases (citosólica e plastidial), a sacarose fosfato sintase e a sacarose-sintase (ARÊAS; LAJOLO, 1981; GARCIA; LAJOLO, 1988; SEYMOUR; TAYLOR; TUCKER, 1993; CORDENUNSI; LAJOLO, 1995; NASCIMENTO; CORDENUNSI; LAJOLO, 1997; MOTA et al., 2002; PURGATTO et al., 2001; BIERHALS et al., 2004; NASCIMENTO et al., 2006). Embora todas elas possam estar envolvidas na degradação do amido da banana, algumas delas, embora tenham atividade, podem não ser importantes e outras, ainda não detectadas, podem ser fundamentais para o processo.

1.4.1 α -amilase

A α -amilase (E.C. 3.2.1.1) possui atividade endoamilolítica hidrolisando aleatoriamente as ligações glicosídicas α -1,4 da amilose e amilopectina produzindo uma mistura de oligossacarídeos, maltose, glicose e dextrinas. É creditada à α -amilase a responsabilidade de ser a única enzima capaz de iniciar o ataque ao grânulo de amido em cereais, promovendo alterações marcantes no grânulo e fornecendo ou aumentando a disponibilidade de substrato para outras enzimas degradativas (BECK; ZIEGLER, 1989).

A velocidade de ação desta enzima é extremamente dependente das suas propriedades cinéticas, de outras enzimas degradativas, da espécie vegetal e do tamanho do grânulo de amido. Garcia e Lajolo (1988) detectaram a atividade de 3 α -

amilases durante o amadurecimento de bananas, que apresentaram um sensível aumento da atividade até atingir o pico climatérico, momento em que grande parte do amido já havia sido degradado. Bassinello, Cordenunsi e Lajolo (2002), obtiveram resultados semelhantes durante o amadurecimento de bananas, em que o pico de atividade da enzima foi concomitante à degradação do amido no fruto.

Reimann et al. (2002; 2007) estudaram o papel das enzimas α -amilase, β -amilase e R1 no grânulo de amido isolado de turions de *Spirodela polyrhiza*. Eles verificaram que a α -amilase estava presente em maiores quantidades na forma solúvel do que associada ao grânulo. No entanto a ligação específica destas proteínas à superfície do amido teve alta correlação com a taxa de degradação do amido, demonstrando ser essencial para o início do processo. Parece que a degradação do amido em turions não necessita de altos níveis da enzima ligada ao grânulo. Uma vez que a enzima inicia a degradação do amido, ela é rapidamente liberada, sendo fundamental somente durante o ataque inicial. Outro dado verificado, é que a quantidade de enzima ligada ao grânulo é totalmente dependente do teor de fosfato na superfície, já que esta enzima se liga somente à superfície.

No entanto, outras questões ficam por ser respondidas em turions, como a exata localização da α -amilase, se está presente no citosol e de alguma forma ganha acesso ao grânulo ou se a isoforma plastidial é ativada na associação ao grânulo. Reimann, Ziegler e Appenroth (2007) relatam que algumas α -amilases possuem um domínio de ligação ao amido que pode facilmente aderir à superfície do grânulo, facilitando a ação da enzima na digestão do amido pelo sítio catalítico. Vieira-Júnior, Nascimento e Lajolo (2006) relataram que os altos níveis de atividade hidrolítica detectados na polpa da banana concomitante com a degradação do amido

podem ser atribuídos a α -amilase, que provavelmente tem um peptídeo de endereçamento específico para o amiloplasto.

Witt e Sauter (1996) purificaram uma α -amilase de batata que tinha a habilidade de se ligar ao grânulo e ainda degradá-lo *in vitro*. Estes resultados sugerem que esta enzima apresenta sítios de ligação facilmente acessíveis principalmente aos grânulos danificados, que foram mais rapidamente degradados.

Com o conhecimento que se tem hoje, embora ainda não se possa atribuir à α -amilase o início da degradação do amido da banana, também não se pode ainda descartá-la como sendo importante nesse processo.

1.4.2 β -amilase

A β -amilase (E.C.3.2.1.2), possui atividade exoamilolítica, hidrolisando somente a penúltima ligação glicosídica $\alpha(1-4)$ da extremidade não redutora de glicanos lineares, liberando moléculas de β -maltose. Existem dois modelos que explicam o modo de ação da β -amilase na degradação do amido: a enzima pode se ligar ao grânulo, participando diretamente da degradação, ou localizar-se no estroma do plasto e degradar glicanos lineares solúveis produzidos por outras enzimas (CORDENUNSI, 2004; KAPLAN; SUNG; GUY, 2006).

Para a proteína estar envolvida diretamente na degradação do amido, é necessário que ela esteja localizada no plastídio. Scheidig et al. (2002) demonstraram que a β -amilase de batata é plastidial. Kaplan e Guy (2005) mostraram que, quando a expressão da isoforma plastidial é reprimida em *Arabidopsis*, o resultado é a obtenção de folhas com excesso de amido. O mesmo foi observado em batata (SCHEIDIG et al., 2002).

Em *Arabidopsis*, a principal via proposta é uma degradação progressiva da superfície do grânulo pela β -amilase seguida pela ação de uma enzima desramificadora, tipo isoamilase. E para que esse processo ocorra, a fosforilação do grânulo pela GWD é um pré-requisito (ZEEMAN; SMITH; SMITH, 2004; ZEEMAN; SMITH; SMITH, 2007).

Kaplan, Sung e Guy (2006) relataram que a atividade e os níveis de transcritos da β -amilase em *Arabidopsis* são aumentados durante estresse pelo frio, tendo como resultado um acúmulo de maltose. No entanto, várias isoformas da β -amilase são localizadas extra-plastidialmente. E nem sempre o peptídeo de trânsito específico para plastídio pode ser detectado na seqüência primária de aminoácidos, tornando difícil identificar a exata localização da enzima em várias espécies de plantas.

Purgatto et al. (2001) e Nascimento et al. (2006), observaram que a atividade enzimática e o nível de transcrito de β -amilase aumentaram durante o amadurecimento da banana, indicando a importância dessa enzima no processo de degradação do amido deste fruto. Outra evidência encontrada por Purgatto et al. (2001) é que, quando fatias de banana foram infiltradas com ácido indol-3 acético (capaz de atrasar o amadurecimento de bananas) a atividade enzimática e o nível de transcrito da enzima foram diminuídos e a degradação do amido atrasada em 7 dias quando comparada a amostras controle.

1.4.3 Glicosidases, enzimas fosforolíticas e desramificadoras

As α -glicosidases (E.C.3.2.1.10) são enzimas conhecidas por degradar maltose liberadas pela β -amilase, produzindo duas moléculas de glicose. No

entanto, já foi demonstrado que as α -glicosidases são enzimas que podem atuar sobre glucanos maiores como amido e amilopectina, não descartando a possibilidade desta enzima atuar diretamente na degradação do amido, não apenas sobre produtos de degradação de outras enzimas.

As amido-fosforilases (E.C.2.4.1.1) atuam nas ligações $\alpha(1-4)$ das extremidades não redutoras do amido, liberando glicose-1-fosfato. Estas enzimas atuam tanto no sentido de síntese quanto na degradação do amido. Duas formas da enzima de diferentes plantas foram purificadas e caracterizadas, sendo que uma forma está localizada no plastídio e a outra no citosol. De acordo com MOTA et al. (2002), uma das isoformas da fosforilase (a fosforilase H ou citosólica, 90,6 kDa), apresenta maior afinidade por glucanos ramificados e substratos de alto peso molecular, enquanto a isoforma L ou plastidial (112 kDa), parece ter afinidade por substratos de baixo peso molecular.

As enzimas desramificadoras (DBE – Debranching enzymes), atuam na desramificação de polímeros que apresentam ligações glicosídicas em $\alpha(1-6)$. De acordo com a especificidade pelo substrato, elas foram divididas em duas classes: pululanases (microrganismos) ou dextrinases limite (vegetais) (E.C.3.1.2.41), que atuam nas ligações $\alpha(1-6)$ de pululano, amilopectina e suas dextrinas, mas não agem sobre o glicogênio; e as isoamilases (E.C.3.1.2.68), que clivam as ligações $\alpha(1-6)$ da amilopectina e glicogênio, porém não atuam sobre o pululano (MANNERS, 1989). Acredita-se que a DBE seja muito importante durante o amadurecimento de frutos, uma vez que na molécula de amido, a quantidade de amilopectina é cerca de 4 vezes maior que a de amilose e um grande número de ligações $\alpha(1-6)$ precisam ser hidrolisadas. De acordo com Bierhals et al. (2004), a enzima desramificadora responsável pela hidrólise das ligações $\alpha(1-6)$ do amido, durante o amadurecimento

da banana é uma isoamilase com maior especificidade por β -dextrina limite e tamanho estimado de 80 kDa.

1.4.4 Modelos de degradação

Várias enzimas podem utilizar o amido ou seus subprodutos como substratos, o que indica que o processo de degradação parece seguir um padrão de corrosão axial, devido a ação de diversas enzimas (KAYISU; HOOD; VANSOEST, 1981; GARCIA; LAJOLO, 1988; ZHANG et al., 2005). A α -amilase teria uma ação inicial ao grânulo de amido, e a β -amilase, fosforilases e α -glicosidases, poderiam atuar sobre os produtos liberados pela ação das α -amilases, gerando os substratos necessários para a síntese de sacarose.

No entanto, atualmente existem dois modelos de metabolismo de amido propostos na literatura: um é baseado na degradação do grânulo durante a germinação da semente em cereais, e o outro baseado na mobilização do amido transitório armazenado em folhas durante a noite (STEUP, 1988; ZEEMAN; SMITH; SMITH, 2007).

No primeiro modelo, a hidrólise do amido é relativamente bem entendida. Uma α -amilase inicia o ataque ao grânulo de amido insolúvel, hidrolisando as ligações internas α -(1-4) para liberar cadeias de glicose lineares e ramificadas. Esta ação pode facilitar o ataque ao grânulo por outras enzimas ou liberar fragmentos de glicose solúveis servindo como substrato para outras enzimas (KOSSMANN; LLOYD, 2000).

No amido transitório, existem indicações de que um mecanismo totalmente diferente esteja operando. Estudos realizados com *Arabidopsis* conferem à α -amilase

um papel menos importante. Parece que a provável via é uma degradação progressiva da superfície do grânulo por uma exo-amilase seguida por uma desramificadora, como já citado anteriormente. (ZEEMAN; SMITH; SMITH, 2004; ZEEMAN; SMITH; SMITH, 2007).

Apesar dos vários trabalhos relatados na literatura para tentar explicar a degradação do amido em cereais e em *Arabidopsis*, nenhuma informação consta quanto à ação de quais enzimas estariam ligadas à degradação do amido durante amadurecimento de frutos.

Estudos de grânulos de amido isolados de banana utilizando técnicas em microscopia mostram que existe uma grande variedade de tamanhos e formatos, tanto em amidos isolados de banana verde quanto de banana madura, mas, em geral, os menores têm formatos predominantemente arredondados, enquanto os maiores são mais alongados. Devido a grande diversidade de tamanho, eles podem ser classificados em grânulos grandes (comprimento compreendido entre 300 e 110 μm), médios (70 a 110 μm) e pequenos (menores que 70 μm) (CORDENUNSI, 2004).

Nota-se também em amido isolado de banana verde, a existência de uma superfície aparentemente mais lisa do que no amido de banana madura, uma vez que estrias paralelas aparecem. É provável que algumas regiões sejam mais difíceis de serem hidrolisadas do que outras, e que os grânulos menores desaparecem mais rapidamente durante o amadurecimento do que os grânulos maiores, devido a maior área superficial (KAYISU; HOOD; VANSOEST, 1981; ZHANG et al., 2005).

A elucidação da estrutura química e física do grânulo de amido aliada à atividade das enzimas que degradam o amido e ao perfil de proteínas associadas ao grânulo de amido, podem fornecer subsídios para o conhecimento do metabolismo

amido-sacarose na banana. Assim, a proposta deste trabalho foi a de estudar as características estruturais do grânulo do amido de banana bem como a atuação de algumas enzimas que degradam o grânulo de amido.

2 OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi o de estudar as características estruturais dos grânulos de amido bem como a atuação de algumas enzimas envolvidas em sua degradação, buscando um melhor entendimento da composição e arquitetura do grânulo e das vias enzimáticas envolvidas em sua degradação.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material

Amostra

Bananas (*Musa acuminata* AAA cv. Nanicão) com no máximo 1 dia pós-colheita foram obtidas no entreposto terminal de São Paulo (CEAGESP - Jaguaré/Magário). Antes da armazenagem em condições controladas, os frutos foram lavados com solução comercial de hipoclorito de sódio (0,1%) e secos com papel. Dois experimentos conduzidos em diferentes ocasiões foram feitos como descritos a seguir. Nos dois casos os frutos foram amostrados durante toda a fase de amadurecimento. Para que cada amostra fosse representativa (homogênea) do estágio de amadurecimento, a cada dia de armazenamento, vários frutos tiveram o teor de etileno e de CO₂ medidos e a amostra a ser congelada era constituída somente por frutos que tivessem teores semelhantes de gases. Os frutos pertencentes a uma amostra foram reunidos, descascados, picados em nitrogênio líquido e armazenados a -80°C.

3.1.2 Primeiro experimento: Efeito do etileno e do 1-MCP no amadurecimento da banana

Aproximadamente 500 frutos foram utilizados neste experimento. As pencas de banana foram divididas aleatoriamente em 3 caixas de polietileno (56 L) com

tampa que, após tratamento dos frutos, foram completamente vedadas com borracha auto-colante, pelo tempo especificado a seguir.

Grupo Etileno: Os frutos a serem submetidos ao tratamento com etileno foram hermeticamente fechados na caixa, que continha entrada e saída para gás e tratados com etileno 100 $\mu\text{L/L}$ (100 ppm) em fluxo contínuo (8 L/min). Após 5 horas, o suprimento de etileno foi fechado e os frutos permaneceram por mais 7 horas fechados no recipiente contendo o gás. Terminado o tratamento, os frutos foram ventilados e armazenados em câmara BOD ($20^{\circ}\text{C} \pm 2$ e umidade $75\% \pm 5$).

Grupo 1-MCP: Os frutos a serem submetidos a tratamento com 1-metilciclopropeno (1-MCP) foram hermeticamente encerrados numa caixa de polietileno contendo 100 nL/L (100 ppb) de 1-MCP (Ethylbloc, Rhom e Haas, Co). A liberação do gás foi feita pela adição de água ao 1-MCP sólido contido num béquero no interior da caixa. Após 12 horas de tratamento (conforme instruções do fabricante), os frutos foram armazenados nas mesmas condições que o grupo etileno.

Grupo Controle: Os frutos controle foram submetidos às mesmas condições de tempo de encerramento em caixa e armazenamento em BOD que os tratados.

3.1.3 Segundo experimento: Efeito da baixa temperatura e etileno x baixa temperatura sobre o amadurecimento de bananas

Aproximadamente 500 frutos foram usados para o experimento. Eles foram divididos aleatoriamente em pencas e separados em 3 grupos (grupo controle, grupo frio e grupo etileno + frio), como descrito a seguir e sumarizado na Tabela I.

Grupo Frio: Uma parte dos frutos foi armazenada a 13°C por 17 dias, quando a temperatura do armazenamento foi aumentada para 18°C até o completo amadurecimento.

Grupo Etileno + Frio: Parte dos frutos foi encerrada hermeticamente em caixa de polietileno (56 L) contendo entrada e saída para gás e submetidos a tratamento com etileno 100 µL/L (100 ppm) em fluxo contínuo (8 L/min) por 2 horas, quando o suprimento do etileno foi fechado. Os frutos permaneceram por mais 10 horas no recipiente contendo o gás, à temperatura ambiente. Após este período, os frutos armazenados em câmara BOD a 13°C por 17 dias e, em seqüência, a 18°C até o amadurecimento.

Grupo Controle: Os frutos foram armazenados em câmara BOD a 18°C até o completo amadurecimento.

Tabela I: Tratamentos e formas de armazenamento que os frutos foram submetidos

Grupo	Tratamento	Armazenamento após tratamento
Controle		18°C até o completo amadurecimento.
Frio	frutos armazenados a 13°C por 17 dias	
Etileno + Frio	frutos tratados com etileno por 12 h armazenados a 13°C por 17 dias.	

3.2 Métodos

3.2.1 Determinação de CO₂ e etileno

A produção de CO₂ e o etileno foram estimados utilizando-se cromatógrafo a gás (Hewlett-Packard modelo GC-6890) equipado com detector de ionização de

chamas (FID) para detecção de etileno e detector de condutividade térmica (TCD) para o CO₂. A coluna utilizada foi HP-Plot Q (30 m, D.I. 0,53 mm). A injeção dos gases foi feita manualmente.

No primeiro experimento, 12 frutos de cada tratamento foram acondicionados em 4 frascos de 1,5 L cada e lacrados por 1 hora, para que as amostras dos gases fossem retiradas. No segundo experimento, foram usados 5 frascos de 3,265 L para cada tratamento contendo em média 4 frutos por frasco. As medidas de CO₂ e etileno foram realizadas diariamente durante todo o período de amadurecimento dos frutos.

3.2.2 Determinação de carboidratos

3.2.2.1 Açúcares solúveis

Os açúcares solúveis totais (glicose, frutose e sacarose) foram extraídos de aproximadamente 1 g de amostra triturada em nitrogênio líquido em 5,0 mL de etanol 80%. As amostras foram agitadas por 15 minutos em banho a 80°C e em seguida centrifugadas a 11952 x g por 10 min. O sobrenadante foi recolhido em balão de 25 mL e o precipitado extraído por mais 2 vezes. Os sobrenadantes foram combinados e o volume ajustado com etanol 80%. Uma alíquota de 1 mL foi retirada e o etanol evaporado em sistema speed-vac a baixas temperaturas (45°C). O volume foi reconstituído com água. Os açúcares solúveis foram determinados por CLAE (DIONEX, modelo DX500), utilizando-se coluna de troca iônica CARBOPAC PA 1 (4 mm x 250 mm), e detector amperométrico de pulso. A fase móvel utilizada foi 100% de NaOH 18 mM a um fluxo de 1,0 mL/min.

3.2.2.2 Determinação de Amido

A determinação do amido foi feita por método enzimático como descrito por Arêas e Lajolo (1981). Cerca de 0,5 g de amostra previamente triturada em nitrogênio líquido, foi homogeneizada em 5 mL de NaOH 0,5 M em sistema Potter por 5 minutos. O homogenato foi neutralizado com 5 mL de ácido acético 0,5 N e em seguida transferido para um balão volumétrico de 25 mL. O amido contido em 1 mL foi precipitado com etanol absoluto e centrifugado a 12000 x g por 15 minutos. O precipitado foi lavado por 2 vezes com etanol 80%. O amido precipitado foi seco e hidrolisado com 1 mL de amiloglicosidase (14 U/mL, pH 4,8) a 37°C por 2 horas. A reação foi finalizada com 100 µL de ácido perclórico 0,6 N e a glicose resultante foi quantificada pelo sistema glicose oxidase/peroxidase/ABTS [2,2'-azino-di-(3-etilbenzotizolina)-6-sulfonato], segundo Bergmeyer (1974). Glicose foi utilizada como padrão.

3.2.3 Isolamento dos grânulos de amido

O isolamento do amido foi feito de acordo com RITTE et al. (2000b), com algumas modificações. Aproximadamente 50 g de amostra foi homogeneizada em cerca de 200 mL de tampão de extração (HEPES-KOH 100 mM, pH 8,0 contendo EDTA 1,0 mM, DTT 5,0 mM e Triton X-100 0,05%) por 2 minutos com auxílio de um homogeneizador tipo Waring blender. O homogenato foi filtrado em 3 camadas de membranas de Miracloth e o resíduo lavado várias vezes (com aproximadamente 500 mL do tampão) até a obtenção de um filtrado translúcido. O filtrado foi deixado em repouso *overnight* a 4°C e parte do sobrenadante resultante foi descartado. A

solução contendo o amido decantado foi colocada no topo de uma solução contendo 95% de Percoll e 5% de HEPES-KOH 0,5 M, pH 7,0, deixado em repouso por 30 minutos a 4°C e em seguida centrifugado por 15 minutos a 2000 x g. O precipitado com os grânulos de amido foi lavado 2 vezes com o tampão de extração e o amido seco em speed-vac. O amido obtido foi armazenado a -20°C.

3.2.4 Determinação do teor de proteína

A proteína foi determinada pelo método de Bradford (1976), utilizando kit específico da Bio-Rad. A 20 µL do extrato protéico foram adicionados 980 µL de água e 200 µL do reagente Bio-Rad. Após incubação por 5 minutos a temperatura ambiente, a absorbância foi lida a 595 nm. Albumina soro bovina foi utilizada como padrão.

3.2.5 Eletroforese em condições não-desnaturantes (PAGE nativo)

3.2.5.1 Utilizando amilopectina como substrato

As eletroforeses em condições não-desnaturantes foram feitas em géis de acrilamida (6%, 7,5% ou 8%, com 1,5 mm de espessura), adicionados de amilopectina como substrato em diferentes concentrações (0,1%, 0,2% ou 0,3%), para revelar a atividade das enzimas que degradam o amido. O tampão de corrida foi Tris 25 mM, pH 8,3, glicina 192 mM (HAMES; RICKWOOD, 1990). A eletroforese ocorreu a 100 V. Com exceção da eletroforese em que o amido em suspensão foi aplicado diretamente ao gel, a voltagem utilizada foi de 50 V inicialmente (até o

corante atingir o gel de separação) e em seguida aumentada para 200 V. Todo o processo ocorreu à temperatura de 4°C. Após a corrida, os géis obtidos, foram lavados por duas vezes (15 minutos cada) com tampão Tris-HCl 100 mM (pH 7,0), contendo MgCl₂ 1mM, DTT 1mM e CaCl₂ 1mM e incubados overnight no mesmo tampão com agitação moderada a 20°C. Os géis foram corados com solução aquosa de iodeto (I₂ 13 mM e KI 40 mM) para revelar as bandas protéicas com atividade amilásica.

Algumas amostras foram aplicadas em duplicata de PAGE-nativo (6%) contendo amilopectina (0,3%) e, após a corrida, uma banda com atividade foi recortada e tratada com tampão desnaturante (LAEMMLI, 1970) por 15 minutos, para ser transferida para eletroforese em condições desnaturantes (item 3.2.6). A outra duplicata do gel foi revelada por coloração com solução aquosa de iodeto (I₂ 13 mM e KI 40 mM).

3.2.5.2 Utilizando glicogênio como substrato

PAGEs-nativos (6% ou 7,5%, 1,5 mm de espessura) também foram realizados usando glicogênio (0,025% e 0,1%), como substrato, para revelar a atividade das isoformas de fosforilases. Após a corrida a 100 V o gel foi incubado por 2 horas a 30°C em tampão Tris-maleato 20 mM, pH 6,0 contendo glicose-1-fosfato 15 mM, NaF 5mM e amido solúvel 1% e em seguida corados com solução aquosa de iodeto (I₂ 13 mM e KI 40 mM).

3.2.5.3 Géis sem substrato para transferência eletroforética

De modo a identificar bandas protéicas que contivessem atividade hidrolítica sobre substratos específicos, foram realizadas eletroforeses em PAGE-nativo seguida de transferência eletroforética para géis contendo substrato, como descrito a seguir: dois PAGEs-nativos (8%) sem substrato foram corridos em duplicata da maneira usual para eletroforese não-desnaturante. Ao final da corrida, enquanto um dos géis foi corado para proteína (Comassie R-250), o outro foi colocado sobre a superfície de outro gel de poliacrilamida contendo amilopectina 0,1% ou 0,2%, e a eletrotransferência de proteínas ocorreu por 30 minutos a 30 V, sob refrigeração (STEUP; GERBLING, 1983). Após a transferência, o gel para o qual as proteínas foram transferidas foi incubado por 14 horas em tampão Tris-HCl 100 mM, pH 7,0 contendo $MgCl_2$ 1mM, DTT 1mM e $CaCl_2$ 1mM e, em seguida, corado com solução aquosa de iodeto (I_2 13 mM e KI 40mM). O gel utilizado na transferência foi corado com Coomassie R-250 para checar a eficiência da mesma.

Todos os géis sem substrato foram corados com solução de Coomassie Brilliant Blue R-250 a 0,1% e descorados em solução aquosa de ácido acético 7,5% e etanol 5%.

3.2.6 Eletroforese em condições desnaturantes (SDS-PAGE)

As eletroforeses em condições desnaturantes foram feitas em géis contendo 7,5% ou 8% de acrilamida com espessura de 0,75 mm ou 1,5 mm. O tampão de corrida foi Tris 25 mM, pH 8,3, glicina 192 Mm contendo 0,1% de SDS (dodecil sulfato de sódio) (HAMES; RICKWOOD, 1990). A eletroforese ocorreu a 200 V à

temperatura de 4°C. As eletroforeses em SDS-PAGE foram calibradas com padrões de peso molecular variando de 29 a 205 kDa.

Após a corrida, os géis foram corados para proteína com solução de Coomassie Brilliant Blue R-250 a 0,1% e descorados em solução aquosa de ácido acético 7,5% e etanol 5%. Alternativamente, foram corados com prata, utilizando-se um conjunto de reagentes fornecidos pela Bio-Rad (Bio-Rad Silver Stain Plus Kit) e a reação finalizada com solução aquosa de ácido acético (v/v) a 5%.

3.2.7 Western-blot

As proteínas foram separadas em SDS-PAGE 8% primeiramente (item 3.2.6) e em seguida transferidas eletroforeticamente para membranas de nitrocelulose (Amersham Hybond™ ECL™) em tampão Tris 25 mM, pH 8,3, glicina 192 mM e metanol 20%. A voltagem utilizada na transferência foi de 30 V por aproximadamente 16 horas a 4°C. Após a transferência, a membrana foi bloqueada com 10 mL de caseína 1% em tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM e 0,05% de Tween-20 com incubação por 1 hora a temperatura ambiente e agitação moderada. Em seguida, o tampão foi descartado e a membrana incubada novamente com 10 mL do mesmo tampão adicionado de anticorpo primário contra as amilases de banana (α -amilase 1:100 e β -amilase 1:125) por 2 horas. A membrana foi lavada 3 vezes (10 minutos cada) com 5 mL da solução salina sem Tween-20 e incubada novamente por 1 hora em 10 mL de tampão de trabalho (Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM e 0,05% de Tween-20) contendo caseína 1% e adicionado de anticorpo secundário Anti-Rabbit IgG, conjugado com fosfatase alcalina (Sigma) (1:30000). A membrana foi lavada novamente 3 vezes (10 minutos

cada) com 5 mL da solução salina sem Tween-20 e as bandas protéicas contidas na membrana reveladas por método cromogênico segundo Sambrook (1989), ou em substrato quimiluminescente utilizando o reagente Lumi-PhosTM WB (Pierce) por 15 minutos.

3.2.8 Extração de proteínas

3.2.8.1 Do grânulo de amido para determinação de atividade “*in vitro*”

A extração das enzimas ligadas ao grânulo foi feita de acordo com Ritte et al. (2000b). Resumidamente, 10,0 mL de tampão HEPES-KOH 50 mM, pH 7,0 contendo CaCl₂ 1 mM e benzamidina 1 mM foram adicionados a 200 mg de amido isolado. A suspensão foi agitada por 1h30min a 37°C e centrifugada por 3 minutos a 6000 x g. O sobrenadante foi concentrado em Centriprep-10 até um volume de aproximadamente 500 µL, em centrífuga a 4°C e 3000 x g. O extrato concentrado foi transferido para Centricon-10 e concentrado novamente até 200 µL a 5000 x g, ou ainda transferido para Microcon-3 até um volume de 50 µL a 14000 x g, dependendo do tipo de análise a ser feita. As etapas de concentração em Centriprep, Centricon e Microcon foram realizadas como descrito no manual do fabricante (Millipore Corporation, Bedford, MA 01730 U.S.A., 2000).

3.2.8.2 Do grânulo de amido para determinação de atividade em gel de poliacrilamida

Alguns experimentos de atividade em gel foram feitos utilizando-se o amido isolado, sem extração prévia da proteína, como descrito a seguir. Aproximadamente 50 μ L de tampão HEPES-KOH 50 mM, pH 7,0 contendo CaCl_2 1mM e benzamidina 1mM foram adicionados a 30 mg de amido para extração das proteínas ligadas ao grânulo. Após homogeneização em agitador tipo vortex, toda a suspensão contendo a amostra de amido foi aplicada diretamente ao gel.

3.2.8.3 Do grânulo de amido para eletroforese desnaturante

A extração de proteína total, proteína ligada à superfície do grânulo e proteína interna ao grânulo foi feita de acordo com Ritte, Lorberth e Steup (2000a).

Proteína Total: em que se extraem proteínas de superfície e do interior do grânulo, foi extraída pela adição de tampão desnaturante (Tris-HCl 62,5 mM, pH 6,8, SDS 10% (p/v), glicerol 10% (p/v), DTT 20 mM e azul de bromofenol 0,005%) ao amido na proporção de 30 μ L de tampão por mg de peso seco de amido. A suspensão foi aquecida por 5 minutos a 95°C, resfriada e centrifugada a 22000 x g por 5 min. O sobrenadante foi aplicado diretamente ao gel.

Proteína ligada à superfície do grânulo: a mesma proporção amido: tampão usada para proteína total foi mantida para extração das proteínas de superfície. O amido foi incubado com agitação constante em tampão desnaturante por 15 minutos à temperatura ambiente. A suspensão foi centrifugada a 22000 x g por 5 minutos. O

precipitado obtido foi reservado e o sobrenadante aquecido por 5 minutos a 95°C e aplicado ao gel.

Proteína interna ao grânulo: o precipitado reservado da extração anterior foi ressuspenso em tampão desnaturante e aquecido a 95°C por 5 minutos. Após resfriamento e centrifugação a 22000 x g por 5 minutos, o sobrenadante obtido foi aplicado ao gel.

Em alguns casos, de modo a concentrar as amostras, foi feita uma precipitação das proteínas com ácido tricloroacético (TCA) (12%). A precipitação foi feita em gelo por 1 hora e em seguida os extratos foram centrifugados a 4°C por 30 minutos a 22000 x g. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado sequencialmente com éter-etanol-clorofórmio (2:2:1), acetona e éter gelados, com centrifugações de 10 minutos a 22000 x g entre as lavagens. O precipitado foi retomado em tampão SDS-PAGE no volume a ser aplicado no gel, fervido por 5 minutos, centrifugado por 2 minutos e aplicado no gel.

3.2.8.4 Do grânulo de amido para *Western Blot*

A extração de proteínas do grânulo de amido foi feita segundo Borén et al. 2004. Aproximadamente 50 mg de amido foram homogeneizados em vortex com 750 µL de tampão desnaturante [Tris-HCl 0,5M, pH 6,8, SDS 2% (p/v) e 2-mercaptoetanol 5% (v/v)] por 2 minutos. A suspensão foi fervida por 15 minutos, mantida em freezer a -20°C por 1 hora, descongelada em banho de água por 20 minutos e centrifugada a 12000 x g por 30 minutos. O sobrenadante obtido foi aplicado ao gel.

3.2.8.5 Totais da polpa da banana para determinação de atividade em gel de poliacrilamida

Cerca de 0,5 g de banana, congelada e triturada em nitrogênio líquido, foram homogeneizadas em homogeneizador do tipo Turrax com 5 mL de tampão de extração contendo Tris-HCl 100 mM, pH 7,0, cisteína 20 mM (recentemente neutralizada), EDTA 20 mM, polivinilpirrolidona (PVP-40) 1% e benzamidina 1 mM. O homogenato foi centrifugado a 10500 x g por 30 minutos e do sobrenadante obtido (extrato bruto), foram recolhidos 200 µL e reservados em gelo. O volume restante foi fracionado com sulfato de amônio na faixa de 20 a 80% e de 80 a 100%. O precipitado, recuperado por centrifugação (10500 x g por 30 minutos) foi retomado em tampão de extração e dialisado por toda a noite para retirada do sulfato de amônio. A partir dos extratos obtidos após diálise e o extrato bruto reservado inicialmente, foi feita quantificação de proteínas pelo método de Bradford (item 3.2.4) e então, aplicados em gel de eletroforese sob condições não-desnaturantes.

3.2.8.6 Totais da polpa da banana para *Western Blot*

A metodologia de extração de proteínas foi feita de acordo com Dominguez-Puigianer, Vendrell e Ludevid (1992), com exceção da etapa de retirada de lipídeos que não foi realizada. Aproximadamente 0,5 g de banana, foram homogeneizadas em vortex com 2 mL de tampão Tris-HCl 0,25 M, pH 8,4, glicina 0,2 M, SDS 0,4% (p/v), 2-mercaptoetanol 10% (v/v) até completa solubilização e então centrifugadas a 6000 x g por 40 minutos. O sobrenadante obtido após centrifugação foi misturado com igual volume de fenol (equilibrado com Tris 1 M, pH 8,0), agitado por 30 minutos

a 4°C, e então centrifugado a 12000 x g por 15 minutos. A fase aquosa superior foi retirada cuidadosamente e em seguida descartada. A fase fenólica inferior foi lavada 4 vezes com 2,0 mL de Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7,5, com etapas de centrifugação entre as lavagens a 6000 x g por 10 minutos. Ao precipitado obtido foram adicionados 4 volumes de metanol / acetato de amônio 0,1 M e mantido em freezer *overnight*, para precipitar proteínas. Após centrifugação por 20 minutos a 6000 x g, o precipitado foi lavado com 1 mL de éter a 100%, para remoção do fenol, e então ressuspendido em 500 µL de tampão Tris-HCl 0,0625 M, pH 6,8, SDS 2% (p/v), 2-mercaptoetanol 5% (v/v), glicerol 10% (v/v) e azul de bromofenol 0,002%. A amostra foi fervida por 15 minutos, centrifugada e 30 µL do sobrenadante foi aplicado ao gel.

3.2.9 Determinação de atividade *in vitro* das enzimas α e β -amilases ligadas à superfície do grânulo de amido

As determinações de atividades de α e β -amilases foram feitas utilizando-se substratos fornecidos pela Megazyme conforme descrito por Bassinello, Cordenunsi e Lajolo (2002). A exceção é que aqui foi utilizado espectrofotômetro para leitura de microplacas (96 celas). Assim, os volumes iniciais foram reduzidos equitativamente de modo a serem de no máximo 190 µL.

Para determinação da atividade endoamilolítica, foi utilizado o substrato p-nitrofenil-maltoheptaosídeo bloqueado na extremidade não redutora (BPNPG7-*Ceralpha*), o que impede a ação de β -amilases, tornando-o específico à ação de α -amilases. O extrato enzimático (10 µL), obtido como descrito no item 3.2.8.1 (RITTE et al., 2000b), foi incubado com 10 µL do reagente a 30°C por 2 horas no próprio

espectrofotômetro para microplacas (BioRad). A reação foi interrompida e a cor desenvolvida pela adição de 170 μL de Tris 1% (p/v) e a absorbância foi medida a 410 nm.

Para a análise da atividade exoamilolítica, foi utilizado o substrato p-nitrofenil-maltopentaosídeo (PNPG5-*Betamyl*) para ação de β -amilases, nas mesmas condições já descritas para α -amilase.

3.2.10 Análises microscópicas

3.2.10.1 Microscopia óptica

Pequenas quantidades de amido isolado foram colocadas em lâminas de microscopia e imersas em uma gota de glicerol para serem examinadas. As micrografias dos grânulos de amido de banana foram feitas usando um Microscópio Óptico (Zeiss-Axioplan 2) com contraste diferencial de interferência (DIC) de Nomarski. As imagens foram capturadas com uma câmera JVC TK-1270. As imagens foram feitas com o auxílio do Prof. Dr. Ricardo Pereira Louro do Laboratório de Ultraestrutura Vegetal no Departamento de Botânica do Instituto de Biologia da UFRJ/RJ.

3.2.10.2 Microscopia Eletrônica de Varredura

As amostras de amidos isolados de bananas do Grupo Frio e Grupo Etileno + Frio foram feitas no Laboratório de Caracterização Tecnológica no Departamento de Engenharia de Minas e de Petróleo da Escola Politécnica da USP. As amostras

foram montadas em “stubs” de alumínio com fita de carbono dupla face. Em seguida, foi feita a metalização com platina (aproximadamente 10 nm de espessura) em equipamento Bal-tec MED-020 Coating System. O microscópio eletrônico de varredura utilizado foi um LEO Stereoscan 440 e as imagens obtidas são de elétrons secundários, operando em modo 10 KV.

As amostras de amidos isolados dos frutos do Grupo Controle foram montadas em “stubs” de alumínio com fita de carbono dupla face, porém os grânulos de amido foram metalizados com uma camada de ouro de 80-100 nm de espessura, por aproximadamente 10 minutos. As eletromicrografias de varredura foram feitas em Microscópio JEOL JSM-5310, operando em modo 10 KV. As imagens foram feitas com o auxílio do Prof. Dr. Ricardo Pereira Louro do Instituto de Biologia da UFRJ/RJ.

3.2.10.3 Microscopia de Imunofluorescência

A imunolocalização de proteínas ligadas à superfície dos grânulos de amido isolados de bananas foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Rocha et al. (2006), com algumas modificações. Aproximadamente 50 mg de amido foi hidratado e bloqueado com 1 mL de tampão PBS/BSA (tampão fosfato pH 7,2 contendo BSA 3% (p/v)) por 2 horas a temperatura ambiente. Após centrifugação a 1000 x g por 5 minutos, o precipitado foi incubado com 200 μ L de tampão PBS/BSA contendo o anticorpo primário contra α ou β -amilase (1:10) *overnight* a 4°C. O pellet foi lavado 3 vezes com 1 mL de tampão PBS/BSA por 30 minutos cada lavagem e então incubado *overnight* à temperatura ambiente com 20 μ L do mesmo tampão contendo o anticorpo secundário Anti-Rabbit IgG conjugado com Fluoresceína

Isocianetada (FITC) (Sigma), diluído 1:50. O pellet foi lavado novamente, repetidamente, com tampão PBS pH 7,2 e os grânulos marcados foram observados em Microscópio Óptico Epifluorescente (Laica). As imagens foram capturadas com uma câmera Sony DSC 707. Para as amostras controle, o mesmo procedimento foi realizado, exceto que o anticorpo primário não foi adicionado.

A técnica de Imunohistoquímica foi também utilizada em cortes de bananas. Fatias congeladas foram colocadas em criostato a -15°C , embebidas em O.C.T. (Optimal Cutting Temperature – Tissue – Tek 4583), cortadas ($12\ \mu\text{m}$ de espessura), transferidas para lâminas de vidro e em seguida lavadas 3 vezes consecutivas com $200\ \mu\text{L}$ de tampão PBS/BSA (tampão fosfato pH 7,2 contendo BSA 3% (p/v)). Outras 2 lavagens de 30 minutos cada foram realizadas e então $20\ \mu\text{L}$ do tampão PBS/BSA, contendo o anticorpo primário contra as enzimas α ou β -amilase (1:10) foram adicionados sob os tecidos e incubados *overnight* a 4°C . Os cortes foram novamente lavados, como descrito acima, e incubados *overnight* à temperatura ambiente com $20\ \mu\text{L}$ do tampão PBS/BSA contendo o anticorpo secundário Anti-Rabbit IgG conjugado com Fluoresceína Isocianetada (FITC) (Sigma), diluído 1:50. Repetidas lavagens com $200\ \mu\text{L}$ tampão PBS pH 7,2 foram realizadas e as lâminas foram montadas em N-propilgalato (Sigma P130) e observadas em Microscópio Óptico Epifluorescente (Laica). As imagens foram capturadas com uma câmera Sony DSC 707.

A imunolocalização de proteínas ligadas à superfície dos grânulos de amido e em cortes de bananas foram feitas com o auxílio do Prof. Dr. Ricardo Pereira Louro do Instituto de Biologia da UFRJ/RJ.

Algumas amostras foram observadas em um Microscópio Confocal de Varredura a Laser (CLMS - Zeiss – LSM 510) localizado na Fundação Oswaldo Cruz

(Fiocruz), no Rio de Janeiro. As imagens obtidas foram analisadas através do programa LSMS Image Browser.

3.2.11 Análise por Difratometria de Raios-X

A análise foi efetuada mediante o emprego de difratômetro de raios-X, marca PANalytical, modelo X'Pert PRO com detector X'Celerator. As condições de análises estão apresentadas na Tabela II.

Tabela II: Condições de análise

CuK α wavelength	1,5406 Å
angular region	2,5-70° (2 θ)
step size	0,02°
measurement time per step	5-s

A identificação das fases cristalinas foi obtida por comparação do difratograma da amostra com o banco de dados do ICDD – International Centre for Diffraction Data (2003).

3.2.12 Grau de cristalinidade do grânulo de amido

A partir dos resultados obtidos por difração de Raios-X, foi calculada a porcentagem de cristalinidade do grânulo de amido segundo a equação:

$$\text{Cristalinidade (\%)} = \text{Ac}/(\text{Ac} + \text{Aa}) \times 100$$

em que Ac é a área cristalina no difratograma de Raios-X e Aa é a área amorfa (HAYAKAWA et al., 1997).

3.2.13 Análise de Distribuição de Tamanho de Partículas

A amostra foi submetida ao ensaio de análise de tamanho de partículas no instrumento Malvern – Mastersizer S long bed, nas condições experimentais descritas a seguir na Tabela III:

Tabela III: Condições experimentais

Meio de dispersão	Álcool isopropílico
Rotação da bomba	2500 rpm
Tipo de acessório	<i>Small Volume Sample Dispersion Unit</i>
Intervalo de medida (lente)	0,05 a 900 µm (lente 300 RF)
Índice de refração considerado	Presentation = 3 TFD (2,5935, 0,0100, 1,3300)
Número de medidas por determinação	1000 (<i>"measure sweeps"</i>)
Número de determinações consideradas	14
Tipo de distribuição	Material polidisperso
Temperatura	Ambiente (± 22°C)

3.2.14 Determinação do Teor de Amilose

As determinações do teor de amilose no amido foram feitas utilizando-se o método enzimático da Megazyme. **Pré-tratamento do amido:** Em 25 mg de amido

foi adicionado 1 mL de dimetilsulfóxido, fervido por aproximadamente 1 minuto com baixa agitação até completa dispersão da amostra, agitado em vortex em alta velocidade por 20 segundos e novamente colocado em banho fervente por 15 minutos, com agitações alternadas entre alta e baixa velocidades. Os tubos foram mantidos em repouso por 5 minutos a temperatura ambiente e então foram adicionados 6 mL de etanol 95% (v/v), com agitação contínua por 1 minuto e deixados overnight a temperatura ambiente para precipitação do amido. Após centrifugação a 2000 x g por 5 minutos e total remoção do etanol, 2 mL de dimetilsulfóxido foram adicionados ao pellet e levados em banho fervente por 15 minutos com agitação. Imediatamente foram adicionados 4 mL do Tampão ConA (Tampão 3) e levados ao volume de 25 mL do mesmo tampão (Solução 1). **Para determinação de amilose:** 1 mL da Solução 1 foi transferida para tubo Eppendorf e 500 µL de Solução ConA (Frasco 1) foi adicionado. Após 1 hora em repouso a temperatura ambiente e centrifugação a 14000 x g por 10 minutos, 1 mL do sobrenadante foi transferido para tubo Corex de 15 mL e adicionado de 3 mL de tampão acetato de sódio 100 mM (pH 4,5). Após 5 minutos de fervura, as amostras foram equilibradas em banho-maria a 40°C por 5 minutos e 100 µL de amiloglicosidase/ α -amilase (Solução 2) foi adicionado, incubados por 30 minutos e centrifugados a 2000 x g por 5 minutos. Em 1 mL do sobrenadante foram adicionados 4 mL de glicose oxidase/peroxidase (Reagente B), incubados por 20 minutos a 40°C e a absorbância lida a 510 nm. **Para determinação de amido total:** Em 500 µL da Solução 1 foram adicionados 4 mL de tampão acetato de sódio 100 mM (pH 4,5) e 100 µL de amiloglicosidase/ α -amilase (Solução 2). Após incubação por 10 minutos a 40°C, uma alíquota de 1 mL foi retirada e 4 mL de glicose oxidase/peroxidase (Reagente B) foram adicionados, incubados por 20 minutos a

40°C e a absorbância lida a 510 nm. O cálculo do teor de amilose (%) foi feito através da divisão da absorbância da amilose pela absorbância do amido total multiplicado por um fator de 66,8.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Efeito do etileno e do seu antagonista 1-MCP sobre o amadurecimento da banana: grânulo de amido e enzimas correlacionadas

4.1.1 Respiração, produção de etileno, teor de amido e produção de açúcares

O etileno é considerado o hormônio do amadurecimento, e o 1-MCP seu antagonista, por comprometer receptores de etileno. Quando aplicados de maneira exógena em bananas, espera-se que os resultados forneçam pistas para tentar identificar eventos relativos ao amadurecimento que sejam, direta ou indiretamente, regulados pelo etileno. Neste trabalho o enfoque foi dado ao metabolismo amido-açúcares solúveis.

Os perfis de respiração e produção de etileno (Figuras 5A e 5B) foram típicos de frutos climatéricos, para as amostras controle e tratadas com etileno (100 ppm). Como já esperado, os frutos tratados com etileno exógeno amadureceram mais rapidamente (~7 dias), com produção de CO₂ e etileno alterados em relação aos frutos controle. Os frutos tratados com 1-MCP sofreram um atraso de 11 dias no amadurecimento quando comparados aos do controle. Uma ressalva deve ser feita em relação à produção de CO₂ do grupo tratado com 1-MCP já que o pico respiratório, no 29º dia, momento em que os frutos já estavam senescentes, levanta dúvidas quanto a ser um pico climatérico normal.

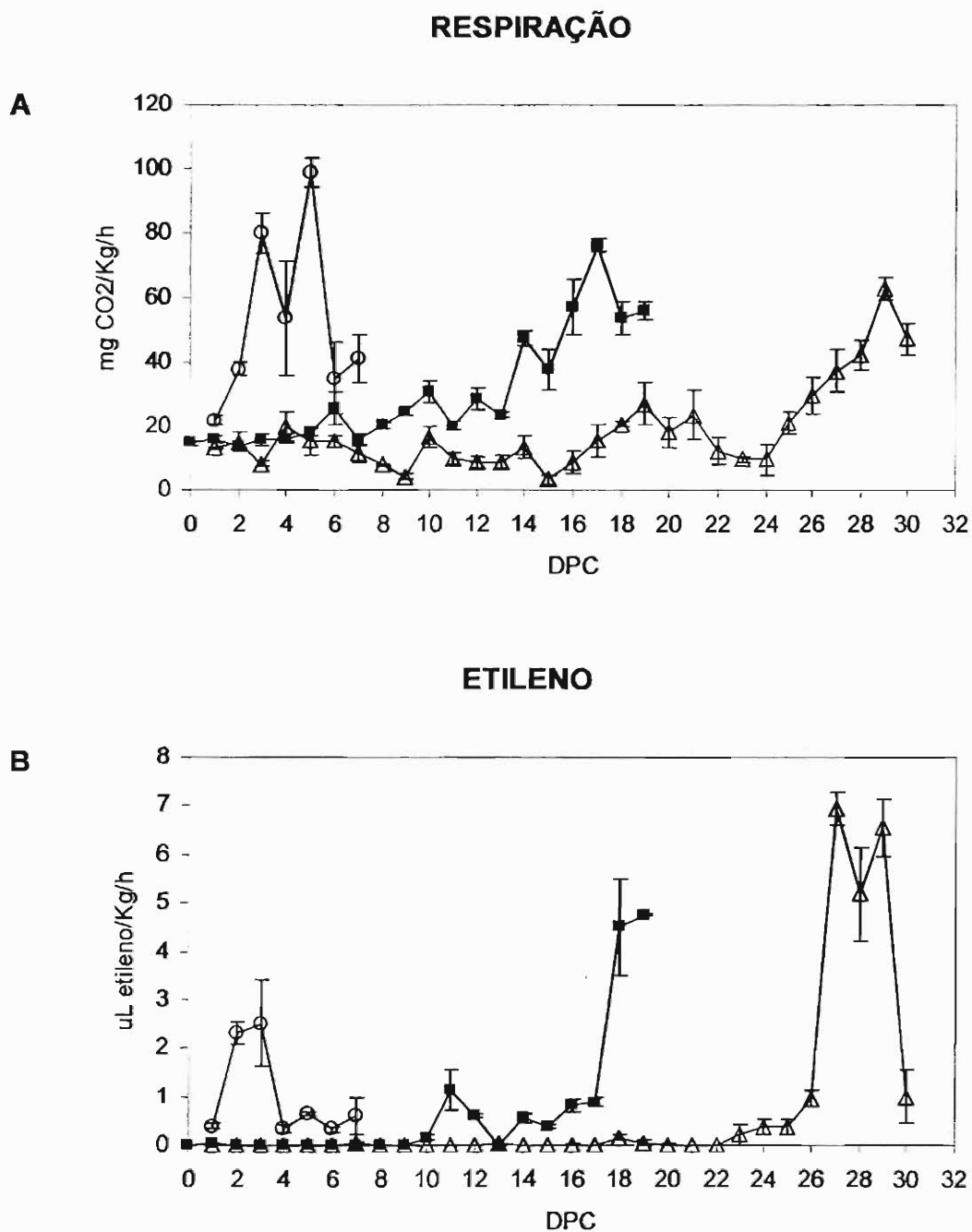


Figura 5: Medidas da produção de gás carbônico (A) e produção de etileno (B) em frutos dos grupos controle (-■-), tratados com 100-ppm de etileno (-○-) e tratados com 1-MCP (-△-). As medidas foram realizadas durante todo o período de amadurecimento dos frutos. Resultados expressos como média da quadruplicata de análise mais o erro padrão da média.

Embora estejam distanciados no tempo, os teores máximos de CO₂ foram semelhantes entre grupos, porém os teores de etileno foram bastante diferenciados tanto no tempo quanto em quantidade do hormônio produzido (Figuras 5A e 5B).

Estudos anteriores mostraram que a aplicação do 1-MCP em bananas atrasou o aparecimento do pico de etileno em relação ao controle, com ausência de pico respiratório. Outras conseqüências foram o atraso no início da degradação do amido e a variação na atividade de enzimas como a β -amilase (NASCIMENTO et al., 2006; MAINARDI et al., 2006). Os valores máximos de etileno (~3 μ L por kg de fruto/h) desse experimento (Figura 5B) foram semelhantes aos de Mainardi et al. (2006), tanto nos frutos controle quanto nos tratados com etileno, mas nos tratados com 1-MCP, o valor detectado no pico foi 2 vezes maior. Para a produção de CO₂ os valores encontrados para os frutos controle e tratados com etileno (Figura 5A) foram 3,2 vezes menores que os encontrados por Mainardi et al. (2006) em bananas.

Nos frutos tratados com etileno, a degradação do amido foi antecipada em 13 dias em relação ao grupo controle, mas os teores residuais de amido e de açúcares, ao final do amadurecimento, foram praticamente os mesmos para os frutos dos dois grupos (Figuras 6A e 6B). Nos frutos tratados com 1-MCP, a taxa de degradação foi mais lenta e o amido começou a ser degradado por volta do 22º dia pós-colheita (Figura 6A), momento em que a síntese de açúcares teve um leve aumento (Figura 6B). O teor de amido residual foi 4 vezes maior quando comparado aos demais grupos e, como conseqüência, o teor máximo de açúcares produzidos não passou de 7% (2,5 vezes menor). Deve-se ressaltar que os frutos deste grupo foram amostrados até a senescência completa dos frutos. Os resultados obtidos foram coerentes com conhecimento que se tem sobre a produção autocatalítica do etileno ser induzida pela aplicação de etileno exógeno em bananas na fase pré-climatérica,

acelerando o processo de degradação do amido e a concomitante síntese de açúcares (PURGATTO et al., 2002). Almeida et al. (2006) estudaram os efeitos do 1-MCP em bananas-maçã e verificaram que bananas expostas por 24 horas ao 1-MCP (50 ppb) apresentaram baixos teores de açúcares totais comparados com frutos não-tratados, em função da lenta degradação do amido.

É conhecido que o 1-MCP reduz as taxas respiratórias na maioria dos frutos, por se ligar aos receptores de etileno, inibindo as respostas dependentes de etileno (SISLER; SEREK, 1997; WATKINS, 2006). Nos resultados aqui obtidos, nota-se que o 1-MCP teve grande influência tanto no início da degradação do amido nos frutos quanto na taxa de degradação que ocorreu de forma mais lenta que nas amostras controle e tratadas com etileno.

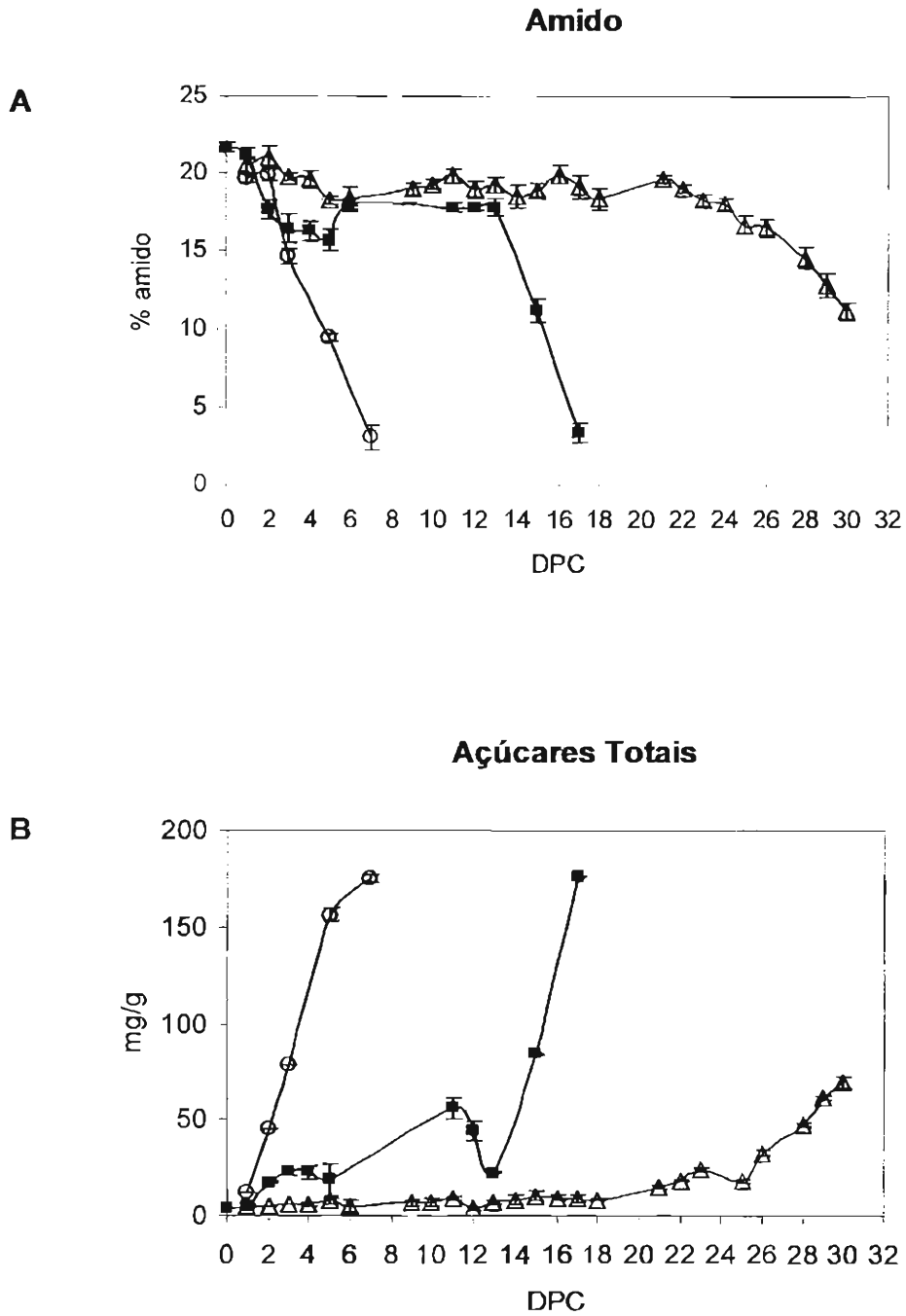


Figura 6: Teores de amido (A) e açúcares solúveis totais (B) durante o amadurecimento dos frutos controle (■-), tratados com etileno (-○-) e tratados com 1-MCP (-△-). Resultados expressos como média da triplicata de análise mais o erro padrão da média.

Com base nos teores de amido (Figura 6A) e no perfil respiratório (Figura 5A), foram selecionadas amostras nos três grupos, que representassem fases representativas de todo período de degradação do amido para o isolamento dos grânulos (Tabela IV). Para que fossem comparáveis, foram escolhidas amostras com o mesmo teor de amido entre tratamentos.

Tabela IV: Amostras selecionadas para o isolamento do grânulo de amido

Tratamento	Dias pós-colheita (dpc)	Amido (%)
Controle	zero	21,69 ± 0,31
	6	18,04 ± 0,41
	9	20,73 ± 0,21
	12	17,81 ± 0,17
	15	11,18 ± 0,78
	16	9,49 ± 0,31
Etileno	1	19,68 ± 0,31
	3	14,67 ± 0,89
1-MCP	3	19,79 ± 0,28
	28	14,58 ± 0,67

As metodologias utilizadas para os processos de isolamento dos grânulos de amido e a extração das proteínas da superfície dos grânulos foram escolhidas e otimizadas de modo a preservar a atividade de possíveis enzimas aderidas ao grânulo, bem como evitar, dentro do possível, que proteínas solúveis aderissem ao grânulo durante o processo de isolamento. Por demandar grandes quantidades de amido isolado, algumas análises foram feitas somente nos grupos controle e tratados com etileno, já que o grupo tratado com 1-MCP estava comprometido com outro projeto.

4.1.2 Perfil de atividade hidrolítica em PAGE nativo

Para verificar o perfil de atividade das enzimas hidrolíticas em extratos brutos de banana controle e tratadas com etileno, foram utilizados géis de acrilamida contendo amilopectina (0,1%) como substrato com o objetivo de tentar separar e identificar estas enzimas. Levando-se em conta que os produtos da hidrólise da amilopectina por diferentes enzimas, revelados por solução de iodo, apresentam bandas com diferentes colorações, pode-se ter uma idéia de quantas e quais hidrolases atuariam em diferentes condições e etapas do amadurecimento do fruto. Por exemplo, a ação da α -amilase resulta em bandas brancas, enquanto a β -amilase resulta em bandas marrons. Já as enzimas desramificadoras produzem bandas azuis claras (ZEEMAN et al., 1998).

As amostras controle (zero e 15 dpc) e tratada com etileno (3 dpc) foram escolhidas por duas razões: velocidade máxima de degradação do amido (Figura 6), o que pressupõe que todas as enzimas envolvidas na degradação do amido estejam atuantes e, teores de amido semelhantes (~14%), para que os perfis de atividade em gel pudessem ser comparados. Extratos brutos e parcialmente purificados com sulfato de amônio (20 a 80%) e diferentes tempos de incubação do gel (3 e 6 horas) foram utilizados neste estudo (Figura 7A e 7B).

Os resultados obtidos (Figura 7A) mostram um número grande de bandas resultantes da atividade de enzimas hidrolíticas em todas as amostras, que aumentam tanto em quantidade quanto em intensidade, com o decorrer do amadurecimento. Também, bandas já existentes tiveram aumento de intensidade, compatível com aumento de atividade das enzimas pré-existentes. Os extratos de amostra tratada com etileno foram os que produziram bandas com maior atividade.

O topo do gel revela bandas com maior intensidade, provavelmente em função da maior afinidade de algumas enzimas pelo substrato. Quando o gel foi incubado por 12 horas, foi observada uma forte reação principalmente para a amostra E-3, sendo difícil a identificação visual quanto à ação de apenas uma enzima ou várias isoformas, devido à localização de diferentes enzimas no mesmo lugar do gel, razão pela qual outro gel foi incubado por apenas 3 horas (Figura 7B), o que possibilitou visualizar pelo menos 2 bandas para a amostra E-3 no topo do gel.

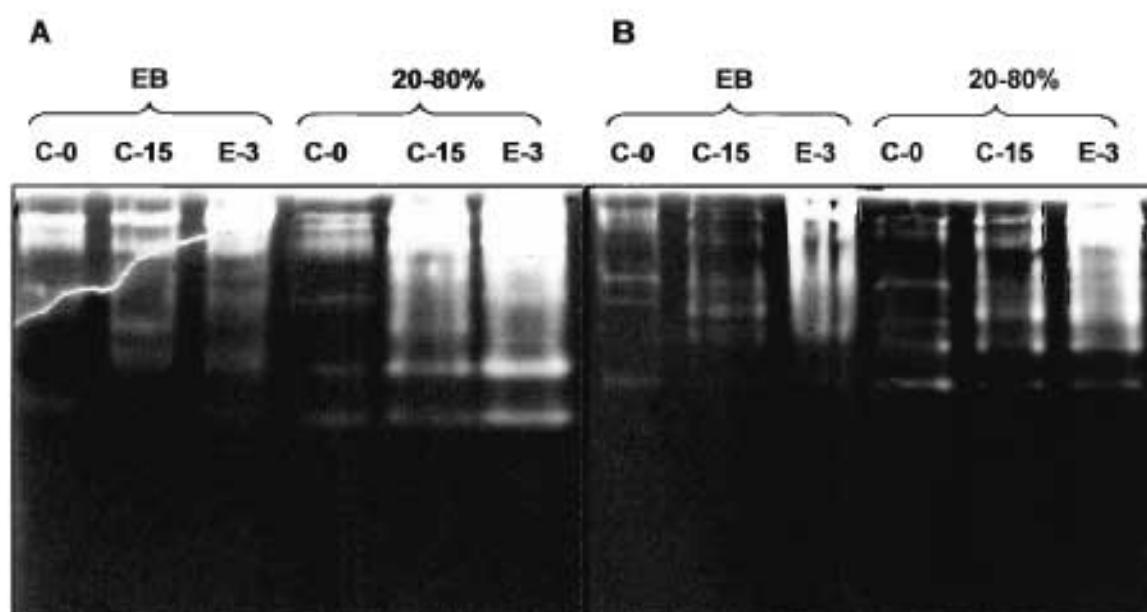


Figura 7: Atividade hidrolítica total através de eletroforese não-desnaturante em géis de poliacrilamida (6%) contendo amilopectina (0,1%) (proteína extraída de acordo com o método descrito no item 3.2.8.5). Os géis foram incubados em tampão Tris-HCl 100 mM, pH 7,0, contendo $MgCl_2$ 1 mM, DTT 1 mM e $CaCl_2$ 1 mM a 20°C por (A) 12 horas e (B) 3 horas, e em seguida corados com solução aquosa de iodeto (I_2 13 mM e KI 40 mM). As amostras usadas foram bananas C: controle; E: tratadas com 100 ppm de etileno; 0, 3 e 15: dias pós-colheita (dpc). EB: extrato bruto de banana; 20-80%: extrato bruto de banana concentrado com $(NH_4)_2SO_4$ nesta faixa de concentração. Foram aplicadas 10 μ g de proteína para cada amostra.

No intuito de comparar a atividade hidrolítica do extrato bruto da polpa e das enzimas ligadas ao grânulo, as proteínas foram extraídas apenas da superfície do grânulo de amido isolado das amostras controle (zero, 9, 15 e 16 dpc) e tratadas com etileno (1 e 3 dpc). O gel revelado com solução de iodo (Figura 8) mostrou que já existia atividade de enzimas hidrolíticas no amido isolado de banana recém colhida (zero dpc), localizada no topo do gel. Outras bandas com atividade podem ser vistas, porém com intensidade muito menor. Como já comentado, a atividade hidrolítica no topo do gel pode ser devida a uma ou a diferentes enzimas, que por terem muita afinidade pelo substrato (amilopectina), se localizam no mesmo lugar e não migram como normalmente ocorreria se o gel de acrilamida não contivesse o substrato. Outra possibilidade seria a presença de um complexo enzimático que, em razão do tamanho, não migra para o interior do gel. Isto dificulta maiores interpretações quanto ao número de enzimas hidrolíticas ligadas ao grânulo em diferentes etapas de degradação do amido com essa técnica.

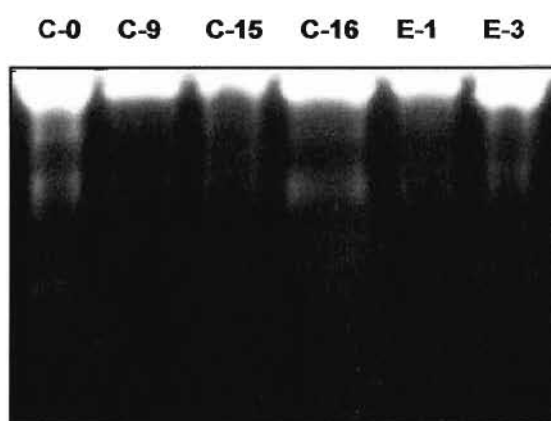


Figura 8: Atividade hidrolítica em eletroforese não-desnaturante em gel de poliacrilamida (6%) contendo amilopectina (0,3%) (proteína extraída de acordo com o método descrito no item 3.2.8.1). O gel foi incubado em tampão Tris-HCl 100 mM, pH 7,0, contendo $MgCl_2$ 1 mM, DTT 1 mM e $CaCl_2$ 1 mM a 20°C *overnight* e em seguida corado com solução aquosa de iodeto (I_2 13 mM e KI 40 mM). Amostras: C: controle; E: tratadas com 100 ppm de etileno; 0, 1, 3, 9, 15, 16: dias pós-colheita (dpc).

Para tentar identificar a massa molecular e estimar o número de proteínas que estivessem contidas na mesma porção do gel contendo atividade, a amostra de amido controle zero dpc, que apresentou o maior número de bandas de atividade, foi submetida a um sistema de separação bidimensional. A primeira dimensão foi em PAGE-nativo não desnaturante contendo amilopectina (0,3%) (Figura 9A) e a segunda em SDS-PAGE (Figura 9B). Para isso, uma nova extração da amostra (3.2.8.1), em duplicata, foi feita. Os extratos foram submetidos à eletroforese em PAGE-nativo, sendo uma das duplicatas do gel corada com solução de iodo (Figura 9A). Este gel foi posicionado sobre o gel desnaturante da segunda dimensão, como ilustrado na Figura 9. A outra duplicata não corada do gel nativo foi aplicada em SDS-PAGE 7,5% (Figura 9B). A revelação com prata mostrou que cada banda de atividade continha várias proteínas com peso molecular de enzimas semelhante ao de enzimas envolvidas na degradação do amido (40 a 90 kDa).

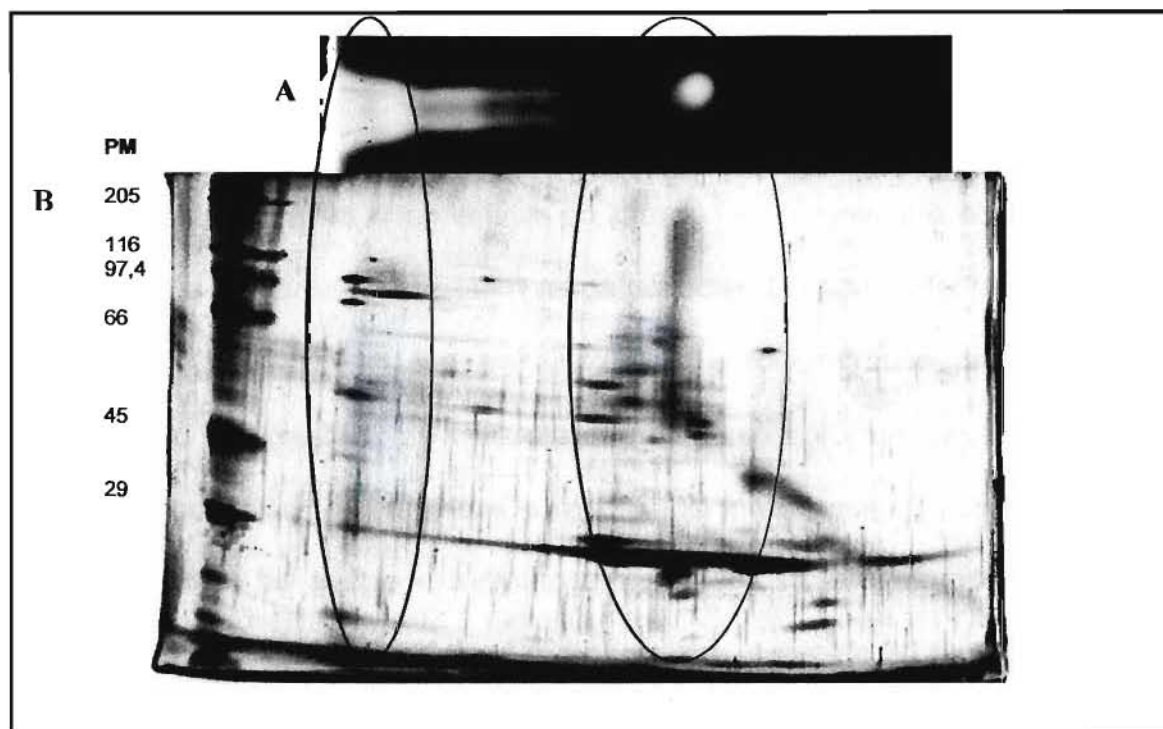


Figura 9: (A) Atividade enzimática em PAGE-nativo (6%) contendo amilopectina (0,3%) revelada por coloração com solução aquosa de iodeto (I_2 13 mM e KI 40 mM). Proteínas ligadas à superfície do grânulo de amido de banana zero dpc foram extraídas como descrito no item 3.2.8.1. **(B)** Perfil protéico em SDS-PAGE (7,5%) bidimensional revelado por coloração com prata. PM: padrão de peso molecular variando de 29-205 kDa. As elipses apontam para o padrão de migração das proteínas contidas no PAGE-nativo para o SDS-PAGE.

Na Figura 9B (na primeira elipse) é possível visualizar o padrão de migração de várias proteínas presentes no topo do gel, que concentra a maior parte da atividade hidrolítica, contendo bandas protéicas com peso molecular variando de 30 a 100 kDa. A hipótese sugerida anteriormente, da formação de um complexo protéico, foi reforçada com este resultado. Na região circundada pela segunda elipse, é possível observar também a presença de várias proteínas com peso molecular entre 45 e 66 e kDa, equivalentes aos valores de peso molecular estimados de α -amilase e β -amilase, respectivamente e, abundância de proteínas

em 30 kDa, inicialmente conhecida por SGAP de superfície que já foi encontrada também no interior do grânulo.

Com o objetivo de otimizar o tempo de extração das proteínas, preservar todas as proteínas ligadas à superfície do grânulo e impedir que os métodos de concentração de proteínas possibilitem a sua associação espúria, foi experimentado aplicar o próprio amido no gel, sem prévia extração e concentração (item 3.2.8.2.). A idéia era que a própria corrente utilizada durante a eletroforese desassociasse as proteínas da superfície do grânulo. Os resultados foram muito positivos tanto em termos de redução de tempo e trabalho empregados na eletroforese, quanto em termos de economia de amido isolado, uma vez que, somente 30 mg de amido são necessários para a análise, o que possibilitou o uso do amido extraído de bananas tratadas com 1-MCP.

A Figura 10 ilustra o perfil de atividade das enzimas hidrolíticas associadas ao grânulo de amido. Um maior número de bandas protéicas com atividade pôde ser visualizado, o que não foi possível com o uso da metodologia de extração usada anteriormente (Figura 8). O amido isolado de amostras tratadas com etileno mostra que enquanto a amostra de 1 dpc (20% de amido) mostra 3 bandas de atividade bem definidas e localizadas em diferentes posições no gel, a amostra referente à plena degradação do amido (14%) mostra uma banda com intensa atividade no topo do gel, que não havia na amostra 1 dpc. Parecem ser relativas a diferentes enzimas atuando em diferentes etapas de degradação do amido.

A associação artificial de proteínas durante o isolamento e concentração das proteínas utilizada na metodologia anterior, pode ter acontecido, mas não parece ser a única causa da presença de maior atividade no topo do gel, como mostra a intensa atividade de proteínas do amido isolado da amostra tratada com etileno (3 dpc).

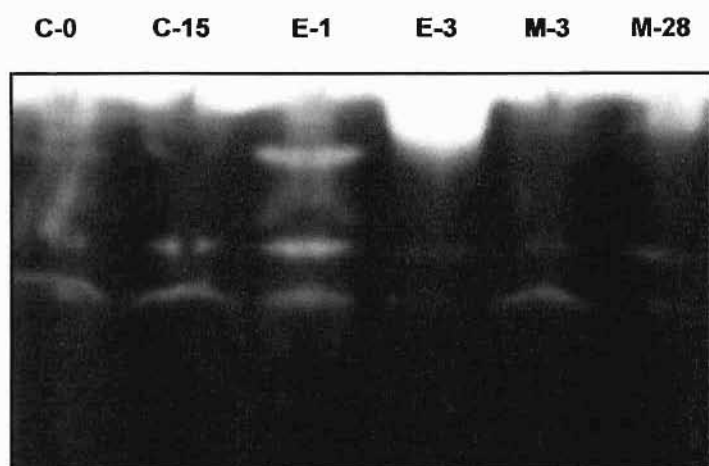


Figura 10: Atividade hidrolítica em eletroforese não-desnaturante em gel de poliacrilamida (8%) contendo amilopectina (0,1%). O gel foi incubado em tampão Tris-HCl 100 mM, pH 7,0, contendo $MgCl_2$ 1 mM, DTT 1 mM e $CaCl_2$ 1 mM a 20°C *overnight* e em seguida corado com solução aquosa de iodeto (I_2 13 mM e KI 40 mM). As amostras usadas foram amidos de bananas C: controle; E: tratadas com 100 ppm de etileno; M: tratadas com 1-MCP. 0, 1, 3, 15, 28: dias pós-colheita (dpc). Foram aplicados diretamente ao gel 30 mg de amido de banana em 50 μ L de tampão HEPES-KOH 50 mM, pH 7,0 contendo $CaCl_2$ 1 mM e benzamidina 1 mM, como descrito no item 3.2.8.2.

As amostras tratadas com 1-MCP apresentaram bandas com menor intensidade e em número reduzido, quando comparadas às demais amostras. Talvez o 1-MCP tenha interferido na ligação das proteínas ao grânulo de amido, ou as enzimas não estivessem disponíveis para essa ligação. No entanto, foi observado aparecimento de uma banda intensificada no topo do gel no 28º dia pós-colheita, quando o amido já estava sendo degradado (~14%), à semelhança da amostra relativa ao etileno-3 dpc.

A Figura 10 mostra diferenças de atividade das enzimas hidrolíticas entre tratamentos, já que as amostras escolhidas tinham aproximadamente os mesmos teores de amido no início e durante a degradação.

Esperava-se encontrar um número e intensidade muito maiores das enzimas hidrolíticas no extrato bruto da banana (Figura 7), uma vez que estão presentes

enzimas do citosol, do estroma e do grânulo de amido, muitas não diretamente envolvidas na degradação do amido. No entanto, o perfil de atividade hidrolítica de enzimas extraídas apenas da superfície do grânulo observadas na Figura 10, mostra que o número e a localização de bandas são comparáveis às existentes no gel contendo o extrato bruto. Ou seja, várias enzimas hidrolíticas, ou várias isoformas das mesmas, devem estar envolvidas no processo de degradação do amido da banana. Deste modo, o próximo passo do experimento seria a identificação destas proteínas através sequenciamento por espectrometria de massas. Para isso, como a amostra que apresentou o maior número de bandas no gel de atividade da Figura 10 foi a de amido tratada com etileno 1 dpc, esta foi a escolhida para ser analisada em maiores detalhes.

Extrações de enzimas ligadas ao grânulo de amido de banana tratada com etileno (1dpc) foram feitas em duplicata, utilizando para cada extração 500 mg de amido e 20 mL de tampão Hepes-NaOH 50 mM, pH 7,0 contendo CaCl_2 1 mM e Benzamidina 1 mM, seguindo as etapas de concentração (3.2.8.1.). Este método de extração foi o mais indicado neste caso, devido à necessidade de se aplicar uma grande quantidade de proteína ao gel, não sendo possível inserir 500 mg de amido diretamente no gel de eletroforese, sendo necessário concentrar os extratos.

Para poder fazer a associação de bandas protéicas com bandas de atividade e contornar a não migração de proteínas com alta afinidade pelo substrato contido no gel de eletroforese, foi utilizada uma técnica de transferência eletroforética de acordo com Steup e Gerbling (1983). Nesta técnica, primeiro é realizada eletroforese sob condições não desnaturantes em um gel sem substrato para que ocorra a separação de proteínas (em duplicata de amostra e gel). Um dos géis é corado (Coomassie R-250) para revelar o padrão de proteínas contido no extrato (Figura

11B) e o outro, é posicionado sobre um segundo gel não-desnaturante contendo amilopectina (0,2%), para o qual as proteínas são transferidas sob condições não-desnaturantes. Após a transferência e incubação para revelar a atividade hidrolítica das enzimas, o gel foi corado com iodeto (Figura 11A).

O resultado demonstra que a banda de maior atividade que se concentrava no topo do gel, por afinidade com o substrato, ficou localizada no meio do gel (Figura 11A). A banda protéica que pode ser associada à atividade contém uma concentração muito baixa de proteína, como revelado por Coomassie (Figura 11B), enquanto que as proteínas em maior quantidade, aparentemente não têm atividade hidrolítica. Através de uma análise visual, algumas bandas no gel de atividade (Figura 11A) foram equivalentes às existentes no gel de proteína (Figura 11B). Estas últimas foram recortadas e congeladas em ácido acético 5%, para serem encaminhadas para análise. No entanto, a banda de maior interesse e que apresentou maior atividade no gel (ponto 1) correspondeu a uma quantidade tão pequena de proteína, que não foi possível realizar o sequenciamento.

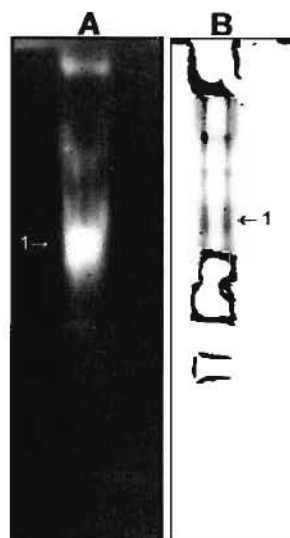


Figura 11: (A) PAGE-nativo contendo amilopectina 0,2% e corado com solução aquosa de iodeto (I_2 13 mM e KI 40 mM); (B) PAGE nativo corado com Coomassie G-250 antes da transferência. Amostra utilizada: amido de banana tratada com etileno 1 dpc. Proteína extraída de acordo com o método descrito no item 3.2.8.1.

Os resultados obtidos indicam a existência de um complexo de enzimas na posição 1 (Figura 11A). Assim, para verificar se houve sobreposição de bandas protéicas nesta posição, um gel bidimensional foi feito para tentar a separação destas proteínas. Para isso, PAGE-nativo em triplicata foi feito como anteriormente, com algumas modificações. Foram utilizadas triplicata de extração da amostra, porém apenas 200 mg do amido e 10 mL de tampão foram usados para cada extração, e o volume final foi concentrado até 30 μ L. Após a eletroforese, os 3 géis foram submetidos às seguintes etapas:

- 1) O primeiro gel foi corado imediatamente com Coomassie G-250 para visualizar o perfil protéico obtido (Figura 12C);
- 2) O segundo foi transferido para PAGE-nativo contendo amilopectina (0,2%) e revelado com solução de iodo (Figura 12A). O gel usado na transferência foi em seguida corado com Coomassie G-250 para verificar se as proteínas foram completamente transferidas (Figura 12D);

- 3) O terceiro gel foi posicionado sobre o gel desnaturante da segunda dimensão (7,5%) para tentar identificar a massa molecular e o número de proteínas que poderiam estar contidas na forte banda apresentada no gel de atividade da Figura 11A. Após a eletroforese, o gel foi corado com prata (Figura 12B).

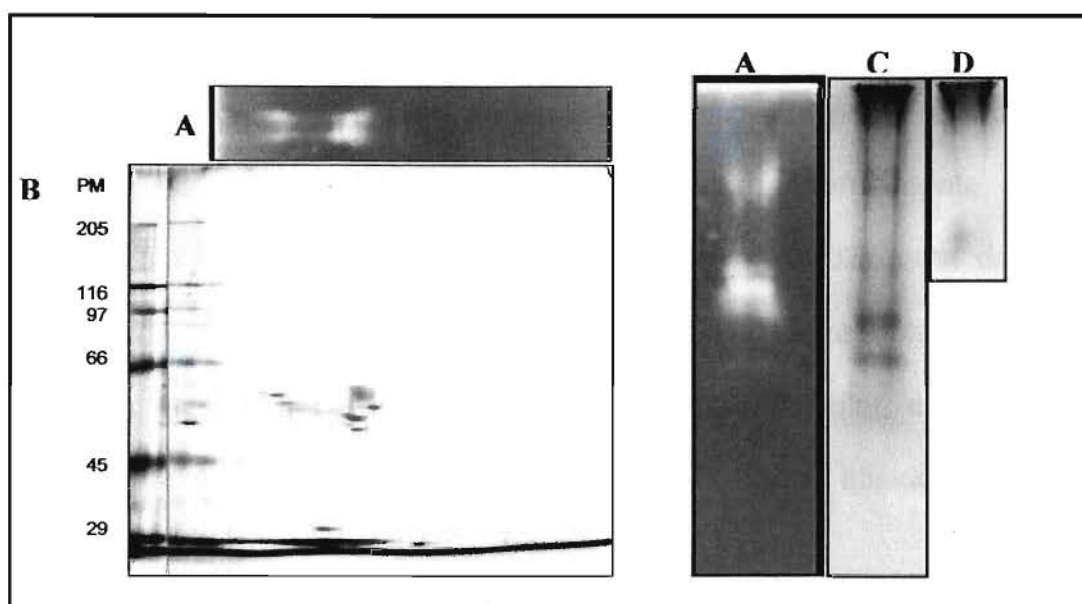


Figura 12: (A) PAGE-nativo contendo amilopectina (0,2%) e corado com solução aquosa de iodeto (I_2 13 mM e KI 40 mM); (B) Perfil protéico em SDS-PAGE bidimensional corado com prata. PM: padrão de peso molecular variando de 29-205 kDa. (C) e (D) PAGE nativo corado com Coomassie G-250 antes e depois da transferência, respectivamente. Amostra utilizada: amido de banana tratada com etileno 1 dpc. Proteína extraída de acordo com o método descrito no item 3.2.8.1.

As bandas protéicas observadas na região de peso molecular entre 45 e 66 kDa na Figura 12B, coincidem com a forte banda de atividade apresentada no gel. E, novamente estas proteínas apresentam peso molecular equivalentes aos valores estimados de α -amilase e β -amilase.

Os resultados obtidos confirmam a eficiência deste sistema de transferência eletroforética, já que todas as proteínas foram transferidas com sucesso. Além de

permitir-nos dizer que, nem sempre uma banda protéica com alta atividade contém uma concentração de proteína elevada, podendo esta nem ser detectada mesmo com a utilização de métodos sensíveis.

4.1.3 Perfil de atividade fosforolítica em PAGE nativo

Arêas e Lajolo (1981) e Mota et al. (2002) relataram que as enzimas fosforolíticas juntamente com as amilolíticas provavelmente estão envolvidas no processo de degradação do amido durante o amadurecimento da banana. De acordo com os resultados obtidos por Mota et al. (2002), uma das isoformas da fosforilase (a fosforilase H ou citosólica, 90,6 kDa), apresenta maior afinidade por glucanos ramificados e substratos de alto peso molecular, estando localizada no topo do gel. A isoforma L ou plastidial (112 kDa), por ter afinidade por substratos de baixo peso molecular, localiza-se mais abaixo.

Com o objetivo de detectar as isoformas da fosforilase em extratos brutos de banana, foram feitos PAGEs-nativo contendo diferentes concentrações de glicogênio (250 µg/mL e 100 µg/mL de gel) e incubados com glicose-1-fosfato. Os resultados (Figuras 13A e 13B) foram semelhantes aos obtidos por Mota et al. (2002), apenas para a fosforilase plastidial, uma vez que bandas representando a isoforma citosólica foram fracamente visíveis.

Comparando-se os resultados obtidos nos géis da Figuras 13 com a Figura 6A, a banda de atividade mais intensa para a fosforilase plastidial foi observada para a amostra controle (zero dpc) em que apresentou o maior teor de amido (21,69%).

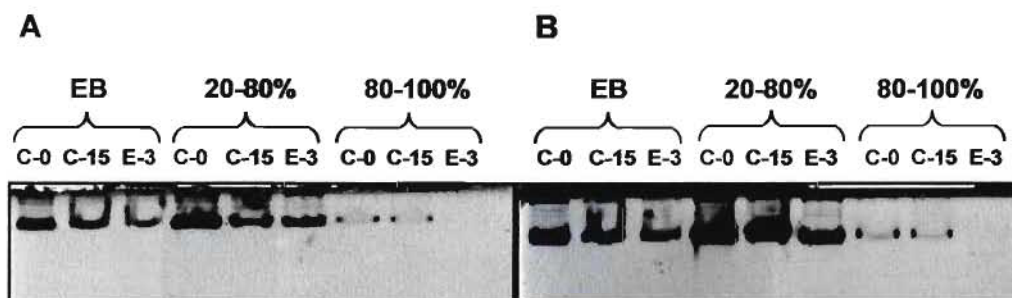


Figura 13: Atividade enzimática das isoformas de fosforilases através de eletroforese não-desnaturante em géis de poliacrilamida (6%) contendo como substrato **(A)** 250 µg de glicogênio por mL de gel; **(B)** 100 µg de glicogênio por mL de gel. Após a corrida o gel foi incubado por 2 horas a 30°C em tampão Tris-maleato 20 mM, pH 6,0 contendo glicose-1-fosfato 15 mM, NaF 5 mM e amido solúvel 1% e em seguida corados com solução aquosa de iodeto (I_2 13 mM e KI 40 mM). As amostras usadas foram bananas C: controle; E: tratadas com 100 ppm de etileno; 0, 3 e 15: dias pós-colheita (dpc). EB: extrato bruto de banana; 20-80% e 80-100%: extrato bruto de banana concentrado com $(NH_4)_2SO_4$ nestas faixas de concentrações. Foram aplicadas 10 µg de proteína para cada amostra. Proteína extraída de acordo com o método descrito no item 3.2.8.5.

Com o objetivo de visualizar atividade enzimática da fosforilase associada ao grânulo, amidos em suspensão (extraídos de bananas em diferentes fases do amadurecimento dos grupos controle, tratadas com etileno, e inclusive tratadas com 1-MCP) foram aplicados diretamente ao gel de poliacrilamida contendo glicogênio (1%), sob condições não-desnaturantes (Figura 14). Nenhuma atividade fosforolítica foi detectada nas proteínas ligadas ao grânulo de amido, em nenhum tratamento. Como a amido-fosforilase presente no amiloplasto é a isoforma que tem alta afinidade por substratos de baixo peso molecular, provavelmente agindo em substratos liberados por outras enzimas, não seria provável encontrá-la associada ao grânulo de amido.

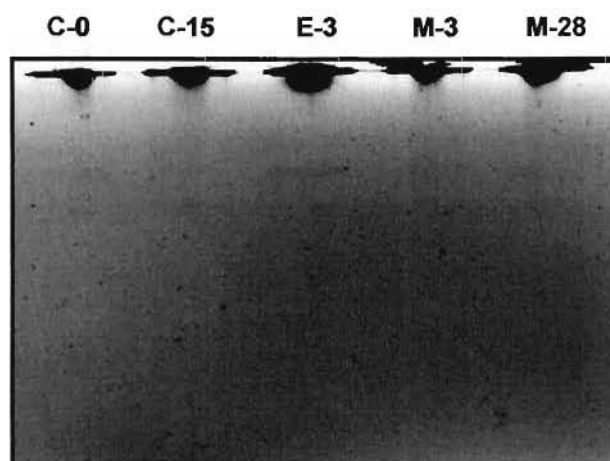


Figura 14: Atividade enzimática das isoformas de fosforilases através de eletroforese não-desnaturante em gel de poliacrilamida (7,5%) contendo como substrato glicogênio (1%). Após a corrida o gel foi incubado overnight a 30°C em tampão Tris-HCl 100 mM, pH 7,0 contendo glicose-1-fosfato 20 mM, MgCl₂ 1 mM, CaCl₂ 1 mM e DTT 1 mM e em seguida corados com solução aquosa de iodeto (I₂ 13 mM e KI 40 mM). As amostras usadas foram amidos de bananas C: controle; E: tratadas com 100 ppm de etileno; M: 1-MCP. 0, 3, 15, 28: dias pós-colheita (dpc). Foram aplicados diretamente ao gel 30 mg de amido de banana em 50 µL de tampão HEPES-KOH 50 mM, pH 7,0 contendo CaCl₂ 1 mM e benzamidina 1 mM de acordo com a metodologia descrita no item 3.2.8.2.

4.1.4 Atividades “*in vitro*” de α e β -amilases extraídas do grânulo de amido

Os valores máximos de atividade de α e β -amilases aderidas à superfície do grânulo de amido das amostras controle e tratadas com etileno (Figura 15A e 15B, respectivamente) foram muito maiores que os encontrados para as enzimas solúveis, medidas em extratos brutos de polpa de banana (PURGATTO et al., 2001; BASSINELLO; CORDENUNSI; LAJOLO, 2002), o que seria compatível com o fato do amido ser o substrato para as enzimas em questão. Este resultado levanta a discussão da β -amilase aderir à superfície do grânulo e não só permanecer solúvel no estroma atuando nos produtos de degradação da α -amilase.

Como já descrito anteriormente por Purgatto et al. (2001) e Nascimento et al. (2006), a β -amilase é uma das enzimas mais importantes envolvidas na degradação do amido em bananas, já que existe uma boa correlação entre o aumento de atividade da enzima simultaneamente com o início da degradação do amido em banana.

Os resultados apresentados nas Figuras 15A e 15B mostram que as atividades de α e β -amilases ligadas à superfície do grânulo foram inversamente proporcionais aos teores de amido na polpa da banana, tanto nos grupos controle como nos tratados com etileno, e diretamente relacionados ao aumento de açúcares (Figura 6B), sugerindo uma relação direta entre o aumento das atividades amilolíticas e a degradação do amido. Nota-se também, que maiores valores de atividade foram detectados nos amidos isolados dos frutos controle comparando-se com os tratados com etileno, principalmente para a β -amilase.

Outras evidências dão suporte aos resultados encontrados. Garcia e Lajolo (1988), após inibirem a atividade da glicosidade em banana, encontraram um aumento na atividade de β -amilase e a detecção de maltose como um dos produtos de degradação do amido, indicando o envolvimento desta enzima no processo.

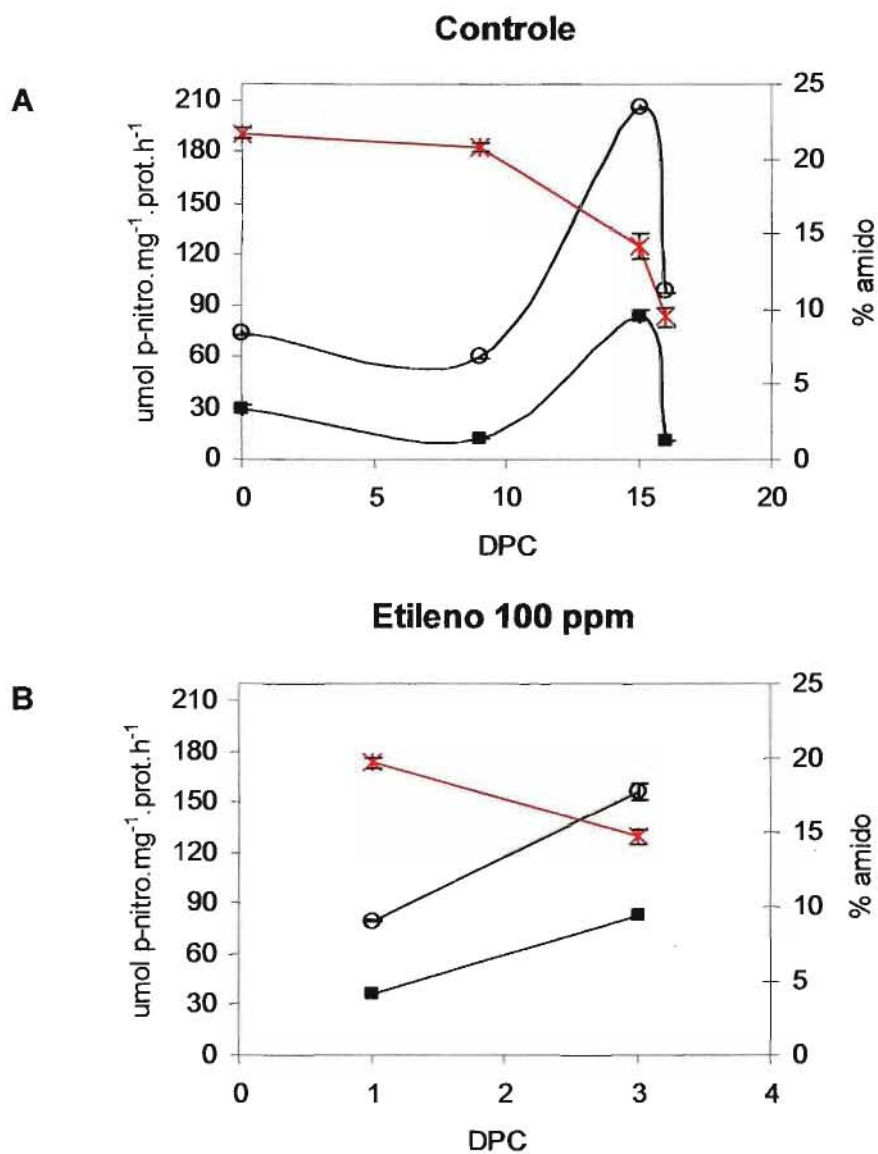


Figura 15: Perfil de amido e (-*-) e perfis de atividade das enzimas α -amilase (-■-) e β -amilase (-○-) aderidas ao grânulo de amido de bananas (A) Controle e (B) tratadas com etileno 100 ppm, em diferentes fases de amadurecimento. Amostras: controle e tratadas com 100 ppm de etileno; 0, 1, 3, 9, 15, 16: dias pós-colheita (dpc). Resultados representam a média de três determinações mais o erro padrão da média.

4.1.5 Perfil em SDS-PAGE de proteínas ligadas ao grânulo de amido

Os amidos isolados de banana controle e tratadas com etileno em diferentes fases do amadurecimento foram usados e as proteínas associadas ao grânulo foram analisadas em SDS-PAGE. Os géis foram corados tanto com Coomassie-blue quanto com prata porque a intensidade da coloração de uma determinada proteína pode diferir quanto ao método utilizado.

Nas Figuras 16 e 17 foi verificada a existência de várias proteínas, tanto na superfície quanto ligadas internamente ao grânulo, com maior predominância de proteínas internas. Os resultados apresentados na Figura 16 em que os géis foram corados com Coomassie-blue, mostram uma proteína de ~60 kDa, encontrada no interior dos grânulos de amido de todas as amostras analisadas, com um aumento na intensidade destas proteínas nas amostras de amido em degradação (controle 15 e 16 dpc, e tratadas com etileno 3 dpc). Segundo Baldwin (2001), esta proteína provavelmente é uma isoforma da amido-sintase.

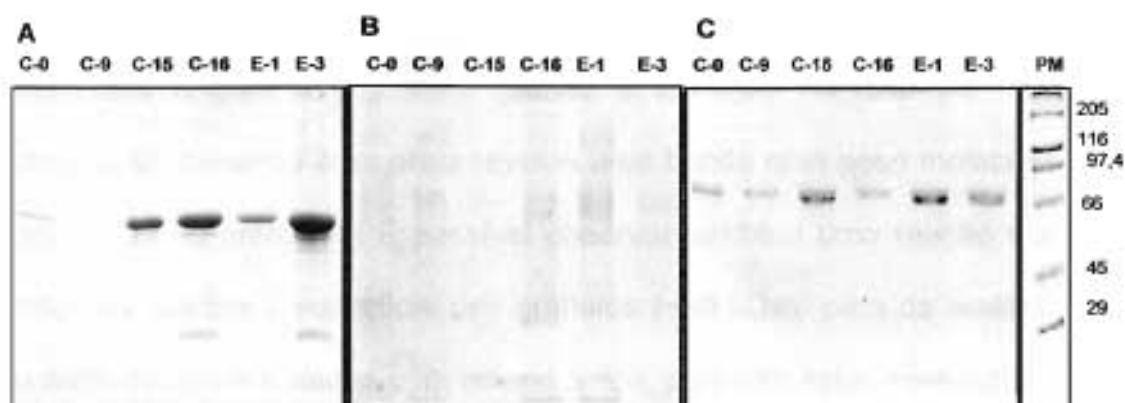


Figura 16: SDS-PAGE (8%) corado com Coomassie Blue R-250 de (A) proteínas totais do grânulo de amido de banana; (B) proteína ligada à superfície do grânulo; (C) proteína interna ao grânulo. PM: padrão de peso molecular variando de 29-205 kDa. Amostras: C: controle; E: tratadas com 100 ppm de etileno; 0, 1, 3, 9, 15, 16: dias pós-colheita (dpc). Eletroforese realizada a 200 V. As proteínas foram extraídas de acordo com o método descrito no item 3.2.8.3.

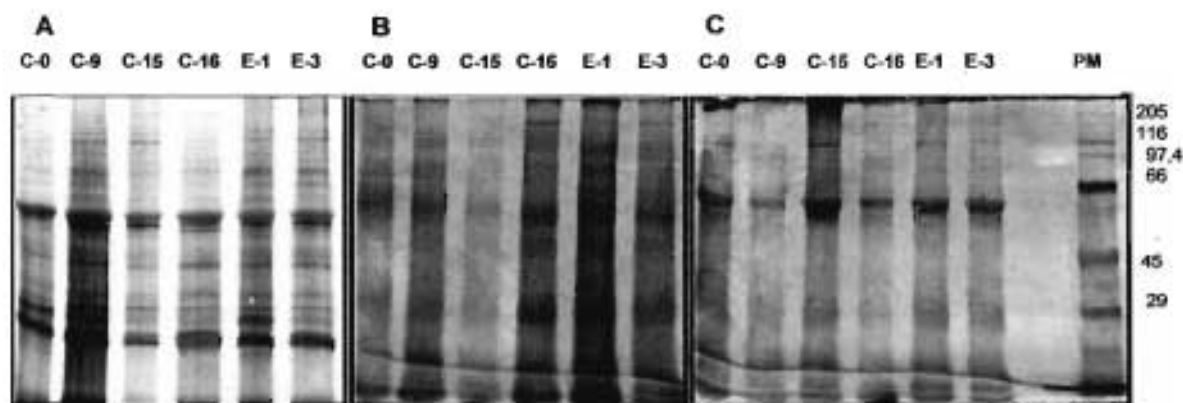


Figura 17: SDS-PAGE (8%) corado com prata de (A) proteínas totais do grânulo de amido de banana; (B) proteína ligada à superfície do grânulo; (C) proteína interna ao grânulo. PM: padrão de peso molecular variando de 29-205 kDa. Amostras: C: controle; E: tratadas com 100 ppm de etileno; 0, 1, 3, 9, 15, 16: dias pós-colheita (dpc). Eletroforese realizada a 200 V. As proteínas foram extraídas de acordo com o método descrito no item 3.2.8.3.

Os géis revelados com solução de prata também mostraram uma proteína de ~60 kDa, encontrada no interior dos grânulos de amido de todas as amostras analisadas (Figura 17). Porém quando a extração foi feita para proteína total somente a coloração com prata revelou uma banda com peso molecular de 45 kDa para todas as amostras. É possível observar também uma reação mais forte nas proteínas ligadas à superfície dos grânulos (~30 kDa), para os amidos de banana controle 16 dpc e tratadas com etileno 3 dpc, podendo estar envolvidas no processo de degradação do amido durante o amadurecimento do fruto. Estas proteínas de baixo peso molecular (~30 kDa) foram também observadas com maior intensidade para as mesmas amostras nos géis de proteína total, corados pelos dois métodos. Dominguez-Puigjaner, Vendrell e Ludevid (1992) também detectaram um aumento na intensidade destas proteínas de 30 kDa em estágios avançados do amadurecimento de bananas.

4.1.6 *Western blot* de proteínas associadas ao grânulo de amido

Para confirmar a presença destas enzimas ligadas ao grânulo, proteínas foram extraídas de amidos isolados de banana controle e tratadas com etileno em diferentes fases do amadurecimento e submetidas à *Western blot* com antisoro contra α e β -amilases de banana (Figuras 18A e 18B, respectivamente).

A Figura 18A, mostra o aparecimento de duas bandas protéicas, uma em 45 kDa e a outra em 30 kDa reagindo com o anticorpo contra a α -amilase. De acordo com Vieira-Júnior, Nascimento e Lajolo (2006), o peso molecular estimado para α -amilase de banana é de 46 kDa. Desta maneira pode-se sugerir que a banda encontrada em 45 kDa para todas as amostras, com exceção da amostra controle 16

dpc, deve ser uma α -amilase, em que a enzima atua como uma iniciadora do ataque ao grânulo, não sendo encontrada em um estágio mais avançado do amadurecimento.

As bandas de proteínas encontradas para α -amilase reforçam os resultados encontrados para atividade *in-vitro* nas amostras controle (Figura 15A) em que a enzima ligada ao grânulo de amido foi detectada nos estágios iniciais do amadurecimento apresentando um pico de atividade em 15 dpc, momento em que o amido começa a ser degradado, seguido de uma queda na atividade em 16 dpc. Nas amostras tratadas com etileno, tanto atividade quanto proteínas foram detectadas em todas as amostras.

Quando as proteínas foram extraídas dos amidos e submetidas a *Western blot* contra a β -amilase, 3 fracas bandas entre ~60-66 kDa reagiram com o anticorpo para os amidos obtidos de frutos em fase final do amadurecimento em que o teor de amido estava menor que 14% (amostras controle 15 e 16 dpc). Para os amidos isolados de bananas tratadas com etileno, apenas uma banda foi visualizada em todas as amostras. A banda protéica de maior intensidade foi visualizada em 15 dpc, época de máxima degradação do amido. Este resultado é coerente, considerando que o ataque inicial ao amido deve ser realizado por pequenas quantidades de α -amilase, a etapa seguinte de hidrólise ao polissacarídeo deve ser realizada diretamente pela ação da β -amilase. Nascimento et al. (2006), também encontraram bandas de proteína referentes à β -amilase em amostras com grau de amadurecimento similar, porém as proteínas apresentaram um peso molecular de ~52 kDa, sugerindo ser uma outra isoforma da enzima.

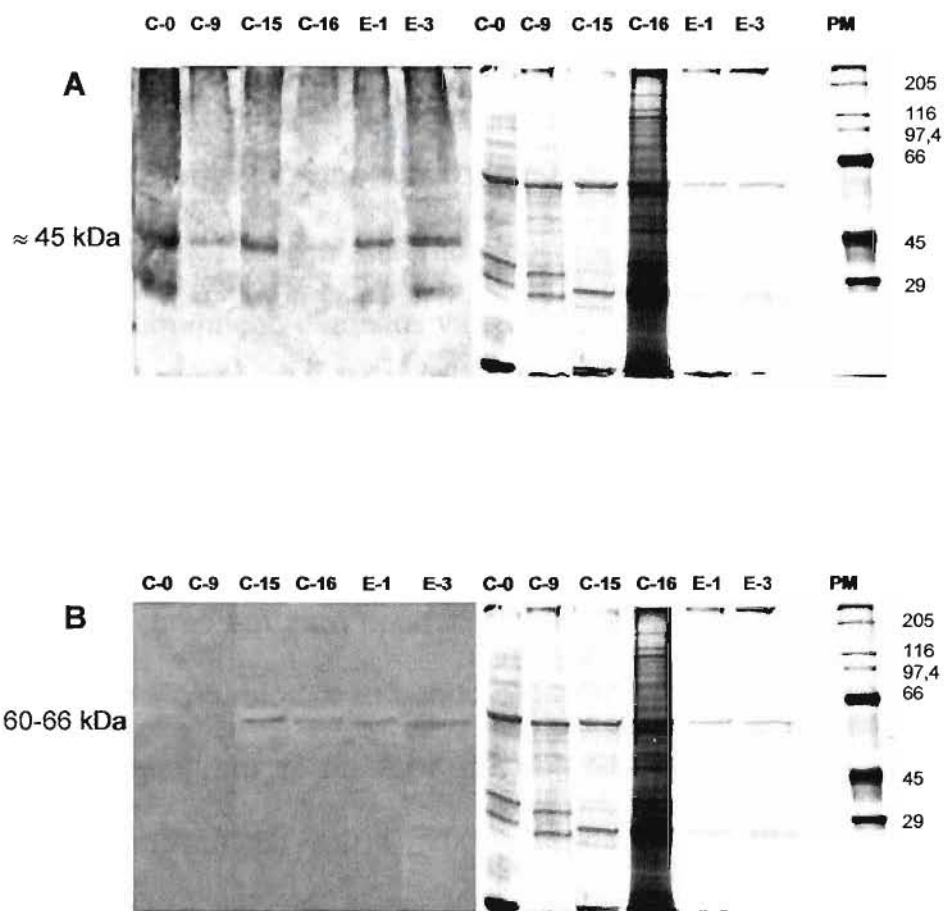


Figura 18: *Western blotting* (esquerda) para imunodetecco das bandas de α -amilase (A) e β -amilase (B). SDS-PAGE (8%) (direita) de proteínas extraídas do grânulo de amido de banana. Gel corado com prata. PM: padrão de peso molecular variando de 29-205 kDa. Amostras: C: controle; E: tratadas com 100 ppm de etileno; 0, 1, 3, 9, 15, 16: dias pós-colheita (dpc). Eletroforese realizada a 200 V. Transferência eletroforética para membrana de nitrocelulose realizada a 30 V *overnight*. As proteínas foram extraídas de acordo com o método descrito no item 3.2.8.4.

Western blot de proteínas associadas ao grânulo de amido de turions, contra α -amilase de ervilha (45 kDa) e β -amilase de turions de *S. polyrhiza* (60 kDa), mostraram a existência de bandas de proteínas com 42 kDa e 60 kDa sugerindo que estas enzimas estão associadas ao grânulo de amido em turions (REIMANN et al., 2002).

Os resultados obtidos até o momento, confirmam que as enzimas α e β -amilases estão aderidas à superfície do grânulo de amido, contribuindo para sua degradação, em função dos altos valores de atividade encontrados no momento em que o amido começa a ser degradado.

Tudo indica que a α -amilase inicia o ataque ao grânulo, já que por detecção imunológica, esta enzima foi encontrada em amostras anteriores ao início da degradação, como em zero dpc (controle) e etileno (1 dpc), cujos teores de amido estavam ainda elevados, não sendo detectada em um estágio mais avançado do amadurecimento, em plena fase de degradação do amido. De acordo com a literatura (KOSSMANN; LLOYD, 2000), esta ação inicial ao grânulo pode facilitar a atuação posterior de outras enzimas, além de liberar cadeias de glucanos que servirão de substrato para outras enzimas. Estes resultados indicam também, que a β -amilase pode aderir à superfície do grânulo e não só permanecer solúvel no estroma atuando nos produtos de degradação da α -amilase, contribuindo para a etapa seguinte de hidrólise ao polissacarídeo, já que bandas protéicas foram encontradas no momento em que os amidos começam a ser degradados.

No entanto, outras técnicas poderiam auxiliar na identificação destas proteínas, como por exemplo, o sequenciamento por espectrometria de massas e Microscopia de Imunofluorescência.

4.2 Efeito da baixa temperatura sobre o amadurecimento da banana: grânulo de amido e enzimas correlacionadas

4.2.1 Respiração, produção de etileno, teor de amido e síntese de açúcares

Bananas destinadas à exportação são transportadas por aproximadamente 14 dias em ambientes refrigerados, com temperatura entre 12-14°C, na tentativa de manter os níveis de produção de etileno os mais baixos possíveis, reduzindo as taxas de respiração, retardando o climatério e, conseqüentemente evitando que os frutos amadureçam (PALMER, 1971; SEYMOUR; TAYLOR; TUCKER, 1993). Na chegada ao destino, os frutos são geralmente transferidos para ambientes a temperatura de 22°C e então expostos ao etileno exógeno para induzir o amadurecimento. O precedente a este experimento era que bananas submetidas ao armazenamento sob ~13°C por duas semanas, tiveram padrão de atividade/expressão de enzimas ligadas à degradação do amido alteradas.

Assim, o objetivo deste experimento foi o de verificar se o armazenamento de bananas a baixas temperaturas (13°C) influencia na via metabólica que atua na degradação do amido durante todo o período de amadurecimento dos frutos, quando comparado a frutos armazenados a 18°C. Foram três os tratamentos: grupo controle (armazenado a 18°C), grupo frio (armazenado a 13°C por 17 dias) e grupo etileno + frio (tratado com etileno 100 ppm e armazenado a frio por 17 dias). Os perfis de respiração e produção de etileno medidos durante todo o período de amadurecimento dos frutos estão apresentados nas Figuras 19A e 19B,

respectivamente. Os perfis de amido e açúcares totais estão apresentados nas Figuras 20A e 20B.

No grupo etileno + frio tanto a produção de etileno quanto a de CO₂ começaram a aumentar no dia 14, cerca de dois dias antes do grupo controle. No grupo frio, os dois eventos começaram a acontecer, de forma mais pronunciada, após a retirada dos frutos do armazenamento a frio. Máximos de produção de etileno foram obtidos aos 18 dpc para as amostras dos grupos controle e tratadas com etileno + frio, e aos 22 dpc para as amostras do grupo frio (Figura 19B). O efeito da temperatura pode ter sido o causador da menor produção de etileno obtida e pelo atraso na produção de pico de produção de etileno do grupo frio quando comparado aos frutos controle. Palmer (1971) mostrou que baixas temperaturas alteram os eventos relacionados ao etileno, uma vez que em bananas expostas a 100 ppm do hormônio, o amadurecimento só foi iniciado quando os frutos passaram da temperatura de ~14°C para 18,5-23 °C. O perfil de respiração foi semelhante até o 15º dia para os frutos dos grupos controle e frio seguido de um notável aumento na produção de CO₂ aos 21 e 22 dpc para cada grupo, respectivamente.

A degradação do amido (Figura 20A) parece ter sido acompanhada pelo aumento respiratório, com uma notável queda de 20% aos 17 dpc para 5% de amido após o pico respiratório para as amostras do grupo controle. Resultados semelhantes foram obtidos para as amostras do grupo frio, em que o teor de amido foi reduzido de 20% aos 20 dpc para 8% após o pico. Já os frutos expostos ao etileno exógeno e mantidos a 13°C (grupo etileno + frio) tiveram um padrão de respiração diferenciado. Três picos no decorrer do amadurecimento foram observados aos 10, 18 e 21 dias pós-colheita (Figura 19A). A degradação do amido também ocorreu em etapas, concomitante com os picos de CO₂ produzidos.

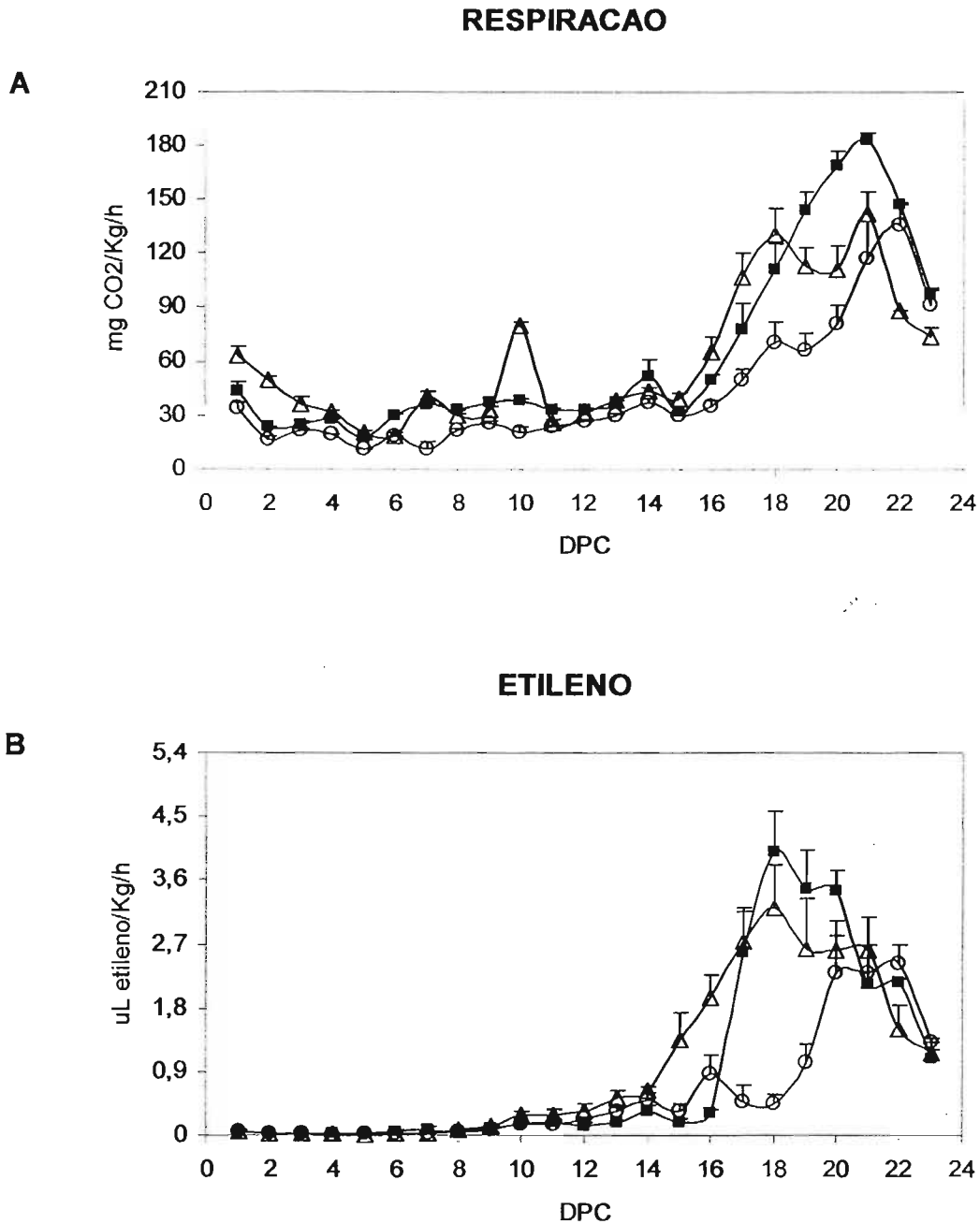


Figura 19: Medidas da produção de gás carbônico (**A**) e produção de etileno (**B**) em frutos dos grupos controle (-■-) (armazenados a 18°C), grupo frio (-○-) (frutos armazenados a temperatura de 13°C por 17 dias e submetidos em seguida a temperatura de 18°C até o completo amadurecimento) e grupo etileno + frio (-△-) (frutos tratados com 100 ppm de etileno e armazenados a temperatura de 13°C por 17 dias e submetidos à temperatura de 18°C até o completo amadurecimento). As medidas foram realizadas durante todo o período de amadurecimento dos frutos. Resultados expressos como média da quintuplicata de análise mais o erro padrão da média.

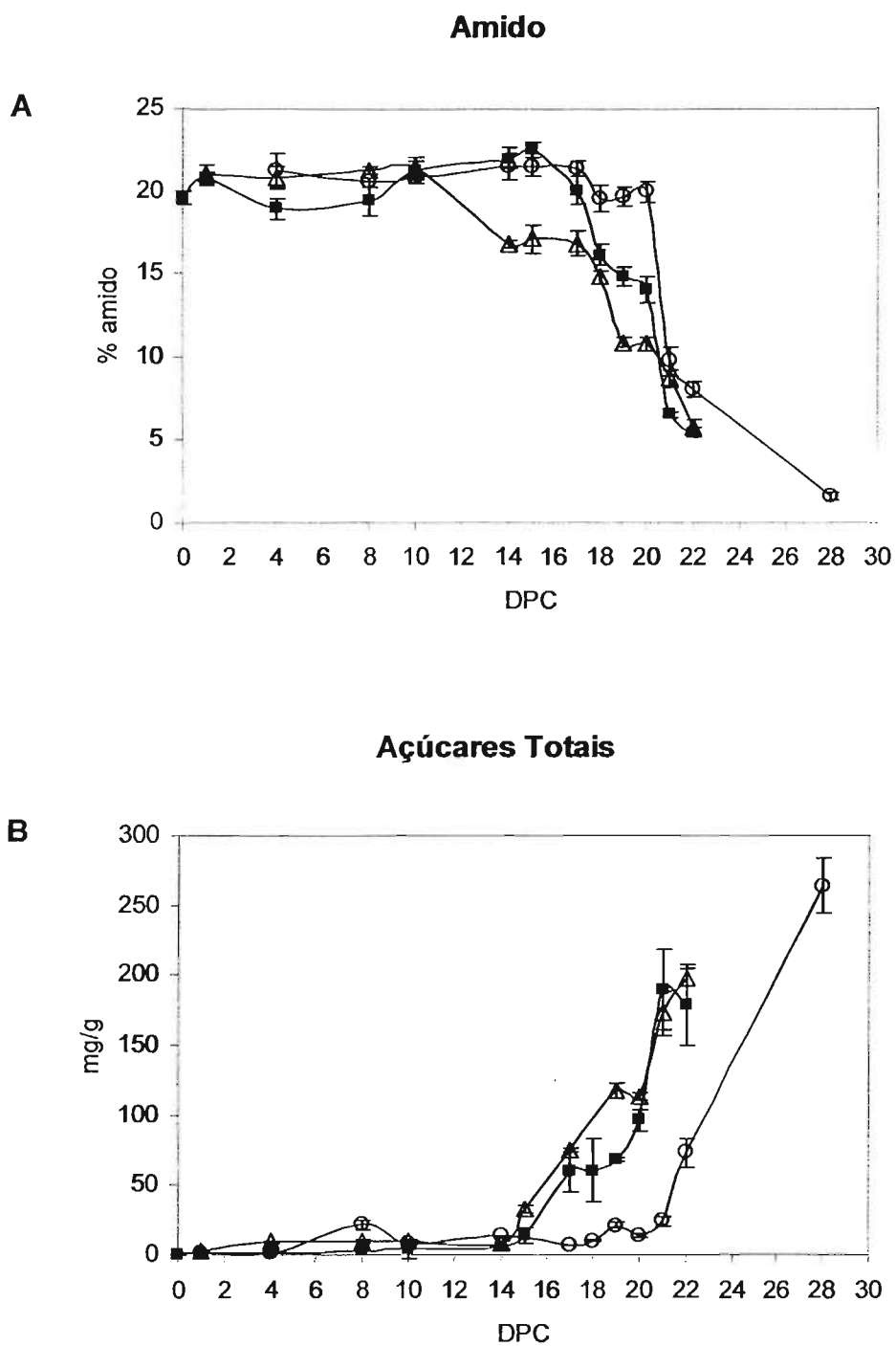


Figura 20: Teores de amido **(A)** e açúcares solúveis **(B)** determinados em bananas dos grupos controle (18°C -■-), frio (13°C -○-) e etileno + frio (etileno + 13°C -△-). Resultados expressos como média da triplicata de análise mais o erro padrão da média.

A síntese e acúmulo de açúcares solúveis ocorreram de forma concomitante com a degradação do amido para os 3 grupos (Figuras 20A e 20B). Em todos os frutos os teores iniciais de açúcares foram inferiores a 1,4%. Nos frutos controle, no momento em que o amido começa a ser degradado (~20%) aos 17 dpc, o teor de açúcares passou rapidamente para cerca de 6%, alcançando 18% no final do amadurecimento. Nesse grupo o teor residual de amido foi de 5,4%. Nas amostras do grupo frio os teores de açúcares foram de 2,4% no início da degradação do amido (9,7%) aos 22 dpc, passando a valores superiores a 26% no final do amadurecimento (1,6% amido). Para os frutos do grupo etileno + frio, o teor de açúcares passou de 7,5% a 19,8%, enquanto que a taxa de degradação do amido caiu de 16,8% para 5,7% no final do amadurecimento.

4.2.2 Perfil em SDS-PAGE e *Western blot* de proteínas extraídas de extrato bruto de banana

Com base no perfil respiratório (Figura 19A) e nos teores de amido (Figura 20A), foram selecionadas amostras dos 3 grupos que representassem todo o período de degradação. As proteínas da polpa da banana foram extraídas (3.2.8.6) e aplicadas em SDS-PAGE com a finalidade de verificar se os frutos armazenados a baixa temperatura, além do tratamento com etileno, tiveram o perfil protéico alterado durante o amadurecimento, quando comparado com os frutos controle.

De acordo com perfil protéico apresentado na Figura 21, foi possível observar dezenas de bandas para todas as amostras, controle e tratadas. Inicialmente, 5 bandas de interesse puderam ser visualizadas. Elas estão indicadas com uma seta apresentando peso molecular em kDa de aproximadamente 112 (fosforilase), 60

(amido sintase), 52 (β -amilase), 45 (α -amilase) e 30, tendo esta última aparecido com maior intensidade em todas as amostras.

A banda de 112 kDa, supostamente uma fosforilase, não estava presente aos zero dpc (19,54% amido) para a amostra controle, tendo aparecido com o amadurecimento. Para as amostras de bananas tratadas, foi possível observar banda protéica desde o primeiro dia em 10 dpc (~21% amido), tendo sua intensidade também aumentada com o amadurecimento. Por apresentarem praticamente o mesmo teor de amido, pode-se supor que esta diferença no perfil protéico tenha sido induzida pela baixa temperatura de armazenamento. Resultados semelhantes foram observados por Mainardi et al. (2006) em bananas não tratadas, em que a atividade da fosforilase aumentou durante o amadurecimento.

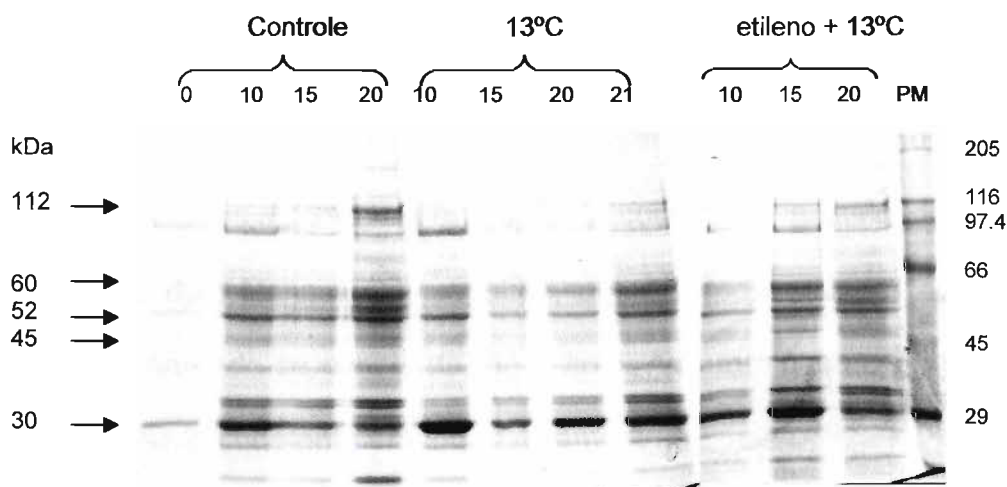


Figura 21: SDS-PAGE (7,5%) revelado com prata de proteínas totais extraídas da polpa da banana (como descrito em 3.2.8.6). Amostras: Frutos controle (0, 10, 15 e 20 dias pós-colheita); Frutos armazenados a 13°C (10, 15, 20 e 21 dias pós-colheita); Frutos tratados com 100 ppm de etileno e armazenados a 13°C (10, 15 e 20 dias pós-colheita); PM: padrão de peso molecular variando de 29-205 kDa. Foi aplicado 30 μ g de proteína por amostra. As setas indicam os pesos moleculares estimados de diferentes enzimas.

Uma banda com 52 kDa, teoricamente referente a β -amilase, teve um aumento na quantidade de proteína concomitantemente com o amadurecimento dos frutos dos grupos controle e tratados (etileno + frio). Porém, os frutos do grupo frio, apresentaram bandas mais intensas no início e no final do amadurecimento. Os frutos deste último tratamento tiveram resultados semelhantes em relação à banda protéica de 45 kDa, apresentando bandas mais intensas aos 10 e 21 dpc. Já no grupo controle zero dpc, não foi detectada a banda referente à α -amilase. Para confirmar estes resultados, os extratos protéicos da polpa da banana obtidos anteriormente foram utilizados para ensaio em *Western blot* com anticorpos primários contra α e β -amilases.

A Figura 22A, mostra a reação do soro anti α -amilase com duas bandas de proteínas com pesos moleculares de 45 kDa e 30 kDa. Sabe-se que o peso molecular estimado para α -amilase de banana é de 46 kDa (VIEIRA-JÚNIOR; NASCIMENTO; LAJOLO, 2006). Nas amostras controle, a quantidade de proteína relativa ao antisoro foi praticamente ausente aos zero dpc, aparecendo discretamente com o amadurecimento. Um perfil muito diferente foi observado para as amostras tratadas a 13°C, em que o ponto com maior intensidade na reação foi o inicial, aos 10 dpc. Na amostra seguinte, aos 15 dpc, a intensidade da banda foi mais fraca, mantendo-se constante até o final. As proteínas do grupo etileno + frio reagiram de forma constante em todas as amostras.

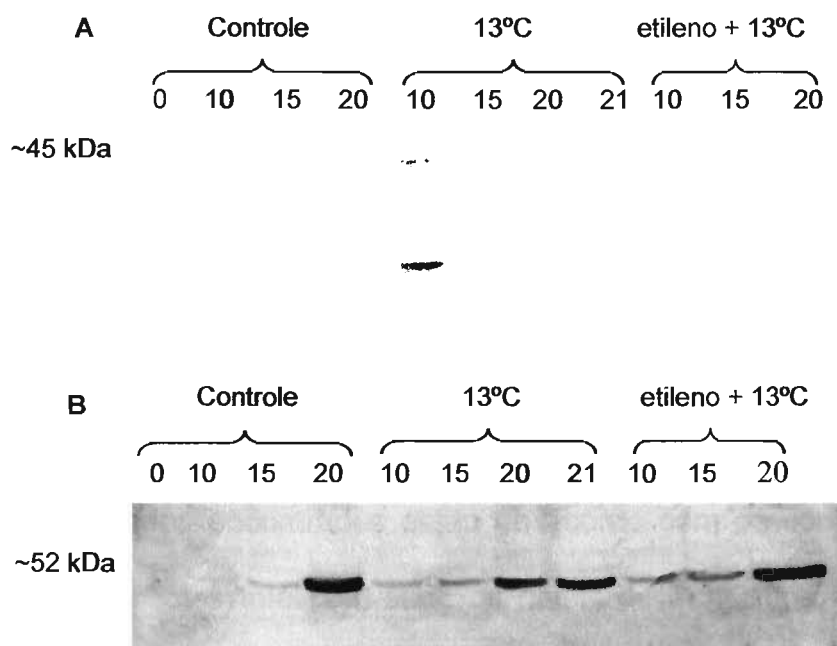


Figura 22: *Western-Blotting* contra **(A)** α -amilase (1:100) e **(B)** β -amilase (1:125). Anticorpo secundário usado para fosfatase alcalina (1:30000). Amostras: Frutos controle (0, 10, 15 e 20 dias pós-colheita); Frutos armazenados a 13°C (10, 15, 20 21 dias pós-colheita); Frutos tratados com 100 ppm de etileno e armazenados a 13°C (10, 15 e 20 dias pós-colheita). Foi aplicado 30 μ g de proteína por amostra. As proteínas foram extraídas da polpa da banana de acordo com o método descrito no item 3.2.8.6. As bandas protéicas foram reveladas por método cromogênico segundo Sambrook (1989).

Os ensaios com o soro anti β -amilase estão apresentados na Figura 22B, em que apareceu uma única faixa de proteínas com peso molecular de aproximadamente 52 kDa. Pode-se observar que a quantidade de proteína foi afetada pelos diferentes tratamentos. Nas amostras controle, a proteína relativa ao antisoro esteve presente apenas após o 15º dpc, com reação mais intensa na fase final do amadurecimento aos 20 dpc. Quanto aos outros grupos (frio e etileno + frio), bandas protéicas relativas à enzima foram observadas já aos 10 dpc, tornando-se mais intensas no estágio final do amadurecimento. Resultados similares foram

obtidos por Nascimento et al. (2006) em que a proteína apareceu aos 16° dpc, em bananas controle.

Estes resultados iniciais mostram que a degradação do amido nos frutos teve início em tempos diferentes para as amostras controle e tratadas (frio, etileno + frio) e ocorreu concomitantemente com a síntese dos açúcares solúveis. E quando as proteínas foram extraídas dos frutos dos 3 grupos e submetidas a *Western blot*, nitidamente pôde-se observar que os perfis de proteínas para cada tratamento foram alterados em relação ao controle.

Os resultados encontrados estão de acordo com os conhecimentos que se tem para tecidos fotossintéticos, onde os níveis de transcritos e a atividade da β -amilase são aumentados através de diferentes estímulos, sendo um deles o estresse pela baixa temperatura, observado pelo aumento no teor de maltose produzida (KAPLAN; SUNG; GUY, 2006). Nos frutos aqui estudados, parece que além da β -amilase, a α -amilase também teve seus padrões alterados.

Com o objetivo de verificar se o armazenamento dos frutos a baixa temperatura (13°C) alterou o padrão de degradação do grânulo durante o amadurecimento dos frutos, quando comparados com os amidos isolados dos frutos controle (18°C), amidos de bananas deste experimento foram isolados durante toda a fase de amadurecimento dos frutos para as seguintes amostras: controle (zero, 17, 20 e 21 dpc), frio (10, 17, 20 e 21 dpc) e etileno + frio (10 e 20 dpc).

Diferentes técnicas de microscopia como a Microscopia Óptica, a Microscopia Eletrônica de Varredura e a Microscopia de Imunofluorescência foram utilizadas para verificar possíveis mudanças estruturais nas superfícies dos amidos isolados (item 4.3.2).

4.3 Caracterização do grânulo de amido de banana

4.3.1 Análise de distribuição de tamanho de partículas, análise de difração de Raios-X, grau de cristalinidade do grânulo de amido e teor de amilose

O diâmetro médio dos grânulos de amido isolados da banana verde (Controle) foi de 28,85 μm , diminuindo cerca de 12% durante o amadurecimento da banana (para 25,36 μm) (Tabela V). A porcentagem de distribuição dos grânulos mostra que 90% dos grânulos tiveram diâmetros inferiores a 49,59 μm e 10% inferiores a 10,27 μm . Estes resultados indicam que aproximadamente 26% dos grânulos menores foram preferencialmente, ou mais rapidamente degradados, durante o amadurecimento da banana, do que os grânulos maiores (somente ~8%) (Tabela V). A maior suscetibilidade ao ataque enzimático é provavelmente devida a diferenças na composição ou disposição dos polissacarídeos que o compõe.

A análise de distribuição de tamanho dos grânulos realizada por Cordenunsi (2004), utilizando microscopia óptica para medida do comprimento e largura dos grânulos, mostrou que durante o amadurecimento da banana houve uma diminuição no número de grânulos grandes (110-300 μm) concomitante com o aumento dos grânulos médios (70-110 μm) e pequenos (< 70 μm). E esta redução foi mais acentuada na largura dos grânulos do que no comprimento, com base na razão comprimento/largura calculada ter aumentado durante o amadurecimento da banana.

Tabela V: Diâmetro médio calculado através do volume dos grânulos de amido. Porcentagem de distribuição realizada de acordo com os tamanhos de grânulos encontrados. Amostras: amidos isolados de bananas controle obtidas no Primeiro Experimento (ver item 3.1.2 e Tabela IV) aos zero, 6, 12 e 15 dias pós-colheita

Amostra	Teor de amido (%)	Diâmetro médio (μm)	% Distribuição de tamanho de grânulos	
			90% (μm)	10% (μm)
0	21,69 \pm 0,31	28,85	49,59	10,27
6	18,04 \pm 0,41	26,68	43,44	8,70
12	17,81 \pm 0,17	24,62	41,81	8,46
15	11,18 \pm 0,78	25,36	45,38	7,64

O grau e o tipo de cristalinidade presentes em um amido são dependentes principalmente das características estruturais da amilopectina e a disposição de suas cadeias dentro do grânulo (ZHANG et al., 2005). O padrão de cristalinidade obtido nos grânulos de amido extraídos de banana verde e no estágio intermediário de amadurecimento (zero e 12 dpc, respectivamente) foi do tipo B (semelhante ao amido de batata) (Tabela VI e Figura 23). O mesmo padrão de cristalinidade foi encontrado por Lii, Chang e Young (1982) e Cordenunsi (2004). Porém à medida que o fruto amadurece e o amido é degradado (15 dpc), padrões dos tipos A e B foram encontrados (semelhantes aos amidos de milho e batata).

Quando dois padrões de Raios-X são encontrados em uma mesma amostra, é dito que este amido é do tipo C, contendo cadeias de amilopectina com comprimentos de ramificações longas e curtas. Segundo Zhang et al. (2005) o amido de banana pode apresentar padrões de difração dos tipos A, B ou C, dependendo da cultivar, das condições de crescimento ou mesmo da técnica utilizada para o isolamento dos grânulos. Assim, é provável que as diferenças observadas por Bello-Pérez et al. (2000), que encontraram padrão de Raios-X do tipo A para amido de

banana, e por Jane, Wong e McPherson (1997), que encontraram um padrão do tipo C para amido da mesma fonte, sejam devidas a estes fatores.

O grau de cristalinidade, calculado a partir do gráfico de difração de Raios-X (Figura 23) para os amidos, aumentou levemente durante o amadurecimento dos frutos de 15% (nas amostras controle zero e 12 dpc) para 17% (aos 15 dpc). Estes resultados indicam que, provavelmente, a superfície degradada tem uma composição ou comprimentos de cadeias de amilopectina diferentes do centro dos grânulos, já que padrões dos tipos A e B foram encontrados no amido degradado (HIZUKURI, 1985). Quando esta região do grânulo, com grau de cristalinidade maior e mais resistente à degradação é atingida, a degradação pára, ou diminui de velocidade. Um precedente para essa hipótese foi dado pelo estudo conduzido por Bogracheva et al. (1998), com amido de ervilha, que apresenta padrão de Raios-X tipo C. Para esse amido foram encontrados, picos característicos de polimorfismos A e B e, estudando as propriedades de gelatinização, observaram que os polimorfismos B são arrançados no centro do grânulo próximo ao hilo, enquanto que polimorfismos A são arrançados na periferia do grânulo.

Como já discutido anteriormente, os grânulos de amido apresentam 2 tipos principais de estruturas cristalinas obtidas por difração de Raios-X, dependendo da distribuição dos comprimentos de cadeia da amilopectina e empacotamento das duplas hélices (TANG; MITSUNAGA; KAWAMURA, 2006; GLARING; KOCH; BLENNOW, 2006) e, em geral os amidos do tipo B são aqueles isolados de tubérculos ou amidos ricos em amilose. Os teores de amilose foram determinados para os amidos isolados nos diferentes pontos do amadurecimento de bananas. Os resultados encontrados não tiveram variações nas três amostras analisadas (Tabela VI).

Os teores de amilose encontrados na literatura para amidos isolados de banana foram de 16% (KAYISU; HOOD; VANSOEST, 1981), 8% (LEHMANN; JACOBASCH; SCHMIEDL, 2002), 17% (GARCIA; LAJOLO, 1988). As diferenças encontradas podem ter sido variações de acordo com a cultivar analisada, estágio de amadurecimento da banana e principalmente a metodologia utilizada na determinação, em que uma mesma amostra pode apresentar diferentes teores de amilose.

Tabela VI: Teor de amido*, teor de amilose*, padrão de difração de Raios-X e grau de cristalinidade dos grânulos de amido isolados de banana. Amostras: Controle (zero, 12 e 15 dpc)

Amostra	Teor de amido (%)	Teor de amilose (%)	ICDD	Padrão de Raios-X	Grau de Cristalinidade (%)
0	21,69 ± 0,31	15,14 ± 0,46	amido de batata	B	15,0
12	17,81 ± 0,17	15,77 ± 1,05	amido de batata	B	15,0
15	11,18 ± 0,78	15,59 ± 0,32	amido de batata e milho	A e B	17,0

*Cada valor representa a média de três determinações mais o erro padrão da média.

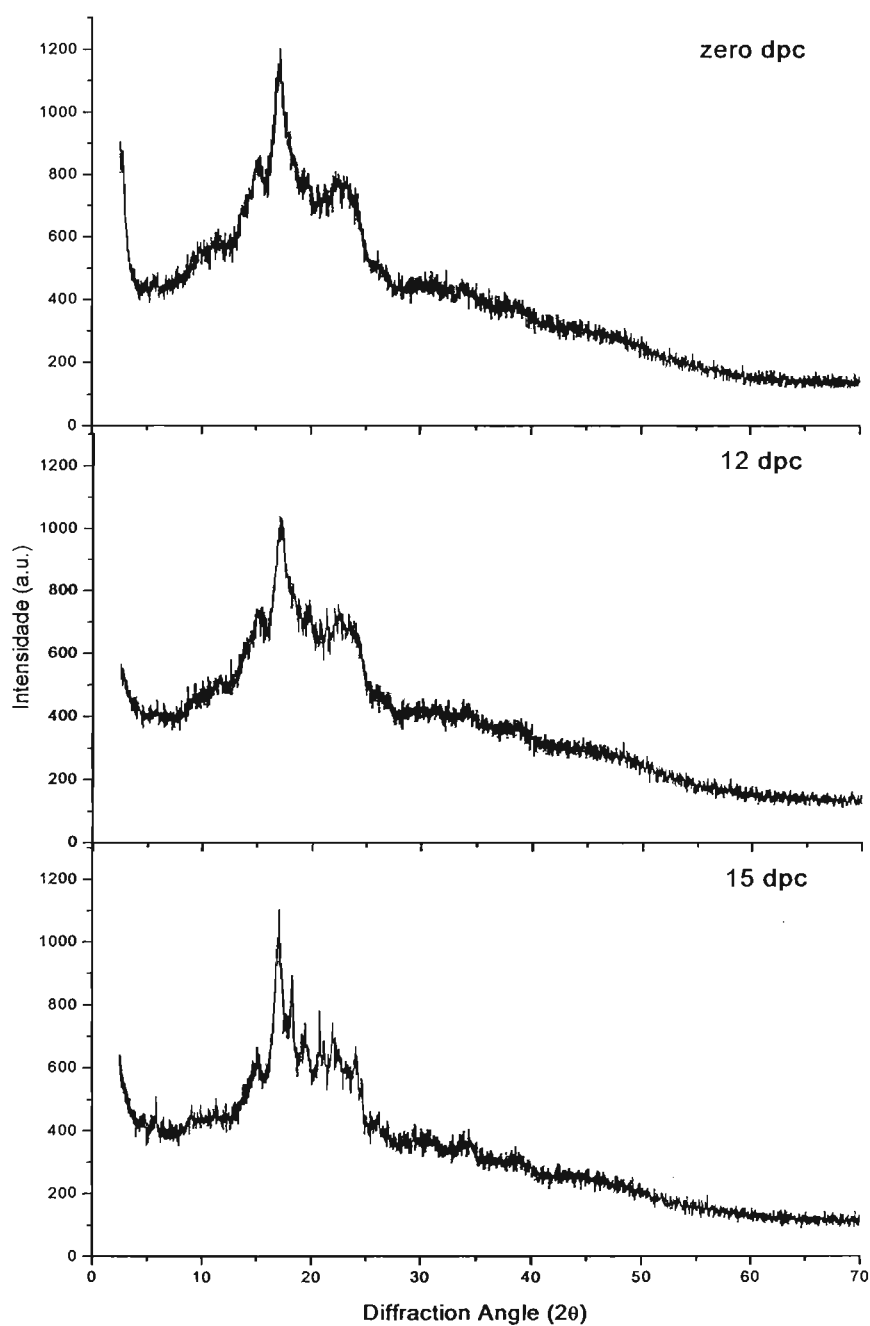


Figura 23: Difratoformas de Raios-x de amidos isolados de bananas Controle zero, 12 e 15 dpc.

Algumas especulações podem ser feitas com base nos resultados aqui obtidos: o amido de banana recém-colhida apresentou um padrão de Raios-X tipo B e teor de amilose de ~15%. Com o amadurecimento, o diâmetro médio dos grânulos diminuiu, atingindo uma região de maior cristalinidade (de 15% para 17%), tendo como conseqüência, a identificação de amidos também do tipo A. O teor de amilose não variou à medida que o grânulo foi degradado, função provavelmente da distribuição homogênea da amilose por todo o grânulo, tanto na superfície quanto nas camadas mais internas. No entanto, como já dito anteriormente, o que pode ter variado foram os comprimentos médios das cadeias de amilopectina e a forma com que estas cadeias se arranjaram, contribuindo para um pequeno aumento na cristalinidade do grânulo, que refletiram em mudanças no padrão de Raios-X. Tang, Mitsunaga e Kawamura (2006) defendem a teoria de que a cristalinidade do grânulo de amido está associada à presença de amilopectina. Mas, somente este dado não indica o modo de organização dos polímeros (amilose e amilopectina) presentes no grânulo de amido, apesar de ter papel decisivo nas características físico-químicas e na arquitetura do grânulo, bem como, susceptibilidade às enzimas amilolíticas.

4.3.2 Análises Microscópicas

4.3.2.1 Microscopia Óptica

A microscopia óptica com contraste diferencial de interferência permite visualizar pequenos detalhes e diferenças de fase do tipo relevo. As imagens obtidas estão apresentadas nas Figuras 24 a 28, utilizando grânulos de amido isolados de bananas obtidas do Segundo Experimento (ver item 3.1.3) dos grupos controle (zero,

17, 20 e 21 dpc), frio (10, 17, 20 e 21 dpc) e etileno + frio (10 e 20 dpc), durante toda a fase de amadurecimento dos frutos.

O amido isolado de bananas verdes recém-colhidas do grupo Controle (Figura 24), contém grânulos grandes e ovais, com uma organização interna bem definida, em que aparecem os anéis de crescimento localizados em torno do hilo. Em alguns grânulos, no decorrer do amadurecimento (17 dpc), pode ser observado o início de uma aparente corrosão superficial, tornando mais evidentes os anéis de crescimento (indicados por setas). Nos amidos isolados em 20 e 21 dpc (Figura 25), em que os grânulos encontram-se em estágios avançados de degradação, ainda é possível visualizar alguns grânulos íntegros e ovais, e outros apresentando formatos finos e alongados, totalmente degradados, mostrando a diversidade dos grânulos no amido da banana, e levando a propor um padrão de exo-corrosão, em que o centro dos grânulos seria mais resistente à degradação do que a superfície.

Nos frutos que foram submetidos ao frio (Figura 26), os amidos isolados aos 10 e 17 dpc apresentaram grânulos dos mais variados formatos e tamanhos, sendo grandes, pequenos, alongados e ovais. No entanto, foi observada a presença de pequenas depressões circulares na superfície destes grânulos (indicadas por setas). À medida que o amido foi sendo degradado (20 dpc), uma maior população de grânulos menores foi visualizada, porém as depressões circulares foram ainda detectadas nos grânulos mais íntegros (Figura 27). Nos frutos com 21 dpc foram observados amidos com formatos semelhantes aos obtidos aos 20° dpc, e os “furos” anteriormente vistos foram substituídos por um perfil de degradação superficial mais alargados, no formato de círculos, indicando que a degradação deve ocorrer da superfície para o interior, e em camadas.

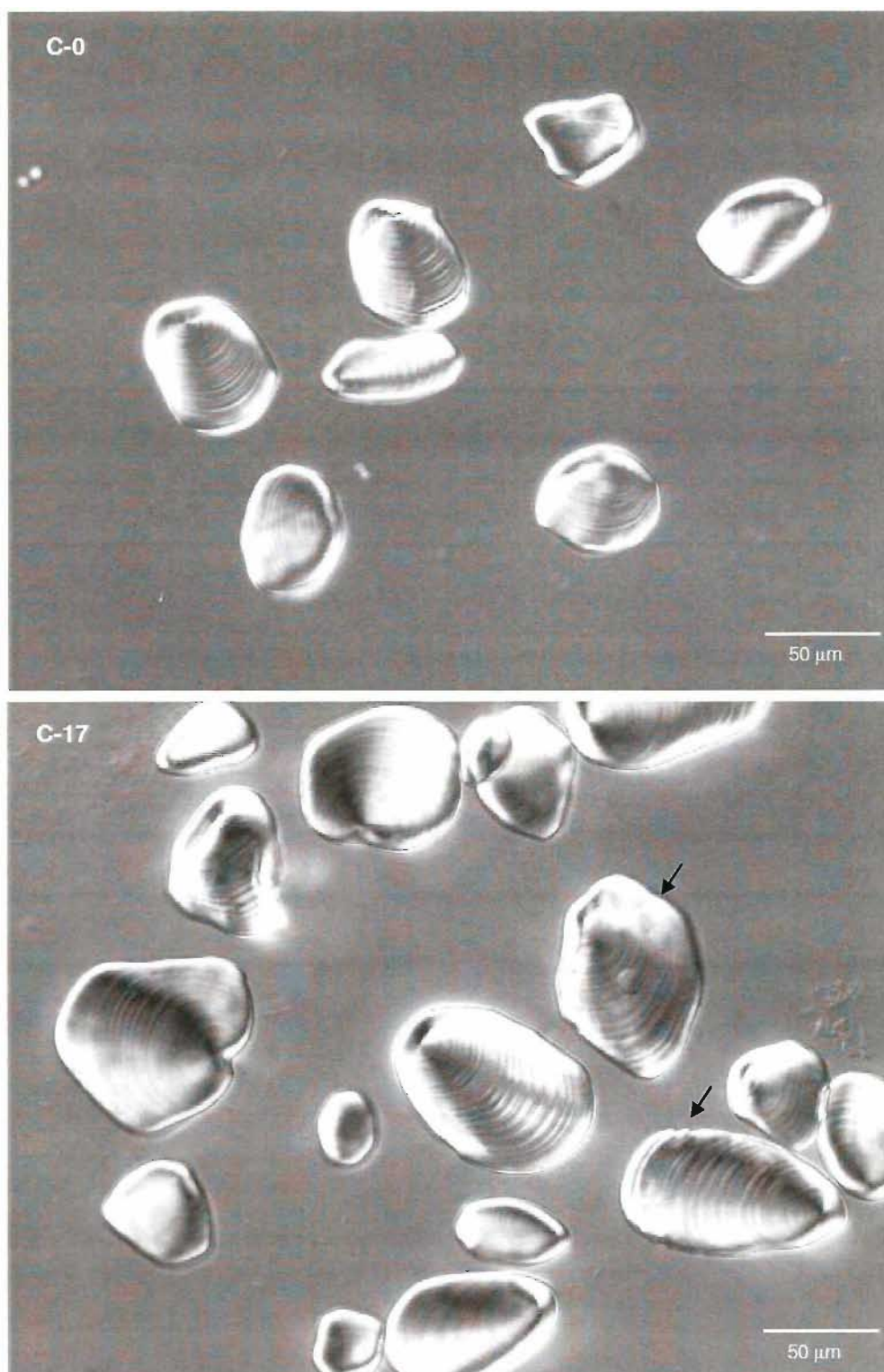


Figura 24: Microscopia óptica com contraste diferencial de interferência de grânulos de amido isolados de banana. Amostras: controle zero e 17 dpc. As setas indicam o início da corrosão superficial em alguns grânulos aos 17 dpc.

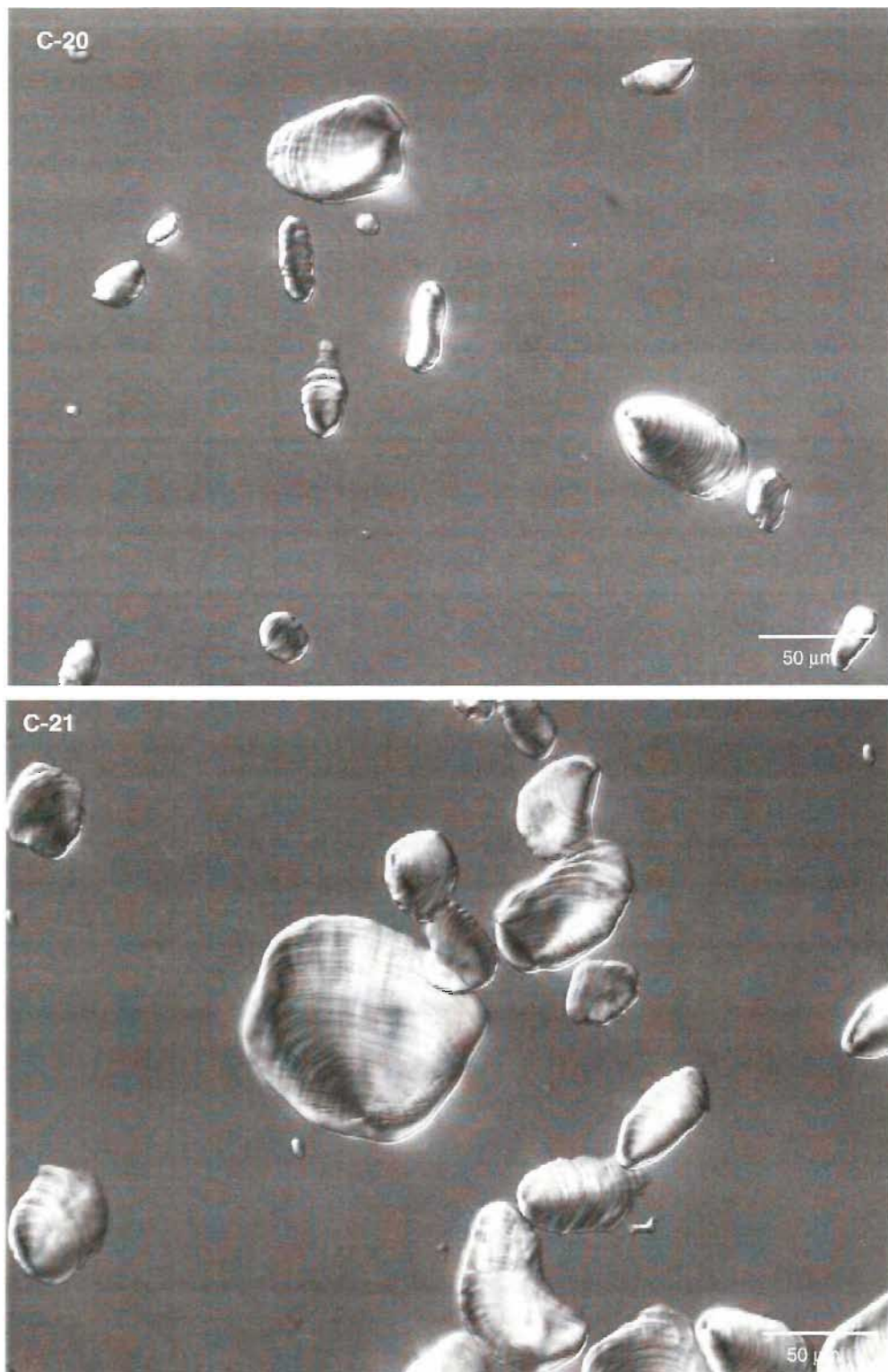


Figura 25: Microscopia óptica com contraste diferencial de interferência de grânulos de amido isolados de banana. Amostras: controle 20 e 21 dpc.

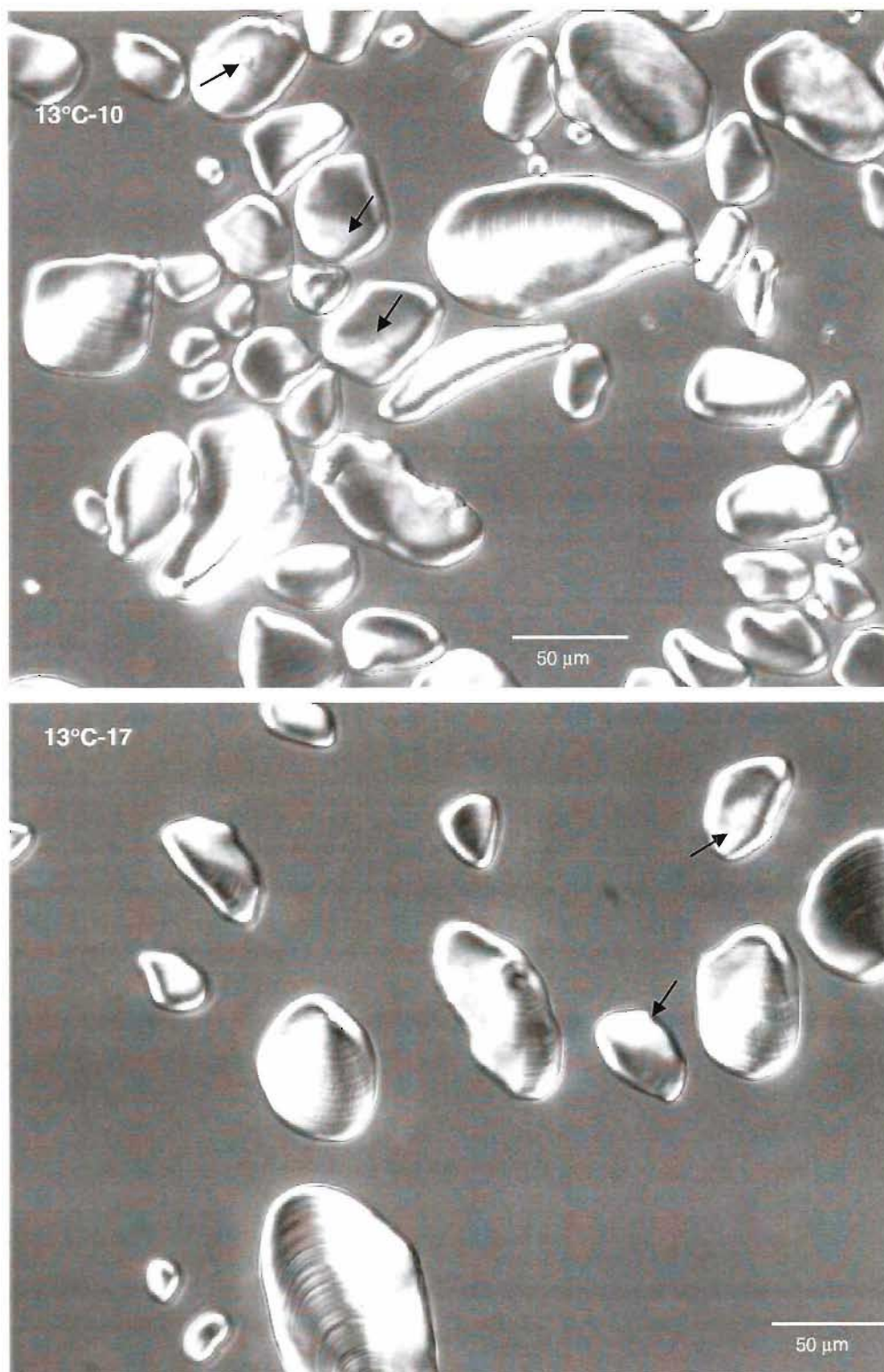


Figura 26: Microscopia óptica com contraste diferencial de interferência de grânulos de amido isolados de banana. Amostras: 13°C 10 e 17 dpc. As setas indicam as pequenas depressões circulares na superfície dos grânulos.

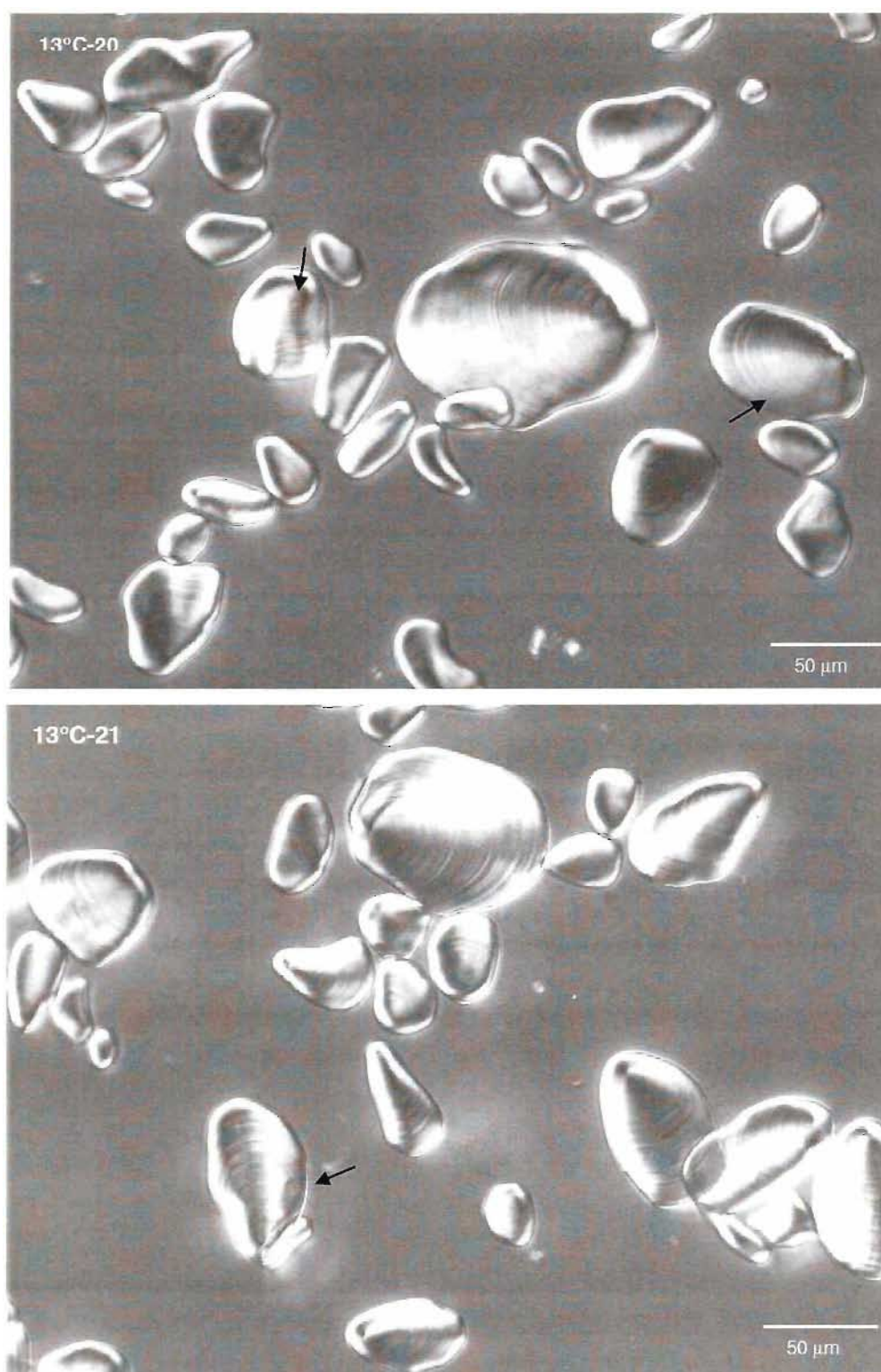


Figura 27: Microscopia óptica com contraste diferencial de interferência de grânulos de amido isolados de banana. Amostras: 13°C 20 e 21 dpc. As setas indicam as depressões circulares tornando-se mais alargadas na superfície dos grânulos.

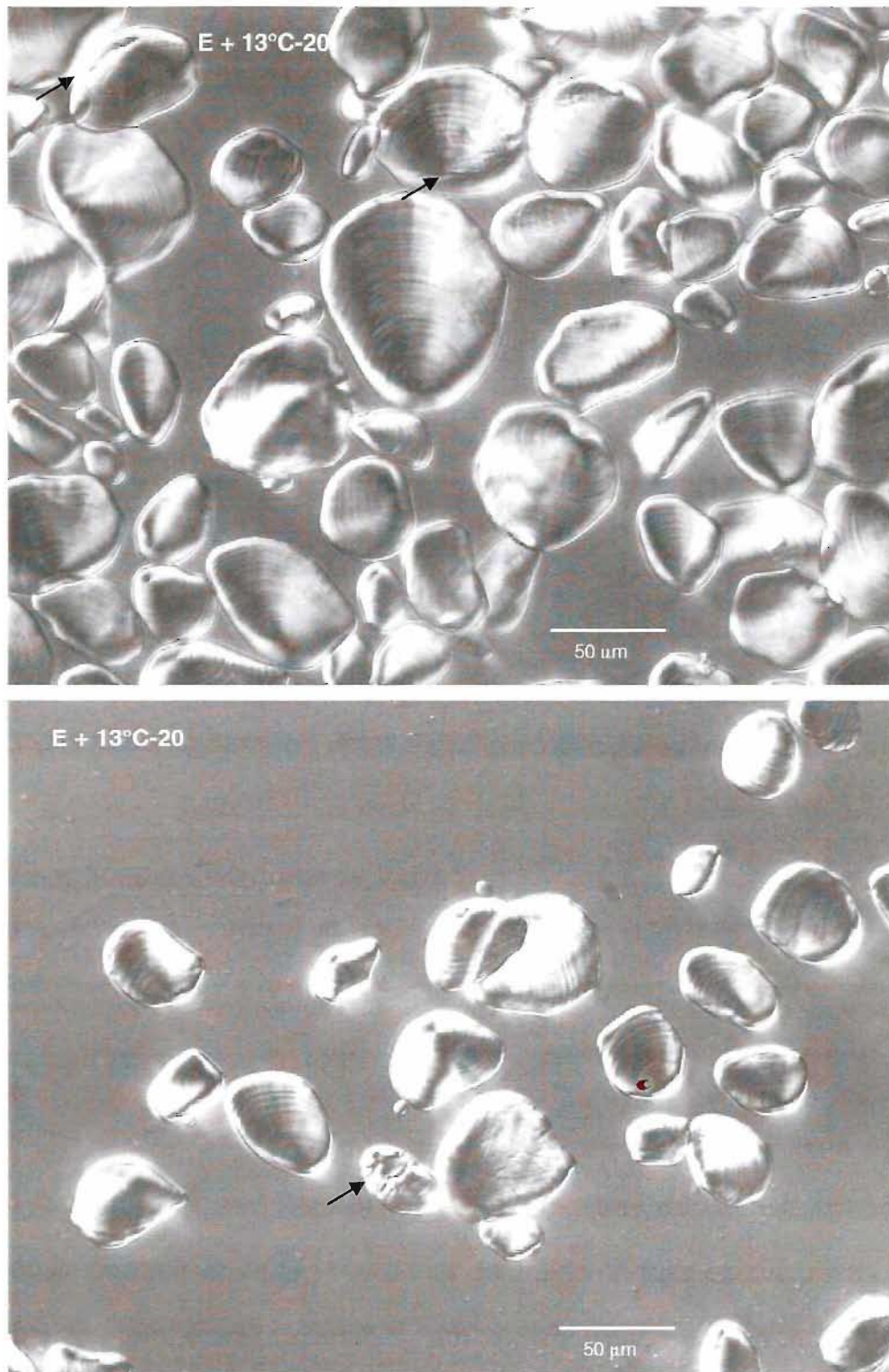


Figura 28: Microscopia óptica com contraste diferencial de interferência de grânulos de amido isolados de banana. Amostras: Etileno + 13°C 10 e 20 dpc. As setas apontam para as rachaduras na superfície de alguns grânulos.

As fotomicrografias dos amidos isolados de frutos tratados com etileno e submetidos ao frio aos 10 dpc (Figura 28) mostram a predominância de grânulos grandes e arredondados, com algumas “rachaduras” superficiais. No amido em estado mais degradado aos 20 dpc, este evento tornou-se mais evidente. Resumindo, cada grupo apresentou um perfil de degradação do amido diferenciado, sendo possível notar características marcantes para cada tratamento.

Cordenunsi (2004) encontrou nos grânulos com alto grau de degradação, submetidos à microscopia óptica sob luz polarizada, a característica Cruz-de-Malta, mostrando que os grânulos permanecem com regiões cristalinas preservadas até o final da degradação.

As eletromicrografias obtidas por Microscopia Eletrônica de Varredura que virão a seguir poderão dar mais detalhes do processo de degradação.

4.3.2.2 Microscopia Eletrônica de Varredura

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) permite realizar detalhada caracterização morfológica do grânulo bem como visualizar o perfil de degradação da superfície do grânulo de amido. Dos amidos isolados de banana obtidas do Segundo Experimento (ver item 3.1.3), duas amostras de cada tratamento foram selecionadas: banana verde em que o teor de amido no fruto estava em torno de 20-21% e banana em amadurecimento, em que o amido estava num estágio de degradação mais avançado (9-11%).

No grupo controle (Figura 29) (zero dpc), a superfície do grânulo estava aparentemente “lisa”, com alguns “riscos” seguidos de círculos, como se fossem camadas de amido em formação. Por outro lado, no amido de banana em

degradação (20 dpc) alguns detalhes em relevo puderam ser observados como a exposição dos anéis de crescimento pelo processo de degradação, formando camadas concêntricas pela superfície do grânulo.

Os amidos de banana a 13°C apresentaram grânulos com formatos variados com predominância de grânulos arredondados (Figura 30). Um padrão de corrosão diferenciado pôde ser observado, em que círculos ou depressões circulares espalhadas pelo grânulo tomaram lugar aos anéis de crescimento expostos pela corrosão, como foi observado na amostra controle. Em amostras isoladas de bananas com 10 dpc, essas depressões eram semelhantes a pequenos “furos”, alguns aparentemente mais profundos e outros mais rasos e largos (indicados por setas). Este perfil de corrosão foi também visualizado em Microscopia Óptica (Figuras 26 e 27). No entanto, no amido mais degradado (21 dpc), esses círculos foram se expandindo por todo o grânulo, como se estivesse sofrendo um processo de descamação superficial.

Na Figura 31, os amidos do grupo etileno + 13°C (10 dpc) mostraram grânulos com superfície mais “lisa” que as apresentadas pelas amostras controle, e as depressões observadas a 13°C surgiram novamente, porém em menor quantidade e aparentemente menos profundas. Num estágio mais avançado da degradação, os anéis concêntricos tornaram-se evidentes, formando camadas mais profundas de um lado do grânulo, mantendo o outro lado íntegro.

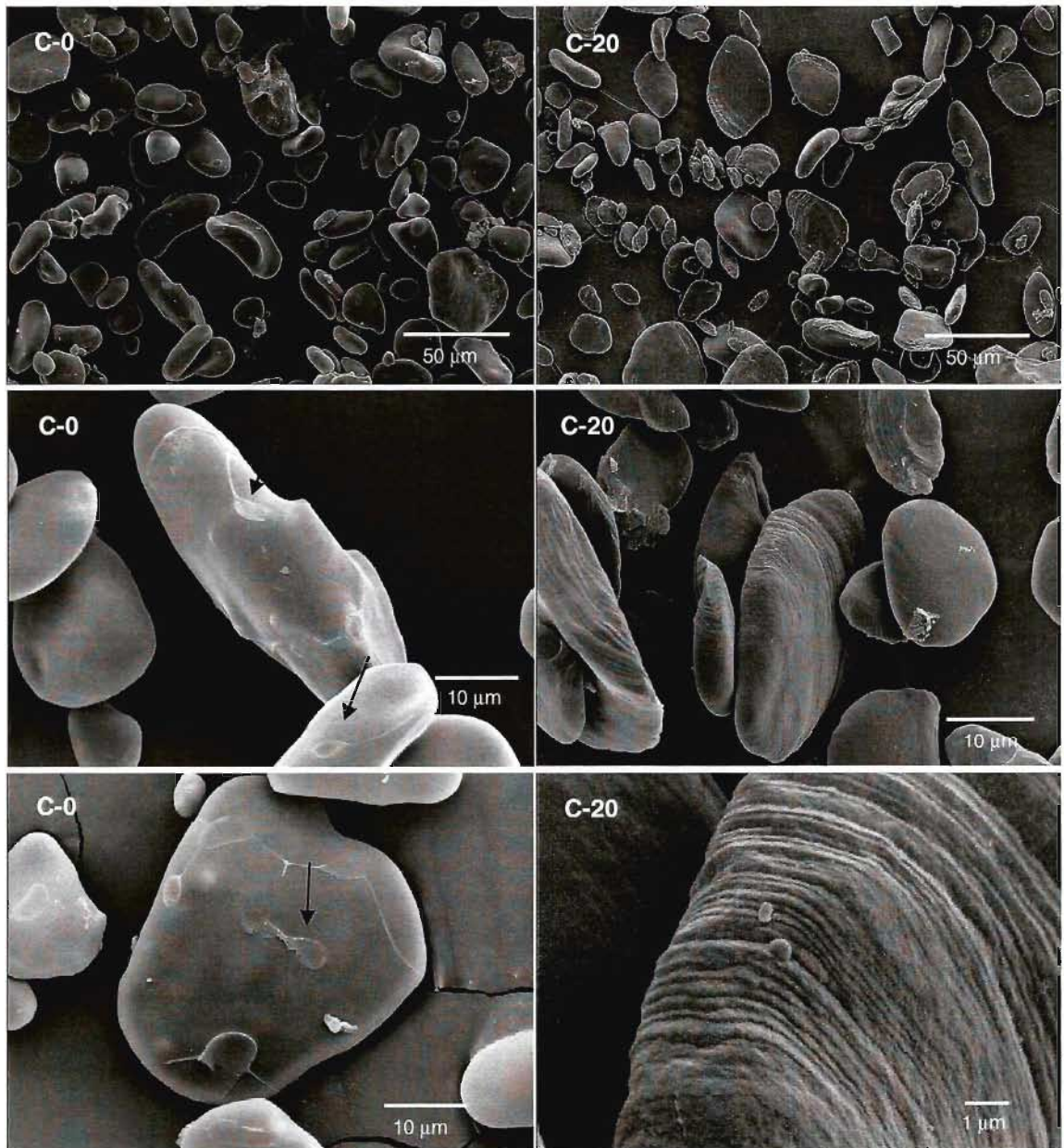


Figura 29: Microscopia Eletrônica de Varredura de grânulos de amido isolados de banana. Amostras: controle zero (19,54% amido) e 20 dpc (13,98% amido). As setas apontam para as camadas de amido em formação na amostra zero dpc.

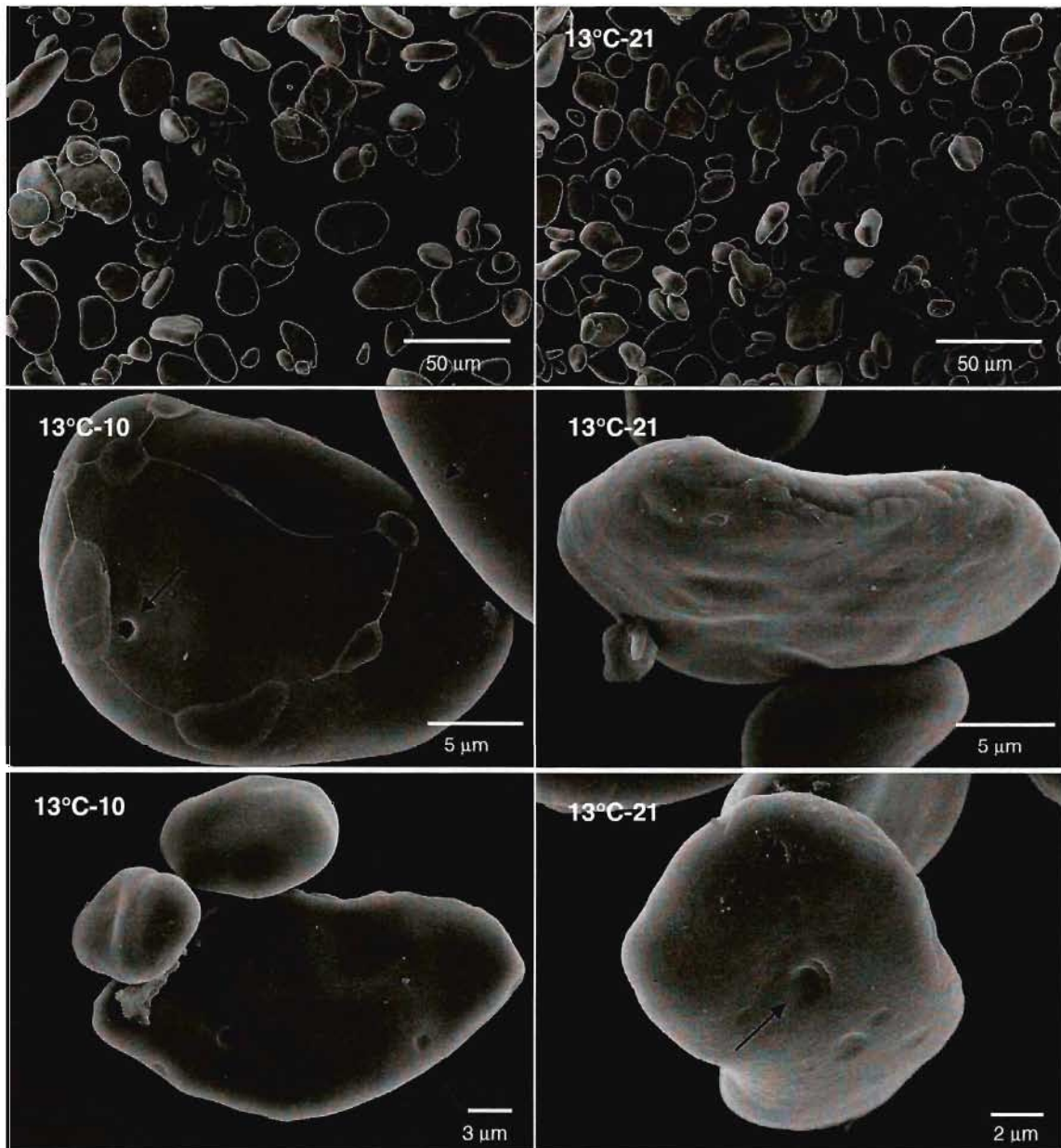


Figura 30: Microscopia Eletrônica de Varredura de grânulos de amido isolados de banana. Amostras: 13°C 10 (20,73% amido) e 21 dpc (9,70% amido). As setas indicam as depressões circulares na superfície dos grânulos de amido.

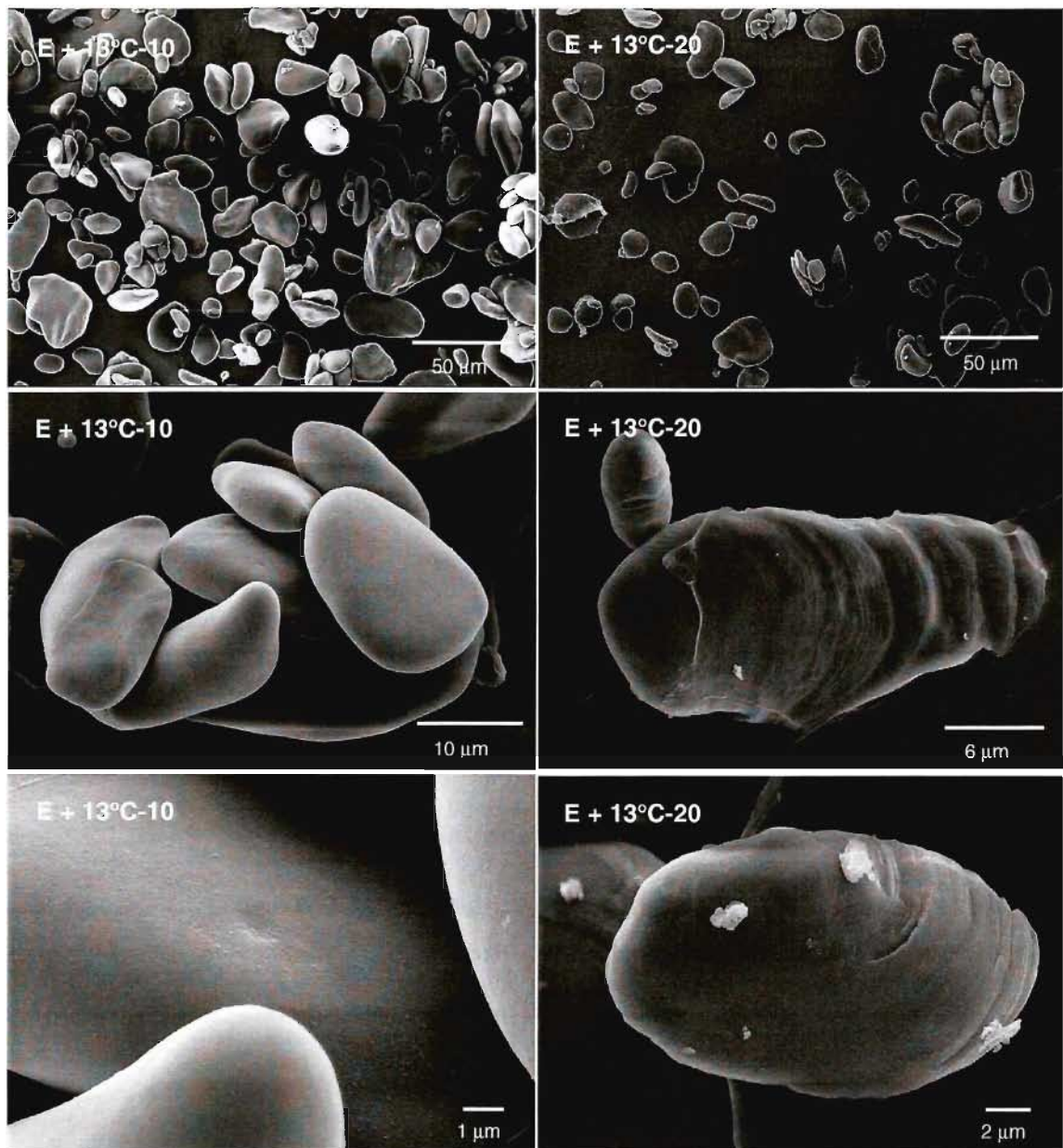


Figura 31: Microscopia Eletrônica de Varredura de grânulos de amido isolados de banana. Amostras: Etileno + 13°C 10 (21,38% amido) e 20 dpc (10,73% amido).

Reunindo as informações obtidas por microscopia eletrônica de varredura e por microscopia óptica, algumas observações puderam ser feitas, como descritas a seguir:

Os grânulos de amido de banana verde são predominantemente grandes e arredondados, tornando-se mais alongados e finos com o amadurecimento. Estas observações são coerentes com os resultados obtidos por Cordenunsi (2004), em que a diminuição do grânulo ocorreu preferencialmente na largura, demonstrando que existe uma corrosão radial no grânulo durante a sua degradação, adquirindo uma forma cada vez mais alongada.

O perfil de degradação apresentado para os amidos variou de acordo com o tratamento sofrido pelos frutos e durante o seu amadurecimento. Os amidos do grupo controle sofreram corrosão radial tornando os anéis de crescimento mais expostos (Figura 29, amido aos 20 dpc). A 13°C, os amidos apresentaram um tipo de degradação em forma de depressões circulares, aparentemente profundas, na superfície do grânulo, que no estágio verde pareciam poros.

No último grupo (Etileno + 13°C), os dois padrões de degradação foram observados, com formação de depressões circulares se expandindo superficialmente ao mesmo tempo em que ocorre o início da exposição dos anéis de crescimento. A aplicação de etileno exógeno na banana pode ter antecipado o processo de degradação (observado pela exposição dos anéis concêntricos) ao mesmo tempo, a baixa temperatura a que os frutos foram submetidos pode ter favorecido a ação de outras enzimas no ataque inicial ao grânulo, formando as depressões circulares.

É provável que as depressões circulares apresentadas nos amidos isolados dos frutos dos grupos frio e etileno + frio, correspondam ao início da degradação através da camada mais externa.

De modo geral, a degradação parece ocorrer da superfície para o interior do grânulo. Aparentemente, os grânulos menores foram preferencialmente degradados, principalmente nas amostras controle e tratadas (etileno + frio), confirmando o que já foi observado através da análise de distribuição de tamanho de partículas. Uma hipótese pode ser sugerida: os grânulos maiores são mais resistentes à degradação enzimática, em função da sua estrutura superficial e por isso os grânulos menores, por estarem "imatuross" ou por terem estrutura diferenciada mais susceptível à degradação, são degradados primeiro.

A cristalinidade de uma região específica do grânulo, ou do grânulo inteiro pode ter um papel importante nessa susceptibilidade à ação das enzimas de degradação. Quando o amido isolado de bananas controle aos zero dpc foi fracionado em peneiras com 3 diferentes tamanhos, foi observado que o padrão de difração de Raios-X encontrado para os grânulos menores que 30 μm foi tipo A e B, sendo que nas outras frações (entre 30-140 μm e > 140 μm) o padrão encontrado foi tipo B (Tabela VII). A diferença de composição apresentada pelos grânulos menores pode explicar porque estes são preferencialmente degradados e apresentam um padrão de degradação diferente dos grânulos maiores, embora o grau de cristalinidade não tenha mudado.

Tabela VII: Padrão de difração de Raios-X e grau de cristalinidade obtidos de grânulos de amido fracionados em peneiras de diferentes tamanhos. Amostras: amido isolado de banana controle (zero dpc)

Amostra	ICDD	Padrão de Raios-X	Grau de Cristalinidade (%)
> 140 μm	amido de batata	B	15,0
30-140 μm	amido de batata	B	15,0
< 30 μm	amido de batata e milho	A e B	15,0

Kayisu, Hood e Vansoest (1981) observaram através de SEM, que os grânulos de amido de banana apresentavam tamanhos e formas diferenciadas, como grânulos alongados e esféricos, com uma superfície lisa, quando o fruto ainda estava verde, e com o aparecimento de estrias paralelas por todo o grânulo, quando os frutos apresentavam-se maduros, com algumas regiões mais resistentes a degradação.

4.3.2.3 Microscopia de Imunofluorescência

A técnica de imunolocalização permite a localização específica de proteínas marcadas na superfície de tecidos ou grânulos de amido por meio de fluorescência, fornecendo informações que levam a um melhor entendimento do empacotamento molecular do grânulo e sua arquitetura, além de auxiliar no entendimento de quais enzimas estão atuando no grânulo de amido intacto.

Neste estudo, os amidos foram analisados após incubação com anticorpos específicos produzidos contra α e β -amilases de banana, e em seguida incubados com anticorpo secundário fluorescente (Figuras 32 a 35). As amostras foram escolhidas com base no perfil de degradação do amido observado na Figura 20A e

nos resultados observados por *Western blot* (Figuras 22A e 22B), momento em que as enzimas estão em plena atuação, aptas a iniciarem a degradação do grânulo.

Utilizando o anticorpo contra α -amilase, foi observado na amostra Controle (zero dpc) que os grânulos menores foram mais fortemente marcados do que os grânulos maiores, cuja marcação ocorreu discretamente somente nas extremidades dos grânulos. Aos 15 dpc, amostra anterior ao início da degradação, nota-se que a reação foi mais intensa, podendo-se observar pontos brilhantes em regiões específicas da superfície do grânulo, sugerindo que a enzima pode estar em plena atividade nesta amostra (Figura 32).

As depressões circulares observadas por MEV para as amostras do grupo frio ($13^{\circ}\text{C}-10$) foram novamente visualizadas na Figura 33 nas imagens feitas por Microscopia Óptica. No entanto, quando a respectiva imagem foi submetida à fluorescência, foi observado que ao redor de cada depressão a marcação foi mais intensa. Na amostra etileno + 13°C 20 dpc, amostra em que o amido está em pleno processo de degradação, a quantidade de α -amilase detectada foi pequena, mas o suficiente para observar os pontos marcados principalmente nos grânulos menores e nas regiões do grânulo em que os anéis de crescimento estavam expostos pela corrosão.

Quando o anticorpo contra β -amilase foi usado, a reação foi nitidamente mais intensa nas amostras Controle (zero e 15 dpc), quando comparado com a α -amilase. Aos zero dpc, somente os grânulos menores foram completamente marcados, diferente do observado aos 15 dpc, em que todos os grânulos tiveram forte marcação (Figura 34).

Na amostra $13^{\circ}\text{C}-10$, os resultados foram semelhantes aos encontrados com o outro anticorpo, em que os grânulos pequenos destacaram-se dos demais. No

entanto, as depressões circulares visualizadas anteriormente pela fluorescência não foram observadas quando o anticorpo da β -amilase foi usado. Estas foram visualizadas somente nas imagens de Microscopia Óptica (Figura 35).

Novamente, na amostra etileno + 13°C (20 dpc), os grânulos menores foram nitidamente marcados, principalmente nas regiões onde os anéis de crescimento já estavam expostos pelo processo de degradação (Figura 35).

Estes resultados indicam que tanto a α -amilase quanto a β -amilase já estavam ligadas à superfície dos grânulos de amido de bananas recém-colhidas (aos zero dpc), nas diferentes fases do amadurecimento e nos diferentes grupos (controle e tratados), dando suporte aos resultados encontrados anteriormente para atividade *in vitro* e *Western blot* de proteínas isoladas da superfície do grânulo.

Além disso, algumas observações específicas puderam ser feitas:

O anticorpo contra a α -amilase estava preferencialmente e mais fortemente ligada aos grânulos menores em todas as amostras.

A β -amilase tem a capacidade de se ligar e degradar tanto grânulos pequenos como grânulos grandes. E a ação desta enzima foi mais pronunciada em amidos que se encontram em plena fase de degradação, como nas amostras dos grupos controle (15 dpc) e etileno + frio aos 20 dpc.

A comparação dos resultados obtidos entre os dois tratamentos indica que os grânulos de amido a 13°C foram mais fortemente marcados para as duas enzimas, do que os amidos isolados do grupo etileno + frio.

Os resultados suscitam ainda dúvidas do tipo: será que pelo fato destas duas enzimas estarem ligadas aos grânulos pequenos, estes são preferencialmente degradados? Ou será que pelo fato dos grânulos menores apresentarem um padrão de cristalinidade diferente dos maiores, a ação das enzimas é facilitada?

A confiabilidade dos resultados se dá pela alta especificidade do anticorpo, como verificado pelos *Western blots* realizados (Figuras 18A e 18B, Figuras 22A e 22B). Além disso, a ausência de artefatos durante a preparação e marcação da amostra e a ausência de ligações inespecíficas foram verificadas, já que para cada amostra observada aqui, foi feita uma lâmina controle (sem adição de anticorpo primário), sendo assim confirmada a ausência de fluorescência (dados não mostrados).

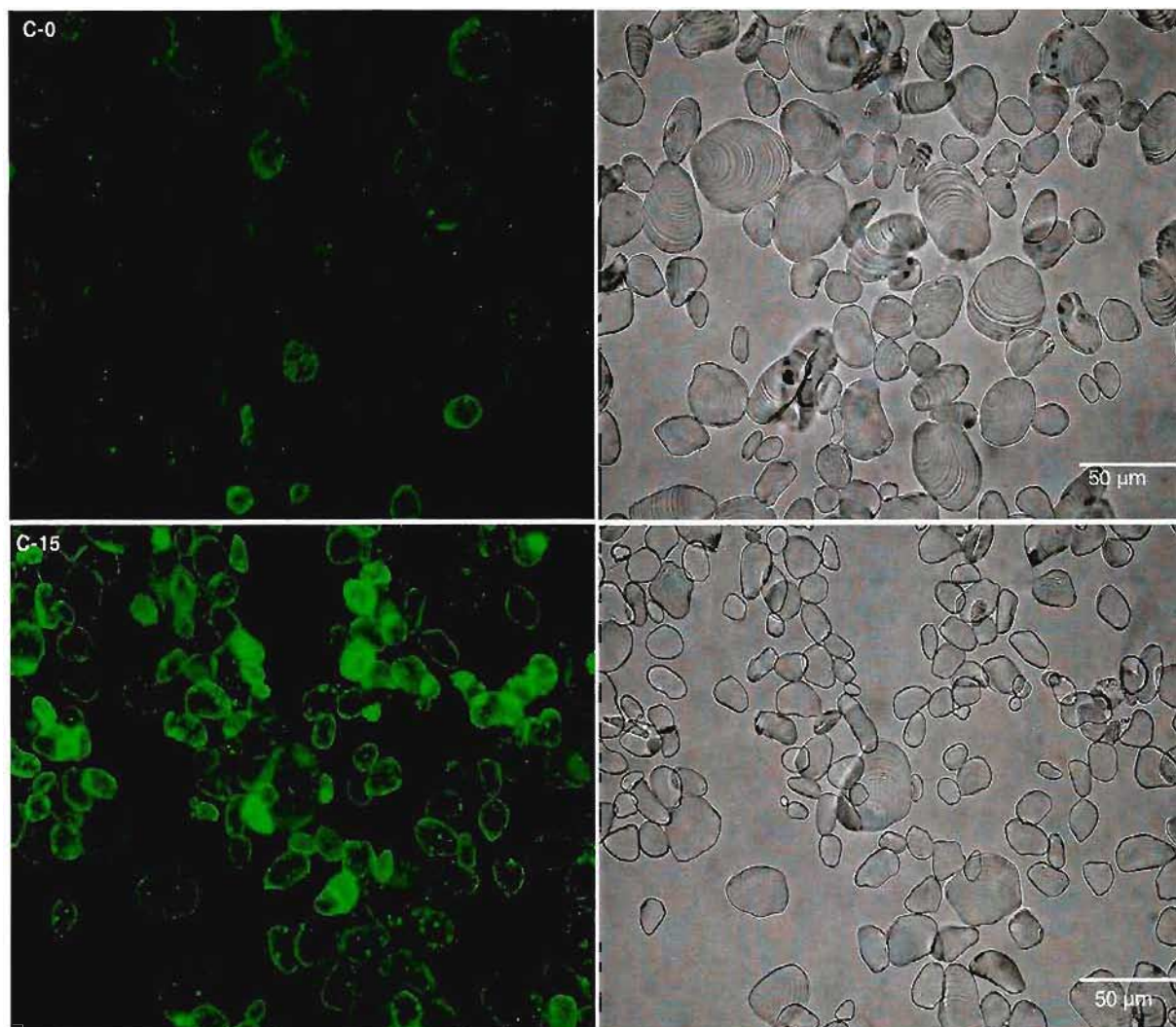


Figura 32: Microscopia de Fluorescência (à esquerda) e Microscopia Óptica (à direita) realizadas em amidos isolados de bananas Controle zero e 15 dpc. Foi usado anticorpo específico produzido contra α -amilase de banana.

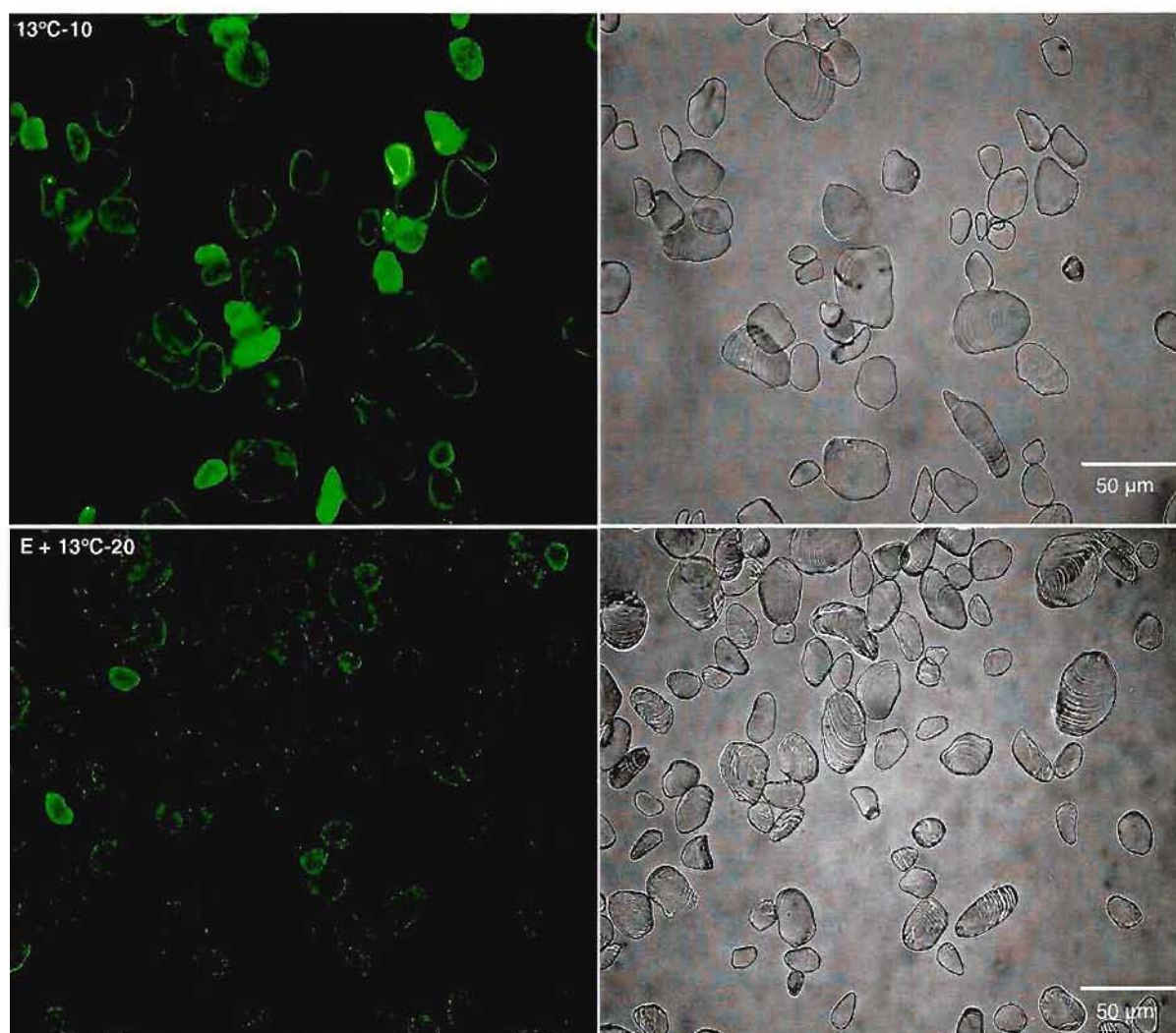


Figura 33: Microscopia de Fluorescência (à esquerda) e Microscopia Óptica (à direita) realizadas em amidos isolados de bananas tratadas a 13°C 10 dpc e Etileno + 13°C 20 dpc. Foi usado anticorpo específico produzido contra α -amilase de banana.

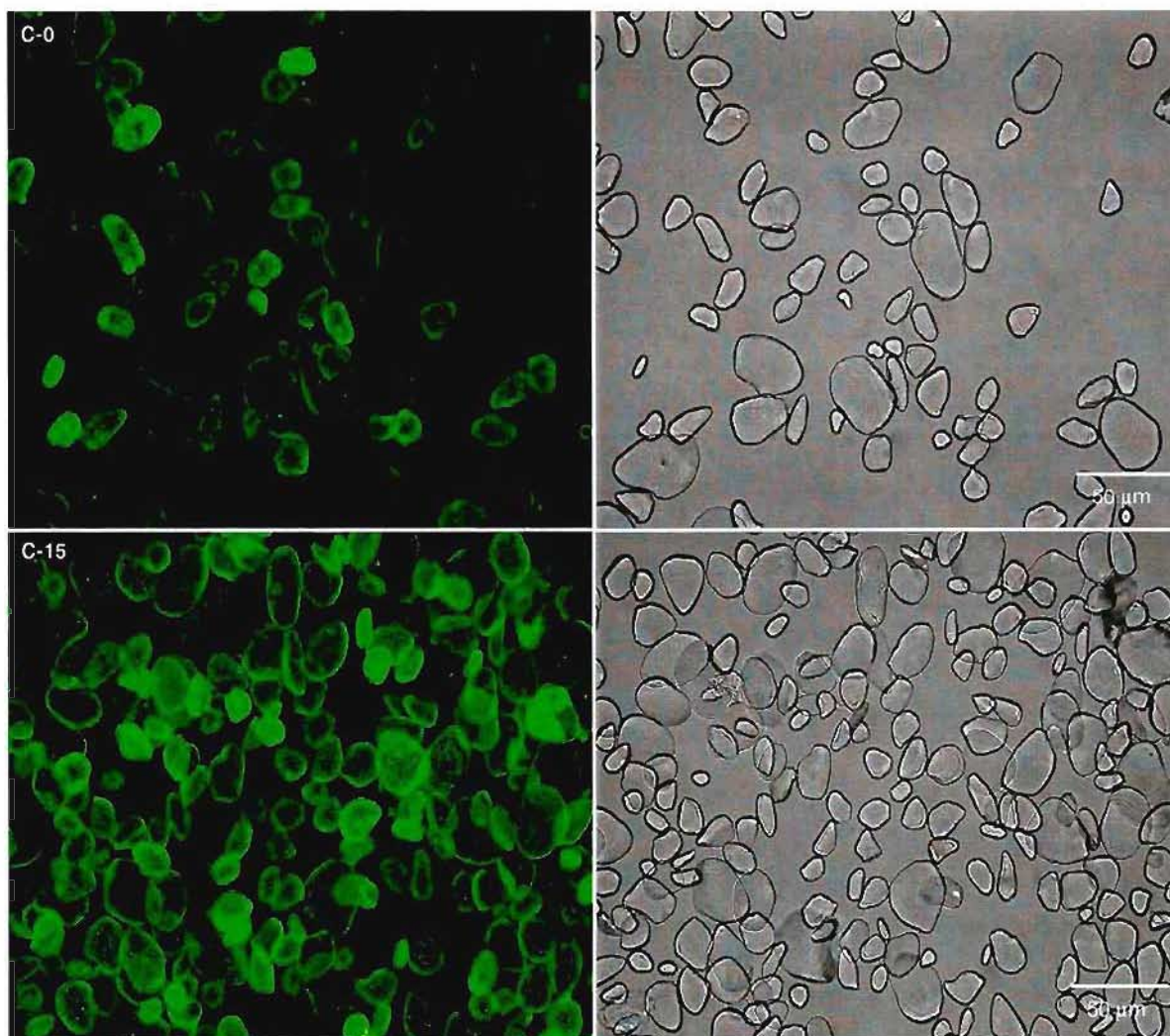


Figura 34: Microscopia de Fluorescência (à esquerda) e Microscopia Óptica (à direita) realizadas em amidos isolados de bananas Controle zero e 15 dpc. Foi usado anticorpo específico produzido contra β -amilase de banana.

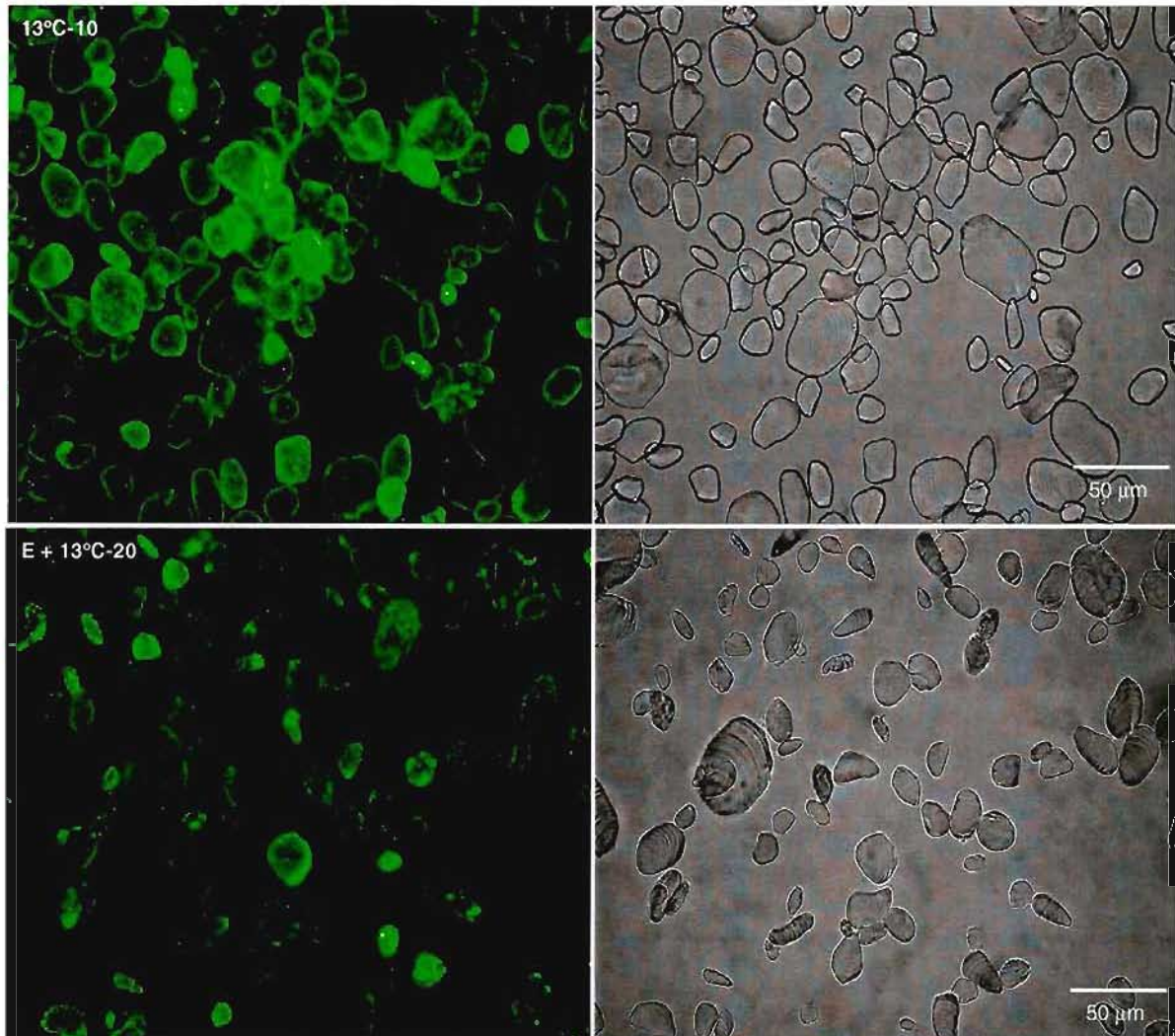


Figura 35: Microscopia de Fluorescência (à esquerda) e Microscopia Óptica (à direita) realizadas em amidos isolados de bananas tratadas a 13°C 10 dpc e Etileno + 13°C 20 dpc. Foi usado anticorpo específico produzido contra contra β -amilase de banana.

Apesar dos cuidados tomados durante o processo de isolamento dos grânulos, os resultados obtidos poderiam ser questionáveis pela possibilidade de proteínas solúveis se ligarem artificialmente à superfície do grânulo. Para confirmar os resultados apresentados de imunolocalização de proteínas nos grânulos e garantir que não houve associação espúria de proteínas, cortes da polpa da banana foram submetidos à imunohistoquímica, utilizando os anticorpos específicos produzidos contra α e β -amilases de banana e anticorpo secundário fluorescente, e em seguida examinados em um Microscópio Óptico Epifluorescente.

Os resultados mostram inúmeros grânulos de amido nas células de banana verde e em estágios mais avançados do amadurecimento (Figuras 36 e 37).

Utilizando o anticorpo contra α -amilase observa-se nas amostras controle zero e 15 dpc e na tratada etileno + 13°C 20 dpc, uma discreta marcação fluorescente ao redor de todos os grânulos. Em 13°C 10 e 20 dpc, marcações mais intensas foram visualizadas, coincidindo com os resultados de *Western blot* (Figura 36).

Quando foi aplicado o anticorpo contra β -amilase, foi observado nas amostras controle zero, 13°C 10 dpc e etileno + 13°C 20 dpc, que toda a área delimitada ao redor dos grânulos estava mais fortemente marcada do que nas amostras controle 15 dpc e 13°C 20 dpc (Figura 37).

Embora algumas amostras tenham apresentado fraca reação com o anticorpo, este resultado é considerado como uma marcação positiva já que no controle nada foi observado (dados não mostrados).

Inicialmente quando os cortes dos tecidos foram feitos, as lâminas foram montadas em quintuplicata de amostra, de anticorpo, e suas respectivas lâminas controle, para garantir que, caso algum corte não fosse aproveitável, haveria outras

lâminas prontas. Com isso, alguns cortes ficaram disponíveis para serem analisados por Microscópio Confocal (aumento de 40x), e confirmar os resultados anteriormente obtidos.

As imagens obtidas foram mais nítidas, sendo possível uma melhor visualização na marcação dos grânulos, principalmente nas amostras Controle 15 dpc, quando os 2 anticorpos foram usados. No entanto, na amostra do grupo etileno + 13°C aos 20 dpc, o corte observado levantou algumas dúvidas quanto o local exato da marcação quando visto por Microscópio Confocal.

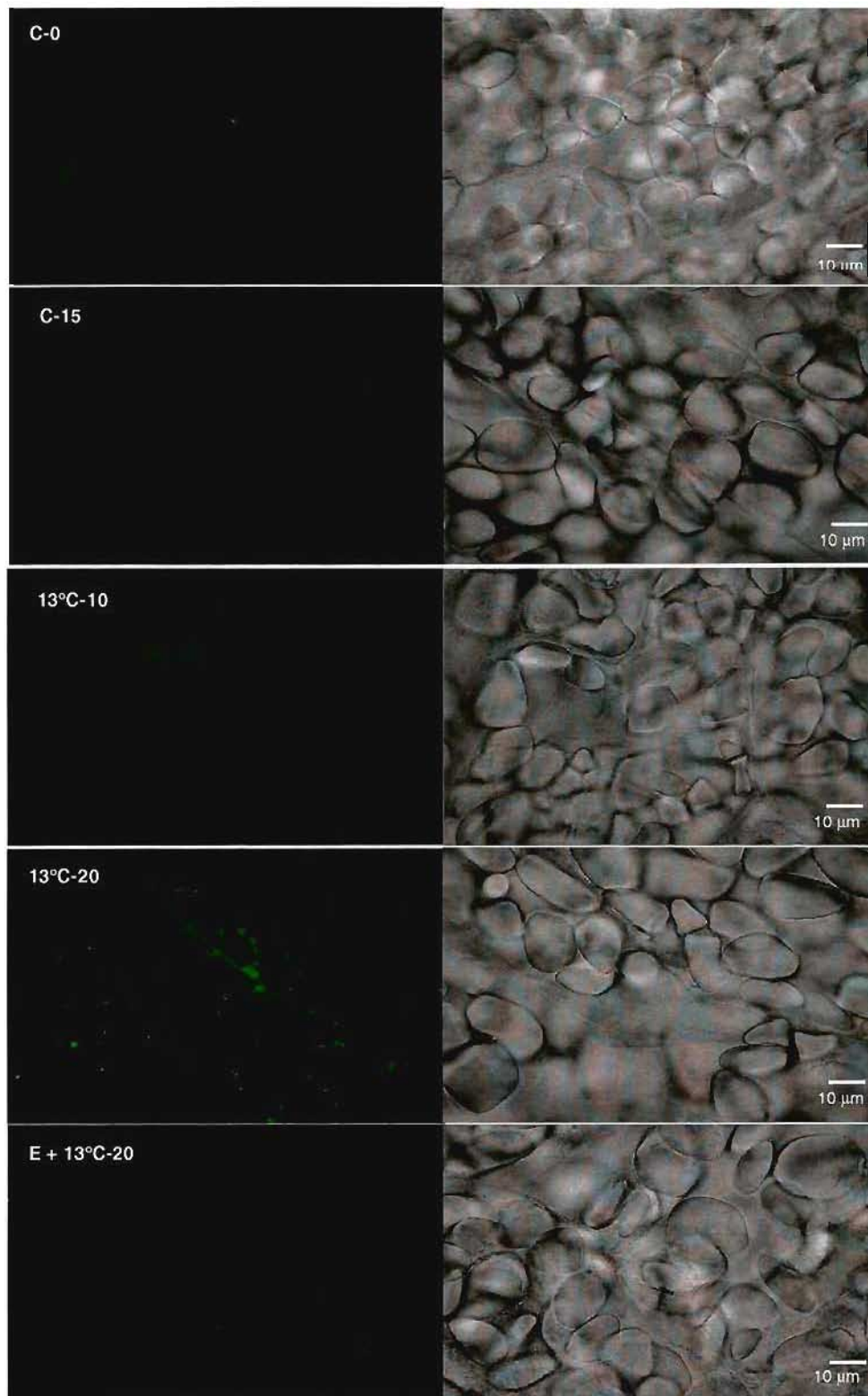


Figura 36: Microscopia de Fluorescência (à esquerda) e Microscopia Óptica (à direita) realizadas em cortes de bananas controle zero e 15 dpc, tratadas a 13°C 10 e 20 dpc e etileno + 13°C 20 dpc. Foi usado anticorpo específico produzido contra α -amilase de banana.

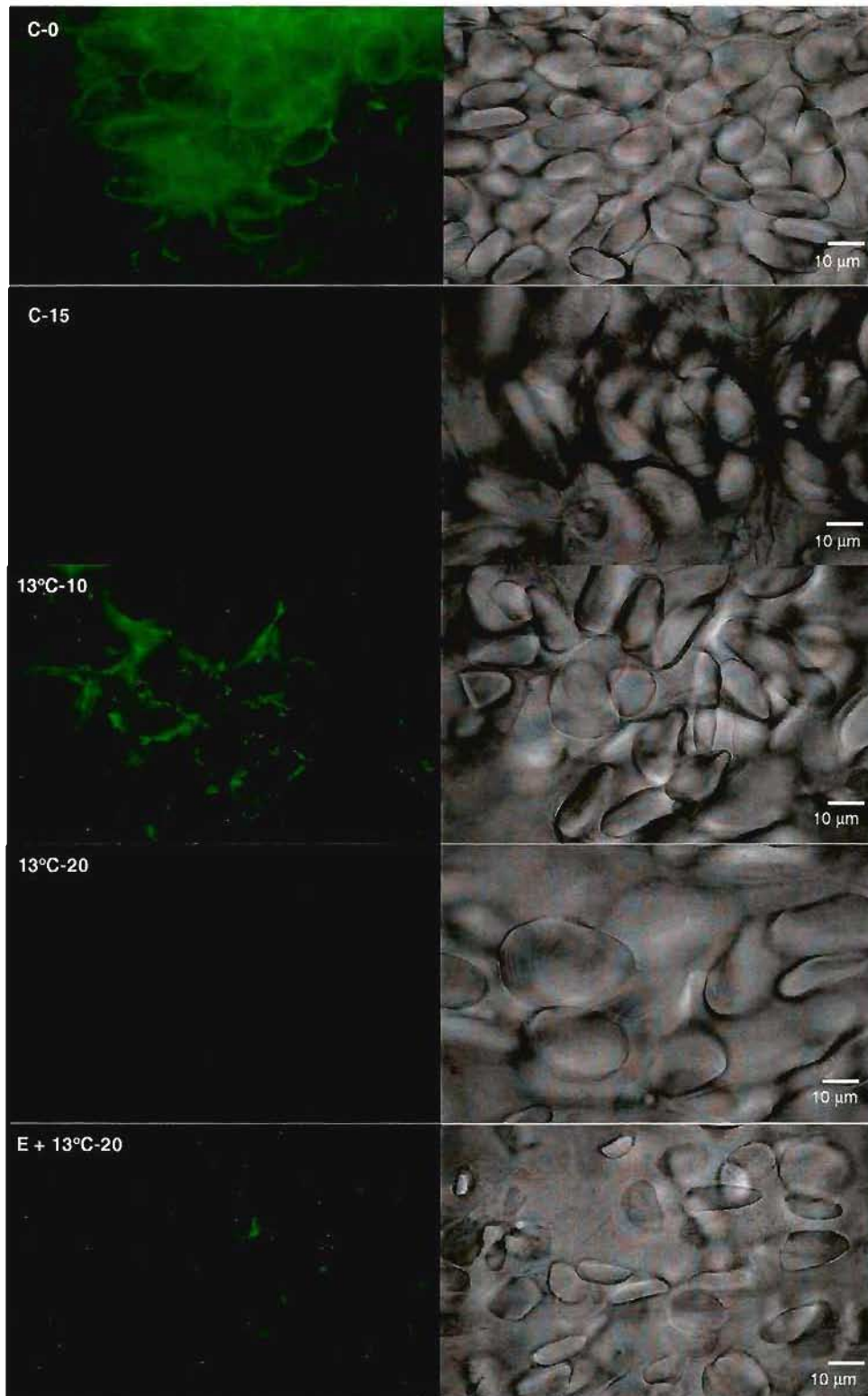


Figura 37: Microscopia de Fluorescência (à esquerda) e Microscopia Óptica (à direita) realizadas em cortes de bananas controle zero e 15 dpc, tratadas a 13°C 10 e 20 dpc e etileno + 13°C 20 dpc. Foi usado anticorpo específico produzido contra β -amilase de banana.

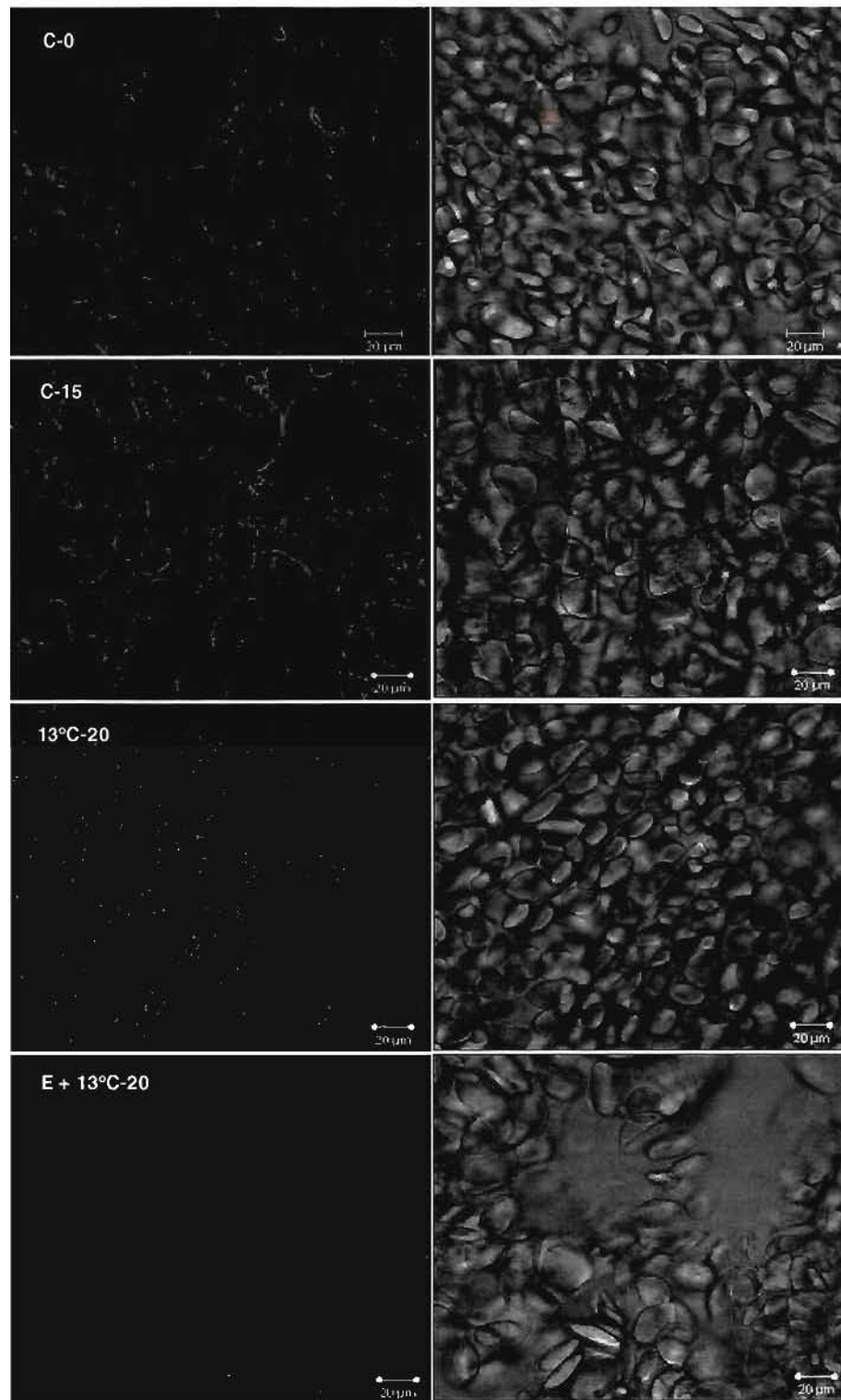


Figura 38: Microscopia Confocal de Varredura a Laser (CLMS) realizada em cortes de bananas controle zero e 15 dpc, tratadas a 13°C 20 dpc e etileno + 13°C 20 dpc. Foi usado anticorpo específico produzido contra α -amilase de banana.

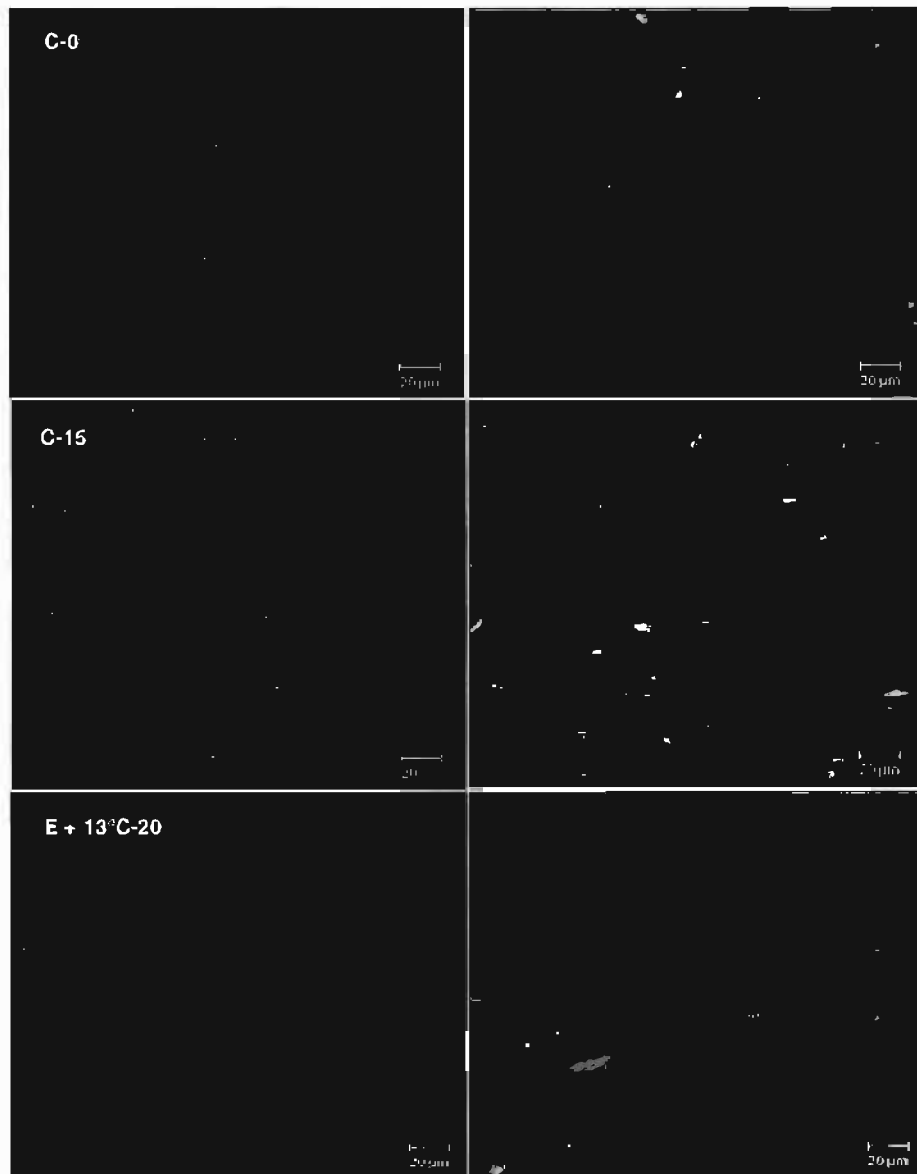


Figura 39: Microscopia Confocal de Varredura a Laser (CLMS) realizada em cortes de bananas controle zero e 15 dpc, tratadas com etileno + 13°C 20 dpc. Foi usado anticorpo específico produzido contra β -amilase de banana.

As duas técnicas, tanto a Microscopia Óptica quanto a Microscopia Confocal podem ser utilizadas em conjunto com imunohistoquímica, com a diferença de que a segunda oferece maior resolução para determinar a distribuição do antígeno dentro das células. Novamente, a confiabilidade dos resultados obtidos, se dá pela alta especificidade do anticorpo como verificado por *Western blot* realizado em extrato bruto de banana (Figuras 22A e 22B).

O conjunto de resultados que inclui atividade hidrolítica total através dos géis de eletroforese, atividade *in vitro* de α e β -amilases, *Western blot* utilizando anticorpos produzidos contra estas enzimas e imunolocalização das proteínas ligadas à superfície dos grânulos, forneceu fortes evidências de que estas enzimas estão ligadas à superfície do grânulo. Quando a técnica de imunohistoquímica foi utilizada em conjunto, estes resultados foram confirmados, já que foi possível visualizar estas enzimas ligadas ao amido, mesmo dentro da célula em cortes de bananas controle e tratadas.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em resumo, os resultados obtidos nos diferentes experimentos, foram os relatados a seguir:

(1) O perfil inicial de enzimas hidrolíticas, mostrou haver várias bandas com atividade hidrolítica tanto nos géis em que foram utilizados extratos brutos de banana como naqueles contendo a proteína ligada à superfície do grânulo de amido. Com a aplicação do etileno exógeno nos frutos, a intensidade e o número das bandas com atividade hidrolítica foram maiores quando comparadas à amostra controle, que continha o mesmo teor de amido. Ao contrário, nos amidos isolados de frutos tratados com 1-MCP, a intensidade e o número de bandas com atividade, foram menores.

(2) Foram detectadas atividades *in vitro* bastante altas de α e β -amilases em extratos protéicos obtidos da superfície de grânulos de amido. Os resultados obtidos mostraram que quantidades elevadas das enzimas já estavam aderidas à superfície dos grânulos de bananas recém colhidas, momento em que os teores de amido eram ainda elevados. No entanto, as atividades máximas foram obtidas concomitantemente com o início da degradação do amido, ocorrendo uma queda na atividade das enzimas imediatamente após a obtenção dos picos nas amostras controle. Estes resultados indicam que o amido pode ser o substrato para as enzimas em questão, já que houve uma relação direta entre o aumento das atividades amilolíticas e a degradação do amido. Os resultados sugerem fortemente que a β -amilase pode se ligar à superfície do grânulo e não só permanecer solúvel no estroma atuando nos produtos de degradação da α -amilase.

(3) Quando proteínas extraídas de amidos isolados de banana controle e tratadas com etileno foram aplicadas em *Western blot*, obteve-se indícios de que, provavelmente, a α -amilase atua como uma iniciadora do ataque ao grânulo, já que apresentou uma fraca banda em um estágio mais avançado do amadurecimento. A β -amilase, contribuiria para a etapa seguinte de hidrólise ao polissacarídeo, uma vez que bandas protéicas foram encontradas principalmente em amidos mais degradados.

(4) A localização das proteínas relativas à α e β -amilases ligadas à superfície do grânulo de amido, foi confirmada por sua imunolocalização tanto na banana *in natura* quanto em grânulos de amido isolados. No entanto, diferenças entre os grupos controle e tratados foram observadas. A α -amilase parece estar preferencialmente ligada aos grânulos menores, enquanto a β -amilase foi encontrada ligada a grânulos pequenos e grandes. Entre os dois tratamentos, a marcação pela fluorescência, tanto utilizando o anticorpo de α como de β -amilases, foi mais intensa nos amidos isolados dos frutos tratados a 13°C, do que nos amidos do grupo frio + etileno.

(5) A presença das amido-fosforilases ligada ao grânulo de amido foi descartada. Assim, provavelmente a isoforma plastidial deve atuar no estroma sobre os produtos de degradação das enzimas hidrolíticas.

(6) Os resultados obtidos por Microscopia Eletrônica de Varredura e Microscopia Óptica, indicam que o grânulo de amido sofre uma exo-corrosão, coerente com os altos valores de atividades de α e β -amilases aderidas à superfície do grânulo. O perfil de degradação dos amidos variou de acordo com os tratamentos a que os frutos foram submetidos. O amido da banana controle apresentou durante a degradação, a exposição dos anéis de crescimento formando camadas concêntricas pela superfície do grânulo. Em amido isolado do grupo frio, em vez dos anéis de

crescimento, foram observadas depressões circulares espalhadas pelo grânulo, como se estivesse sofrendo um processo de descamação superficial. Nos amidos do grupo frio + etileno, os dois padrões de degradação foram observados, com formação de depressões circulares se expandindo superficialmente ao mesmo tempo em que ocorre o início da exposição dos anéis de crescimento. Os diferentes padrões de degradação indicam haver vias enzimáticas diferenciadas atuando na degradação do amido, em resposta ao frio e ao etileno.

(7) A aparente degradação preferencial dos grânulos pequenos indica haver uma arquitetura destes grânulos diferente da dos grandes e mais susceptível à degradação. O fato do teor de amilose não ter mudado nos grânulos durante a degradação do amido, mostra haver uma arquitetura homogênea da superfície ao centro do grânulo. O padrão de Raios-X encontrado foi tipo B para amido de bananas recém-colhidas e tipos A e B foram encontrados em amidos em degradação. O grau de cristalinidade variou de 15% para 17% durante a degradação, indicando haver mudanças nas cadeias de amilopectina.

6 CONCLUSÕES

As α e β -amilases estão ligadas à superfície dos grânulos de amido da banana agindo diretamente em sua degradação. As amido-fosforilases não estão.

O grânulo de amido é constituído por 15% de amilose distribuída de forma homogênea por todo o grânulo. As cadeias de amilopectina parecem sofrer mudanças com a degradação do grânulo, resultando em um pequeno aumento na cristalinidade verificado por mudanças no padrão de Raios-X, de B para A e B.

A degradação do grânulo de amido ocorreu da superfície para o interior do grânulo, sem a presença de poros, mas o padrão de degradação mudou em resposta ao etileno e/ou ao frio, indicando haver mudanças das vias enzimáticas em resposta aos diferentes tratamentos.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, G.C.; VILAS-BOAS, E.V.B.; RODRIGUES, L.J.; PAULA, N.R.F. Atraso do amadurecimento de banana "maçã" pelo 1-MCP, aplicado previamente à refrigeração. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v.28, p.319-321, 2006.

ARÉAS, J.A.G.; LAJOLO, F.M. Starch transformation during banana ripening: I – the phosphorilase and phosphatase behavior in *Musa acuminata*. *Journal of Food Biochemistry*, v.5, p.19-37, 1981.

BAGNATO, N.; BARRETT, R.; SEDGLEY, M.; KLIEBER, A. The effects on the quality of Cavendish bananas, which have been treated with ethylene, of exposure to 1-methylcyclopropene. *International Journal of Food Science and Technology*, v.38, p.745-750, 2003.

BAKER, A.A.; MILES, M.J.; HELBERT, W. Internal structure of the starch granule revealed by AFM. *Carbohydrate Research*, v.330, p. 249-256, 2001.

BALDWIN, P.M. Starch granule-associated proteins and polypeptides: a review. *Starch/Starke*, v.53, p.475-503, 2001.

BASSINELLO, P.Z.; CORDENUNSI, B.R.; LAJOLO, F.M. Amylolytic activity in fruits: comparison of different substrates and methods using banana as model. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.50, p.5781-5786, 2002.

BECK, E.; ZIEGLER, P. Biosynthesis and degradations of starch in higher plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, v.40, p.95-117, 1989.

BELLO-PÉREZ, L.A.; AGAMA-ACEVEDO, E.; SÁYAGO-AYERDI, S.G.; MORENO-DAMIAN, E.; FIGUEROA, J.D.C. Some structural, physicochemical and functional studies of banana starches isolated from two varieties growing in Guerrero, México. *Starch/stärke*, v.52, p.68-73, 2000.

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

BERTOFT, E. Investigation of the fine structure of amylopectin using alpha-amylase and beta-amylase. *Carbohydrate Research*, v.189, p.195-207, 1989.

BIALE, J.B. The Postharvest Biochemistry of Tropical and Subtropical Fruits. *Advances in Food Research*, v.10, p.293-354, 1960.

BIERHALS, J.D.; LAJOLO, F.M. CORDENUNSI, B.R.; NASCIMENTO, J.R.O. Activity, cloning and expression of an isoamylase-type starch-debranching enzyme from banana fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.52, p.7412-7418, 2004).

BILIADERIS, C.G. The structure and interactions of starch with food constituents. *Canadian Journal Physiology Pharmacology*, v.69, p.60-78, 1991.

BLENNOW, A.; ENGELSEN, S.B.; MUNCK, L.; MÜLLER B.L. Starch molecular structure and phosphorylation investigated by a combined chromatographic and chemometric approach. *Carbohydrate Polymers*, v.41, p.163-174, 2000a.

BLENNOW, A.; SMIDT, A.M.B.S.; OLSEN, C.E.; MÜLLER, B.L. The distribution of covalently bound phosphate in the starch granule in relation to starch crystallinity. *International Journal of Biological Macromolecules*, v.27, p.211-218, 2000b.

BOGRACHEVA, T.Ya.; MORRIS, V.J.; RING, S.G.; HEDLEY, C.L. The granular structure of C-type pea starch and its role in gelatinization. *Biopolymers*, v.45, p.323-332, 1998.

BORÉN, M.; LARSSON, H.; FALK, A.; JANSSON, C. The barley starch granule proteome-internalized granule polypeptides of the mature endosperm. *Plant Science*, v.166, p.617-626, 2004.

BRADFORD, M. M. Rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, v. 72, p. 248-254, 1976.

BULEON, A.; COLONNA, P.; PLANCHOT, V.; BALL, S. Starch granules: structure and biosynthesis. *International Journal of Biological Macromolecules*, v.23, p.85-112, 1998.

CORDENUNSI, B.R. *Aspectos químicos, bioquímicos e ultraestruturais do grânulo de amido durante o amadurecimento da banana*. São Paulo, 2004. 130p. (Tese de Livre-Docência – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP).

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

CUI, R.; OATES, C.G. The effect of amylose-lipid complex formation on enzyme susceptibility of sago starch. *Food Chemistry*, v.65, p.417-425, 1999.

DOMINGUES- PUIGJANER, E.; VENDRELL, M.; LUDEVID, M.D. Differential protein accumulation in banana fruit during ripening. *Plant Physiology*, v.98, p.157-162, 1992.

FRENCH, D. Chemical and physical properties of starch. *Journal of Animal Science*, v.37, n.4, p.1048-1061, 1973.

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

GALLANT, D.J.; BOUCHET, B.; BULÉON, A.; PÉREZ, S. Physical characteristics of starch granules and susceptibility to enzymatic degradation. *European Journal of Clinical Nutrition*, v.46, p-53-516, 1992.

GALLANT, D.J.; BEWA, H.; BUY, Q.H.; BOUCHET, B.; SZYLIT, O.; SEALY, L. On ultrastructural and nutritional aspects of some tropical tuber starches. *Starch/Stärke*, v.34, p.255-262, 1982.

GARCIA, E; LAJOLO, F.M. Starch transformation during banana ripening: the amylase and glucosidase behavior. *Journal of Food Science*, v.53, p.1181-1186, 1988.

GLARING, M.A.; KOCH, C.B.; BLENNOW, A. Genotype-specific spatial distribution of starch molecules in the starch granule: A combined CLMS and SEM approach. *Biomacromolecules*, v.7, p.2310-2320; 2006.

GOLDING, J.B.; SHEARER, D.; WYLLIE, S.G.; McGLASSON, W.B. Application of 1-MCP and propylene to identify ethylene-dependent ripening processes in mature banana fruit. *Postharvest Biology and Technology*, v.14, p.87-98, 1998.

HAMES, B.D.; RICKWOOD, D. *Gel electrophoresis of proteins: a practical approach / edited by*. Oxford; New York: IRL Press at Oxford University Press, 1990.

HAN, X.Z.; HAMAKER, B.R. Location of starch granule-associated proteins revealed by Confocal Laser Scanning Microscopy. *Journal of Cereal Science*, v.35, p.109-116, 2002.

HAYAKAWA, K.; TANAKA, K.; NAKAMURA, T.; ENDO, S., HOSHINO, T. Quality characteristics of waxy hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.): properties of starch gelatinization and retrogradation. *Cereal Chemistry*, v.74, p.576–580, 1997.

HERMANSSON, A.M.; SVEGMARK, K. Development in the understanding of starch functionality. *Trends in Food Science e Technology*, v.7, p.345-353, 1996.

HIZUKURI, S. Polymodal distribution of the chain lengths of amylopectins and its significance. *Carbohydrate Research*, v.147, p.342-347, 1985.

HOOVER, R. Composition, molecular structure, and physicochemical properties of tuber and root starches: a review. *Carbohydrate Polymers*, v.45, p.253-267, 2001.

JANE, J-L; WONG, K-S; McPHERSON, A.E. Branch-structure difference in starches of A- and B-type X-ray patterns revealed by their Naegeli dextrans. *Carbohydrate Research*, v.300, p.219-227, 1997.

KAPLAN, F.; GUY,C.L. RNA interference of *Arabidopsis* beta-amylase8 prevents maltose accumulation upon cold shock and increases sensitivity of PSII photochemical efficiency to freezing stress. *The Plant Journal*, v.44, p.730-743, 2005.

KAPLAN, F.; SUNG, D.Y.; GUY,C.L. Roles of β -amylase and starch breakdown during temperatures stress. *Physiologia Plantarum*, v.126, p.120-128, 2006.

KAYISU, K.; HOOD, L.F.; VANSOEST, P.J. Characterization of starch and fiber of banana fruit. *Journal of Food Science*, v.46, p. 1885-1890, 1981.

KOSSMANN, J.; LLOYD, J. Understanding and influencing starch biochemistry. *Critical Reviews in Plant Science*, v.19, p.171-226, 2000.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during assembly of the bacteriophage T4. *Nature*, v.227, p.680-685, 1970.

LEHMANN, U.; JACOBASCH, G.; SCHMIEDL, D. Characterization of resistant starch type III from banana (*Musa acuminata*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 50, p. 5236-5240, 2002.

LEONEL, M.; CEREDA, M.P. Caracterização físico-química de algumas tuberosas amiláceas. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 22, p. 65-69, 2002.

LII, C.Y.; CHANG, S.M.; YOUNG, Y.L. Investigation of the physical and chemical properties of banana starches. *Journal of Food Science*, v.47, p.1493-1497, 1982.

LIM, S.; KASEMSUWAN, T.; JANE, J. Characterization of phosphorus in starch by ³¹P-nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Cereal Chemistry*, v.71, p.488-493, 1994.

LORBERT, R.; RITTE, G.; WILLMITZER, L.; KOSSMANN, J. Inhibition of a starch-granule-bound protein leads to modified starch and repression of cold sweetening. *Nature Biotechnology*, v.16, p.473-477, 1998.

MAINARDI, J.A.; PURGATTO, E.; VIEIRA-JÚNIOR, A.; BASTOS, W.A.; CORDENUNSI, B.R.; NASCIMENTO, J.R.O.; LAJOLO, F.M. Effects of ethylene and 1-methylcyclopropene (1-MCP) on gene expression and activity profile of α -1,4-glucan-phosphorylase during banana ripening. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.54, p.7294-7299, 2006.

MANNERS, D.J.; MATHERSON, N.K. The fine structure of amylopectin. *Carbohydrate Research*, v.90, p.99-110, 1981.

MANNERS, D.J. Recent developments in our understanding of amylopectin structure. *Carbohydrate Polymers*, v.11, p.87-112, 1989.

McPHERSON, A.E.; JANE, J. Comparison of waxy potato with other root and tuber starches. *Carbohydrate Polymers*, v.40, p.57-70, 1999.

MOTA, R. V.; LAJOLO, F. M.; CORDENUNSI, B. R. Composição em carboidratos de alguns cultivares de banana (*Musa* spp.) durante o amadurecimento. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 17, n.2, p. 94-97, 1997.

MOTA, R. V.; CORDENUNSI, B. R.; NASCIMENTO, J. R. O.; PURGATTO, E.; ROSSETO, M. R. M.; LAJOLO, F. M.; Activity and expression of banana starch

phosphorylases during fruit development and ripening. *Planta*, v. 216, p. 325-333, 2002.

MYERS, A.M.; MORELL, M.K.; JAMES, M.G.; BALL, S.G. Recent progress toward understanding biosynthesis of the amylopectin crystal. *Plant Physiology*, v.122, p.989-997, 2000.

NASCIMENTO, J.R.O.; CORDENUNSI, B.R.; LAJOLO, F.M. Partial purification and characterization of sucrose phosphate synthase from preclimacteric and climacteric bananas. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.45, p. 1103-1107, 1997.

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

PALMER, J.K. *The biochemistry of fruits and their products / edited by. A. C. Hulme;* Academic Press London and New York, 1971. p.65-105.

PARKER, R.; RING, S.G. Aspects of the physical chemistry of starch. *Journal of Cereal Science*, v.34, p.1-17, 2001.

PENG, M.; GAO, M.; BAGA, M.; HUCI, P.; CHIBBAR, R.N. Starch-branching enzymes preferentially associated with A-type starch granules in wheat endosperm. *Plant Physiology*, v.124, p.265-272, 2004.

PILLING, E.; SMITH, A.M. Growth ring formation in the starch granules of potato tubers. *Plant Physiology*, v. 132, p. 365-371, 2003.

PRASANNA, V.; PRABHA, T.N.; THARANATHAN, R.N. Fruit Ripening Phenomena – An Overview. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v.47, p.1-19, 2007.

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

PURGATTO, E.; NASCIMENTO, J.R.O.; LAJOLO, F.M.; CORDENUNSI, B.R. The onset of starch degradation during banana ripening is concomitant to changes in the content of free and conjugated forms of indole-3-acetic acid. *Journal of Plant Physiology*, v.159, p.1105-1111, 2002.

REIMANN, R.; ZIEGLER, P.; APPENROTH, K-J. The binding of α -amylase to starch plays a decisive role in the initiation of storage starch degradation in turions of *Spirodela polyrhiza*. *Physiologia Plantarum*, v.129, p.334-341, 2007.

REIMANN, R.; RITTE, G.; STEUP, M.; APPENROTH, K-J. Association of α -amylase and the R1 protein with starch granules precedes the initiation of net starch degradation in turions of *Spirodela polyrhiza*. *Physiologia Plantarum*, v.114, p.2-12, 2002.

RITTE, G.; LORBERTH, R.; STEUP, M. Reversible binding of the starch-related R1 protein to the surface of transitory starch granules. *The Plant Journal*, v. 21, p. 387-391, 2000a.

RITTE, G.; ECKERMANN, N.; HAEBEL, S.; LORBERTH, R.; STEUP, M. Compartmentation of the starch-related R1 protein in higher plants. *Starch/Stärke*, v.52, p.179-185, 2000b.

RITTE, G.; LLOYD, J.R.; ECKERMANN, N.; ROTTMANN, A.; KOSSMANN, J.; STEUP, M. The starch-related R1 protein is an α -glucan, water dikinase. *PNAS*, v.99, p.7166-7171, 2002.

ROBIN, J.P.; MERCIER, C.; CHARBONNIERE, R.; GUILBOT, A. Lintnerized starches gel filtration and enzymatic studies of insoluble residues from prolonged acid treatment of potato starch. *Cereal Chemistry*, v.51, p.389-405, 1974.

ROCHA, G.M.; BRANDÃO, B.A.; MORTARA, R.A.; ATTIAS, M.; SOUZA, W.; CARVALHO, T.M.U. *Journal of Structural Biology*, V.154, p.89-99, 2006.

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

SCHEIDIG, A.; FRÖHLICH, A.; SCHULZE, S.; LLOYD, J.R.; KOSSMANN, J. Downregulation of a chloroplast-targeted β -amylase leads to a starch-excess phenotype in leaves. *The Plant Journal*, v.30, p.581-591, 2002.

SEYMOUR, G.; TAYLOR, J.; TUCKER, G. *Biochemistry of Fruit Ripening*. London: Chapman & Hall, 1993, 454p.

SISLER, E.C.; SEREK, M. Inhibitors of ethylene responses in plants at the receptor level: Recent developments. *Physiologia Plantarum*, v.100, p.577-582, 1997.

SLATTERY, C.J.; KAVAKLI, I.H.; OKITA, T.W. Engineering starch for increased quantity and quality. *Trends in Plant Science*, v.5, p.291-297, 2000.

STEUP, M.; GERBLING, K.P. Multiple forms of amylase in leaf extracts: electrophoretic transfer of the enzyme forms into amylose-containing polyacrylamide gels. *Analytical Biochemistry*, v.134, p.96-100, 1983.

TANG, H.; MITSUNAGA, T.; KAWAMURA, Y. Molecular arrangement in blocklets and starch granule architecture. *Carbohydrate Polymers*, v.63, p.555-560, 2006.

THOMAS, D. J., ATWELL, W. A. *Starches: Practical Guides for the Food Industry*. Minnesota: Eagan Press, 1999. 94p.

VIEIRA-JÚNIOR, A.; NASCIMENTO, J.R.O.; LAJOLO, F.M. Molecular cloning and characterization of an α -amylase occurring in the pulp of ripening bananas and its expression in *Pichia pastoris*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.54, p.8222-8228, 2006.

VILAS-BOAS, E.V.B.; KADER, A.A. Effect of atmospheric modification, 1-MCP and chemicals on quality of fresh-cut banana. *Postharvest Biology and Technology*, v.39, p.155-162, 2006.

WANG, Y.J.; WHITE, P.; POLLAK, L.; JANE, J. Characterization of starch structures of 17 maize endosperm mutant genotypes with Oh43 inbred line background. *Cereal Chemistry*, v.70, p.171-179, 1993.

WATKINS, C.B. The use of 1-methylcyclopropene (1-MCP) on fruits and vegetables. *Biotechnology Advances*, v.24, p.389-409, 2006.

WHISTLER, R.L.; BeMILLER, J.N. Starch. In WHISTLER, R.L.; BeMILLER, J.N. *Carbohydrate Chemistry for Food Scientists*. AACC. St Paul: Eagan Press, 1997. p. 117-151.

WITT, W.; SAUTER, J.J. Purification and properties of a starch granule-degrading α -amylase from potato tubers. *Journal of Experimental Botany*, v.47, p.1789-1795, 1996.

YOO, S.; JANE, J. Molecular weights and gyration radii of amylopectins determined by high-performance size-exclusion chromatography equipped with multi-angle laser-light scattering and refractive index detectors. *Carbohydrate Polymers*, v.49, p.307-314, 2002.

YU, T-S; KOFLER, H.; HÄUSLER, R.E.; HILLE, D.; FLÜGGE, U-I; ZEEMAN, S.C.; SMITH, A.M.; KOSSMANN, J.; LLOYD, J.; RITTE, G.; STEUP, M.; LUE, W-L; CHEN, J.; WEBER, A. The *Arabidopsis* *sex1* mutant is defective in the R1 protein, a general regulator of starch degradation in plants, and not in the chloroplast hexose transporter. *Plant Cell*, v.13, p.1907-1918, 2001.

YUAN, R.C.; THOMPSON, D.B.; BOYER, C.D. Fine structure of amylopectin in relation to gelatinization and retrogradation behavior of maize starches from three wx-containing genotypes in two inbred lines. *Cereal Chemistry*, v.70, p.81-89, 1993.

ZHANG, P.; WHISTLER, R.L.; BeMILLER, J.N.; HAMAKER, B.R. Banana starch: production, physicochemical properties, and digestibility – a review. *Carbohydrate Polymers*, v.59, p.443-458, 2005.

ZEEMAN, S.C.; SMITH, S.M.; SMITH, A.M. The breakdown of starch in leaves. *New Phytologist*, v.163, p.247-261, 2004.

ZEEMAN, S.C.; SMITH, S.M.; SMITH, A.M. The diurnal metabolism of leaf starch. *Biochemical Journal*, v.401, p.13-28, 2007.

ZEEMAN, S.C.; NORTHROP, F.; SMITH, A.M., ap REES, T. A starch-accumulating mutant of *Arabidopsis thaliana* deficient in a chloroplastic starch-hydrolysing enzyme. *The Plant Journal*, v.15, p.357-365, 1998.

8 ANEXOS

Informações para os Membros de Bancas Julgadoras de Mestrado/Doutorado

1. O candidato fará uma apresentação oral do seu trabalho, com duração máxima de trinta minutos.

2. Os membros da banca farão a arguição oral. Cada examinador disporá, no máximo, de trinta minutos para arguir o candidato, exclusivamente sobre o tema do trabalho apresentado, e o candidato disporá de trinta minutos para sua resposta.

2.1 Com a devida anuência das partes (examinador e candidato), é facultada a arguição na forma de diálogo em até sessenta minutos por examinador.

3. A sessão de defesa será aberta ao público.

4. Terminada a arguição por todos os membros da banca, a mesma se reunirá reservadamente e expressará na ata (relatório de defesa) a aprovação ou reprovação do candidato, baseando-se no trabalho escrito e na arguição.

4.1 Caso algum membro da banca reprove o candidato, a Comissão Julgadora deverá emitir um parecer a ser escrito em campo exclusivamente indicado na ata.

4.2 Será considerado aprovado o aluno que obtiver aprovação por unanimidade ou pela maioria da banca.

5. Dúvidas poderão ser esclarecidas junto à Secretaria de Pós-Graduação: pgfarma@usp.br, (11) 3091 3621.

São Paulo, 18 de março de 2005.

Profa. Dra. Bernadette D. G. M. Franco
Presidente da CPG/FCF/USP