

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

Ocorrência e biossíntese de frutooligossacarídeos em banana

Roberta Ghedini Der Agopian

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientador:
Prof. Tit. Franco Maria Lajolo

SÃO PAULO
2009

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

Ocorrência e biossíntese de frutooligossacarídeos em banana

Roberta Ghedini Der Agopian

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientador:
Prof. Tit. Franco Maria Lajolo

SÃO PAULO
2009

Ao Gil, com amor, admiração e gratidão
por sua compreensão, carinho e
incansável apoio ao longo desta
minha jornada!

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Franco Maria Lajolo. Obrigada pela confiança que depositou em mim e por me deixar fazer parte de seu grupo de pesquisa.

Ao Prof. João Roberto Nascimento, pela atenção e valiosas sugestões.

Em especial agradeço à Profa. Beatriz Cordenunsi e ao Prof. Eduardo Purgatto, pelo carinho, amizade, incentivo e apoio em todos os momentos. Obrigada pela eficiência, conhecimento e competência que fizeram deste um trabalho possível!

Ao Instituto de Botânica, especialmente ao departamento de Fisiologia e Bioquímica de Plantas por colocar a disposição a área experimental e o laboratório.

À Dra. Maria Ângela Machado de Carvalho e a Dra. Amanda Francine Asega pelo auxílio nos primeiros anos de trabalho.

Às minhas queridas amigas, Claudinéia, Fernanda, Silvia, Cíntia e Paty, pela sinceridade, amizade e pelos momentos muito agradáveis.

Às minhas irmãs, especialmente à Paula, pelo seu exemplo e incentivo a área acadêmica.

A todos os amigos, alunos, e funcionários do Laboratório de Química, Bioquímica e Biologia Molecular de Alimentos, Márcia, Tânia, Lúcia, João Paulo, Neuza, Any, Milana, Marcela, Kátia, Eliana, Aline, Marcelo, Tatiana, Talita, e ex-alunos Janaína, Adriana, Claudinha, Ana Cris, Lena, Marcinha, Lucile, Selma, Maurício, Denise, Gabi, Malu e Dêra.

Aos doutores Adair Vieira Júnior, pelos anticorpos, e ao Doutor Renato Astorini Filho, pelos conselhos e ajuda.

À Elaine e ao Jorge, da Secretaria de Pós-Graduação, pela amizade, eficiência e atenção.

Em especial à Mônica, Cléo e Edílson, da Secretaria do Departamento, pela amizade, eficiência e atenção.

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

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

RESUMO

AGOPIAN, R.G.D. **Ocorrência e biossíntese de frutooligossacarídeos em banana.** 2009. Tese (Doutorado)- Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

A banana tem sido comumente indicada como uma boa fonte de frutooligossacarídeos (FOS), que são considerados componentes funcionais de alimentos. Contudo, diferenças significantes em suas quantidades têm sido referidas na literatura. Portanto, uma parte do trabalho foi destinada à identificação e quantificação de FOS durante o amadurecimento de cultivares de bananas pertencentes aos grupos genômicos mais comumente cultivados no Brasil. Considerando as diferenças de cultivar, estágio do amadurecimento e metodologia usada para análise de FOS, os conteúdos dos açúcares foram analisados por cromatografia líquida de alta performance (HPAEC-PAD) e cromatografia a gás (CG-MS). Uma pesquisa inicial entre oito cultivares no estágio maduro, mostrou acúmulo de 1-cestose, primeiro membro da série de FOS, em todas elas (quantidades entre 297 e 1600 $\mu\text{g/g}$ M.S). A nistose, o segundo membro, foi detectado somente na cultivar Prata. Com bases nestes dados, foram escolhidas cinco cultivares, para que fossem analisadas durante todo o amadurecimento. Os resultados mostraram uma forte correlação entre a chegada a um nível específico de sacarose (~ 200 mg/g M.S) e a síntese de 1-cestose.

Em uma segunda fase, os níveis de sacarose e FOS total foram quantificados em diferentes fases de amadurecimento de banana Prata, armazenada em temperatura ambiente e em baixa temperatura. As supostas enzimas envolvidas em sua síntese também foram avaliadas. Para explorar a possibilidade da invertase ser responsável pela atividade de frutossiltransferase em banana, foi medido o efeito do inibidor Piridoxal HCl, os níveis de concentração do substrato e as atividades de hidrólise e transglicosilação, e o efeito do tempo no estudo cinético da enzima. A baixa temperatura atrasou todos os eventos analisados por 15 dias e os níveis de sacarose tiveram um pequeno aumento, porém constante, enquanto a banana estava armazenada ao frio, e uma rápida elevação no final do amadurecimento. Foi detectado FOS total desde o primeiro dia pós-colheita, enquanto que a 1-cestose permaneceu indetectável até os níveis de sacarose atingirem aproximadamente 200 mg/g M.S., em ambos os grupos. Os níveis de sacarose e FOS total foram ligeiramente maiores em bananas armazenadas em baixas temperaturas do que em frutos controle. Em ambas as amostras os níveis de FOS total foram maiores que de 1-cestose. Os perfis de carboidratos por HPLC e TLC sugeriram a presença de neocestose, 6-cestose e bifurcose. A enzima supostamente responsável pela atividade de transglicosilação em banana parece ser a invertase. Contudo, os altos níveis de sacarose encontrados em banana armazenadas em baixa temperatura, poderiam ser resultado de várias mudanças de enzimas degradativas e biossintéticas, como sacarose-sintase (SuSy), sacarose-fosfato-sintase (SPS), invertase e outras, uma vez que a sacarose possui um papel central, direta ou indiretamente, em diversas vias do metabolismo de carboidrato em banana. Assim, na última parte do trabalho foram analisados o acúmulo de sacarose e a síntese e atividade de enzimas sintéticas, hidrolíticas e fosforolíticas, importantes no metabolismo de amido-sacarose, durante o amadurecimento de banana

Prata nos dois tratamentos. A baixa temperatura não danificou os frutos, aumentando a vida de prateleira deles. As amostras do frio apresentaram pequeno aumento no nível de degradação de amido e um acréscimo de 20 % na sacarose acumulada durante o amadurecimento. Foi verificado o atraso na produção de etileno, CO₂, e no início de degradação de amido durante o acondicionamento ao frio, concomitante ao atraso no pico de atividade de α -amilase. O atraso no climatério também manteve alta a atividade e síntese protéica de SuSy durante o armazenamento a frio, que declinaram após a retirada do frio, como no controle. As enzimas β -amilase, fosforilase (forma citosólica e plastidial) e SPS reagiram positivamente, sofrendo uma indução positiva na síntese e atividade enzimática durante o armazenamento ao frio, que poderia ser parte do mecanismo necessário para os maiores níveis de açúcares e para o processo de tolerância do fruto à baixa temperatura.

Palavras-chave: Banana Prata. Frutooligossacarídeos. Sacarose. Invertase. Frio.

ABSTRACT

AGOPIAN, R.G.D. **Occurrence and biosynthesis of fructooligosaccharides in banana.** 2009. Thesis (Doctoral)- Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

Banana has been currently indicated as a good source of fructooligosaccharides (FOS), which are considered to be functional components of foods. However, significant differences in their amounts in bananas have been observed in the literature. So, a part of this work aims to identify and quantify FOS during ripening in different banana cultivars belonging to the most common genomic groups cultivated in Brazil. Considering that these differences can be due to cultivar, stage of ripening, and the methodologies used for FOS analyses, sugar contents were analyzed by high performance anion exchange chromatography pulsed amperometric detection (HPAEC-PAD) and gas chromatography- mass spectrometry (GC-MS). An initial screening of eight cultivars in a full-ripe stage showed that 1-Kestose, the first member of the FOS series (amounts between 297 and 1600 $\mu\text{g/g}$ of D.M.), was accumulated in all of them. Nystose, the second member, was detected only in Prata cultivar. Five of the cultivars were analyzed during ripening, and a strong correlation could be established with a specific sucrose level (~ 200 mg/g of D.M.), which seems to trigger the synthesis of 1-Kestose.

In a second part of this work, the levels of sucrose and total-FOS were quantified in different phases of banana Prata ripening stored at ambient and low temperature. The supposed enzymes involved in their synthesis were also evaluated. To explore the possibility that invertase could be responsible for the fructosyltransferase activity in banana, we measured the effect of the inhibitor Pyridoxal HCl, the level of substrate concentration on both hydrolyze and transglycosylase activity in the same protein extract and the effect of time on kinetic study of the enzyme. The cold temperature delayed all the analyzed events for 15 days and sucrose levels increased low, but constantly, while banana were stored at low temperature and had a burst when it increased. Total-FOS were detected in the first days after harvest, while 1-kestose remained undetectable until the sucrose levels were around 200 mg.g (dry weight), in both groups. Total-FOS and sucrose levels were higher in banana stored at low temperature than in control. In both samples total-FOS levels were higher than 1-kestose. The carbohydrate profiles by HPLC and TLC suggest the presence of neokestose, 6-kestose and bifurcose. The enzyme supposed to be responsible for the transglycosylation activity in banana, seems to be an invertase. However, the higher sucrose levels found in banana stored at low temperature could be result of several changes in biosynthetic and degradative enzymes, such sucrose-synthase, sucrose-phosphate-synthase, invertase and others, once that sucrose plays a central role in a lot of direct and indirect carbohydrate pathways in banana fruits.

So, in the last part of this work, we analyzed the sucrose accumulation and synthesis and activity of synthetic, hydrolytic and phosphorolytic enzymes that are important in the starch-sucrose metabolism during ripening of banana Prata stored at ambient and low temperature. The levels of starch degradation and sucrose accumulation (around 20% over) showed high levels in cold fruits as compared with control, during the ripening. The cold temperature delayed the ethylene and CO_2 production, and the beginning of the

starch degradation, concomitantly with a delay in the profile of α -amylase synthesis and activity. The late climateric also maintained the high synthesis and activity of SuSy during the cold storage that decreased just after ending the cold exposure. The β -amylase, phosphorylase (plastidial and cytosolic forms) and the SPS enzymes showed a positive induction in the both activity and synthesis of protein during the cold storage. It could be important to the higher sugars levels showed at low temperature and that could contribute to the process of cold resistance in banana fruit.

Key words: Banana Prata. Fructooligosaccharides. Sucrose. Invertase. Cold storage.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	1
1. O METABOLISMO AMIDO-SACAROSE EM BANANA.....	1
1.2. A SACAROSE	4
1.3. O EFEITO DO FRIO NAS ENZIMAS DO METABOLISMO AMIDO-SACAROSE E NA SÍNTESE DE FRUTANOS.	5
2. FRUTANOS.....	8
2.1. DEFINIÇÃO E ORIGEM.....	8
2.2. BENEFÍCIOS A SAÚDE	9
2.3. ESTRUTURA E CLASSIFICAÇÃO	11
2.4. SÍNTESE DE FRUTANOS	12
2.5. ATIVIDADE DE TRANSGlicosILAÇÃO DA INVERTASE E SÍNTESE DE FOS	14
2.6. FRUTANOS EM BANANA	15
OBJETIVOS	17
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	18
CAPÍTULO I	28
IDENTIFICAÇÃO DE FRUCTOOLIGOSSACARÍDEOS EM DIFERENTES CULTIVARES DE BANANA	28
1. INTRODUÇÃO	28
2. MATERIAIS E MÉTODOS	32
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	36
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48
CAPÍTULO II	51
A SÍNTESE DE FRUCTOOLIGOSSACARÍDEOS EM BANANA E SUA RELAÇÃO COM A ATIVIDADE DE INVERTASE E O ACÚMULO DE FOS E SACAROSE	51
1. INTRODUÇÃO	51
2. MATERIAIS E MÉTODOS	53
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	59
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76
CAPÍTULO III	81
O ACÚMULO DE SACAROSE E O EFEITO DO ARMAZENAMENTO AO FRIO DURANTE O AMADURECIMENTO DE BANANA PRATA	81
1. INTRODUÇÃO	81
2. MATERIAIS E MÉTODOS	84
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	90
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	105
CONCLUSÕES	112
ANEXOS	113

ÍNDICE DE FIGURAS

INTRODUÇÃO

Figura 1. Esquema estrutural de frutooligossacarídeos com grau de polimerização (DP 2-4) de acordo com a análise estrutural de *Asparagus officinalis* (Shiomi, 1989, 1993), folha de *Avena sp.* (Livingston et al, 1993), modificado a partir de Avigad and Dey (1997): Metabolismo de carboidratos: carboidratos de reserva.....**12**

Figura 2. Modelo de biossíntese de frutanos em plantas proposto por Vijn and Smeekens (1993) e modificado por Sims (2003).....**14**

CAPÍTULO I

Figura 1. (A e B) Cromatogramas através de cromatografia a gás acoplado a espectrômetro de massa de 1-cestose (padrão) e extrato de açúcar de banana Mysore. O pico em 20,02 minutos representa o pico de 1-cestose. (C e D) Espectros de massa parciais de 1-cestose, indicando a presença de íons característicos em 217 e 361 m/z.....**37**

Figura 2. Cromatograma parcial de extrato de açúcares de amostras de diferentes cultivares de banana. As setas indicam a presença de nistose em amostra de banana Prata e em solução padrão (0,5 µg/ µL).....**39**

Figura 3. Espectro de massas de fragmentação iônica por CG-MS de solução padrão de nistose e extrato de açúcares solúveis de banana Prata. A variação da relação entre os íons 217:361 foi estatisticamente diferente (** p< 0,01) entre as amostras das cultivares de banana e o padrão de nistose, com exceção da banana Prata.....**40**

Figura 4. Perfis de sacarose e 1-cestose em cinco cultivares de banana. As cultivares foram amostradas no período que compreende os estágios pré e pós-cilmatérico, abrangendo todo o processo de amadurecimento do fruto. Os resultados foram expressos como média de triplicata de análise ± erro padrão da média. O gráfico em semilog mostra a correlação entre os níveis de sacarose e 1-cestose durante o processo de amadurecimento da cultivar Terra.....**46**

CAPÍTULO II

Figura 1. Acúmulo de sacarose, 1-cestose e FOS total durante o amadurecimento de banana Prata controle (19 °C) e armazenada ao frio (10 °C). Os resultados foram expressos como média da triplicata de análise ± erro padrão da média. A linha tracejada representa o fim do armazenamento ao frio.....**60**

Figura 2. Cromatografia através de HPLC-PAD do extrato de açúcar de banana Prata 10 DPC. Os padrões de 1-cestose e de nistose são indicados pelas setas. As letras A, B, C e D correspondem aos picos de carboidrato entre 1-cestose e nistose, com possível formação para FOS.....**63**

Figura 3. Cromatografia em camada delgada (sílica-gel) de extrato de açúcar de banana Prata 10 DPC (amostra controle) e padrão *Helianthus tuberosus* (H. T.), com desenvolvimento triplo em sistema de solvente propanol: acetato de etila: água (45: 35:20) e revelador específico para frutose de uréia – ácido fosfórico, seguido de aquecimento a 110 °C por 5 minutos. I e II indicados pela flecha correspondem a FOS com grau de polimerização 3 (DP3).....**64**

Figura 4. Perfil de atividade de transglicosilação da invertase em extrato bruto e parcialmente purificado de banana Prata (controle 10 DPC), incubado em diferentes concentrações de sacarose (100 mM, 600 mM e 1,2 M). O produto de atividade foi quantificado pelos teores de 1-cestose a partir da análise por HPAEC-PAD após 0, 2, 4, 12, 36 e 60 horas.....**67**

Figura 5. (A) Cromatografia em HPAEC-PAD de extrato protéico de banana Prata controle (10 DPC) após ensaio com incubação de 6 horas com diferentes concentrações de sacarose. A seta indica a presença de um açúcar com estrutura distinta de FOS. (B) Corresponde ao ensaio da atividade de hidrólise da invertase em extrato protéico de banana Prata (10 DPC) após diferentes tempos de incubação em 20 mM de sacarose.....**70**

Figura 6. (A) Cromatografia por HPAEC-PAD dos produtos de síntese do ensaio de extrato protéico de banana Prata (controle 10 DPC) após incubação com sacarose 600 mM em diferentes intervalos de tempo. A seta indica o maior pico de formação de açúcar após 24 horas de ensaio enzimático. (B) Efeito da atividade de hidrólise da Fructanase sobre os produtos de reação do ensaio do extrato protéico de banana Prata após incubação overnight. I, III e IV correspondem aos produtos de FOS e II a formação de açúcar resistente a ação da enzima.....**71**

Figura 7. Cromatografia líquida (HPAEC-PAD) dos produtos de carboidrato sintetizados a partir da atividade de transglicosilação da invertase em extrato de banana Prata (controle 10 DPC) com e sem a presença de Piridoxal HCl (10 mM).....**74**

CAPÍTULO III

Figura 1. Perfis da produção de etileno (A) e CO₂ (B) em frutos do grupo controle (▲) e armazenados em baixa temperatura (●), durante o amadurecimento. A seta indica a retirada dos frutos armazenados ao frio para temperatura de 19 °C, até o fim do amadurecimento dos frutos. Os resultados foram expressos como média de quadruplicata de análise mais o desvio padrão das médias. As linhas tracejadas indicam o aumento da produção de etileno e CO₂ em ambos os tratamentos, com intervalo de 13 dias pós-colheita.....**91**

Figura 2. Perfis de degradação de amido (A), acúmulo de sacarose (B), acúmulo de glicose (C), e frutose (D) durante o amadurecimento dos frutos controle e frio. As setas indicam o fim do armazenamento ao frio. A linha tracejada indica o início de degradação do amido concomitantemente com o início do acúmulo de açúcares solúveis em ambos tratamentos.....**93**

Figura 3: Análise de síntese de sacarose total durante o amadurecimento dos frutos controle e frio. Os valores indicados na tabela correspondem à área total abaixo das colunas verticais em cada tratamento, obtidas pelo programa Graph Pad Prism 4.0.....**94**

Figura 4. Perfis de atividade de α -amilase, β -amilase e fosforilase (sentido de degradação do amido) durante o amadurecimento dos frutos controle (19°C) e acondicionados ao frio (10°C). Western blotting contra α e β -amilase a partir de $50\ \mu\text{g}$ de proteína da polpa. Western blotting com anticorpo específico de α -glucano-fosforilase plastidial contra $10\ \mu\text{g}$ de proteína total de polpa de banana. O anticorpo secundário usado para fosfatase alcalina (1:30000).....**99**

Figura 5. Perfis de atividade enzimática de SPS e SuSy em banana Prata controle e acondicionadas ao frio, durante o amadurecimento. Western blotting a partir de $20\ \mu\text{g}$ de extrato protéico contra soro anti-SS e anti-SPS. As setas indicam o fim do armazenamento ao frio.....**103**

ÍNDICE DE TABELA

Tabela 1. Teores de açúcares solúveis e umidade em diferentes cultivares de banana pertencentes a grupos genômicos distintos, no estágio maduro. 42

INTRODUÇÃO

1. O METABOLISMO AMIDO-SACAROSE EM BANANA

A degradação de amido consiste um dos principais eventos no processo de amadurecimento de bananas, uma vez que este pode representar 20 a 25% do peso fresco do fruto, podendo ser rapidamente degradado no período climatérico, sendo uma grande quantidade convertida em açúcares solúveis (CORDENUNSI e LAJOLO, 1995). Considerando a estrutura do grânulo de amido e as atividades enzimáticas encontradas em polpa de banana, parece que tanto a via fosforolítica (MOTA et al., 2002; MAINARDI et al., 2006), quanto à via hidrolítica (PURGATTO et al., 2001; BASSINELLO et al., 2002; NASCIMENTO et al., 2006) podem ter um importante papel neste processo. Logo, várias enzimas parecem contribuir ao longo da degradação do grânulo de amido, entre elas as α -amilases (E.C. 3.2.1.1.); as β -amilases (E.C. 3.2.1.2.) e as fosforilases (E.C. 2.4.1.1.).

A mobilização do grânulo de amido envolve a conversão da insolúvel, matriz semicristalina, formada de amilopectina e amilose, para açúcares solúveis que podem ser substratos para metabolismo intermediário. As α -amilases são endoamilases que atuam nas ligações α -1,4 da amilose e da amilopectina. Os produtos principais após sua ação hidrolítica são as dextrinas, maltoses e maltotrioses.

Apesar de ter sido mostrada a importância da α -amilase para o início de degradação de amido durante a germinação de cereais (BECK e ZIEGLER, 1989), pouco é conhecido desta enzima em outros tecidos e em outras plantas. Estudos em *Arabidopsis thaliana* mostraram que o início da degradação de amido poderia ocorrer

sem a atuação desta enzima, ou que novas formas de endoamilases poderiam atuar neste processo (SMITH et al., 2005). Zeeman et al. (2007), sugerem que a α -amilase participa da degradação do amido, porém a sua ausência poderia ser compensada pela atuação de outras enzimas.

Em estudos com banana, Vieira Júnior (2006), observou que apesar de encontrados baixos níveis de transcritos para α -amilase, sua atividade apresentou um sutil aumento ao longo do amadurecimento.

As β -amilases são exoenzimas que atuam nas ligações α -1,4 glicosídicas, atuando apenas na penúltima ligação da extremidade não redutora do substrato. Esta enzima vem sendo apontada, recentemente, como enzima chave na hidrólise de amido transitório (SHARKEY et al., 2004; SMITH et al., 2005). Em *Arabidopsis* foram localizados 9 isoformas da β -amilase, distribuídas entre o citosol, o cloroplasto, e o vacúolo das células. (KAPLAN et al., 2006).

Scheiding et al. (2002), mostraram que a ausência de uma isoforma de β -amilase direcionada ao cloroplasto em batata causou o acúmulo de amido. Kaplan e Guy (2005) mostraram, também, que a falta desta enzima em *Arabidopsis* causou o mesmo fenótipo, resultado de acordo com trabalhos anteriores (SMITH et al., 2005). Schidig et al. (2002) analisaram a atividade da proteína de batata *in vitro*, verificando que além da atividade em substrato solúvel, a β -amilase também é capaz de liberar pequenas quantidades de maltose a partir de grânulo de amido isolado de batata.

Em banana, foi observado o aumento da atividade enzimática de β -amilase com o início da degradação de amido (GARCIA e LAJOLO, 1988). Quanto ao mecanismo de regulação da expressão desta enzima, Nascimento et al. (2006) observaram uma forte

indução de β -amilase durante o amadurecimento do fruto e o aumento da atividade também altamente correlacionado com o processo de degradação de amido, exceto para frutos tratados com 1-MCP, um antagonista do etileno. Portanto, a atividade de β -amilase parece ser primariamente dependente da expressão para este gene, e a ausência de β -amilase para frutos com 1-MCP poderia indicar que a tradução para esta enzima é altamente dependente de etileno (NASCIMENTO et al., 2006).

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 produzindo glicose-1-fosfato (degradação) ou transferem glicose (da glicose-1-fosfato) para cadeias de α -1,4-glicanos e alongando a cadeia (síntese). Elas ocorrem como isoformas plastidial (Pho 1) e citossólica (Pho 2), que diferem não apenas na localização mas também nas propriedades cinéticas e afinidades pelo substrato.(MOTA et al., 2002).

Estudos recentes com banana mostraram que a atividade de fosforilase aumenta com o amadurecimento do fruto e que seus níveis máximos são atingidos durante a mobilização do amido (MAINARDI et al., 2006). Neste mesmo estudo, foi observado que frutos tratados com 1-MCP resultaram no aumento da atividade total da enzima, sugerindo que a ausência da percepção ao etileno teria um efeito positivo na atividade da fosforilase. No entanto, o efeito mais pronunciado sobre a isoforma Pho1, também sugeriu que esta poderia ser mais propícia à regulação pelo etileno. Portanto, estes autores sugeriram que o efeito positivo na fosforilase em frutos tratados com antagonista de etileno poderia ser um mecanismo compensatório da inibição de outras

enzimas responsáveis pela degradação de amido, como uma forte indicação desta enzima no processo de mobilização do amido.

Apesar de Mota et al. (2002) observarem que a quantidade de proteína não ser claramente correlacionada com as mudanças na atividade de fosforilase em banana durante o amadurecimento, Mainardi et al. (2006) indicaram que as mudanças na atividade da enzima eram principalmente dependentes da modulação da expressão deste gene. Estes resultados estão de acordo ao fato que Mota et al. (2002) não observaram qualquer indício de regulação alostérica ou metabólica para a enzima, apesar dos estudos de caracterização cinética de fosforilase de banana, enquanto Mainardi et al. (2006) observaram que o efeito positivo na atividade da enzima estavam de acordo com maiores níveis de mRNA e proteína.

1.2. A SACAROSE

Em bananas, a transição do carbono entre o amido e a sacarose constitui a principal rota de mobilização e compartimentação do metabolismo de carboidrato. Durante o natural processo do amadurecimento da banana ocorre à modulação da atividade de ambas as enzimas de metabolização do amido e biossíntese da sacarose, como da Sacarose-sintase (SuSy) e Sacarose-fosfato-sintase (SPS). Em estudos com a banana, foi verificado que a atividade de SuSy foi mantida alta e constante durante a fase do desenvolvimento do fruto, correspondente ao período de síntese de amido, porém declinou drasticamente durante o período de hidrólise de amido no amadurecimento do fruto (CORDENUNSI e LAJOLO, 1995). No entanto, ainda durante o amadurecimento da banana foi verificado o aumento da atividade de SPS

concomitantemente com a mobilização do amido e acúmulo da sacarose, sugerindo então a participação da SuSy na síntese de amido e de SPS na síntese de sacarose.

Apesar da limitação do substrato possuir um importante papel no processo de regulação destas enzimas, as atividades de SuSy e SPS parecem ser reguladas pelo controle da expressão de seus respectivos genes (NASCIMENTO et al., 1997, 2000). No entanto, um estudo recente em banana mostrou que a influência de alguns fatores no amadurecimento do fruto, como os níveis de etileno, auxina e baixa temperatura alteravam diretamente os níveis de mRNA, atuando diretamente na regulação da transcrição do gene para esta enzima.

Apesar de poucos estudos em relação à influência da baixa temperatura ao longo do amadurecimento da banana, o frio parece atuar na regulação da síntese e atividade de muitas enzimas do metabolismo de amido-sacarose em outros vegetais, como também nas enzimas relacionadas à síntese de frutanos e seus derivados, discutidos adiante.

1.3. O EFEITO DO FRIO NAS ENZIMAS DO METABOLISMO AMIDO-SACAROSE E NA SÍNTESE DE FRUTANOS.

Muitos mecanismos têm sido considerados para explicar a tolerância de plantas ao efeito da baixa temperatura, como o acúmulo de açúcar, alta mobilização do amido e aumento da atividade de endo e exo amilases (COCHRANE et al., 2001; COTTRELL et al., 1993) e amido-fosforilase (CLAASEN et al., 1993) e aumento da atividade de enzimas envolvidas na síntese de sacarose, como da sacarose-fosfato-sintase (REIMMOLZ et al., 1997; HILL et al., 1996).

Wegrzyn et al. (2000) demonstraram que em maçãs amadurecidas sob baixa temperatura ($0,5^{\circ}\text{C}$), o transcrito de α -amilase se acumulou temporariamente até os primeiros dias do amadurecimento, com altos níveis de mRNA sendo observados do 3º ao 9º dia e não sendo detectado posteriormente, evidenciando a expressão da α -amilase como uma resposta ao frio.

Estudos recentes sugerem que o nível de transcritos e a atividade variam em diferentes isoformas de β -amilase, que podem também ser reguladas por diferentes estímulos em resposta ao frio, calor e umidade. Uma das isoformas cloroplásticas desta enzima em *Arabidopsis*, tem sido observada como resposta à proteção ao stress ao frio, principalmente na mobilização de açúcares. (KAPLAN et al, 2006).

A atividade de fosforilase em tubérculos de batata armazenados em temperaturas de 2, 4 e 8°C , apresentaram forte interação com a temperatura, tempo de duração do armazenamento e acúmulo de açúcar. Portanto, foi sugerida que o aumento da atividade desta enzima com o frio atuaria como um evento sinalizador do adoçamento de batata durante o armazenamento no frio (CLAASSEN et al., 1993).

Muitas vezes a adaptação das plantas a baixas temperaturas envolve o acúmulo de açúcares solúveis, principalmente a sacarose, no qual tem sido ligado ao aumento da atividade de SPS. Tanto em espinafre como em batata tem sido observado o máximo da atividade de SPS como resultado da exposição ao frio, em paralelo com o aumento da síntese dos níveis de proteína desta enzima (GEIGENBERGER et al., 1995; GUY et al., 1992). Em batata, este aumento da atividade de SPS no acondicionamento ao frio tem sido associado com o aparecimento de novas formas de SPS (REIMHOLZ et al., 1997).

Além destas enzimas relacionadas ao metabolismo amido-sacarose, foi observado que em gramíneas, a exposição a baixas temperaturas poderia também induzir a síntese de frutanos, que ocorreria em resposta ao próprio acúmulo da sacarose (POLLOCK e CAIRNS, 1991). O conteúdo de frutano e seu metabolismo têm sido verificados com uma estreita relação com a tolerância ao frio e a seca (YOSHIDA et al., 1998).

Santoiani et al. (1993) observaram que além do aumento da atividade das enzimas relacionadas à síntese de frutanos em mais de 25 vezes no frio, também ocorreu o aumento da atividade de enzimas ligadas a síntese de sacarose, como sacarose-fosfato-sintase (SPS) e sacarose-sintase (SuSy), em trigo exposto a baixas temperaturas.

No entanto, plantas são organismos sensíveis e conhecidos por possuírem vários mecanismos regulatórios para sua defesa em condições de stress ambiental. Porém, a tolerância a este stress é um processo bastante complicado que não pode ser explicado pela simples ação de uma enzima ou de um mecanismo individual (VALLURU et al., 2008). Além disso, estes mecanismos regulatórios parecem variar bastante entre organismos pertencentes à mesma espécie de plantas, com diferenças apenas em grupos genômicos e cultivar. Por exemplo, um estudo sobre a resistência de bananas ao frio verificou a tolerância ao armazenamento ao frio de apenas uma cultivar, a banana Prata, porém que pertencia ao mesmo grupo genômico de outras cultivares analisadas (LICHTENBERG et al., 2001). Porém, os possíveis eventos envolvidos na tolerância desta cultivar ao frio sobre as demais amostras de banana, não foram estudados. Isto porque, apesar da refrigeração ser um método muito eficiente no

controle do amadurecimento da banana, ela parece atuar em diversos processos fisiológicos e bioquímicos do fruto (JIANG et al., 2004).

2. FRUTANOS

2.1. DEFINIÇÃO E ORIGEM

Frutanos são oligo e polissacarídeos formados primariamente por unidades de frutose que, depois de amido e sacarose, são provavelmente o mais abundante carboidrato de reserva encontrado em plantas (AVIGAD e DEY, 1997). O acúmulo destes polímeros de frutanos ocorre principalmente em raízes, tubérculos ou bulbos em numerosas plantas como em Alliaceae, Liliaceae, Compositae e em outras famílias de angiospermas, além de também ser encontrado em sementes de gramíneas. Embora sua presença tenha sido extensivamente descrita, em aproximadamente 36.000 espécies de planta (FLICKINGER et al., 2003), o estudo destes polímeros tem sido mais realizado em algumas espécies como: alcachofra de Jerusalem (*Helianthus tuberosus* L.), chicória (*Cichorium intybus* L.), dente de leão (*Taraxacum officinale*), alcachofra (*Cynara scolymus* L.), entre as Asterales, alho (*Allium sativum* L.), cebola (*Allium cepa* L.), aspargo (*Asparagus officinalis* L.), entre as Liliales e trigo (*Triticum aestivum* L.), cevada (*Hordeum vulgare* L.) e gramíneas (*Lolium perenne* L., *L. temulentum* L.). (AVIGAD e DEY, 1997).

2.2. BENEFÍCIOS A SAÚDE

A utilização de frutanos em função de seu benefício fisiológicos destinados a saúde está primeiramente relacionado a sua função como fibra dietética, devido a diminuição dos níveis lipídicos e de glicose no sangue, além de sua ação laxativa (CAMIRE et al, 2001). Outro benefício comprovado de sua ingestão é sua capacidade de modular a flora intestinal (ROBERFROID et al., 1998; SCHNEEMAN, 1999), devido seu efeito de prebiótico, aumentando o número de bactérias benéficas ao cólon intestinal (RAO, 1999; JENKINS, et al., 1999). Os frutanos e seus derivados possuem um pequeno valor calórico (máximo de 1,5 Kcal/g), atribuído à resistência a enzimas digestivas e posterior hidrólise pela fermentação através da seletiva flora intestinal do intestino grosso (GIBSON et al., 1995; ROBERFROID et al., 1995; CUMMINGS et al., 2001). Pela fermentação na mucosa intestinal, são formados ácidos graxos de cadeia curta que parecem estar relacionados á redução de colesterol sanguíneo. (FIORDALISO et al., 1995). A fermentação dos frutanos também estimula a motilidade intestinal (ROBERFROID, 1993) e previne a constipação intestinal (HOND et al., 2000). A produção de ácido láctico pelo processo fermentativo parece também prevenir a incidência de câncer de cólon intestinal (WARGOVICH et al., 1996), devido á redução das atividades das enzimas relacionadas ao processo carcinogênico.

Experimentos com ratos e humanos indicaram um incremento da absorção de cálcio e outros minerais a partir da ingestão de frutanos na dieta (GREGER, 1999; ROBERFROID et al., 2002). Em adolescentes, também foram observados estes efeitos com a ingestão de doses pouco maiores (ABRAMS et al., 2005; BOSSCHER et al.,

2005). Também tem sido demonstrados o efeito positivo dos frutanos e seus derivados na absorção de magnésio (COUDRAY et al., 2003).

Em relação ao câncer, foi demonstrado que a administração de prebióticos (inulina e frutooligosacarídeos) diminuem o crescimento de câncer em cólon de ratas (PIETRO et al., 2002). O mecanismo ainda não está completamente elucidado, mas os resultados parecem apontar como responsável à ação combinada de dois fatores: o aumento dos ácidos graxos de cadeia curta (produzidos pela fermentação dos prebióticos) e a diminuição da proliferação de enzimas envolvidas na patogênese do câncer (PIETRO et al., 2002). Foi também observada a inibição do câncer mamário em ratas com dieta suplementada com inulina (TAPER et al., 1999). Além disso, também tem sido reportado um efeito antimelanoma pelo consumo de inulina (DELZENNE et al., 2002). Portanto, por estes efeitos positivos tem sido recomendada a ingestão de frutanos como fator coadjuvante nas terapias de câncer (ROBERFROID, 2005).

Os frutanos também cumprem uma função importante no melhoramento de fórmulas alimentícias, principalmente em leite infantil para cumprir o efeito de prebiótico, além de aumentar a resistência a infecções intestinais, atenuação das enfermidades inflamatórias do intestino, estimulação do sistema imune e conseqüente resistência a infecções (ROBERFROID, 2005; OLIVEROS et al., 2006).

2.3. ESTRUTURA E CLASSIFICAÇÃO

Os frutanos são formados por adições sucessivas de unidades de frutose com diferentes ligações a três trissacarídeos: 1-cestose (1-F-frutosil sacarose), 6-cestose (6-F-frutosil sacarose) e neocestose (6-G- frutosil sacarose). Estes trissacarídeos são sintetizados pela ligação da unidade de frutose em um dos três grupos hidroxila da sacarose (POLLOCK et al., 1996). Baseando-se nos três trissacarídeos e no tipo de ligação entre as unidades de frutose, cinco tipos diferentes de estruturas de frutanos podem ser distinguidos em plantas superiores, conforme ilustra a Figura 1:

- a) inulina, uma molécula tipicamente linear encontrada em Asteraceae, que contém ligações do tipo β (2,1) e é baseada no trissacarídeo 1-cestose;
- b) levano, que também é uma molécula linear, contém ligações do tipo β (2,6) e é baseado na 6-cestose;
- c) frutanos ramificados e de ligações mistas com unidade terminal de glucose, encontrados em Poaceae;
- d) frutanos baseados na neocestose com ligações β (2,1), encontrado em aspargo, cebola (Liliaceae); e
- e) frutanos baseados na neocestose com ligações β (2,6) encontrados em alguns membros de Poaceae

Inulo-n-ose é uma série de frutanos que não contém a unidade de glicose terminal e que foi encontrada em algumas fases da espécie Asteraceae (CARVALHO et al., 1997). A complexidade estrutural dos frutanos varia de acordo com a ligação glicosídica entre as unidades de frutose, a ramificação de cadeias lineares, a posição da molécula de sacarose na cadeia de açúcar e o comprimento da cadeia.

A razão para a variedade de estruturas de frutanos em plantas é desconhecida; uma razão poderia ser sugerida baseando-se nas diferentes necessidades fisiológicas ou poderia ser uma consequência das diferentes origens evolutivas da biossíntese de frutanos em diferentes famílias (RITSEMA e SMEEKENS, 2003).

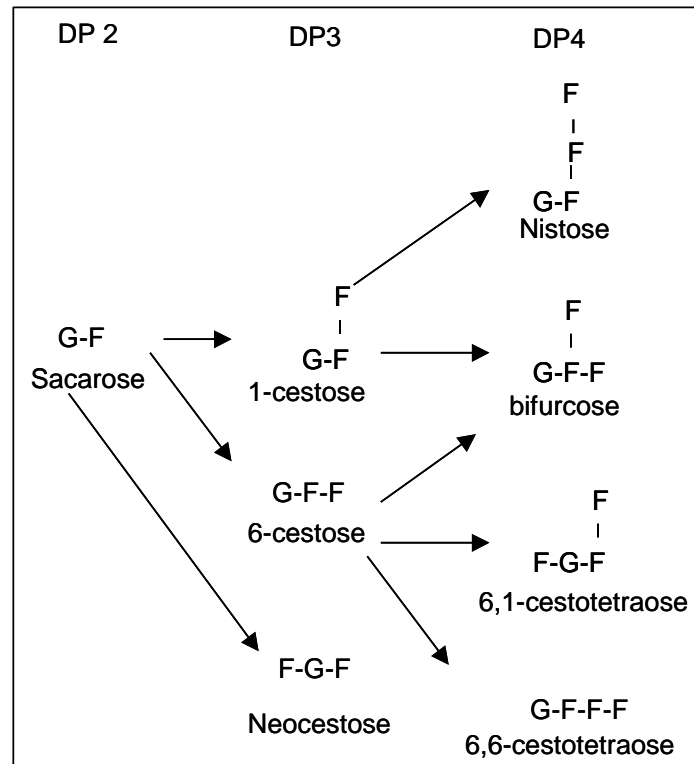


Figura 1. Esquema estrutural de frutooligossacarídeos com grau de polimerização (DP 2-4) de acordo com a análise estrutural de *Asparagus officinalis* (Shiomi, 1989, 1993), folha de *Avena sp.* (Livingston et al., 1993), modificado a partir de Avigad e Dey (1997): Metabolismo de carboidratos: carboidratos de reserva.

2.4. SÍNTESE DE FRUTANOS

O processo de síntese de frutanos em plantas é catalisado por um sistema de enzima multifuncional, originalmente proposto por Edelman e Jefford (1968). Segundo

este modelo, duas enzimas atuam na síntese de frutanos da série da inulina. A primeira enzima, 1 sacarose: sacarose frutossil transferase (1-SST, EC 2.4.1.99), catalisa a transferência de uma unidade frutossil de uma molécula de sacarose para outra, produzindo o trissacarídeo 1-cestose, por uma reação irreversível. A segunda enzima, 1 frutano: frutano frutossil transferase (1-FFT, EC 2.4.1.100), catalisa a transferência reversível da unidade frutossil de uma molécula de frutano com GP = 3 para outra molécula de frutano, ou para a sacarose, resultando em moléculas de frutanos com comprimentos de cadeias variáveis. Diferenças na afinidade da 1-FFT pelo substrato doador e receptor resultam em um padrão diferente de polímeros de inulina (HELLWEGE et al., 1998; HELLWEGE et al., 2000; VERGAUWEN et al., 2003).

No entanto, outras frutossiltransferases também estão envolvidas na biossíntese de outras séries:

- Sacarose: frutano 6 frutossiltransferase (6-SFT, EC 2.4.1.10) é a enzima mais bem caracterizada, responsável pelas ligações β (2,6) nos frutanos do tipo levano e levanos ramificados. Esta enzima catalisa a transferência da unidade de frutose da sacarose para uma ampla variedade de receptores incluindo a sacarose, 1-cestose e 6-cestose, produzindo respectivamente 6-cestose, bifurcose ou frutanos maiores β -(2,6) ligados (Duchateau et al. 1995, Wei et al. 2002).
- Frutano: frutano 6G frutossiltransferase (6G-FFT, EC 2.4.1.243) é a enzima envolvida na biossíntese da neosérie, que catalisa a transferência da unidade de frutose de um frutano para o carbono 6 da unidade de glicose da sacarose, formando o trissacarídeo neocestose, ou para a unidade de glicose de outro

frutano (Shiomi, 1989; Lasseur et al., 2006). A molécula é em seguida alongada com ligações β (2,1) ou β (2,6), produzindo frutanos da neosérie de inulina ou da neosérie de levano, respectivamente.

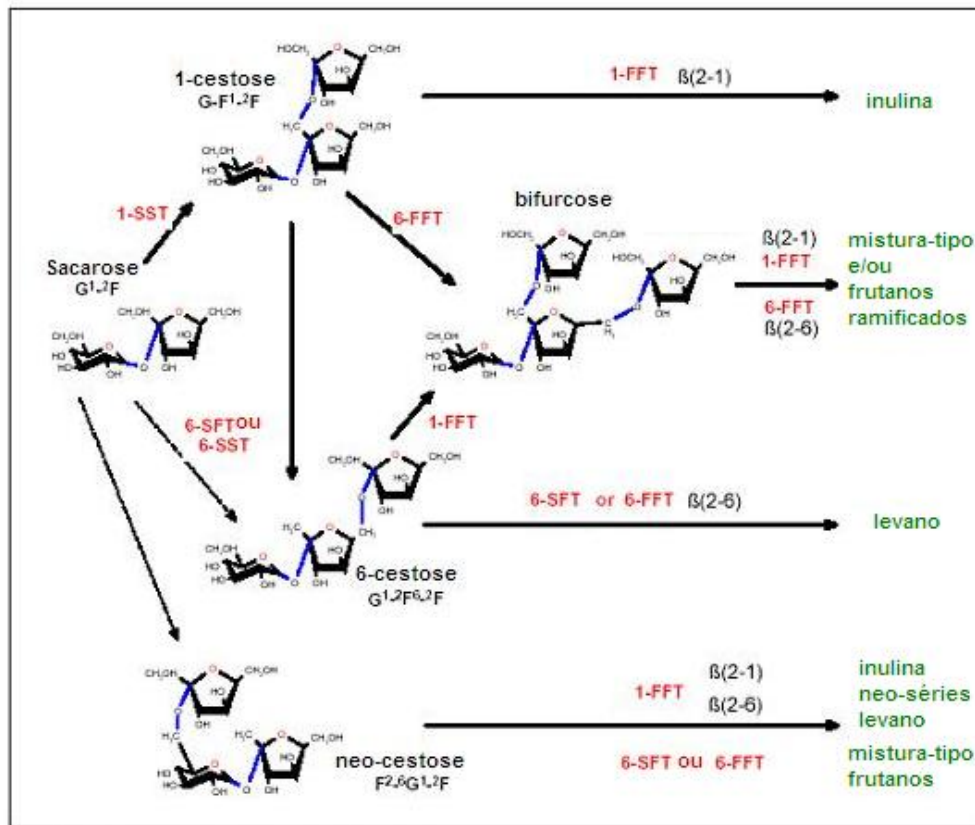


Figura 2. Modelo de biossíntese de frutanos em plantas proposto por Vijn e Smeekens (1993) e modificado por Sims (2003).

2.5. ATIVIDADE DE TRANSGLICOSILAÇÃO DA INVERTASE E SÍNTESE DE FOS

Apesar do modelo bem definido de síntese de frutanos a partir das frutossiltransferases, em estudos anteriores foi verificado que invertases, principalmente ácidas e vacuolares, poderiam também formar os mesmos produtos de trissacarídeos

sintetizados por SST específicas. Esta adicional propriedade da invertase é resultado de sua habilidade de catalisar reações de transfrutoseilação com sacarose como substrato, resultando na formação de vários isômeros de trissacarídeos (frutosilsacarose) tipo-cestose (CAIRNS e ASHTON, 1991; POLLOCK e CAIRNS, 1991). A produção destes oligossacarídeos é diretamente relacionada com a concentração inicial do substrato (a sacarose), e uma vez que os oligossacarídeos e sacarose também são hidrolisados pela própria invertase, sua presença tende a ser usualmente transitória quando sintetizadas por esta enzima.

Através da análise em cromatografia em camada delgada, um trabalho anterior sugeriu a formação de uma pequena quantidade de cestotriose em banana no estágio maduro, pela atividade de transferase da invertase (HEDERSON et al., 1958).

2.6. FRUTANOS EM BANANA

Os níveis de frutanos em banana parecem depender de vários fatores, como a variedade, a cultivar e o estágio do amadurecimento do fruto. No entanto, de forma geral, foi observado que estes níveis aumentam com o amadurecimento do fruto (HOMME et al., 2001). Porém, apesar destas variações, os níveis de frutooligossacarídeos indicados em banana têm apresentados valores bastante discrepantes entre os estudos anteriores, como: 10,9 mg/g de massa seca (CAMPBELL et al., 1997); 4,3 e 6,0 mg em diferentes estágios do amadurecimento da banana (HOMME et al., 2001), e 1,3 mg/g de FOS em banana processada (HOGARTH et al., 2000).

No entanto, o amadurecimento da banana compreende um processo altamente integrado entre enzimas e alterações fisiológicas e bioquímicas que poderiam variar entre as cultivares, além de possivelmente variar com a influência de fatores ambientais, como o stress ao frio, nos quais a síntese e/ou os níveis de frutanos poderiam estar relacionados.

OBJETIVOS

Identificar a presença de frutooligossacarídeos (FOS) em banana e seus níveis entre as cultivares pertencentes a diferentes grupos genômicos. Avaliar a síntese de FOS durante o amadurecimento da banana e as enzimas correlacionadas. Analisar o acúmulo de FOS e de seu substrato, a sacarose, em banana armazenada a baixas temperaturas e verificar o efeito do frio sobre as demais enzimas relacionadas ao metabolismo amido-sacarose em banana.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAMS, S., GRIFFIN, I., HAWTHORNE, K., LIANG, L., GUNN, S., DARLINGTON, G., ELLIS, K. A combination of prebiotic short- and long-chain inulin-type fructans enhances calcium absorption and bone mineralization in young adolescents. **American Journal Clinical Nutrition**, v. 82, p. 471 - 476, 2005.
- AVIGAD, G., DEY, P.M. Carbohydrate metabolism. Storage carbohydrates. **Plant Biochemistry**, p.143-203, 1997.
- BASSINELO, P. Z., CORDENUNSI, B, R., LAJOLO, F. M. Amylolytic activity in fruits: comparison of different substrates and methods using banana as model. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 9, n.50, p.5781 - 5786, 2002.
- BECK, E., ZIEGLER, P. Biosynthesis and Degradation of Starch in Higher Plants. **Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.40, p.95-117.1989.
- BOSSCHER, D., VAN LOO, J., FRANCK, A. Inulin and oligofructose as functional ingredients to improve bone mineralization. **Int. Dairy Journal**, v. 16, p. 1092-1097, 2005.
- BURGER, Y., SCHAFFER, A.A. The contribution of sucrose metabolism enzymes to sucrose accumulation in cucumis melo. **Journal American Society for Horticultural Science**, v. 132 (5), p. 704-712, 2007,
- CAIRNS, A. J., ASHTON, J. E. The interpretation of in vitro measurements of fructosyl transferase activity: na analysis of patterns of fructosyl transferases by fungal invertase. **New Physiologist**, v., 118, p. 23-24, 1991

- CAMIRE, M., CHO, S., CRAIG, S., DEVRIE, J., GORDON, D., JONES, J., LI, B., LINEBACK, D., PROSKY, L., TUNGLAND, B. The definition of dietary fiber. **Cereal Foods World**, v. 46, p. 112-126, 2001.
- CARVALHO, M.A.M., ZAIDAN, L.B.P. & DIETRICH, S.M.C. Growth and fructans contents in plants of *Vernonia herbacea* (Asteraceae) regenerated from rhizophores. **New Phytologist**, v. 136, p.153 -161, 1997.
- CHOUDHURY, S. R., ROY, S., DAS, R., SENGUPTA, D. N. Differential transcriptional regulation of banana sucrose phosphate synthase gene in response to ethylene, auxin, wounding, low temperature and different photoperiods during fruit ripening and functional analysis of banana SPS gene promoter. **Planta**, v. 229, n. 1, p. 207 – 223, 2008.
- CLAASSEN, PAM, BUDDE MAW, VANCALKER MH. Increase in phosphorylase activity during cold-induced sugar accumulation in potato tubers. **Potato Research**, v. 36, p. 205–217, 1993.
- COCHRANE, M. P., DUFFIES, C. M., ALLISON, M. J., MACKAY, G. R. Amylolytic activity in stored potato tubers. 2. The effect of low temperature storage on the activities of α -amylase and β -amylase and 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. **Journal Agriculture and Food Chemistry**, V.43, p.347-351, 1995.
- COTTRELL, J. E., DUFFUS, C. M., PATERSON, L., MACKAY, G. R., ALLISON, M. J., BAIN, H. The effect of storage temperature on reducing sugar concentration on the activities of three amylolytic enzymes in tubers of the cultivated potato. *Solanum tuberosus* L. **Potato Research**, v. 36, p. 107-117, 1993.

- COUDRAY, C., DEMIGNÉ, C., RAYSSIGUIER, Y. Effects of dietary fibers on magnesium absorption in animals and humans. **Journal Nutrition**, v. 133, p. 1-4, 2003.
- CUMMINGS, J. H., MAC FARLANE, G. T., ENGLYST, H. N. Prebiotic digestion and fermentation, **American Journal Clinical Nutrition (suppl)**, v. 73, p. 415-420, 2001.
- DELZENNE N., WILLIAMS, C. Prebiotics and lipid metabolism. **Curr. Opin. Lipidol.**, v. 13, p. 61-67, 2002.
- DUCHATEAU, N., BORTLIK, K., SIMMEN, U., WIEMKEN, A. & BANCAL, P. Sucrose: fructan 6- fructosyltransferase, a key enzyme for diverting carbon from sucrose to fructan in barley leaves. **Plant Physiology**, v. 107, p. 1249 -1255, 1995.
- EDELMAN, J.; JEFFORD, T. G. The mechanism of fructans metabolism in higher plants as exemplified in *Helianthus tuberosus*. **New Phytologist**, v. 67, p. 517-531, 1968
- FIORDALISO, M., KOK, N., DESAGER, J. P., GOETHALS, F., DEBPYSER, D., ROBERFROID, M., DELZENNE, N. Dietary oligofructose lowers serum and VLDL concentration of triglycerides, phospholipids and cholesterol in rats. **Lipids**, v. 30, p. 163 -167, 1995
- FLICKINGER E, VAN LOO J, FAHEY G. Nutritional responses to the presence of inulin and oligofructose in the diet of domesticated animals: **A review. Critical Review and Food Science Nutrition**, v. 43, p. 19 -60, 2003.
- GARCIA, E., LAJOLO, F. M. Starch transformation during banana ripening: the amylase and glucosidase behavior. **Journal and Food Science**, v. 53, p. 1181 – 1186, 1989.

- GEIGENBERGER, P., KRAUSE, K. P., HILL, L. M., REIMHOLZ, R., MACRAE, E., QUICK, P., SONNEWALD, U., STITT, M. The regulation of sucrose synthesis in leaves and tubers of potato plants. *Sucrose metabolism, Biochemistry, Physiology, and molecular Biology*. Rockville, M. D, American Society and **Plant Physiologists**, 1995.
- GIBSON, G. R., BEATTY, E. R., WANG, X., CUMMINGS, J. H. Selective stimulation of bifidobacteria in the human colon by oligofructose and inulin. **Gastroenterology**, v. 108, p. 975-982, 1995.
- GREGER, J. Nondigestible carbohydrates and mineral bioavailability. **Journal Nutrition**, v. 129, p. 1434-1435, 1999
- GUY, C. L., HUBER, J. L. A., HUBER, S. C. Sucrose PhosphateSynthase and sucrose accumulation at low temperature. **Plant Physiology**, v. 100, p. 502-508. 1992.
- HEDERSON, R. W., MORTON, R. K., RAWLINSON, W. A. Oligosaccharide synthesis in the banana and its relationship to the transferase activity of invertase, **Biochemistry Journal**, v. 72, p. 340-344, 1958.
- HELLWEGE, E.M., RAAP, M., GRITSCHER, D., WILLMITZER, L. & HEYER, G.
Differences in chain length distribution of inulin from *Cynara scolymus* and *Helianthus tuberosus* are reflecting in a transient plant expression system using the respective 1-FFT cDNAs. **FEBS Letters** , v. 427, p. 25-28, 1998.
- HELLWEGE, E. M., CZAPLA, S., JAHNKE, A., WILLMITZER, L. & HEYER, G.
Transgenic potato (*Solanum tuberosum*) tubers synthesise the full spectrum of inulin molecules naturally occurring in globe artichoke (*Cynara scolymus*) roots. **PNAS**, v. 97, p. 8699 - 8704, 2000.

- HIDAKA, H., TASHIRO, Y., EIDA, T. Proliferation of bifidobacteria by oligosaccharides and their useful effect on human health. **Bifidobact. Microflora**, v. 10, p. 65-79, 1991.
- HILL, L. M., REIMHOLZ, R., SCHRODER, R., NIELSEN, T. H., STITT, M. The onset of sucrose accumulation in cold-stored potato tubers is caused by an increased rate of sucrose synthesis and coincides with low levels of hexose-phosphates, an activation of sucrose phosphate synthase and the appearance of a new form of amylase. **Plant All Environments**, v. 19, p. 1223-1237, 1996.
- HOGARTH, A. J. C. L., HUNTER, D. E., JACOBS, W. A., GARLEB, K. A., WOLF, B. W. Ion Chromatography determination of three fructooligosaccharide oligomers in prepared and preserved foods. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 8, p. 5326-5330, 2000.
- HOMME, C. L., PESCHET, J. L., PUIGSERVER, A., BIAGINI, A. Evaluation of fructans in various fresh and stewed fruits by high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection. **Journal of Chromatography A**, v. 920, p. 291-297, 2001.
- HONDA, E. D., GEYBENS, B., GHOOS, Y. Effect of high performance chicory inulin on constipation. **Nutrition. Research**, v. 20, p. 731 - 736, 2000.
- JENKINS D, KENDALL C, VUKSAN W. Inulin, oligofructose and intestinal function. **Journal Nutrition**, v. 129, p. 1431-1433, 1999;
- JIANG, Y., JOYCE, D. C., JIANG, W, LU, W. Effects of chilling temperatures on ethylene binding by banana fruit. **Plant Growth Regulation**, v. 43, p. 109- 115, 2004.
- 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.

- KAPLAN, F., GUY, C. L. RNA interference of Arabidopsis beta-amylase prevents maltose accumulation upon cold shock and increase sensitive of PSII photochemical efficiency to freezing stress. **The Plant Journal**, v.44, p. 730-743, 2005.
- LIVINGSTON, D. F., CHATTERTON, N. J., HARRISON, P. A. **New Phytologist**, v. 123, p. 725- 7734, 1993.
- 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 r-1,4-Glucan-phosphorylase during Banana Ripening. **Journal Agriculture and Food Chemistry**, v. 54, p. 7294-7299, 2006.
- MOTA, R. V. DA., LAJOLO, F. M., CORDENUNSI, B. R. Composição de carboidratos em alguns cultivares de banana (*Musa ssp.*) durante o amadurecimento. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 17, (2), p. 94-97, 1997.
- MOTA, R. V., CORDENUNSI, B. R., NASCIMENTO, J. R. O, PURGATTO, E., ROSSETO, M. R. M., LAJOLO, F. M. Activity and expression of banana starch phosphorylase during fruit development and ripening. **Planta**, v.216, n.2, p. 325-333, 2002.
- NASCIMENTO, J. R. O., CORDENUNSI, B. R., LAJOLO, F. M. Sucrose synthase activity and expression during development and ripening in bananas. **Journal Plant Physiology**, v.156, p.605-611, 2000.
- NASCIMENTO, J. R. O., CORDENUNSI, B. R., LAJOLO, F. M., ALCOCER, M. J. C. Banana sucrose-phosphate synthase gene expression during fruit ripening. **Planta**, v.203, n.3, p.283-288, 1997.

- NACIMENTO, J. R. O., VIEIRA-JÚNIOR, A., BASSINELO, P. Z., CORDENUNSI, B. R., MAINARDI, J. A., PURGATTO, E., LAJOLO, F. M. Beta-amylase expression and starch degradation during banana ripening. **Postharvest Biology and Technology In press**, 2006.
- OLIVEROS L, MORENO J. Prebióticos en formulas infantiles. **Anal Pediatr.**, v. 4, p. 20-29, 2006.
- PIETRO, A., LUCER, C., DOLARA, P., GIANNINI, A., BIGGERI, A., SALVADORI, M., CLUNE, Y., COLLINS, K., PAGLIENARI, M., CADERNI, G. Antitumorigenic activity of the prebiotic inulin enriched with oligofructose in combination with the probiotics *Lactobacillus rhamnosus* and *Bifidobacterium lactis* on azoxymethaneinduced colon carcinogenesis in rats. **Carcinogenesis**, v. 23, p. 1953-1960, 2002.
- POLLOCK, C. J., CAIRNS, A.J., SIMS, I.M. & HOUSLEY, T.L. Fructans as Reserve Carbohydrates in Crop Plants. In E. Zamski and A.A. Shaffer (eds). Photoassimilate Distribution in Plants and Crops : Source - Sink Relationships, A.A. Marcel Dekker Inc, New York, p. 97-113, 1996.
- POLLOCK, C. J., CAIRNS, A. J. Fructan metabolism in grasses and cereals. **Annual Review Plant. Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 42, p. 77-101, 1991.
- PURGATTO, E., LAJOLO, F. M., NACIMENTO, 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, n.5-6, p.823-828, 2001.
- POLLOCK, C. J., CAIRNS, A. J. Fructan metabolism in grasses and cereals. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 42, p. 77 – 101, 1991.

- RAO A. Dose response effects of inulin and oligofructose on intestinal bifidogenesis effects. **Journal Nutrition**, v. 129, p. 1442-1445, 1999.
- REIMHOLZ, R., GEIGER, M., HAAKE, V., DEITING, U., KRAUSE, K. P., SONNEWALD, U., STITT, M. Potato plants contain multiple forms of sucrose-phosphate synthase, which differ in their tissue distributions, their levels during development, and their responses to low temperature. **Plant Cell Environment**, v. 20, p. 291- 305, 1997.
- RITSEMA, T. & SMEEKENS, S. Fructans: beneficial for plants and humans. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 6, p. 223-230, 2003
- ROBERFROID M, VAN LOO J, GIBSON G. The bifidogenic nature of chicory inulin and its hydrolysis products. **Journal Nutrition**, v. 128, p. 11-191, 1998.
- ROBERFROID, M., CUMPS, J., DEVOGELAER, J. Dietary chicory inulin increases whole-body mineral density in growing male rats. **Journal Nutrition**, v.132, p. 3599 - 3602, 2002.
- ROBERFROID, M. Inulin-Type Fructans: Functional Food Ingredients. Boca Raton, USA: CRC Press, p. 370, 2005.
- ROBERFROID, M. B., BORNET, F., BOULEY, C. H., CUMMINGS, J. H. Colonic microflora: nutrition and health. **Nutrition Review**, v. 53, p. 127 -130, 1995.
- ROBERFROID, M. B. Dietary fiber, inulin and oligofructose: a review comparing their physiological effects. **Critical Review of Food Science Technology**, v. 33, p. 103-148, 1993.
- SANTOIANI, C,S., TOGNETTI, J,A., PONTIS, H,G., SALERNO, G,L. Sucrose and fructan metabolism in wheat roots at chilling temperatures. **Physiologia Plantarum**, v. 87, p. 84-88, 1993.

- SCHNEEMAN B. Fiber, inulin and oligofructose: similarities and differences. **Journal Nutrition**, v. 129, p. 1424-1427, 1999.
- SCHEIDING, A, FRÖHLICH, A, SCHULZE, S., LLOYD, J. R., KOSSMANN, J. Downregulation of a chloroplast –targeted β -amylase leads to a starch-excess phenotype in leaves. **The Plant Journal**, v. 30, p. 581-591, 2002.
- SHARKEY, T. D., LAPORTE, M., LU, Y., WEISE, S., WEBER, A. P. Engineering plants for elevated CO₂, a relationship between starch degradation and sugar sensing. **Plant Biology**, v.6, p.280-288, 2004
- SIMS, I. M. Structural diversity of fructans from members of the order Asparagales in New Zealand. **Photochemistry**, v. 63, p. 351-359, 2003.
- 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 Physiology**, v.136, p.2687-2699, 2004.
- SMITH, A. M., ZEEMAN, S. C. SMITH, S. M. Starch degradation. **Annual Review of Plant Biology**, v.56, p.73-97, 2005
- TAPER, H., ROBERFROID, M. Influence of inulin and oligofructose on breast cancer and tumor growth. **Journal Nutrition**, v. 129, p. 1488- 1491, 1999.
- VALLEURU, R., VAN DEN ENDE, W. Plant fructans in stress environments: emerging concepts and future prospects. **J. Exp. Bot.**, v. 59, 1, p. 2905- 2916, 2008.

- VERGAUWEN, R., VAN LAERE, A. & VAN DEN ENDE, W. Properties of fructan: fructan 1- fructosyltransferases from chicory and globe thistle, two asteracean plants storing greatly different types of inulin. **Plant Physiology**, v.133, p. 391 - 401, 2003.
- VIEIRA JÚNIOR, A. Alfa e beta-amilase no metabolismo de amido durante o amadurecimento de banana: clonagem, expressão e caracterização molecular. São Paulo, 2006, 91p. (Tese de Doutorado- Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo).
- WARGOVICH, M. H., CHEN, D. D., JIMENEZ, A., STEELE, V. E., VELASCO, M., STEPHENS, C., PRICE, R., GRAY, K., KELL, O. F. G. J. crypts as a biomarker for colon cancer, evaluation of potential chemo preventive agents in the rat. **Cancer Epidemiological Biomarkers Preview**, v. 5, p. 355-360, 1996.
- WEI, J.Z., CHATTERTON, N.J., HARRISON, P. A., WANG, R.R.C. & LARSON, S.R. Characterization of fructan biosynthesis in big bluegrass (*Poa secunda*). **Journal Plant Physiology**, v. 159, p. 705-715, 2002.
- 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. **Europe Journal of Biochemistry**, v.267, n.5, p.1313-1322, 2000
- YOSHIDA, M., AB,E J., MORIYAMA, M., KUWABARA, T. Carbohydrate levels among winter wheat cultivars varying in freezing tolerance and snow mold resistance during autumn and winter. **Physiology Plantarum**, v. 103, p. 8–16, 1998.
- ZEEMAN, S. C., SMITH, S. M., SMITH, A. M. The diurnal metabolism of leaf starch. **Biochemistry Journal**, v. 401, p. 13-28, 2007.

CAPÍTULO I

IDENTIFICAÇÃO DE FRUCTOOLIGOSSACARÍDEOS EM DIFERENTES CULTIVARES DE BANANA

1. INTRODUÇÃO

Frutanos é um termo geral usado para denominar carboidratos constituídos por unidades frutossilfrutose ligados a uma unidade glicosídica. Fructooligosacarídeos (FOS) têm sido definidos como uma combinação de três açúcares, 1-kestose [β -D-Fru-(2 \rightarrow 1)₂- α -D-glicopiranosideo, GF₂], nistose [β -D-Fru-(2 \rightarrow 1)₃- α -D-glicopiranosideo, GF₃], e frutofuranosilnistose [β -D-Fru-(2 \rightarrow 1)₄- α -D-glicopiranosideo, GF₄], nos quais as unidades de frutose estão ligadas na posição β (2 \rightarrow 1) da sacarose (LEWIS, 1993). Frutanos de cadeias longa são nomeados de Inulina.

Inulina e FOS são considerados ingredientes funcionais de alimentos principalmente devido a seus efeitos benéficos nas funções gastrintestinais. Eles são nomeados como prebióticos por causa de sua resistência à digestão por enzimas de hidrólise, sendo então hidrolisados apenas pelas bactérias do cólon intestinal. Como resultado, o processo de fermentação por estas bactérias estimula a motilidade intestinal, alterando também a composição da flora intestinal, causando o aumento da biomassa bifidobactérias seletivas, as quais podem reduzir os riscos de algumas doenças, como o câncer de cólon (HIDAKA et al., 1986; WANG et al., 1993; GIBSON et al., 1994; GIBSON et al., 1995; ROBERFROID et al., 1995; CUMMING et al., 2001). Outros benefícios à ingestão de FOS na alimentação foram a redução dos índices de

glicemia e insulinemia, observada em experimentos com ratos (OKU et al., 1984) e redução na taxa de triglicérides, associado com a menor atividade das enzimas lipogênicas, observados também em pacientes diabéticos (YAMASHITA et al., 1984; ARBEENY et al., 1992).

Em virtude da descoberta científica de diversos benefícios destes carboidratos “bioativos” e “funcionais”, com ação de fibras ativas para saúde do intestino, as indústrias de alimentos vêm aumentando a inclusão dos FOS em seus produtos. Porém, o consumo de FOS por fontes alimentícias naturais é benéfico pelo preço quando comparados aos produtos industrializados. Além disso, as fontes naturais de FOS podem também ter valor agregado maior pela associação à ingestão de outros nutrientes importantes para a saúde, como fibras, vitaminas e minerais. Algumas das fontes naturais de FOS indicadas pela literatura são aspargos, alho, cebola alcachofra, chicória e algumas frutas (VAN LOO, et al., 1995).

Apesar de a banana ser comumente indicada como uma boa fonte alimentícia de FOS (CAMPBELL et al., 1997; HOGARTH et al., 2000; HOMME et al., 2001), diferenças significativas no conteúdo de FOS foram observadas em estudos relacionados ao fruto: 10,9 mg/g de massa seca (CAMPBELL et al., 1997); 4,3 e 6,0 mg em diferentes estágios do amadurecimento da banana (HOMME et al., 2001), e 1,3 mg/g de FOS em banana processada (HOGARTH et al., 2000). No entanto, estas diferenças poderiam ser resultado da diferença do cultivar, estágio do amadurecimento, processamento (devido ao aquecimento e/ou diminuição do pH), além da diferença da metodologia aplicada para a análise do FOS.

O método estabelecido pela AOAC para análise de FOS compreende a hidrólise enzimática das cadeias de frutanos, seguida pela análise das moléculas de frutose,

glicose e sacarose, que determina o teor de FOS total, porém não a concentração de cada constituinte de FOS na matriz alimentícia. Outro método alternativo da AOAC constitui a análise de FOS através do método de HPLC (em inglês, High-performance liquid chromatography), cromatografia líquida de alta performance e cromatografia gasosa (CG) (em inglês, gás chromatography_GC), que apresentam diferentes limites de sensibilidade, seletividade e aplicabilidade (VERZELE et al., 1987).

O método de análise por cromatografia líquida de alta performance de troca aniônica acoplada a detector amperométrico pulsado (HPAEC-PAD- High Performance anion exchange chromatography coupled to pulsed amperometric detection), oferece uma alternativa mais sensível para análise de FOS que o tradicional método de HPLC. Muitas das análises de FOS por HPAEC-PAD tem sido estabelecido com o uso das colunas CarboPac Pa1 e PA100. No entanto, este método também apresenta algumas implicações na análise de pequenas cadeias de FOS devido à parcial solubilidade em etanol e água destes componentes. Além disso, este método também pode sofrer a interferência da presença de maltooligossacarídeos, derivados da hidrólise do amido, o qual eluem no mesmo tempo de retenção de pequenos frutooligossacarídeos. O que torna necessária a avaliação cuidadosa da presença e dos tipos de frutooligossacarídeos presentes em alimentos, como a banana.

De maneira geral, a presença de FOS em banana ainda produz dúvidas, uma vez que não há relatos de trabalhos anteriores sobre a presença de enzimas ligadas à síntese de FOS em bananas. A enzima supostamente envolvida na síntese de frutanos em plantas é a sacarose-sacarose frutossil-transferase (EC 2.4.1.99), que catalisa a transferência de uma molécula de frutose da molécula de sacarose para outra de sacarose, levando à formação da cestosose (glicosil-1,2-frutossil-1,2-frutose). O

enlongamento da cadeia de frutanos é mediado por outra enzima 1^F-6^F fructan- fructan frutosil (EC 2.4.1.100) transferase, levando à formação de inulina ou levano, respectivamente (Gupta et al., 2000). A sacarose é o principal substrato para a biossíntese de FOS, além disso, e é bem estabelecido o fato que um significativo acúmulo de sacarose ocorre durante o amadurecimento de banana (6-16% peso fresco), que por sua vez, também é altamente dependente da cultivar (CORDENUNSI et al., 1995; MOTA et al., 1997). Porém, pouco é conhecido a respeito da presença de frutanos em frutos como a banana. Além disso, a natural variabilidade do metabolismo de carboidratos em diferentes cultivares de banana poderia contribuir para os diferentes níveis de FOS relatados anteriormente, assim como o estágio do amadurecimento do fruto. Assim, o objetivo deste trabalho foi identificar e quantificar os níveis de sacarose e FOS nas cultivares de banana mais consumidos no Brasil e também verificar as possíveis relações destes como os estágios de amadurecimento do fruto.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Frutos

Cultivares de banana (*Musa acuminata* L.), Ouro Colatina (AA), Nanicão (AAA), Prata comum (AAB), Mysore (AAB), Maçã (AAB), Terra (AAB), Pacovan (AAB) e Figo (ABB) foram obtidas junto ao CEAGESP-SP após 1 dia pós-colheita. Estas cultivares foram escolhidas como base na quantidade de amido acumulado durante o período de desenvolvimento do fruto, e baseado no conteúdo de sacarose sintetizada durante o amadurecimento do fruto (~14-23 % e 6-16%, respectivamente) (Mota et al, 1997). Bananas com aproximadamente 110 dias após antese foram armazenadas a 20°C e 90 % de umidade. Elas foram amostradas com base nas medidas diárias de respiração e produção de etileno (dados não mostrados) no período pré e pós climatérico, incluindo também o primeiro estágio de senescência do fruto. As amostras diárias, compostas de 10 bananas foram descascadas, picadas e congelados em N₂ líquido e armazenadas a - 80 °C para futuras análises.

2.2. Medidas de respiração e etileno

Para análise de etileno e respiração, amostras de banana foram inseridas em jarras hermeticamente fechadas de 1,5 L (3 bananas por jarra e 6 jarras por cultivar). Após 1 hora, amostras de 10 mL para etileno e 1 mL para CO₂ foram retiradas com utilização de seringa gás tight do interior das jarras e analisadas por cromatografia a gás (HP-6890, Angilet Technologies), com utilização de coluna HP-Plot Q (30m, D.I. 0,53 mm). Foi empregado o detector de ionização de chama para análise de etileno e

de condutividade térmica para CO₂. A temperatura do injetor e detector foi de 250 °C e a corrida foi mantida isotérmica a 30 °C. O fluxo de 1 mL/min de gás hélio foi utilizado para a análise de etileno e de 4mL/ min para a de CO₂. A injeção foi realizada no modo splitless para etileno e modo split para análise de CO₂ (50:1). As estimativas das quantidades de CO₂ e de etileno foram feitas em relação à curva de calibração obtida com padrão de CO₂ e etileno em ar sintético Air Liquid.

2.3. Determinação de carboidrato

Açúcares solúveis foram extraídos três vezes com etanol 80% a 80 °C. Os sobrenadantes foram combinados e etanol evaporado em sistema a vácuo. Os resíduos foram então reconstituídos com água, filtrados através de membrana de 0,22µm e analisados por HPAEC-PAD. A análise por cromatografia foi realizada através do sistema Dionex DX 500, equipado com sistema PAD (detector amperiométrico pulsado) (ED40). A coluna analítica empregada foi a CarboPac PA1 (250 x 4 mm, com tamanho de partícula de 5 µm). A fase móvel foi de NaOH 18mM com fluxo constante de 1,0 mL/min.

A análise de FOS (fructooligossacarídeos) foi também realizada por HPAEC-PAD a partir da mesma extração etanólica e com uso da mesma coluna analítica. O fluxo empregado também foi de 1mL/ min, porém com gradiente de eluição a partir de dois sistemas solvente: solução A (150 mM NaOH) e solução B (500 mM de acetato de sódio em NaOH 150 mM), com uma corrida total de 65 minutos. O programa de eluição foi iniciado a partir de 95% A e 5 % de B, seguido de 90% A e 10% de B em 8 min; 81% A, 19% de B em 12 min; 30% A, 70 % de B em 19,7 min até a etapa de limpeza em 39,8 min, com 100% de B, mantidos por 10 minutos. A coluna foi então re-equilibrada

por 15 minutos com 95% de A e 5 % de B. Para distinguir entre FOS e produtos de hidrólise de amido, as amostras foram analisadas com e sem tratamento enzimático com invertase, incubada por 6 horas e 40 °C (1326 unidades/ L; 1 unidade de atividade de invertase foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1 ml de frutose por minuto a 60 °C, a partir da solução de sacarose 0,5 mol/L em 0,1 mol/L de tampão acetato pH 4,5). Após o tratamento enzimático, o etanol foi adicionado para concentração final de 80% para precipitação protéica, e a mistura foi então centrifugada a 17000g durante 15 minutos a 25 °C. O sobrenadante foi então evaporado em sistema a vácuo e o pellet foi ressuscitado com 1 mL de água deionizada, depois filtrado em membrana 0,45 µm e analisado por cromatografia líquida.

O rendimento de FOS foi calculado como segue (Ouarne et al., 1994):

$$\frac{\{[\text{g de 1-cestose} + \text{maltose}] - \text{g de maltose}\} + \{[\text{g de nistose} + \text{maltotriose}] - \text{g de maltotriose}\}}{\text{g de 1-cestose} + \text{g de nistose}} \times 100$$

Para análise de FOS por GC-MS, uma alíquota de 2 mL de extrato de açúcar solúvel em etanol 80% foi evaporada sob vácuo. Ao extrato seco foram adicionados 100 µL de N-metil-N-(trimetilsilil) trifluoroacetamida (MSTFA) para derivatização da amostra, que foi homogeneizada em bloco de aquecimento a 800 rpm a 37°C durante 1 hora, seguida de centrifugação a 14.000 g durante 1 minuto. O sobrenadante foi analisado por GC-MS (Cromatógrafo a gás equipado com espectrômetro de massas). As condições cromatográficas foram: injeção de 1 µL de amostra em modo splitless, em coluna HP5MS (50m, 0,25 µm de espessura e 0,32 mm de diâmetro interno). Foi

utilizado como gás de arraste o gás hélio, com fluxo de 1,4 mL/ min. A curva de temperatura utilizada foi: 70 °C por 2 min; de 70 °C para 315 °C com taxa de 15°C/min e de 315 °C para 325 °C com taxa constante de 10 °C/min. O detector seletivo de massas (modelo HP 5973) foi operado em sistema SIM (selected ion monitored) em sistema scanning íons para m/z 217 e 361 e em modo scan de m/z 50 para 550.

2.4 .Análise de Umidade

O conteúdo de umidade das amostras foi calculado com base na perda de peso após as amostras serem submetidas ao aquecimento constante em estufa de 105 °C.

2.5. Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e teste de comparação por Tukey, com auxílio do softwer Statistic 6.0. As médias avaliadas foram consideradas significativamente diferente para $p < 0,05$ e muito significativamente diferentes para $p < 0,01$.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Metodologias para identificação e quantificação de FOS por HPAEC-PAD e GC-MS.

Durante o processo de otimização do método de HPAEC-PAD para quantificação de FOS foi observado que alguns maltooligossacarídeos, como a maltose e maltotriose, eluem no mesmo tempo que a 1-cestose e a nistose, respectivamente. Mudanças no gradiente de acetato da fase móvel, não foram efetivas na obtenção de uma separação desejável entre os malto e frutooligossacarídeos. Assim, as amostras foram tratadas com invertase para confirmar a natureza de ligação das moléculas para FOS, de 1-cestose e nistose (OUARNE et al., 1994), que ocasionaram o desaparecimento dos respectivos picos no cromatograma, como um indicativo de sua identidade (dados não mostrados).

Para confirmação da identidade estrutural dos frutooligossacarídeos, as análises foram realizadas por CG-MS pelo método SIM (monitoramento do espectro dos íons relacionados à substância em análise). As Figuras 1 A e 1 B representam cromatogramas parciais do padrão de 1-cestose (1 µg / µL) e extrato de banana Mysore, respectivamente por CG-MS. O tempo de retenção de 1-cestose foi de 20,2 minutos e os espectros de massas de ambos, padrão e amostra (Figura 1 C e 1 D), apresentaram similaridade de 0,98 em relação à razão de massa entre os íons característicos de 217 e 361 (m/z). A mesma metodologia usada para quantificar 1-cestose por HPAEC-PAD foi testada para a análise da nistose. Porém, devido à baixa

concentração deste açúcar em banana e a maior sensibilidade pelo CG-MS, os níveis de nistose foram estimados diretamente por este último método.

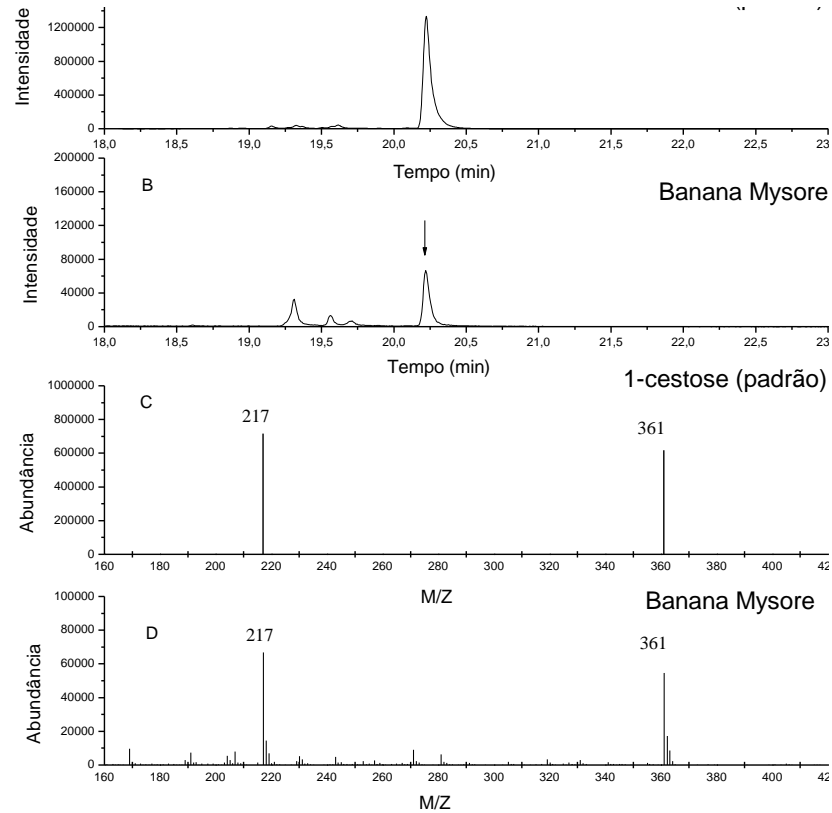


Figura 1. (A e B) Cromatogramas através de cromatografia a gás acoplado a espectrômetro de massa de 1-cestose (padrão) e extrato de açúcar de banana Mysore. O pico em 20,02 minutos representa o pico de 1-cestose. (C e D) Espectros de massa parciais de 1-cestose, indicando a presença de íons característicos em 217 e 361 m/z.

Em amostra de banana Prata, um pico no cromatograma com alta definição foi detectado com mesmo tempo de retenção que o padrão de nistose, em 28,2 minutos (Figura 2). O parcial espectro de massa do equivalente pico no cromatograma de banana Prata apresentou similaridade estrutural com padrão de nistose (Figura 3) (Match > 98%, de acordo com análise pelo software NIST MS Search 1.6). No entanto, uma pequena projeção na linha de base em 28,2 minutos também foi observada nos cromatogramas de outras cultivares de banana, mas a análise de identidade estrutural não apresentaram identidade equivalente com a nistose.

Os cromatogramas provenientes da análise de CG-MS de diferentes cultivares, com mesmo tempo de retenção da nistose, foram submetidos à análise de pureza dos picos com auxílio do software AMDIS 32. Esta análise revelou a presença de dois componentes co-eluídos no mesmo tempo de retenção que de 28,2 minutos, com exceção para as amostras de banana Prata.

No espectro de nistose foram visualizados dois íons de maior abundância (m/z 217 e 361), como também observados para os espectros de 1-cestose (Figura 1 C e 1 D), porém com diferença na razão de massa e abundância entre eles. As análises revelaram que estes picos eram característicos das estruturas de FOS, porém a razão entre eles poderia ser utilizada como indicativo de identidade individual de cada elemento desta série. Assim, a razão 217:361 foi verificada como 1,2 para os elementos de 1-cestose e de 1,79 para de nistose.

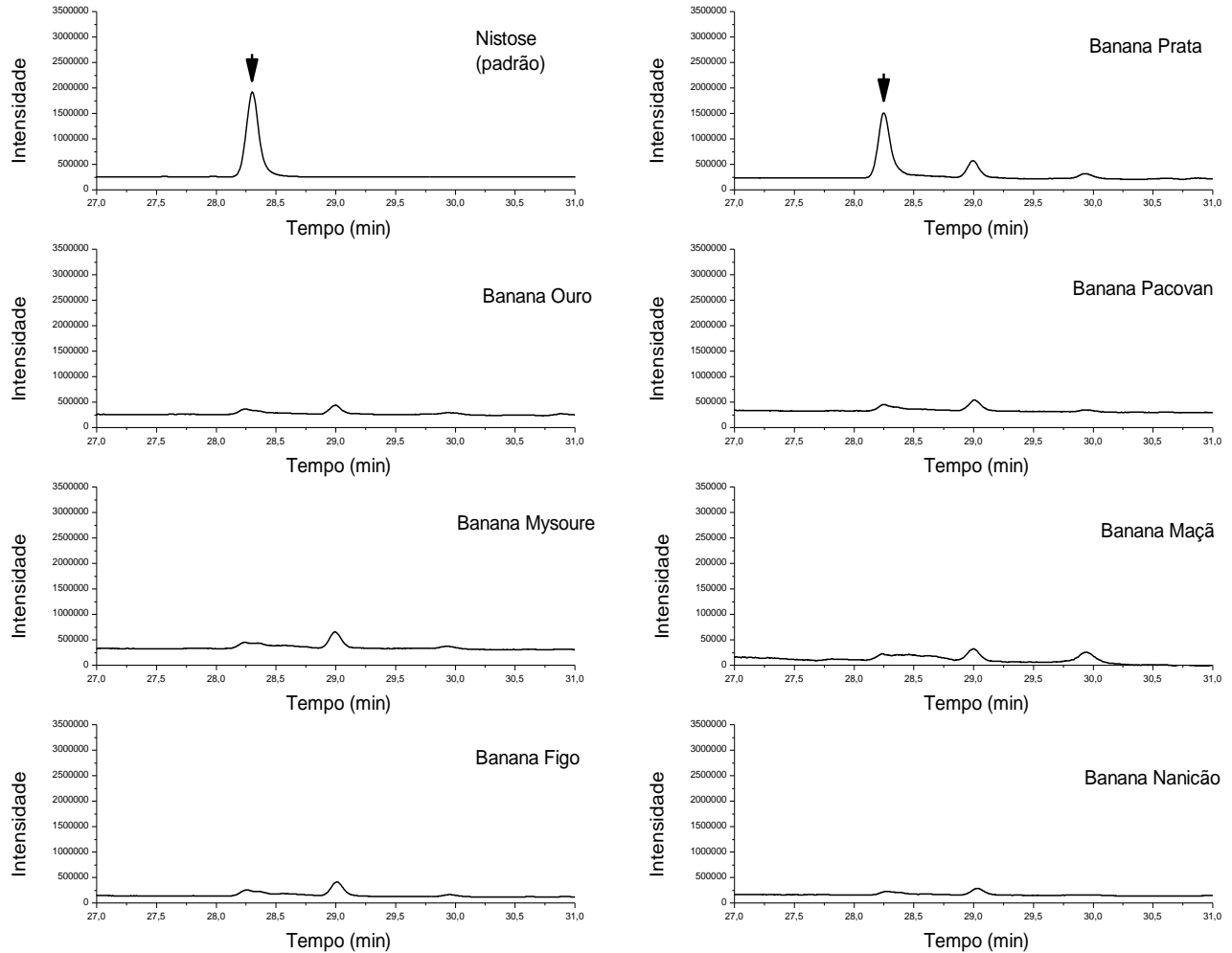


Figura 2. Cromatograma parcial de extrato de açúcares de amostras de diferentes cultivares de banana. As setas indicam a presença de nistose em amostra de banana Prata e em solução padrão (0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$).

Portanto, as análises estatísticas da razão dos picos de abundância de 217 e 361 (m/z) revelaram significativa similaridade com o pico do padrão de nistose ($p > 0,05$) apenas para o pico observado em extrato de açúcar de banana Prata, confirmando a presença deste elemento apenas nesta cultivar de banana.

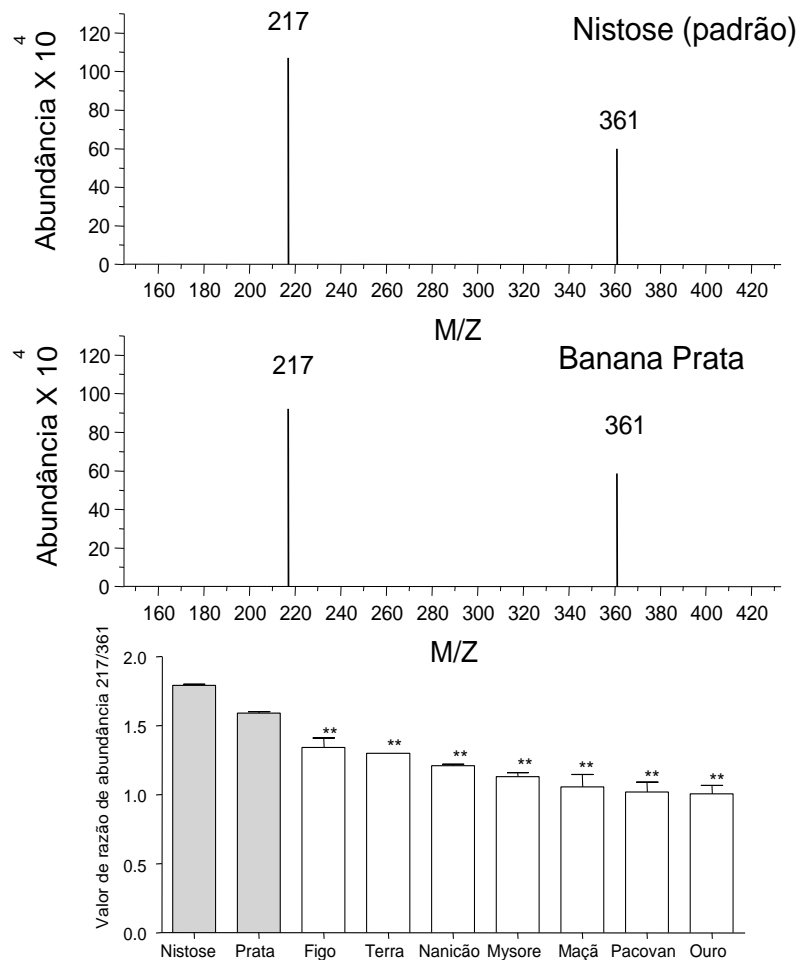


Figura 3. Espectro de massas de fragmentação iônica por CG-MS de solução padrão de nistose e extrato de açúcares solúveis de banana Prata. A variação da relação entre os íons 217:361 foi estatisticamente diferente (** $p < 0,01$) entre as amostras das cultivares de banana e o padrão de nistose, com exceção da banana Prata.

Apesar da alta reprodutibilidade e facilidade da análise de FOS por HPAEC-PAD, a confirmação e a determinação de alguns níveis de FOS em banana foi determinada apenas por CG-MS devido sua alta sensibilidade e capacidade de análise estrutural.

Além disso, devido à presença de maltooligossacarídeos, o método de CG-MS parece ser uma boa alternativa ao método de HPAE-PAD para análise de FOS em material rico em amido.

3.2. Detecção e quantificação de FOS em diferentes cultivares de banana.

Para detecção e triagem de FOS em bananas foi realizada uma análise inicial com oito cultivares de banana no estágio maduro, provenientes de diferentes grupos genômicos (AA, AAA, AAB e ABB) (Tabela 1). A 1-cestose foi detectada em todas as cultivares, com uma variação entre 297 e 1.600 $\mu\text{g/g}$ de massa seca em polpa de banana. No entanto, a nistose foi detectada apenas na cultivar de banana Prata, que também apresentou os maiores níveis de 1-cestose entre as cultivares analisadas.

Amostras de cinco cultivares de banana também foram analisadas para detecção de FOS ao longo de todo o amadurecimento (período pré e pós climatérico, com base em seus perfis de etileno e respiração), com o objetivo de detectar o estágio do amadurecimento em que ocorre o início da síntese de FOS em banana. Os resultados apresentaram diferentes níveis totais na quantidade de 1-cestose no estágio de banana madura (Tabela 1) e também diferentes perfil na síntese de 1-cestose entre as diferentes cultivares de banana (Figura 4).

A maior quantidade de 1-cestose encontrada entre as cultivares (1.100 $\mu\text{g/g}$ de M.S) foi similar ao encontrado por Hogarth et al. (2000). Porém, estes autores não detectaram nistose em banana, uma vez que o limite de detecção utilizado por sua metodologia (200 $\mu\text{g/g}$ M.S) de análise foi maior que o nível de nistose quantificado em nossos estudos pela metodologia de CG-MS com alta sensibilidade de detecção. Contudo, Hogarth et al. (2000) detectaram a presença de $1^{\text{F}}\beta$ -frutofuranosilnistose (GF_4)

(0,02 g/ 100 mL), não foi detectado em nossos estudos, apesar da alta sensibilidade das análises realizadas por CG-MS. Porém, o conteúdo de frutooligossacarídeos parece depender tanto do cultivar, como do estágio de amadurecimento do fruto (condições não indicadas pelo autor).

Tabela 1 - Teores de açúcares solúveis e umidade em diferentes cultivares de banana pertencentes a grupos genômicos distintos, no estágio maduro.

Cultivares	Grupos genômicos	Umidade (%)	Sacarose (mg/g M.S.)	1-cestose (µg/g M.S.)	Nistose (µg/g M.S.)
Ouro	AA	69,2 ± 0,3	190,71 ± 5,72	918 ± 18	ND
Nanicão	AAA	75,9 ± 0,2	354,73 ± 3,11	1016 ± 40**	ND
Prata	AAB	71,1 ± 0,2	326,47 ± 18,9	1630 ± 29**	105 ± 8
Maçã	AAB	73,1 ± 0,1	224,47 ± 8,37	699 ± 15**	ND
Mysore	AAB	76,6 ± 0,2	179,16 ± 3,51	1292 ± 50**	ND
Pacovan	AAB	75,1 ± 0,1	274,28 ± 15,7	1097 ± 28**	ND
Terra	AAB	61,8 ± 0,2	210,07 ± 2,25	297 ± 13**	ND
Figo	ABB	68,7 ± 0,1	180,08 ± 2,04	881 ± 38	ND

ND – não detectado; M.S, massa seca. Cada valor corresponde a media de três determinações as quais foram indicados pelos seus respectivos desvios padrões. ** Indica diferenças estatisticamente significantes (p> 0.05).

O acúmulo de sacarose (Figura 4) ocorreu principalmente durante o amadurecimento da banana, com uma variação no tempo entre as cultivares, mas

temporalmente relacionadas com o climatério em todas as amostras. Os níveis de sacarose atingiram valores similares entre as amostras de banana Mysore, Terra e Figo (207, 210 e 227mg/g M.S, respectivamente), enquanto foi observado um acúmulo de quase duas vezes nas cultivares Pacovan e Prata (430 e 470 mg/g, respectivamente). Os níveis de 1-cestose (Figura 4), o primeiro membro da série de FOS, aumentaram concomitantemente com os níveis de sacarose, com pico no final do amadurecimento, mas com diferentes valores entre as cultivares. Como esperado, os valores máximos de sacarose foram muito maiores que os de 1-cestose (~100 vezes).

Os resultados então sugerem que o início do acúmulo de 1-cestose é altamente dependente da quantidade específica de sacarose acumulada. De fato, a síntese e acúmulo de 1-cestose tiveram início apenas após a sacarose atingir níveis de aproximadamente de 200 mg/g M.S. (Figura 4). Esta quantidade de sacarose, visualizada concomitantemente com o primeiro dia do aparecimento de 1-cestose, não foi diferente estatisticamente entre as cultivares (ANOVA $P=0,623$ e $F= 0,7222$). No entanto, parece que não há uma correlação entre os níveis finais atingidos de 1-cestose e sacarose ao longo do amadurecimento da banana: a cultivar Prata, comparada as outras cultivares teve os maiores valores para o acúmulo de 1-cestose e sacarose. No entanto, as cultivares Mysore, Figo e Terra acumularam diferentes níveis totais de 1-cestose (1,3; 0,9; e 0,3 mg/g M.S), apesar de níveis similares para o acúmulo de sacarose (207, 227 e 210 mg/g M.S). Apesar disso, os perfis de sacarose e 1-cestose (Figura 4) sugerem que um pequeno aumento nos níveis de sacarose causa um significativo aumento nos níveis de 1-cestose. Esta relação pode ser mais facilmente visualizada através do gráfico na escala de semilog entre os níveis de sacarose e 1-cestose durante o amadurecimento da cultivar Terra (Figura 4). O mesmo teste foi

aplicado para as outras cultivares, resultando em perfil bastante semelhante ao demonstrado para cultivar Terra (dados não mostrados). Quando outras cultivares, pertencente a diferentes grupos genômicos, foram analisadas em relação às quantidades máximas de sacarose e 1-cestose, a não dependência do grupo genômico foi reforçada.

A importância das cultivares e do estágio do amadurecimento na influência quanto aos níveis de FOS em banana foi anteriormente mencionado por Homme et al. (2001) e confirmada em nossos estudos. Porém, a influência da cultivar na quantidade de FOS parece ser independente do grupo genômico, uma vez que tanto os maiores quanto os menores níveis de 1-cestose foram encontrados respectivamente às cultivares Prata e Terra, ambas pertencentes ao grupo genômico AAB. Os resultados apresentados na Tabela 1 e Figura 4 mostraram também que apesar da síntese e do acúmulo de sacarose e 1-cestose parecerem depender de cada cultivar, não foi encontrado nenhuma correlação entre esta e o grupo genômico. Por exemplo, a Nanicão e a Pacovan, pertencentes aos grupos AAA e AAB, respectivamente, acumularam quantidades similares de 1-cestose (1.916 e 1.097 $\mu\text{g/g}$ M.S).

Campbell et al. (1997), observaram que os níveis de FOS variaram entre 0,2 e 2,0 mg/g M.S em mais de 50% de diferentes frutos analisados, os quais foram similares aos dados encontrados em nossos estudos com banana (0,3-1,6 mg/g M.S., entre as cultivares). Mas encontraram os maiores níveis de FOS total em banana (~10 mg/g M.S). Porém, os frutos analisados pelos autores não apresentam nem a cultivar, nem o estágio pós-colheita especificado, parâmetros importantes para a comparação que dificultariam a explicação das discrepâncias encontradas entre as análises. Além disso,

os autores encontraram maiores valores em banana para FOS total, enquanto foram quantificadas apenas as somatórias dos níveis de 1-cestose e nistose em nossos estudos.

Os resultados encontrados neste estudo apoiaram a hipótese proposta por Farrar et al. (2000), no qual a sacarose atua tanto como um sinal para o início da síntese da 1-cestose, tanto quanto de substrato para a síntese destes FOS. De fato, os autores propuseram uma ligação entre os elevados níveis de sacarose e a indução na expressão gênica para o acúmulo de frutanos em folhas de cereais e gramíneas.

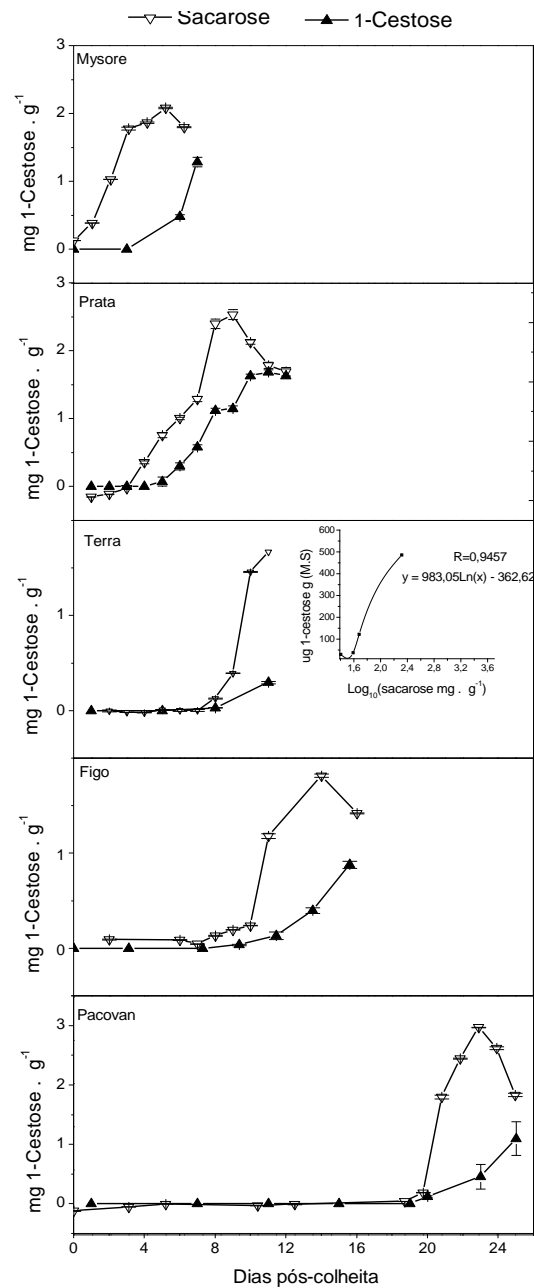


Figura 4. Perfis de sacarose e 1-cestose em cinco cultivares de banana. As cultivares foram amostradas no período que compreende os estágios pré e pós-climatérico, abrangendo todo o processo de amadurecimento do fruto. Os resultados foram expressos como média de triplicata de análise \pm erro padrão da média. O gráfico em semilog mostra a correlação entre os níveis de sacarose e 1-cestose durante o processo de amadurecimento da cultivar Terra.

Nossos estudos também confirmaram a presença dos frutooligossacarídeos, 1-cestose e nistose em banana, com níveis bastante variáveis entre as cultivares, mas independente do grupo genômico do fruto. Devido às baixas quantidades de FOS detectadas em banana, abaixo das doses diariamente recomendadas, segundo nossos estudos, este fruto não poderia ser considerado uma boa fonte de ingestão de FOS. A síntese de 1-cestose parece também ser ativada por uma quantidade bastante específica de sacarose (~200 mg/g M.S) durante o amadurecimento da banana, sugerindo que esta poderia atuar como um sinal para a síntese de FOS em banana.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARBEENY, C. A., MEYSERS, D. S., BERGQUIST, K. E., GREGG R. E. Inhibitions of fatty acid synthesis decrease very low density lipoprotein secretion in the hamster. **Journal Lipid Research**, v.33, p.843-851, 1992.
- CAMPBELL, J. M., BAUER, L. L., FAHEY, G. C. J. R., HOGARTH, A. J. C. L., WOLF, B. W., HUNTER, D. E. Selected fructooligosaccharides (1-kestose, nystose and 1-F- β -fructofuranosilnystose) composition of foods and feeds. **Journal Agriculture and Food Chemistry**, v.45, p.3076-3082, 1997.
- CORDENUNSI, B. R., LAJOLO, F. M. Starch transformation during banana ripening: sucrose synthase and sucrose phosphate synthase behavior. **Journal Agriculture and Food Chemistry**, v.43, p.347-351, 1995.
- CUMMING, J. H., MACFARLANE, G. T., ENGLYST, H. N. Prebiotic digestion and fermentation. **American Journal of Clinical Nutrition** (suppl), v.73, p. 415-420, 2001.
- FARRAR, J., POLLOCK, C., GALLAGHER, J. Sucrose and the integration of metabolism in vascular plants. **Plant Science**, v.154, p.1-11, 2000.
- GIBSON, G. R., BEATTY, E. R., WANG, X.; CUMMINGS, J., H. Selective stimulation of bifidobacteria in the human colon by oligofructose and inulin. **Gastroenterology**, v.108, p.975-982, 1995.
- GIBSON, G. R., WANG, X. Enrichment of bifidobacteria from human gut contest by oligofructose using continuous culture. FEMS. **Microbiology**, v.118, p. 121-128, 1994.

- GUPTA, A. K., KAUR, N. Fructan metabolism in Jerusalem artichoke and chicory. In Carbohydrate Reserve in plants- Synthesis and regulation; Elsevier Science: Amsterdam, The Netherlands, 223-248, 2000.
- HIDAKA, H., EIDA, T., TAKIWAZA, T., TOKUNGA, T., TASHIRO, Y. Effects of fructooligosaccharides on intestinal flora and human health. **Bifidobacteria Microflora**, v. 5, p. 37-50, 1986.
- HOGARTH, A., J., C., L., HUNTER, D. E., JACOBS, W. A., GARLEB, K. A., WOLF, B. W. Ion chromatographic determination of three fructooligosaccharides oligomers in prepared and preserved foods. **Journal Agriculture of Food Chemistry**, v.48, p.5326- 5330, 2000.
- HOMMME, C. L., PESCHET, J. L., PEIGSERVER, A., BIAGINI, A. Evaluation of fructans in various fresh and stewed fruits by high performance anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection. **J. Chromatography A**, v. 920, p.291-297, 2001.
- LEWIS, D. H. Nomenclature and diagrammatic representation of oligomeric fructans: a paper for discussion. **New Phytologist**, v.124, p.583 – 594, 1993.
- MEDEIROS, P. M., SIMONEIT, B. R. T. Analysis of sugar in environmental samples by a gas chromatography- mass spectrometry. **J. Chromatography A**, v. 1141, p. 271-278, 2007.
- MOTA, R. V. D. Da., LAJOLO, F. M., CORDENUNSI, B. R. Composição em carboidratos de alguns cultivares de banana (*Musa ssp.*) durante o amadurecimento. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 17. p. 94 -97, 1997.
- OKU, T., TOKUNGA, T., HOSOYA, H. Non-digestibility of a new sweetener “neosugars” in the rat. **Journal Nutrition**, v. 114, p. 1574-158, 1984.

- OUARNE, F., GEUIBERT, A., BROWN, D., BORNET, F. A sensitive and reproducible analytical method to measure fructooligosaccharide in food products. In *Complex Carbohydrate in Foods*; Cho, S. S., Prosky, I., Dreher, M., Eds., Marcel Dekker: New York. p. 191-201, 1994.
- ROBERFROID M. B., BORNET, F., BOULEY, C. H., CUMMINGS, J. H. Colonic microflora: nutrition and health. **Nutrition Review**, v. 53, p. 127- 130, 1995.
- SPRENGER, N., BORTILIK, K., BRANDT, A., BOLLER, T., WLERNKEN, A. Purification, cloning and functional expression of sucrose fructan 6-transferase, a key enzyme of fructan synthesis in barley. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, p. 11652- 11656, 1995.
- VAN LOO, H. J., COUSSEMENT, P., LEENHEER, L. D. E., HOEBREGS, H., SMITS, G. On the presence of inulin and oligofructose as a natural ingredients in the western diet. **Critical Review of Food Science Nutrition**, v. 35 (6), p. 525 – 552, 1995.
- VERZELE, M., SIMOENS, G., VAN DAMME, F. A critical review of some liquid chromatography systems for the separation of sugars. **Chromatographia**, v. 23, p. 292- 300, 1987.
- WANG, X., GIBSON, G. R. Effects of the in vitro fermentation of oligofructose and inulin by bacteria growing in the human large intestine. *J. Appl. Bacteriology*, v. 75, p. 373-380, 1993.
- YAMASHITA, K., KAWAIT, K., ITAKURA, K. Effect of fructooligosaccharides on blood glucose and serum lipids in diabetic subjects. **Nutrition Research**, v. 4, p. 961-966, 1984.

CAPÍTULO II

A SÍNTESE DE FRUTOOLIGOSSACARÍDEOS EM BANANA E SUA RELAÇÃO COM A ATIVIDADE DE INVERTASE E O ACÚMULO DE FOS E SACAROSE

1. INTRODUÇÃO

Em estudos anteriores identificamos a presença de frutooligossacarídeos (FOS), como 1-cestose e nistose em diferentes cultivares de banana, com maior destaque para a cultivar Prata. No entanto, não existem estudos que identifiquem as enzimas responsáveis pela síntese desta classe de carboidrato em banana, nem evidências que expliquem a predominância destes FOS na cultivar Prata.

A habilidade de acumular frutanos foi relacionada à capacidade de aumentar a atividade das enzimas frutossiltransferases, principalmente SST (sacarose, sucrosiltransferase), principalmente à exposição de plantas a baixas temperaturas, como observado anteriormente para trigo (JIONG et al., 1990). No entanto, a síntese de FOS pode também ser resultado do aumento da capacidade de transglicosilação da enzima invertase (RITSEMA et al., 2006). Obeland et al. (1993), também observaram que este aumento de transglicosilação da invertase está diretamente relacionado com o aumento da concentração dos níveis de sacarose, que atuam como substrato principal ambos para a atividade de síntese de FOS e de hidrólise da invertase.

A sacarose é o açúcar livre mais abundante acumulado em resposta a baixas temperaturas (OBELAND et al., 1993). Além disso, tem sido observado em gramíneas,

que a exposição a baixas temperaturas também levou à síntese de frutanos (POLLOCK et al., 1987), dependente também do acúmulo de sacarose.

A função real dos frutanos no ajuste fisiológico em resposta a baixas temperaturas, ainda é pouco conhecida. Porém, sabe-se que os frutanos poderiam ter um papel importante na osmorregulação, devido aos seus polímeros osmoticamente inertes, que poderiam ser rapidamente convertidos a monossacarídeos osmoticamente ativos (WIEMKEN et al., 1995). Além disso, o acúmulo de frutanos parece ser importante no ajuste fisiológico no crescimento sob baixa temperatura e na resistência contra o frio (POLLOCK et al., 1986).

Um estudo sobre a resistência contra danos ocasionados pela exposição de bananas ao frio foi realizado entre diversas cultivares, que demonstrou ser a banana Prata a mais resistente. O que permitiria o armazenamento desta cultivar a temperaturas inferiores a 12 °C (LICHTENBERG et al., 2001). Em nossos estudos esta cultivar também foi a que apresentaram maior concentração de 1-kestose (primeiro membro da série de FOS), de sacarose e a única com a detecção de nistose (o segundo membro da série de FOS, resultado do início da polimerização deste açúcar). Apesar da correlação destes açúcares com a tolerância ao frio já ter sido relatada anteriormente em algumas plantas, não há estudos relacionando banana Prata e frio, focalizando os açúcares como a sacarose e os frutooligossacarídeos. Assim, este estudo teve como objetivo verificar a influência do armazenamento da banana Prata em baixas temperaturas na produção de sacarose e FOS. Também foram analisadas as possíveis enzimas envolvidas no processo.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Material

Bananas no estágio verde-maduro foram obtidas junto ao CEAGESP-SP em um dia pós-colheita. Os frutos foram separados em dois grupos e armazenados em câmaras separadas com temperatura controlada (19 °C, grupo controle e 10 °C, grupo armazenado ao frio). Após 15 dias armazenados a 10°C, a temperatura da câmara foi aumentada para 19 °C até o final do amadurecimento. Ambos os grupos foram monitorados diariamente quanto aos teores de etileno e respiração (dados não mostrados). As amostras selecionadas foram descascadas, cortadas e armazenadas em N₂ líquido a – 80 °C para futuras análises.

2.2. Determinação da sacarose

Os açúcares solúveis 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. O sacarose foi analisada por HPLC-PAD, utilizando cromatógrafo DIONEX DX-500 com coluna CarboPac PA-1 (250 x 4,0 mm), com fluxo constante de 1 mL/min de NaOH 18 mM, e detector amperométrico de pulso ED 40.

2.3. Extração de Frutooligossacarídeos

Os frutooligossacarídeos totais foram extraídos a partir de 0,5 g de polpa de banana por três vezes com água destilada (10 mL), a 80 ° C por 15 minutos. O sobrenadante foi combinado e ajustado para 50 mL em temperatura ambiente. As análises de FOS por HPAEC-PAD e pelo método enzimático foram feitas diretamente neste extrato após filtração em membrana de 0,22 µm. Para análise de FOS por TLC (cromatografia em camada delgada), uma alíquota de 1 mL do extrato de FOS foi evaporada em sistema a vácuo e reconstituída com água em 250 µL.

2.4. Análise de FOS por HPAECPAD

Os frutooligossacarídeos foram analisados por HPLC-PAD, utilizando cromatógrafo Dionex DX-500, com coluna Carbopac PA1 (250 x 4 mm), com fluxo de 1 mL/ min em gradiente de eluição através das soluções A (1M NaOH), solução B (H₂O) e C (1 M de acetato de sódio). O programa de eluição foi iniciado com 10% de A e 90% de B (por 12 min), seguido de 30 % de A e 70 % de B (até 15 min); 30 % de A, 50 % de B e 20 % de C até 25 minutos; 30 % de A, 20 % de B e 50 % de C até 40 minutos; e re-equilibrada em 40, 1 min com 10% A e 90 % B por 10 minutos; com um total de 50 minutos de tempo de corrida.

2.5. Análise de FOS pelo método enzimático

O teor de FOS total foi determinado através do KIT Megazyme (“Fructan Assay Procedure for the measurement of Fructo-oligosaccharides (FOS) and Fructan Polysaccharides”), baseado nos métodos (AOAC, 999.03) e (AACC, 32. 32).

2.6. Análise de FOS por TLC

Uma alíquota de 10 μL do extrato de FOS e de 3 μL de padrão de *Helianthus tuberosus* (40 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) foi aplicada em placa de sílica gel - alumínio (20 x 20 Merck), que foi submetida três vezes ao desenvolvimento com 1-n-butanol, 2-iso-propanol e água (3/12/4) (v/v). Após a secagem total da placa, foi utilizado revelador específico para frutose, a partir da solução de uréia-ácido fosfórico, de acordo com Wise et al. (1995).

2.7. Extração enzimática

Uma amostra de 20 g de polpa de banana foi homogeneizada em turrax em 50 mL de tampão MÊS 50 mM, pH 5,5, contendo DTT 1mM, EDTA 1 mM, benzamidina 1 mM, cisteína 50 mM e PVP 1%. O homogenato foi centrifugado a 10.000 g por 15 minutos. O sobrenadante foi coletado e precipitado com solução de sulfato de amônio até 40% a 4 °C. Cristais de sulfato de amônio foram adicionados ao sobrenadante até saturação de 75 % para concentração de proteínas. O precipitado formado após 3 horas de vagarosa agitação foi coletado por centrifugação a 10.000 g por 15 minutos. O “pellet” resultante foi re-suspendido com 5 mL de tampão de extração (sem PVP) e dializado overnight. Em seguida, o extrato protéico foi removido da diálise e

centrifugado a 10.000 g por 15 minutos para remoção de possíveis materiais precipitados. A solução resultante foi denominada de “extrato bruto”. Para uma maior purificação, o mesmo extrato protéico foi submetido a uma resina de DEAE-celulose, equilibrada com tampão de homogeneização (sem PVP). As enzimas foram eluídas da resina após lavagem com solução de NaCl 0,5 M em tampão de homogeneização. Em seguida, a fração protéica foi concentrada com a adição de sulfato de amônio sólido até 75 % de saturação. O precipitado formado após 3 horas de agitação vagarosa, foi coletado por centrifugação a 10.000 g por 5 min, e o “pellet” resultante foi re-suspendido em 2mL de tampão de extração pH 5,5 e dializado overnight. Este extrato foi denominado de “parcialmente purificado”.

2.8. Determinação Protéica

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

2.9. Atividade enzimática de invertase

A atividade de frutossiltransferase presente no extrato protéico foi medida em relação à concentração do substrato, tempo de incubação e resposta ao inibidor. Em relação à concentração do substrato, 200 μ L do extrato bruto e parcialmente purificados foram adicionados a 200 μ L de tampão MÊS, pH 5,5, 50 mM e sacarose para concentração final de 20 mM, 100 mM, 600 mM, 1,2 M e 2M. A mistura de reação foi incubada a 28 °C por 6 horas e em seguida aquecida a 90 °C por 5 minutos em bloco

de aquecimento, para finalizar a atividade da enzima imediatamente. Em seguida, a mistura resultante foi diluída para concentração final de sacarose 50 mM e filtrada em membrana de 0,45 μm e análise por HPAEC-PAD (cromatografia líquida de alta performance). A medida da atividade de frutossiltransferase foi determinada a partir da formação de frutooligossacarídeos, como produto de reação, pela análise em HPAEC-PAD, com utilização de coluna CarboPac PA-1, fluxo de 1 mL/ min em gradiente de acetato de sódio em NaOH, como já descrito no item 2.4.

Para medida da atividade em função do tempo, volumes iguais de extrato protéico e tampão MÊS pH 5,5 foram adicionados de solução de sacarose de maneira a atingir a concentração final de 600mM e foram incubados em por diferentes intervalos de tempo. As medidas de atividade também foram analisadas por cromatografia como descrito anteriormente no item 2.4. Para medir o efeito do inibidor na atividade enzimática, partes iguais (v/v) de extrato protéico foram incubadas com tampão MÊS(pH 5,5), contendo sacarose 600 mM e Piridoxal HCl (10mM). Os produtos de reação (trissacarídeo- FOS) tiveram seus níveis determinados com a utilização de Turanose como medida de padrão interno.

Para verificar a estrutura molecular tipo frutano dos produtos de trissacarídeos formados nas reações de atividade enzimática, uma alíquota de cada extrato final de reação após análise por HPAEC-PAD foi tratada com fructanase (Megazyme) (454 U exo-inulinase/ mL e 4,54 U de endo-inulinase/ mL) por 2 horas de incubação a 40 °C em tampão acetato pH 5,5. O produto formado foi então re-analisado através de cromatografia (HPAEC-PAD), nas mesmas condições descritas anteriormente.

Devido a baixa atividade de transferase da invertase em concentrações de sacarose abaixo de 100 mM, a atividade de hidrólise da invertase foi determinada em solução de 20 mM de sacarose e os produtos de reação (glicose e frutose) foram analisados por cromatografia em sistema CLAE (DIONEX), com coluna CarboPac PA-1 com fluxo constante de NaOH 18 mM, como descrito anteriormente (item 2.2).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Teores de sacarose e de frutooligossacarídeos totais

Os frutooligossacarídeos totais foram detectados desde o primeiro dia pós-colheita tanto em bananas controle (armazenadas a 19 °C) quanto nas armazenadas a baixa temperatura (10 °C), apesar dos baixos níveis de sacarose no início do amadurecimento (Figura 1). O acúmulo de 1-kestose começou a ser detectado apenas após a sacarose ter atingido níveis de aproximadamente 200 mg/ g M.S e, imediatamente após este mesmo nível de sacarose, foi verificado um rápido aumento no perfil de acúmulo de FOS total (Figura 1). Assim, este novo conjunto de dados confirma os resultados apresentados no capítulo 1, que sugerem a importância da sacarose como um sinal de ativação para a síntese de 1-kestose e o consequente acúmulo de oligos de maior grau de polimerização.

A formação de sacarose e de FOS parece sofrer um atraso temporal nas amostras de bananas armazenadas a baixa temperatura. No entanto, o amadurecimento das bananas expostas ao frio também ocorreu apenas aos 23 dias pós-colheita (DPC), quando comparado com o amadurecimento total em 12 DPC para bananas controle (Figura 1). O nível total de FOS também foi maior em bananas armazenadas a baixas temperaturas do que nas amostras controle, mas o teor de sacarose em bananas submetidas ao frio também foi maior (Figura 1). A razão entre o nível máximo de FOS pelo nível de sacarose foi igual entre ambos os tratamentos (controle: $3692 \mu\text{g/g FOS} / 470 \text{ mg/g sacarose} = 7,8$ e armazenada ao frio: $4345 \mu\text{g FOS} / 554 \text{ mg/g sacarose} = 7,8$), sugerindo uma correlação positiva entre os açúcares.

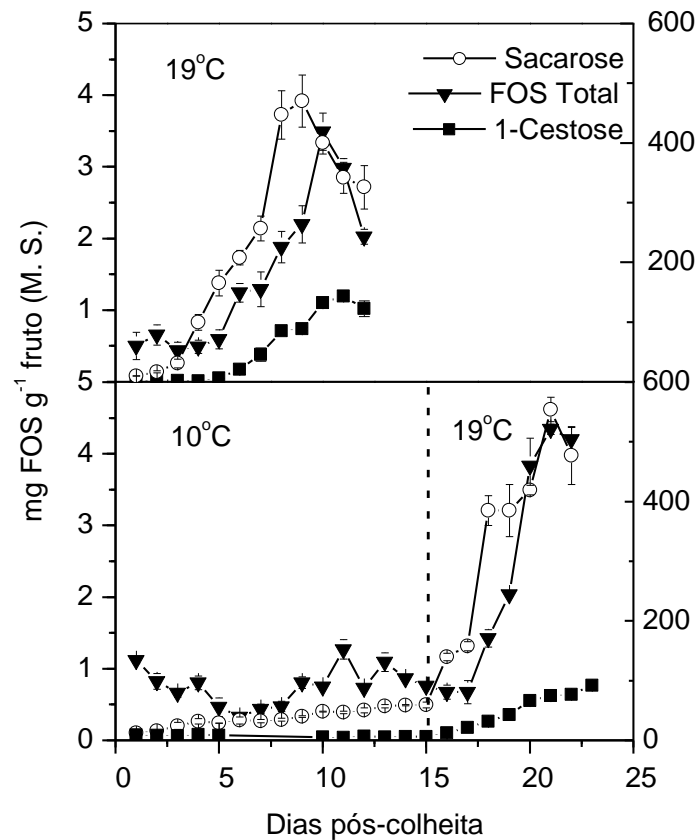


Figura 1. Acúmulo de sacarose, 1-cestose e FOS total durante o amadurecimento de banana Prata controle (19 °C) e armazenada ao frio (10 °C). Os resultados foram expressos como média da triplicata de análise \pm erro padrão da média. A linha tracejada representa o fim do armazenamento ao frio.

A quantidade de FOS total nas bananas no estágio maduro, em ambos os tratamentos, foi quatro vezes maior que os níveis de 1-cestose (Figura 1), sugerindo a presença de outros frutooligossacarídeos, apesar da 1-cestose ter sido apontada como principal membro de FOS acumulado em banana (HOMME et al., 2001; HOGARTH et

al., 2000). No entanto, diferenças significativas em relação aos níveis de FOS em banana têm sido observadas na literatura. Campbell et al. (1997), verificaram os maiores níveis de FOS (aproximadamente 10 mg) em banana, em contraste aos menores níveis (0,2 a 2,0 mg) mencionados por outros estudos (HOGARTH et al., 2000). Além disso, a presença de frutanos além da série inulina, como neocestose, 6-cestose e bifurcose poderiam explicar as diferenças dos dados relatados anteriormente.

3.2. Análises de extrato de açúcares

Freqüentemente, a identificação de outros FOS além de 1-cestose em banana é difícil devido à ausência de padrões de frutooligossacarídeos, razão que nos conduziu às análises de FOS em extrato de açúcar de banana por HPLC e TLC nas mesmas condições de ensaios previamente estabelecidos em estudos anteriores, para efeito de comparação. Para estas análises foram escolhidas amostras sem influência do resfriamento e no estágio (DPC) correspondente aos maiores níveis de FOS total (Figura 1), que vem a ser a controle 10 DPC.

No perfil cromatográfico por HPAEC-PAD do extrato de açúcares, foram observados dois picos coincidentes com os padrões de 1-cestose e de nistose (Figura 2), que já haviam sido identificados estruturalmente por CG-MS (capítulo 1). No entanto, foram também observados mais 4 picos (A, B, C e D, Figura 2) entre os padrões de cestose e nistose, com tempos de retenção coincidentes com os respectivos FOS, 6-cestose, neocestose e bifurcose. A indicação de que se tratam destes FOS vem da utilização das mesmas condições cromatográficas utilizadas por

Vijn et al. (1998) e Kawakami et al. (2005), que identificaram picos com os mesmos tempos de eluição como sendo destas formas de FOS.

Este mesmo extrato de açúcares analisado acima foi submetido à hidrólise enzimática com fructanase (exo e endo-inulinase- Megazyme) para verificar a natureza molecular dos picos de carboidratos denominados como A, B, C e D no cromatograma da Figura 2. Logo, todos os picos correspondentes do cromatograma sofreram ação das enzimas específicas para hidrólise de FOS (dados não mostrados), sugerindo a presença de demais picos de frutooligossacarídeos.

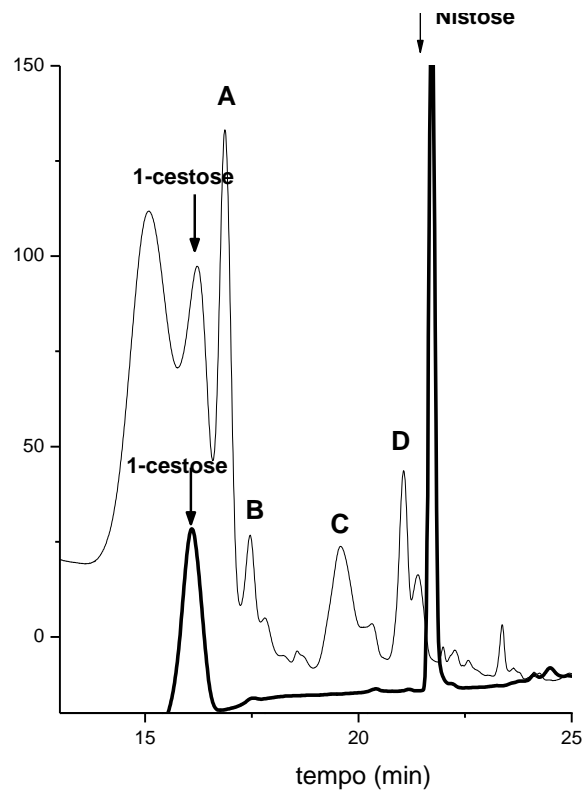


Figura 2. Cromatografia através de HPLC-PAD do extrato de açúcar de banana Prata 10 DPC. Os padrões de 1-cestose e de nistose são indicados pelas setas. As letras A, B, C e D correspondem aos picos de carboidrato entre 1-cestose e nistose, com possível formação para FOS.

Uma triplicata do mesmo extrato foi submetida à análise por TLC com utilização de revelador específico para ligação tipo frutose e *Helianthus tuberosus* como padrão (Figura 3).

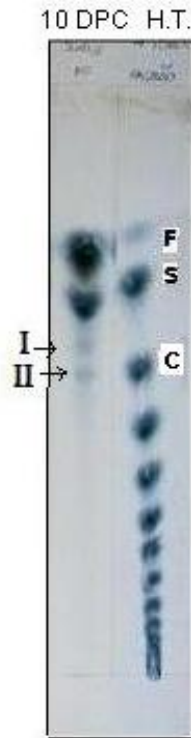


Figura 3. Cromatografia em camada delgada (sílica-gel) de extrato de açúcar de banana Prata 10 DPC (amostra controle) e padrão *Helianthus tuberosus* (H. T.), com desenvolvimento triplo em sistema de solvente propanol: acetato de etila: água (45: 35:20) e revelador específico para frutose de uréia – ácido fosfórico, seguido de aquecimento a 110 ° C por 5 minutos. I e II indicados pela flecha correspondem a FOS com grau de polimerização 3 (DP3).

No extrato de banana (controle,10 DPC), foram visualizadas duas marcações (I e II), além da presença de frutose e sacarose, que parecem corresponder à presença de carboidrato tipo FOS. A marcação em II apresentou rf equivalente à posição 1-cestose pelo padrão de *Helianthus tuberosus* (Figura 3). Porém, a marcação em I (entre a sacarose e a 1-cestose) apresentou idêntica mobilidade da 6-cestose em uma análise de carboidrato similar observada por Sims et al. (2003).

3.3. Biossíntese de FOS em banana

Uma vez encontradas diferentes formas de FOS na banana Prata, foi considerada a hipótese da presença de enzimas frutossiltransferases na banana e por isso foram feitos diversos experimentos que não resultaram positivos (dados não mostrados), para a presença destas enzimas clássicas associadas com a biossíntese de frutanos. Assim, foi aventada a possibilidade da invertase estar atuando na síntese de FOS na banana pela ação de transglicosilação. Além disso, pelo sistema enzimático clássico, os diferentes tipos de frutanos encontrados em banana iriam requerer a presença de um sistema metabólico complexo, que são mais comumente encontrados em vegetais em que os frutanos são a principal fonte de reserva de carboidratos (SIMS et al., 2003). Isto porque, as presenças de distintas formas de frutanos, com base em suas diferentes ligações glicosídicas, dependeriam da ação consecutiva de várias enzimas frutossiltransferases (VIJN e SMEEKENS, 1999).

A inulina que é uma estrutura linear composta da ligação β -(2-1) é sintetizada pela ação das enzimas: sacarose: sacarose 1-frutossiltransferase (1-SST E. C. 2.4.1.99) que catalisa a formação da 1-cestotriose, e da frutano: frutano 1-frutossiltransferase (1-FFT; E.C. 2.4.1.100), que catalisa a transfrutossililação entre frutanos (EDELMAN e JEFFORD, 1986). A neo-série de inulinas são formadas pela ação da 1-SST e da frutano: frutano 6-G-frutossiltransferase (6-G-FT ou 6 G-FFT), que transfere uma unidade frutossil de uma molécula de frutano para a posição 6 da unidade glicosil da molécula de sacarose, resultando na formação da 6G-cestotriose (SHIOMI, 1981; VIJN, 1997). A bifurcose corresponde a extensões da sacarose através da ligação β -(2,6) nas unidades frutossil, com e sem ramificações de unidades frutossil na posição β -(2,1), e parecem ser sintetizadas pela ação das enzimas 1-SST e sacarose: frutano 6-frutossiltransferase (6-SFT) (Duchateau et al., 1995; VIJN e SMEEKENS, 1999).

Além disso, não há estudos que indiquem evidências da síntese de FOS pela ação de frutossiltransferases em bananas. Por outro lado, estudos anteriores já têm apontado a atividade de transferase pela invertase em banana em relação à síntese de FOS (HEDERSON et al., 1958). Assim, foram então testadas a capacidade de síntese de FOS por transglicosilação em soluções de diferentes concentrações de sacarose, de acordo com o experimento previamente proposto por Obeland et al. (1993), contra extrato protéico bruto e parcialmente purificado de banana Prata (controle_10 DPC). A figura 4 demonstra que a enzima com atividade de transglicosilação apresentou atividade em alta concentração de sacarose, de acordo com as características de atividade de invertase, e o extrato enzimático parcialmente purificado apresentou uma atividade específica quase 10 vezes maior que o extrato bruto.

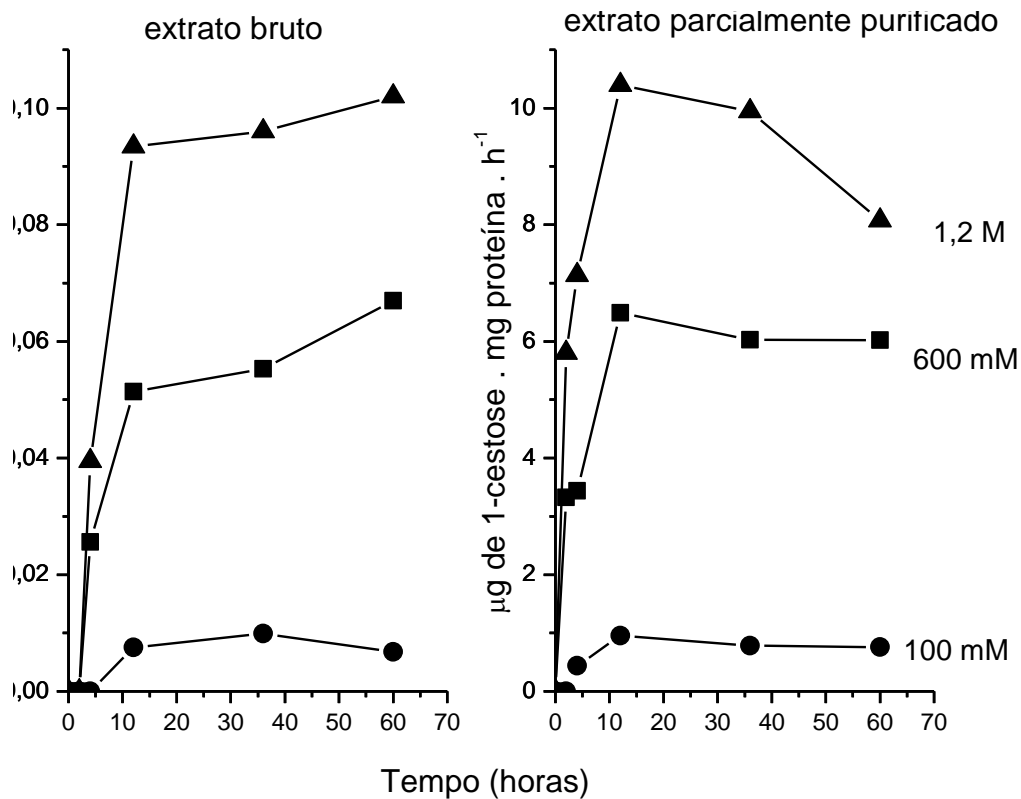


Figura 4. Perfil de atividade de transglicosilação da invertase em extrato bruto e parcialmente purificado de banana Prata (controle 10 DPC), incubado em diferentes concentrações de sacarose (100 mM, 600 mM e 1,2 M). O produto de atividade foi quantificado pelos teores de 1-cestose a partir da análise por HPAEC-PAD após 0, 2, 4, 12, 36 e 60 horas.

Durante a extração protéica, as pectinas solúveis da polpa da banana aumentaram a viscosidade do extrato bruto, dificultando a passagem por colunas utilizadas nas etapas de purificação proposta pela metodologia de purificação de invertase solúvel em cevada (OBELAND et al., 1993). Além disso, várias etapas propostas para purificação da invertase de banana (ROGERS et al., 1980), usualmente causam uma grande perda na atividade que dificultava a visualização da ação de

transglicosilação desta enzima, já que esta corresponde apenas a 14 a 19% da atividade total, considerando a atividade de hidrólise a principal ação da enzima (OBELAND et al., 1993). Portanto, o extrato enzimático foi somente parcialmente purificado e a identidade da enzima responsável pela atividade de frutossiltransferase foi demonstrada por vias indiretas, como descrito abaixo.

3.4. Atividade de transglicosilação da invertase em banana

Uma propriedade geral das frutossiltransferases é a especificidade de transfrutossililação para a síntese de FOS, enquanto as invertases têm a capacidade de síntese de FOS e de hidrólise da sacarose simultaneamente, a partir do mesmo substrato. Para confirmar a presença de invertase no extrato protéico, foi ensaiada a atividade de hidrólise da invertase com base na quebra da sacarose e formação da glicose e frutose nas condições de baixa concentração de sacarose 20 mM (Figura 5 B). Neste mesmo extrato, a análise dos carboidratos formados a partir do ensaio, em diferentes concentrações de sacarose, mostraram a síntese de FOS apenas a partir da concentração de 100 mM de sacarose e nenhuma formação na concentração de 20 mM (Figura 5). Apesar da presença de um pequeno pico em 17 minutos (tempo de retenção), no cromatograma referente ao ensaio com sacarose 20 mM (Figura 5), este parece não corresponder a nenhuma formação tipo FOS (discutida adiante na Figura 6).

Assim, parece que a atividade enzimática na banana foi altamente dependente da concentração de sacarose e do tempo de incubação (Figura 4 e 5). Estudos anteriores mostraram que a atividade de transglicosilação é geralmente observada

apenas a partir da concentração de 100 mM de sacarose e aumenta com a concentração deste substrato. Ao contrário, a atividade de hidrólise apenas aumenta em condições de baixa concentração de sacarose e permanece constante a partir de 100 mM (RITSEMA et al., 2006). Por outro lado, a síntese de FOS pela ação das enzimas frutossiltransferases não segue as mesmas características cinéticas da invertase, apresentando atividade em concentrações bem abaixo de 100mM de sacarose. (LUSCHER et al., 2000; VAN DEN ENDE et al., 1996; CAIRNS et al., 1989).

A capacidade e especificidade enzimática para a síntese de FOS pela invertase parece ser o resultado da presença das “Sucrose binding box” que correspondem a regiões de aminoácidos altamente conservadas no sítio catalítico da enzima, também encontradas nas frutossiltransferases (RITSEMA et al., 2006). Um estudo recente em cebola mostrou que pequenas mudanças nas posições destes aminoácidos na região do “sucrose binding box” da invertase aumentou significativamente a capacidade de transglicosilação desta enzima que levou ao acúmulo de FOS, devido a mesma origem filogenética entre as enzimas (RITSEMA et al., 2006).

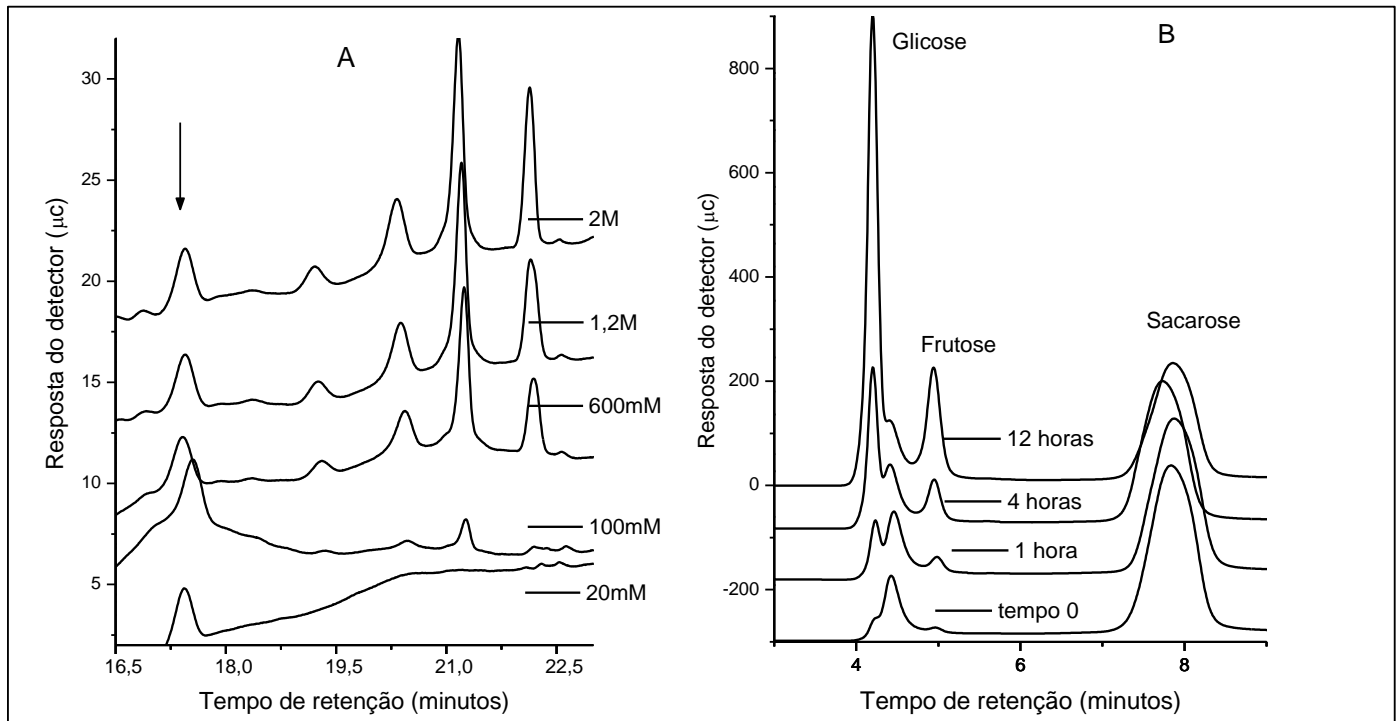


Figura 5. (A) Cromatografia em HPAEC-PAD de extrato protéico de banana Prata controle (10 DPC) após ensaio com incubação de 6 horas com diferentes concentrações de sacarose. A seta indica a presença de um açúcar com estrutura distinta de FOS. (B) Corresponde ao ensaio da atividade de hidrólise da invertase em extrato protéico de banana Prata (10 DPC) após diferentes tempos de incubação em 20 mM de sacarose.

Para investigar a influência do tempo na síntese de FOS, foi estabelecida a concentração de 600 mM de sacarose para o ensaio de transglicosilação em diferentes intervalos de incubação do extrato protéico (Figura 6 A). Nele foram observados 4 picos com o mesmo tempo de retenção que verificado anteriormente na Figura 5 (entre os padrões de 1-kestose e nistose), que também correspondem aos picos A, B, C e D, visualizados no cromatograma proveniente do extrato de açúcares da banana (controle_10 DPC) (Figura 2), que parecem corresponder a FOS. Portanto, para confirmar a identidade destes picos, estes foram submetidos à ação da fructanase (exo

e endo inulinase, específica para a hidrólise de FOS) (Figura 6 B) e apenas um pico não desapareceu (pico II, em 17 minutos), sugerindo um açúcar diferente neste ponto, como anteriormente discutido (Figura 5).

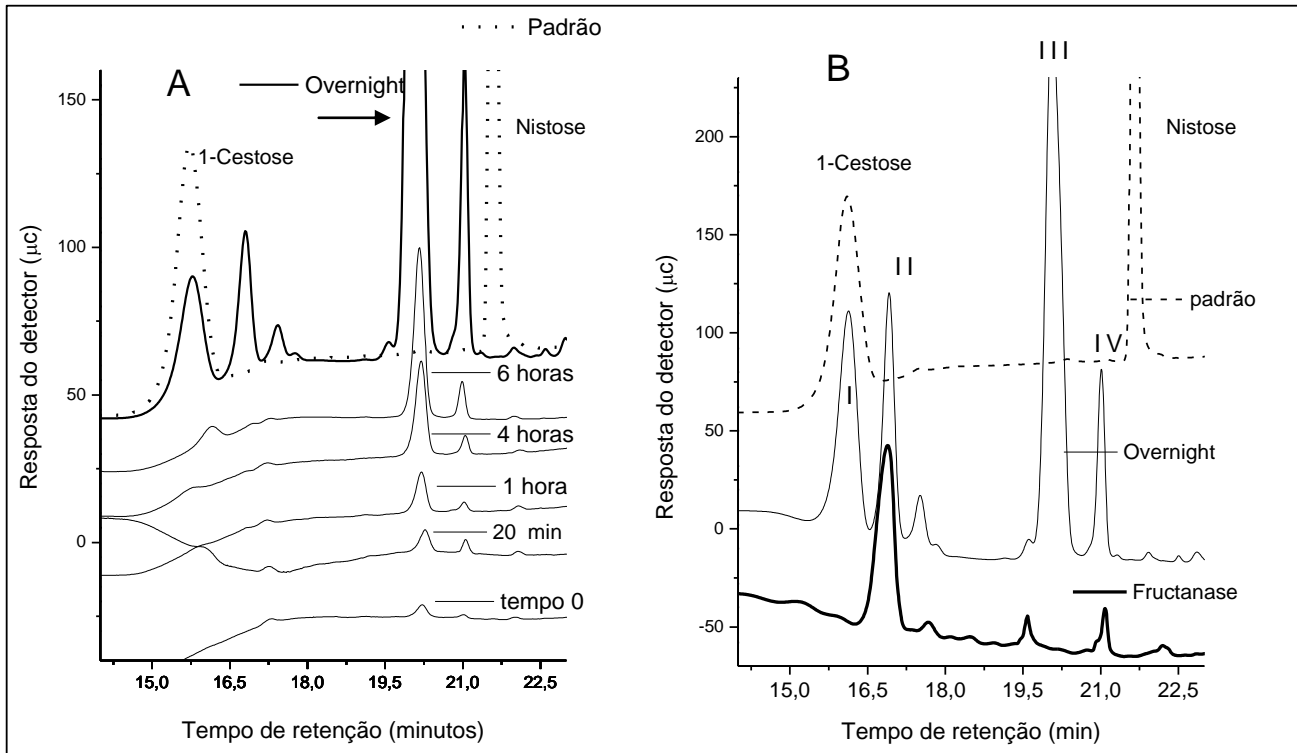


Figura 6. (A) Cromatografia por HPAEC-PAD dos produtos de síntese do ensaio de extrato protéico de banana Prata (controle 10 DPC) após incubação com sacarose 600 mM em diferentes intervalos de tempo. A seta indica o maior pico de formação de açúcar após 24 horas de ensaio enzimático. (B) Efeito da atividade de hidrólise da Fructanase sobre os produtos de reação do ensaio do extrato protéico de banana Prata após incubação overnight. I, III e IV correspondem aos produtos de FOS e II a formação de açúcar resistente a ação da enzima.

Na figura 6 A, também pode ser notado um pico bastante elevado (20 min de retenção) após ensaio enzimático com 24 horas de incubação, quando comparado aos picos dos produtos de reação após 6 horas de ensaio. No entanto, de acordo com a análise da Figura 4, a ação de transglicosilação da invertase parece atingir a atividade máxima somente após 12 horas de reação. Portanto, estes altos níveis de formação depois de prolongada ação da atividade de transglicosilação da enzima invertase, poderiam explicar os maiores níveis de FOS previamente indicados para banana em trabalhos anteriores (CAMPBELL et al., 1997). Este mesmo pico (20 min de retenção) relacionado à formação de FOS poderia corresponder ao mesmo produto visualizado anteriormente pela análise de carboidrato com revelador específico para frutose em TLC (Figura 3), devido aos altos níveis observados pela análise em HPLC comparada a baixa sensibilidade da cromatografia em camada delgada. Portanto, baseado na análise do TLC (Figura 3), este pico poderia corresponder à formação de 6-cestose.

Ritsema et al. (2006) observaram que em 20 minutos de ensaio de invertase com 100 mM de sacarose resultou em 1,2 % de transglicosilação em relação à atividade total da enzima. No entanto, após incubação “overnight”, houve a completa hidrólise do substrato, a sacarose. Além disso, os autores também observaram que nestas condições de longo ensaio enzimático, a invertase também degradou a 1-cestose formada. Ainda neste mesmo experimento, foi observado que o ensaio “overnight” da invertase com 1 M de sacarose resultou em 6,4% de transglicosilação da atividade total da enzima. Portanto, o tempo de incubação e as condições de concentrações da sacarose são parâmetros importantes que atuam diretamente sobre a atividade de transglicosilação da invertase.

Uma questão central no desenvolvimento da habilidade de sintetizar frutanos é a evolução das enzimas frutossiltransferases a partir das hidrolases invertases (VAN DEN ENDE et al., 2002; HENDRY, 1993; WEI e CHATTERTON, 2001). No entanto, as frutossiltransferases e invertases conservaram propriedades individuais que têm sido consideradas para distinguir a atividade de cada enzima. Por exemplo, as atividades de hidrolases e transferases provenientes da invertase purificada de trigo, não respondem as mesmas condições de pH e temperatura, dando uma falsa idéia da presença de duas enzimas (CAIRNS e ASHTON, 1991). No entanto, os autores verificaram que as duas atividades de hidrolase e transferase pela invertase eram inibidas em paralelo pela ação do Piridixal HCl (10mM). A inibição diferencial por Piridoxal é um indicativo que a atividade da invertase e da SST são atributos de diferentes enzimas (WAGNER e WIEMKEN, 1986). Assim, para aumentar as evidências de que a atividade de frutossiltransferase pela invertase em banana, é a atuante na síntese dos FOS da banana, foi também avaliado o efeito do Piridoxal diretamente sobre a atividade de transferase no extrato protéico de banana (10 DPC, controle) (Figura 7).

Através da análise da Figura 7, foi verificado que a enzima responsável pela ação de transglicosilação e conseqüente síntese de FOS em extrato de banana Prata, foi sensível à ação do Piridoxal HCl 10 mM, do mesmo modo que a invertase de cevada (OBELAND et al., 1993). O que sugere que a invertase poderia ser a enzima chave, responsável pelas etapas iniciais da biossíntese de FOS em banana Prata.

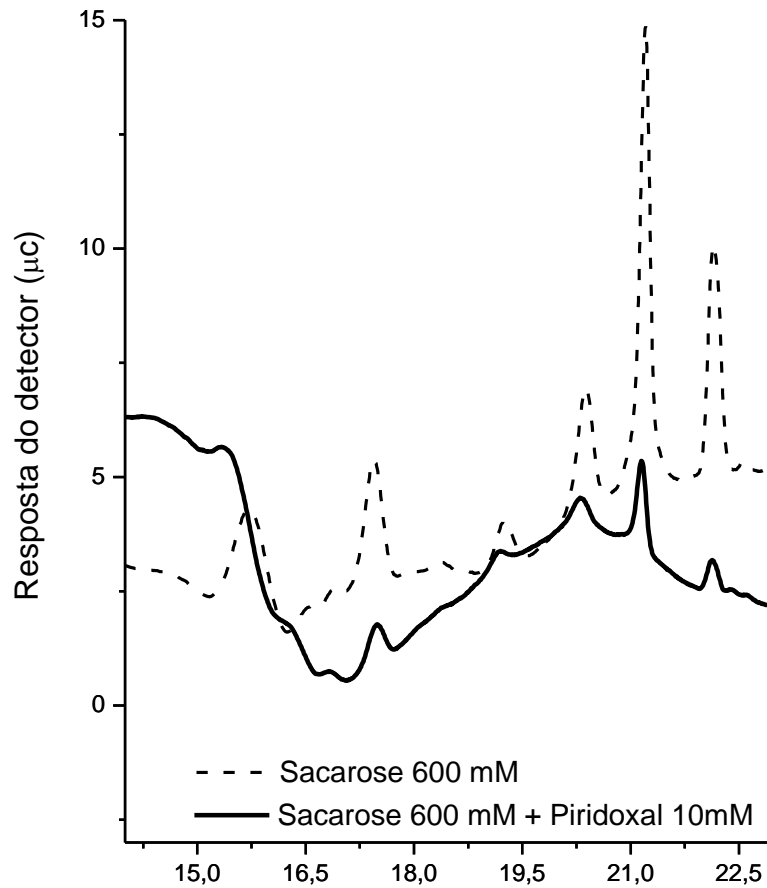


Figura 7. Cromatografia líquida (HPAEC-PAD) dos produtos de carboidrato sintetizados a partir da atividade de transglicosilação da invertase em extrato de banana Prata (controle 10 DPC) com e sem a presença de Piridoxal HCl (10 mM).

Em suma, os resultados obtidos foram de acordo com a ação da invertase, sugerindo sua capacidade na síntese de FOS na banana Prata. Além disso, as análises dos níveis de FOS e dos produtos de reação das atividades enzimáticas indicaram a presença de trissacarídeos estruturalmente semelhantes aos FOS, além da 1-cestose, que poderiam explicar os maiores níveis desta classe de carboidratos encontrado em banana em trabalhos anteriores (CAMPBELL et al., 1997).

Níveis maiores de FOS foram detectados em bananas armazenadas a baixa temperatura, que estavam também em paralelo com os maiores níveis de sacarose, também visualizados em bananas acondicionados ao frio, confirmando a correlação apresentada no capítulo 1 entre os açúcares. Entretanto, os maiores níveis de sacarose encontrados em bananas armazenados em baixas temperaturas poderiam ser resultado de mudanças na atividade de enzimas biossintéticas e degradativas sob o efeito do frio. Entre elas a sacarose-sintase (SuSy), a sacarose-fosfato sintase (SPS) e as invertases, uma vez que o metabolismo de carboidratos em banana apresenta um sistema altamente integrado no qual a sacarose possui um importante papel, direta ou indiretamente.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRADFORD, M.M. Rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. **Anal. Biochemistry**, San Diego, v. 72, n.1-2, p.248-254, 1976.

CAIRNS, A. J., ASHTON, J. E. The interpretation of in vitro measurements of fructosyl transferase activity: an analysis of patterns of fructosyl transferase by fungal invertase. **New Phytologist**, v. 118,p. 23-24, 1991.

CAIRNS, A. J.; WINTERS, A.; POLLOCK, C. J. Fructan biosynthesis in excised leaves of *Lolium temulentum* L. III. A comparison of the *in vitro* properties of fructosyl transferase activities with the characteristics of *in vivo* fructan accumulation. **New Phytologist** ,v. 112, p. 343-352, 1989.

CAMPBELL, J. M.; BAUER, L. L.; FASHEY, G. C. JR.; HOGARTH, A. J. C. L.; WOLF, BR. W.; HUNTER, D. E. Selected Fructooligosaccharides (1-Kestose, Nystose and 1^F - β -Fructofuranosylnystose) composition of foods and feeds. **Journal Agriculture and Food Chemistry**, v. 45, p. 3076-3082, 1997.

DUCHATEAU, N., BORTLIK, K., SIMMEN, U., WIEMKEN, A., BANCAL, P. Sucrose: fructan 6-fructosyltransferase, a key enzyme for diverting carbon from sucrose to fructan in barley leaves. **Plant Physiology**, v. 197, p. 1249 -1255, 1995.

EDELMAN, J., JEFFORD, T. G. The mechanism of fructan metabolism in higher plants as exemplified in *Helianthus tuberosus*. **New Phytologist**, v. 67, p. 517-531, 1968.

HENDERSON, R. W., MORTON, R. K., RAWLINSON, W. A. Oligosaccharide synthesis in banana and its relationship to the transferase activity of invertase. p. 341-344, 1958.

- HENDRY, G. A. F. Evolutionary origins and natural functions of fructans – A climatological, biogeographic and mechanistic appraisal. **New Phytologist**, v. 123, p. 3-14, 1993.
- HOGARTH, A. J. C. L., HUNTER, D. E., JACOBS, W. A., GARLEB, K. A., WOLF, B. W. Ion Chromatography determination of three fructooligosaccharide oligomers in prepared and preserved foods. **Journal Agriculture and Food Chemistry**, v. 8, p. 5326-5330, 2000.
- HOMME, C. L., PESCHET, J. L., PUIGSERVER, A., BIAGINI, A. Evaluation of fructans in various fresh and stewed fruits by high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection. **Journal of Chromatography A**, v. 920, p. 291-297, 2001.
- JEONG, B. R., HOUSLEY, J. Fructan metabolism in wheat in alternating warm and cold temperatures. **Plant Physiology**, v. 93, p. 902-906, 1990.
- KAWAKAMI, A., YOSHIDA, M. Fructan: fructan 1-fructosyltransferase, a key enzyme for biosynthesis of graminan oligomers in hardened wheat. **Planta**, v. 223, p. 90-104, 2005.
- LICHTENBERG, L. A., MALBURG, J. L., HINZ, R. H. Susceptibilidade varietal de frutos de bananeira ao frio. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 23, p. 3, 2001.
- LUSCHER, M., HOSCSTRASSER, U., VOGEL, G., AESCHBACHER, R., GALATI, V., NELSON, C. J., BOLLER, T., WIEMKEN, A. Cloning and functional analysis of sucrose: sucrose 1-fructosyltransferase from tall fescue. **Plant Physiology**, v. 124, p. 1217-1228, 2000.

- OBELAND, D. M.; SIMMEN, U.; BOLLER, T.; WIEMKEN, A. Purification and characterization of three soluble invertases from Barley (*Hordeum vulgare* L.) Leaves. **Plant Physiology**, v. 101, p. 1331-1339, 1993.
- POLLOCK, C. J. Fructans and the metabolism of sucrose in vascular plants. **New Phytologist**, v. 104, p. 1-24, 1986.
- POLLOCK, C. J., LLOYD, E. J. The effect of low temperature upon starch, sucrose and fructan synthesis in leaves. **Annual Botanic**, v. 60, p. 231- 235, 1987.
- RITSEMA, T., VERHAAR, A., VIJN, I., SMEEKENS, S. Fructosyltransferase mutants specify a function for the β -fructosidase motif of the sucrose-binding box in specifying the fructan type synthesized. **Plant Molecular Biology**, v. 54, p. 853- 863, 2004.
- RITSEMA, T., HERNÁNDEZ, L., VERHAAR, A., ALTENBACH, D., BOLLER, T., WIEMKEN, A, SMEEKENS, S. D. Developing fructan-synthesizing capability in a plant invertase via mutations in the sucrose-binding box. **The Plant Journal**, v. 48, p. 228-237, 2006.
- ROGERS, W. F. S., JENKINS, I. D., GUTHRIE, R. D. Isolation of invertase from Banana Fruit (*Musa Cavendishii*). **Phytochemistry**, v.19, p.399-401, 1980.
- SHIOMI, N. Purification and characterization of 6^G-fructosyltransferase from the roots of asparagus (*Asparagus officinalis* L.) **Carbohydrate Research**, v. 96, p. 281- 292, 1981.
- SIMS, I. M. Structural diversity of fructans from members of the order Asparagales in New Zealand. **Phytochemistry**, v. 63, p. 351- 359, 2003.

- VAN DEN ENDE, W., VAN WONTERGHEM, D., DEWIL, D., VERHAERT, P., DE LOOF, A., VAN LAERE, A. Purification and characterization of 1-SST, the key enzyme initiating fructan biosynthesis in young chicory roots (*Chicory intybus L.*). **Physiololy Plantarium**, v. 98, p. 455- 466, 1996.
- VAN DEN ENDE, W., MICHIELIS, A., DE ROOVER, J., VAN LAERE, A. Fructan biosynthetic and breakdown enzymes in dicots evolved from different invertases. Expression of fructan genes throughout chicory development. **Science World Journal**, v. 2, p. 1281- 1295, 2002.
- VIJN, I., SMEEKENS, S. Fructan: more than a reserve carbohydrate? **Plant Physiology**, v. 120, p. 351- 359, 1999.
- VIJN, I., VAN DIJKEN, A., LUSCHER, M., BOS, A., SMEETS, E., WEISBEEK, P., WIEMKEN, A., SMEEKENS, S. Cloning of sucrose: sucrose 1-fructosyltransferase from onion and synthesis of structurally defined fructan molecules from sucrose. **Plant Physiology**, v. 117, p. 1507-1513, 1998.
- VIJN, I., VAN DIJKEN, A., SPRENGER, N., VAN DUN, K., WEISBEEK, P., WIEMKEN, A., SMEEKENS, S. Fructan of the inulin neoseris is synthesized in transgenic chicory plants (*Cichorium intybus L.*) harboring onion (*Allium cepa L.*) fructan: fructan 6G-fructosyltransferase. **Plant Journal**, v. 11, p. 387- 398, 1997.
- WAGNER, W., WIEMKEN, A. Properties and subcellular localization of fructan hydrolyze in the leaves of barley (*Hordeum vulgare L. cv Gerbel*). **Journal of Plant Physiology**, v. 123, p. 429- 439, 1986.
- WEI, J. Z., CHATTERTON, N. J. Fructan biosynthesis and frutosiltransferases evolution: Expression of the 6-SFT (sucrose: fructan 6-fructosyltransferase) gene in crested wheat-grass (*Agropyron cristatum*). **Journal of Plant Physiology**, v. 158, p. 1203- 1213, 2001.

WIEMKEN, A., SPRENGER, N., BOLLER, T. Fructan - an extension of sucrose by sucrose. In: Pontes HG, Salerno GL, Echeverria EJ (eds). Internat Sympos. Sucrose metabolism. **American Society of Plant Physiologists**, p. 179- 189., 1995.

WISE, C. S.; DIMLER, R. J.; DAVIS, H. A.; RIST, C. E. Determination of easily hydrolysable fructose units in dextran preparations. **Anal.** 1995.

CAPÍTULO III

O ACÚMULO DE SACAROSE E O EFEITO DO ARMAZENAMENTO AO FRIO DURANTE O AMADURECIMENTO DE BANANA PRATA

1. INTRODUÇÃO

A sacarose possui um papel fundamental no crescimento e desenvolvimento das plantas, como açúcar de transporte e em alguns casos, como regulador direto ou indireto da expressão de alguns genes (WINTER e HUBER, 2000).

O estudo e a identificação das vias envolvidas na síntese e nos produtos de degradação deste açúcar, com suas respectivas enzimas, contribuem para elucidação do complexo mecanismo de controle do fluxo da sacarose.

Em banana, ocorre durante o amadurecimento uma maciça conversão de amido (18 a 25%) para açúcares solúveis, principalmente de sacarose, podendo atingir mais de 10 % do peso fresco do fruto (Mota et al, 1997). As vias metabólicas que atuam nesta conversão contam com a atividade de várias enzimas (SEYMOUR, 1993; CORDENUNSI e LAJOLO, 1995; MOTA et al., 2002).

O amido pode ser degradado pela via hidrolítica ou fosforolítica e seus produtos exportados do amiloplasto diretamente, ou via transportadores. Em extratos protéicos de bananas no climatério, podem ser detectadas atividades de várias das enzimas que atuam na degradação do amido e na síntese da sacarose, entre elas: a α -amilase, a β -amilase, as amido-fosforilases, a sacarose-sintase (SuSy) e a sacarose-fosfato-sintase

(SPS) (CORDENUNSI e LAJOLO, 1995) (NASCIMENTO et al., 2000; NASCIMENTO et al., 1997; MOTA et al., 2002; CORDENUNSI e LAJOLO, 1995; NASCIMENTO et al., 2006; BASSINELO et al., 2002).

Vários estudos têm demonstrado mudanças quantitativa e qualitativa no conteúdo de açúcares em plantas expostas a baixas temperaturas, sendo o mais comum e abundante a sacarose (MALONE et al., 2006; GUY et al., 1992).

Em bananas, a refrigeração é um método bastante eficiente no controle do amadurecimento, pois diminui a taxa respiratória e demais processos fisiológicos e bioquímicos dos frutos (JIANG et al., 2004). Porém, o abaixamento da temperatura no armazenamento pode promover injúrias ao fruto (“chilling injuries”), com amadurecimento anormal e incompleto, aparecimento de manchas marrom na casca e na polpa, entre VÁRIOS SINTOMAS FISIOLÓGICOS, QUE PARECEM DEPENDENTES DA CULTIVAR (YANG et al., 2000; NGUYEN et al., 2003).

Lichtemberg et al. (2001), estudaram a resposta ao frio de várias cultivares de banana tanto no campo quanto no armazenamento pós-colheita. Eles observaram que existia uma grande variação entre os grupos genômicos, no qual a banana do subgrupo Prata apresentou maior resistência, podendo ser armazenada a temperaturas inferiores a 12 °C. Este resultado é importante no caso de viabilizar seu transporte a longas distâncias, sem prejuízo à qualidade do fruto.

Muitos mecanismos têm sido estudados para explicar a tolerância de plantas ao frio, como o acúmulo de açúcares, maior mobilização do amido e aumento na atividade de endo, exo amilases e amido-fosforilases (COCHRANE et al., 1991; COTTRELL et al., 1993; CLAASEN et al., 1993) e aumento da atividade de enzimas envolvidas na síntese da sacarose, como a sacarose-fosfato-sintase (REIMMHOLOZ et al., 1997; HILL

et al., 1996). Mas não existem trabalhos que avaliem o efeito do armazenamento a baixas temperaturas sobre o metabolismo dos carboidratos da banana. Assim, este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito do frio em algumas das enzimas relacionadas ao metabolismo amido-sacarose na banana Prata.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Material

Frutos pré-climatéricos de banana cv. Prata foram obtidos junto à CEAGESP-SP, um dia após a colheita. Os frutos foram separados em dois grupos e armazenados em câmaras separadas do tipo BOD, com temperatura controlada (19 °C, grupo-controle e 10 °C, grupo-frio). Após 15 dias, os frutos armazenados a 10°C tiveram a temperatura da câmara aumentada para 19°C até o final do amadurecimento. Os frutos dos dois tratamentos foram monitorados, durante todo o amadurecimento, quanto à produção de CO₂ e etileno. As amostras (pelo menos 4 frutos por tratamento e por estágio), obtidas com base neste monitoramento, foram descascadas, picadas e armazenadas em N₂ líquido a – 80 °C para futuras análises.

2.2. Medidas de respiração e etileno

Para análise de etileno e respiração, amostras de banana foram encerradas em jarras hermeticamente fechadas de 1,5 L (3 bananas por jarra e 6 jarras por tratamento). Após 1 hora, amostras de 10 mL para etileno e 1 mL para CO₂ foram retiradas com utilização de seringa gás tight do interior das jarras e analisadas por cromatografia a gás (HP-6890, Angilet Technologies), com utilização de coluna HP-Plot Q (30m, D.I. 0,53 mm). Foi empregado o detector de ionização de chama para análise de etileno e de condutividade térmica para CO₂. A temperatura do injetor e detector foi de 250 °C e a corrida foi mantida isotérmica a 30 °C. O fluxo de 1 mL/min de gás hélio foi utilizado para análise de etileno e de 4mL/ min para de CO₂. A injeção foi realizada no modo splitless para etileno e modo split para análise de CO₂ (50:1). A

estimativa da quantidade de CO₂ e etileno foram feitas em relação á curva de calibração obtida com padrão de CO₂ e etileno em ar sintético Air Liquid.

2.3. Determinação de carboidrato

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.

Os açúcares solúveis (glicose, frutose e sacarose) foram extraídos três vezes com etanol 80 % a 70 °C, 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 amperiométrico 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 realizada com NaOH 300mM.

2.4. Determinação de proteínas

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

2.5. Preparo do extrato enzimático

Para as atividades das enzimas SuSy e SPS, as polpas de banana congeladas (-80 °C) foram trituradas em gral de porcelana, com o auxílio de nitrogênio líquido. Aproximadamente 0,5 g de amostra foi homogeneizada em 2,0 mL de solução extratora contendo Tris-HCl 100 mM (pH 8,0), NaF 1 mM, EDTA 20 mM, cisteína 20 mM, 1 % (P/V), polivinilpirrolidona (PVP) 40.000 e benzamidina 1 mM. Após a centrifugação os extratos foram dializados por 24 horas em tampão Tris HCl 100 mM, pH 8,0.

Para obtenção dos extratos protéicos para a determinação da atividade das amilases, a solução de extração foi constituída de Hepes-KOH 50 mM (pH 7,0), 20 mM cisteína, PVP 40.000 1 % (m/v), e benzamidina 1 mM. Para a atividade de β -amilase, foi acrescentado EDTA 20 mM na solução extratora. Os extratos brutos não foram dializados.

A solução extratora utilizada para a obtenção do extrato para a atividade de amido fosforilase 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 atividade.

2.6. Determinação da atividade enzimática

A atividade de sacarose sintase (SuSy) foi medida na direção da síntese de sacarose a partir do meio de atividade contendo Tris-HCL 100 mM pH 7,6, NaF 1 mM, frutose 10 mM, UDPG 5 mM e MgCl₂ 15 mM.

Para a medida de atividade de SPS foram utilizados meio contendo 50 mM de HEPES-KOH pH 7,5, 1 mM de NaF, 10 mM UDP-glicose, 5 mM de frutose-6-fosfato, 15 mM de glicose-6-fosfato, 15 mM MgCl₂ e 1 mM de NaF. Em ambos os casos, a sacarose (na atividade de SuSy) e a sacarose-6-fosfato (na atividade de SPS) foram determinadas pelo método do ácido tiobarbitúrico, como previamente descrito por Cordenunsi e Lajolo (1995).

A atividade α -amilásica foi medida utilizando o reagente Ceralpha (Megazyme international Ireland, Ltd) composto pelo substrato ρ -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 ρ -nitrofenol liberado foi lida a 410 nm e sua concentração determinada com base em curva-padrão de ρ -nitrofenol.

A atividade β -amilásica foi avaliada da mesma forma, mas o substrato utilizado foi o Betamyl (Megazyme International Ireland, Ltd), composto pelo substrato ρ -nitrofenil-maltppentosídeo e o tempo de reação foi de 30 minutos.

2.7. PAGE nativo

Os géis de eletroforese para a determinação de atividade das fosforilases foram preparados como descrito a seguir: 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-crilamida e 62,5 mM de Tris-HCl pH6,8. 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 5 (p/v) + KI 3,33% (p/v).

2.8. Extração de proteína total

Cerca de 0,5 g de polpa de banana (em diferentes estágios de amadurecimento), previamente trituradas em nitrogênio líquido, foram homogeneizadas 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 %.

2.9. 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 (30V) por pelo menos 16 horas a 4 °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 caseína 1 %. Após o bloqueio, elas foram incubadas no mesmo tampão por 2 horas, adicionado com anti-soros de coelho específico contra fosforilase (MOTA, 2001), β -amilase (NASCIMENTO et al., 2006) e α -amilase (VIEIRA JR, 2001), nas diluições 1:3000 (para fosforilase), 1:1000 (para SPS e SuSy), 1:100 (para β -amilase) e 1:200 (para α -amilase). Em seguida, as membranas foram lavadas por três vezes em tampão TBS e incubadas por mais 1 hora com anticorpo secundário antiimunoglobulina de coelho, conjugado com fosfatase alcalina, em TBS contendo caseína 1 %, na diluição (1:30.000 para fosfatase alcalina). 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 quimiluminescência usando luminol (ECL Western Blotting Detection Reaction Reagents and Analysis System, Amersham Bioscience).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os frutos do grupo controle tiveram o aumento da produção de etileno no terceiro dia pós-colheita, com o aumento na produção de CO₂ no dia seguinte (Figura 1). Os frutos do grupo frio tiveram aumento na produção de etileno um dia após a retirada dos frutos do frio (aos 16 dias pós-colheita), com aumento concomitante nas taxas de CO₂. Os níveis máximos de produção, tanto de etileno, como de CO₂, foram semelhantes entre os grupos, assim como o perfil na evolução dos dois gases.

Em ambos os grupos, a produção máxima de etileno antecedeu o pico da respiração, como já visto anteriormente em banana (SEYMOUR et al., 1993; PURGATTO et al., 2002; NASCIMENTO et al., 2006; MAINARDI et al., 2006). Assim, o armazenamento dos frutos a baixa temperatura (10 °C), parece ter produzido apenas um atraso no amadurecimento das bananas, porém sem alterar o perfil e a ordem dos eventos avaliados. Apesar deste atraso, a exposição ao frio não pareceu ter afetado os frutos, quanto à aparência.

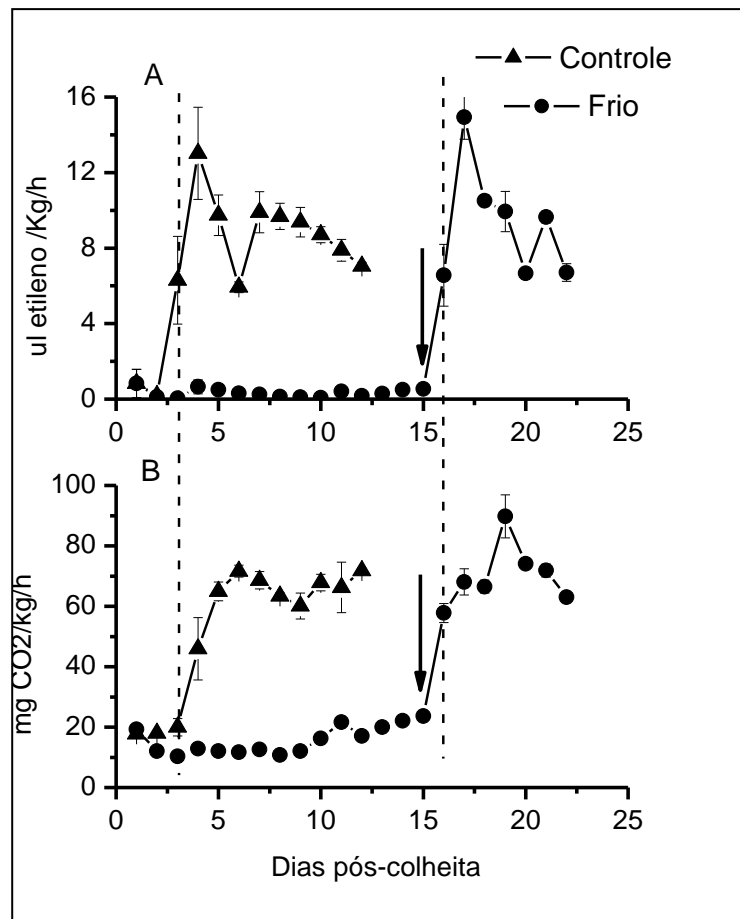


Figura 1. Perfis da produção de etileno (A) e CO₂ (B) em frutos do grupo controle (▲) e armazenados em baixa temperatura (●), durante o amadurecimento. A seta indica a retirada dos frutos armazenados ao frio para temperatura de 19 °C, até o fim do amadurecimento dos frutos. Os resultados foram expressos como média de quadruplicata de análise mais o desvio padrão das médias. As linhas tracejadas indicam o aumento da produção de etileno e CO₂ em ambos os tratamentos, com intervalo de 13 dias pós-colheita.

Os resultados obtidos estão de acordo com estudos recentes que verificaram que o pico climatérico respiratório varia com a temperatura de armazenamento das bananas, prolongando o tempo necessário para a banana atingir o amadurecimento com a diminuição da temperatura (LOBO et al., 2005).

O armazenamento dos frutos no frio também retardou em 13 dias o início da degradação do amido que ocorreu a partir do 3^o DPC do controle e do 16^o DPC no frio (Figura 2), temporalmente coincidente com o rápido aumento do etileno em cada um dos grupos. Apesar deste atraso, o perfil de degradação do amido ocorreu de modo bastante semelhante entre os frutos, apesar de visualizada uma maior taxa de degradação do amido no frio (Figura 2). Esta diferença poderia ser responsável pelos maiores níveis de sacarose (acrécimo de 20 %) verificados pelos frutos armazenados no frio em relação ao grupo controle (Figura 3), uma vez que este açúcar é formado a partir da quebra do amido durante o amadurecimento da banana.

Na figura 2 também é possível verificar a evolução das hexoses, a partir da hidrólise da sacarose e liberação de glicose e frutose devida ação da enzima invertase. Apesar do teor máximo de sacarose acumulada ser ligeiramente maior no grupo frio, o mesmo não foi observado em relação às hexoses. Apesar do maior acúmulo de sacarose no grupo frio, até como uma possível resposta fisiológica ao stress do resfriamento, não houve maior conversão desta sacarose em hexose (2C e 2D). A figura 2B mostra um acúmulo pequeno, mas constante de sacarose nas amostras de banana durante todo o armazenamento a 10°C (15 dias).

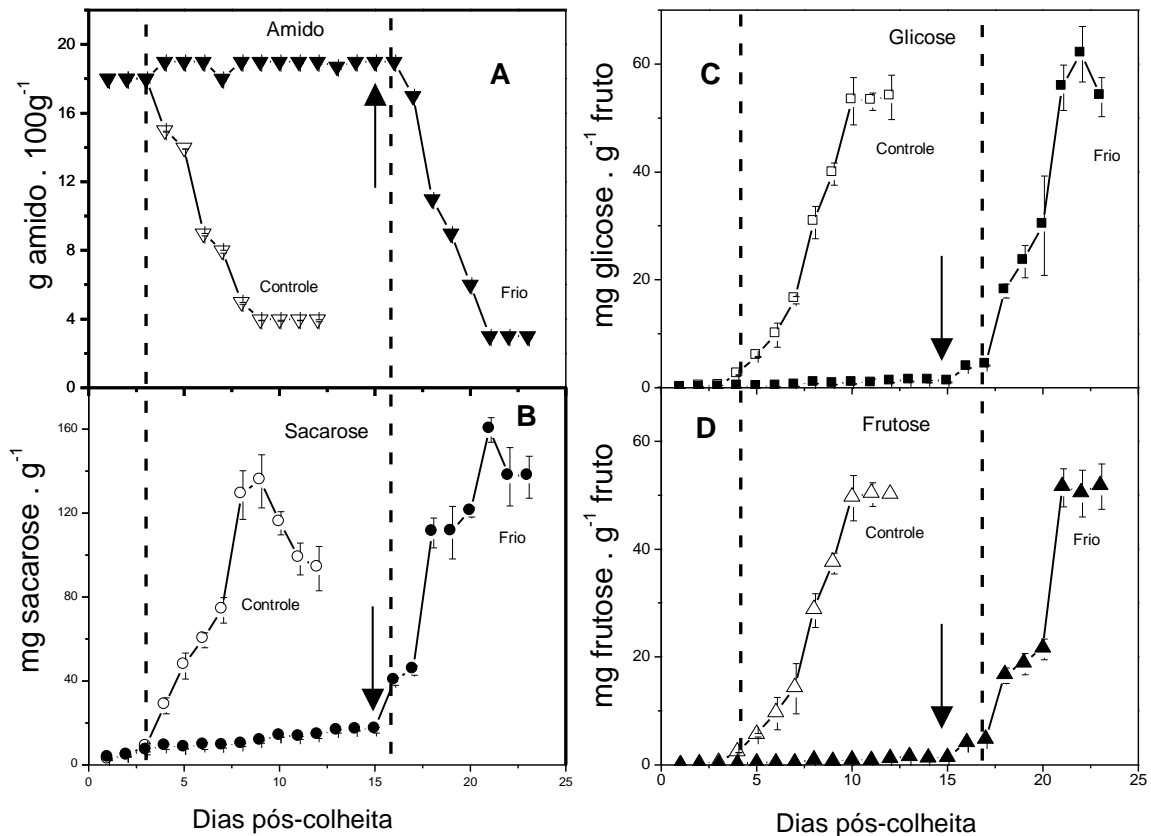


Figura 2. Perfis de degradação de amido (A), acúmulo de sacarose (B), acúmulo de glicose (C), e frutose (D) durante o amadurecimento dos frutos controle e frio. As setas indicam o fim do armazenamento no frio. A linha tracejada indica o início de degradação do amido concomitantemente com o início do acúmulo de açúcares solúveis em ambos tratamentos.

Para comparar os níveis de sacarose entre os grupos controle e frio, foi quantificada a área total da sacarose abaixo das colunas verticais ao longo de todo o amadurecimento (Figura 3) através do programa Graph Pad Prism, o qual foi verificado um acréscimo de 20 % de sacarose em frutos submetidos ao frio em relação ao controle.

Através da Figura 2B é possível verificar um pequeno acúmulo de sacarose nas amostras de banana durante todo o armazenadas ao frio (15 dias).

Para comparar os níveis formados de sacarose entre os grupos controle e frio, foi quantificada a área total da sacarose abaixo das colunas verticais ao longo de todo o amadurecimento (Figura 3) através do programa Graph Pad Prism, o qual foi verificado um acréscimo de 20 % de sacarose em frutos submetidos ao frio em relação ao controle.

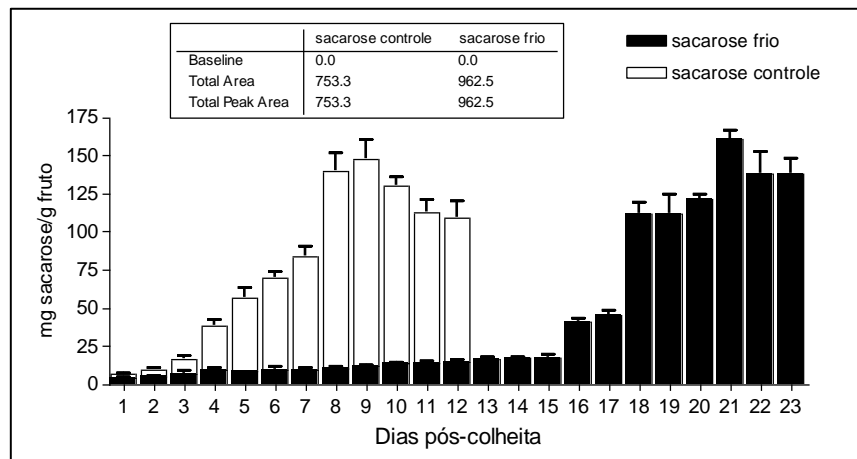


Figura 3: Análise de síntese de sacarose total durante o amadurecimento dos frutos controle e frio. Os valores indicados na tabela correspondem à área total abaixo das colunas verticais em cada tratamento, obtidas pelo programa Graph Pad Prism 4.0.

O acúmulo da sacarose durante a exposição a baixas temperaturas poderia ser conseqüência da necessidade de uma fonte de carboidrato de rápida mobilização. Neste papel, a sacarose poderia ser rapidamente translocada ou utilizada para

suprimento energético respiratório e produto metabólico em baixas taxas respiratórias, até o fruto retornar a condições mais favoráveis. Um papel adicional do acúmulo da sacarose durante o acondicionamento ao frio está relacionado à tolerância ao congelamento. A justificativa para a relação de concentração de sacarose e tolerância ao frio é bem documentada pela atividade crioprotetora da sacarose, impedindo a formação de núcleos de cristais de gelo, protegendo a célula da desidratação induzida pelo frio (SANTARIUS, 1973, 1992). Este tipo de correlação já foi encontrado em framboesas armazenada no frio (PALOMEN et al., 2000).

Muitas alterações durante o amadurecimento parecem estar intimamente envolvidas, como a degradação do amido, formação de sacarose, liberação de glicose e frutose tempo-dependente com o aumento nos níveis de etileno, como visualizados através das linhas tracejadas entre as Figuras 1 e 2, em ambos os grupos. No entanto, várias enzimas parecem atuar de forma coordenada e integrada em cada um dos processos no amadurecimento de banana, como α , β -amilases (GARCIA e LAJOLO, 1998; PURGATTO et al., 2001; BASSINELO et al., 2002), as fosforilases (MOTA et al., 2001), as α -glicosidases (GARCIA e LAJOLO, 1988) e as isoamilases (BIERHALS et al., 2004).

A possibilidade do aumento no conteúdo total de açúcares solúveis em resposta ao estresse ao frio, devido à mobilização do amido e/ ou estímulo de enzimas relacionadas a síntese de sacarose, deveria ser considerada em frutos como a banana, uma vez que após a degradação hidrolítica ou fosforolítica deste amido, os produtos são exportados do amiloplasto para o citosol e convertido a sacarose pela ação da SPS (WEBER et al., 2004; SMITH et al., 2005; KRAUSE et al., 1998).

O aumento na atividade dos extratos tanto das amilases quanto das amido fosforilases (COCHRANE et al., 2006; COTTRITE et al., 1993; CLASSEN et al., 1993) tem sido observado em batatas após o armazenamento ao frio. O acúmulo de açúcares como resultado do aumento da atividade de enzimas relacionadas à síntese de sacarose em batata acondicionadas ao frio também têm sido observado (MALONE et al., 2006).

Em nossos estudos, foi detectada a atividade de α -amilase desde o início do amadurecimento no grupo controle (Figura 4A), sendo sua atividade máxima coincidente com o pico respiratório, como já descrito anteriormente por Mainardi et al. (2003), e Vieira et al. (2006) na cultivar Nanicão. Nos frutos armazenados no frio, foi verificado o mesmo nível de atividade para esta enzima, com um perfil bastante semelhante (elevação gradativa da atividade com a atividade máxima coincidente com o pico respiratório do grupo frio), porém com um atraso em relação ao grupo controle. A síntese da proteína relativa à α -amilase (Figura 4C) ocorreu desde o primeiro dia pós-colheita em ambos os grupos, com um perfil de expressão variável ao longo do amadurecimento, e com maior expressão protéica concomitante com o final do amadurecimento em cada grupo. Os resultados sugerem que o atraso do pico respiratório e de etileno nas amostras acondicionadas ao frio resultou num atraso no aumento da atividade desta enzima, que ocorreu simultaneamente com sua síntese protéica ao longo do amadurecimento.

Porém, tanto a atividade quanto a expressão da proteína relativa à β -amilase parecem terem sido mais afetadas pela baixa temperatura, pois apresentaram atividade máxima e perfis diferentes entre os grupos frio e controle. O perfil de atividade da β -

amilase no grupo controle foi de rápida elevação durante a fase climatérica, atingindo quase o dobro do nível de atividade máxima em relação ao grupo-frio (Figura 4 B). Em amostras armazenadas no frio foram observados dois picos de atividade para a β -amilase, no sexto DPC e outro ao final do amadurecimento, coincidente com o climatério e após o fim do acondicionamento ao frio.

O segundo pico de atividade da β -amilase parece ocorrer temporalmente com a degradação de amido em bananas acondicionadas ao frio, como observado para o grupo controle. No entanto, o primeiro pico de β -amilase ocorreu na metade do armazenamento no frio, antes do início da degradação maciça de amido, do pico de CO_2 e etileno.

Os picos de atividade de β -amilase ocorreram juntamente com o aumento da expressão protéica desta enzima, que foram observados no climatério em ambos os grupos e no sexto DPC em bananas acondicionadas ao frio (Figura 4D).

Um estudo anterior, com tubérculo de batata, mostrou que o armazenamento a baixas temperaturas induziu a síntese protéica de isoenzimas de β -amilase que pareciam ser altamente dependentes da temperatura, e que atuavam na liberação de pequenas quantidades de açúcar para efeito de proteção e resistência ao frio (NIELSEN et al., 1997). Foi também observado, em tubérculo de batata, que a indução de novas formas de β -amilases dependia da temperatura e do tempo de exposição ao frio (DEITING et al., 1998). A importância do amido e sua conversão em açúcares solúveis e da β -amilase durante os primeiros estágios do resfriamento foram recentemente demonstradas em *Arabidopsis* (RITTE et al., 2002). Além disso, foram observados que os níveis de transcritos e de atividade variavam segundo as isoformas,

localização celular e subcelular de β -amilase que eram regulados por diferentes estímulos como o frio, o calor e o nível de umidade.

Portanto, o frio poderia induzir a síntese de uma fração de β -amilases importante para um pequeno acúmulo de açúcar neste período de permanência da banana no frio. Porém, após o aumento da temperatura para 19 °C, o aumento do etileno e outras alterações no climatério poderiam manter a indução de β -amilases mais relacionadas à degradação de amido neste período, como no grupo controle. No entanto, apesar da importância do papel da α e β -amilase na degradação do amido, a mobilização deste amido não é apenas resultado da atividade amilásica e a contribuição de cada enzima neste processo ainda não é completamente elucidada.

Em alguns casos, o acúmulo de açúcar em tecidos submetido ao stress não apresenta uma correlação direta apenas com a ativação de amilases (OHYAMA et al., 1996; DEILING et al., 1998) e o envolvimento de amido-fosforilase também devem ser avaliados.

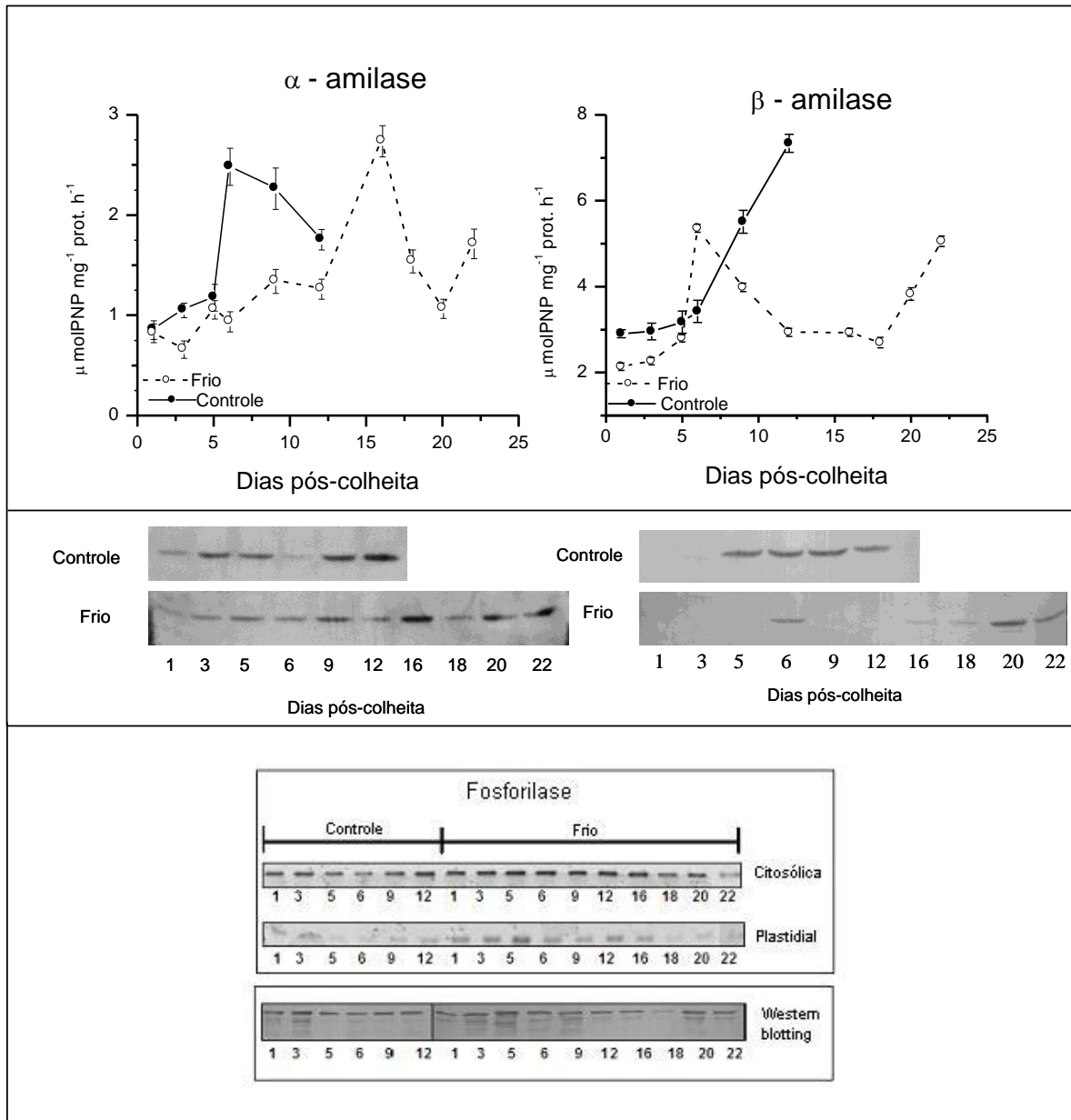


Figura 4. Perfis de atividade de α -amilase, β -amilase e fosforilase (sentido de degradação do amido) durante o amadurecimento dos frutos controle (19°C) e acondicionados ao frio (10°C). Western blotting contra α e β -amilase a partir de $50\ \mu\text{g}$ de proteína da polpa. Western blotting com anticorpo específico de α -glucano-fosforilase plastidial contra $10\ \mu\text{g}$ de proteína total de polpa de banana. O anticorpo secundário usado para fosfatase alcalina (1:30.000).

Em relação à atividade das amido-fosforilases, foi observado um aumento na atividade tanto das formas citosólicas e plastidial principalmente durante o período de armazenamento dos frutos ao frio. Estudos anteriores mostraram que ocorre uma diminuição na percepção pelos receptores de etileno em bananas armazenadas no frio, e que esta diminui com a temperatura e com o tempo prolongado do armazenamento (JIANG et al., 2004). No entanto, um significativo aumento da atividade das fosforilases, principalmente da forma plastidial, foi observado em bananas insensíveis ao etileno (pela ação de 1-MCP), que também apresentaram atraso no processo do amadurecimento (MAINARDI et al., 2006). De acordo com estes autores, o efeito positivo da ausência de etileno na atividade da fosforilase, poderia ser parte de um mecanismo compensatório da inibição de outras enzimas relacionadas a metabolização do amido em condições de estresse. Estes autores também observaram que as mudanças na atividade da fosforilase eram dependentes, principalmente, da indução da expressão desta enzima. No entanto, Mota et al. (2002) não encontraram correlação entre a quantidade de proteína e mudanças na atividade das fosforilases, apesar do estudo das características cinéticas da enzima não indicarem nenhum tipo de regulação alostérica ou metabólica.

A análise de western blotting (Figura 4), também sugere que as mudanças na atividade da fosforilase parecem ser dependentes dos níveis de mRNA e proteína da enzima, visto o aumento na quantidade de proteína concomitante com o aumento da atividade enzimática durante o armazenamento no frio (principalmente entre 3 e 9 DPC no grupo-frio).

Em tubérculo de batata, a atividade de fosforilase também apresentou uma forte correlação com a temperatura, tempo de armazenamento, sugerindo o aumento da

atividade da enzima como um evento para o adoçamento da batata no frio (CLASSEN et al., 1993). Porém, o acúmulo de açúcares não pode ser apenas considerado como consequência do aumento da atividade de enzimas envolvidas na mobilização do amido, e enzimas relacionadas diretamente com a síntese de sacarose também devem ser avaliadas.

A sacarose-fosfato-sintase (SPS) é uma enzima chave na síntese da sacarose em banana durante o amadurecimento. Por isso sua atividade foi testada nos dois grupos. Os perfis de atividade da SPS (Figura 5) nas amostras do grupo controle foram similares aos verificados por Cordenunsi e Lajolo (1995) para a cultivar Nanicão, que reportaram um aumento de 3 a 5 vezes na atividade de SPS durante o amadurecimento, simultaneamente com a formação da sacarose. Através da análise por Western blotting foi observada um pequeno aumento da quantidade de proteína relativa à SPS nos dias 5, 6 e 9 DPC nos frutos controle, coincidentes com o aumento da atividade desta enzima, como observado por Nascimento et al. (1997).

A atividade da SuSy no grupo-controle (Figura 5), também foi semelhante à observada por Cordenunsi e Lajolo (1995) e Nascimento et al. (2000), que verificaram alta atividade durante o período de síntese de amido em banana (período de desenvolvimento do fruto), decaindo após a colheita, atingindo níveis muito baixos durante o amadurecimento. Na ocasião, foi sugerido que a enzima é importante na SuSy na formação do amido e não para a síntese de sacarose em banana. Assim como em batata, no qual o conteúdo de amido foi drasticamente reduzido através da inibição antisense da transcrição para o respectivo gene (ZRENNER et al., 1995).

Através da análise por western blotting foi observada uma pequena redução na quantidade protéica de SuSy, concomitantemente com a redução na atividade

enzimática, durante o amadurecimento. Nascimento et al. (2000) atribuíram a expressão do gene da SuSy um papel relevante na regulação da atividade da enzima.

Em frutos acondicionados ao frio, foi verificado um aumento em quase duas vezes nas atividades de SPS e SuSy, que apresentaram perfis de atividade bastante distintos das amostras de banana controle, com pico de atividade no terceiro DPC, no início do armazenamento ao frio.

A partir do western blotting foi também verificado um aumento na síntese protéica de SPS e SuSy durante o período de armazenamento ao frio, principalmente no 3 DPC, concomitantemente com o aumento da atividade enzimática

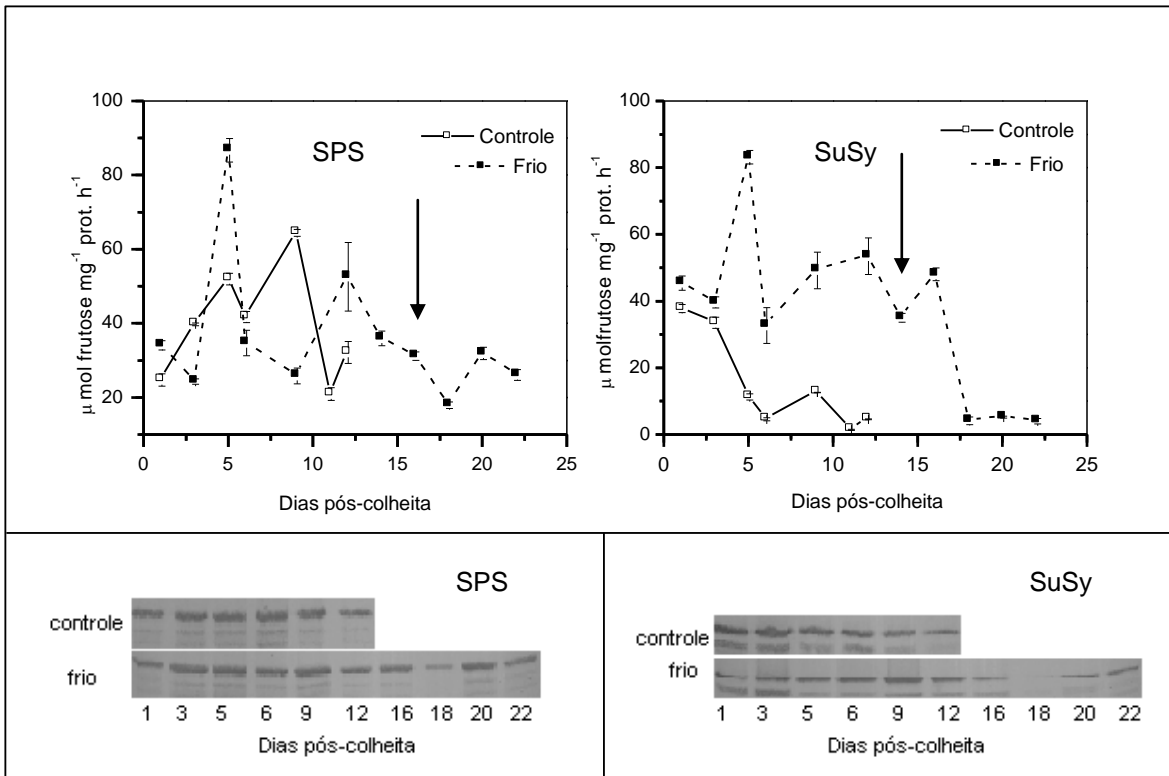


Figura 5. Perfis de atividade enzimática de SPS e SuSy em banana Prata controle e acondicionadas ao frio, durante o amadurecimento. Western blotting a partir de 20 µg de extrato protéico contra soro anti-SS e anti-SPS. As setas indicam o fim do armazenamento ao frio.

A baixa temperatura também induziu o aumento da atividade de SPS em espinafre, como também o aumento das subunidades protéicas desta enzima (GUY et al., 1992). Estes autores sugeriram o aumento da atividade desta enzima como um papel adicional para o acúmulo da sacarose, para o efeito de tolerância ao frio, devido à sua atividade crioprotetora.

Um estudo mais recente mostrou a possibilidade de uma expressão diferencial de isoenzimas para genes da mesma família de SPS no mesmo fruto, como conseqüência da exposição de diferentes condições de estresse (FUNG et al., 2003).

Neste trabalho, foi observada a expressão de SPS em *A. chinensis* pela indução do etileno, que ocorreu concomitantemente com a degradação de amido, e a indução de outras formas de SPS em função dos fatores de stress ambiental, como o frio.

Em relação a SuSy, a atividade enzimática no primeiro ponto pós-colheita do frio foi similar a atividade das amostras controle, no entanto com o aumento das taxas de etileno e o início do climatério nas bananas controle houve queda da atividade e síntese protéica de SuSy. Porém, em bananas acondicionadas ao frio esta atividade e síntese protéica mantiveram-se altas até o fim do armazenamento, em 15 DPC, com declínio imediato com início do climatério, como observado no controle. Portanto, para esta enzima, a ausência de algum hormônio liberado no período climatérico no amadurecimento de banana poderia manter o estímulo para síntese e atividade desta enzima no frio.

Nossos resultados permitiram observar que o armazenamento de banana em baixas temperaturas induziu importantes alterações, principalmente no metabolismo dos carboidratos, como conseqüência de mudanças na atividade e síntese de algumas proteínas. No entanto, a razão e a conseqüência de cada modificação ainda não foram completamente elucidadas, uma vez que após a exposição de um vegetal a baixas temperaturas, uma série de eventos parece ser iniciada para promover a aclimação e tolerância do vegetal ao frio.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BASSINELO, P. Z., CORDENUNSI, B. R., LAJOLO, F. M. Amylolytic activity in fruits: comparison of different substrates and methods using banana as model. **Journal Agriculture and Food Chemistry**, v. 9, n. 50, p. 5781- 5786, 2002.
- BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein dye binding. **Anal Biochemistry**, v. 72, 248 – 254, 1976.
- BERGMEYER, H. U., BERNT, E. D-glucose determination with glucose oxidase and peroxidase. In: BERGMEYER, H. U., GAWEHN, K., eds. Methods of enzymatic analysis. 2ed. New York: Academic Press, v.2, p. 1212-1215, 1974.
- BIERHALS, J. D., LAJOLO, F. M., CORDENUNSI, B. R., NASCIMENTO, J. R. O. Activity, cloning, and expression of an isoamylase-type starch-debranching enzyme from banana fruit. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 52, p. 7412 – 7418, 2004.
- CLASSEN, P. A. M., BUDDE, M. A. W., VANCALKER, M. H. Increase in phosphorylase activity during cold-induced sugar accumulation in potato tubers. **Potato Research**, v.36, p.205-217. 1993.
- COCHRANE, M. P., DUFFIES, C. M., ALLISON, M. J., MACKAY, G. R. Amylolytic activity in stored potato tubers. 2. The effect of low temperature storage on the activities of α -amylase and β -amylase and 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. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.43, p.347-351, 1995.

- COTTRELL, J. E., DUFFUS, C. M., PATERSON, L., MACKAY, G. R., ALLISON, M. J., BAIN, H. The effect of storage temperature on reducing sugar concentration on the activities of three amylolytic enzymes in tubers of the cultivated potato. *Solanum tuberosus L.* **Potato Research**, v. 36, p. 107-117, 1993.
- DEITING, U., ZRENNER, R., STITT, M. Similar temperature requirement for sugar accumulation and for the induction of new forms of sucrose phosphate synthase and amylase in cold stored potato tubers. **Plant Cell Environments**, v.21, p.127-138, 1998.
- FUNG, R. W. M., LANGENKAMPER, G., GARDNER, R. C., MACRAE, E. Differential expression within and SPS gene family. **Plant Science**, V.164, p.459-470, 2003.
- GARCIA, E., LAJOLO, F. M. Starch transformation during banana ripening: the amylase and glucosidase behavior. **Journal of Food Science**, V.53. 94, p.1181-1186, 1998.
- GUY, C. L., HUBER, J. L. A., HUBER, S. C. Sucrose Phosphate Synthase and sucrose accumulation at low temperature. **Plant Physiologist**, v. 100, p. 502-508, 1992.
- HILL, L. M., REIMHOLZ, R., SCHRODER, R., NIELSEN, T. H., STITT, M. The onset of sucrose accumulation in cold-stored potato tubers is caused by an increased rate of sucrose synthesis and coincides with low levels of hexose-phosphates, an activation of sucrose phosphate synthase and the appearance of a new form of amylase. **Plant All Environments**, v.19. p.1223-1237, 1996.
- JIANG, Y., JOYCE, D. C., JIANG, W., AND LU, W. Effects of chilling temperatures on ethylene binding by banana fruit. **Plant Growth Regulation**, v. 43, p.109–115, 2004.

- KRAUSE, K.P., HILL, L., REIMHOLZ, R., NIELSEN, T.H., SONNEWALD, U. AND STITT, M. Sucrose metabolism in cold-stored potato tubers with decreased expression of sucrose phosphate synthase. **Plant Cell Environments**, V.21, p. 285–299, 1998.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during assembly of bacteriophage t4. **Nature**, v.94, p.201-208, 1970.
- LICHTENBERG, L. A., MALBURG, J. L., HINZ, R. H. Cold Damage in Bananas. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.23, 2001.
- LOBO, M. G., GONZÁLEZ, M., PENÃ, A., MARRERO, A. Effects of ethylene exposure temperature on shelf life, composition and quality of artificially ripened bananas (*Musa acuminata* AAA, cv. ‘Dwarf Cavendish’). **Food Science Technology**, Int. 11 v.2, p. 99 -105, 2005.
- LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **Journal of Biology and Chemistry**, v.193, p.256-275, 1951.
- MAINARDI, J. A., PURGATTO, E., CORDENUNSI, B. R., LAJOLO, F. M. Influência Do 1-Metilciclopropeno (1-Mcp) Sobre O Perfil De Atividade De Enzimas Associadas À Degradação Do Amido Em Bananas (*Musa acuminata* AAA cv. Nanicação). RBCF. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, São Paulo, v. 39, p. 150-152, 2003.
- 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. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 54, p. 7294-7299, 2006.

- MALONE, J. G., MITTOVA, V., RATDIFFE, R. G., KRUGER, N. J. The response of carbohydrate metabolism in Potato tubers to low temperature. **Plant Cell Physiology**, v.47, 9, p.1309-1322, 2006.
- MOTA, R. V. Identificação, purificação e caracterização parcial da enzima amido fosforilase em bananas Nanicao (*Musa acuminata*, grupo Cavendish). Tese de Doutorado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, USP, São Paulo, 2001; 86 pp.
- 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 phosphorylase during fruit development and ripening. **Planta**, v.216, n.2, p.325-333, 2002.
- MOTA, R. V. DA., LAJOLO, F. M., CORDENUNSI, B. R. Composição em carboidratos de alguns cultivares de banana (*Musa ssp.*) durante o amadurecimento. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 17 (2), p.94-97. 1997.
- NASCIMENTO, J. R. O., VIEIRA-JÚNIOR, A., BASSINELO, P. Z., CORDENUNSI, B. R., MAINARDI, J. A., PURGATTO, E., LAJOLO, F. M. Beta-amylase expression and starch degradation during banana ripening. Postharvest **Biology Technology** In press, 2006
- NASCIMENTO, J. R. O., CORDENUNSI, B. R., LAJOLO, F. M. Sucrose synthase activity and expression during development and ripening in bananas. **Journal of Plant Physiology**, v.156, p.605-611. 2000
- NASCIMENTO, J. R. O., CORDENUNSI, B. R., LAJOLO, F. M., ALCOCCER, M. J. C. Banana sucrose-phosphate synthase gene expression during fruit ripening. **Planta**, v. 203, n.3, p.283-288. 1997

- NGUYEN, T. B., KETSA, S., VAN-DOORN, W. G. Relationship between browning and the activities of polyphenol oxidase and phenylalanine ammonia lyase in banana peel during low temperature storage. **Postharvest Biology and Technology**, v.30, p.187-193. 2003.
- NIELSEN, T. H., DEITING, U., STITT, M. A. β -amylase in potato tubers is induced by storage at low temperature. **Plant Physiology**, v.113, p. 503-510. 1997.
- OHYAMA, T., YAMAZAKI, T., HORI, E., SHIDA, Y., KOMIYAMA, S., IKARASHI, T. Induction of alpha-amylase activity and starch degradation by cold temperature in tulip bulb scales. In: Bulletin Faculty of Agriculture. Niigata University. v.48, p. 81-92, 1996.
- PALOMEN, P., BUSZARD, D., DONNELLY, D. Changes in carbohydrate and freezing tolerance during cold acclimation of raspberry cultivars grown in vitro and in vivo. **Physiology Plantarum**, v. 110, p. 393-401, 2000.
- PETTERSON, G. L. A simplification of the protein assay method of Lowry et al., which is more generally applicable. **Anal. Biochemistry**, v. 83, p. 346-356, 1977.
- REIMHOLZ, R., GEIGER, M., HAAKE, V., DETING, U., KRAUSE, K. P., SONNEWALD, U., STITT, M. Potato plants contain multiple forms of sucrose phosphate synthase, which differ in their tissue distributions, their levels during development, and their response to low temperature. **Plant Cell Environments**, v. 20, p. 291-305, 1997.
- RITTE G, LLOYD JR, ECKERMANN N, ROTTMANN A, KOSSMANN J, STEUP M The starch-related R1 protein is an alphasglucan, water dikinase. *Proc Natl Acad Sci USA* v. 99, p.7166– 7171, 2002.

- 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, n.5-6, p.823-828, 2001.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F., MANIATTIS, T. Molecular cloning: a laboratory manual, 2 nd ed; cold Spring Harbor Laboratory: Cold Spring Harbor, NY, 7.2-7.52. 1989.
- SANTARIUS, K. A. The protective effect of sugars on chloroplast membranes during temperature and water stress and its relation to frost desiccation and heat resistance. **Planta**, v. 113, p.105-114, 1973.
- SEYMOUR, G. B. Banana. In SEYMOUR, G. B., TAYLOR, J. E., TUCKER, G.A. EDS. Biochemistry of Fruit ripening. London: Chapman & Hall, 1993. cap 3, p.83-105.
- SMITH, A. M., ZEEMAN, S. C. SMITH, S. M. Starch degradation. **Annual Review of Plant Biology**, v.56, p.73-97, 2005.
- VIEIRA JR, ADAIR ; DO NASCIMENTO, JOÃO ROBERTO OLIVEIRA ; LAJOLO, FRANCO MARIA . Molecular cloning and characterization of an alpha-amylase occurring in the pulp of ripening bananas and its expression in *Pichia pastoris*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 54, n. 21, p. 8222-8228, 2006.
- WINTER, H., HUBER, S. C. Regulation of sucrose metabolism in higher plants: Localization and regulation of activity of key enzymes. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v.19 (1), p.31-67. 2000.
- WEBER, A. P. M. Solute transporters as a connecting element between cytosol and plastid stroma. **Current Opinion of Plant Biology**, v.7, p.247-253, 2004.

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

ZRENNER, R., WILLMITZER, L., SONEWALD, U. Analysis of the expression of potato uridinediphosphate-glucose pyrophosphorylase and its inhibition by antisense RNA. **Planta**, v.190, p.247-252, 1993.

CONCLUSÕES

A banana produz frutooligossacarídeos durante seu amadurecimento (aproximadamente 4 mg de FOS total/ g de fruto em massa seca), que acumulam mais rapidamente a partir de 200 mg de sacarose por grama de massa seca de polpa de banana. A invertase parece ser a enzima responsável pela síntese de FOS em banana Prata.

São importantes para este acúmulo, o estágio de amadurecimento da banana e a cultivar, mas não o grupo genômico. A cultivar Prata foi a que apresentou maior concentração de FOS 1-cestose, de sacarose e a única com a detecção de nistose.

A cultivar Prata parece ser tolerante ao frio, com poucas mudanças em seu metabolismo amido-sacarose, exceto pela atividade e expressão das enzimas β -amilase e fosforilases, talvez em resposta à inibição da produção do etileno. Também as enzimas metabolizadoras da sacarose, SuSy e SPS, foram afetadas pelo armazenamento à baixas temperaturas.

ANEXOS

Informações para os Membros de Bancas Julgadoras de Mestrado/Doutorado

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

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

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

3. A sessão de defesa será aberta ao público.

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

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

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

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

São Paulo, 18 de março de 2005.

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