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

Perfil metabólico da banana durante o amadurecimento

Andréia Ricci Hernandez

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Profa. Dra. Beatriz Rosana Cordenunsi

São Paulo
2005

DEDALUS - Acervo - CQ

30100011105

Ficha Catalográfica

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

H557p	Hernandes, Andréia Ricci Perfil metabólico da banana durante o amadurecimento / Andréia Ricci Hernandez. -- São Paulo, 2005. 66p.
	Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental. Orientador: Cordenunsi, Beatriz Rosana
	1. Bromatologia 2. Bioquímica dos alimentos 3. Espectrometria de massa aplicada à ciência dos alimentos 4. Banana : Bioquímica dos alimentos I. T. II. Cordenunsi, Beatriz Rosana, orientador.
	641 CDD

Perfil metabólico da banana durante o amadurecimento

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profa. Dra. Beatriz Rosana Cordenunsi
orientador/presidente

Prof^o Dr. Eduardo Purgatto
1^o. examinador

Profa. Dra. Helenice Mercier
2^o. examinador

São Paulo, 12 Dezembro de 2005.

E disse Deus: Produza a terra erva verde, erva que dê semente, árvore frutífera que dê fruto segundo a sua espécie, cuja semente esteja nela sobre a terra.

E assim foi.
(Gênesis, 1:11)

Dedico este trabalho

**Ao futuro da minha família
e aos meus amados Haller e Kevin.**

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus pela oportunidade que me foi dada, pois sem Ele eu não conseguiria.

Sinceros agradecimentos aos meus pais, minha sogra, meu marido Haller e meu filho Kevin, pelo incentivo, dedicação, apoio, paciência, amizade, pela compreensão da minha ausência em alguns momentos de convívio familiar e acima de tudo pelo amor sincero.

Agradeço a Profa. Dra. Beatriz Rosana Cordenunsi pela orientação, pelo seu exemplo, incentivo, confiança, apoio e amizade. No momento mais difícil, você soube me apoiar e me empurrar para cima.

Agradeço ao Prof. Dr. Eduardo Purgatto pela valiosa colaboração. Sem a sua didática e seu amor pelo ensino, além da dedicação e conhecimento, eu não teria conseguido.

Agradeço de forma muito especial a Rosecler, Denise, Ana Paula, Janaina, Fernanda, Adair, João Paulo, Jacqueline, Malu, Márcia, Ana Cris, Aderuza, Gracielli, Marcinha, Lúcia, Tânia, Ricardo, Maurício, Eliana, Neuza e a todos do Departamento de Alimentos que em algum momento me auxiliaram.

A CAPES pela bolsa, e à FAPESP pelo suporte financeiro do laboratório.

Por fim agradeço ao Prof. Walter Borzani pela indicação do laboratório, fazendo uma excelente sugestão e escolha e ao Prof. Dr. Franco Maria Lajolo, que me recebeu tão bem, sempre simpático e atencioso.

RESUMO

A análise do perfil metabólico de frutos em amadurecimento pode prover informações a respeito de quais as vias metabólicas são ativadas e inativadas durante o processo. Tais informações podem auxiliar na identificação de genes expressos nessa fase do ciclo de vida do fruto, ampliando o conhecimento sobre os mecanismos envolvidos no amadurecimento. Usando esta abordagem, este trabalho tem por objetivo identificar mudanças significativas nos níveis de metabólitos da banana durante o amadurecimento induzido pelo etileno. Para tal utilizou-se a cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas para a análise, em função do poder de resolução da técnica. Utilizando a biblioteca de espectros de massa NIST 98 foi possível identificar 70 substâncias na fração polar e 40 substâncias na fração apolar incluindo aminoácidos, açúcares, ácidos orgânicos, lipídeos entre outros. A análise de perfil metabólico revelou importantes variações nos níveis metabólicos de açúcares e ácidos orgânicos, provavelmente devido ao aumento na taxa respiratória do fruto. A maltose e o mio-inositol foram os metabólitos escolhidos para uma análise mais detalhada, que evidenciou a influência de outros metabólitos, independentes do etileno na regulação dos eventos da degradação do amido.

ABSTRACT

The analysis of the metabolic profile of fruits can provide information regarding which metabolic ways are activated and inactivated during the ripening. Such information may help the identification of expressed genes in this process, extending the knowledge on the involved mechanisms of ripening. Using this approach, the aim of this work was identify significant changes in the levels of metabolites of the banana during the ripening induced by ethylene. In this way it was used gas chromatography connected the mass spectrometry for these analysis, due to the high resolution of this technique. Using the NIST 98 library of mass spectra it was possible to identify about 70 substances in the polar fraction and 40 substances in the apolar fraction, including amino acids, sugars, organic acid, lipids, and others. The analysis of metabolic profile revealed important variations in the metabolic levels of organic acid sugars and, probably due to an increase in the respiratory rate of the fruit. A detailed analysis was conducted with maltose and myo-inositol and revealed the influence of other metabolites which depended of ethylene, in the regulation of starch degradation.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	01
2. Alterações bioquímicas durante o amadurecimento dos frutos	02
2.1 Etileno	02
2.2 Respiração	05
2.3 Textura	07
2.4 Cor	09
2.5 Sabor e aroma	11
2.5.1 Degradação do amido e síntese de sacarose	12
3. Análise do perfil metabólico e da composição química (Metaboloma)	16
4. OBJETIVO	23
5. MATERIAL E MÉTODOS	24
5.1 MÉTODOS	25
5.1.1 Método otimizado para extração e derivatização de metabólitos polares em amostras de banana	25
5.1.2 Método otimizado para extração e derivatização de metabólitos apolares em amostras de banana	26
5.2 Análise estatística	27
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
6.1 Otimização do protocolo de extração e análise dos metabólitos polares	28
6.2 Otimização do protocolo de extração e análise dos metabólitos apolares	31
6.3 Caracterização das amostras e metabólitos identificados	34
7. CONCLUSÕES	52
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 Metabólitos polares identificados em banana nanicão controle (zero dpc e 15 dpc) e tratadas com etileno (1 dpc e 4.dpc) por CG-EM. Foram considerados metabólitos com qualificador acima de 80, com base na biblioteca NIST 98 36

Tabela 2 Metabólitos polares identificados em banana nanicão controle (zero dpc e 15 dpc) e tratadas com etileno (1 dpc e 4.dpc) por CG-EM. Foram considerados metabólitos com qualificador acima de 80, com base na biblioteca NIST 98 37

Tabela 3 Metabólitos apolares identificados em banana nanicão controle (zero dpc e 15 dpc) e tratadas com etileno (1 dpc e 4.dpc) por CG-EM. Foram considerados metabólitos com qualificador acima de 80, com base na biblioteca NIST 98 38

Tabela 4 Metabólitos polares identificados por CG-EM que apresentaram variação significativa em relação a amostra controle C0* 41

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1	Representação esquemática do papel que o etileno desempenha durante o amadurecimento dos frutos (ALEXANDER e GRIERSON, 2002)	03
FIGURA 2	Cromatograma da análise em cromatógrafo gasoso, acoplado ao espectrômetro de massas (CG-EM) de amostras de banana nanicão controle e tratadas com etileno	29
FIGURA 3	Cromatograma da análise em CG-EM de metabólitos polares em banana nanicão	30
FIGURA 4	Cromatograma da análise em CG-EM de metabólitos apolares em banana nanicão com 15 dias pós-colheita	33
FIGURA 5	Caracterização das amostras	35
FIGURA 6	Porcentagem relativa dos grupos de metabólitos identificados em banana nanicão por CG-EM	39
FIGURA 7	Teores de açúcares com variação significativa, analisados em banana nanicão por CG-EM	43
FIGURA 8	Teores de ácidos com variação significativa, analisados em banana nanicão por CG-EM	44
FIGURA 9	Funções do mio-inositol (MI) no metabolismo das plantas (LOEWUS e MURTHY, 2000)	47

1. INTRODUÇÃO

Os frutos são essenciais para a alimentação humana, são fonte de vitaminas, minerais, substâncias antioxidantes, fibras e carboidratos em quantidades significativas para uma dieta saudável. Quando o fruto amadurece ocorrem diversas mudanças na cor (por alterações no acúmulo e biossíntese de pigmentos), na textura (por modificações na estrutura da parede celular) e no sabor e aroma (devido ao aumento dos níveis de compostos voláteis aromáticos e síntese de açúcares e ácidos orgânicos) (SEYMOUR *et al.*, 1993). Porém, parte das transformações que ocorrem durante o amadurecimento resultam na diminuição da qualidade e da vida útil destes frutos após a colheita e durante o seu transporte e estocagem. Neste caso, um importante aspecto é a mudança da firmeza da polpa e o decréscimo da resistência a microorganismos que estão associados a deterioração do tecido, diminuindo a vida-de-prateleira dos frutos (WHITE, 2002).

Nos frutos climatéricos todo o processo de amadurecimento é acelerado depois do climatério. A banana possui cerca de 20% de amido no pré-climatério, que é degradado no pós-climatério, com concomitante acúmulo de açúcares solúveis. Este evento, juntamente com a degradação da clorofila da casca e com a síntese de compostos voláteis, relativos ao aroma, caracterizam o amadurecimento da banana.

A via metabólica amido-açúcares solúveis na banana, conta com a potencial participação de várias enzimas (ÂREAS e LAJOLO, 1981; GARCIA e LAJOLO, 1988, CORDENUNSI E LAJOLO, 1995; NASCIMENTO *et al.*, 1997; NASCIMENTO *et al.*, 2000; VIERIA JÚNIOR, 2001; BASSINELLO *et al.*, 2002; MOTA *et al.*, 2002; BIERHALS *et al.*, 2004), vários hormônios vegetais (PURGATTO *et al.*, 2001; ROSSETTO *et al.*, 2003) e, certamente, de vários metabólitos.

O conhecimento da distribuição qualitativa e quantitativa destes metabólitos, através da análise do perfil metabólico durante o amadurecimento da banana é de grande importância, pois diferenças nestes perfis de distribuição são responsáveis pelas diversas alterações bioquímicas que ocorrem durante o amadurecimento.

O estudo do perfil dos metabólitos existentes em diferentes estágios de amadurecimento da banana, pode contribuir para um melhor entendimento da complexidade dos eventos que ocorrem no amadurecimento do fruto e também auxiliar na identificação de vias metabólicas dependentes ou não do etileno.

2. Alterações bioquímicas durante o amadurecimento dos frutos

2.1 Etileno

Durante o amadurecimento dos frutos, verifica-se o aumento das atividades metabólicas e mudanças na expressão gênica de enzimas importantes para o amadurecimento, muitas destas controladas por hormônios vegetais (PURGATTO *et al.*, 2001). Recentes avanços no estudo da regulação individual destes eventos, bem como a sua influência, estão contribuindo para uma visão mais abrangente do amadurecimento, através do uso de ferramentas da biologia molecular, trazendo soluções para problemas de produção, qualidade e estocagem dos frutos.

Os frutos possuem diferentes mecanismos de amadurecimento, o que permite dividi-los em dois grandes grupos: climatéricos e não-climatéricos. Esta classificação tem sido usada para distinção dos frutos em relação à respiração e a biossíntese do etileno. Frutos climatéricos como o tomate, abacate, maçã e banana se diferenciam dos frutos não-climatéricos como o morango, a uva e a laranja, pelo aumento na

respiração e biossíntese de etileno durante o amadurecimento (LELIÈVRE *et al.*, 1997).

As respostas fisiológicas reguladas pelo etileno são muito amplas, sendo importantes no desenvolvimento dos frutos, bem como em condições de estresse. Durante o desenvolvimento da planta, o etileno coordena os eventos de senescência das flores e do crescimento de tecidos como hastes, raízes e pecíolos, abscisão e amadurecimento do fruto. O aumento da biossíntese do etileno responde a vários estímulos como ferimentos nos frutos, ataque de patógenos, estímulos mecânicos e, como consequência, estimula a produção de compostos de defesa (ABELES *et al.*, 1992 ; MATTO E SUTTLE, 1991), como mostra a Figura 1.

Figura 1: Representação esquemática do papel que o etileno desempenha durante o amadurecimento dos frutos (ALEXANDER e GRIERSON, 2002).

Os níveis de produção de etileno e sua síntese foram estudados por Mc Murchie *et al.*, (1972), que demonstraram que os frutos climatéricos diferem dos frutos não-climatéricos também no controle da síntese do etileno. Esta demonstração consistiu na exposição dos frutos climatéricos e não climatéricos a um

análogo ao etileno, o propileno. A fruta climatérica exposta ao propileno começou a sintetizar o etileno de maneira auto-catalítica enquanto o fruto não climatérico não mostrou tal resposta. Por esta observação, Mc Murchie *et al.*, (1972), postularam a teoria da existência de dois sistemas de controle da biossíntese do etileno: Sistema 1, responsável pela produção de níveis basais de etileno, tanto nos frutos climatéricos como nos não climatéricos e o Sistema 2 que atua exclusivamente nos frutos climatéricos e é reconhecido pelo elevado aumento na produção de etileno em níveis bem acima dos basais.

O etileno é sintetizado à partir de intermediários do ciclo da metionina, no qual a S-adenosil-metionina (SAM) é convertida no ácido-1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC), pela ACC sintase (S-adenosil-L-metionina metiltioadenosina liase, E.C 4.4.1.14) que, em seguida, é convertido para etileno, gás carbônico e ácido cianídrico pela ACC oxidase (1-aminociclopropano carboxilato oxidase, E.C 1.4.3). A enzima limitante do processo de biossíntese do etileno é a ACC sintase (KENDE, 1993), responsável pelo aumento na produção de etileno.

Três genes que codificam a ACC sintase, *MA-ACS1*, *MA-ACS2* e *MA-ACS3*, foram encontrados na banana. Destes, somente o gene *MA-ACS1* foi expresso durante o amadurecimento, tanto nos frutos amadurecidos naturalmente, quanto nos de amadurecimento acelerado, por aplicação de etileno exógeno. Em relação a ACC oxidase foi detectado apenas um gene *MA-ACO1*, nos frutos controle que aumentou sua expressão gradualmente durante o período pré-climatérico e continuou constante até a fase climatérica, com um pequeno aumento juntamente com o aparecimento do pico de etileno (LIU *et al.*, 1999).

Além dos genes que codificam as enzimas da biossíntese do etileno, existem os receptores de etileno, sinalizando para a expressão destes genes, que são

acionados respondendo a diferentes estímulos ambientais e estágios de desenvolvimento do fruto (CHANG e STEWART, 1998). Foram encontrados três receptores de etileno em banana, que são: *ERS1*, *ERS2* e *ERS3* ("GenBank accession number " AF113748, AF445195, AF445196).

Estudos genéticos e bioquímicos, utilizando frutos transgênicos e mutantes, tem o objetivo de desvendar ou esclarecer em detalhes a via metabólica de regulação do etileno, bem como a regulação dos genes dependentes e independentes do mesmo, os quais são imprescindíveis para se chegar a um perfil genético regulatório. Em complemento, estudos dos perfis metabólicos em frutos, tubérculos e plantas transgênicas, mutantes e wild-type (controle), estão visando estudar a equivalência entre estes sistemas e também identificar diferenças significativas entre metabólitos, que anteriormente não haviam sido notadas.

2.2 Respiração

As vias glicolíticas, o ciclo do ácido carboxílico e a cadeia de transporte de elétrons mitocondrial são importantes para as funções fisiológicas dos frutos e são essenciais para fornecer energia para as células. As interações entre o metabolismo citossólico e mitocondrial em geral, incluindo as interações entre as funções mitocondriais na fotossíntese, na fotorespiração e na biossíntese de aminoácidos são muito complexas e precisam ser estudadas (FERNIE *et al.*, 2004).

Beaudry *et al.* (1989) elucidou parte do sistema que envolve o fluxo de carbono, nos frutos pré-climatéricos e climatéricos em bananas. Nos frutos pré-climatéricos, a glicólise predomina em relação a gliconeogênese, mas durante o pico

respiratório, o fluxo glicolítico de carbono aumenta 4-5 vezes, enquanto o fluxo gliconeogênico aumenta de 50 a 100 vezes. Um dia após o pico respiratório, o fluxo de carbono gliconeogênico diminui, enquanto o fluxo glicolítico permanece alto. A frutose 2,6-bifosfatase (enzima importante na regulação de mecanismos de fosforilação e desfosforilação e na síntese e degradação da frutose 2,6-bifosfato), não parece estar envolvida no controle destes efeitos, provavelmente, estando ligada ao controle da glicólise, que é essencial para produção de sacarose.

Os frutos possuem comportamentos distintos em relação a sua atividade respiratória, quando submetidos à atmosferas com baixa concentração de oxigênio. A banana mostra um padrão respiratório típico após a sua colheita, porém o climatério respiratório é suprimido sob altas concentrações de gás carbônico (LIU *et al.*, 2004).

Durante o amadurecimento da banana, várias transformações metabólicas ocorrem, dentre elas o aumento dos açúcares solúveis durante o climatério, atingindo sua máxima concentração próximo ao climatério respiratório, concomitante com o conteúdo de amido degradado. A firmeza do fruto diminui, juntamente com o aparecimento da cor amarela. O conteúdo dos ácidos orgânicos como o malato e o citrato aumentam gradualmente durante o climatério, porém o conteúdo de succinato diminui. O piruvato, glioxilato e 2-oxoglutarato também aparecem, respectivamente, 2 e 3 dias após o tratamento com etileno (LIU *et al.*, 2004).

As atividades da NADP-ligada a isocitrato desidrogenase (NADP-IDH) e da isocitrato liase aumentam, juntamente com o aumento na taxa de respiração, sendo que a atividade da isocitrato liase aumenta continuamente durante o amadurecimento da banana (LIU *et al.*, 2004)..

A análise do comportamento respiratório da banana evidencia que há um sucessivo fluxo glicolítico por todo o período de amadurecimento, devido ao contínuo acúmulo de citrato e malato, indicando que a atividade da fosfofrutoquinase, enzima chave do fluxo glicolítico de carbono, continua alta durante o amadurecimento. A ativação da enzima isocitrato liase, o sucessivo acréscimo no conteúdo do malato e o decréscimo no conteúdo do piruvato indicam a ativação das enzimas do ciclo do glioxilato (YANG *et al.*, 1998). O aumento da atividade da NADP-IDH e do 2-oxoglutarato, paralelamente com o climatério respiratório, é responsável pelo fluxo de carbono para a assimilação dos grupos amino na formação dos aminoácidos, que por sua vez são requeridos para a síntese de proteínas (KE *et al.*, 1993, LIU *et al.*, 2003, LIU *et al.*, 2004).

2.3 Textura

A textura é considerada um dos principais atributos de qualidade dos frutos, pois o amolecimento influencia a sua aceitabilidade pelos consumidores, bem como o seu transporte e resistência a patógenos (TUCKER, 1996). Com a introdução do uso de plantas transgênicas, em que se suprimiram os genes responsáveis pelo amolecimento dos frutos, tornou-se possível controlar o amolecimento de frutos pelo uso de técnicas de biologia molecular. A supressão ou expressão de enzimas responsáveis pela degradação da parede celular dos frutos são de grande interesse comercial, pois aumentam a qualidade e reduzem as perdas dos frutos (SEYMOUR *et al.*, 2002).

Já está bem estabelecido que as mudanças na textura dos frutos são consequência de modificações na fração polissacarídica péctica da parede celular

(JACKMAN e STANLEY, 1995) e que, dependendo do tipo de fruto, pode-se encontrar variações na composição da sua parede celular.

A parede celular primária das monocotiledôneas contém menos que 10% de polissacarídeos pécticos. Em bananas as mudanças de textura que ocorrem durante o amadurecimento parecem estar ligadas não somente a degradação da parede celular, mas também a degradação do amido. Os produtos do fracionamento dos polissacarídeos pécticos da banana são a ramnose, arabinose, xilose e glicose (PRABHA E BHAGYALAKSHMI, 1998).

Dentre as principais enzimas que afetam a textura dos frutos estão as poligalacturonases (PG, E.C 3.2.1.15), que catalisam a hidrólise do ácido galacturônico e cadeias poliméricas de galactose, as pectina metilesterases (PME, E.C 3.1.1.11), que removem os grupos metil de resíduos de ácido galacturônico esterificados, e as pectato liases (PEL, E.C 4.2.2.2), que causam a despolimerização da pectina da lamela média e parede celular primária dos frutos. Três isoformas da PG foram encontradas durante o amadurecimento da banana (WADE e SATYAN, 1993), além das celulasas e pectato liases. A atividade da PEL aumentou durante o amadurecimento e atingiu sua máxima atividade concomitante com o pico climatérico, enquanto que a PG também aumentou durante o amadurecimento da banana, porém ao contrário da PEL, continuou a aumentar sua atividade no pós-climatério, quando o fruto já tinha a textura alterada (PAYASI e SANWAL, 2003).

Proteínas associadas a parede celular com a finalidade de causar o seu afrouxamento (Exp- expansina) foram detectadas, com correlação positiva entre a Exp1 e o amolecimento do tomate (GIOVANNONI, 2001). Em banana, a identificação e a caracterização do gene, Exp, MaExp1, mostra que o mesmo é

regulado pelo etileno, pois sua transcrição foi bloqueada durante o amadurecimento do fruto na presença de 1-MCP (TRIVEDI e NATH, 2004).

A atividade das hidrolases PME, PG, CEL e PEL foi correlacionada com o etileno, o ácido abscísico (ABA), e o ácido indol-acético (AIA) em banana. A atividade destas enzimas parece depender da produção e percepção do etileno na banana, com o ABA mediando o efeito do etileno sobre estas enzimas. O AIA, ao contrário, inibiu estas quatro enzimas, quando o fruto foi tratado e não tratado com etileno (LOHANI *et al.*, 2004).

2.4 Cor

Durante o amadurecimento dos frutos ocorrem mudanças na coloração da sua pele ou casca e também na sua polpa. Os pigmentos responsáveis por estas mudanças, são principalmente os carotenóides e antocianinas.

A cor dos frutos é de grande importância para a comercialização dos mesmos, as mudanças na coloração dos frutos de verde para amarelo, por exemplo, indicam, muitas vezes, a época adequada para a colheita do fruto (BROOKFIELD *et al.*, 1993). Porém o estágio de amadurecimento para a colheita é o primeiro e principal fator que determina a qualidade do fruto e sua vida-de-prateleira.

Alguns métodos foram desenvolvidos para se estabelecer um parâmetro, ou índice de cores para os frutos, porém não produzem resultados satisfatórios quando os frutos não possuem coloração uniforme (BROOKFIELD *et al.*, 1993).

A degradação da clorofila e a síntese de pigmentos como carotenóides são responsáveis pela cor dos frutos maduros. A degradação da clorofila em frutos e vegetais pode ocorrer tanto pela morte de células, quanto por fatores externos, como injúrias causadas por baixas ou altas temperaturas, ou ataque de patógenos. Uma

das enzimas que catalisam a degradação da clorofila é a clorofilase (Chlase, E.C 3.11.14).

Foram medidas mudanças na atividade da clorofilase e conteúdo de clorofila e de carotenóides em casca de banana durante o amadurecimento, em temperaturas 20, 30 e 34°C. A 30 e 34°C, as bananas permaneceram verdes, devido a incompleta degradação da clorofila, enquanto a 20°C ocorreu a completa degradação da clorofila e os frutos ficaram amarelos. A atividade da clorofilase aumentou durante o amadurecimento do fruto, paralelamente ao climatério respiratório. A aplicação de etileno exógeno não afetou os níveis de clorofilase e degradação da clorofila nas temperaturas dos experimentos (THOMAS e JANAVE., 1992). O experimento mostrou também não existir influência da temperatura na síntese de carotenóides na casca, já que o seu conteúdo permaneceu constante durante o amadurecimento. Ocorreu, no entanto, o decréscimo de xantofilas livres e o aumento da sua forma esterificada durante o amadurecimento (THOMAS e JANAVE, 1992).

Os carotenóides são responsáveis pelas cores de vários frutos e vegetais. São constituídos de moléculas isoprenóides e classificados como carotenos (licopeno e β -caroteno) ou xantofilas (luteína). O β -caroteno é importante na dieta humana, pois é precursor da vitamina A, e por este motivo alimentos geneticamente modificados como o arroz que produz β -caroteno têm sido desenvolvidos (YE *et al.*, 2000).

A regulação da biossíntese de carotenóides durante o desenvolvimento e amadurecimento dos frutos, está altamente ligada com a coordenação do fluxo de unidades isoprenóides que formam o C40 carotenóide, bem como outras ramificações das vias de formação de isoprenóides. Em tecidos fotossintéticos a

regulação da síntese de carotenóides está ligada com a formação de clorofila, proteínas, lipídeos e desenvolvimento de cloroplastos. A intensidade da luz influencia na formação dos carotenóides, pois sua síntese é estimulada pelo aumento da expressão de seus genes, quando as plantas são transferidas para a luz (BRAMLEY, 2002).

2.5 Sabor e aroma

O desenvolvimento do sabor acompanha uma complexa interação entre compostos voláteis como os ésteres, aldeídos, cetonas e não-voláteis como os açúcares e os ácidos orgânicos, responsáveis pelo aroma e sabor do fruto. Os polifenóis e os taninos são responsáveis pela adstringência, sendo os ésteres e aldeídos os principais componentes que fazem a diferença do sabor e aroma entre os frutos (WATSON *et al.*, 2002).

Dependendo das condições ambientais e da estação do ano em que o fruto foi desenvolvido, o conteúdo de sólidos solúveis e a acidez variam (WATSON *et al.*, 2002). Outro fator determinante é a síntese dos compostos responsáveis pelo sabor e aroma, em relação ao desenvolvimento do fruto na luz e na sombra. Estudos desenvolvidos com morango, evidenciaram uma redução do sabor e aroma destes frutos, quando desenvolvidos na sombra. As concentrações de hexenal, hexanal, etil-metil-butirato, metil-butirato, bem como os conteúdos de sacarose, glicose/frutose foram reduzidos, reduzindo assim também, a qualidade organoléptica dos frutos (WATSON *et al.*, 2002).

Na banana 70% dos compostos voláteis são ésteres, com predominância dos acetatos e butiratos. As vias metabólicas que participam na produção destes voláteis são as do metabolismo de aminoácidos e ácidos graxos. Os conteúdos dos

aminoácidos leucina e valina, aumentam significativamente durante o amadurecimento da banana, concomitante a produção de voláteis, podendo ser seus possíveis precursores. A conversão do ácido linoleico e linolênico em determinados aldeídos, bem como de outros ácidos graxos em ésteres indica também a evidência desta outra via precursora de voláteis (SEYMOUR, 1993).

Durante o amadurecimento da banana, ocorre um acréscimo na acidez da polpa devido principalmente aos ácidos málico, cítrico e oxálico, sendo este último também responsável, em parte pela adstringência da banana verde (SEYMOUR, 1993).

Estudos recentes têm focado a ação de enzimas responsáveis pela produção destes voláteis nas suas diversas vias metabólicas, como é o caso de Gardner, (1995) e Baldwin *et al.*, (2000). Eles determinaram que certas enzimas são importantes na síntese de compostos voláteis, contribuindo para determinadas características aromáticas dos frutos.

2.5.1 Degradação do amido e síntese de sacarose

Durante o amadurecimento dos frutos, ocorre o processo de adoçamento originado pelo acúmulo de açúcares solúveis, via sacarose transportada da planta para o fruto, ou pela hidrólise de carboidratos de reserva, como o amido. Os frutos não-climatéricos sintetizam açúcares em proporções muito pequenas após a colheita, como é o caso da laranja (SEYMOUR, 1993), sendo a maior parte transportada da planta para o fruto durante o desenvolvimento.

Alguns frutos climatéricos, acumulam amido de reserva em proporções que podem atingir até 20% do peso fresco, como é o caso da banana (CORDENUNSI,

1989; MOTA, 1997). O amido é constituído de grânulos que estão dentro de plastídios, denominados amiloplastos. Após a ruptura e a dissolução desse grânulos, a maior parte do amido pode ser fracionada em duas macromoléculas: a amilose e a amilopectina. A amilose é predominantemente linear sendo constituída de moléculas de glicose ligadas por ligações α -1,4, enquanto a amilopectina é um polímero ramificado, composto de ligações α -1,4 e α -1,6.

A degradação do amido a açúcares solúveis pode ocorrer mediante a ação de diversas enzimas como as α -amilases (E.C 3.2.1.1), β -amilases (E.C 3.2.1.2), α -1,4 e α -1,6 glicosidades (E.C 3.2.1.3), fosforilases (E.C 2.4.1.1) e enzimas desramificadoras. Garcia e Lajolo (1988) detectaram um aumento na atividade destas enzimas durante o amadurecimento da banana e correlacionaram tal aumento a degradação do amido neste fruto.

As α -amilases possuem atividade endo-amilolítica e hidrolisam as ligações α -1,4 do amido, produzindo as α -dextrinas, enquanto as β -amilases hidrolisam o amido à partir da sua extremidade não-redutora, produzindo maltose (GARCIA e LAJOLO, 1988; BASSINELLO *et al.*, 2002; VIERA JR., 2001). Durante o amadurecimento da banana ocorre um grande aumento na atividade da β -amilase (BASSINELLO *et al.*, 2002; VIEIRA JR., 2001). As dextrinas e a maltose produzidas pela α e β amilases podem ser metabolizadas pelas α -glicosidases (E.C 3.2.1.20), resultando em glicose. Konishi *et al.* (1992) caracterizaram formas ácida e neutra das α -glicosidases (AAG e NAG). Na banana a forma AAG possui atividade maltásica típica e a NAG foi 50 vezes menos ativa na hidrólise da maltose. Konishi *et al.* (1992) também identificaram que a forma NAG têm preferência por substratos α -glicosídeos sintéticos. Posteriormente Konishi *et al.* (2001), identificaram duas isoformas ácidas

de α -glicosidases em polpa de banana, sendo uma solúvel e a outra ligada a parede celular.

As fosforilases catalisam a conversão reversível do amido em glicose-1-fosfato na presença de ortofosfato (ÂREAS e LAJOLO, 1981). Mota (2001) identificou, purificou e caracterizou duas formas de fosforilases em polpa de banana.

Enzimas desramificadoras foram detectadas em banana por Garcia e Lajolo (1988). Posteriormente, Bierhals *et al.*, (2004) mostraram tratar-se de uma isoamilase, que parece estar presente durante todo o amadurecimento da banana.

A sacarose é o açúcar solúvel predominante na banana madura (CORDENUNSI e LAJOLO, 1995; MOTA, 1997). As enzimas envolvidas na biossíntese de sacarose em plantas superiores são a sacarose sintase (Susy - E.C 2.4.1.13) e a sacarose-fosfato sintase (SPS - E.C 2.4.1.14). A SPS produz sacarose-6-fosfato a partir de UDP-glicose e frutose-6-fosfato, seguida da sacarose fosfatase (E.C 3.1.3.24) que retira o grupamento fosfato da molécula, gerando sacarose. A SuSy produz sacarose e UDP a partir de UDP-glicose e frutose. A descoberta de que a SPS é a enzima chave na síntese de sacarose foi feita através de estudos pré e pós-colheita (CORDENUNSI e LAJOLO, 1995; NASCIMENTO *et al.*, 1997), nos quais foi observado que a atividade da SPS é baixa durante o desenvolvimento do fruto e aumenta quando o fruto atinge a maturidade. Após a colheita sua atividade continua aumentando, atingindo seu ponto máximo juntamente com o maior acúmulo de sacarose, concomitante aos menores níveis de amido. Com a SuSy acontece o contrário, durante o desenvolvimento do fruto a sua atividade é alta, sendo reduzida durante o amadurecimento. Embora vários mecanismos de regulação da atividade da SPS tenham sido descritos (fosforilação, regulação alostérica) no

amadurecimento da banana, a expressão gênica parece ser um dos mecanismos mais relevantes (NASCIMENTO *et al.*, 1997).

As variações na atividade da SuSy e SPS quando o fruto é amadurecido na planta ocorrem de modo mais lento, indicando que metabólitos e hormônios, que são transportados para os frutos, podem influenciar a ação das duas enzimas (CORDENUNSI e LAJOLO, 1995; PURGATTO *et al.*, 2001; ROSSETO *et al.*, 2003).

O conjunto de resultados obtidos para o metabolismo de carboidratos na banana, mostra, que as alterações na composição química da banana são dependentes da ação combinada de várias enzimas, hormônios e metabólitos. A análise de metabólitos tem sido feita de maneira individual, o que além de ser extremamente trabalhoso, conduz à obtenção de informações sobre metabólitos já conhecidos ou já esperados, deixando margem a haver outros metabólitos importantes em eventos como o metabolismo de carboidratos. Um exemplo neste aspecto foram estudos realizados em tubérculos de batata transgênicos, aplicando técnicas convencionais tais como ensaios enzimáticos e HPLC para a detecção e comparação de metabólitos entre o controle e a modificada. Por estas metodologias a ocorrência de trealose e de outros dissacarídeos não foi detectada. Quando uma metodologia que fornece o perfil metabólico foi aplicada, tiveram a vantagem de encontrar compostos inesperados, como por exemplo a identificação de trealose, assim fornecendo novas informações para a rede metabólica (ROESSNER *et al.*, 2000).

Este tipo de metodologia é relativamente recente e tem como característica produzir “mapas” com perfis metabólicos que permitem detectar, analisar e até quantificar vários metabólitos presentes num dado estágio fisiológico do tecido, o

que poderia fornecer um “mapa”, com vários metabólitos que desaparecem ou aparecem, sugerindo sua importância no metabolismo do fruto, por exemplo.

3. Análise do perfil metabólico e da composição química (Metaboloma)

O termo metaboloma compreende a análise em que os metabólitos de um organismo são identificados e quantificados (FIEHN, 2002). Juntamente com a genômica funcional, que têm como finalidade um melhor entendimento da correlação entre genes e suas contribuições para o fenótipo do organismo, contribui para o entendimento das complexas interações que ocorrem nos sistemas biológicos (HALL *et al.*, 2002).

A metabolômica tem sido aplicada em vários estudos biológicos, entre eles a interação entre carbono e nitrogênio nas plantas (STITT e FERNIE, 2003), para a avaliação nutricional personalizada em humanos (GERMAN *et al.*, 2003) e para a obtenção de respostas bioquímicas de um organismo que foi submetido a uma perturbação no seu sistema, sendo caracterizada pelo acúmulo de certos metabólitos (RAAMSDONK *et al.*, 2001).

Entre as várias funções dos metabólitos em plantas, uma delas é fornecer respostas ao estresse e contribuir para as mudanças na cor, textura, aroma e sabor dos frutos. A identificação simultânea e quantificação de metabólitos é necessária para o estudo da dinâmica do metaboloma, para a análise dos fluxos das vias metabólicas e para decifrar a principal função de cada metabólito seguido dos seus vários estímulos (FIEHN e WECKWERTH, 2003). O objetivo da análise metabólica, é identificar as mudanças na rede metabólica que são funcionalmente correlacionadas com a fisiologia e desenvolvimento do fenótipo da célula e tecidos

dos organismos (WECKWERTH *et al.*, 2004). A ligação da metabolômica funcional com expressão de proteínas e de informações do mRNA, fornecem dados que tornam possível a visualização de genes dos fenótipos que possuem um grande potencial de aplicação, por exemplo, na eficiência da colheita de frutos e vegetais que combinem uma aparência e textura atrativa, com os níveis de fitonutrientes, tais como flavonóides e carotenóides.

Dentre as tecnologias atuais, a análise de metabólitos tem sido feita por cromatografia à gás com detecção por espectrometria de massas (CG-EM) através de impacto de elétrons, devido ao seu alto poder de resolução, sensibilidade, precisão e seletividade, independente da matriz utilizada. Outras tecnologias também são utilizadas, como por exemplo, LC/MS (cromatógrafo líquido acoplado ao espectrômetro de massas), Transformada de *Fourier*/MS, Tempo-de-vôo/MS ou *Time-of-flight*-MS, *ion-trap* e ressonância magnética nuclear.

A necessidade de múltiplas tecnologias reflete a dificuldade da técnica de análise de metabólitos, devido às grandes variações em suas concentrações relativas e complexidades químicas. Esforços têm sido feitos para fornecer a identificação inequívoca de metabólitos individuais em amostras complexas. Um exemplo é a identificação dos metabólitos em folhas de *Arabidopsis*. Dos 5000 diferentes metabólitos primários e secundários estimados, apenas aproximadamente 10% foram identificados, utilizando as tecnologias atuais (BINO *et al.*, 2004). Geralmente os metabólitos são identificados através de comparações espectrais com os compostos autênticos contidos dentro de bibliotecas espectrais, tais como a NIST 98. A identificação é feita através da comparação da estrutura química do metabólito, o tempo de retenção do mesmo na coluna utilizada pelo cromatógrafo à gás e pelo seu espectro de massas.

O uso de materiais de referência como padrões, permitiria a comparação da eficácia experimental e instrumental entre laboratórios e tecnologias. Com o uso destas diferentes tecnologias geram-se dados de metabólitos que variam em sua escala de identificação, de exatidão, de definição e sensibilidade, nos quais os materiais de referência permitiriam a validação do desempenho técnico e por sua vez avaliaria e compararia o desempenho entre tecnologias. Atualmente, alguns materiais de referência estão sendo compostos, como para o *Lycopersicon esculentum*, *Arabidopsis thaliana* e para o *Medicago truncatula* (BINO *et al.*, 2004).

Apesar das dificuldades da identificação de certos metabólitos, a técnica CG-EM consiste em um procedimento simples e vantajoso que permite a análise simultânea de um grande grupo de compostos. Portanto, através da análise metabolômica de tecidos, separados temporalmente e, dependendo do objetivo do estudo, submetidos a tratamentos específicos ou não, pode-se obter a composição química do mesmo através do conjunto de metabólitos identificados, como açúcares, aminoácidos, ácidos orgânicos, lipídios, etc. Também, através desta técnica, pode-se identificar variações dos metabólitos mais relevantes para a via metabólica de interesse. Por intermédio desta análise pode-se direcionar a investigação destes metabólitos para a via estudada.

Roessner *et al.*, (2000) analisaram frações de metabólitos polares extraídos de tubérculos durante o desenvolvimento da batata e compararam com tubérculos derivados de plantas transgênicas que expressavam altos níveis de uma invertase citossólica ou que expressavam um mRNA antisense para a ADPG-pirofosforilase, ambas importantes enzimas envolvidas no metabolismo de carboidratos em plantas. Através do CG-EM, foram analisados mais de 150 compostos, sendo quimicamente identificados 77 destes, como aminoácidos, ácidos orgânicos e açúcares. Dentre os

resultados encontrados, um dos mais interessantes foi o grande aumento no nível de oligossacarídeos (maltose, isomaltose e trealose), observados nos tubérculos que expressavam a invertase citossólica. Interessante também foi o fato de que a transformação resultou na síntese de trealose, um açúcar que vem sendo apontado como sinalizador para a expressão de genes específicos ligados ao metabolismo de carboidratos, de modo similar à sacarose e glicose. A reprodutibilidade do método foi grande, o desvio padrão foi menor ou igual a 6% entre os 33 compostos avaliados em relação a extração, modificações químicas realizadas durante o procedimento analítico e etapas da análise no CG-EM. A reprodutibilidade final da análise, isto é a avaliação da manutenção das condições iniciais do método, foi realizada através de vinte e três substâncias padrões medidas separadamente a cada 2 horas num período de 30 horas. Esta avaliação mostrou estabilidade nos resultados, com algumas exceções. Em geral apenas a perda de 2% do sinal inicial foi observada no final do período de 30 horas de análise. Todas estas análises demonstraram a robustez e reprodutibilidade do método analítico. Com isso, os pesquisadores decidiram verificar a variabilidade biológica das amostras e concluíram que com o uso da tecnologia CG-EM, a variação nos resultados é essencialmente devido a variabilidade biológica entre as amostras. A identificação da natureza química dos metabólitos, foi possível através de duas estratégias. A primeira consistiu na comparação dos espectros de massas de todos os picos identificados com os espectros de massas, obtidos por impacto de elétrons, de bibliotecas como a NIST ou WILEY. A segunda estratégia consistiu na criação de uma própria biblioteca de referência, que continha cem compostos padrões, que os pesquisadores consideraram estar presentes em quantidades detectáveis em tecidos da planta. Deste modo, criaram uma biblioteca de referência que contém o tempo de retenção

destes compostos (como determinado sob as circunstâncias do método) e os correspondentes espectros de massas.

Através da mesma técnica, Fienh *et al.* (2000) analisaram mais de 300 compostos extraídos de folhas de mutantes *Arabidopsis thaliana* e compararam o efeito das mutações nos níveis de metabólitos em relação a plantas controle (wild-type). Neste caso foi empregado um procedimento de fracionamento que rendeu frações de metabólitos polares e apolares. A mesma estratégia foi refinada posteriormente por Frenzel *et al.* (2002), fracionando os metabólitos extraídos de variedades de arroz comerciais e transgênicas (Golden Rice), em metabólitos apolares e polares, cada uma subfracionada em compostos presentes em altas concentrações e compostos presentes em baixas concentrações. O objetivo deste estudo era desenvolver uma técnica de perfil metabólico usando o arroz como modelo, pois técnicas de DNA recombinante estão sendo cada vez mais aplicadas, para melhorar as características agrônômicas e nutricionais do arroz (TYAGI *et al.*, 2000). Um exemplo recente é a biossíntese de β -caroteno no arroz Golden Rice (YE *et al.*, 2000). Neste aspecto uma questão importante é a comparação das composições químicas entre a planta parental e a planta geneticamente modificada, focando os nutrientes essenciais e os tóxicos, como por exemplo os glicoalcalóides em batatas (ENGEL *et al.*, 1998). Portanto para aumentar as possibilidades de detectar os efeitos inesperados causados pela modificação genética, a técnica do perfil metabólico foi sugerida como a ferramenta analítica adicional. Os resultados obtidos da análise comparativa entre as duas amostras de arroz indicaram que o método do perfil metabólico deve ser aplicável à plantas com distribuições similares dos constituintes. Sendo assim, a metodologia desenvolvida poderia servir como base para a análise da composição química de outras colheitas e servir como uma

ferramenta analítica adicional para a avaliação de segurança de colheitas geneticamente modificadas. A seleção de um grande espectro de compostos combinou uma separação eficaz entre os principais constituintes e os constituintes encontrados em menores concentrações, podendo ajudar a aumentar a possibilidade de detecção dos efeitos inesperados oriundos da aplicação das técnicas de DNA recombinante.

Os exemplos citados estão entre os relatos encontrados na literatura na aplicação da análise metabolômica em Ciência de Alimentos e Fisiologia Vegetal. Particularmente em fisiologia de frutos, existem poucos relatos da aplicação de tal abordagem. Em um deles, Katona *et al.* (1999), analisaram e compararam o perfil metabólico de duas variedades de damascos, em diferentes pontos de colheita e também dos mesmos submetidos a diferentes condições de armazenamento. Utilizando a técnica CG-MS, os pesquisadores avaliaram a extração e derivatização das amostras, bem como a reprodutibilidade dos resultados. Através do uso de dois padrões internos avaliaram as perdas durante os procedimentos de extração e derivatização das amostras. Testaram também dois métodos diferentes de extração (refluxo e centrifugação) e, através de testes de recuperação, determinaram o melhor método de extração das amostras. A reprodutibilidade da determinação dos metabólitos nos damascos foi realizada baseando-se nos valores fornecidos pelos modos TIC (corrente total do íon) e SFI (fragmento seletivo do íon), assegurando a identificação e quantificação de variadas concentrações. A eficiência e reprodutibilidade do método proposto mostrou um total de metabólitos identificados e quantificados de aproximadamente 80% em uma única solução e simples injeção.

Estudos que utilizam compostos radioativos demonstram a importância do conhecimento a respeito dos intermediários do metabolismo de carboidratos e do

provável efeito modulador desses compostos sobre o fluxo de algumas vias metabólicas (HILL e ApREES, 1994, 1995a, 1995b). Contudo, esses estudos têm natureza distinta da análise metabolômica, uma vez que essa última não promove perturbação no sistema, em razão da administração de grandes quantidades de composto marcado, nem restringe o campo de análise à distribuição da radioatividade.

Assim, através da obtenção de um “mapa” de metabólitos, em situações específicas, como diferentes estágios de amadurecimento, pode-se conhecer um pouco mais sobre as alterações metabólicas decorrentes do amadurecimento. Elas podem ser responsáveis por mudanças na atividade e expressão de certas enzimas nos frutos, bem como na transcrição dos genes e na síntese de proteínas. Do mesmo modo pequenas alterações nos níveis de certos metabólitos podem ser significativos na ativação de enzimas e na transcrição de genes.

Portanto espera-se que a análise destes diferentes metabólitos presentes nos frutos da banana verde e madura, contribua para o conhecimento dos fluxos metabólicos operantes.

4. Objetivo

O objetivo deste trabalho foi estabelecer metodologia e obter um perfil de metabólitos associados com as mudanças que ocorrem durante o amadurecimento de bananas controle e tratadas com etileno.

5. Material e Métodos

Bananas (*Musa acuminata*), da cultivar nanicão, foram obtidas no mercado local, com, no máximo, um dia após a colheita. Amostras dos frutos pré-climatéricos (frutos verdes), foram imediatamente congelados em N₂ líquido e armazenadas a - 80°C. Outra parte dos frutos foi armazenada em câmara com temperatura (~20°C) e umidade relativa (~75%) controladas, até completa maturidade. O amadurecimento foi acompanhado pela medida diária da respiração e produção de etileno por cromatografia à gás. Os frutos foram amostrados diariamente, congelados em N₂ líquido e armazenados a - 80°C. Uma outra parte foi tratada com etileno na concentração de 100 ppm e fluxo gasoso de 7L/min. Parte das amostras colhidas ao longo do amadurecimento, foram reunidas para constituição da amostra de frutos climatéricos (frutos maduros). Desse modo foram preparadas as amostras, representativas de frutos tratados e não tratados com etileno, a serem utilizados nas comparações dos perfis transcritos. As amostras utilizadas nas extrações com solventes polares e apolares, eram constituídas por frações de fatias de várias bananas, pulverizadas com o auxílio de nitrogênio líquido em gral de porcelana. Assim, apesar de serem pesadas pequenas quantidades de cada amostra, elas podem ser consideradas representativas de cada estágio de amadurecimento.

5.1. MÉTODOS

5.1.1 Método otimizado para extração e derivatização de metabólitos polares em amostras de banana

Cerca de 0,5g de amostra de banana congelada e triturada (amostra composta por frutos variados), foi adicionada de 4 mL de metanol 80%, 50 μ L de ribitol em água (2,0mg/ml) e agitada por 30 min a 60°C, sendo em seguida centrifugada por 15 min a 11.951 g. Os sobrenadantes foram retirados com o auxílio de pipeta Pasteur e transferidos para balões volumétricos de 25 mL. A operação foi repetida 3 vezes e os extratos foram combinados, sendo o volume final completado com metanol 80%. No total foram feitas cerca de 50 extrações.

Para a derivatização da fração polar, alíquotas de 1 mL das amostras foram evaporadas a baixa temperatura em sistema tipo Speed Vac. Os resíduos foram adicionados de 80 μ L de metoxiamina em piridina (20 mg/ml) e sonicados por 2 horas até completa dissolução. Em seguida, adicionou-se 40 μ L da mistura padrão de ácidos graxos em tetrahidrofurano na concentração de 10 mg/mL (ácido heptanóico 3,7%, undecanóico 3,7% e nonadecanóico 7,4%) e 80 μ L de MSTFA, e incubados por 30 min a 37°C. As amostras que continham precipitado foram centrifugadas a 11.951 g por 5 min e os sobrenadantes foram transferidos para vials de CG-EM. Para análise foram injetadas 1 μ L das amostras derivatizadas.

A coluna utilizada foi a SPB 50 da Supelco e as injeções foram feitas automaticamente em modo splitless e split (35:1), com injetor automático HP ALS-1100 (Agilent Technologies). A temperatura de injeção foi de 250 °C e a temperatura da interface entre o cromatógrafo e o detector foi de 230°C. A fonte de íons foi

ajustada para 200°C. O programa de temperatura utilizado foi: 5 min. isotérmico a 70°C, seguido de uma rampa de temperatura de 5°C /min até 310°C que permaneceu por 10 min nesta temperatura. O sistema foi então reequilibrado por 6 min a 70°C antes da próxima injeção.

5.1.2 Método otimizado para extração e derivatização de metabólitos apolares em amostras de banana

Cerca de 0,5g de amostra de banana liofilizada (amostra composta por frutos variados), foi adicionada de 2 mL de diclorometano e 100µL de ácido nonanóico 3,7% em diclorometano e agitadas por 30 min a 30°C, sendo em seguida centrifugadas por 25 min. a 26.891 g. Os sobrenadantes foram retirados com o auxílio de pipeta Pasteur e transferidos para balões volumétricos de 5 mL. A operação foi repetida 3 vezes e os extratos foram combinados, sendo o volume final de 5 mL completado com diclorometano. No total foram feitas 30 extrações.

Alíquotas de 1 mL foram evaporadas a baixa temperatura em sistema tipo Speed Vac. Para a transmetilação e derivatização da fração apolar, foram adicionados 1000µL de clorofórmio aos resíduos e transferidos para vials de reação para posterior transmetilação. Em seguida, adicionou-se 900µL de H₂SO₄ 3% em metanol. A reação ocorreu sob aquecimento a 100°C durante 4 h. Após esta reação o líquido transmetilado foi transferido para tubos de ensaio e procedeu-se a retirada do H₂SO₄, utilizando 4 mL de água deionizada por 3 vezes. A fração transmetilada foi transferida para tubos de microcentrífuga e evaporada em Speed Vac. O resíduo foi ressuspenso em 40µL de piridina e sonificado por 1h. Após a dissolução do resíduo, adicionou-se 10µL da mistura padrão de alcanos (nonadecano, docosano,

octacosano, dotriacontano e hexatriacontano, todos a 0,029% em piridina), juntamente com 80 μ L de MSTFA e incubadas a 37°C por 30 min. As amostras que continham precipitado foram centrifugadas a 11.951 g por 5 min e os sobrenadantes foram transferidos para vials de CG-EM. Para análise foram injetadas 1 μ L das amostras derivatizadas em modo de injeção split (25:1), nas mesmas condições cromatográficas já descritas no ítem 5.1.1.

5.2 Análise estatística

As diferenças significativas nos níveis de metabólitos foram avaliadas por Testes t de “Student” utilizando o software “Statística 5.0”. A análise estatística foi realizada utilizando triplicatas da extração de cada ponto escolhido do amadurecimento.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Otimização do protocolo de extração e análise dos metabólitos polares

A quantidade de amostra foi otimizada tendo como base o protocolo descrito por Roessner *et al.* (2000), que trabalhou com batata. Os solventes de extração foram adaptados de acordo com Frenzel *et al.* (2002). O tempo e a temperatura de extração, também foram mudados, de 30°C/ 20 min para 60°C/ 30 min (adaptado de Frenzel *et al.*, 2002), em função da melhor extração e posterior detecção dos açúcares no CG-EM. O protocolo final foi fixado com a quantidade de amostra em 0,5 g, ao invés de 1 g e a alíquota do solvente em 1 mL, ao invés de 5 mL.

Os resultados destas modificações foram satisfatórios, pois não houve a precipitação de sais com a adição da metoxiamina e, em conjunto, ocorreu a solubilização quase completa do resíduo. O modo de injeção da amostra derivatizada no CG-EM foi também otimizada, sendo testados os modos de injeção splitless, split 25:1 e 35:1. Destes foi escolhido o modo de injeção splitless para tornar possível a detecção também de aminoácidos e ácidos orgânicos e o modo de injeção split 35:1 para detectar os açúcares, em razão da boa resolução dos picos.

No decorrer das análises outras otimizações foram feitas no protocolo de Frenzel *et al.*, (2002), como a derivatização em tubos de microcentrífuga fechados e não em tubos de ensaio e com aquecimento sem banho de água, pois o mesmo estava impedindo a completa derivatização da amostra, devido a grande reatividade do agente de derivatização com os vapores de água.

As condições cromatográficas foram as mesmas descritas por Roessner *et al.*, 2000, exceto pela permanência na temperatura final de 310°C por 10 min, ao invés de 1 min.

Exemplos dos cromatogramas obtidos após a otimização da metodologia podem ser vistos nas Figuras 2 e 3. O cromatograma da Figura 2, foi obtido através da análise em CG-EM de amostras de banana nanicão controle e tratadas com etileno. Neste cromatograma encontram-se mais de duzentos picos, mostrando a alta sensibilidade do método, que permitiu a identificação de vários metabólitos (aminoácidos, ácidos orgânicos, açúcares e outros), com boa resolução dos picos cromatográficos.

Figura 2: Cromatograma da análise em cromatógrafo gasoso, acoplado ao espectrômetro de massas (CG-EM) de amostras de banana nanicão controle e tratadas com etileno. (A) Cromatograma da análise em cromatógrafo gasoso, acoplado ao espectrômetro de massas (CG-EM), dos metabólitos polares em banana nanicão controle e tratada com etileno. (B) Aumento para melhor visualização da faixa de 20 a 40 min no tempo de retenção.

Figura 3: Cromatograma da análise em CG-EM de metabólitos polares em banana nanicão. (A) Cromatograma da análise em CG-EM de metabólitos polares em banana nanicão na faixa de 20 a 38 min. (B) Ampliação e identificação dos picos cromatográficos 1, 2 e 3, nos tempos de retenção de aproximadamente 21.1 (min), 26.1 (min) e 37.7 (min), respectivamente.

Na extração das amostras foi adicionado como padrão interno o ribitol, com a finalidade de normalização, devido as perdas decorrentes no procedimento analítico e também por este composto ter a mesma natureza química dos metabólitos encontrados nas amostras, apresentando uma boa dissolução e extração no solvente utilizado.

Antes da derivatização das amostras, foi utilizada uma mistura de ácidos graxos com a finalidade de verificar os tempos de retenção dos metabólitos analisados em relação aos tempos de retenção dos constituintes da mistura (Mistura de TR), verificando assim a repetibilidade do método, através da diferença entre tempos de retenção, que permaneceram praticamente constantes.

6.2 Otimização do protocolo de extração dos metabólitos apolares

A quantidade de amostra e os solventes de extração foram otimizados tendo como base o protocolo descrito por Frenzel *et al.* (2002), que trabalhou com arroz. Devido a dificuldade de penetração do solvente nas amostras congeladas, as amostras foram liofilizadas, o que melhorou a extração dos lipídeos. O tempo e a temperatura de extração foram os mesmos utilizados por Frenzel *et al.* (2002), 30°C/30 min. O protocolo final foi fixado com a quantidade de amostra em 0,5 g, ao invés de 2 g e a alíquota do solvente em 1 mL, ao invés de 5 mL.

A etapa de transmetilação dos lipídeos foi inicialmente adaptada por Frenzel *et al.* (2002), usando metil-terc-butil-éter e metilado de sódio em metanol. A reação de transmetilação ocorreu em 1 hora na temperatura ambiente, e não foi satisfatória, pois na análise no CG-EM, foram detectados pouco lipídeos transmetilados. Após várias tentativas, foi utilizado o protocolo descrito por Fiehn *et al.* (2000). Os lipídeos

extraídos foram transmetilados pela adição de clorofórmio e metanol com 3% de H_2SO_4 . A reação ocorreu por 4 horas a 100°C em vials fechados. O conjunto de modificações na técnica resultou num maior número de lipídeos identificados.

O modo de injeção da amostra derivatizada no CG-EM foi também otimizado, sendo testados os modos de injeção splitless e split 25:1. Destes foi escolhido o modo de injeção splitless para tornar possível a detecção de um maior número de lipídeos, pois o conteúdo destes na banana é relativamente baixo.

O protocolo de derivatização e as condições cromatográficas utilizadas foram as mesmas descritas no ítem 6.1, para os metabólitos polares.

O cromatograma da Figura 4, foi obtido através da análise em CG-EM de amostras de banana nanicão com 15 dias pós-colheita. Neste cromatograma encontram-se mais de cem picos, mostrando a alta sensibilidade do método, que permitiu a identificação de vários metabólitos apolares, como os ácidos oleico, linoleico e linolênico entre outros.

Da mesma maneira que nos metabólitos polares, na extração das amostras foi adicionado um padrão interno, o ácido nonanóico, com a finalidade de normalização. Também, como nos metabólitos polares, antes da derivatização das amostras foi utilizada uma mistura de alcanos (Mistura de TR), com a finalidade de verificar os tempos de retenção dos metabólitos analisados, em relação aos tempos de retenção dos constituintes da mistura.

Figura 4: Cromatograma da análise em CG-EM de metabólitos apolares em banana nanica com 15 dias pós-colheita. (A) Cromatograma da análise em CG-EM de metabólitos apolares em banana nanica na faixa de 31.0 a 36.0 min e ampliação e identificação dos picos cromatográficos dos ácidos hexadecanóico, hexadecenóico, hexadecadienóico, octadecenóico, octadecadienóico, octadecatrienóico, respectivamente.

6.3 Caracterização das amostras e metabólitos identificados

Foram escolhidas amostras que representassem a banana verde (recém colhida) e a banana em amadurecimento, com teores de amido intermediários entre verde e maduro. Para isso, os frutos foram amostrados tendo como base a produção de etileno e de CO_2 e as amostras escolhidas posteriormente, pelo teor de amido. Também foram escolhidas amostras que pudessem indicar a influência do tratamento com etileno no amadurecimento, ou seja logo após o tratamento e, durante o amadurecimento, com teor próximo de amido ao do controle. As amostras escolhidas foram zero dpc (zero dia pós-colheita, controle), 1 dpc (um dia pós-colheita, tratada com etileno), tendo teor de amido semelhantes entre si e 4 dpc (quatro dias pós-colheita, tratada com etileno) e 15 dpc (quinze dias pós-colheita, controle). A finalidade da escolha destas amostras foi estabelecer um estágio fisiológico aproximado entre as amostras tratadas e não tratadas com o etileno, e com isso reduzir as variáveis entre tratamentos.

A Figura 5 mostra os resultados dos teores de amido e açúcares totais e perfis de respiração e etileno nas amostras de banana nanicão utilizadas para as análises (CORDENUNSI, 2005).

Figura 5: Caracterização das amostras. Níveis de etileno endógeno, CO₂ produzido na respiração e teores de amido e açúcares totais de bananas durante o amadurecimento normal (°) ou induzido por tratamento com 100 ppm de etileno exógeno (•). As setas (↓) indicam os pontos que foram escolhidos para serem analisados.

As Tabelas 1, 2 e 3 mostram a listagem geral dos metabólitos polares e apolares, identificados através da análise em CG-EM em todas as amostras de banana nanicão utilizadas. A identificação dos metabólitos foi feita através da comparação do tempo de retenção em CG, estrutura química e espectro de massas contidos na biblioteca NIST 98. Foram considerados os metabólitos que obtiveram semelhança igual ou maior que 80% em relação aos metabólitos contidos na biblioteca. Alguns metabólitos identificados na fração apolar, também foram identificados na fração apolar, devido a extensão da cadeia de carbonos, que permitiu a identificação nas duas frações sem a necessidade de transmetilação.

Tabela 1: Metabólitos polares identificados em banana nanicão controle (zero dpc e 15 dpc) e tratadas com etileno (1 dpc e 4.dpc) por CG-EM. Foram considerados metabólitos com qualificador acima de 80, com base na biblioteca NIST 98.

Açúcares	Aminoácidos
Arabinose	Asparagina
Frutose	Beta-alanina
Frutose benzoil-oxima	Fenilalanina
Galactose	Glicina
Glicose	Glutamina
Manose	Histidina
Maltose	Prolina
Melibiose	Tirosina
Metil-frutose	Triptofano
Ribose	
Sacarose	
Xilose	

Tabela 2: Metabólitos polares identificados em banana nanicão controle (zero dpc e 15 dpc) e tratadas com etileno (1 dpc e 4.dpc) por CG-EM. Foram considerados metabólitos com qualificador acima de 80, com base na biblioteca NIST 98.

Ácidos orgânicos	Outros compostos
Ácido arábico	Acetamida
Ácido butírico	Beta-sitosterol
Ácido 2-butenóico	Butanal
Ácido delta-aminolevulínico	Amino-propanol
Ácido D-glucônico	Escopolina
Ácido docosanóico	Fenil-etilenodiamina
Ácido eicosanóico	Silanoamina
Ácido fosfórico	Stigmasterol
Ácido ftálico	Mio-inositol
Ácido fosfoglicérico	Éter de glicerol
Ácido glicurônico	Fosfato de silanol
Ácido heptanóico	Germanicol
Ácido palmítico	Glucitol
Ácido heptadecanóico	Ribitol (padrão interno)
Ácido 4-hidroxibutanóico	
Ácido malônico	
Ácido 10,13-metil-octadecadienóico	
Ácido 9,12-octadecadienóico	
Ácido undecanóico	
Ácido pentadecanóico	
Ácido nonadecanóico	
Ácido nicotínico	
Ácido nonadecanóico	
Ácido 10-octadecenóico	
Ácido 2-pentenóico	
Ácido propanóico	
Ácido mirístico	
Ácido pipecólico	
Ácido xilônico	
Ácidos orgânicos do Ciclo de Krebs	
Ácido cítrico	
Ácido isocítrico	
Ácido cetoglutárico	
Ácido succínico	
Ácido fumárico	
Ácido málico	

Tabela 3: Metabólitos apolares identificados em banana nanicão controle (zero dpc e 15 dpc) e tratadas com etileno (1 dpc e 4.dpc) por CG-EM. Foram considerados metabólitos com qualificador acima de 80, com base na biblioteca NIST 98.

Ácidos carboxílicos	Alcanos e outros compostos
Ácido nonanóico (padrão interno)	Nonadecano (mistura de TR)
Ácido nonahexacontanóico	Docosano (mistura de TR)
Ácido pentadecanóico	Octacosano (mistura de TR)
14-metil-ácido pentadecanóico	Dotriacontano (mistura de TR)
Ácido hexadecanóico	Hexatriacontano (mistura de TR)
14-metil-ácido hexadecanóico	9,12,15-octadecatrienal
9-ácido hexadecenóico	Di-octil-ftalato
Ácido hexadecadienóico	Dimetil ftalato
9,12-ácido hexadecadienóico	Dibutil ftalato
Ácido hexadecanóico	Trifenil fosfato
Ácido heptadecanóico	Metil tetradecanoato
Ácido heptacosanóico	
16-metil-ácido heptadecanóico	
Ácido octadecanóico	
8-ácido octadecenóico	
11-ácido octadecenóico	
9-ácido octadecenóico	
7-ácido octadecenóico	
9,12-ácido octadecadienóico	
10,13-ácido octadecadienóico	
8,11-ácido octadecadienóico	
9,12,15-ácido octadecatrienóico	
Ácido linoleico	
Ácido linolênico	
Ácido tridecanóico	
Ácido oleico	
Ácido eicosanóico	
Ácido hexanodióico	
Ácido docosanóico	
Ácido tricosanóico	
Ácido pentacosanóico	
Ácido hexacosanóico	
Ácido 1,2-benzenodicarboxílico	
Ácido dehidroabiético	

A Figura 6 mostra a porcentagem relativa de metabólitos identificados por CG-EM em todas as amostras de banana nanicão utilizadas. Foram considerados os metabólitos apresentados na listagem geral, os quais possuem semelhança igual ou superior a 80% em relação aos metabólitos contidos na biblioteca NIST 98.

Figura 6: Porcentagem relativa dos grupos de metabólitos identificados em banana nanicão por CG-EM. (A) Porcentagem de açúcares, aminoácidos, ácidos orgânicos e outros metabólitos identificados em banana nanicão por CG-EM.

Em relação aos açúcares solúveis, foram identificados pentoses, hexoses e dissacarídeos. Dentre estes, como era de se esperar, estão presentes os açúcares solúveis mais abundantes na banana madura: glicose, frutose e sacarose. Dentre os aminoácidos, foram identificados a asparagina e a histidina, considerados os principais aminoácidos presentes na banana madura (SEYMOUR *et al.*, 1993). Além destes também foram identificados a fenilalanina, tirosina e o triptofano, que participam das reações do Ciclo do ácido Chiquímico em plantas superiores (VICKERY e VICKERY, 1981). Em relação aos ácidos orgânicos, foram identificados desde ácidos de cadeia curta até ácidos de cadeia longa, saturados e insaturados. Os ácidos orgânicos málico e cítrico, que participam do Ciclo de Krebs, e, em parte, responsáveis pelo aumento da acidez durante o amadurecimento da banana, foram identificados. Também o ácido fosfoglicérico, que participa na síntese de glicose, da via das pentose-fosfato, foi encontrado (SEYMOUR *et al.*, 1993). Outros metabólitos também foram identificados como os açúcares alcóois e fitoesteróis, como por exemplo: mio-inositol e glicerol e o β -sitosterol e stigmasterol.

Por intermédio de análises estatísticas, pôde-se identificar quais metabólitos polares variaram significativamente entre as amostras analisadas. A Tabela 3 mostra os metabólitos com maior variância nas amostras 15 dias pós-colheita e tratadas com etileno 1 e 4 dias pós-colheita em relação a amostra controle zero dia pós-colheita.

Tabela 4: Metabólitos polares identificados por CG-EM que apresentaram variação significativa em relação a amostra controle C0 *.

Composto**	Qual***	C15	E1	E4
Ácido málico	99			
L-Asparagina	99			
Ácido hexadecanóico	99			
Ácido 10,13-metil-octadecadienóico	99			
Ácido 9,12-octadecadienóico	99			
Ácido eicosanóico	99			
Ácido L-aspártico	98			
Ácido 9,12-metil-octadecadienóico	98			
Ácido undecanóico	97			
Ácido nicotínico	97			
Ácido fosfórico	96			
Éster metílico do ácido undecanóico	96			
Ácido heptadecanóico	95			
D-Fructose	94			
L-tirosina	94			
Maltose, octakis(trimethylsilyl)-	94			
Ácido fitálico	94			
Ácido glicerofosfórico	93			
Melibiose	93			
Ácido pipecólico	92			
Metil-frutofuranosídeo	91			
Mio-inositol	91			
Sacarose	91			
α -glicopiranosídeo	91			
Ácido δ -aminolevulínico	90			
L-prolina	90			
Fructose oxima	90			
Galactose oxima	90			
α -glicopiranosídeo	90			
Escopolina	90			
Ácido docosanóico	90			
Metil éster do ácido heptanóico	88			
Amino propanol	88			

Continuação da Tabela 4

Composto**	Qual***	C15	E1	E4
Ácido glutâmico	88			
Ácido fumárico	88			
Xilose	87			
Glicose oxima	87			
Ácido glicurônico	87			
Ácido nonadecanóico	85			
Ácido 2-pentenóico	84			
Ácido 5-pentanóico	84			
Triptofano	84			
Ácido 4-hidroxibutanóico	83			
β -alanina	83			
Glicina	83			
Ácido glucônico	83			
Frutose benzoil oxima	83			
Ácido malônico	83			
Fenil-etilenodiamina	82			
L-fenilalanina	82			
Xilitol	82			
Silanoamina	82			
Manose	82			
Metil éster do ácido hexadecanóico	81			
α -glicopiranosídeo	81			
Glucitol	80			
Ácido isocítrico	80			

C0 : Amostra controle com zero dpc, **C15**: amostra controle com 15 dpc, **E1**: amostra tratada com etileno com 1 dpc e **E4**:- amostra tratada com etileno com 4.dpc.

(*) - As amostras foram comparadas duas a duas. O preenchimento nas colunas C15, E1 e E4 indicam em qual das comparações, o metabólito foi identificado como significativamente variável em relação a amostra C0.

(**) - Todos os metabólitos indicados foram identificados como derivados trimetilsilil na biblioteca de espectros de massa NIST 98.

(***) - Número correspondente ao qualificador retornado pelo software de busca na biblioteca de espectros de massa NIST 98. Foram considerados significativos os qualificadores iguais ou acima de 80. Abaixo deste valor o número foi omitido.

Para melhor compreensão dos resultados, alguns dos metabólitos polares que apresentaram variação significativa foram apresentados nas Figuras 7 e 8.

Figura 7: Teores de açúcares com variação significativa, analisados em banana nanicação por CG-EM. A quantidade de cada metabólito foi expressa em unidades relativas a quantidade do padrão interno ribitol (2 mg/ml). Desta forma, o eixo das ordenadas em cada gráfico representa a área dos picos de cada metabólito dividido pela área do pico do padrão interno na respectiva amostra.

Figura 8: Teores de ácidos com variação significativa, analisados em banana nanicação por CG-EM. A quantidade de cada metabólito foi expressa em unidades relativas a quantidade do padrão interno ribitol (2 mg/ml). Desta forma, o eixo das ordenadas em cada gráfico representa a área dos picos de cada metabólito dividido pela área do pico do padrão interno na respectiva amostra.

A sacarose possui outras funções em plantas superiores, que não a de carboidrato de reserva, sendo também responsável, pelo transporte de glicose e frutose para partes não-fotossintéticas das plantas, como raízes e sementes. Em várias espécies vegetais sua concentração aumenta durante o dia e diminui durante a noite (VICKERY e VICKERY, 1981). Por meio das Figuras 7 e 8, podemos notar que a concentração de sacarose aumentou durante o amadurecimento da banana, sendo sua concentração mais baixa em amostras de bananas verdes do que nas maduras. A melibiose apareceu em todas as amostras analisadas, tanto em bananas verdes quanto em maduras, tratadas ou não-tratadas com etileno, em concentrações relativamente altas. Este açúcar têm sido encontrado na forma de exudados em néctar de diversas plantas (VICKERY e VICKERY, 1981). Em relação à maltose, nota-se que sua concentração aumentou quando a amostra foi tratada com etileno, mas também foi detectada em todas as amostras de banana analisadas. A maltose é o principal produto da degradação do amido pela enzima β -amilase, sendo um dissacarídeo composto de duas moléculas de glicose (NIITYLLA *et al.*, 2004). A galactose aparece em concentrações relativamente altas na banana madura e em concentrações muito baixas nas amostras verdes e tratadas com etileno. Entre outros, participa da composição da parede celular de plantas, na forma de polímeros e na forma livre, em geral, é produto da degradação da parede celular, resultando em perda da textura do tecido (VICKERY e VICKERY, 1981). O mio-inositol aparece em amostras verdes, porém não foi identificado em amostras de banana maduras, tratadas ou não com etileno. O mio-inositol em combinação com a galactose forma um complexo chamado galactinol, que participa da biossíntese de rafinose (LOEWUS e MURTHY, 2000). O fósforo está presente nos fluidos intracelulares dos tecidos dos vegetais, sob a forma do íon fosfato, sendo um dos constituintes

imprescindíveis no metabolismo celular das plantas. O ácido fosfórico aparece em concentrações elevadas na banana madura e não foi identificado em amostras de banana verdes. A escopolina, composto aromático classificado como heterosídeo cumarínico, apareceu em todos os estados fisiológicos analisados, porém em concentrações maiores em amostras de banana tratadas com etileno. Os ácidos pipercolico (aminoácido não comum em plantas) e δ -aminolevulínico (precursor na síntese de clorofila) aparecem em bananas verdes, porém não foram identificados na banana madura tratada ou não com etileno. Por fim, o ácido nicotínico, derivado do ácido aspártico no Ciclo do ácido tricarboxílico, apareceu apenas na banana verde, em concentração relativa elevada (VICKERY e VICKERY, 1981).

Pela impossibilidade de discutir o papel de cada metabólito e pela relação com o metabolismo de carboidratos, foram escolhidos dois metabólitos para uma análise crítica do papel que teriam no metabolismo de carboidratos da banana: (1) o mio-inositol, que diminui durante o amadurecimento e (2) a maltose que aumenta durante o amadurecimento.

O conteúdo de mio-inositol variou significativamente entre as amostras controle (zero dpc e 15 dpc) e tratadas com etileno (1 dpc e 4 dpc). Verifica-se na Figura 7 que o mio-inositol livre na amostra controle zero dpc, praticamente não foi identificado nas amostras relativas à banana em amadurecimento.

O mio-inositol desempenha várias funções no metabolismo das plantas, como resumido na Figura 9.

Figura 9: Funções do mio-inositol (MI) no metabolismo das plantas (LOEWUS e MURTHY, 2000).

O produto de oxidação do mio-inositol, como o ácido D-glicurônico, é utilizado na biogênese de pectinas e hemiceluloses, compostos importantes para a formação da parede celular (LOEWUS e LOEWUS, 1983; MORRÉ *et al.*, 1990). O mio-inositol pode também sofrer esterificação e formar ésteres de auxinas, originando as auxinas conjugadas e seus glicosídeos (PURGATTO *et al.*, 2002). A biossíntese das séries de rafinoses e galactopinitóis é resultado da conjugação do mio-inositol livre com a UDP-D-galactose (OBENDORF, 1997). Os O-metil-inositóis, que participam na resposta ao estresse nas sementes das plantas, são formados pela isomerização e metilação do mio-inositol e outros isômeros (PETERBAUER e RICHTER, 1998). Outro papel importante do mio-inositol é na biossíntese do ácido fítico e ácido fítico pirofosfatados que, através de hidrólise, originam mio-inositol livre e outros produtos que participam do reciclo metabólico da planta (BREARLEY e HANKE, 1996). O mio-inositol participa também, da biossíntese de precursores de mio-inositóis polifosfatos específicos na via de transdução de sinal do ácido abscísico (COTÉ e CRAIN, 1998) e por fim na síntese de lípidos (LAINE e HSIEH, 1987).

A mio-inositol oxigenase (MIOX), uma enzima que participa da biogênese da parede celular em plantas, pode também ser considerada como participante da síntese do ácido ascórbico. Lorence *et al.* (2004) clonaram e caracterizaram a MIOX em *Arabidopsis* e, com base nos resultados encontrados, sugeriram a enzima como importante no aumento do conteúdo de ácido ascórbico na planta. É por esta razão que evidências crescentes da participação do mio-inositol, como um novo intermediário na biossíntese de ácido ascórbico, vem sendo estudada (VALPUESTA e BOTELLA, 2004).

Em estudos recentes Loewus e Murthy (2000), mostraram que o gene que codifica a MIOX em *Arabidopsis*, quando expresso produz ácido D-glicurônico e

participa de duas vias metabólicas na planta, uma na biossíntese do ácido ascórbico e outra como precursor na síntese de polímeros da parede celular.

A hipótese de que o mio-inositol é utilizado para síntese da parede celular da banana durante o amadurecimento é possível, mas pouco provável. Apesar de haver síntese e degradação da parede o tempo todo, no amadurecimento deve predominar o processo de degradação.

Também é possível que o mio-inositol tenha sido consumido no processo de síntese do ácido ascórbico (AA) já que bananas infiltradas por precursores de AA, indicaram que pode haver síntese de quantidades mínimas de ácido ascórbico nos frutos verdes e maduros (GOMEZ, dados não publicados). Pode-se sugerir também, que o AA sintetizado contribui na regulação da biossíntese de hormônios nos frutos (ARRIGONI *et al.*, 2000). Outra hipótese é de que o mio-inositol pode estar armazenado na amostra zero dpc, na forma de compostos fosfatados, como os fitatos, pois com o início do amadurecimento ocorre uma grande demanda de fósforo, sendo o mio-inositol liberado com a hidrólise destes compostos de reserva. Portanto, o mio-inositol livre pode ser utilizado na formação de açúcares, bem como na formação de compostos conjugados com auxinas.

A maltose (Figura 7), provavelmente é um dos principais produtos da degradação do amido, que ocorre durante o amadurecimento da banana. Produto da ação da β -amilase que têm sido indicada, como uma das principais responsáveis pela degradação do amido (NIITTYLA *et al.*, 2004; WEISE *et al.*, 2005). Sabe-se que nos tecidos fotossintéticos, a fotossíntese produz os primeiros metabólitos assimilados pela planta durante o dia, como a sacarose e transforma o excesso em amido. O amido é então armazenado nos cloroplastos e à noite é degradado para suplementar a demanda de carbono para a síntese de sacarose. A degradação do

amido é realizada através de enzimas amilolíticas no cloroplasto, sendo a maltose e a glicose os principais produtos da hidrólise do amido (ZIEGLER, 1991). A maltose, então produzida pela β -amilase é transportada do cloroplasto para o citosol através da recém descoberta proteína MEX1. Estudos em *Arabidopsis*, indicaram que a proteína MEX1 é a principal via de transporte pela qual os produtos da degradação do amido são exportados do cloroplasto para o citosol durante a noite, sendo sua função específica exportar a maltose proveniente do cloroplasto (NIITTYLA *et al.*, 2004). A distribuição da proteína transcrita MEX1 foi verificada em partes fotossintéticas e não fotossintéticas da *Arabidopsis*, indicando a ocorrência de maltose exportada de plastídeos. (NIITTYLA *et al.*, 2004).

Já se sabe que a banana possui organelas não-fotossintéticas, os amiloplastos, onde o amido é armazenado e, possivelmente, degradado através da ação conjunta de hidrolases e fosforilases. A β -amilase parece ser importante na degradação do amido da banana, já que tem sua atividade bastante aumentada por ocasião da degradação do amido (PURGATTO *et al.*, 2001, BASSINELLO *et al.*, 2002, NASCIMENTO *et al.*, 2005). Além disso, tudo indica que a sua expressão é controlada pelo etileno, ou por produtos da sua ação (PURGATTO *et al.*, 2001; ROSSETTO *et al.*, 2003, NASCIMENTO *et al.*, 2005). O produto da ação da β -amilase é a maltose, que normalmente não é detectada nas análises de açúcares solúveis da banana madura, provavelmente em consequência da sua pronta utilização como substrato por outras enzimas como a maltose-fosforilase, as α -1,4 glicosidases e a disproportionating enzyme (DPE do tipo II).

A Figura 7 mostra que a quantidade relativa de maltose, é relativamente maior na amostra controle zero do que na amostra controle 15 dpc e que as amostras tratadas com etileno possuem quantidades relativas muito maiores que a controle

zero. Uma possível explicação seria que as enzimas que metabolizam a maltose poderiam não ser controladas pelo etileno ou seus metabólitos, por isso acumulam relativamente mais maltose do que a controle 15 dpc. Outra possível explicação seria que as enzimas que metabolizam a maltose não conseguiram consumir a grande demanda, ou melhor, o grande fluxo de maltose, formado nas amostras tratadas por etileno.

Além do estudo mais apurado dos resultados aqui obtidos, existe a necessidade de analisar frutos tratados e controle que possuam a mesma quantidade de amido para equalizar o estado de maturação, tornando possível a obtenção de resultados mais esclarecedores quanto à possível influência do etileno na produção de metabólitos associados ao amadurecimento da banana. Além disso, uma análise cuidadosa, com recursos de bioinformática, associando metabólitos e expressão/atividade de enzimas ligadas ao processo de degradação do amido, validem os resultados desta análise metabolômica da banana e tornem possível conclusões acerca da importância de alguns dos metabólitos detectados por esta técnica, neste trabalho. Também, trabalhos futuros, como a identificação de açúcares fosforilados, por exemplo, são necessários para um melhor entendimento do metabolismo geral dos frutos de banana e das vias metabólicas, que precisam da demanda destes compostos durante o amadurecimento do fruto.

Outra consideração a ser feita é que além do estudo, as quantificações dos metabólitos de interesse, os quais apresentaram variação significativa durante o amadurecimento, podem fornecer dados importantes para os eventos do amadurecimento dos frutos.

7. CONCLUSÕES

A metodologia para análise de metabólitos foi estabelecida satisfatoriamente, de acordo com os resultados obtidos. Com esta metodologia foi possível obter um perfil de metabólitos para cada fase de amadurecimento do fruto, que foram diferenciados quanto aos frutos tratados com etileno. A análise quantitativa de alguns dos metabólitos obtidos, vai permitir a comparação de metabólitos importantes para o amadurecimento.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABELES, F.B.; MORGAN, P.W. & SALTVEIT, M.E. **Ethylene in Plant Biology**, Ed. Academic Press , p. 182-221, 1992

ALEXANDER, L., GRIERSON, D. Ethylene biosynthesis and action in tomato: a model for climacteric fruit ripening. **Journal of Experimental botany**, v. 53, n.377, p.2039-2054, 2002.

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

ARRIGONI, O.; TULLIO, C.M. The role of ascorbic acid in cell metabolism: between gene-directed functions and unpredictable chemical reactions **Journal Plant Physiol.** v.157, p.481-488, 2000.

BALDWIN, E.A, SCOTT, J.W, SHEWMAKER, C.K, SCHUCH, W. Flavour trivia and tomato aroma: biochemistry and possible mechanism for control of important aroma components **Hort Science**, v.35, p.1013-1022, 2000.

BARRY, C.S., LLOP-TOUS, M.I., GRIERSON, D. The regulation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase gene expression during the transition from System-1 to System-2 ethylene synthesis in tomato. **Plant Physiology**, Rockville, v.123, n.3, p.979-986, 2000.

BASSINELLO, P.Z.; CORDENUNSI, B.R.; LAJOLO, F.M. Amylolytic activity in fruits: comparison of different substrates and methods using banana as model **J. Agric. Food Chem.**, v.50, n.21, p. 5781-5786, 2002.

BEAUDRY, R.M.; SEVERSON, R.F.; BLACK, C.C.; KAYS, S.J. Banana ripening: implications of changes in glycolytic intermediate concentrations, glycolytic and gluconeogenic carbon flux, and fructose 2,6-bisphosphate concentration **Plant Physiol.** v.91, p.1426-1444, 1989.

BIALE, J.B.; YOUNG, R.E. in: **Respiration and Ripening in Fruits – Retrospect and Prospect**, FRIEND, J.; RHODES, M.J.C – Recent Advances in the Biochemistry of Fruit and Vegetables, Academic Press, p. 13-23, 1981.

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. **J. Agric. Food Chem.**, v.52, p.7412-7418, 2004.

BINO, J. R .; HALL, D. R.; FIEHN, O.; KOPKA, J.; SAITO, K.; DRAPER, J.; NIKOLAU, J.B.; MENDES, P.; ROESSNER, T.U.; BEALE, H.M.; TRETHEWEY, N.R.; LANGE, M.B.; WURTELE, S.E.; SUMNER, W.L. Potencial of metabolomics as a functional genomics tool. **Trends in Plant Science**, v.9, n.9, p.418-425, 2004.

BRAMLEY, PM. Regulation of carotenoid formation during tomato fruit ripening and development **Journal of Experimental Botany**, v. 53, p. 2107-2113, 2002.

BREARLY, C.A; HANK, D.E Metabolic evidence for the order of addition of individual phosphate esters to the *myo*-inositol moiety of inositol hexaphosphate in the duckweed *Spirodela polyrhiza* **Biochem. J.** , v.314, p.227-233, 1996.

BROOKFIELD, P.L.; HUGHES, J.G.; WATKINS, C.B. Fruit maturity and quality of selectively picked royal Gala apples **New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science**, v.21, n.2, p.183-187, 1993.

BURG, S. P.; BURG, E. A . Role of ethylene in fruit ripening **Plant. Physiol.** , v. 37, p. 179, 1962.

CHANG, C.; STEWART RC. The two-component system: regulation of diverse signaling pathways in prokaryotes and eukaryotes **Plant Physiol.** , v. 117, p. 723-731, 1998.

CLARK, KL.; LARSEN, PB.; WANG, XX.; CHANG, C. Association of the Arabidopsis CTR1 Raf-like kinase with the ETR1 and ERS ethylene receptors **Proceedings of the National Academy of Sciences, USA**, v. 95, p. 5401-5406, 1998.

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

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

CORDENUNSI, B.R. **Aspectos químicos, bioquímicos e ultraestruturais do grânulo de amido durante o amadurecimento da banana.** São Paulo, 2005, 130p. (Tese de Livre-Docência –Faculdade de Ciências Farmacêuticas –USP).

COTÉ, G.G.; CRAIN, R.C. Biochemistry of phosphoinositides **Annu. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol.**, v. 44, p.333-356, 1998.

D'INNOZENZO, M. **Evolução da atividade e expressão de enzimas e modificação de polímeros da parede celular de mamões durante o amadurecimento.** São Paulo, 2001, 119p. (Tese de Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP).

FERNIE, R. A.; CARRARI, F.; SWEETLOVE, J. L. Respiratory metabolism : glycolysis, the TCA cycle and mitochondrial electron transport **Current Opinion in Plant Biol.** , v. 7, p. 254-261, 2004.

FIEHN, O. Metabolomics - the link between genotypes and phenotypes **Plant Mol. Biol.**, v. 48, p.155-171, 2002.

FIEHN, O.; KOPKA, J.; DORMANN, P.; ALTMANN, T.; TRETHEWEY, N.R.; WILLMITZER, L. Metabolite profiling for plant functional genomics **Nature Biotechnology**, v. 18, p. 1157-1161, 2000.

FIEHN, O.; WECKWERTH, W. Deciphering metabolic networks **Eur. J. Biochem.**, v.210, p. 579-588, 2003.

FRENZEL, TH.; MILLER, A. ENGEL, K.-H. Metabolic profiling – Fractionation Method for Analysis of Major and Minor Compounds in Rice Grains **Cereal Chemistry**, v.79, p. 215-221, 2002.

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

GARDNER, H.W Biological roles and biochemistry of the lipoxygenase pathway **Hort Science**, v.30, p. 197-205, 1995.

GERMAN, J.B., ROBERTS M.A., WATKINS, S.M. Personal metabolomics as a next generation nutritional assessment **The American Society for Nutritional Sciences J. Nutr.** , v.133, p. 4260-4266, 2003.

GIOVANNONI, J. Molecular biology of fruit maturation and ripening **Annual Review of Plant Physiology**, v. 52, p.725-749, 2001.

HALL, R., BEALE, M., FIEHN, O., HARDY, N., SUMNER, L., BINO, R. The missing link in functional genomics strategies **The Plant Cell**, v. 14, p. 1437-1440, 2002.

HILL, A.S., AP REES, T. Fluxes of carbohydrate metabolism in ripening bananas **Planta**, v.192, p.52-60, 1994.

HILL, A.S., AP REES, T. The effect of glucose on the control of carbohydrate metabolism in ripening bananas. **Planta**, v.196, p.335-334, 1995a.

HILL, A.S., AP REES, T. The effect of hypoxia on the control of carbohydrate metabolism in ripening bananas. **Planta**, v.197, p.313-323, 1995b.

JACKMAN, R.L, STANLEY, D.W Perspectives in the textural evaluation of plant foods **Trends Food Sci. Technol.**, v.6, p.187-194, 1995.

KATONA, Z. F.; SASS, P.; MOLNÁR-PERL, I. Simultaneous determination of sugars, sugar alcohols, acids and amino acids in apricots by gas chromatography-mass spectrometry **Journal of Chromatogr.** , v. 847, p. 91-102, 1999.

KE, D.; MATEOS, M.; SIRIPHANICH, J.; LI, C.; KADER, A. A. Carbon dioxide action on metabolism of organic and amino acids in crisphead lettuce **Postharvest Biol. Technol.**, v. 3. , p. 235-247, 1993.

KENDE, H. Ethylene biosynthesis **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.** v. 44, p. 283-307, 1993.

KLEE, HJ. Control of ethylene-mediated processes in tomato at the level of receptors
Journal of Experimental Botany, v.53, p. 2057-2063, 2002.

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

KONISHI, Y.; KITASATO, S.; NAKATANI, N. Partial purification and characterization
of acid and neutral alpha-glucosidases from preclimateric banana pulp tissues.
Biosci. Biotechnol. Biochem., v.56, n.12, p.2046-2051, 1992.

LAINE, R.A.; HSIEH, T.C.-Y Inositol-containing sphingolipids **Methods Enzymol.**
v. 138, p. 186-195, 1987.

LELIÈVRE, J.M.; LATCHÉ, A.; JONES, B.; BOUZAYEN, M.; PECH, J.C. Ethylene
and fruit ripening. **Plant Physiol.** , v. 101, p. 727-739, 1997.

LIU, X.; SHIOMI S.; NAKATSUKA A. ; KUBO Y.; NAKAMURA R.; INABA A.
Characterization of ethylene biosynthesis associated with ripening in banana fruit
Plant Physiol. v. 121, p. 1257-1265, 1999.

LIU, S.; YANG, Y.; MURAYAMA, H.; TAIRA, S.; FUKUSHIMA, T. Changes of NADP
linked isocitrate dehydrogenase activity during postharvest ripening in banana fruit
Journal Japanese Society Hort. Sci. , v. 72, p. 352-356, 2003.

LIU, S.; YANG, Y.; MURAYAMA, H.; TAIRA, S.; FUKUSHIMA, T. Effects of CO₂ on respiratory metabolism in ripening banana fruit **Postharvest Biology and Techn.** v. 33, p.27-34, 2004.

LOEWUS, F.A.; LOEWUS, M.W. myo-Inositol: Its biosynthesis and metabolism **Annu. Rev. Plant Physiol.**, v.34, p. 137-161, 1983.

LOEWUS, F.A.; MURTHY, P.P.N. Myo-Inositol metabolism in plants **Plant Science**, v.150, p.1-19, 2000.

LOHANI, S ; TRIVERDI, K.P. ; NATH, P. Changes in activities of cell wall hydrolases during ethylene-induced ripening in banana: effect of 1-MCP, ABA and IAA **Postharvest Biology and Technology**, v. 31, p. 119-126, 2004.

LOIS, LM.; RODRIGUEZ-CONCEPCION, M.; GALLEG0, F.; CAMPOS, N.; BORONAT, A. Carotenoid biosynthesis during tomato fruit development : regulatory role of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase **The Plant Journal**, v.22, p. 503-513, 2000.

LORENCE, A.; CHEVONE, B.I.; MENDES, P.; NESSLER, C.L. Myo-Inositol Oxygenase offers a possible entry point into plant ascorbic biosynthesis **Plant Physiology**, v.134, p.1200-1205, 2004.

MORRÉ, D.J.; BOSS, W.F.; LOEWUS, F.A. (Eds.), Inositol metabolism in plants **Wiley-Liss**, 393 p, New York, 1990.

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

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

MOTA, R.V.; CORDENUNSI, B.R.; NASCIMENTO, J.R.O.; PURGATTO, E.; ROSSETTO, M.R.M.; LAJOLO, F.M. Activity and expression of banana starch phosphorylases during fruit development and ripening **Planta**, v.216, p.325-333, 2002.

MATTOO, A.K. & SUTTLE, C. **The Plant Hormone Ethylene**, Ed. CRC Press, p.21-42, 1991.

MCMURCHIE, E.J., MCGLASSON, W.B., EAKS, I.L. Treatment of fruit with propylene gives information about biogenesis of ethylene. **Nature**, London, v.237, n. 5352, p. 235-236, 1972.

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

NASCIMENTO, J.R.O.; CORDENUNSI, B.R. ; LAJOLO, F.M. Sucrose synthase activity and expression during development and ripening in bananas **J. Plant Physiol.**, v.156, n.5-6, p.605-611, 2000.

NASCIMENTO, J.R.O; VIEIRA JÚNIOR, A.; BASSINELO, P.Z.; CORDENUNSI, B.R.; MAINARDI, J.A.; PURGATTO, E.; LAJOLO, F.M. Effect of ethylene and 1-methylcyclopropene on banana β -amylase expression and starch degradation during fruit ripening (**em publicação no Postharvest Biology and Technology**).

NIITTYLA, T.; MESSERLI, G.; TREVISAN, M.; CHEN, J.; SMITH, A.M.; ZEEMAN, S.C. A previously unknown maltose transporter essential for starch degradation in leaves **Science**, v.303, p.87-89, 2004.

OBENDORF, R.L. Oligosaccharides and galactosyl cyclitols in seed desiccation (review update) **Seed Sci. Res.**, v.7, p. 63-74, 1997.

PAYASI, A.; SANWAL, G.G. Pectate lyase activity during ripening of banana fruit **Phytochemistry**, v. 63, p. 243-248, 2003.

PETERBAUER, T.; RICHTER, A. Galactosylononitol and stachyose synthesis in seeds of Adzuki bean **Plant Physiol.** , v.117, p.165-172, 1998.

PICHERSKY, E.; GANG, D. Genetics and biochemistry of secondary metabolites : na evolutionary perspective **Trends Plant Sci.**, v. 5, p. 439-445, 2000.

PRABHA, T.N.; BHAGYALAKSHMI, N. Carbohydrate metabolism in ripening banana fruit **Phytochemistry**, v. 48, p. 915-919, 1998.

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

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

RAAMSDONK, L.M., TEUSINK, B., BROADHURST, D., ZHANG, N., HAYES, A., WALSH, M.C., BERDEN, J.A., BRINDLE, K.M., KELL, D.B., ROWLAND, J.J A functional genomics strategy that uses metabolome data to reveal the phenotype of silent mutations **Nat. Biotechnol.**, v.19, p. 45-50, 2001.

ROESSNER, U.; WAGNER, C.; KOPKA, J.; TRETHEWEY, N.R.; WILLMITZER, L. Simultaneous analysis of metabolites in potato tuber by gas chromatography-mass spectrometry **The Plant Journal**, v. 23, p.131-142, 2000.

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

SEYMOUR, G. B.; TAYLOR, J. E.; TUCKER, G. A. **Biochemistry of Fruit Ripening**, Ed. Chapman e Hall, 454 p., 1993.

SEYMOUR, G. B.; MANNING K.; ERIKSSON, E.M.; POPOVICH, .A. H.; KING, G.J. Genetic identification and genomic organization of factors affecting fruit texture **Journal of Experimental Botany**, v. 53, n. 377, p. 2065-2071, 2002.

STITT, M.; FERNIE, A. R. From measurement of metabolites to metabolomics an “on the fly” perspective illustrated by recent studies of carbon-nitrogen interactions **Curr. Opin. Biotechnol.**, v. 14, p. 136-144, 2003.

THOMAS, P., JANAVE, M.T Effect of temperature on chlorophyllase activity, chlorophyll degradation and carotenoids of Cavendish bananas during ripening **Int. J. Food Sci. Technol.**, v.27, p. 57-63, 1992.

TOLSTIKOV, V.V.; FIEHN, O. Analysis of highly polar compounds of plant origin: combination of hydrophilic interaction chromatography and eletrospray ion mass trap spectrometry **Anal. Biochem.** , v. 301, p. 298-307, 2002.

TRIVERDI, K.P. ; NATH, P. *MaExp1*, an ethylene-induced expansin from ripening banana fruit **Plant Science**, v.167, p.1351-1358, 2004.

TUCKER, G. A., Introduction. In: Seymour, G.B.; Taylor, J.E.; Tucker, G. A. **Biochemistry of Fruit Ripening**, Ed. Chapman & Hall, London, p. 1-51, 1996.

VALPUESTA, V.; BOTELLA, M.A. Biosynthesis of L-ascorbic acid in plants: new pathways for an old antioxidant **Plant Scienc**, v.9, n.12, p.1360-1385, 2004.

VICKERY, L. M.; VICKERY, B. **Secondary plant metabolism**, Ed. The Macmillan Press, London e Basingstoke, 335p., 1981.

VIEIRA JÚNIOR, A. **Seqüência e caracterização molecular do cDNA de uma α -amilase expressa durante o amadurecimento da banana (*Musa spp.*)**. São Paulo, 2001. 88p. (Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP).

YANG, Y.; MURAYAMA, H.; FUKUSHIMA, T. Activation of glyoxylate cycle enzymes in cucumber fruit exposed to CO₂ **Plant Cell Physiol.** , v.39, p.533-539, 1998.

YE, X. ; AL-BABILI, S.; KLOTI, A.; ZHANG, J.; LUCCA,P.; BEYER, P.; POTRYKUS, I. Engineering provitamin A (β -caroteno) biosynthesis pathway into (carotenoid free) rice endosperm **Science**, v.287, p. 303-305, 2000.

WADE, N.L.; SATYAN, S.H. Increase in low molecular size uronic acid in ripening banana fruit **Journal Science Food Agric.**, v. 63, p. 257-259, 1993.

WATSON, R.; WRIGHT, C.J.; MCBURNEY, T.; TAYLOR, A.J.; LINFORTH, RST. Influence of harvest date and light integral on the development of strawberry flavour compounds **Journal of Experimental Botany**, v. 53, p. 2121-2129, 2002.

WECKWERTH, W. Metabolomics in systems biology **Ann. Rev. Plant. Biol.**, v. 54, p.669-689, 2003.

WECKWERTH, W., LOUREIRO, M.E., WENZEL, K., FIEHN, O. Differential metabolic networks unravel the effects of silent plant phenotypes **PNAS**, v.101, n. 20, p. 7809-7814, 2004.

WEISE, S.E.; KIM, K.S.; STEWART, R.P., SHARKEY, T.D. β -Maltose is the metabolically active anomer of maltose during transitory starch degradation **Plant Physiology**, v.137, p.756-761, 2005.

WHITE, P. J. Recent advances in fruit development and ripening: an overview. **Journal of Experimental Botany**, v.53, p. 1995-2000, 2002.

ZIEGLER, P. in **Recent advances in phloem transport and assimilate compartmentation** (Bonnemain, J.L., Delrot, S., Lucas, W.J. and Dainty, J., eds.), p.196-203, Quest Editions Presses Académiques, Nantes Cedex, 1991.