

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

**O efeito do 1-metilciclopropeno sobre o metabolismo de
carboidratos de bananas (*Musa acuminata* aaa cv. Nanicão)**

JANAINA APARECIDA MAINARDI

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientador: Prof. Tit. Franco Maria Lajolo

Co-orientador: Prof. Dr. Eduardo Purgatto

SÃO PAULO

2007

18693

DEDALUS - Acervo - CQ



30100012963

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

Mainardi, Janaina Aparecida
M224e O efeito do 1-metilciclopropeno sobre o metabolismo de
carboidratos de bananas (*Musa acuminata* aaa cv. Nanicão) /
Janaina Aparecida Mainardi. -- São Paulo, 2007.
82p.

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

Orientador: Lajolo, Franco Maria

Co-orientador: Purgatto, Eduardo

I. Bromatologia 2. Fisiologia vegetal 3. Banana : Bioquímica
dos alimentos I. T. II. Lajolo, Franco Maria. orientador III.
Purgatto, Eduardo, co-orientador.

641 CDD

JANAINA APARECIDA MAINARDI

O efeito do 1-metilciclopropeno ^{1-MCP} o metabolismo de carboidratos de bananas
(*Musa acuminata* aaa cv. Nanicão)

Comissão Julgadora da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Prof. Tit. Franco Maria Lajolo
Orientador/Presidente

Prof. Dr. Eduardo Purgatto
Co-orientador/1º Examinador

Prof. Dr.
2º Examinador

Prof. Dr.
3º Examinador

Prof. Dr.
4º Examinador

São Paulo, 19/06/2007

***Ao Cris, meu menino....sua
fortaleza me sustenta, seu
amor me salva!***

AGRADECIMENTOS

Nem sei por onde começar...foram tantos os que fizeram parte deste trabalho, que me ajudaram até mesmo sem saber...

Aos meus pais, Antonio e Ely, que sempre me apoiaram nas minhas escolhas e neste caminho em especial, mesmo sem compreender muito para onde algumas enzimas poderiam me levar. Amo vocês!

Aos meus irmãos Plínio e Antonietta...que nosso amor incondicional dure por toda a eternidade!

Ao Cris, meu amor, "there is nothing for me, but to love you".

À minha segunda família: Sr. Gilberto, D. Eliana, Buti, Gus, Lú, Caique e à princesa Helena, muito obrigada pelo carinho...vocês todos contribuíram muito para que este sonho fosse realizado.

Às minhas queridas amigas, Adriana, Amanda, Ana Paula, Fernanda, Milana e Silvinha...vocês que souberam falar e ouvir com apenas um olhar, que perceberam em meus olhos os meus desejos, meus disfarces, minhas alegrias e meus medos e que sempre tiveram uma palavra, sob medida, quando estes mesmos olhos precisaram...vocês são especiais.

À Márcia, Malú e Dêra...sorrisos inesquecíveis, gestos inesquecíveis...pessoas inesquecíveis.

Sinceros agradecimentos ao meu orientador, Prof. Franco Maria Lajolo, pelas conversas, conselhos e por me deixar fazer parte de seu tão cobiçado grupo de pesquisa.

Ao meu co-orientador e amigo, Prof. Eduardo Purgatto. Sem você isto tudo não teria o mesmo sucesso. Obrigada por segurar em minha mão quando precisei, não só entre uma pipetagem e outra, mas também entre uma e outra peça que a vida nos prega. Agradeço profundamente todo o carinho, atenção e todo o conhecimento que dividiu comigo.

Agradecimentos especiais à Profa. Beatriz Cordenunsi, pelo carinho, pelas incansáveis discussões e pela oportunidade que me concedeu de fazer um estágio fora do país, pois, além de proporcionar um "upgrade" no meu currículo, pude aprender muitas coisas, conhecer pessoas maravilhosas e cidades lindas!

Agradeço também ao Prof. João Roberto pelas valiosas sugestões.

Ao Prof. Fernando, Profa. Inés e Profa. Bety pela agradável convivência.

Ao Dr. Adair Vieira Júnior, por fornecer alguns dos dados de *Western blot*.

À Profa. Alison Smith, do John Innes Institute, por me receber de braços abertos em seu laboratório, pelo total apoio e pelas sábias discussões. Também agradeço a todos os amigos que lá deixei.

Aos que passaram pelo laboratório e aos que continuam, Ana Cris, Neuza, Claudinha, Claudinéia, Roberta, Any, Marcinha, Lena, Lucile, Alberto, Ricardo, Maurício, Lúcia, Selma, Aline, Paty, Priscila, Jacqueline, Adair, Thomas, João Paulo, Renato, Gracieli, Grazielli, Juliana, Tânia, Clarice, Walter, Fernanda Mendes, Rose, Marcelo, Sílvia, Eliana, Gisele, Gabi, Cíntia, Ana Ratto, Paola, Andréia, Denise, agradeço as pipetas emprestadas, os sorrisos divididos, as soluções preparadas e as piadas bem humoradas.

Aos funcionários da limpeza, da manutenção, das secretarias e da biblioteca, obrigada por todo o apoio.

À CAPES pela bolsa e à FAPESP pelo apoio financeiro ao laboratório.

***A falsa ciência cria os ateus;
a verdadeira faz o homem
prostrar-se diante da divindade.***

Voltaire

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Amadurecimento de frutos – banana	1
1.2. O mediador – etileno	5
1.3. O antagonista – 1-MCP	10
1.4. O metabolismo do amido.....	14
1.5. A degradação do amido	17
1.5.1. α -amilases	18
1.5.2. β -amilases	19
1.5.3. Fosforilases.....	20
1.5.4. <i>D-enzyme</i> plastidial (DPE 1).....	22
1.5.5. <i>D-enzyme</i> citossólica (DPE 2)	23
1.6. Síntese de sacarose.....	26
1.7. Etileno e a degradação do amido no amadurecimento	27
2. OBJETIVOS.....	29
3. MATERIAIS E MÉTODOS	30
3.1. Frutos	30
3.2. Medidas de respiração e etileno.....	30
3.3. Determinação de amido	31
3.4. Determinação de açúcares solúveis.....	31
3.5. Determinação de proteínas	32
3.6. Extração das enzimas	32
3.7. Atividade enzimática.....	33
3.8. PAGE nativo	34
3.9. Extração de RNA total, <i>Northern blotting</i> e hibridização.....	35
3.10. Extração de proteína total	36
3.11. Western Blotting	36
3.12. Obtenção dos fragmentos para a fosforilase e sequenciamento.....	37
3.13. Análise de AIA (ácido indol-3-acético) livre e ABA (ácido abscísico)	38

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
4.1. Efeitos do etileno e do 1-MCP sobre o pico climatérico	41
4.2. Efeitos do etileno e do 1-MCP sobre a degradação de amido e síntese de sacarose.....	43
4.3. Influência do etileno sobre enzimas relacionadas à degradação do amido....	45
4.3.1. α -amilases	45
4.3.2. β -amilases	48
4.3.3. Fosforilases.....	51
4.3.4. DPE 1	57
4.3.5. DPE 2	58
4.4. Enzimas e o metabolismo do amido.....	61
5. CONCLUSÕES	67
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	68

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Representação do Ciclo de Yang e consequente síntese do etileno.....6
- Figura 2:** Esquema proposto do mecanismo de ligação do etileno ao receptor no retículo endoplasmático em *Arabidopsis*.....9
- Figura 3:** Possível mecanismo de ligação do 1-MCP ao receptor de etileno no retículo endoplasmático em *Arabidopsis*.....12
- Figura 4:** Esquema da organização estrutural do grânulo de amido.....17
- Figura 5:** Esquema proposto resumido para a conversão do amido para hexose fosfato em células de banana.....25
- Figura 6:** Produção de CO₂ (A) e etileno (B) pelos frutos nos diferentes tratamentos.....42
- Figura 7:** Degradação do amido (A) e síntese de sacarose (B) ao longo do amadurecimento dos frutos nos diferentes tratamentos.....44
- Figura 8:** 1ª Linha: Atividade enzimática de α -amilase ($\mu\text{mol p-nitr./mg proteína/h}$) durante o amadurecimento dos frutos controle (A), tratados com etileno (B) e tratados com 1-MCP (C). 2ª Linha: *Western blotting* anti- α -amilase contra 100 μg de proteínas de polpa da fruta controle (D), tratadas com etileno (E) e 1-MCP (F).....47
- Figura 9:** 1ª Linha: Atividade enzimática de β -amilase ($\mu\text{mol p-nitr./mg proteína/h}$) durante o amadurecimento dos frutos controle (A), tratados com etileno (B) e tratados com 1-MCP (C). 2ª Linha: *Western blotting* anti- β -amilase contra 50 μg de proteínas de polpa da fruta controle (D), tratada com etileno (E) e 1-MCP (F).....50

Figura 10: 1ª Linha: Atividade enzimática total de fosforilase ($\mu\text{mol p-nitr./mg}$ proteína/h – sentido de degradação do amido) durante o amadurecimento dos frutos controle (A), tratados com etileno (B) e tratados com 1-MCP (C). 2ª Linha: Atividade em PAGE nativo ao longo do amadurecimento dos frutos controle (D), etileno (E) e 1-MCP (F).....52

Figura 11: Painéis esquerdos: análise densitométrica das bandas de amido fosforilase (citossólica e plastidial, como indicado) em gel de poliacrilamina.....55

Figura 12: Painéis esquerdos: análise densitométrica das bandas de amido fosforilase (citossólica e plastidial, como indicado) de western blots.....56

Figura 13: Painéis esquerdos: análise densitométrica das bandas de amido fosforilase (citossólica e plastidial, como indicado) de Northern blots.....57

Figura 14: 1ª Linha: Conteúdo de maltose ao longo do amadurecimento dos frutos controle (A), tratados com etileno (B) e tratados com 1-MCP (C). 2ª Linha: Atividade em PAGE nativo para a DPE 1 durante o amadurecimento dos frutos controle (D), tratados com etileno (E) e tratados com 1-MCP (F). 3ª Linha: PAGE nativo para a DPE 2 nos frutos controle (G), etileno (H) e 1-MCP (I).....60

Figura 15: Comparação das atividades totais das enzimas β -amilase, α -amilase e fosforilase durante a degradação do amido de bananas controle - \bullet -, tratadas com etileno - \blacktriangle - ou com 1-MCP - \square -65

Figura 16: Teor de AIA (ácido indol-3 acético) livre e ABA (ácido abscísico) durante a degradação do amido de bananas controle - \bullet -, tratadas com etileno - \blacktriangle - e tratadas com 1-MCP - \square -66

RESUMO

MAINARDI, J.A. **O efeito do 1-metilciclopropeno sobre metabolismo de carboidratos de bananas (*Musa acuminata* AAA cv. Nanicão)**. 2007. 82f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

A banana é um fruto climatérico que apresenta alta taxa respiratória e alta produção de etileno após a colheita, o que a torna altamente perecível. Acredita-se que o 1-MCP é capaz de ligar-se ao receptor do hormônio etileno, bloqueando sua ação e, conseqüentemente, retardando o amadurecimento do fruto. Bananas (*Musa acuminata* AAA cv. Nanicão) com aproximadamente 110 dias pós-antese foram armazenadas em condições controladas de umidade e temperatura. Parte da amostra foi tratada com 1-MCP (100 nL/L), outra parte foi tratada com etileno (100 ppm – 7L/min), e, uma terceira parte, foi mantida como controle. Os frutos foram caracterizados, durante o período de amadurecimento, em relação à produção de etileno e CO₂ (por cromatografia à gás), à concentração de amido (pelo método enzimático descrito por Cordenunsi e Lajolo 1995) e açúcares (glicose, frutose, sacarose e maltose – por HPLC-PAD). Também foram analisados os comportamentos das enzimas α e β -amilases, fosforilase, DPE 1 e DPE 2 por atividade enzimática *in vitro* ou por P.A.G.E. nativo e, quando possível, foram avaliados os comportamentos destas enzimas frente a tradução (*Western blotting*) e transcrição proteica (*Northern blotting*). A degradação de amido, assim como a respiração, a produção de etileno e síntese de açúcares foram retardadas nos frutos tratados com o 1-MCP. Como consequência destas mudanças, também houve uma alteração nos perfis das atividades enzimáticas. Os resultados indicaram que o 1-MCP, além de atrasar o climatério respiratório, foi capaz de provocar descompasso no padrão de degradação de amido e síntese de açúcares sugerindo também que outros fatores temporais, necessários ao processo, foram prejudicados. Dentre as enzimas envolvidas no metabolismo de carboidratos de bananas, as α -amilases não demonstraram ser etileno-dependentes, as β -amilases mostraram ser enzimas bastante dependentes do etileno e parecem ter importância especial quando se trata do metabolismo da maltose, em conjunto com a DPE 2; atividade fosforolítica foi induzida ao longo do amadurecimento, mas parece ter resposta mais significativa a alterações basais do hormônio etileno e, portanto, sugere-se que esta enzima esteja envolvida com mais de uma forma de regulação; a DPE 1 apresentou maior atividade ao início da degradação do amido, indicando sua atuação sobre glicanos liberados pelas α -amilases. A presença de DPEs na banana torna o seu metabolismo de carboidratos mais próximo daquele presente em folhas.

Palavras-chave: Degradação de amido. Banana. Enzimas. 1-metilciclopropeno. Etileno.

ABSTRACT

MAINARDI, J.A. **The effect of 1-methylcyclopropene on bananas (*Musa acuminata* AAA cv. Nanicão) carbohydrates metabolism.** 2007. 82f. Thesis (Doctoral) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

Banana is a climateric fruit that has a high respiration rate and a high ethylene production after harvest, what makes this fruit very perishable. It is believe that 1-MCP is capable to interact with the hormone ethylene receptors, blocking its action and, as result, delaying the fruit ripening. Bananas (*Musa acuminata* AAA cv. Nanicão) with 110 days after anthesis were stored in controlled conditions of humidity and temperature. Part of the sample was treated with 1-MCP (100 nL/L), another part was treated with ethylene (100 ppm - 7L/min), and, a third part, was kept as control. The fruits were characterized, along the ripening process, based on the ethylene and CO₂ production (by gas chromatography), the starch amount (enzymatic method described by Cordenunsi and Lajolo, 1995) and sugars content (glucose, fructose, sucrose and maltose - by HPLC-PAD). Enzymes behaviors were also followed – α and β -amylases, phosphorylase, DPE 1 and DPE 2 by enzymatic activity (*in vitro* or native P.A.G.E.) and, when it was possible, the translation (Western blotting) and protein transcription (Northern blotting) were also analyzed. The starch degradation, as well as the CO₂ and ethylene production and sugars synthesis were delayed in the fruits treated with the 1-MCP. As consequence of these changes, we also had an alteration in the enzymatic activity profiles. The results indicated that the 1-MCP, besides delaying the respiratory climateric, was capable to change the standard profile of starch degradation and synthesis of sugars, suggesting that other factors, necessary to the process, were damaged. Considering the involved enzymes in the carbohydrates metabolism of bananas, the α -amylases did not demonstrated to be ethylene-dependents β -amylases seem to be ethylene-dependent and seem to have special importance in the maltose metabolism, working on it with the DPE 2; phosphorolytic activity was induced along the ripening, but it seems to have more significant relation to the basal alterations of the hormone ethylene, therefore, it suggests that this enzyme is involved with more than one type of regulation; DPE 1 presented greater activity in the beginning of the starch degradation, indicating its performance on glucans released by the α -amylases activity. The presence of DPEs in bananas approximates its metabolism of carbohydrates to the leaves metabolism.

Key words: Starch degradation. Banana. Enzymes. 1-methylcyclopropene. Ethylene.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Amadurecimento de frutos – banana

Os frutos constituem uma parte da dieta humana de significativo valor devido às suas qualidades nutritivas. Além disso, outras características contribuem para torná-los atraentes aos consumidores, tais como a textura, coloração, sabor e aroma, e estas serão desenvolvidas, principalmente, durante o seu amadurecimento, onde ocorre um grande aumento da atividade respiratória e, conseqüente produção de energia, açúcares, acetatos, ácidos orgânicos, compostos fenólicos e taninos, produtos estes responsáveis pelo sabor e aroma. Ainda, durante este processo, acontecem alterações na pigmentação do fruto, devido à degradação da clorofila, alterações na parede celular, causadas pela perda ou ganho em excesso de água ou pela própria degradação do amido (Seymour e Tucker, 1993).

Cada espécie cultivada possui uma taxa respiratória característica e, em geral, a intensidade de respiração no início da germinação é alta, diminuindo com o tempo, com o crescimento e a frutificação das plantas (Morgan, 1992). Ao início da fase de maturação do fruto, a taxa respiratória volta a aumentar em algumas espécies. Daí surge a classificação de frutos climatéricos e não-climatéricos. Os primeiros envolvem um grupo que, logo após o início da maturação, apresentam rápido aumento na intensidade respiratória, ou seja, as reações relacionadas com o amadurecimento e senescência ocorrem rapidamente e com grande demanda de energia. Nestes frutos, observa-se também um aumento característico na produção de etileno e muitos eventos relacionados ao amadurecimento estão direta ou

indiretamente associados a este hormônio. Exemplos de frutos climatéricos são: banana, goiaba, manga, mamão, caqui e tomate. A fim de retardar o amadurecimento e o processo de senescência e aumentar o período de conservação, frutos climatéricos costumam ser colhidos ainda verdes, a partir do momento em que atingem o ponto de maturação, e em seguida são armazenados em condições controladas. São caracterizados como frutos não-climatéricos aqueles cujas taxas respiratórias não aumentam antes do amadurecimento e a produção de etileno é bem mais baixa, não apresentando pico característico como em frutos climatéricos. A energia fornecida se mantém em constante declínio durante todo processo de senescência. Dentro deste grupo podem ser citados a laranja, a tangerina, a uva e o abacaxi. Frutos não-climatéricos, em geral, ficam ligados à planta-mãe até atingirem seu estágio ótimo de amadurecimento, quando então são colhidos (Biale e Young, 1981).

Dentro destes dois grandes grupos, a banana, uma monocotiledônea da família *Musaceae*, se enquadra no primeiro, como já descrito, e é um bom modelo para os estudos de alterações bioquímicas (Seymour e Tucker, 1993), principalmente daquelas relacionadas ao metabolismo de carboidratos, devido ao grande conteúdo de amido acumulado durante o seu desenvolvimento (aproximadamente 20% do peso fresco) e à rápida mobilização deste, durante o processo de amadurecimento do fruto. Além disso, a banana é um dos frutos mais consumidos no mundo, é boa fonte de energia (bananas comumente consumidas têm alto teor de sacarose), e minerais (potássio, cálcio, fósforo, ferro, magnésio, enxofre), sendo um componente importante na alimentação em todo mundo (Adão e Glória, 2005).

Os frutos da bananeira resultam do desenvolvimento partenocárpico e reúnem-se em pencas, coletivamente conhecidas como cachos (Ballester, 1992), passando por quatro fases de desenvolvimento:

- o crescimento: marcado por um período de rápida divisão seguido do alongamento celular;
- a maturação: caracterizada por mudanças físicas e químicas que afetam a qualidade sensorial do fruto; esta fase sobrepõe-se à parte do estágio de crescimento e de amadurecimento do fruto;
- amadurecimento: período no qual o fruto se torna apto para o consumo, em virtude de alterações desejáveis na aparência, no sabor, no aroma e na textura;
- senescência: fase que se estende da completa maturação até a morte (Vilas Boas et al, 2001).

Considerando as características organolépticas da banana, o amarelecimento da casca é a alteração mais marcante que ocorre com o amadurecimento. A clorofila que confere coloração verde à casca da banana no estágio pré-climatérico, é rapidamente degradada, dando lugar aos carotenóides, pigmentos amarelos que caracterizam a banana madura (Vilas Boas et al, 2001). O estágio de maturação pode ser caracterizado subjetivamente pelo grau de coloração da casca, que é um importante parâmetro para prever a vida de prateleira da fruta.

O sabor da banana é um dos mais importantes atributos de sua qualidade. A polpa da banana verde é caracterizada por uma forte adstringência determinada pela presença de compostos fenólicos solúveis, principalmente taninos. À medida que o fruto amadurece, ocorre polimerização destes compostos, com conseqüente diminuição na adstringência e na acidez (Vilas Boas et al, 2001). Também ocorre um

declínio no teor de amido, simultâneo ao aumento no conteúdo de açúcares solúveis (Areas e Lajolo, 1981; Cordenunsi e Lajolo, 1995; Purgatto, 2001), principalmente sacarose, glicose e frutose (Mota et al, 1997, Purgatto et al, 2001).

A solubilização e despolimerização de pectinas e hemiceluloses resulta, geralmente, na extensa degradação da parede celular e como consequência no amolecimento do fruto com o amadurecimento (Asif e Nath, 2005). No entanto, em bananas, vem sendo observado que a parede celular parece não ser degradada (Shiga et al, 2006 dados ainda não publicados), mas sim reorganizada. Neste caso, o amolecimento da banana poderia então ser consequência da própria degradação do amido, já que os grânulos de amido podem atingir, segundo Cordenunsi (2004), até 300 μm em frutos verdes, ocupando parte considerável do amiloplasto, e, em frutos maduros, o tamanho pode cair para valores menores que 70 μm . Como consequência disto, há uma mudança na forma do grânulo que passa de alongado para arredondado, o amiloplasto ficaria mais “vazio” e o fruto mais macio. O aumento da concentração de açúcares solúveis na polpa em relação à casca causa ainda um gradiente de potencial osmótico entre polpa e casca, resultando na migração de água da casca para polpa. Além disso, a casca perde água para atmosfera por transpiração através dos estômatos. Assim, a perda de água pelo fruto por transpiração resulta em significativa perda de peso do fruto durante seu amadurecimento (Hulme, 1970). O aroma característico da banana também se intensifica com o amadurecimento, devido ao aumento dos teores de ésteres, acetatos e butanoatos, mas são os acetatos de isopentila e de amila, principalmente, que conferem à banana seu aroma característico (Kader, 1992; Lichtemberg, 1999).

Dentro deste contexto e com base nos muitos estudos já realizados, envolvendo a íntima relação entre o etileno e o amadurecimento de frutos, a

produção deste gás, conhecido por ser um regulador vegetal, representa um sinal que dispara rapidamente as modificações que resultam nas transformações bioquímicas da banana, tornando-a um fruto apto para o consumo (Seymour e Tucker, 1993).



Já está bem documentado que o hormônio vegetal etileno regula muitos aspectos do crescimento, desenvolvimento e senescência de plantas e, estudos envolvendo este hormônio são cada vez mais frequentes, desde que sua via de biossíntese foi estabelecida por Adams e Yang (1979). A metionina necessária para a biossíntese do etileno é proveniente do ciclo de Yang (figura 1) e é um aminoácido essencial para inúmeras funções da célula, incluindo a iniciação da síntese de proteínas, a metilação do DNA e do rRNA (Brummell, 2005). Para a biossíntese do etileno, a metionina é convertida em S-adenosilmetionina (SAM) e esta libera a 5'-metiltioadenosina (MTA) e também o 1-aminociclopropano-1-ácido carboxílico (ACC), pela ação da 1-aminociclopropano-1-ácido carboxílico sintase (ACS). A MTA volta para o ciclo para que haja regeneração da metionina e desta forma o etileno possa continuar sendo produzido e o ACC então, quando oxidado pela 1-aminociclopropano-1-ácido carboxílico oxidase (ACO) tem como produto principal o etileno (McKeon et al, 1995).

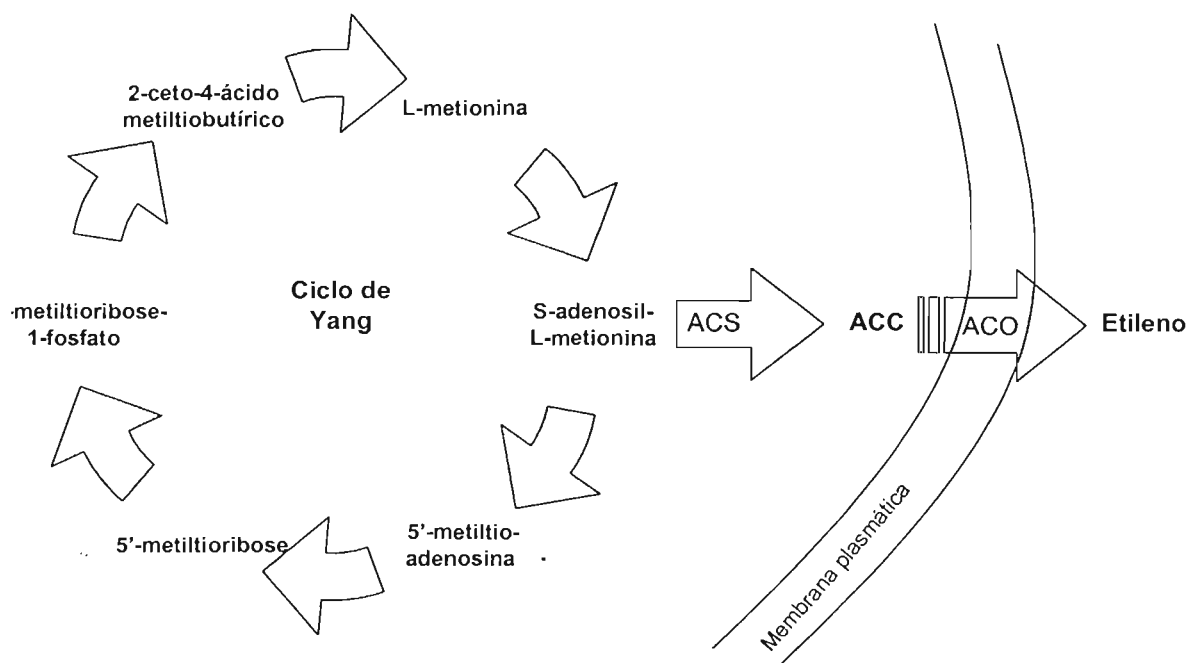


Figura 1: Representação do Ciclo de Yang e consequente síntese do etileno. Adaptado de Brummell, 2005.

A autocatálise do etileno pode ser reduzida pela redução dos níveis de oxigênio combinada com o abaixamento da temperatura, pois neste ambiente a estimulação da atividade da ACS e da ACO é inibida (Gorny e Kader, 1996). Da mesma forma, estudos em tomates mostraram que um alto nível de CO_2 pode prevenir o acúmulo da ACC, reduzindo a ação do etileno (Wild et al, 2005).

Por ser a banana um fruto climatérico ela, assim como outros frutos climatéricos, produz etileno em duas fases. O primeiro sistema regulador da biossíntese de etileno controla os níveis de etileno basal e a produção relativa ao estresse. Já o segundo sistema regula a produção autocatalítica do etileno. Este segundo sistema não ocorre em frutos não climatéricos (Fluhr e Mattoo, 1996; Lelievre et al, 1997).

Dentre os processos relacionados ao amadurecimento de frutos, alguns deles são inibidos com a redução de etileno (estes são chamados de etileno-dependentes), enquanto outros não são afetados (etileno - independentes). A

maciez, por exemplo, talvez seja um dos fatores que mais sofre alterações causadas pelo etileno, como mostram alguns estudos realizados em tomates mutantes (*Nr*) e melões (*ACO antisense*) com taxas de produção de etileno reduzidas onde o processo de desenvolvimento da maciez foi retardado (Levievre et al, 1997). Estes estudos também mostraram que a mudança na coloração pode estar ou não relacionada ao etileno, dependendo do pigmento envolvido na reação. Por exemplo, em tomates transgênicos, com níveis reduzidos de expressão de ACS, o processo de síntese do pigmento licopeno é atrasado com a redução de etileno, no entanto, a clorofila é degradada. Outras pesquisas ainda mostram que a transcrição da poligalacturonase (PG), a princípio, independe do etileno, porém foi observado que seu acúmulo é sensível a este hormônio. O aumento da transcrição da PG parece responder, também, a baixos níveis de etileno conforme evidenciado em frutos transgênicos com reduzida expressão da ACS (Alexander e Grierson, 2002).

Em frutos como a banana, o etileno provoca alterações relacionadas ao comportamento de algumas enzimas como a β -amilase, que parece ser bastante dependente deste hormônio (Nascimento et al, 2006). Já o comportamento da α -amilase, ao longo do amadurecimento de bananas, ainda não está muito claro, mas esta enzima parece não depender somente desta via de sinalização hormonal (Vieira Júnior, 2006), assim como a fosforilase, que mostrou ser parcialmente dependente do etileno (Mainardi et al, 2006).

A via de sinalização do etileno consiste na sua ligação, via cofator de cobre, com proteínas receptoras localizadas no retículo endoplasmático das células vegetais (Gao et al, 2003). Até hoje foram descobertas em *Arabidopsis* e em tomate 5 moléculas receptoras, divididas em dois grupos: receptores do tipo I e do tipo II (baseados em diferenças estruturais) e ainda um outro componente, o CTR1,

localizado logo abaixo dos receptores, na cascata de sinalização (O'Malley et al, 2005). O CTR1 é uma proteína quinase "Raf-like", regulado através de interações diretas com os receptores, funcionando como um regulador negativo à resposta (Chang, 2003). O CTR 1 interage com o domínio histidina quinase dos receptores, mostrando maior afinidade com os do tipo-I do que com os membros do tipo-II. Esta interação mantém o CTR 1 ligado ao retículo endoplasmático. Na ausência do etileno, os receptores tendem a permanecer funcionalmente ativos, aptos para interagir com o CTR 1, que por possuir atividade de serina/treonina quinase, fosforila um substrato logo abaixo na cadeia de sinalização, identificado como uma provável proteína quinase ativada por mitógeno (Mitogen Activated Protein Kinase – MAPK), iniciando uma cascata de inibição de resposta ao etileno (Ouaked et al, 2003). Quando o etileno está presente, ele se liga aos receptores, causando uma mudança conformacional, resultando na inativação dos mesmos. O CTR 1 é liberado do RE e também é inativado, ocorrendo a resposta ao etileno (figura 2).

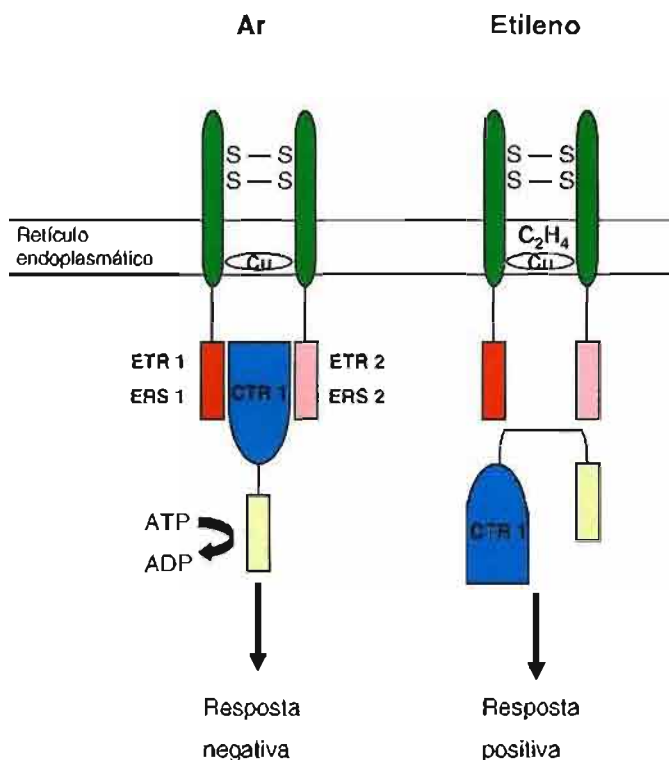


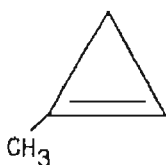
Figura 2: Esquema proposto do mecanismo de ligação do etileno ao receptor no retículo endoplasmático em *Arabidopsis*. Em verde: região de ligação do etileno; em vermelho: receptores tipo-I, cujo domínio histidina quinase está conservado; em rosa: receptores tipo-II contendo domínio histidina quinase degenerado; em azul: CTR 1; em amarelo: domínio serina/treonina quinase. Adaptado de Guo e Ecker (2003).

As evidências apontam para um mecanismo no qual o receptor de etileno atua como um regulador negativo da resposta ao hormônio. Isto torna mais complexo estabelecer qual o modelo possível que explique como a sensibilidade ao etileno é regulada.

A resposta ao etileno parece ter relação com a expressão dos genes dos receptores do hormônio. Klee (2004) levantou a hipótese de que a atividade de quinase dos receptores atuaria suprimindo a resposta ao etileno, ou seja, quanto maior o número de receptores presentes, maior a atividade de quinase e menor a sensibilidade ao etileno. Desta forma, mais etileno seria necessário para inativar (já

que a resposta parece ser negativa) altos níveis de receptores e só a síntese de novos receptores é que poderia reverter o processo. Klee se baseou no fato de que níveis da proteína do NR (um dos receptores de etileno de tomate) apresentaram boa correlação com os níveis de RNA; as plantas que superexpressaram o cDNA do NR nativo acumularam mais proteína e foram menos sensíveis ao etileno.

1.3. O antagonista – 1-MCP



Os efeitos que o etileno provoca no crescimento e desenvolvimento das plantas acabaram despertando o interesse em estudar mais a fundo o papel deste hormônio e, para tal, foram pesquisados inibidores de sua síntese ou ação. Muitas foram as moléculas orgânicas estudadas e definidas como bloqueadoras da ação do etileno, como por exemplo a prata (na forma de tiosulfato de prata) que embora pareça atuar sobre os receptores do etileno, não pode ser utilizada em produtos comestíveis; o 2,5- norbornadieno, de grande ação bloqueadora, porém tem um odor bastante desagradável (Veen, 1986). E ainda outros compostos descritos por Sisler e Serek (1997) foram avaliados, como o diazociclopentadieno (DACP) que em presença de luz exerce efeito inibidor considerável sobre os receptores de etileno, mas em altas concentrações é explosivo; o ciclopropeno (CP), 3,3-dimetilciclopropeno (3,3-DMCP) e o 1-MCP (1-metilciclopropeno) que são altamente eficazes no bloqueio do hormônio de amadurecimento e não têm odor perceptível nas concentrações necessária para a inibição, a temperatura ambiente. Destes três

últimos compostos, o mais estudado é o 1-MCP, por ser mais estável que o CP e mais ativo que o 3,3-DMCP.

O 1-metilciclopropeno, encontrado sob a forma de sal de lítio, inibe o aumento da síntese de duas ACS e de uma ACO e conseqüentemente a biossíntese do etileno em tomates (Nakatsuka et al, 1998). Tal fato ocorre como consequência da ação do 1-MCP que se fixa preferencialmente aos receptores de etileno (figura 3), bloqueando-os de forma irreversível (Jiang et al, 1999a; Feng et al, 2000). O processo de amadurecimento só inicia-se novamente quando novos receptores são sintetizados. Segundo Jiang et al (1999b), o K_m para o 1-MCP é 17 nL por litro, enquanto que para o etileno é 96 nL por litro.

Estudos comprovam que se aplicando o 1-MCP no estágio pré-climatérico da banana o processo de amadurecimento é atrasado, pois o fruto passa a não responder ao etileno temporariamente, atrasando o pico de produção deste hormônio, assim como a respiração climatérica (Nascimento et al, 2006). Quando aplicado depois da autocatálise do etileno, a produção deste não é inibida e nem o processo de respiração climatérica, mas o desenvolvimento da coloração e a produção de compostos voláteis parecem ser atrasados. Isto ocorre, pois o início da produção de compostos voláteis, por exemplo, embora pareça estar correlacionado com a autocatálise do etileno, não tem sua máxima produção relacionada ao nível de produção do hormônio de amadurecimento e sua baixa produção pode ser atribuída a outros fatores alterados pelo 1-MCP, como a formação de precursores (Golding et al, 1998).

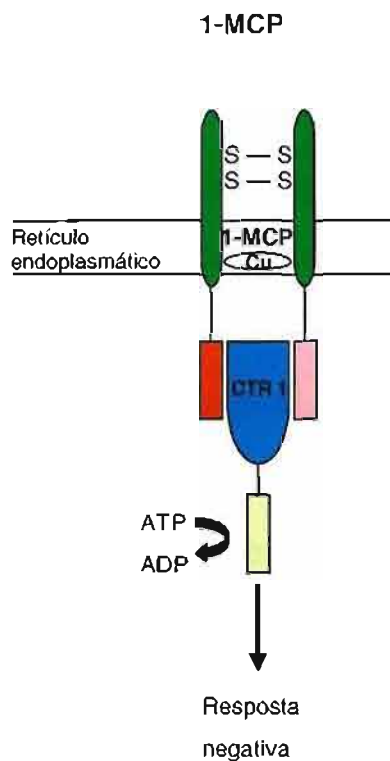


Figura 3: Possível mecanismo de ligação do 1-MCP ao receptor de etileno no retículo endoplasmático em *Arabidopsis*. Em verde: região de ligação do 1-MCP; em vermelho: receptores tipo-I, cujo domínio histidina quinase está conservado; em rosa: receptores tipo-II contendo domínio histidina quinase degenerado; em azul: CTR 1; em amarelo: domínio serina/treonina quinase. Adaptado de Guo e Ecker (2003).

A concentração de 1-MCP e o tempo de exposição são fatores que podem determinar em quanto tempo o amadurecimento será retardado. Por exemplo, 24 horas de fumigação com 10 nL.L^{-1} de 1-MCP com subsequente exposição ao etileno (1 mL.L^{-1}) por 18 horas, atrasa o amadurecimento da banana por cerca de 11-12 dias à 25°C (Sisler et al, 1996), ao passo que bananas tratadas com 6 horas de fumigação com $450 \text{ }\mu\text{L.L}^{-1}$ de 1-MCP têm seu tempo de amadurecimento retardado em 20-30 dias (Golding et al, 1998). Jiang et al (1999b) observaram também que bananas tratadas com 100 nL.L^{-1} de 1-MCP durante 12 horas, apresentaram o mesmo efeito que aquelas tratadas com 1000 nL.L^{-1} por 3 horas, confirmando que quanto maior for o tempo de exposição ao produto, menor será a concentração

necessária para se obter o efeito desejado. O mesmo foi observado quando abacates foram tratados com 1-MCP (Jeong et al, 2002), onde mantendo-se a concentração e apenas variando o tempo de exposição, foi observado que o maior tempo foi mais efetivo para o atraso do amadurecimento.

Fan et al (2000) verificaram o efeito do 1-MCP em damascos em diferentes estádios de maturação, concluindo que o antagonista do etileno retardou o amadurecimento em todos os estádios, porém quanto maior o grau de maturação do fruto, menor foi o efeito do 1-MCP sobre a firmeza dos frutos.

Alguns pesquisadores mostraram também que o 1-MCP pode prevenir o acúmulo de mRNAs que codificam a expressão da ACC sintase, ACC oxidase e do receptor de etileno envolvido na regulação da produção de etileno no sistema 2 (etileno autocatalítico) (Nakatsuda et al, 1997; Harris et al, 2000). Ou seja, o acúmulo de mRNAs necessários para a transição do sistema 1 para o sistema 2 de produção de etileno pode ser bloqueado ou retardado pela ação do 1-MCP.

Uma das vantagens de se utilizar o 1-MCP como inibidor do etileno é que ele não provoca sintomas fitotóxicos, enquanto que um outro inibidor, a prata (utilizada na forma de tiosulfato de prata), apesar de ter ação semelhante àquela do 1-MCP sobre o etileno, causa a fitotoxicidade em determinadas concentrações (Cameron e Reid, 1981).

Desta forma, o uso do 1-MCP como ferramenta para a conservação de frutos no pós-colheita soma-se às tecnologias já disponíveis para a aplicação em espécies frutíferas de interesse comercial como a maçã, o mamão e a banana.

No Brasil, a quantidade de banana ofertada é grande, no entanto, a qualidade do produto, em determinados locais, ainda é baixa, contribuindo para que o preço, principalmente em termos de produtor, seja baixo. Assim sendo, por ser o 1-MCP um

antagonista do hormônio etileno, ele poderia trazer informações sobre as relações deste hormônio com os principais processos bioquímicos que ocorrem no metabolismo de carboidratos de bananas e das enzimas envolvidas nestes processos. Dado o grande interesse da agroindústria na utilização em larga escala deste composto e à recente aprovação (2003) pelo Ministério da Agricultura e pela ANVISA no Brasil para uso do 1-MCP no controle do amadurecimento de frutos, faz-se necessário estudos a respeito dos seus efeitos sobre a banana, em níveis mais aprofundados da fisiologia pós-colheita deste fruto. Tal conhecimento pode fornecer subsídios para orientar a aplicação de tecnologias que visem empregar este composto como forma de estender a vida de prateleira da banana e de outros frutos.

No entanto, tendo em vista que ainda faltam informações acerca dos efeitos da aplicação deste composto em parâmetros importantes da qualidade da banana, são necessários maiores estudos para calcular os reais benefícios de seu emprego.

Particularmente em relação à banana, um dos parâmetros menos estudados diz respeito à mobilização do amido. Já que este carboidrato é a principal fonte de reserva vegetal e, em bananas, representando cerca de 20% do peso fresco do fruto, sua degradação e consequente conversão em açúcares é um metabolismo bastante interessante para ser estudado, pois este processo de adoçamento afeta diretamente a qualidade do fruto.

1.4. O metabolismo do amido

O amido é formado por dois polissacarídeos, a amilose (normalmente 20-30%) e a amilopectina (70-80%). Ambos são constituídos por unidades de α -D-glicose unidas por ligações do tipo α -1,4 (no caso da amilose), e do tipo α -1,4 e α -

1,6 no caso da amilopectina. As amiloses geram cadeias basicamente lineares e bem menores que as amilopectinas, formadas por cadeias ramificadas (aparecem a cada 20-30 molécula de glicose) (Buléon et al, 1998). A proporção em que estes dois polissacarídeos irão aparecer depende não só da fonte de amido como da espécie vegetal, por exemplo, em milho ceroso a quantidade de amilose não ultrapassa os 3%, enquanto que no milho comercial este conteúdo sobe para mais de 50% (Li e Yeh, 2001; Singh et al, 2003).

Embora a estrutura do grânulo de amido ainda não esteja bem definida, acredita-se que os grânulos de amido apresentam-se estruturalmente diferentes, onde as amiloses aparecem com menor peso molecular e com forma estendida, enquanto que as amilopectinas são moléculas de alto peso molecular, porém compactas (Imberty et al, 1988). Desta forma, grânulos de cristalinidade tipo B teriam uma alta concentração de amilose em sua composição e formariam estruturas mais abertas e mais facilmente hidratáveis. Já os grânulos mais ricos em amilopectina, mais densamente empacotados, resultariam em alta cristalinidade sendo então considerados do tipo A (Parker e Ring, 2001). Geralmente, as estruturas tipo A, com cadeias contendo cerca de 23-29 unidades de glicose, são encontradas na maioria dos cereais, enquanto as de tipo B (~30-44 unidades de glicose) podem ser encontradas em bananas, batatas e cereais com alto teor de amilose. Ainda existem amilopectinas do tipo C, as quais consistem numa combinação de estruturas do tipo A e B e estão presentes em ervilhas e feijões (Tang et al, 2006).

Geralmente, nos grânulos, as moléculas de amilose e amilopectina se dispõem em forma radial, formando uma série de capas concêntricas, onde são encontradas zonas cristalinas e amorfas. As regiões cristalinas são formadas por

estruturas muito compactas, geradas pelas ramificações das cadeias de glicose, o que confere à estrutura resistência à hidrólise ácida. Entre estas regiões aparece a lamela amorfa que parece ser menos resistente à hidrólise ácida por ser menos compacta e menos ramificada (figura 3). Repetidas unidades destas regiões formariam os “blocklets” e repetidos blocklets formariam o grânulo de amido (Cordenunsi, 2004).

Cordenunsi (2004) ainda mostrou claramente por meio de microscopia de força atômica a presença dos “blocklets” em amido de banana e seu desligamento do grânulo ao longo do amadurecimento deste fruto, considerado que no fruto ainda verde há a predominância de grânulos de amido de tamanho médio (43%) e grande (37%) e, ao longo do amadurecimento, grânulos de tamanho médio e pequeno começam a aparecer em maior número.

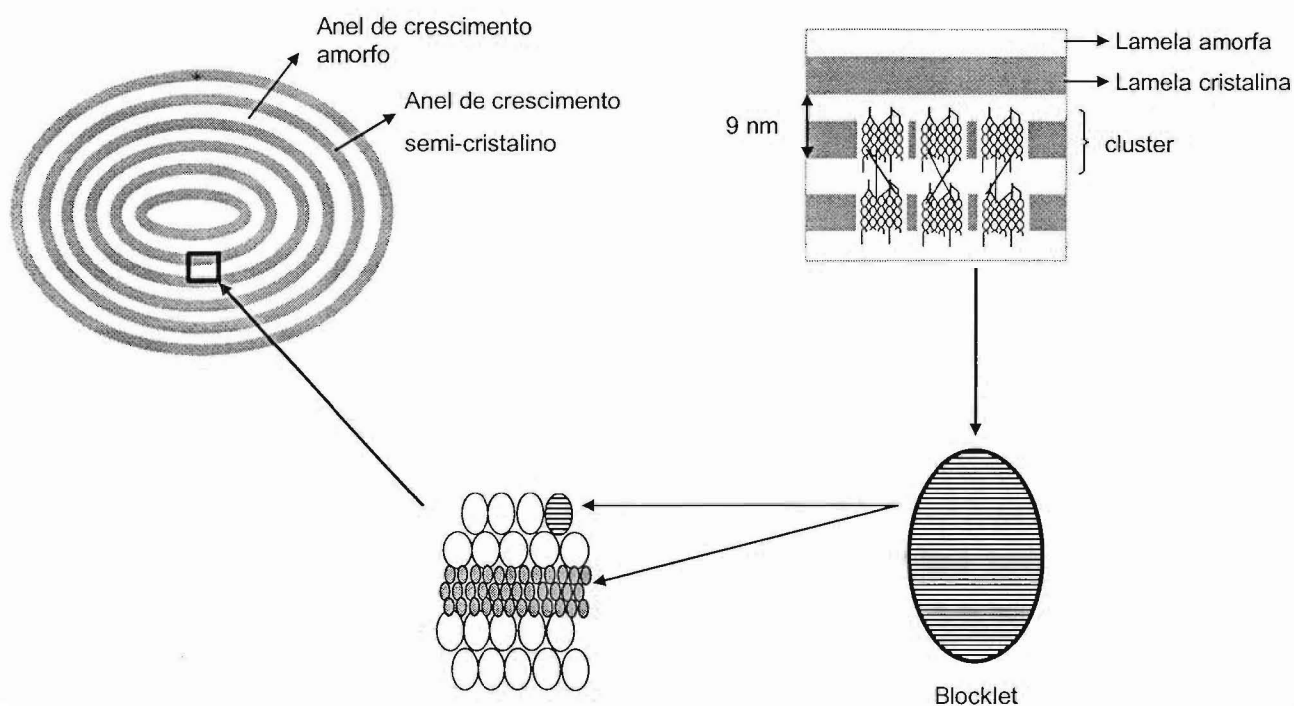


Figura 4: Esquema da organização estrutural do grânulo de amido. Adaptado de Smith (1999).

1.5. A degradação do amido

Durante a mobilização do amido, na fase de amadurecimento do fruto, várias enzimas contribuem para o ataque aos grânulos, atuando de forma coordenada e clivando tais cadeias polissacarídeas. Dentre elas estão:

- as α -amilases (EC 3.2.1.1);
- as β -amilases (EC 3.2.1.2);
- as fosforilases (EC 2.4.1.1);
- a DPE 1 e a DPE 2 (*disproportionating enzymes*) (EC 2.4.1.25).

1.5.1. α -amilases

As α -amilases, ou 1,4- α -D-glicanohidrolases, são endoamilases que atuam nas ligações do tipo α -1,4 da amilose e da amilopectina. Estas enzimas parecem ser as primeiras a atacarem os grânulos de amido em cereais (Ziegler, 1999; Irving, 1999), disponibilizando substratos para outras enzimas. Os produtos principais formados após sua ação hidrolítica são as dextrinas, maltoses e maltotrioses (Whitaker, 1994).

Duas isoformas de α -amilases de cereais já foram cristalizadas e, embora seus aminoácidos apresentem 80% de similaridade, elas diferem em muitos aspectos. O ponto isoelétrico, por exemplo, é um deles e parece conferir à isoenzima uma maior ou menor afinidade ao grânulo (Sargent e Walker, 1978; Weselake e Hill, 1983), e, portanto, uma maior ou menor atividade total. A expressão de mRNA das α -amilases também parece responder ao frio, como observado nos estudos realizados por Wegrzyn et al (2000) com maçãs. Previamente, Cochrane et al (1991) mostraram que batatas submetidas a 4 °C apresentaram aumento na atividade de α -amilase quando comparadas a batatas submetidas a 10 °C.

Os estudos com α -amilases em frutos são bastante limitados. Garcia e Lajolo (1988) avaliaram o comportamento desta enzima em bananas, sugerindo que duas vias de degradação do amido pudessem existir, uma na fase pré-climatérica e outra na fase climatérica. Mais recentemente foi visto que, em bananas, a sua participação pode ocorrer no início da degradação do amido, mas que muitos mecanismos de regulação mais complexos devem estar envolvidos na atividade e expressão gênica desta enzima, já que em 2006, Vieira Júnior observou que baixos níveis de

transcritos foram encontrados para a α -amilase, no entanto sua atividade apresentou um sutil aumento ao longo do amadurecimento de bananas.

1.5.2. β -amilases

As β -amilases ou 1,4- α -D-maltohidrolases são exoenzimas que atuam nas ligações α -1,4 glicosídicas. No entanto elas exercem ação apenas na penúltima ligação da extremidade não redutora do substrato. Recentemente esta enzima vem sendo apontada como enzima chave na hidrólise do amido transitório (Sharkey et al, 2004; Smith et al, 2004). Em *Arabidopsis* foram localizadas 9 isoformas da β -amilase, distribuídas entre o citossol, o cloroplasto e ainda no vacúolo das células (Kaplan et al, 2006).

Atuando em pH ótimo de 5,4 – 6,0 (Hirata et al, 2004) em *Arabidopsis*, as β -amilases têm como produto principal a maltose, que é transportada para o citossol através de um transportador localizado no amiloplasto da célula, o MEX 1, uma vez que mutações em uma simples cópia de seu gene ocasiona o acúmulo excessivo de amido e elevado conteúdo de maltose (Niilytã et al, 2004).

Os mecanismos de regulação da expressão e atividade da β -amilase são bastante complexos, já que esta enzima responde a vários fatores como estresse abiótico, intensidade de luz, fitohormônios e teor de açúcar. Quando submetidos ao estresse pela temperatura ou pelo sal, por exemplo, cevada (Dreier et al, 1995) e milho (Datta et al, 1999) apresentaram aumento no conteúdo de proteína e na atividade da β -amilase vacuolar, seguidos de acúmulo de maltose. Em *Arabidopsis* também já foi visto que o acúmulo de transcritos de β -amilase está sincronizado

com o ritmo circadiano, mostrando um rápido acúmulo ao longo do dia e um coordenado declínio no período escuro (Harmer et al, 2000; Lu et al, 2005).

O efeito que alguns fitohormônios exercem na atividade da β -amilase podem variar de acordo com a espécie vegetal estudada. Wang et al (1996) verificaram que, em sementes de arroz em fase de germinação, a atividade β -amilásica foi reprimida quando as sementes foram submetidas ao tratamento com ácido abscísico, no entanto, a atividade voltou a subir ao ser aplicado nas amostras ácido giberélico. Comportamento contrário foi observado em folhas de batata doce (Ohto et al, 1992). Fatias de bananas tratadas com ácido giberélico também têm sua atividade β -amilásica reduzida, coincidindo com o atraso na degradação do amido, também causado pela aplicação do ácido (Rosseto, 2001).

1.5.3. Fosforilases

As amido fosforilases são enzimas conhecidas por participarem tanto do processo de síntese como de degradação do amido e, basicamente, atacam a extremidade não redutora do polímero de glicose, na presença de ortofosfato, produzindo glicose-1-fosfato (degradação) ou transferem glicose, da glicose-1-fosfato, para cadeias de α -1,4-glicanos, liberando fosfato inorgânico e alongando a cadeia (síntese). Arêas e Lajolo (1981), descreveram um complexo modelo da atividade fosforolítica durante o amadurecimento de bananas, e, em 2002, Mota et al observaram que a atividade da amido fosforilase parecia estar mais relacionada à fase de desenvolvimento da fruta. Estes autores isolaram e caracterizaram parcialmente suas duas isoformas, a plastidial (PHO1) e a citossólica (PHO2), que

diferem entre si não só pela localização, como também pelas propriedades cinéticas e afinidade pelo substrato (Mota, 2001).

Estudos recentes em folhas de ervilhas (Fettke et al, 2004) identificaram um heteroglicano citossólico produzido, provavelmente, por uma transglucosidase (DPE2), que serviria como substrato para a PHO2. De acordo com o modelo proposto, a maltose produzida pela degradação do amido seria transportada para o citossol e funcionaria como doadora de unidades glicosídicas para o heteroglicano acceptor e, com isso, este seria substrato para a PHO2, o que explicaria sua alta afinidade por glicanos de cadeias longas e ramificadas, como o glicogênio, por exemplo, ao contrário do que acontece com a PHO 1.

O papel da PHO1 ainda não está bem definido, mas existem evidências que mostram a sua atividade tanto no processo de síntese quanto no de degradação de amido. Folhas e tubérculos de batata não apresentaram acúmulo de amido quando foi expresso o mRNA antisense para a PHO1 (Sonnewald et al, 1995), no entanto, Zeeman et al (2004) indicaram uma pequena participação da PHO1 no acúmulo de amido durante o dia e sua mobilização durante a noite, em folhas de mutantes *Atphs 1* de *Arabidopsis*.

Em tecidos não fotossintéticos, como a polpa de banana, o papel das amido fosforilases também não está muito claro. Experimentos apresentados por Mota et al (2002), envolvendo a infiltração de ácido indol-acético e ácido giberélico em fatias de bananas, não revelaram mudanças significativas na atividade e conteúdo da proteína PHO1 ao longo do amadurecimento, mas os hormônios causaram atraso na degradação do amido. Estes resultados mostram que estes hormônios, aparentemente, não têm influência na regulação desta enzima. Por outro lado, considerando que o processo de degradação está muito bem relacionado à

produção de etileno autocatalítico e ao pico de respiração dos frutos climatéricos, ao longo do amadurecimento, alterações neste mecanismo podem fornecer mais informações sobre as fosforilases.

1.5.4. *D-enzyme* plastidial (DPE 1)

A *disproportionating enzyme* (D-enzyme), uma α -1,4-glicanotransferase, atua no amiloplasto das células vegetais participando do processo de degradação do amido, catalisando a transferência de parte da molécula de um glicano para outro. Geralmente, a menor molécula doadora é uma maltotriose e a menor receptora, uma glicose, mas a enzima ainda pode utilizar receptores e doadores bem maiores. Quando os substratos são duas maltotrioses, por exemplo, uma molécula de glicose é liberada e uma maltopentaose é formada (Smith et al, 2005).

Acreditava-se que a DPE 1 estaria também envolvida na síntese do amido, atuando na recuperação de malto-oligossacarídeos produzidos durante a formação das moléculas de amilopectina, ou seja, estes malto-oligossacarídeos seriam reorganizados, voltando a fazer parte da "pré-cadeia" de amilopectina pela ação da DPE 1 (Myers et al, 2001). Critchley et al (2001) estudaram um mutante "knockout" de *Arabidopsis* com uma inserção de T-DNA no gene da DPE 1 e observaram que, embora a atividade da enzima tenha sido drasticamente reduzida, o conteúdo de amido e a estrutura das amilopectinas não foram alterados quando comparados à espécie selvagem, sugerindo que a DPE 1 tenha sua atividade basicamente relacionada à degradação do amido transitório em folhas. O mesmo tipo de estudo também foi feito em batata, e mais uma vez foi visto que a perda da atividade da DPE 1 provocou um acúmulo excessivo de maltose e amido (Lloyd et al, 2004).

Outros estudos recentes mostraram uma forma ativa da DPE 1 no endosperma de trigo em desenvolvimento. A enzima foi localizada no amiloplasto e apresentou a clássica função de uma glicanotransferase, com a habilidade tanto de alongar como a de reduzir o tamanho de maltooligossacarídeos (Bresolin et al, 2006).

1.5.5. *D-enzyme* citossólica (DPE 2)

A DPE citossólica já foi encontrada em folhas de espinafre, ervilha, *Arabidopsis* e batata. Esta enzima já foi considerada como sendo uma mobilizadora de amido, mas sua presença no citossol da célula causou dúvidas em relação a este fato e outros estudos surgiram mostrando sua ação sobre um heteroglicano citossólico apontado como substrato natural desta enzima (Lu e Sharkey, 2006).

A DPE 2 é também uma α -1,4-glicanotransferase, mas atua no citoplasma da célula, convertendo, através de uma reação de transglicosilação, uma molécula de maltose em glicose e transferindo a outra molécula de glicose para um heteroglicano citossólico, recentemente identificado em *Arabidopsis* (Fettke et al, 2006). Quando comparada à mobilidade da DPE 1 em gel nativo contendo glicogênio, a DPE 2 tem uma afinidade muito maior por este substrato, cujo grau de ramificação pode ser comparado ao de um heteroglicano (Chia et al, 2004). Este heteroglicano foi recentemente identificado por Fettke et al (2005 a,b) em batata e em *Arabidopsis* e mostrou ser altamente seletivo em relação as enzimas, ou seja, uma fosforilase plastidial, por exemplo, não teria atividade sobre o heteroglicano, ao contrário da amido fosforilase citossólica.

Especula-se então, que tanto os resíduos de glicanos dos heteroglicanos, assim como maltodextrinas encontradas no citoplasma são substrato/produto da DPE 2 e substrato da PHO 2, isto é, estas duas enzimas atuariam paralelamente no citoplasma das células de tecidos fotossintéticos (Lu e Sharkey, 2004). Os mesmos autores discutem ainda o fato do heteroglicano encontrado no citoplasma poder ter uma função de controle do fluxo de carboidratos, formados pela degradação do amido, no período da noite, em tecidos fotossintéticos.

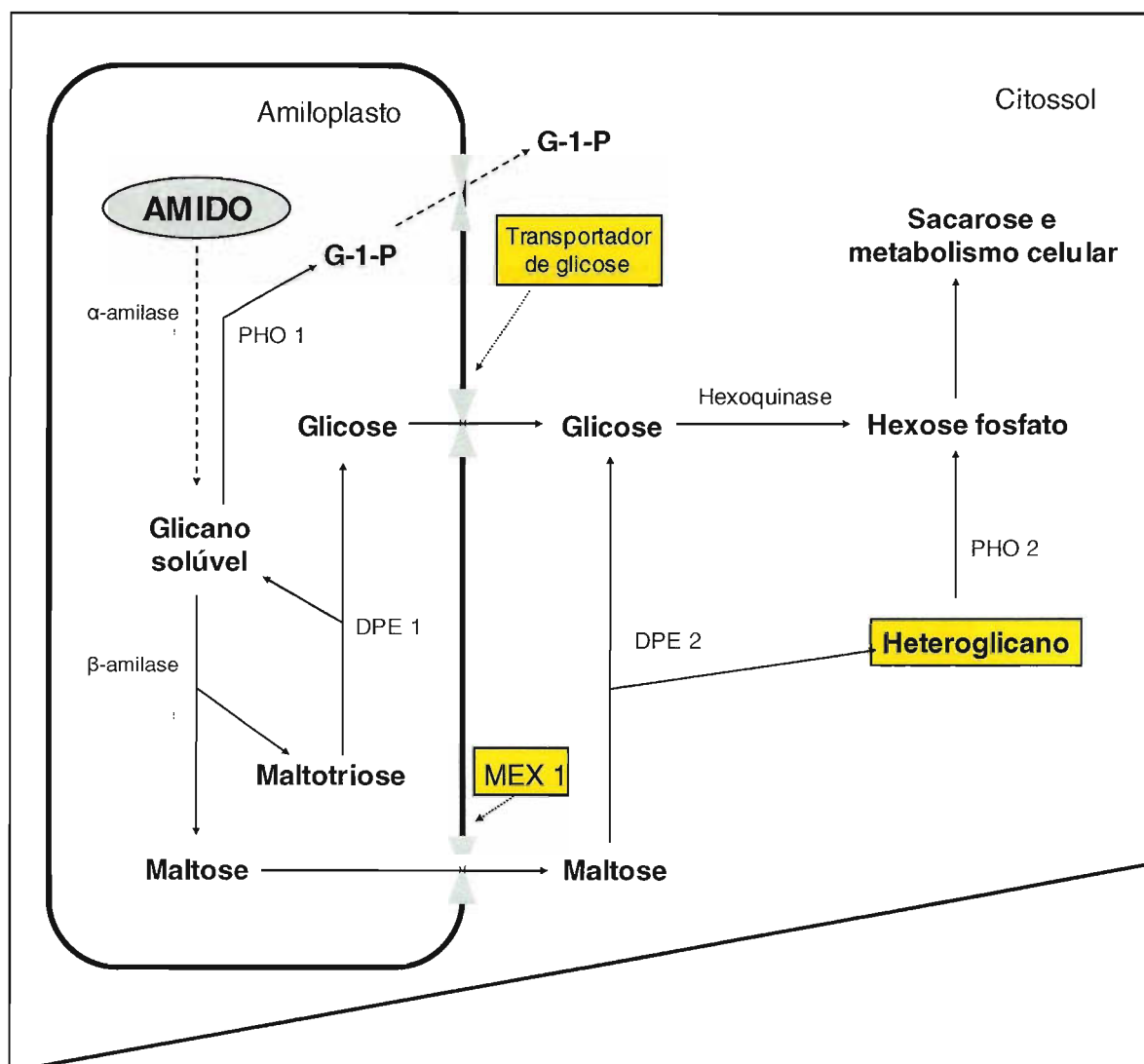
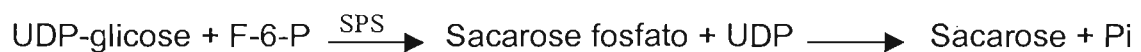


Figura 5: Esquema proposto resumido para a conversão do amido para hexose fosfato em células de banana. DPE1 – transglicosidase plastidial; DPE2 – transglicosidase citossólica; PHO 1 – amido fosforilase plastidial; PHO 2 – amido fosforilase citossólica; MEX 1 – transportador de maltose. OBS.: Os elementos destacados em amarelo ainda não foram encontrados em bananas. Adaptado de Lu e Sharkey (2006).

1.6. Síntese de sacarose

Os produtos finais da degradação do amido são então glicose, frutose e glicose 1-P (G-1-P), assim, pela ação da fosfoglicomutase (PGM) e da hexoquinase (HXK), estes produtos são convertidos em glicose-6-fosfato (G-6-P) e/ou frutose-6-fosfato (F-6-P), os quais serão utilizados em várias vias metabólicas, dentre as quais na síntese da sacarose.

A partir da UDP-glicose e da frutose 6-P, pela ação da sacarose fosfato sintase (SPS – principal enzima atuante na síntese de sacarose em bananas) será formada a sacarose fosfato que, somada à UDP e à ação da sacarose fosfato fosfatase, sintetizará a sacarose e Pi. Este açúcar é o mais abundante em bananas (Dey e Dixor, 1985).



Em 1995, Cordenunsi e Lajolo demonstraram que em bananas a SPS exerce grande papel na síntese de sacarose e que sua atividade parece ser mantida durante todo o amadurecimento. Durante este processo existe uma forte correlação entre o aumento da transcrição dos genes da SPS com o aumento na síntese de proteínas e da sua atividade em bananas (Nascimento et al, 1997).

Como o etileno parece adiantar alguns eventos, como a degradação do amido, como consequência, bananas tratadas com este hormônio têm a formação de açúcares solúveis acelerada, como observado por Cordenunsi (2004).

1.7. Etileno e a degradação do amido no amadurecimento

Embora a mobilização do amido e sua conversão em açúcares venham sendo estudadas há vários anos, não só em frutos, mas também em outros tecidos vegetais, os sinais metabólicos ou hormonais capazes de influenciar tal metabolismo, assim como os mecanismos pelos quais atuam, ainda não foram esclarecidos.

Sabe-se que o processo de amadurecimento, envolvendo o desenvolvimento da cor, do sabor, do aroma e da textura do fruto, está intimamente associado a hormônios e, dentre eles, o etileno. Análises mais aprofundadas em relação a este fato tornaram-se possíveis devido à descoberta de novas ferramentas, como plantas transgênicas com reduzida produção de etileno, antagonistas, como o 1-MCP e mutantes, como é o caso do tomate *Nr* (never ripe) (Lelievre et al, 1997). No entanto, a relação deste hormônio com o processo de amadurecimento geralmente aborda ensaios envolvendo parâmetros como firmeza, perda de clorofila, formação de compostos voláteis. Porém, ensaios que relacionam a degradação do amido, as enzimas envolvidas neste processo e o etileno ainda são poucos. Em abacates, por exemplo, o tratamento com etileno exógeno acelerou o processo de degradação do amido, pois o hormônio provocou aumento na atividade amilolítica total (Pesis et al, 1978). Em kiwis, Wegrzyn e Macrae (1995), também observaram seu amadurecimento adiantado quando submetidos ao tratamento com etileno exógeno. Neste caso, a atividade amilolítica pós-colheita manteve níveis semelhantes àqueles medidos ao longo do desenvolvimento do fruto e teve um decréscimo assim que a degradação do amido iniciou-se.

Ao receber etileno exógeno, bananas amadurecem muito mais rapidamente (Cordenunsi, 2004, Nascimento et al, 2006; Mainardi et al, 2006, Vieira Jr., 2006) e a atividade de muitas enzimas, relacionadas ao amadurecimento, é alterada.

Desta forma, o bloqueio do sítio de ligação do etileno, empregando seu antagonista 1-MCP, pode trazer maiores informações sobre a relação entre o hormônio do amadurecimento e as enzimas relacionadas à degradação do amido. Este estudo permitiria estabelecer quais enzimas são dependentes do etileno e como são reguladas, acrescentando maiores informações a estudos anteriores sobre a extensão da influência do etileno em um dos metabolismos que contribui de maneira significativa para o desenvolvimento do sabor doce na banana, importante parâmetro para a aceitação deste fruto para o consumo.

2. OBJETIVOS

Analisar os efeitos do 1-metilciclopropeno (1-MCP), um antagonista do etileno, sobre a degradação do amido de banana e, desta forma, entender que tipo de regulação o hormônio exerce sobre enzimas relacionadas a este metabolismo.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Frutos

Cerca de 8 pencas (~12 frutos/penca) de bananas (*Musa acuminata* AAA cv. Nanicão) pré-climatéricas com aproximadamente 110 dias pós-antese e 1 dia pós-colheita, foram obtidas junto ao CEAGESP – SP e higienizadas com solução de hipoclorito 1% e selecionadas de acordo com a similaridade de tamanho (~18 cm de comprimento e 6 cm de diâmetro na porção central) e pela ausência de injúrias. Em dessecadores de 6 litros (8-10 frutos por dessecador – teste realizado em quadruplicata) as amostras receberam os seguintes tratamentos: 100 nL.L⁻¹ de 1-MCP (EthyBlock®, Floralife, Burr Ridge, Illinois) por um período de 12 horas ou 100 ppm de etileno por 5 horas (7 L.min⁻¹) e uma terceira parte das amostras foi mantida como controle (sem tratamento). Os frutos (aprox. 150 g/fruto) foram armazenados em câmaras B.O.D. com temperatura (20°C ± 1 °C) e umidade (75% ± 5%) controladas. Os frutos foram amostrados ao longo do amadurecimento, descascados, picados e congelados em N₂ líquido e armazenados a -80 °C.

3.2. Medidas de respiração e etileno

Os perfis de respiração (estimada pela produção de CO₂) e de produção de etileno foram obtidos por meio de cromatografia à gás utilizando detector de condutividade térmica (CO₂) e detector de ionização de chama (etileno). Três

frutos foram condicionados em potes de vidro herméticos e após 1 hora as amostras de gás foram removidas utilizando uma seringa *gás tight*. Em ambas análises foi empregado o cromatógrafo HP-6890 com coluna HP-Plot Q (30 m, D.I. 0,53 mm). A estimativa da quantidade de CO₂ foi feita em relação à curva obtida com padrão de CO₂ em ar sintético da Air Liquid. Para a análise de etileno foi utilizada curva obtida com padrão de etileno em ar sintético da mesma empresa.

3.3. Determinação de amido

O teor de amido foi determinado enzimaticamente pelo método descrito por Cordenunsi e Lajolo (1995). O amido foi extraído com hidróxido de sódio 0,5 N, neutralizado com ácido acético 0,5 N, precipitado com etanol 80%, hidrolisado com amiloglicosidase (14 unidades/mL) e a glicose liberada determinada a 450 nm pelo sistema glicose oxidase/peroxidase/ABTS, segundo método de Bergmeyer e Bernt (1974). O cálculo foi baseado em curva-padrão de glicose.

3.4. Determinação de açúcares solúveis

Os açúcares solúveis (glicose, frutose, maltose e sacarose) foram extraídos com etanol 80% a 70 °C por três vezes, os sobrenadantes foram combinados, o etanol evaporado em sistema a vácuo (*speed vac*) a 45 °C e o volume reconstituído em água. Os açúcares solúveis foram determinados por HPLC-PAD, utilizando cromatógrafo Dionex DX-500 com coluna Carbopac PA-1 (250 x 4,0 mm) e detector amperométrico de pulso modelo ED 40. Para a determinação de glicose, frutose e

sacarose, a fase móvel empregada foi NaOH 18 mM com fluxo de 1,0 mL/min e a limpeza foi feita com NaOH 300 mM.

No caso da maltose, foram utilizadas 2 soluções (fase móvel – fluxo de 1,0 mL/min), para gradiente de eluição. O eluente A foi 150 mM de NaOH e o eluente B 500 mM de acetato de sódio em 150 mM de NaOH. O tempo total de corrida para cada amostra foi de 70 minutos, começando com 95% de A e 5% de B por 8 minutos; 90% de A e 10% de B até 20 minutos; 80% de A e 20% de B até 40 minutos; 30% de A e 70% de B até 50 minutos. A coluna foi lavada com 100% do eluente B e equilibrada com a solução inicial.

3.5. Determinação de proteínas

As determinações de proteína foram feitas pelo método de Bradford (1976), a 595 nm, usando albumina de soro bovino como padrão.

3.6. Extração das enzimas

Para a atividade de α -amilase e β -amilase, as polpas de bananas congeladas (-80 °C) foram trituradas, na presença de N₂, líquido em gral de porcelana. Aproximadamente 0,25 g de amostra foi homogeneizada com 4,0 mL de solução extratora contendo HEPES-KOH 50 mM pH 7,0, contendo cisteína 20 mM, benzamidina 1 mM, polivinilpirrolidona 40000 (PVP 40) 1% (m/v). Para a atividade da β -amilase ainda foram adicionados 20 mM de EDTA na solução extratora.

A solução extratora utilizada para a obtenção dos extratos para as atividades da amido fosforilase, DPE 1 e DPE 2 compreendia os mesmos reagentes descritos

acima, exceto pelo tampão Hepes-KOH 50 mM cujo pH foi 7,5 e pela adição de EDTA 20 mM.

Os extratos obtidos, após a homogeneização, para cada uma destas extrações, foram centrifugados a 12000 x *g* por 15 minutos e os sobrenadantes recolhidos e utilizados nos ensaios de atividades.

3.7. Atividade enzimática

A atividade α -amilásica foi medida utilizando o reagente Ceralpha (Megazyme International Ireland, Ltd) composto pelo substrato *p*-nitrofenil-maltoheptaosídeo, bloqueado na extremidade não-redutora (BPNPG7-EPS), e α -glicosidase. Após incubação a 30 °C, por 60 minutos, de 50 μ L do extrato enzimático com 50 μ L do reagente, a reação foi interrompida com a adição de 750 μ L de Tris 1%. A absorbância do *p*-nitrofenol liberado foi lida a 410 nm em espectrofotômetro Hewlett-Packard modelo 8453 (UV- visível) e sua concentração determinada com base em curva-padrão de *p*-nitrofenol

A atividade β -amilásica foi avaliada da mesma forma, no entanto, o substrato utilizado foi o reagente Betamyl (Megazyme International Ireland, Ltd), composto pelo substrato *p*-nitrofenil-maltopentaosídeo e o tempo de reação foi de 30 minutos.

Para a enzima amido fosforilase, a atividade foi medida no sentido de degradação do amido pela liberação de glicose-1-fosfato a partir de amido solúvel de batata a 2% em água, conforme descrito por Arêas e Lajolo (1981). O meio de reação (500 μ L) constituiu-se de 50 μ L de extrato enzimático, tampão Tris-maleato 50 mM pH 7,5, NaF 50 mM, amido 2% (m/v), Na₂HPO₄ 500 mM. Após incubação a 30 °C, por 45 minutos, a reação foi interrompida por incubação em banho fervente

por 5 minutos. A glicose-1-fosfato formada foi medida enzimaticamente após a sua conversão em glicose-6-fosfato, pela fosfoglicomutase (Sigma), seguida da formação de glucuronídeo mais NADPH pela glicose-6-fosfato desidrogenase (Sigma). A concentração de NADPH foi medida pela leitura de absorvância a 340 nm em espectrofotômetro HP 8453 (Mota et al, 2002). Pela estequiometria das reações, cada molécula de NADPH formada é originada de uma molécula de glicose-1-fosfato (Bergmeyer e Bernt, 1974).

3.8. PAGE nativo

Géis para fosforilase: os géis de separação, para este ensaio, continham 6% de acrilamida/ bis-acrilamida (30:0,8), 375 mM de Tris-HCl pH 8,8 e 0,4% (p/v) de glicogênio de ostra; os géis de empilhamento foram compostos por 3,75% de acrilamida/ bis-acrilamida e 62,5 mM de Tris-HCl pH 6,8. Após a eletroforese (15 mA/gel – 4 °C), os géis foram lavados, durante 15 minutos, com 40 mL de uma solução de citrato-NaOH 100 mM pH 6,0 e então foram incubados por 1 hora à 37 °C em 40 mL deste mesmo meio adicionado de 0,05% de amido solúvel de batata e glicose-1-fosfato 20 mM. Após a incubação os géis foram novamente lavados com a solução de citrato-NaOH e por fim foram corados com I₂ 0,67% (p/v) + KI 3,33% (p/v).

Géis para DPE 1 e DPE 2: os géis de separação, para estes ensaios, continham 7,5% de acrilamida/ bis-acrilamida (30:0,8), 375 mM de Tris-HCl pH 8,8 e 1,0% (p/v) de glicogênio de ostra; os géis de empilhamento foram compostos por 3,75% de acrilamida/ bis-acrilamida e 62,5 mM de Tris-HCl. Após a eletroforese (15 mA/gel – 4 °C), os géis foram lavados duas vezes, durante 15 minutos, com 40 mL

de uma solução contendo Tris 100 mM pH 7,0, MgCl₂ 1mM, EDTA 1 mM e DTT 1 mM , e então foram incubados por 2 horas à 37 °C ou por 16 horas à 25 °C em 40 mL deste mesmo meio adicionado de maltotriose 5mM (para DPE 1) ou maltose 5mM (para DPE2) . Os géis foram corados com I₂ 0,67% (p/v) + KI 3,33% (p/v).

3.9. Extração de RNA total, *Northern blotting* e hibridização

Cerca de 3 gramas de polpa de banana, em diferentes estádios de amadurecimento, foram triturados em gral, na presença de nitrogênio líquido e os RNAs totais das polpas dos frutos controle, assim como dos frutos tratados com etileno e com 1-MCP foram obtidos conforme descrito por López-Gómez e Gómez-Lim (1992) e separados em gel de agarose 1% contendo formaldeído conforme descrito por Sambrook et al. (1989). Foram aplicados 10 µg de RNA total de cada amostra no gel. Após o fracionamento, os RNAs totais e os padrões de RNA (Sigma) foram transferidos à vácuo para membranas de nylon (Hybond N+; Amersham Biosciences) e visualizados pela coloração com azul de metileno. As membranas que não mostraram diferenças no carregamento dos poços foram submetidas à hibridização. Para o preparo de sondas de cDNA foram utilizados os insertos de α-amilase (Vieira Jr 2001), β-amilase (Nascimento et al, 2006) e fosforilase (obtido como descrito no item *obtenção dos fragmentos para a fosforilase e sequenciamento*), isolados por restrição dos respectivos vetores, separados em gel de agarose e purificados usando o sistema de purificação Prep-a-Gene (BioRad). As sondas de cDNA foram marcadas com ³²P utilizando o Ready-To-Go Labeling Kit (Amersham Biosciences), hibridizadas à 65 °C por 4 horas em solução contendo SSPE 5x, solução de Denhardt's 5x e SDS 0,5% (p/v) , lavadas e expostas a filmes

de raios X à $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Sambrook et al. 1989). As membranas foram lavadas, entre uma hibridização e outra, conforme as instruções do fabricante.

3.10. Extração de proteína total

Cerca de 0,5 g de polpa de banana (em diferentes estádios de amadurecimento) triturada em nitrogênio líquido, foi homogeneizada em 1,5 mL de meio extrator, composto por tampão Tris-HCl 62,5 mM (pH 6,8), SDS 2% e β -mercaptoetanol 5%, segundo Laemmli (1970). O homogenato foi fervido por 10 minutos e centrifugado a 12000 x g por 30 minutos.

A quantificação das proteínas foi feita pelo método de Lowry et al (1951), modificado por Peterson (1977) e as proteínas foram separadas por SDS-PAGE [gel de poliacrilamida (10%) em tampão Tris 25 mM, glicina 192 mM (pH 8,3) e SDS 0,1%].

3.11. Western Blotting

As proteínas fracionadas nos géis foram transferidas para membranas de nitrocelulose em tampão Tris 25 mM, glicina 192 mM (pH 8,3) à voltagem constante (30 V) por pelo menos 16 h a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. As membranas foram coradas com Ponceau-S 0,2% / TCA 3%, para verificar a eficiência da transferência e marcação das posições dos padrões de peso molecular (Sigma).

As membranas foram bloqueadas por incubação, durante uma hora, em tampão TBS (Tris-HCl 50 mM pH 7,5, NaCl 150 mM), adicionado de 0,02% de Tween 20 (TTBS) e leite desnatado 5%. Após o bloqueio, elas foram incubadas no

mesmo tampão, por 2 horas, adicionado com anti-soros de coelho específicos contra fosforilase (Mota, 2001), β -amilase (Nascimento et al, 2006) e α -amilase (Vieira Jr 2001), nas diluições 1:500 (para fosforilase) e 1:100 (para β -amilase e α -amilase). Em seguida as membranas foram lavadas por três vezes em tampão TBS e incubadas por mais 1 hora com anticorpo secundário antiimunoglobulinas de coelho, conjugado com fosfatase alcalina ou com peroxidase (HP), em TTBS contendo leite desnatado 5%, na diluição 1:30000 (fosfatase alcalina) ou 1:8000 (HP). Em seguida, foram novamente lavadas por três vezes em tampão TBS. As membranas foram reveladas segundo o método descrito por Sambrook et al (1989) utilizando substrato cromogênico (BCIP e NBT) ou via detecção por quimiluminescência usando luminol (ECL Western Blotting Detection Reaction Reagents and Analysis System, Amersham Bioscience).

3.12. Obtenção dos fragmentos para a fosforilase e sequenciamento

O fragmento de PHO1 utilizado como molde para a sonda de DNA foi obtido através da técnica de RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends), usando o GeneRacer™ Kit (Invitrogen, Inc). A sequência utilizada para o desenho dos primers específicos utilizados na reação foi obtida a partir de um fragmento de 358 pb (Purgatto et al, dados não publicados) isolados por painel cDNA-Amplified Fragment Length Polymorphism (cDNA-AFLP).

Os cDNAs da polpa da banana foram obtidos usando o *First Strand cDNA Synthesis Kit* (Amersham Biosciences). As reações de RACE foram conduzidas em termociclador (Bio-Rad) e a sequência usada no protocolo foi 5'-CAA AAC AAA TGG TGT GAC TCC TCG CCG C-3' (sentido sense) e 5'-GCT TTT TCA TCC AGG AGC

ACA CCA GAA G-3' (sentido reverso). Os fragmentos gerados foram visualizados em gel de agarose (Sambrook et al, 1989).

Os fragmentos foram recortados do gel, purificados usando o *GFXTM PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (Amersham Biosciences) e clonados usando pGEM^R-T Vector Systems (Promega).

As colônias transformadas foram transferidas para tubos contendo meio LB-ampicilina, incubadas por 16 horas a 37 °C e o plasmídeo obtido foi purificado usando o *GFX Micro Plasmid Prep Kit* (Amersham Biosciences). Os fragmentos foram sequenciados de acordo com o protocolo descrito pelo *Thermo Sequenase Cy5 Dye Terminator Cycle Sequencing Kit* e pelo *ReproGelTM Long Read*, ambos da Amersham Biosciences. As reações de eletroforese foram conduzidas a 55 °C por 750 minutos no equipamento *ALF Express* (Amersham Pharmacia Biotech) e as seqüências foram analisadas através do aplicativo Blastx disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Um fragmento de 1256 pb (número de acesso AY463025), correspondente ao terminal-3', foi obtido com 80% de similaridade com uma outra α -1,4 glucano fosforilase de arroz. Este fragmento foi usado como molde para gerar sondas radioativas para o protocolo de hibridização e Northern. Não foi possível obter o fragmento correspondente ao terminal-5'.

3.13. Análise de AIA (ácido indol-3-acético) livre e ABA (ácido abscísico)

O método empregado para extração e purificação parcial do AIA livre e do ABA das polpas de bananas foi o descrito por Chen et al (1998).

Aproximadamente 0,5 g de polpa de banana, em diferentes estádios de amadurecimento, foi homogeneizada por 1 minuto em 2 mL de solução contendo

65% de isopropanol em tampão imidazol 0,2 M, pH 7,0, 1,14 µg de padrão interno de [¹³C₆]-AIA (Cambridge Isotopes, Inc) e 1 µg de padrão interno de ABA (OIChemIm Ltd). O homogenato foi centrifugado a 1200 x g por 15 minutos e o sobrenadante coletado foi diluído 6 vezes. Em coluna de troca iônica aminopropil (LC-NH₂; Supelco), previamente lavada com hexano, acetonitrila e água ultrapurificada e condicionada com tampão imidazol 0,2 M, pH 7,0, a amostra diluída foi aplicada. Após lavagens sucessivas com hexano, acetato de etila, acetonitrila e metanol, a fração contendo o AIA e o ABA foi eluída com ácido acético a 2% em metanol, seca em *speed vac*, retomada em metanol e metilada com diazometano etéreo. O extrato metilado foi submetido a análise por cromatografia à gás-espectrometria de massa com monitoramento seletivo de íons (CG-EM-MSI).

Estas análises foram realizadas em cromatógrafo a gás Hewlett-Packard modelo 6890 acoplado a detetor por espectrometria de massa modelo 5973. A coluna utilizada nas separações foi a HP-1701 (30 m, D.I. 0,25 mm, 0,50 µm de espessura do filme interno) tendo hélio como gás carreador, com fluxo de 1 mL/min. As injeções foram feitas automaticamente por meio do injetor Hewlett-Packard modelo LS-1100 e o volume injetado foi 3 µL, sem utilização do divisor de amostras (*splitless*). A coluna foi mantida a 150 °C por 3 minutos, seguida de rampa de temperatura de 5 °C/min até 210 °C e 15 °C/min até 260 °C. Foram monitorados os íons com relação massa/carga (*m/z*) em 130 e 189 (correspondentes ao AIA endógeno); 136 e 195 (correspondentes ao padrão interno de [¹³C₆]-AIA); 134, 162, 190 (correspondentes ao ABA endógeno) e 138, 166 e 194 (referentes ao padrão interno de ABA). As concentrações endógenas

de AIA e de ABA foram obtidas pela relação entre as áreas dos picos nos cromatogramas extraídos em m/z 130 e 136 para o AIA e 190 e 194 para o ABA.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Efeitos do etileno e do 1-MCP sobre o pico climatérico

O amadurecimento da banana foi claramente afetado pelos tratamentos (figura 6). Quando comparado ao grupo controle, o pico climatérico dos frutos expostos ao etileno exógeno foi antecipado, enquanto que as amostras tratadas com 1-MCP não apresentaram um pico climatérico característico, apesar de um pico de etileno poder ser observado aos 24 dias pós-colheita.

As frutas que foram expostas ao etileno exógeno iniciaram a fase climatérica no dia 2, após o tratamento, enquanto as amostras controle levaram 12 dias para apresentar o característico aumento na produção de etileno e na taxa respiratória (figura 6). No caso dos frutos tratados com 1-MCP foi observada pouca alteração no padrão respiratório, como já observado em outros estudos realizados com damasco (Fan et al, 2000), brócolis (Fan e Mattheis, 2000), tomate (Wills e Ku, 2002) e maçã (Fan e Mattheis, 1999), porém com alterações significativas na produção de etileno, atrasada por aproximadamente 10 dias em relação aos frutos controle. Normalmente, a produção de etileno na banana precede o aumento respiratório, como pôde ser observado nas outras amostras.

Já é bem descrito pela literatura o efeito que o hormônio etileno exerce sobre o amadurecimento de frutos, seja ele produzido pelo próprio fruto ou aplicado de forma exógena (Cordenunsi, 2004; Nascimento et al, 2006; Mainardi et al, 2006). Em frutos como a banana, o pico na produção de etileno tende a anteceder o pico de respiração, o que a caracteriza como um fruto climatérico.

Paralelamente, quando o antagonista do etileno, o 1-MCP, é aplicado no estágio pré-climatérico das bananas, a influência do etileno sobre o processo de amadurecimento é atrasada, assim como a respiração climatérica (Golding et al, 1998).

O uso do etileno exógeno assim como do 1-MCP, resultou em grupos distintos de frutos. Como esperado, o tratamento com etileno antecipou os eventos relacionados ao amadurecimento, enquanto o 1-MCP os atrasou, sugerindo que o antagonista inibe a percepção do etileno pelos frutos, devido ao bloqueio de seus receptores (Sisler e Serek, 1997).

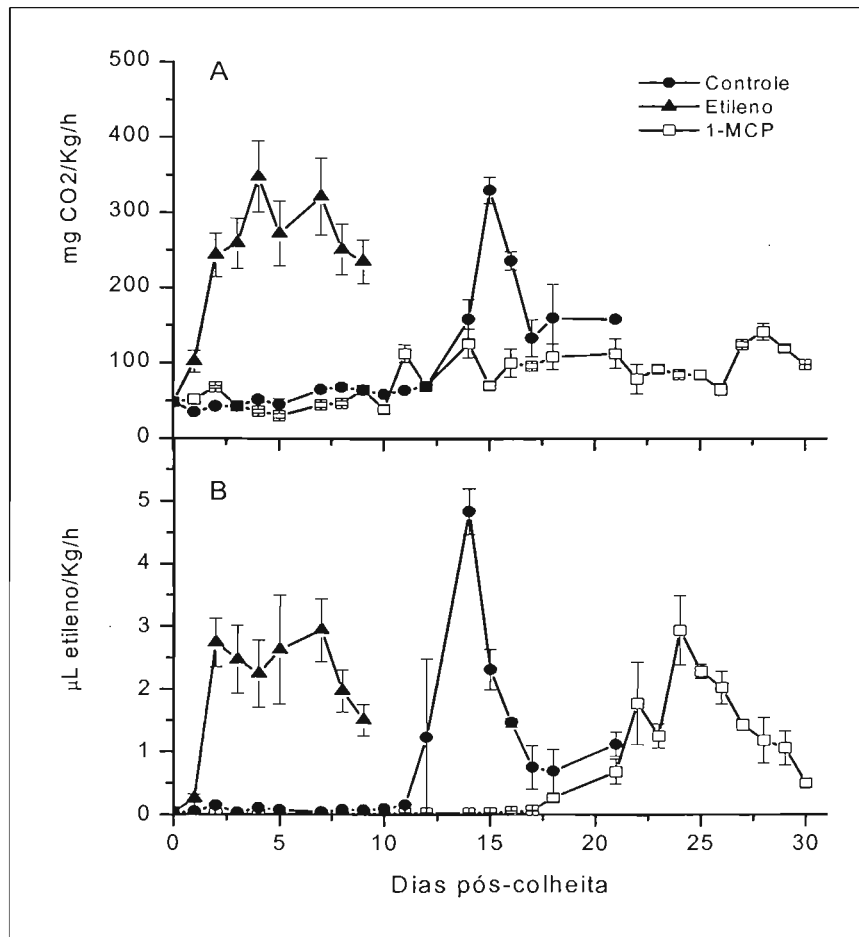


FIGURA 6: Produção de CO₂ (A) e etileno (B) pelos frutos nos diferentes tratamentos.

4.2. Efeitos do etileno e do 1-MCP sobre a degradação de amido e síntese de sacarose

A degradação do amido também foi afetada pelos tratamentos uma vez que a velocidade de degradação das bananas expostas ao etileno exógeno foi acelerada em relação àquelas tratadas com 1-MCP (figura 7). A degradação do amido nos frutos tratados com etileno foi antecipada em relação aos frutos controle, no entanto, a taxa de mobilização foi similar para ambos os grupos. No caso das bananas tratadas com 1-MCP, a quantidade residual de amido foi similar a dos frutos controle, mas a taxa de degradação foi menor. Embora a degradação do amido tenha sido iniciada por volta do mesmo dia que das amostras controle (dia 14), o conteúdo final de amido nos frutos tratados com 1-MCP foi atingido somente no dia 28.

Ainda de acordo com a figura 7, os mesmos efeitos puderam ser observados em relação à síntese de sacarose, frutose e glicose, ou seja, enquanto o etileno adianta o início da síntese, o 1-MCP a retarda, mas em todos os casos ela inicia-se concomitantemente ao início da degradação do amido, indicando e corroborando resultados reportados na literatura (Purgatto et al. 2001) que o efeito está mais correlacionado a uma limitação de substrato para a síntese do açúcar do que propriamente a uma inibição de alguma enzima da via de síntese da sacarose. Para o caso do conteúdo de sacarose, as bananas tratadas com 1-MCP não atingiram os mesmos níveis quando comparadas as bananas do grupo controle e daquelas tratadas com etileno.

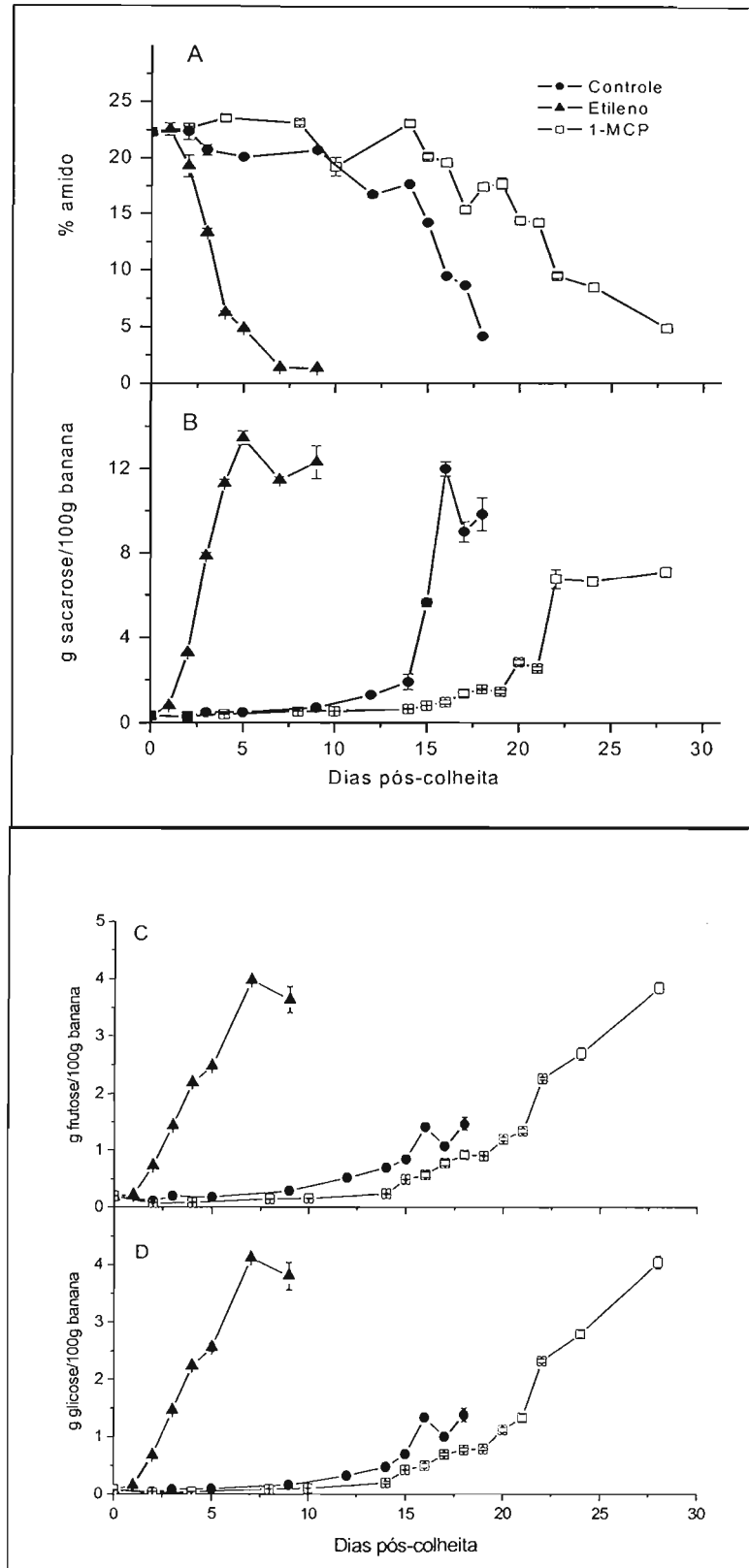


FIGURA 7: Degradação do amido (A), síntese de sacarose (B), de frutose (C) e glicose (D) ao longo do amadurecimento dos frutos nos diferentes tratamentos.

4.3. Influência do etileno sobre enzimas relacionadas à degradação do amido

4.3.1. α -amilases

A atividade α -amilásica chega a aumentar cerca de 50% para os frutos controle e para aqueles tratados com 1-MCP; já os tratados com etileno têm um aumento pouco maior (figura 8A, 8B e 8C). Estes dados sugerem que a atividade destas enzimas independe do etileno e/ou que se tratam de isoenzimas, onde algumas formas podem ser etileno-dependentes, enquanto outras não.

Os resultados de Western blotting mostrados nas figuras 8D, 8E e 8F, também não mostram variações de expressão das α -amilases claramente correlacionadas com o climatério, como já mostrado anteriormente por Vieira Jr. (2001 e 2006). Embora a atividade apresentada nos frutos controle e 1-MCP pareçam semelhantes, a síntese protéica parece menor nos frutos tratados com 1-MCP, ou seja, a quantidade de proteínas varia muito de tratamento para tratamento e não parecem se relacionar com os perfis de atividade. Talvez sua sutil atividade seja suficiente para atacar inicialmente o grânulo, permitindo o acesso de outras enzimas ou ainda que esta enzima não seja tão importante para a degradação do amido de bananas, e, como em *Arabidopsis*, uma outra enzima, ainda não descrita em bananas, poderia realizar melhor o papel de ataque inicial ao grânulo. Ainda existe a hipótese de existirem isoformas, como apontam os resultados obtidos por Vieira Jr (2006) que, embora não tenha conseguido determinar o número exato de cópias do gene de α -amilase no genoma da banana, indicou que há mais de uma, conforme seus resultados obtidos por Southern blotting.

Alguns estudos em cereais (Irving, 1999), mostram que as α -amilases são proteínas de atividade endo-amilolítica e que seriam as primeiras a atacarem os grânulos intactos de amido. Tal hipótese também poderia ser aplicada em bananas nos primeiros passos da degradação, considerando que os níveis de atividade são suficientes para tal tarefa e que após o ataque inicial, outras enzimas como as β -amilases, fosforilases e DPE-1 entrariam em ação. Por outro lado, já foi descrito por Smith et al (2005) que em tecidos fotossintéticos, como é o caso da *Arabidopsis*, as α -amilases não são necessárias para que haja degradação do amido, ou pelo menos nenhuma das 3 isoformas encontradas em *Arabidopsis*. Sendo assim, é sugerido que, ou existe uma isoforma ainda não encontrada, ou sua ausência pode ser compensada pela ação de outra enzima.

A presença de isoformas também foi notada no trabalho de Bassinello (2002), que utilizou diversas técnicas envolvendo cromatografia, eletroforese e isoeletrofocalização para purificar α -amilases. Em especial, a isoeletrofocalização mostrou a presença de várias bandas de proteínas com atividade α -amilásica e diferentes pontos isoelétricos.

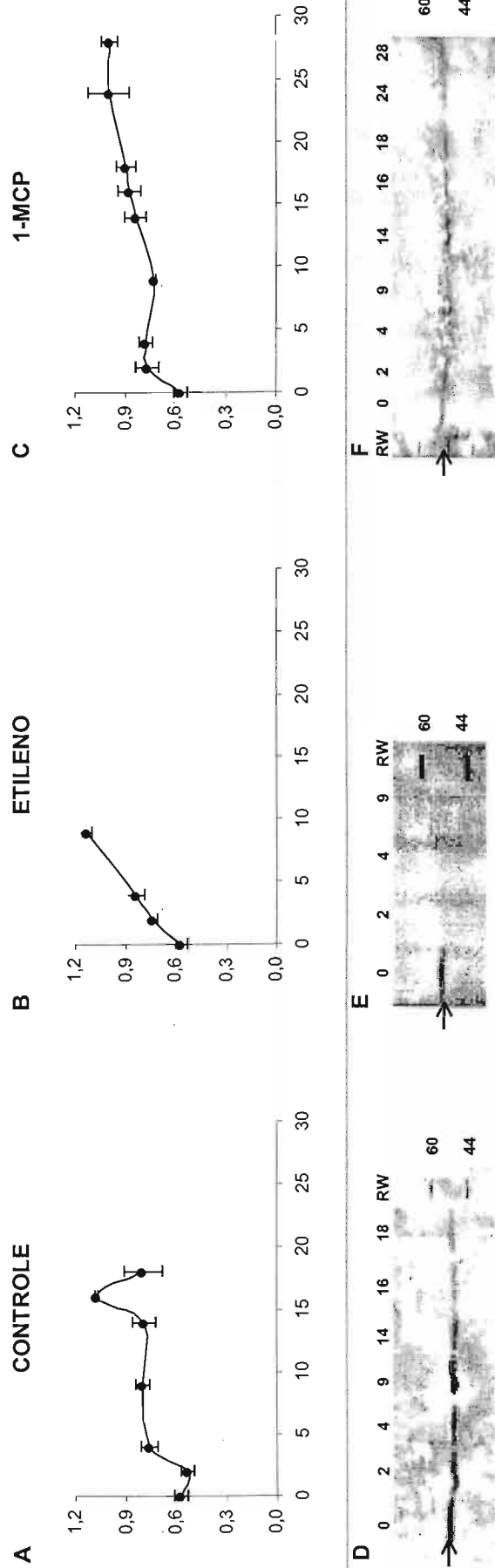


Figura 8: 1ª Linha: Atividade enzimática de α -amilase ($\mu\text{mol p-nitr./mg proteína/h}$) durante o amadurecimento dos frutos controle (A), tratados com etileno (B) e tratados com 1-MCP (C). 2ª Linha: *Western blotting* anti- α -amilase contra 100 μg de proteínas de polpa da fruta controle (D), tratadas com etileno (E) e 1-MCP (F). RW: padrão de pesos moleculares RAINBOW em kDa. A seta indica a posição onde era esperada a banda de proteína reativa ao anti-soro. Os números das amostras se referem aos dias pós-colheita.

4.3.2. β -amilases

Os resultados mostram que a atividade das β -amilases foi inversamente relacionada ao teor de amido na polpa dos frutos controle e tratados com etileno (figura 9A e 9B). Embora tenha ocorrido um decréscimo no conteúdo de amido, a atividade das β -amilases mostrou-se praticamente constante, quando os frutos eram tratados com o 1-metilciclopropeno (figura 9C), sugerindo que elas possam ser parcialmente dependentes do etileno ou que possa ter ocorrido um atraso na transcrição e/ou tradução das mesmas. O fato de o amido ainda assim ter sido degradado nos frutos tratados com 1-MCP, chegando aos níveis dos frutos controle, pode estar relacionado à presença de outras enzimas atuantes no processo, como as amido-fosforilases.

Os ensaios de Northern blots, mostraram o nível de transcrição do mRNA da β -amilase ao longo do amadurecimento dos frutos, sob os diferentes tratamentos (figura 9). Um significativo aumento na expressão desta proteína foi observado no decorrer do amadurecimento e ainda houve diferença significativa entre os três tratamentos. Os frutos controle (figura 9G) apresentaram um aumento na quantidade de transcritos a partir do dia 9, intensificando-se no dia 16, enquanto que nos frutos tratados com etileno (figura 9H) os maiores níveis de transcrição foram notados no dia 2, e em ambos os grupos, a atividade enzimática mostrou-se bastante correlacionada aos níveis de transcritos. Por outro lado, o acúmulo de transcritos nos frutos que receberam tratamento com 1-MCP (figura 9I) foi atrasado até o dia 24, mas não resultou em nenhuma mudança na atividade enzimática.

Como também apresentado na figura 9, o conteúdo de proteínas também foi afetado pelos diferentes tratamentos. Enquanto uma banda de aproximadamente 52

kDa aparece abundante no dia 16 para os frutos controle e no dia 2 para os tratados com etileno, nada pôde ser visto nos extratos de bananas tratadas com 1-MCP. Isto pode sugerir que tanto a transcrição, como a tradução são mediadas pelo etileno, porém são diferentemente afetadas. Pode-se ainda considerar que a proteína ainda seria traduzida nos frutos tratados com 1-MCP, pois houve um aumento na transcrição, mas não havia condições para continuar a coleta dos frutos por estarem em estado muito avançado de senescência.

O uso do agonista e do antagonista do amadurecimento de frutos permitiu que Nascimento et al (2006) pudessem agregar maiores informações sobre a regulação da expressão da β -amilase em bananas. A atividade enzimática mostrou correlação direta com variações na expressão gênica e, a ausência da proteína (β -amilase) nos frutos tratados com 1-MCP, reforçou a hipótese desta enzima ser regulada pelo etileno. No entanto, houve uma recuperação na produção de etileno pelos frutos tratados com 1-MCP, mas não houve aumento na atividade enzimática e, neste caso, o etileno pode ter diferente ação sobre os níveis de transcrição e tradução, processos estes ainda não esclarecidos.

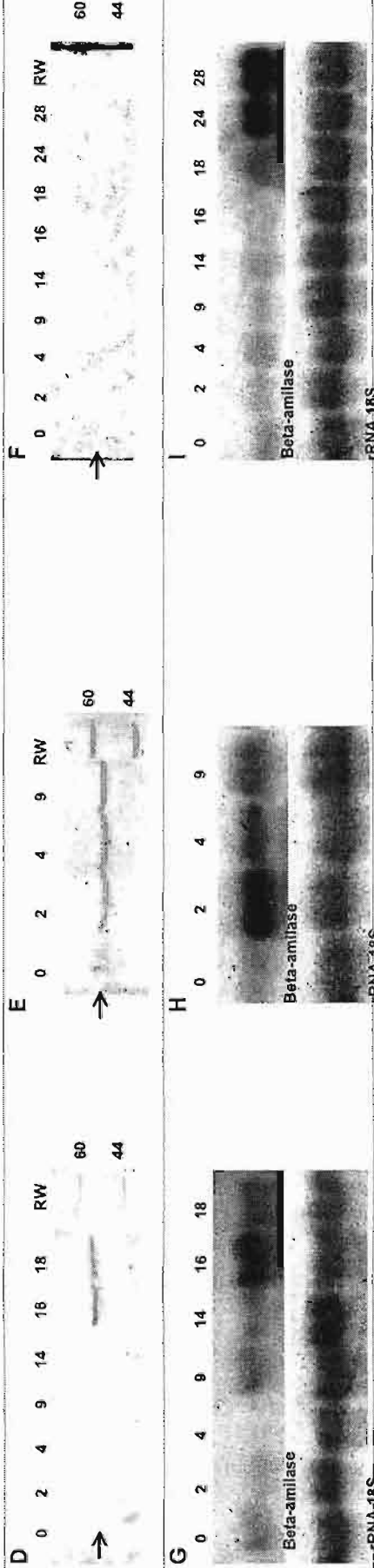
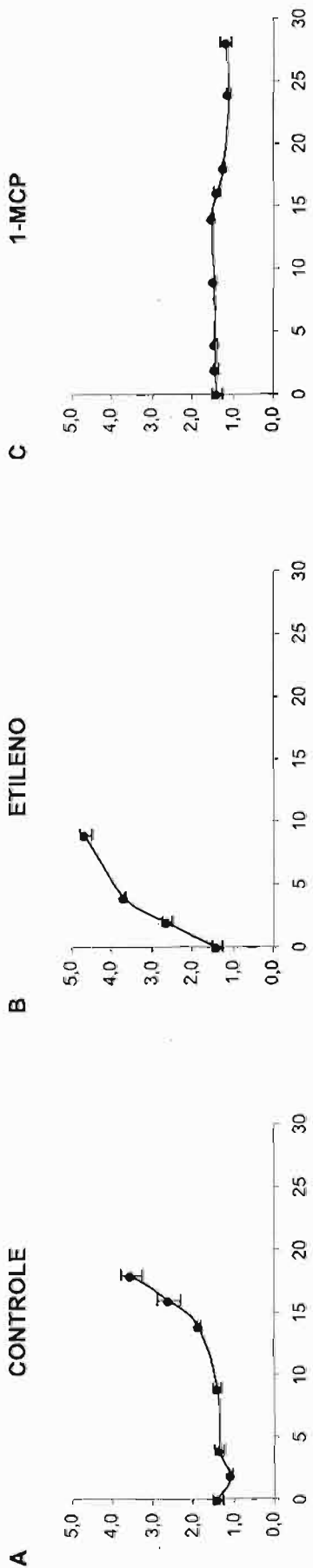


Figura 9: 1ª Linha: Atividade enzimática de β -amilase ($\mu\text{mol p-nitr./mg proteina/h}$) durante o amadurecimento dos frutos controle (A), tratados com etileno (B) e tratados com 1-MCP (C). 2ª Linha: Western blotting anti- β -amilase contra 50 μg de proteínas de polpa da fruta controle (D), tratada com etileno (E) e 1-MCP (F). RW: padrão de pesos moleculares RAINBOW em kDa. A seta indica a posição onde era esperada a banda de proteína reativa ao anti-soro. 3ª Linha: Northern blotting de β -amilase a partir do mRNA das polpas de frutos controle (G), etileno (H) e 1-MCP (I); a expressão do mRNA ribossomal 18S foi utilizada como controle. Os números das amostras se referem aos dias pós-colheita.

4.3.3. Fosforilases

Com o aumento da concentração de etileno, a atividade da fosforilase (figura 10) diminuiu. Nos frutos tratados com 1-MCP a redução também aconteceu, mas a atividade mostrou-se mais alta nestas amostras, devido talvez ao bloqueio dos receptores de etileno. Um discreto aumento foi observado durante o amadurecimento dos frutos controle e, o pico máximo de atividade foi alcançado no início da degradação de amido. Esta tendência foi mais evidente quando o amadurecimento do fruto foi atrasado pelo tratamento com 1-MCP, uma vez que uma elevação mais consistente pôde ser observada até 18 DPC, indicando que a ausência do etileno tem um efeito positivo na atividade da fosforilase. Para ambos os grupos a atividade enzimática decaiu nos últimos estádios do amadurecimento. Nas bananas cujo amadurecimento foi induzido pelo etileno, houve apenas uma redução discreta da atividade da fosforilase para as amostras que continham baixos teores de amido. É possível especular que o efeito causado pela aplicação do 1-MCP teria ativado um mecanismo compensatório, ou seja, a atividade da fosforilase teria aumentado devido à redução da atividade da β -amilase. Talvez ainda possa ter ocorrido uma mudança no estado de ativação desta enzima, o que também poderia causar aumento de sua atividade.

Como existem duas isoformas de fosforilase de banana, que então poderiam apresentar diferentes perfis de atividade ao longo do amadurecimento, ensaios de atividade enzimática foram conduzidos após eletroforese em géis nativos contendo glicogênio (figura 10). De acordo com as análises densitométricas, apresentadas na figura 11, as atividades das isoenzimas Pho1 e Pho2 mudaram durante o amadurecimento. A banda com menor mobilidade (Pho2), que corresponde à

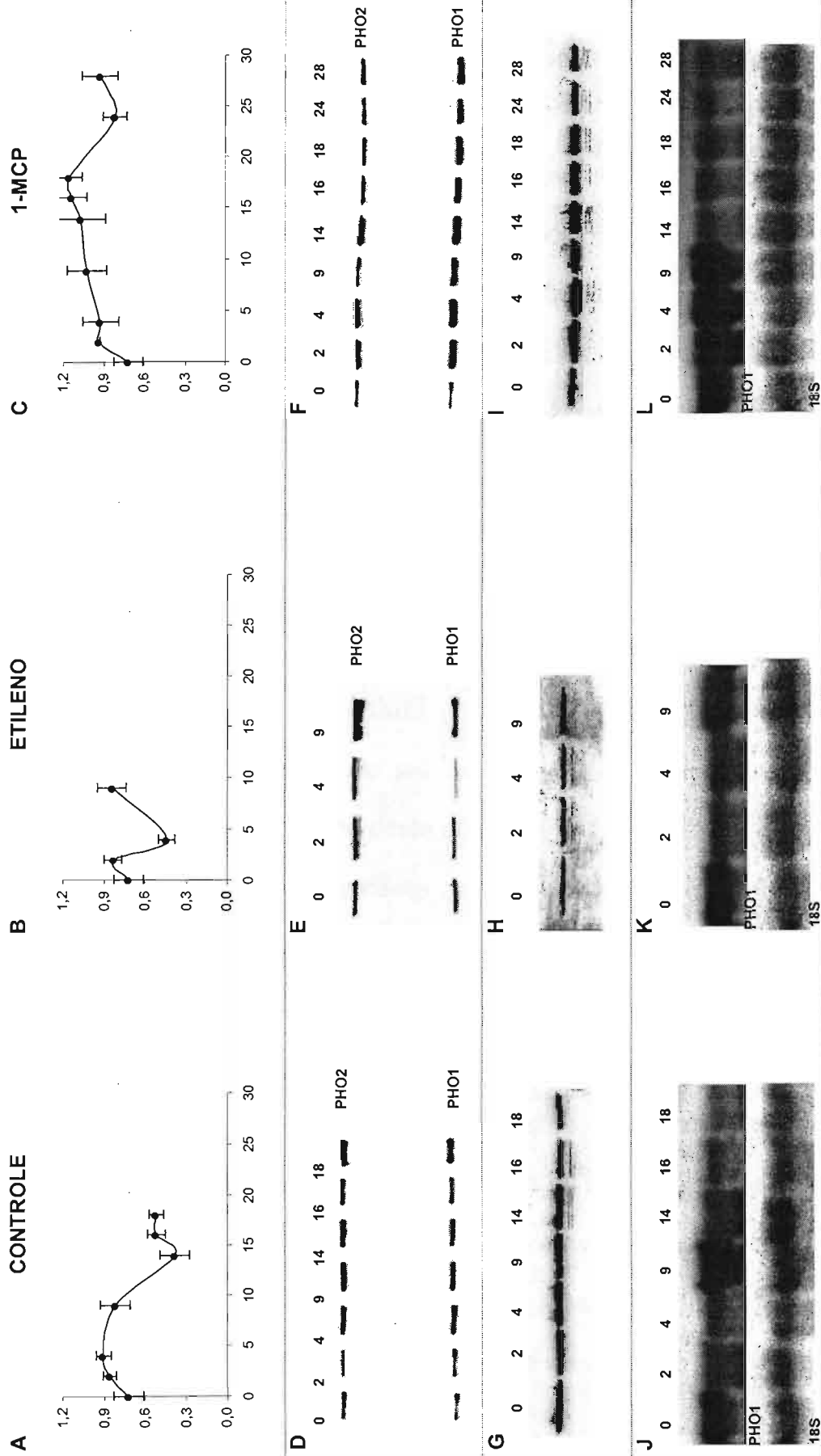


Figura 10: 1ª Linha: Atividade enzimática total de fosforilase (µmol p-nitr./mg proteína/h – sentido de degradação do amido) durante o amadurecimento dos frutos controle (A), tratados com etileno (B) e tratados com 1-MCP (C). 2ª Linha: Atividade em PAGE nativo ao longo do amadurecimento dos frutos controle (D), etileno (E) e 1-MCP (F). PHO1: isoforma plastidial da fosforilase; PHO2: isoforma citossólica da fosforilase. 3ª Linha: Western blotting anti-fosforilase contra 50 µg de proteínas de polpa da fruta controle (G), tratada com etileno (H) e 1-MCP (I). RW: padrão de pesos moleculares RA/NBOW em kDa. A seta indica a posição onde era esperada a banda de proteína reativa ao anti-soro. 4ª Linha: Northern blotting de fosforilase a partir do mRNA das polpas de frutos controle (J), etileno (K) e 1-MCP (L); a expressão do mRNA ribossomal 18S foi utilizada como controle. Os números das amostras se referem aos dias pós-colheita.

isoforma citossólica, aumentou durante o amadurecimento para todas as condições testadas. Os resultados para a banda correspondente à isoforma plastidial (Pho1) também revelam um aumento da atividade como um todo, no entanto, os tratamentos tiveram diferentes efeitos.

A exposição ao 1-MCP resultou na indução da Pho1 e seus níveis mantiveram-se altos ao longo do amadurecimento, enquanto que o etileno exógeno causou uma discreta redução da atividade, seguida por uma aparente recuperação da mesma aos 9 DPC. Por outro lado, o pico da Pho1 apareceu nos frutos do grupo controle no 4^o dia após a colheita, coincidindo com o início da degradação do amido, e foi decaindo sutilmente após este período. Esta isoforma pareceu ser a mais afetada pelos diferentes tratamentos e a mais relacionada à mobilização do amido ao longo do amadurecimento. Os efeitos causados pela aplicação do etileno exógeno levam a crer que a PHO 1 estaria mais propensa à regulação pelo etileno.

Segundo Mota et al (2002), ensaios de cinética enzimática indicaram que as fosforilases parecem não estar sob controle alostérico e a síntese de proteínas é que iria então regular a atividade desta enzima. Para checar estas informações, extratos da polpa das frutas foram testados com anti-soro contra Pho1 de banana (figura 10). As análises densitométricas dos *blots*, apresentadas na figura 12, indicaram que o conteúdo de proteína aumentou ao longo do amadurecimento dos frutos e que o 1-MCP teve um efeito positivo neste aumento, o que estabeleceu a relação com a abundância de fosforilase transcrita. De acordo com as análises de densitometria do Northern blotting (normalizado) apresentado na figura 13, a quantidade de mRNA da fosforilase também aumentou durante o amadurecimento e, similarmente ao que foi observado em relação à atividade e tradução de proteínas, este efeito foi mais evidente nos frutos expostos ao antagonista do etileno, o 1-MCP que, mais uma vez,

afetou positivamente os níveis de mRNA e proteína. Neste caso, a maior contribuição para o controle da atividade enzimática viria dos níveis de proteína.

Os resultados em relação as fosforilases sugerem então que a atividade desta enzima é aumentada durante o amadurecimento normal do fruto e que seus níveis máximos são alcançados no momento em que o amido é mobilizado. Considerando os contrastantes efeitos que a aplicação do etileno ou do 1-MCP causaram sobre a atividade da fosforilase e sua expressão gênica, parece que esta enzima responderia a mudanças mais relacionadas aos níveis basais do hormônio do que aquelas relacionadas ao seu pico autocatalítico.

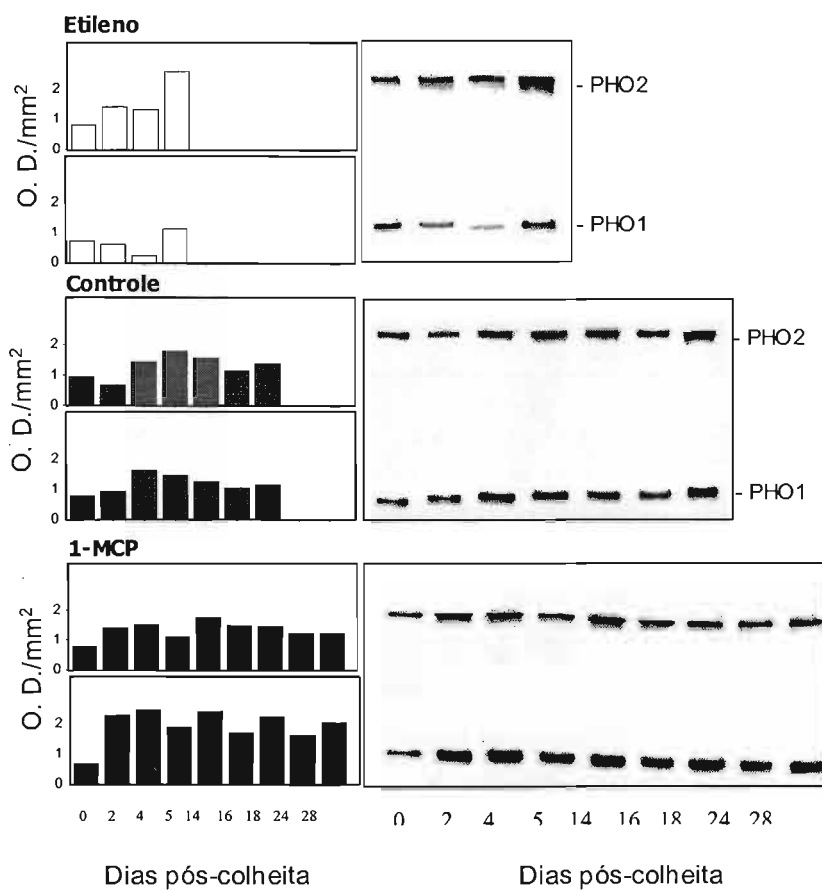


FIGURA 11: Painéis esquerdos: análise densitométrica das bandas de amido fosforilase (citossólica e plastidial, como indicado) em gel de poliácridamida. Painéis direitos: atividade em PAGE nativo para PHO1 e PHO2.

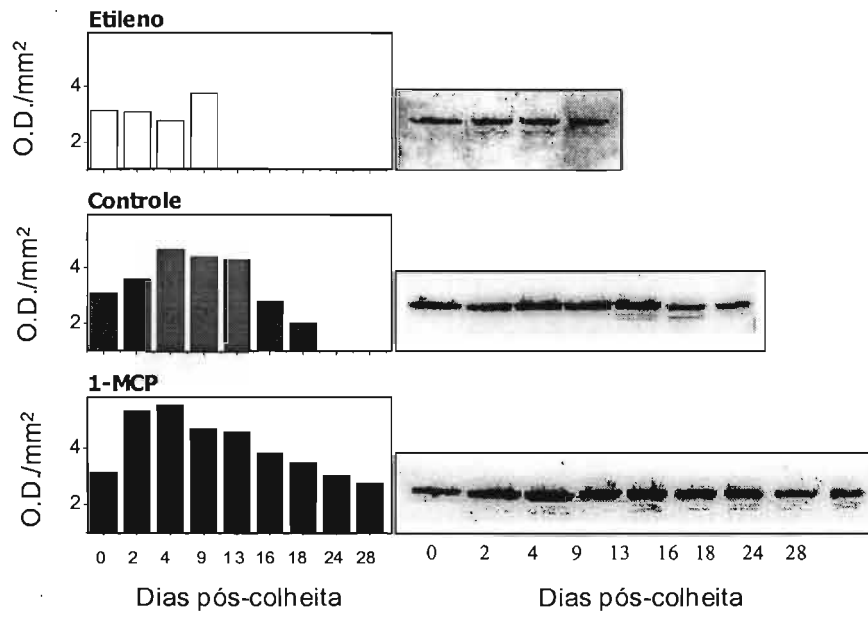


FIGURA 12: Painéis esquerdos: análise densitométrica das bandas de amido fosforilase (citossólica e plastidial, como indicado) de western blots. Painéis direitos: Western blots com soro anti- PHO1.

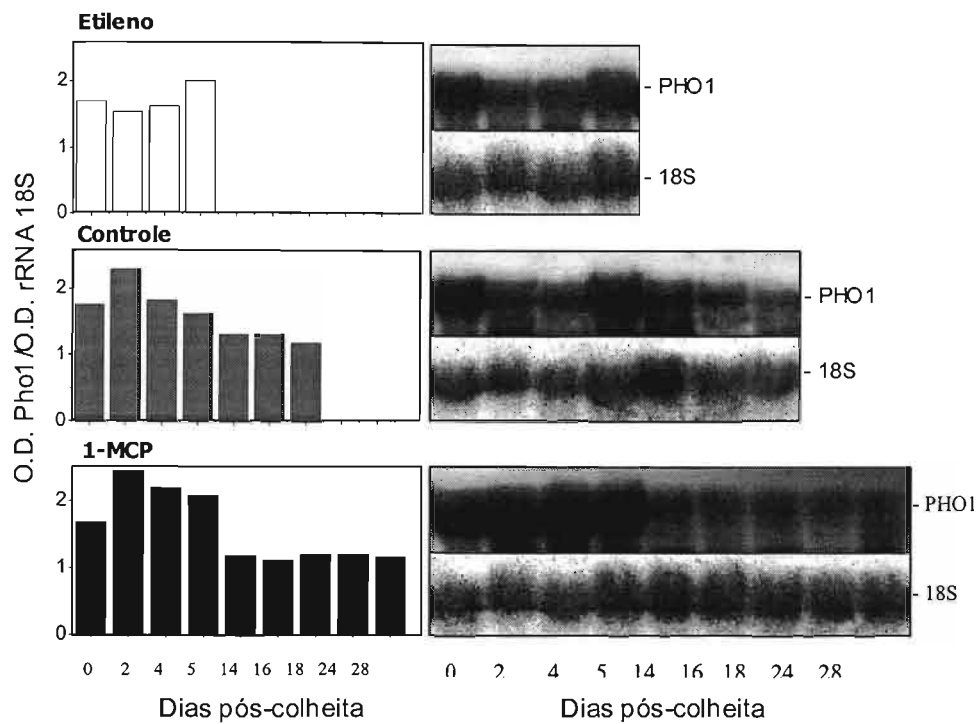


FIGURA 13: Painéis esquerdos: análise densitométrica das bandas de amido fosforilase (citossólica e plastidial, como indicado) de Northern blots. Painéis direitos: Northern blots para PHO1. Os valores para a normalização foram obtidos pelo ratio entre a OD das bandas da PHO1 pela OD das bandas de mRNA 18S.

4.3.4. DPE 1

A atividade desta enzima, assim como a atividade da DPE 2, foi avaliada apenas utilizando a técnica de PAGE nativo e incubação com substrato específico. Outros métodos para avaliar estas atividades foram testados (atividade *in vitro* – métodos descritos por Critchley et al, 2001 e Chia et al, 2004), porém não foram bem sucedidos.

A enzima DPE 1 tem sido descrita como uma enzima plastidial e assim sendo faz sentido o que mostra a figura 14, ou seja, sua atividade parece ser maior no

início da degradação, onde existe ainda muito substrato para esta enzima. A partir do momento que a degradação do amido se intensifica, sua atividade é reduzida, porém, parece manter atividade residual. Neste ponto o conteúdo de maltose formada (figura 14) deve ser muito maior quando comparado à formação de glucanos maiores, logo esta maltose produzida deve ser exportada para o citossol (possivelmente pelo transportador MEX 1) e a atividade da DPE 2 passa a ser mais intensa.

A atividade da DPE 1 também parece ter uma grande relação com o etileno, já que foi bastante reduzida, quando o hormônio foi bloqueado.

Pelos ensaios realizados neste trabalho, a DPE 1 parece participar do processo de degradação do amido de banana e, estes estudos são pioneiros em se tratando de frutos tropicais.

4.3.5. DPE 2

Um pico na produção de açúcares solúveis (figura 14) foi observado concomitantemente ao aumento da atividade de DPE 2 em todos os tratamentos. Como o 1-MCP atrasa a degradação do amido e modifica alguns perfis enzimáticos, como o da β -amilase (que parece ser a principal enzima que libera maltose ao longo do processo de degradação), por exemplo, nota-se uma redução da atividade como um todo da DPE 2 (figura 14), sugerindo que esta enzima possa ser parcialmente dependente do etileno. Nos frutos tratados com etileno, este acontecimento foi acelerado.

Ao contrário do que já foi relatado na literatura por Konish et al (1992), estudos realizados para um projeto piloto em conjunto com os resultados apresentados por Vieira (2006) sugerem que as α -1,4 glicosidases não possuem

atividade maltásica, pois parecem não atuar sobre a maltose em polpa de banana e, além disso, a atividade destas enzimas decaem ao longo do amadurecimento. Neste caso, a atividade α -glicosídica foi detectada sobre substratos do tipo 4-metilumbeliferil- α -D-glicosídeo e não sobre a maltose.

Considerando a maltose como principal produto da degradação do amido, liberada pela ação da β -amilase no amiloplasto (Chia et al. 2004; Weise et al. 2004; Fettke et al. 2006; Lu e Sharkey 2006) , e que nenhuma atividade maltásica foi detectada (dados não apresentados), a DPE 2 pode ser a principal proteína envolvida no metabolismo da maltose. O baixo conteúdo deste dissacarídeo mostrado na figura 14A, 14B e 14C pode ser atribuído a uma alta taxa de trasglicosilação por parte da atividade da DPE 2. Esta é a primeira vez que é reportada a atividade desta enzima, em um fruto tropical e, neste caso, esta via de degradação parece ser mais provável que a da maltase.

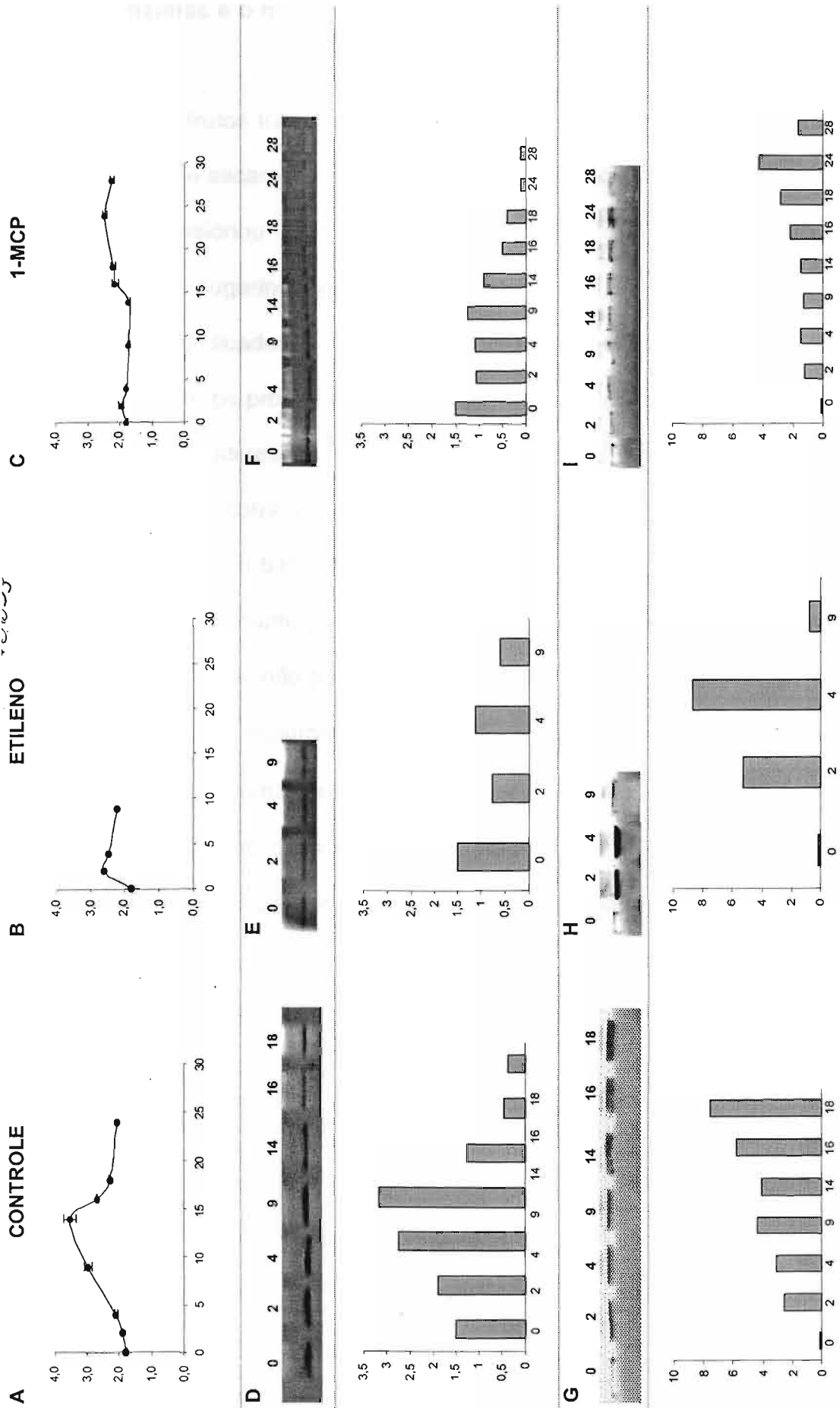


Figura 14: 1ª Linha: Conteúdo de maltose (mg malto/g banana) ao longo do amadurecimento dos frutos controle (A), tratados com etileno (B) e tratados com 1-MCP (C). 2ª Linha: Atividade em PAGE nativo para a DPE 1 e respectivas análises densitométricas durante o amadurecimento dos frutos controle (D), tratados com etileno (E) e tratados com 1-MCP (F). 3ª Linha: PAGE nativo para a DPE 1 e respectivas análises densitométricas nos frutos controle (G), etileno (H) e 1-MCP (I).

4.4. Enzimas e o metabolismo do amido

Nos frutos tratados com 1-MCP observou-se atraso na degradação de amido e síntese de sacarose, apesar do aumento de etileno ao final do experimento. Este atraso ocasionou também alteração geral no comportamento das enzimas estudadas, sugerindo que diversos fatores temporais, necessários ao processo, foram prejudicados. O 1-metilciclopropeno (1-MCP) parece afetar apenas parcialmente os processos metabólicos relacionados ao metabolismo do amido, por interferir com as respostas celulares ao etileno.

Mesmo considerando que os resultados para a enzima α -amilase não foram esclarecedores o bastante, e que portanto, não é possível afirmar se esta enzima é realmente importante para a degradação do amido, ou pelo menos para o ataque inicial do grânulo, não pode-se descartar sua ação em conjunto com outras enzimas. Há estudos que mostram que a α -amilase pode ter sua ação potencializada quando combinada a uma α -glicosidase, por exemplo. É possível especular que, principalmente no caso dos frutos tratados com 1-MCP, a atividade da α -amilase tenha sido essencial para liberar substrato suficiente para a ação das fosforilases, já que a β -amilase, neste caso, teve sua atividade bastante reprimida, além de não ser uma endoamilase (figura 15).

Os dados relativos à atividade e expressão da β -amilase deixam fortes impressões da dependência desta enzima pelo hormônio etileno. Os resultados da atividade da β -amilase em frutos tratados com 1-MCP reforçam a hipótese da fosforilase ter uma ação compensatória (figura 15), dado o aumento de atividade fosforolítica observado nas amostras. Essas duas enzimas criariam então condições para a ação da DPE1 sobre polissacarídeos como a maltotriose.

Com os resultados apresentados também é possível especular que, em bananas, a via hidrolítica pode ser tão ou mais relevante que a via fosforolítica e que a atividade da amido fosforilase depende de outro fator além do etileno. Esta enzima pode necessitar de outras formas de ativação como uma complexação com outras enzimas (Tetlow et al, 2004), ou ainda pode ser regulada por um mecanismo de oxirredução como já foi descrito para uma forma de β -amilase em *Arabidopsis*, onde os autores propuseram que esta enzima pode ser regulada por um sistema envolvendo a ferredoxina/tiorredoxina. Neste sistema a ferredoxina reduziria a tiorredoxina que, por sua vez, reduziria pontes dissulfeto na enzima, provocando mudanças conformacionais e tornando-a ativa (Balmer et al, 2006).

A DPE1, que apresentou-se mais ativa em todos os tratamentos, no início da degradação do amido, teve sua queda de atividade a partir do momento que a quantidade de açúcares foi aumentando. Considerando que a banana possa ter algum tipo de transportador de maltose (cujo pico de produção coincidiu com o aumento da atividade da β -amilase), o conteúdo deste açúcar seria rapidamente levado do amiloplasto para o citossol, dando espaço para o aumento da atividade da DPE2, que atuaria então sobre a maltose e sobre um possível heteroglicano localizado no citossol.

O papel que o etileno exerce sobre algumas enzimas ainda não está muito claro, mas sabe-se que quando o hormônio liga-se, via cofator cobre, aos receptores, a proteína CTR 1 torna-se inativa, ativando então uma cascata de MAP-quinases; que por sua vez ativam uma cascata de transdução de sinal envolvendo fatores de transcrição que respondem pelo hormônio (EINs, ERFs) que em última instância ligam-se aos elementos de resposta ao etileno (EREs) localizados nas regiões promotoras dos genes-alvo. Astorino e Nascimento (dados ainda não

publicados) vêm trabalhando com o isolamento de regiões promotoras de genes de enzimas da banana, mais especificamente com o gene da β -amilase, e já encontraram nestas regiões elementos como os "GCC-box", que parecem estar associados à resposta ao etileno (Stepanova e Ecker, 2000), pois interagem com os ERFs. Neste caso, o etileno estaria intimamente relacionado à transcrição e regulação da β -amilase e, os resultados apresentados no presente trabalho podem reforçar esta hipótese.

Com base nos resultados referentes à β -amilase e com o intuito de acrescentar dados sobre o mecanismo de regulação desta enzima, investigamos os níveis de auxina (AIA – ácido indol-3-acético) e ácido abscísico (ABA), como mostra a figura 16. Em trabalhos prévios (Purgatto et al, 2001 e 2002), foi observado que altos níveis de AIA no tecido da polpa de bananas são capazes de inibir a transcrição do mRNA e o aumento da atividade enzimática da β -amilase e, conseqüentemente, o início da fase rápida da degradação do amido. Estes ensaios foram conduzidos em um modelo que envolvia a infiltração de AIA em fatias de bananas, onde abaixo de 4 ng/g de fruto (massa fresca), a expressão e aumento da atividade de β -amilase ocorriam. O mesmo resultado foi obtido em frutos de banana intactos, amadurecidos sem nenhum tratamento pós-colheita. Os dados apresentados na figura 16 estão em acordo com estes resultados prévios e sugerem que a degradação do amido, assim como a atividade β -amilásica estão bem relacionados com os níveis de AIA, além do etileno, visto que logo nas primeiras horas após o tratamento com este último, os níveis de AIA eram praticamente indetectáveis, enquanto que a atividade e a expressão da β -amilase aumentaram e o teor de amido estava em fase de rápido declínio. O tratamento com 1-MCP, por sua vez, provocou atraso no desenvolvimento destes processos e, nestes frutos, os

níveis de AIA mantiveram-se altos em relação aos outros dois grupos, até o 10º dia pós-colheita, declinando a teores semelhantes aos encontrados no grupo controle por volta do 15º dpc, após o qual foi observado o início da degradação do amido e aumento da transcrição do mRNA de β -amilase, embora esta última não tenha levado a aumentos detectáveis na atividade da enzima.

Considerando os teores de ABA encontrados sugere-se, assim como já apresentados em outros estudos com bananas (Jiang et al, 2000), que este hormônio pode facilitar a ação do etileno, quando em maiores quantidades, pois tornaria alguns eventos relacionados ao amadurecimento mais sensíveis ao etileno. Os dados obtidos podem tornar esta especulação mais plausível, já que os frutos controle e tratados com etileno tiveram maior produção de ABA e amadureceram mais rápido, quando comparados aos frutos tratados com 1-MCP (figura 16). Porém, sua relação com a degradação de amido não parece ser tão direta, visto que os frutos tratados com 1-MCP apresentavam teores relativamente menores do que o grupo controle, na fase de mobilização do polissacarídeo, indicando que este hormônio pode não estar correlacionado a este metabolismo no tecido da polpa de bananas em amadurecimento.

Em relação as demais enzimas estudadas ainda não há relatos claros na literatura que assinalem a presença de elementos de resposta ao etileno nas regiões promotoras de seus genes.

Porém, os dados parecem apontar para uma sinalização bastante dependente do balanço dos níveis de etileno com outros hormônios como o fator preponderante na mudança de atividade e/ou expressão gênica de algumas das enzimas correlacionadas à degradação do amido. Dados de literatura não só atestam a presença de *cross-talks* entre a sinalização do etileno e auxinas e também do etileno

com açúcares, mas também os colocam como um motivo largamente encontrado na regulação de diversos processos do ciclo de vida das plantas (Stepanova e Alonso, 2005).

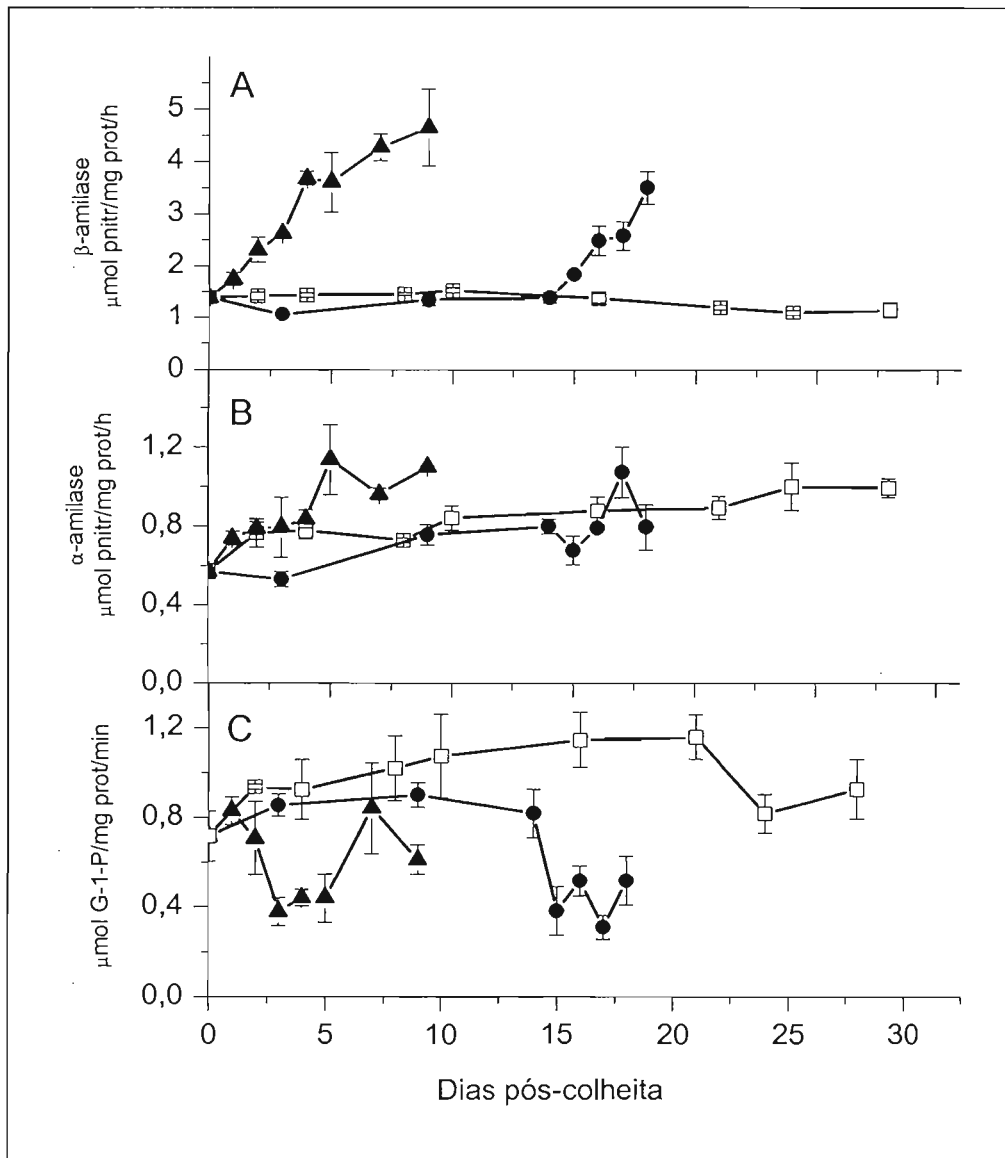


FIGURA 15: Comparação das atividades totais das enzimas β-amilase, α-amilase e fosforilase durante a degradação do amido de bananas controle - ● -, tratadas com etileno - ▲ - e tratadas com 1-MCP - ◻ -.

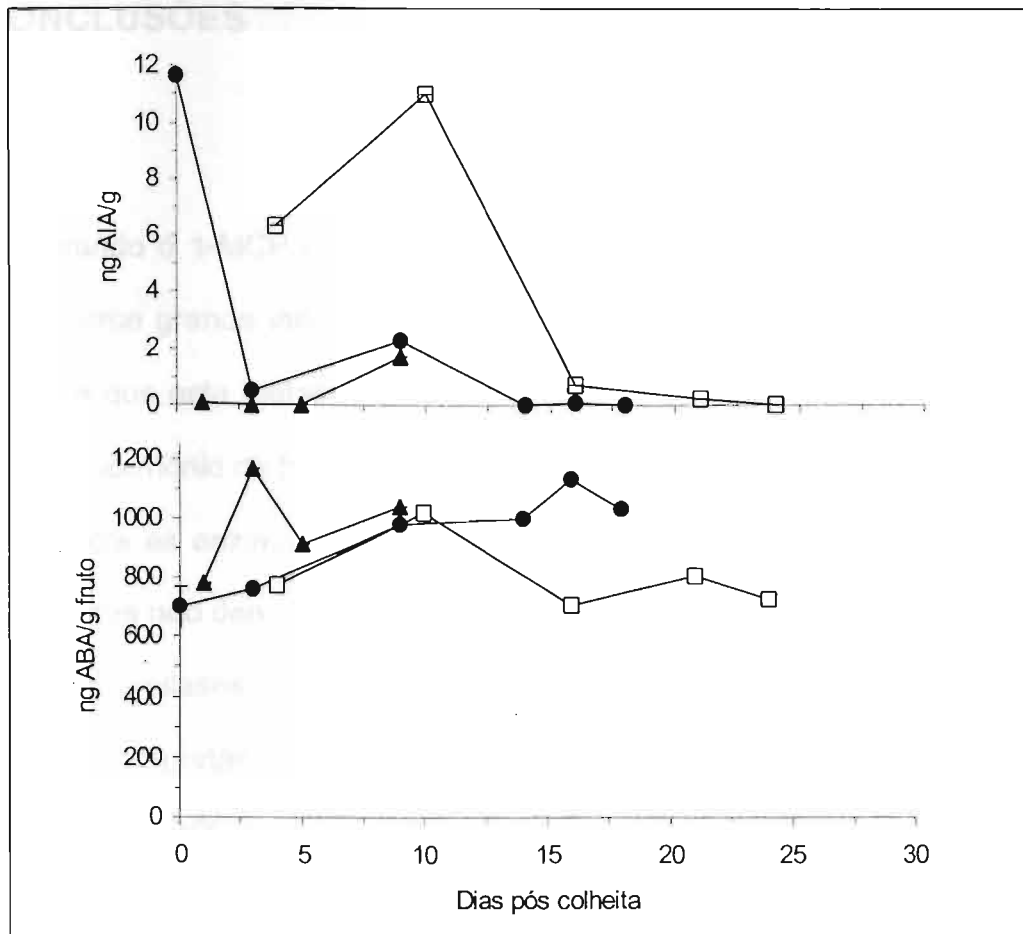


FIGURA 16: Teor de IAA (ácido indol-3 acético) livre e ABA (ácido abscísico) durante a degradação do amido de bananas controle - ● -, tratadas com etileno -▲ - e tratadas com 1-MCP - □ -.

5. CONCLUSÕES

Usando o 1-MCP como estratégia experimental, foi possível observar que o etileno exerce grande influência sobre o metabolismo de degradação do amido em bananas e que este metabolismo envolve ações de diferentes enzimas, que sofrem a ação do hormônio de forma diferente.

Dentre as enzimas envolvidas no metabolismo de carboidratos de bananas, as α -amilases não demonstraram ser etileno-dependentes.

As β -amilases mostraram ser enzimas bastante dependentes do etileno e parecem ter importância especial quando se trata do metabolismo da maltose, em conjunto com a DPE 2.

A atividade fosforolítica foi induzida ao longo do amadurecimento, mas parece ter resposta mais significativa a alterações basais do hormônio etileno. Sugere-se que esta enzima esteja envolvida com mais de uma forma de regulação.

A DPE 1 apresentou maior atividade ao início da degradação do amido, indicando sua atuação sobre glicanos liberados pelas α -amilases.

A presença de DPEs na banana torna o seu metabolismo de carboidratos mais próximo daquele presente em folhas.

A regulação da degradação do amido durante o amadurecimento da banana parece depender, ao menos em parte, do balanço entre os níveis de etileno e ácido-indol-3-acético encontrado no fruto.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, D.O. and YANG, S.F. Ethylene biosynthesis: identification of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid as an intermediate in the conversion of methionine to ethylene. **Proc. Natl. Acad. Sci**, v. 76, p. 170-174, 1979.
- ADÃO, R.C., GLÓRIA, M.B.A. Bioactive amines and carbohydrate changes during ripening of 'Prata' banana (*Musa acuminata* x *M. balbisiana*). **Food Chemistry**. v.90; p. 705–711, 2005.
- ALEXANDER, L., GRIERSON, D. Ethylene biosynthesis and action in tomato: a model for climateric fruit ripening. **J. Exp. Botany**, v. 53, n. 37, p. 2039-2055, 2002.
- ARÊAS, J.A.G., LAJOLO, F.M. Starch transformation during banana ripening .1. The phosphorylase and phosphatase behavior in *Musa acuminata*. **J. Food Biochem.**, Trumbull, v.5, n.1, p.19-37, 1981.
- ASIF, M.H., NATH, P. Expression of multiple forms of polygalacturonase gene during ripening in banana fruit. **Plant Physiology and Biochemistry**. v. 43, p.177–184, 2005.
- BACHEM, C.W.; VAN DER HOEVEN, R.S.; DE BRUIJN, S.M.; VREUGDENHIL, D.; ZABEAU, M.; VISSER, R.G. Visualization of differential gene expression using a novel method of RNA fingerprinting based on AFLP: analysis of gene expression during potato tuber development. **Plant J.**, 9, 745-753, 1996.
- BALLESTERO, S. M. **Bananos: Cultivo y comercialización**. 2.ed. San José, Costa Rica: Litografía e Imprenta Lil, 1992, 674p.

- BALMER, Y., VENSEL, W.H., CAI, N., MANIER, I, W., SCHÜRMAN, P., HURKMAN, W.J., BUCHANAN, B.B. A complete ferredoxin/thioredoxin system regulates fundamental process in amyloplast. **PNAS**, v. 103, n. 8, p. 2988-2993, 2006.
- BASSINELLO, P.Z. **Estudo e caracterização parcial de amilases de banana (*Musa acuminata* cv. Nanicão)**. São Paulo, 2002, 174p. (Tese de Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo).
- BERGMEYER, H.U., BERNT, E. D-glucose. Determination with glucose oxidase and peroxidase. In: BERGMEYER, H.U., GAWHEHN, K., eds. **Methods of enzymatic analysis**. 2.ed. New York: Academic Press, 1974, v.2, p.1212-1215.
- BERNFELD, P. Amylases, alpha and beta. **Meth. Enzymology**, San Diego, v.1, n.149-158, 1955.
- BIALE, J. B. E YOUNG, R. E. Respiration and ripening in fruits – retrospects and prospects. In: FRIEND, J. e RHODES, M.J.C. **Recent advances in the biochemistry of fruit and vegetables**. London: Academic Press, 1981, cap. 1, p.1-13.
- BRADFORD, M.M. Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, San Diego, v.72, n.1-2, p.248-254, 1976.
- BRESOLIN, N.S., ZHONGYI, L., KOSAR-HASHEMI, B., TETLOW, I.J., CHATTERJEE, M., RAHMAN, S., MORELL, M.K., HOWITT, C.A. Characterization of disproportionating enzyme from wheat endosperm. **Planta**, v. 224, p. 30-31, 2006.
- BRUMMELL, D.A. Regulation and genetic manipulation of ripening in climacteric fruit. **Stewart Postharves Review**, v. 1, p. 1-19, 2005.

- BULÉON, A., COLONNA, P., PLANCHOT, V., BALL, S. Starch granules: structure and biosynthesis. **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 23, p. 85-112, 1998.
- CAMERON, A.C., REID, M.S. The use of silver anionic complex as a foliar spray to prevent flower abscission of *Zygocactus*. **HortScience**, v.16, p. 761-762, 1981.
- CHANG, C. Ethylene signaling: the MAPK module has finally landed. **Plant Science**, v. 8, n. 8, p. 365-368, 2003.
- CHEN, K.H., MILLER, A.N., PATTERSON, G.W., COHEN, J.D. A rapid and simple procedure for purification of indole-3-acetic acid prior to CG-MS-SIM analysis. **Plant Physiol.**, v.86, n.3, p. 822-825, 1988.
- CHIA, T., THORNEYCROFT, D., CHAPPLE, A., MESSERLI, G., CHEN, J. et al. A cytosolic glycosyltransferase is required for conversion of starch to sucrose in *Arabidopsis* leaves at night. **Plant Journal**. v. 37, p. 853-863, 2004.
- COCHRANE, M.P., DUFFUS, C.M., ALLISON, M.J., MACKAY, G.R. Amyolytic activity in stored potato tubers. 2 The effect of low-temperature storage on the activities of α - & β -amylase & α -glucosidase in potato tubers. **Potato Research**, v.34, p. 333–341, 1991.
- CORDENUNSI, B.R., LAJOLO, F.M. Starch breakdown during banana ripening - Sucrose synthase and sucrose-phosphate synthase. **J. Agr. Food Chem.**, Washington, v.43, n.2, p.347-351, 1995.
- 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).
- CRITCHLEY, J.H.; ZEEMAN, S.C.; TAKAHA, T.; SMITH, A.M.; SMITH, S.M. A critical role for disproportionating enzyme in starch breakdown is revealed by a knock-out mutant in *Arabidopsis*. **Plant Journal**. v. 26, p.89-100, 2001.

- DATTA, R., SELVI, M.T., SEETHARAMA, N., SHARMA, R. Stressmediated enhancement of beta-amylase activity in pearl millet and maize leaves is dependent on light. **J Plant Physiol**, v. 154, p. 657–664, 1999.
- DEY, P.M., DIXON, R.A. **Biochemistry of storage carbohydrates in green plants**. 1.ed. London: Academic Press, 1985, cap. 1, p.5-6, 149-193.
- DREIER, W., SCHNARRENBERGER, C., BORNER, T. Light- and stress-dependent enhancement of amylolytic activities in white and green barley leaves: beta-amylases are stress induced proteins. **J Plant Physiol**, v. 145, p. 342–348, 1995.
- DUBOIS, M. GILES, K.A., HAMILTON, J.K., REBERS, P.A. and SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Anal. Chem**, v. 28, p. 350, 1956.
- FAN, X.; MATTHEIS, J.P. Impact of 1-methylcyclopropene and methyl jasmonate on apple volatile production. **J. Agric. Food Chem.**, v. 47, p. 2847-2853, 1999.
- FAN, X., ARGENTA, L., MATTHEIS, J.P. Inhibition of ethylene action by 1-methylcyclopropene prolongs storage life of apricots. **Postharvest Biology and Technology**, v.20, p. 135-142, 2000.
- FAN, X.; MATTHEIS, J.P. Yellowing of broccoli in storage is reduced by 1-methylcyclopropene. **HortScience**, v. 35, p. 885-887, 2000.
- FETTKE, J.; ECKERMANN, N.; POESTE, S.; PAULY, M.; STEUP, M. The glycan substrate of the cytosolic (Pho 2) phosphorylase isozyme from *Pisum sativum* L.: identification, linkage analysis and subcellular localization. **Plant J.**, v. 39, p.933-946, 2004.
- FETTKE, J., ECKERMANN, N., TIESSEN, A., GEIGENBERGER, P., STEUP, M. Identification, subcellular localization and biochemical characterization of water-

- soluble heteroglycans (SHG) in leaves of *Arabidopsis thaliana* L.: distinct SHG reside in the cytosol and in the apoplast. **Plant J.**, v. 43, p. 568-586, 2005a.
- FETTKE, J., POESTE, S., ECKERMANN, N., TIESSEN, A., PAULY, M., GEIGENBERGER, P., STEUP, M. Analysis of cytosolic heteroglycans from leaves of transgenic potato (*Solanum tuberosum* L.) plants that under-or overexpressed the Pho2 phosphorylase isozyme. **Plant Cell Physiol.**, v. 46, p. 1984-2004, 2005b.
- FETTKE, J., CHIA, T., ECKERMANN, N., SMITH, A., STEUP, M. A transglucosidase necessary for starch degradation and maltose metabolism in leaves at night acts on cytosolic heteroglycans (SHG). **The Plant Journal**, v. 46, p. 668-684, 2006.
- FLUHR, R., MATTOO, A.K. Ethylene – Biosynthesis and perception. **Crit. Ver. Plant Sci.** v. 15, p. 479-523, 1996.
- FUJITA, N., KUBO, A., FRANCISCO, P., NAKAKITA, M., HARADA, K., MINAKA, N., NAKAMURA, Y. Purification, characterization, and cDNA structure of isoamylase from developing endosperm of rice. **Planta**, v. 208, p. 283-293, 1999.
- GAO, Z., CHEN, Y., RANDLETT, M.D., ZHAO, X., FINDELL, J.L., KIEBER, J.J., SCHALLER, G.E. Localization of the raf-like kinase CTR1 to the endoplasmic reticulum of *Arabidopsis* through participation in ethylene receptor signaling complexes. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n.36, p. 34725-34732, 2003.
- GOLDING, J.B., SHEARER, D., WYLLIE, S.G., MCGLASSON, W.B. Application of 1-MCP and propylene to identify ethylene-dependent ripening processes in mature banana fruit. **Postharvest Biol. Technol.**, Amsterdam, v.14, n.1, p.87-98, 1998.
- GORNY, J.R., KADER, A. Controlled-atmosphere suppression of ACC synthase and ACC oxidase in "Golden delicious" apple during long-term cold storage. **J. Am. Soc. Hortic. Sci.** v. 121, p. 751-755, 1996.

- GROSS, K.C. a rapid and sensitive spectrophotometric method for assaying polygalacturonase using 2-cyanoacetamide. **Hortscience**. v.17, p. 93-94, 1982.
- GUO, H., ECKER, J.R. The ethylene signaling pathway: new insights. **Plant Biology**, v. 7, p. 1-10, 2003.
- HARGREAVES, J.A. and ap REES, T. Turnover of starch and sucrose in roots of *Pisum sativum*. **Phytochemistry**. v. 27, p. 1627–1629, 1988.
- HARMER, S.L., HOGENESCH, J.B., STRAUME, M., CHANG, H.S., HAN, B., ZHU, T., WANG, X., KREPS, J.A., KAY, S.A. Orchestrated transcription of key pathways in *Arabidopsis* by the circadian clock. **Science**, v. 290, p. 2110–2113, 2000.
- HARRIS, D.R., SEBERRY, J.A., WILLS, R.B.H., SPOHR, L.J. Effect of fruit maturity on efficiency of 1-methylcyclopropene to delay the ripening of bananas. **Postharvest Biol. Technol.**, Amsterdam, v. 20, p. 303-308, 2000.
- HIRATA, A., ADACHI, M., SEKINE, A., KANG, Y.N., UTSUMI, S., MIKAMI, B. Structural and enzymatic analysis of soybean beta amylase mutants with increased pH optimum. **J Biol Chem**, v. 279, p. 7287–7295, 2004.
- HONDA, S., NISHIMURA, Y., TAKAHASHI, M., CHIBA, H., KAKEHI, K. A manual method for the spectrophotometric determination of reducing carbohydrates with 2- cyanoacetamide. **Anal. Biochem**. v.19, p. 194-199, 1982.
- HULME, A.C. **The biochemistry of fruits and their products**. London: Academic Press, v. 1, 1970. 620p.
- IMBERTY, A., CHANZY, H., PÉREZ, S. The double-helical nature of the crystalline part of A-starch. **J. Mol. Biol.**, v. 201, p. 365-378, 1988.
- IRVING, D.E. Starch degradation in buttercup squash (*Cucurbita maxima*). **J. Amer. Soc. Hort. Sci.**, v. 124, n. 6, p. 587-590, 1999.

- JEONG, J., HUBER, D.J., SARGENT, S.A. Influence of 1-methylcyclopropene (1-MCP) on ripening and cell-wall matrix polysaccharides of avocado (*Persea Americana*) fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v.25, n.3, p. 241-256, 2002.
- JIANG, Y.M., JOYCE, D.C., MACNISH, A.J. Responses of banana fruit to treatment with 1-methylcyclopropene. **J. Plant Growth Regulation**, v.28, p.77-82, 1999a.
- JIANG, Y.M., JOYCE, D.C., MACNISH, A.J. Extension of the shelf life of banana fruit by 1-methylcyclopropene in combination with polyethylene bags. **Postharvest Biol. Technol.**, v.16, n.2, p.187-193, 1999b.
- JIANG, Y.M., JOYCE, D.C., MACNISH, A.J. Effect of Abscisic Acid on Banana Fruit Ripening in Relation to the Role of Ethylene. **J. Plant Growth Regulation**, v.19, n. 1, p. 106-111, 2000.
- KADER, A.A. **Postharvest technology of horticultural crops**. 2.ed. Division of Agriculture and Natural Resources. Davis: University of California, n. 3311, 295p, 1992.
- 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.
- KLEE, H.J. Ethylene signal transduction. Moving beyond Arabidopsis. **Plant Physiol.** v. 135, p. 660-667, 2004.
- KONISHI, Y., KITASATO, S., NAKATANI, N. Partial purification and characterization of acid and neutral alpha-glucosidases from preclimateric banana pulp tissues. **Biosci. Biothechnol. Biochem.**, v. 56, n. 12, p. 2046-2051, 1992.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during assembly of the bacteriophage T4. **Nature**, London, v. 94, p. 201-208, 1970.

- LELIÉVRE, J.M., LATCHÉ, A., JONES, B., BOUZAYEN, M., PÉCH, J.C. Ethylene and fruit ripening. **Physiol. Plant.**, Copenhagen, v.101, n.4, p.727-739, 1997.
- LI J., YEH A., Relationships between thermal, rheological characteristics and swelling power for various starches. **J. Food Engineering**, v.50, p.141-148, 2001.
- LICHTENBERG, L.A.; Colheita e Pós-Colheita da Banana. **Informe Agropecuário**. Belo Horizonte, v. 20, n. 196, p. 73-90, 1999.
- LÓPEZ-GÓMEZ, R., GÓMEZ-LIM, M.A. A method for extracting intact RNA from fruits rich in polysaccharides using ripe mango mesocarp. **Hortscience**, Alexandria, v.27, n.5, p.440-442, 1992.
- LLOYD J.R., BLENNOW, A., BURHENNE, K., KOSSMANN, J. Repression of a novel isoform of disproportionating enzyme (stDPE 2) in potato leads to inhibition of starch degradation in leaves but not tubers stored at low temperatures. **Plant Physiol.**, v. 134, p. 1347-1354, 2004.
- LU, Y. e SHARKEY, T.D. The role of amylomaltase in maltose metabolism in the cytosol of photosynthetic cells. **Planta**, v. 218, p. 466-473, 2004.
- LU, Y., GEHAN, J.P., SHARKEY, T.D. Daylength and circadian effects on starch degradation and maltose metabolism. **Plant Physiol**, v. 138, p. 2280–2291, 2005.
- LU, Y. e SHARKEY, T.D. The importance of maltose in transitory starch breakdown. **Plant, Cell and Environment**, v. 29, p. 353-366, 2006.
- MACKEON, T.A., JUAN, C.F.M., YANG, S. Biosynthesis and metabolism of ethylene. In: DAVIES, J.P. eds. **Plant Hormones. Physiology, biochemistry and molecular biology**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1995, p. 118-131.
- MACNISH, A.J., JOYCE, D.C., HOFMAN, P.J., SIMONS, D.H., REID, M.S. 1-Methylcyclopropene treatment efficacy in preventing ethylene perception in

banana fruit and grevillea and waxflower flowers. **Aust. J. Exp. Agr.** v. 40, p. 471-481, 2000.

MAINARDI, J.A., PURGATTO, E., VIEIRA Jr., 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. **J. Agric. Food Chem.**, v. 54, p. 7294-7299, 2006.

MEDINA-SUÁREZ, R., MANNING, K., FLETCHER, J., AKED, J., BIRD, C.R., SEYMOUR, G.B. Gene expression in the pulp of ripening bananas - Two-dimensional sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis of in vitro translation products and cDNA cloning of 25 different ripening-related mRNAs. **Plant Physiol.**, Rockville, v.115, n.2, p.453-461, 1997.

MORGAN, A. **Ethylene in plant biology**. London: Academic Press, 1992, cap. 6, p. 182-186.

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

MOTA, R.V. **Identificação, purificação e caracterização parcial da enzima amido fosforilase em bananas Nanicao (*Musa acuminata*. grupo Cavendish)**. São Paulo, 2001. 86p. (Tese de Doutorado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP).

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 the biosynthesis of the amylopectin crystal. **Plant Physiology**, v. 122, p. 989-997, 2000.
- NAKATSUKA, A., SHIOMI, S., KUBO, Y., INABA, A. Expression and internal feedback regulation of ACC synthase and ACC oxidase genes in ripening tomato fruit. **Plant Cell Physiology**, v.38, p.1103-1110, 1997.
- NAKATSUKA, A., MURACHI, S., OKUNISHI, H., SHIOMI, S., NAKANO, R., KUBO, Y., INABA, A. Differential expression and internal feedback regulation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase, 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase, and ethylene receptor genes in tomato fruit during development and ripening. **Plant Physiol.** v. 118, p. 1295-1305, 1998.
- NASCIMENTO, J.R.O., CORDENUNSI, B.R., LAJOLO, F.M., ALCOCER, M.J.C. Banana sucrose-phosphate synthase gene expression during fruit ripening. **Planta**, New York, v.203, n.3, p.283-288, 1997.
- NASCIMENTO, J.R.O.; VIEIRA, JR. A.; MAINARDI, J.A.; PURGATTO, E.; BASTOS, W.A.; CORDENUNSI, B.R.; LAJOLO, F.M. Beta-amylase expression and starch degradation during banana ripening. **Postharvest Biol. Technol.** v. 40, p. 41-47, 2006.
- NIITTYLÄ, T., MESSERLI, G., TREVISAN, M., CHEN, J., SMITH, A.M., ZEEMAN, S.C. A previously unknown maltose transporter essential for starch degradation in leaves. **Science**, v. 303, p. 87-89, 2004.
- OHTO, M.A., NAKAMURA-KITO, K., NAKAMURA, K. Induction of expression of genes coding for sporamin and beta amylase by polygalacturonic acid in leaf-petiole cuttings of sweet potato. **Plant Physiol**, v. 99, p. 422-427, 1992.
- O'MALLEY, R.C., RODRIGUEZ, F.I., ESCH, J.J., BINDER, B.M., O'DONNELL, P., KLEE, H.J., BLEECKER, A.B. Ethylene-binding activity, gene expression levels

- and receptor system output for ethylene receptor family members from *Arabidopsis* and tomato. **The Plant Journal**, v. 41, p. 651-659, 2005.
- OUAKED, F., ROZHON, W., LECOURIEUX, D., HIRT, H. A MAPK pathway mediates ethylene signaling in plants. **The EMBO Journal**, v. 22, n. 6, p. 1282-1288, 2003.
- PARKER, R. e RING, S. G. Aspects of the physical chemistry of starch, **J. Cereal Sci.**, v. 34, p. 1-17, 2001.
- PERCHERON, F. Chimie Biologique - Dosage alorimétrique du fructose et des fructofuranosides par l'acide thiobarbiturique. **C R Hebd Sean Acad Sci**, Paris, v.255, n.19, p.2521-2522, 1962.
- PESIS, E., FUCHS, Y., ZAUBERMAN, G. Starch Content and Amylase Activity in Avocado Fruit Pulp. **J. Amer. Soc. Hort. Sci.** v. 103, n.5, p.673-676, 1978.
- PURGATTO, E. **Efeito do ácido indol-acético no metabolismo amido-sacarose durante o amadurecimento da banana (*Musa spp.*)**. São Paulo, 2001. 118p. (Tese de Doutorado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP).
- PURGATTO, E., LAJOLO, F.M., NASCIMENTO, J.R.O., CORDENUNSI, B.R. Inhibition of β -amylase activity, starch degradation and sucrose formation by indole-3-acetic acid during banana ripening. **Planta**, v. 212, p.823-828, 2001.
- PURGATTO, E., NASCIMENTO, J.R.O., LAJOLO, F.M., CORDENUNSI, B.R. The onset of starch degradation during banana ripening is concomitant to changes in the content of free and conjugated forms of indole-3-acetic acid. **J. Plant Physiol.**, v. 159, p. 1105-1111, 2002.
- ROE, B., BRUEMMER, J.H. Changes in pectic substances and enzymes during ripening and storage of "Keitt" mangos. **J. Food. Sci.** v.46, p.186-189, 1981.
- ROSSETTO, M.R.M. **Efeito do ácido giberélico no metabolismo amido-sacarose durante o amadurecimento da banana (*Musa acuminata* var. Nanicão)**. São

Paulo, 2001. 71p. (Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP).

SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F., MANIATIS, T. Molecular cloning: a laboratory manual. 2.ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989, v.3.

SARGENT, J.G., WALKER, T.S. Adsorption of wheat α -amylases isoenzymes to wheat starch. **Starch**, v.30, p. 160-163, 1978.

SEYMOUR, G.B. Banana. In: SEYMOUR, G.B., TAYLOR, J.E., TUCKER, G.A., eds. **Biochemistry of fruit ripening**. London: Chapman & Hall, 1993. cap.2, p.83-106.

SHARKEY, T.D., LAPORTE, M., LU, Y., WEISE, S., WEBER, A.P. Engineering plants for elevated CO₂ (2): a relationship between starch degradation and sugar sensing. **Plant Biol**, v.6, p. 280–288, 2004.

SINGH, N., SINGH, J., KAUR, L., SODHI N. S., GILL, B. S. Morphological, thermal and rheological properties of starches from different botanical sources. **Food Chem**, v. 81, p. 219-231, 2003.

SISLER, E.C., SEREK, M., DUPILLE, E. Comparison of cyclopropene, 1-methylcyclopropene and 3,3-dimethylcyclopropene as ethylene antagonists in plants. **Plant Growth Regul.**, v. 18, p. 169-174, 1996.

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.

SMITH, A.M. Making starch. **Plant Biology**, v.2, p. 223-229, 1999.

SMITH, A.M., ZEEMAN, S.C., SMITH, S.M. Starch degradation. **Annu. Rev. Plant Biol.**, v. 56, p.73-97, 2005.

- SMITH, S.M., FULTON, D.C., CHIA, T., THORNEYCROFT, D., CHAPPLE, A., DUNSTAN, H., HYLTON, C., ZEEMAN, S.C., SMITH, A.M. Diurnal changes in the transcriptome encoding enzymes of starch metabolism provide evidence for both transcriptional and posttranscriptional regulation of starch metabolism in *Arabidopsis* leaves. **Plant Physiol**, v. 136, p. 2687–2699, 2004.
- SONNEWALD, U.; BASNER, A.; GREVE, B.; STEUP, M. A 2nd L-type isozyme of potato glucan phosphorylase: cloning, antisense inhibition and expression analysis. **Plant Mol. Biol.**, v. 27, p. 567-576, 1995.
- STEPANOVA, A.N., ECKER, J.R. Ethylene signaling: from mutants to molecules. **Current opinion in Plant Biology**, v. 3, p. 353-360, 2000.
- STEPANOVA, A.N., ALONSO, J.M. Ethylene signalling and response pathway: a unique signalling cascade with a multitude of inputs and outputs. **Physiologia Plantarum**, v. 123, n. 2, p. 195-206, 2005.
- TANG, H., MITSUNAGA, T., KAWAMURA, Y. Molecular arrangement in blocklets and starch granule architecture. **Carbohydr. Polym.**, v. 63, p. 555-560, 2006.
- TETLOW, I.J., WAIT, R., LU, Z., AKKASAENG, R., BOWSHER, C.G., ESPOSITO, S., KOSAR-HASHEMI, B., MORELL, M.K., EMES, M.J. Protein Phosphorylation in Amyloplasts Regulates Starch Branching Enzyme Activity and Protein–Protein Interactions. **The Plant Cell**, v. 16, p. 694–708, 2004.
- TUCKER, G.A. Introduction. In: Introduction. In: SEYMOUR, G.B., TAYLOR, J.E., TUCKER, G.A., eds. **Biochemistry of fruit ripening**. London: Chapman & Hall, 1993. cap.1, p.1-17.
- VEEN, H. A theoretical model for anti-ethylene effects of silver thiosulfate and 2,5-norbornadiene. **Acta Hortic.** V. 181, p. 129-134, 1986.
- VIEIRA, D. P. **Atividade e expressão gênica da α -1,4 glicosidase durante o amadurecimento da banana (*Musa acuminata* AAA cv. Nanicão)** São Paulo,

2006 (Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo).

VIEIRA JÚNIOR, A. **Seqüência e caracterização molecular do cDNA de uma α -amilase de banana expressa durante o amadurecimento da banana (*Musa spp.*)** São Paulo, 2001, 78p. (Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo).

VIEIRA JÚNIOR, A. **Alfa e beta-amilase no metabolismo de amido durante o amadurecimento da banana: clonagem, expressão e caracterização molecular.** São Paulo, 2006, 91p. (Tese de Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo).

VILAS BOAS, E.V.B., ALVES, R.E., FILGUEIRAS, H.A.C., MENEZES, J.B. Características da fruta. In: MATSUURA, F.C.A.U., FOLEGATTI, I.S. **Banana: Pós-colheita.** Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2001, p.15-19.

WANG, S.M., LUE, W.L., EIMER, T. K., CHEN, J. Phytohormone regulated beta-amylase gene expression in rice. **Plant Mol Biol**, v. 31, p. 975–982, 1996.

WEGRZYN T. e MACRAE E. Alpha-amylase and starch degradation in kiwifruit. **J. Plant Physiol.** v. 147, n. 1, p. 19-28, 1995.

WEGRZYN, T., REILLY, K., CIPRIANI, G., MURPHY, P., NEWCOMB, R., GARDNER, R., MACRAE, E. A novel alpha-amylase gene is transiently upregulated during low temperature exposure in apple fruit. **Eur. J. Biochem.** V. 267, n.5, p. 1313-1322, 2000.

WEISE, S.E., WEBER, A.P.M., SHARKEY, T.D. Maltose is the major form of carbon exported from the chloroplast at night. **Planta**, v. 218, p. 474-482, 2004.

WESELAKE, R.J., HILL, R.D. Inhibition of alpha-amylase catalysed starch granule hydrolysis by cycloheptamylose. **Cereal Chemistry**, v. 60, p. 98, 1983.

- WHITAKHER, J.R. **Principles of enzymology for the food sciences**. 2 ed. New York: Marcel Dekker, Inc. 1994, cap. 15, p. 391-423.
- WILD, H.P.J., BALK, P.A., FERNANDES, E.C.A., PEPPELENBOS, H.W. The action site of carbon dioxide in relation to inhibition of ethylene production in tomato fruit. **Postharvest Biol. Technol.** v. 36, n. 3, p. 273-280, 2005.
- WILLS, R.B.H., KU, V.V.V. Use of 1-MCP to extend the time to ripen of green tomatoes and postharvest life of ripe tomatoes. **Postharvest Biol. Technol.**, v. 26, p. 85-90 2002.
- ZEEMAN, S.C.; THORNEYCROFT, D.; SCHUPP, N.; CHAPPLE, A.; WECK, M.; DUNSTAN, H.; HALDIMANN, P.; BECHTOLD, N.; SMITH, A.M.; SMITH, S.M. Plastidial α -glucan phosphorylase is not required for starch degradation in Arabidopsis leaves but has a role in the tolerance of abiotic stress. **Plant Physiol.**, p. 135, 1-10, 2004.
- ZIEGLER, P. Cereal beta-amylases. **J. Cereal Sci.** V. 29, p. 195-204, 1999.