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

Avaliação comparativa de características estruturais do amido e enzimas
relacionadas à sua degradação em cultivares de banana com padrão
distinto do modelo representado pela cultivar Nanicão

Claudinéia Aparecida Soares

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientadora

Profa. Associada Beatriz Rosana Cordenunsi

São Paulo

2009

19849

DEDALUS - ACERVO - CQ

30100016526

Ficha Catalográfica

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

Soares, Claudinéia Aparecida

S676a   Avaliação comparativa de características estruturais do amido
e enzimas relacionadas à sua degradação em cultivares de banana
com padrão distinto do modelo representado pela cultivar
nanica / Claudinéia Aparecida Soares. -- São Paulo, 2009.
108p.

947
Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da
Universidade de São Paulo. Departamento de Alimentos e Nutrição
Experimental

Orientador: Cordenunsi, Beatriz Rosana

1. Banana : Bioquímica dos alimentos 2. Enzima : Atividade :
Bioquímica 3. Microscopia I. T. II. Cordenunsi, Beatriz Rosana,
orientador.

641.3477   CDD

Claudinéia Aparecida Soares

Avaliação comparativa de características estruturais do amido e enzimas
relacionadas à sua degradação em cultivares de banana com padrão
distinto do modelo representado pela cultivar Nanicão

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Profa. Associada Beatriz Rosana Cordenunsi
orientador/presidente

1º. examinador

2º. examinador

3º. examinador

4º. examinador

São Paulo, 05, 08 de 2009.

“Feliz o homem que encontra a sabedoria e adquire conhecimento.”
(Provérbios 3: 13-15)

A minha família;
Aos meus amigos.
Muito obrigada.

AGRADECIMENTOS

A minha mãe e minha madrinha pelo o incentivo e apoio em todos os momentos.

A profa. Associada Beatriz Rosana Cordenunsi pela confiança depositada em mim para o desenvolvimento deste trabalho, pela orientação, apoio e principalmente pela amizade.

Ao prof. Dr. Eduardo Purgatto pelas discussões que contribuíram para o enriquecimento deste trabalho.

Ao prof. Dr. João Roberto Oliveira do Nascimento pelo apoio.

Ao Prof. Franco Maria Lajolo pela oportunidade concedida de participar da sua equipe de trabalho.

As minhas amigas Fernanda Helena Gonçalves Peroni Okita, Roberta Ghedini Der Agopian, Claudia Mitsue Koike, Patricia Hasegawa Gushiken, Silvia Nogueira Bezerra, Talita Pimenta e Renata Shitakubo, muito obrigada pela amizade que vai além dos espaços da universidade.

As Técnicas Márcia Moraes, Lúcia Helena Justino e Tânia Shiga pela amizade e ajuda concedida durante estes anos.

A Mônica, Edilson e Cléo, da secretaria do departamento de Alimentos e Nutrição pela ajuda concedida durante estes anos. Ao Jorge Lima e Elaine, da secretaria de pós- graduação pelo apoio e auxílio.

Aos que aqui se encontram: Any Elisa, Marcela, Kátia, Milana, Juliana, Nelaine, Eliana, Alexandra, Helena, Aline, Alexandre, Tatiana, Florence, Lorenzo; e aos que já foram: Ana Cris, Janaína, Denise, Márcia, Adriana, muito obrigada.

Aos pós-doutorandos Amanda, João Paulo e Neuza, muito obrigada.

Aos integrantes do grupo de jovens da Sukyo Mahikari pelo incentivo e apoio.

Ao Prof. Dr. Ricardo Pereira Louro do CCS - UFRJ e a Profa. Dra. Renata Antoun Simão da COPE - UFRJ pelo apoio e permissão concedida, de ambos, para realização de parte deste trabalho em seus laboratórios.

A Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo pelo suporte financeiro para a realização deste trabalho.

Enfim, a todos muito obrigada, pela realização deste trabalho cujos méritos não são só meus, mas de todos.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Amadurecimento da Banana	2
1.2	A estrutura do Grânulo de Amido	5
1.3	Amido de banana	11
1.4	Degradação do amido	13
1.5	Hidrolases	15
1.6	Enzimas desramificadoras	18
1.7	Amido-fosforilase	19
1.8	Outras enzimas envolvidas na degradação de amido	20
2	OBJETIVO	23
3	MATERIAL E MÉTODOS	24
3.1	Material	24
3.2	Métodos	26
3.2.1	Medidas de etileno e CO ₂	26
3.2.2	Carboidratos	27
3.2.3	Determinação de atividade das enzimas	28
3.2.4	Isolamento dos grânulos de amido	30
3.3	Eletroforese em condições não-desnaturantes (PAGE nativo)	30
3.3.1	Extração das proteínas do grânulo para atividade em gel de poliacrilamida	31
3.3.2	Determinação dos teores de amilose e amilopectina do amido isolado	32
3.3.3	Determinação da distribuição de tamanho da cadeia da amilopectina	33
3.3.4	Caracterização do grânulo de amido por técnicas microscópicas	34
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
4.1	Etileno e CO ₂	36
4.2	Amido e Açúcares Solúveis	39
4.3	Atividade das amido-fosforilases no sentido de síntese de amido	45
4.4	Atividade das α -amilase e β -amilase solúveis	47
4.5	Atividade de α e β -amilases ligadas ao grânulo de amido	51
4.6	Estrutura do grânulo	55
4.6.1	– Amilose	55
4.6.2	– Amilopectina x cristalinidade	59

4.7	Caracterização microscópica da superfície dos grânulos de amido.....	67
4.7.1	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	67
4.7.2	Microscopia de Força Atômica.....	73
5	CONCLUSÕES	83
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	84

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Resumo dos principais dados de classificação das cultivares estudadas neste trabalho.....	25
Tabela 2. Máxima produção de etileno e CO ₂ das cultivares de banana.....	38
Tabela 3. Teores de amido e de sacarose acumulados nos estágios 1 e 3 e percentual de degradação do amido das cultivares.	41
Tabela 4. Comparação e percentual de degradação entre o método enzimático e químico utilizados na determinação de amido nas cultivares de banana	43
Tabela 5. Teores de amilose e amilopectina obtidos nas cultivares nos estágio verde e maduro.	56
Tabela 6. Teores de amilose (%) obtidos em amido isolado e fracionado das cultivares Terra, Figo e Nanicao nos estágio verde e maduro.	58
Tabela 7. Grau de cristalinidade e proporção de polimorfos (A e B) presentes nas cultivares nos estágios 1 e 3.	60
Tabela 8. Porcentagem de distribuição das frações de cadeia da amilopectina nos dois estágios de amadurecimento.	66

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Frações das moléculas de amilose (A) e amilopectina (B) destacando as ligações α 1,4 e α 1,6.....	7
Figura 2. Representação esquemática de uma secção da molécula de amilopectina indicando a cadeia redutora (C) e o perfil de ramificação das cadeias α -1,4 (A, B1-B2) unidas por ligação α -1,6. Adaptado de Tester et al., 2004.	8
Figura 3. Esquema de representação dos níveis de organização do grânulo de amido, envolvendo amilose e amilopectina. Adaptado de Buléon et al., 1998.....	10
Figura 4. Modelo proposto para degradação de amido transitório (folhas de <i>Arabidopsis</i>). Adaptado de SMITH et al., 2005. GWD- <i>Glucan Water Dikinase</i> ; PWD- <i>Phosphoglucan water dikinase</i>	14
Figura 5. Perfis de produção de CO ₂ (■) e etileno (□) das cultivares durante o amadurecimento. Símbolos representam a média (n=5) de estimativas e as barras o erro padrão. A seta pontilhada indica o pico de etileno e a seta continua o máximo de respiração. Os grupos genômicos das cultivares são: Nanicão (AAA), Terra (AAB), Mysore (AAB), Pacovan (AAB) e Figo (ABB). A figura da cultivar Nanicão foi adaptada de Peroni (2007).	37
Figura 6. Perfis de (■) degradação do amido e de (○) acúmulo de açúcares solúveis nas cultivares durante o amadurecimento. As linhas representam à média (n=3) de determinações e as barras o erro padrão. Os grupos genômicos das cultivares são: Nanicão (AAA), Terra (AAB), Mysore (AAB), Pacovan (AAB) e Figo (ABB). A figura da cultivar Nanicão foi adaptada de Peroni (2007).	40
Figura 7. Degradação de amido das cultivares Terra (AAB) e Figo (ABB) utilizando o método químico (coluna cinza) e enzimático (coluna branca) durante o amadurecimento. As colunas representam à média (n=3) e as barras o erro padrão.	42
Figura 8. Acúmulo de glicose (■), frutose (○) e sacarose (▲) das cultivares durante o amadurecimento. Os símbolos representam à média (n=3) e as barras o erro padrão. Os grupos genômicos das cultivares são: Nanicão (AAA), Terra (AAB), Mysore (AAB), Pacovan (AAB) e Figo (ABB).....	44
Figura 9. Atividade das amido-fosforilases obtidas por PAGE-nativo contendo glicogênio (6%) após 1h de incubação em tampão citrato-NaOH 100mM a 37°C os	

géis foram corado com solução aquosa de iodeto. Os números indica os DPC (dias pós colheita) em que se realizaram os ensaios. Os grupos genômicos das cultivares são: Nanicão (AAA), Terra (AAB), Mysore (AAB), Pacovan (AAB) e Figo (ABB). 46

Figura 10. Perfis de acúmulo de maltose durante o amadurecimento das cultivares. Na cultivar Mysore (AAB) não foi detectada maltose. As colunas representam à média (n=3) e as barras o erro padrão. Os grupos genômicos das cultivares são: Nanicão (AAA), Terra (AAB), Pacovan (AAB) e Figo (ABB). 50

Figura 11. Atividade hidrolítica total associada ao grânulo de amido obtida por eletroforese em condições não-desnaturantes em gel de acrilamida (7,5%), contendo 0,1% de amilopectina. Em (A) o perfil da cultivar Nanicão(AAA) adaptado de Peroni (2007). Em (B) perfis das cultivares Terra (AAB), Figo (ABB), Pacovan (AAB) e Mysore (AAB). Em (C) perfil da Cultivar Mysore(AAB). Em (A) e (B) as bandas foram reveladas após a coloração com solução de iodo. O gel foi incubado *overnight* em tampão Tris-HCl 100 mM, pH 7,0, contendo MgCl₂ 1 mM, DTT 1 mM e CaCl₂ 1 mM a 20°C. Em (C) o tempo de incubação foi reduzido (3h) para uma melhor visualização das bandas, as demais condições foram mantidas de acordo com o descrito acima. Os números correspondem aos DPC analisados. 51

Figura 12. Atividade de α e β -amilases associada ao grânulo de amido diferentes estágios do amadurecimento das cultivares. DPC (dias pós colheita). As colunas representam à média (n=3) e a barra o erro padrão. Os grupos genômicos das cultivares são: Nanicão (AAA), Terra (AAB), Mysore (AAB), Pacovan (AAB) e Figo (ABB). Os DPC analisados, em todas cultivares, correspondem aos estágios 1, 2 e 3, respectivamente. 53

Figura 13. Distribuição de tamanho da cadeia de amilopectina nas cultivares de banana nos estágios 1 e 3. DPC (dias pós-colheita). Os números representam os DPC correspondentes aos estágios analisados. Os grupos genômicos das cultivares são: Nanicão (AAA), Terra (AAB), Mysore (AAB), Pacovan (AAB) e Figo (ABB). DP (Grau de Polimerização). 63

Figura 14. Diferenças na distribuição de tamanho da cadeia de amilopectina nas cultivares de banana. A diferença foi calculada subtraindo os valores de distribuição de tamanho de cadeia entre os estágios 1 e 3. Os grupos genômicos das cultivares são: Nanicão (AAA), Terra (AAB), Mysore (AAB), Pacovan (AAB) e Figo (ABB). DP (grau de Polimerização). 64

Figura 15. Micrografias por microscopia eletrônica de varredura da superfície do grânulo de amido das cultivares no estágio 1. De A-F têm-se uma visão geral da distribuição dos grânulos e de G-H detalhes da superfície dos grânulos. Os números indicam os DPC correspondentes ao estágio 1. DPC (dias pós-colheita). Grupos genômicos das cultivares são: Nanicão (AAA), Terra (AAB), Mysore (AAB), Pacovan (AAB) e Figo (ABB). 70

Figura 16. Micrografias da superfície do grânulo de amido das cultivares no estágio 3.. De A-E têm-se uma visão geral da distribuição dos grânulos. De F-L detalhes do perfil de degradação visualizado nos grânulos de amido das cultivares. Os números indicam os DPC correspondentes ao estágio 3. DPC (dias pós-colheita). Grupos genômicos das cultivares são: Nanicão (AAA), Terra (AAB), Mysore (AAB), Pacovan (AAB) e Figo (ABB). 71

Figura 17. Micrografias da superfície do grânulo de amido das cultivares no estágio 3 destacando-se os a exposição dos anéis de crescimentos. Os números indicam os DPC correspondentes ao estágio 3. Grupos genômicos das cultivares são: Nanicão (AAA), Terra (AAB), Mysore (AAB), Pacovan (AAB) e Figo (ABB). 72

Figura 18. Imagens de MFA obtidas por modo não contanto mostrando a superfície de grânulo de amido das cultivares no estágio 1. Em (A) imagens de contraste de fase em (B) imagens topográficas. Parâmetros das imagens. Nanicão (AAA): varredura de 5,0 μm x 5,0 μm e variação de 396,7 nm altura de; Figo (ABB): varredura 4,2 μm x 4,2 μm e variação de altura de 352,4 nm; Terra (AAB): varredura de 3,0 μm x 3,0 μm e variação de altura 369,5 nm. Os DPC correspondentes ao estágio 1 são: 0 para a Nanicão, 2 para Terra e 2 para Figo. 75

Figura 19. Imagens de MFA obtidas por modo não-contato mostrando a superfície de grânulo de amido das cultivares Nanicão, Figo e Terra no estágio 3. Em (A) imagens de contraste de fase em (B) imagens topográficas. Parâmetros das imagens. Nanicão (AAA): varredura de 5,0 μm x 5,0 μm e a diferença de cor indica uma variação de 1,5 μm de altura; Figo (ABB): varredura 5,3 μm x 5,3 μm e a diferença de cor indica uma variação de altura de 593,4 nm; Terra (AAB): varredura de 6,0 μm x 6,0 e a diferença de cor indica uma variação 413,4 nm de altura. Os DPC correspondentes ao estágio 3 são: 21 para a Nanicão, 10 para Terra e 14 para Figo. 77

Figura 20. Imagens de MFA obtidas por modo não-contato mostrando detalhes da superfície de grânulo de amido das cultivares Nanicão, Figo e Terra no estágio 3. Há

exposição de estruturas globulares e uniformes por toda a superfície. Parâmetros da varredura. Nanicao (AAA): varredura de 2,6 μm x 2,6 μm e a diferença de cor indica mudança na rigidez do material; Figo (ABB): varredura 2,8 μm x 2,8 μm e a diferença de cor indica mudança na rigidez do material; Terra (AAB): varredura de 2,0 μm x 2,0 e a diferença de cor indica mudança na rigidez do material. Os DPC correspondentes ao estágio 3 são: 21 para a Nanicao, 10 para Terra e 14 para Figo.

..... 78

Figura 21. Imagens de MFA obtidas por modo não-contato mostrando detalhes da superfície de grânulo de amido da cultivar Terra. Em (A) há exposição de estruturas semelhantes aos anéis de crescimento. Em (B) histograma onde pode ser visto o comprimento e altura dos anéis de crescimento e a sua regularidade. Terra (AAB): varredura de 6,0 μm x 6,0 μm e a diferença de cor indica mudança na rigidez do material. Análise realizada no estágio 3 e o correspondente ao 10 DPC..... 80

Figura 22. Imagens de MFA obtidas por modo não-contato mostrando detalhes da superfície de grânulo de amido das cultivares Nanicao e Figo. Estruturas alongadas com diferentes tamanhos podem observadas. Nanicao (AAA): varredura de 8,0 μm x 8,0 μm e a diferença de cor indica mudança na rigidez do material; Figo (ABB): varredura 10 μm x 10 μm e a diferença de cor indica mudança na rigidez do material; Terra (AAB): varredura de 2,0 μm x 2,0 μm e a diferença de cor indica mudança na rigidez do material. Análise realizada no estágio 3 e os correspondentes são: 21 para Nanicao e 14 para Figo. 81

Figura 23. Esquema proposto para o mecanismo de degradação de amido em bananas. DPE. (Transglicosidade). Glicose-1P(Glicose 1-Fosfato). A linha tracejada indica a parte da via de degradação que possivelmente ocorre e, a linha continua indica a parte da via de degradação conhecida. Em vermelho- possíveis produtos, principais, da degradação de amido. Em negrito- enzimas com atividade já mensurada em bananas. Os círculos tracejados representam os transportadores responsáveis pela passagem dos produtos de degradação para o citosol. 82

LISTA DE ABREVIATURAS

ABTS	2,2'-azino-di-(3-etilbenzotiazolina)-6-sulfonato
ATP	5'-Trifosfato de adenosina (Adenosine 5'-triphosphate)
B.O.D.	Demanda bioquímica de oxigênio
BNPG7	p-Nitrofenil-maltoheptaosideo bloqueado (Blocked p-nitrophenyl-maltoheptaoside)
BSA	Albumina de soro bovina
CEAGESP	Central de Entrepósitos e Armazéns Gerais do Estado de São Paulo
ConA	Concanavalin A
DBE	Enzimas desramificadoras (Debranching enzymes)
DPC	Dias pós-colheita
DTT	Ditiotreitol (tio-1,4-dimercapto-2,3-butanodiol)
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético (ethylenediaminetetraacetic acid)
FID	Detector de ionização de chama (Fire ionization detector)
GWD	glicano-água-diquinase (Glucan-Water Dikinase)
HEPES	N-[2-hidroxi-etil]-piperazina-N'-[ácido 2-ethanosulfônico] (N-[2-hydroxyethyl]-piperazine-N'-[2-ethanesulphonic acid])
1-MCP	1-Metil-ciclopropeno
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida (polyacrylamide gel electrophoresis)
PNPG5	p-Nitrofenil-maltopentaosideo bloqueado (Blocked p-nitrophenyl-maltopentaoside)
PVP-40	Polivinilpirrolidona de peso molecular médio de 40.000 g/mol
SBE	Enzimas ramificadoras (starch branching enzymes)
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura (Scanning electron microscopy)

MFA	Microscopia de Força Atômica
SGBSS I	Isoforma I da amido-sintase ligada ao grânulo de amido (Starch granule bound starch synthase isoform 1)
SSS	Amido-sintase solúvel (soluble starch synthases)
TCD	Detector de condutividade térmica (Thermal conductivity detector)
TRIS	(Hidroximetil) aminometano (Hydroxymethylaminomethane)

RESUMO

O acúmulo de açúcares solúveis observados em banana madura é resultado da ação de diversas enzimas que atuam sob o amido acumulado durante o seu desenvolvimento. Este processo pode ocorrer fora da planta e, em um período relativamente curto conhecido como amadurecimento. A rápida mobilização associado à escassez de trabalhos que enfoquem o processo de degradação de amido em órgãos que armazenam amido temporariamente, como bananas, o objetivo desse estudo foi localizar cultivares que se comportem diferente do modelo Nanicão, que é objeto de estudo do laboratório há muito tempo, sendo por isso, a cultivar mais conhecida e estudada. Bananas pertencentes a diferentes grupos genômicos foram selecionadas e analisadas, sendo elas: Nanicão (AAA), Terra (AAB), Mysore (AAB), Pacovan (AAB) e Figo (ABB). Quanto aos parâmetros de amadurecimento analisados, as cultivares Nanicão, Terra e Pacovan tiveram um comportamento climatérico típico. A sacarose foi o açúcar predominante em todas as cultivares seguida pela glicose e frutose que mantiveram uma proporção 1:1. A cultivar Nanicão teve maiores teores de açúcares solúveis seguida pela Figo, Pacovan, Terra e Mysore. Em extrato bruto de banana, os maiores valores de atividade da β -amilase foi verificada nos estágios finais do amadurecimento, enquanto que a da α -amilase foi, praticamente, constante durante o período analisado, com exceção da Figo. Para detectar a presença das amido-fosforilases foi realizado ensaio, em extrato bruto de banana, de eletroforese em condições não-desnaturantes (PAGE-nativo) e, duas bandas com atividade foram visualizadas nas cultivares, com exceção da Mysore. O início do processo de degradação de amido ocorreu anterior a produção autocatalítica de etileno e, as cultivares tiveram diferentes percentuais de degradação de amido, sendo os maiores obtidos na Pacovan seguida pela Mysore, Nanicão, Figo e Terra. Os grânulos de amido das cultivares Terra e Figo mostraram-se resistentes a hidrólise enzimática. Todas as cultivares tiveram atividade de α e β -amilase associadas aos grânulos presentes desde as fases iniciais do amadurecimento. Somente na cultivar Mysore a atividade ligada da α -amilase foi superior ao da β -amilase. O conteúdo de amilose e a distribuição de tamanhos de cadeias da amilopectina não tiveram grandes variações ao longo do amadurecimento. As micrografias revelaram que com o avanço do amadurecimento as superfícies dos grânulos de amido sofrem a exposição de estruturas, os anéis de crescimento, decorrentes da ação de enzimas. As imagens de microscopia de força atômica relevaram a presença de estruturas semelhantes ao modelo dos bloquetes na superfície dos grânulos de amido em banana.

Palavras chave: banana, grânulo de amido, amadurecimento, estrutura.

ABSTRACT

The soluble sugars accumulation in mature banana is consequence of several enzymes action on accumulate starch obtained during its development process. The starch degradation can occur outside the plant in a relatively short time called ripening. Associate at the faster starch mobilization, few works are available focusing this process in organs that store starch temporarily like banana. The aim of this study was identified cultivars that show different pattern of starch degradation when compared with Nanicão model. Bananas of different genomic groups were selected and analyzed, Nanicão (AAA), Terra (AAB), Mysore (AAB), Pacovan (AAB) and Figo (ABB). The Nanicão, Terra and Pacovan cultivars had a typical climacteric behavior. Sucrose was the predominant sugar followed by glucose and fructose that maintained 1:1 ratio, in all cultivars. Nanicão had the higher levels of soluble sugars followed by Figo, Pacovan, Terra and Mysore. The onset of starch degradation seems to be independent of ethylene. The higher activities of β -amylase, in banana pulp, was obtained in the last ripening stages, while α -amylase activities was constant and low at Nanicão and Pacovan. Two bands with activities were visualized in native PAGE which corresponded to cytosolic and plastidial forms of starch-phosphorylases, with exception of Mysore. All cultivars had different perceptual of starch degradation and the higher one was observed at Pacovan, followed by Mysore, Nanicão, Figo and Terra. Starches granules of Terra and Figo showed to be resistant to enzymatic hydrolysis. All cultivars had α and β -amylase activities associated to granule throughout the ripening process. Only Mysore showed α -amylase activity associated to granule higher than β -amylase. No significant change along the ripening was observed in amylose content and amylopectin chain length distribution. The micrographs revealed that granule surface suffer changes along the ripening, exposing structures called growth rings. The Atomic Force Microscopy revealed the presence of blockets at banana granule surface.

Key-words: banana, ripening, structure, starch granule.

1 INTRODUÇÃO

A banana é uma das frutas mais consumidas no Brasil, com média de anual de aproximadamente 7 kg/habitante (POF, 2002-2003). O preço acessível e a sua fácil disponibilidade são fatores determinantes para o consumo nas diferentes camadas sociais da população. No mercado internacional destacam-se as cultivares do subgrupo Cavendish (SEYMOUR, TAYLOR e TUCKER, 1993). No mercado nacional a cultivar mais consumida é a banana prata (subgrupo prata) com aproximadamente 2,75 kg/habitante/ano (POF, 2002-2003).

Quando verde, a banana é rica em amido, que é convertido a açúcares solúveis durante o amadurecimento (CORDENUNSI e LAJOLO, 1995). O amido é a principal forma de estoque de carbono encontrado em plantas superiores e constitui um insumo de grande relevância para indústria de alimentos, além de contribuir diretamente para a alimentação humana (TETLOW, 2006). Por sua importância econômica, as vias metabólicas envolvidas na síntese de amido são bastante conhecidas (SMITH, DENYER e MARTIN, 1997), mas conhece-se muito pouco ainda sobre as vias metabólicas da degradação do amido.

Os estudos de degradação de amido, em geral, enfocam o amido de reserva armazenado em tubérculos como a batata, e cereais como o milho e a cevada, ou ainda, o amido transitório das folhas, o qual é produzido e degradado de acordo com ciclo claro-escuro (BECK e ZIEGLER, 1989; SMITH, ZEEMAN, SMITH, 2005). O amido armazenado em frutos, ainda é objeto de escassa investigação embora a reserva seja significativa e tenha relação direta com a síntese de açúcares e, conseqüentemente, com o adoçamento do fruto (CORDENUNSI e LAJOLO, 1995). Pela grande quantidade de amido acumulado, e pela rápida degradação que ocorre

durante o amadurecimento, a banana é um bom modelo de degradação do amido e, conseqüentemente, é o fruto mais estudado neste aspecto tendo, no nosso grupo de pesquisa, a cultivar Nanicão como padrão.

1.1 Amadurecimento da Banana

A banana é um fruto originário da Ásia e pertencente à família das Musáceas, possui reprodução assexuada alcançada através da partenocarpia. O surgimento das diferentes cultivares deve-se primariamente ao cruzamento de duas espécies selvagens: *Musa acuminata* e *Musa balbisiana*, sendo convencionalmente utilizadas as letras A e B, respectivamente, para a contribuição haplóide de cada cultivar (CANO et al., 1997; ZHANG et al., 2005).

O desenvolvimento da banana pode ser dividido em quatro fases de acordo com o descrito por BALLESTERO (1992):

Crescimento: rápida divisão celular anterior a um alongamento celular;

Maturação: mudanças nas características químicas e físicas podem ser aqui observadas, afetando a qualidade sensorial do fruto. Esta fase se sobrepõe parte da fase de crescimento e o amadurecimento;

Amadurecimento: fase em que o fruto se torna apto para o consumo decorrente de mudanças na aparência, sabor, aroma e textura.

Senescência: fase que compreende desde a completa maturação até a morte do fruto.

Durante o amadurecimento da banana ocorrem mudanças importantes que refletem no seu sabor e qualidade. As mudanças na textura são, provavelmente, devidas à degradação do amido (CORDENUNSI, SHIGA e LAJOLO, 2008) e não a

mudanças na parede celular, como acontece em outros frutos como o mamão (FABI et al, 2006). Dentre as mudanças que contribuem para o sabor, está a perda de adstringência verificada em banana verde em consequência da polimerização dos compostos fenólicos, a degradação dos ácidos orgânicos e a síntese e acúmulo de açúcares solúveis tornando o fruto mais doce (VILAS BOAS et al, 2001; CORDENUNSI e LAJOLO, 1995). Muitos destes eventos são regulados pelo climatério da fruta, como consequência do aumento da produção de etileno e da respiração.

Tradicionalmente os frutos são divididos em dois subgrupos de acordo com o perfil de produção de etileno e taxa respiratória (CO_2). Frutos conhecidos como climatéricos apresentam, geralmente, uma produção autocatalítica de etileno juntamente com um aumento de respiração durante o amadurecimento, o que não acontece nos frutos classificados como não-climatéricos (GIOVANNONI, 2001).

Embora o etileno apresente uma estreita relação com o amadurecimento de frutos climatéricos, outros reguladores vegetais também, podem ser relevantes durante esta fase. Purgatto et al (2002) observaram um retardo na degradação do amido em fatias de bananas tratadas com ácido indolacético (AIA) e resultados similares foram obtidos em fatias de banana tratadas com ácido giberélico (GA_3) (ROSSETTO et al, 2004). Outros fatores como a perda de água e a colheita de frutos, também, podem atuar como agentes desencadeadores da síntese de etileno nas fases iniciais do amadurecimento (BARRY e GIOVANNONI, 2007).

O etileno é considerado um regulador vegetal intimamente relacionado ao desencadeamento de processos como crescimento e senescência de plantas podendo agir também, em resposta a condições bióticas e abióticas de estresse. Plantas superiores sintetizam o etileno a partir da L-metionina, sendo que o primeiro

passo envolve a síntese de um aminoácido não-protéico (ACC), convertido a etileno pela ação de duas enzimas ACC-sintase e ACC-oxidase (BEECKER e KENDE, 2000). A produção do etileno em frutos climatéricos como a banana, é consequência de dois sistemas de produção de etileno bem definidos. O primeiro é dominante na fase pré-climatérica, com produção de baixas quantidades de etileno (produção basal) e o segundo, corresponde a uma produção autocatalítica que culmina com o surgimento do pico de etileno e conseqüentemente o início do processo de amadurecimento (JIANG et al., 2004; GOLDING et al., 1998).

O aumento na produção endógena de etileno pode ser considerado como um agente desencadeador do amadurecimento da banana. A indução da maturação também pode ser alcançada pelo tratamento com etileno exógeno (MCMURCHIE, MCGLASSON e EAKS, 1972).

Liu et al (1999) observaram em bananas cv. Grand Naine (subgrupo Cavendish), comportamentos distintos entre frutos tratados com etileno exógeno e frutos amadurecidos de modo natural (não-tratados). Embora, o uso do etileno exógeno tenha causado uma antecipação de 4 dias no amadurecimento, os frutos tratados não tiveram um comportamento climatérico característico (pico de etileno) como observado nos frutos não-tratados. Liu et al (1999) concluíram que estes comportamentos são, possivelmente, oriundos da indução de um gene pertencente à família da ACC sintase (MA-ACS1).

A produção de etileno e a atividade da ACC-oxidase possuem uma intrínseca relação, sendo observado que o aumento na atividade de ACC-oxidase e na produção de etileno ocorre primeiro na polpa, depois na casca, indicando que possivelmente o processo de amadurecimento em bananas ocorre do interior para fora do fruto (VENDRELL e MCGLASSON, 1971).

Yong et al. (1962) verificaram que os frutos mantidos em atmosfera contendo 10% de CO₂ sofreram um retardo de aproximadamente 13 dias no processo de amadurecimento, suprimindo a taxa respiratória, quando comparados a frutos mantidos em condições controladas. Neste mesmo estudo, foi observado que uma vez iniciado o processo de amadurecimento, a atmosfera contendo 10% de CO₂ não influenciou mais a taxa respiratória. Também Liu et al. (2004) verificaram que atmosfera ricas em CO₂ (60%) favoreceu a supressão da via glicolítica, responsável pela síntese de CO₂ (BEAUDRY et al., 1989), além de promover um retardo no amadurecimento das bananas.

Giovannoni e Barry (2007) relacionaram o aumento da taxa respiratória, observada durante o amadurecimento de frutos, ao fornecimento de ATP necessário para reciclagem do ciclo da metionina, o qual sustentaria o aumento da produção de etileno às baixas concentrações intracelulares de metionina.

Beaudry et al. (1989) observaram que o início do aumento da taxa respiratória em bananas foi concomitante com o aumento dos intermediários da via glicolítica e do fluxo de carbono da gliconeogênese, sugerindo que a degradação do amido, que ocorre durante o amadurecimento, deve ser fonte de carbono para a síntese de açúcares e CO₂.

1.2 A estrutura do Grânulo de Amido

O amido é a principal forma de estoque de carbono encontrado nas plantas superiores e corresponde a aproximadamente 80% da ingestão calórica, sendo uma importante fonte de energia para a dieta humana (TETLOW, 2006). Ele é constituído, majoritariamente, por dois polímeros de glicose: amilose e amilopectina. A síntese destes componentes envolve a ação de diferentes isoformas da amido-sintase (SS -

Starch Synthases) e da enzima ramificadora de amido (SBE - Starch Branching Enzymes) presentes no amiloplasto. Acredita-se que a síntese da amilose é mediada por uma isoforma da amido-sintase que se encontra ligada ao grânulo (SGBSS I – starch granule bound starch synthase isoform 1), enquanto a amilopectina é sintetizada na superfície do grânulo por uma isoforma solúvel da amido-sintase (SSS – Soluble Starch Synthases) (SMITH, DENYER e MARTIN, 1997).

Outros compostos também podem estar presentes em menor quantidade no grânulo de amido, como lipídeos, proteínas e minerais. Os lipídeos normalmente se encontram complexados dentro da matriz da amilose. Os minerais também são encontrados em pequenas quantidades como constituintes do grânulo de amido (< 0,4%), entretanto, o fósforo parece ser o mais relevante. O fósforo pode ser encontrado em três principais formas: (1) monoéster fosfato, (2) fosfolipídeos e (3) fósforo inorgânico (TESTER, KARKALAS e QI, 2004). As proteínas, presentes em quantidades menores que 0,6%, são encontradas tanto dentro quanto associadas à superfície do grânulo (BALDWIN, 2001).

A amilose (Figura 1A) é constituída basicamente de cadeias lineares de glicose unidas por ligações α -1,4, correspondendo a aproximadamente 30% do amido. A conformação helicoidal da molécula, proporcionada pelo arranjo das ligações α -1,4, permite a sua complexação com soluções de iodo formando um composto de coloração azul. Esta característica é a base para a determinação quantitativa de amilose e como indicador da presença de amido (HOOVER, 2001). A amilose, também, devido a sua natureza química, é capaz de formar complexos com pequenas moléculas hidrofóbicas (KOSSMANN e LLOYD, 2000).

Figura 1. Frações das moléculas de amilose (A) e amilopectina (B) destacando as ligações $\alpha 1,4$ e $\alpha 1,6$.

A amilopectina (Figura 1B) é um polímero altamente ramificado contendo até 6% das ligações em $\alpha 1,6$ e representa, aproximadamente, 70% dos polissacarídeos presentes no amido (MARTIN e SMITH, 1995; CORDENUNSI, 2004). As suas ramificações são compostas por pequenas cadeias com tamanho médio de 18 a 25 unidades de glicose (BULÉON et al., 1998; (TESTER, KARKALAS e QI, 2004)).

A molécula de amilopectina consiste de uma única cadeia redutora, conhecida como cadeia C, na qual as cadeias mais externas e internas se unem a ela por ligações $\alpha 1,6$ (BULÉON et al., 1998). As cadeias mais externas (A e B₁) formam duplas hélices dentro dos grânulos e possuem, aproximadamente, de 12 a 24 resíduos de glicose (KOSSMANN e LLOYD, 2000; TESTER, KARKALAS e QI, 2004)) (Figura 2).

Figura 2. Representação esquemática de uma secção da molécula de amilopectina indicando a cadeia redutora (C) e o perfil de ramificação das cadeias α -1,4 (A, B1-B2) unidas por ligação α -1,6. Adaptado de Tester et al., 2004.

Utilizando-se a técnica de difração de raios-X, verificou-se que o comportamento das duplas hélices, principalmente da amilopectina, apresenta tradicionalmente três tipos de polimorfismo: Tipo A, geralmente presente em cereais; Tipo B, mais comum em tubérculos e em amidos rico em amilose e Tipo C já encontrado em algumas frutas e raízes. A estrutura do Tipo A apresenta-se de modo mais compacto e com baixo teor de água enquanto que no Tipo B, devido à maneira com que as duplas hélices se arranjam, é mais hidratada. O tipo C, atualmente, vem sendo reconhecido como uma mistura dos Tipos A e B (BOGRACHEVA et al., 1998; TETLOW 2006).

Em grânulos nativos de amido, quando observados sob luz polarizada do microscópio ótico, é possível visualizar uma estrutura conhecida como Cruz de Malta. A presença desta estrutura indica que o grânulo de amido possui uma natureza cristalina. Acredita-se que esta natureza está relacionada, principalmente, à amilopectina, entretanto a participação da amilose não deve ser descartada (BULÉON et al., 1998).

A técnica de *scattering study* (SAXS) permite a análise da estrutura fina do grânulo de amido, tornando possível a identificação de estruturas conhecidas como lamelas. A organização das lamelas envolve, principalmente, o arranjo da molécula de amilopectina. A lamela cristalina é o local onde as duplas hélices da cadeia de amilopectina se encontram formando estruturas conhecidas como *clusters*. Outra denominação relevante na estrutura fina do grânulo de amido é o conceito de lamela amorfa onde possivelmente os pontos de ramificação da amilopectina estão localizados. As lamelas cristalinas e amorfas estão dispostas alternadamente e se repetem em intervalos de, aproximadamente, 9nm (DONALD et al., 2001) (Figura 3). Este intervalo, de acordo com Jenkins e Donald (1995), parece ser constante, independente da fonte botânica. Entretanto, a disposição das lamelas (cristalinas e amorfas), em grânulos de amido de milho, cevada e ervilha, parece sofrer forte influência do conteúdo de amilose presente no grânulo.

O emprego de diferentes técnicas vem auxiliando na compreensão de como as moléculas de amilose e amilopectina se arranjam para formar o grânulo de amido. Com o auxílio da Microscopia de Força Atômica, estruturas pequenas e esféricas, denominadas bloquetes, foram propostas como sendo um novo modelo de organização (GALLANT et al., 1997; BAKER, MILES e HELBERT, 2001; TANG, MITSUNAGA, KAWAMURA, 2006). Os bloquetes seriam constituídos por uma molécula de amilopectina e seriam a menor estrutura organizada do grânulo de amido.

Figura 3. Esquema de representação dos níveis de organização do grânulo de amido, envolvendo amilose e amilopectina. Adaptado de Buléon et al., 1998.

O tamanho dos bloquetes parece variar de acordo com fonte botânica: de 130 a 250 nm em amido de ervilha (RIDOUT et al., 2003), de 20 a 50nm em amido de batata (SZYMOSKA e KROK, 2003) e de 10 a 30nm em grânulos de amido de milho (BAKER, MILES e HELBERT, 2001). Recentemente, Tang, Mitsunaga, Kawamura (2006) resumiram o assunto dos bloquetes em 7 itens bastante úteis para o entendimento vigente: (1) possuem estrutura semelhantes em formato, porém com tamanhos variados, (2) grânulos da mesma fonte botânica, geralmente, possuem bloquetes com tamanhos semelhantes embora uma variação possa ser encontrada, (3) os bloquetes são estruturas presentes em todo o grânulo de amido, (4) o tamanho dos bloquetes não possui uma relação direta com o tamanho do grânulo nem com a espessura dos anéis de crescimento, (5) nas regiões amorfas dos grânulos, os bloquetes podem apresentar uma estrutura diferenciada (defeituosa), (6) os bloquetes podem se agrupar e formar complexos e (7) os anéis de crescimento e as regiões amorfas dos grânulos não são estruturas regulares.

De acordo com Ridout et al (2004), os bloquetes podem ser considerados como estruturas parcialmente cristalinas embebidos por uma matriz amorfa, possivelmente, amilose. Provavelmente devido a esta organização, diferentes perfis de hidratação dos grânulos de amido de ervilha foram observados pelos autores.

Além da natureza semicristalina dos bloquetes (TANG, MITSUNAGA, KAWAMURA, 2006), variações na proporção dos componentes majoritários (amilose e amilopectina) também afetam o comportamento dos grânulos. Ridout et al (2006) verificaram que grânulos de amido de ervilha com alto teor de amilose apresentaram ao redor dos bloquetes uma fina, porém rígida, camada de uma matrix, possivelmente amilose, que teve seu comportamento alterado durante o processo de gelatinização.

De acordo com Jenkins e Donald (1995), a amilose parece promover uma desordem na estrutura da amilopectina, que pode ser alcançada de duas maneiras: (1) através de uma co-cristalização da amilose dentro da matriz de amilopectina ou (2) pela penetração da amilose da região amorfa, onde se encontram os pontos de ramificação. Estes dois mecanismos auxiliam na diminuição da região cristalina sem, no entanto, atuarem no tamanho do cluster. Entretanto, segundo Ridout et al (2006), o alto teor de amilose não afetou a cristalinidade dos grânulos de amido de ervilha, embora tenha aumentado a presença de cristais tipo B.

1.3 Amido de banana

Micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) permitiram a Garcia e Lajolo (1988) visualizarem em amido isolado de banana, que as formas esféricas, ovais e alongadas são predominantes e que, com o avanço do

amadurecimento, diminuem radialmente no diâmetro dos grânulos, fato também observado por Peroni (2007).

Segundo Garcia e Lajolo (1988) os grânulos de amido de banana verde apresentaram superfície lisa enquanto que nos amidos de banana madura foram observadas estriações, indicando uma possível exocorrosão pelas enzimas que degradam o amido.

MILAN-TESTA et al. (2005), visualizaram nas micrografias obtidas por MEV, que a forma predominante encontrada para o grânulo de amido de banana (plantain) foi o elíptico com dimensões entre 35 μm a 55 μm , sendo, também observados grânulos esféricos com diâmetro de 7-8 μm aproximadamente. Bello-Perez et al. (2005), obtiveram resultados semelhantes com amido de banana tipo plantain. Contudo, as micrografias obtidas por Microscopia Ótica permitiram a observação de um arranjo radial e ordenado dos grânulos de amido evidenciando a sua natureza semi-cristalina.

Cordenunsi (2004), utilizando a técnica de Microscopia de Força Atômica (MFA), também obteve imagens que sugerem a presença de bloquetes em amidos isolados de banana.

A cultivar Nanicão, acumula cerca de 20% de amido durante o seu desenvolvimento, que é reduzido a menos de 1% no final do amadurecimento. Esta degradação é fonte de carbono para a síntese e acúmulo de grandes quantidades de açúcares solúveis, com predominância da sacarose, glicose e frutose (GARCIA e LAJOLO, 1981; CORDENUNSI e LAJOLO, 1995; PRABHA e BHAGYALAKSHMI, 1998). Em outras cultivares brasileiras, com diferentes perfis de acúmulo e degradação de amido, foram observados resultados semelhantes (MOTA et al., 1997).

1.4 Degradação do amido

O processo de degradação do amido tem sido objeto de investigação tanto em germinação de cereais (BECK e ZIEGLER, 1989), quanto em amido transitório (EDNER et al., 2007; ZEEMANN et al., 2007). Contudo, o seu mecanismo regulatório é ainda pouco conhecido. A presença de diversas isoformas de diferentes enzimas, capazes de degradar amido e liberar glicanos dificulta a identificação da participação e relevância de cada enzima neste processo (SMITH et al., 2005) (Figura 4).

Algumas das enzimas supostamente envolvidas na degradação do amido e síntese de sacarose, já foram detectadas em banana. Entre elas, as α e β -amilases, as amido-fosforilases, as desramificadoras, as α -glicosidases, a sacarose fosfato-sintase (SPS) e a sacarose sintase (SuSy). Entretanto, a relevância e participação destas enzimas durante este evento ainda é pouco conhecida (PURGATTO et al., 2001; MAINARDI et al., 2006; NASCIMENTO et al., 2006; MOTA et al., 2002; BIERHALS et al., 2004).

Figura 4. Modelo proposto para degradação de amido transitório (folhas de *Arabidopsis*). Adaptado de SMITH et al., 2005. GWD- Glucan Water Dikinase; PWD- Phosphoglucan water dikinase

1.5 Hidrolases

A maioria das amido-hidrolases, como a α -amilase, pertence à família glicosil hidrolase 13 (GH 13) que contém, também, as transferases e isomerases (BOZONNET, et al., 2005). A α -amilase (E.C. 3.2.1.1) é uma endoamilase, que age ao acaso hidrolisando as ligações α 1,4 da amilose e da amilopectina produzindo uma mistura de dextrinas (oligossacarídeos). Ainda é a única enzima conhecida capaz de atuar na superfície de grânulos nativos, iniciando sua degradação (BECK e ZEIGLER, 1989).

Durante a germinação de cereais, a ação da α -amilase é relevante para que o processo de degradação de amido possa ocorrer. Entretanto, neste tecido, as células da aleurona são responsáveis pela secreção da enzima para que o processo de degradação se inicie, sendo, portanto considerado um tecido não-vivo. Considera-se que em tecidos vivos, outros mecanismos podem atuar que prescindam da atividade da α -amilase (SMITH, ZEEMAN e SMITH, 2005).

O genoma da *Arabidopsis Thaliana* codifica três α -amilases que são direcionadas para diferentes compartimentos celulares e são divididas em: **Família 1** - apoplasto e outros compartimentos extracelulares, **Família 2** - citosol e **Família 3** - plastídio (STANLEY, FARNDEN e MACRAE, 2005). Segundo Smith Zeeman e Smith (2005) nenhuma das α -amilases encontradas no genoma de *Arabidopsis thaliana* parece ser necessária para a degradação de amido transitório. Zeeman et al. (2007), sugerem que α -amilase pode participar da degradação de amido transitório (folhas), porém a sua ausência poderia ser compensada por outras enzimas.

Garcia e Lajolo (1988) detectaram a atividade de três α -amilases durante o amadurecimento de bananas, sendo que o máximo da atividade amilolítica ocorreu concomitante com o pico respiratório, indicando a importância da ação destas enzimas no processo de degradação de amido que ocorre durante o amadurecimento.

Vieira-Junior, Nascimento e Lajolo (2006), isolaram uma α -amilase com peso molecular de 45 kDa, de polpa de banana da cultivar Nanicão. Isto sugere que a α -amilase encontrada neste estudo é capaz de transpor os compartimentos celulares para dentro do plastídio. Outra evidência que a α -amilase pode ser importante no metabolismo do amido em banana, é o fato de a enzima ter sido isolada da superfície do grânulo de amido, já nas fases iniciais do amadurecimento (PERONI, 2007).

A β -amilase (E.C.3.2.1.2) é uma exoamilase, pertencente à família glicosil hidrolase 14 (NASCIMENTO et al., 2006) que remove unidades de β -maltosil da extremidade não redutora da cadeia, liberando unidades de maltose, que é transportada para o citosol via um translocador de membrana específico (SMITH, ZEEMAN e SMITH; 2005 KAPLAN, SUNG e GUY, 2006).

Em cevada em germinação, a β -amilase pode ser encontrada na forma livre e/ou associada a proteínas. A forma livre parece ter importância nas fases iniciais da germinação, enquanto que a forma associada, que se encontra complexada com proteínas, não possui atividade catalítica. Agentes redutores promovem a liberação da proteína que, apresenta atividade similar à da α -amilase durante a germinação (BECK e ZIEGLER, 1989).

A participação da β -amilase (Figura 4) na hidrólise de amido transitório em folhas parece ser importante, já que a redução da atividade desta enzima promoveu um fenótipo de excesso de amido e, com uma degradação inferior a 30% (KAPLAN, SUNG e GUY, 2006). Dentre as nove β -amilases codificadas no genoma de *Arabidopsis* somente quatro, possivelmente, se encontram no cloroplasto e poderiam participar da hidrólise do amido que ocorre no interior deste plastídeo (SMITH ZEEMAN e SMITH; 2005).

Em bananas, Garcia e Lajolo (1988) verificaram um aumento da atividade da β -amilase simultaneamente ao início da degradação de amido. Resultados similares foram observados por Nascimento et al. (2006) em polpa de banana, onde a atividade da β -amilase foi inversamente correlacionada com o teor de amido. Adicionalmente, quando fatias de bananas foram tratadas com ácido indol acético (AIA), a atividade da enzima foi afetada, embora altos níveis de transcrição da β -amilase tenham sido observados, indicando que outros fatores podem atuar na regulação desta enzima (PURGATTO et al., 2001)

Sparla et al. (2006) obtiveram uma sequência de β -amilase, supostamente plastidial, com 60kDa que parece ser regulada por mecanismo redox. Segundo Kaplan Sung e Guy (2006), outros fatores como a atividade e expressão desta proteína podem ser reguladas por fatores como estresse abiótico, luz, açúcares, reguladores vegetais e proteólise.

Evidências sugerem que a β -amilase pode atuar na superfície de grânulos nativos em ação conjunta com outras enzimas que promoveriam uma desestruturação das cadeias de amilopectina, afetando o seu grau de cristalinidade (SMITH, ZEEMAN e SMITH, 2005). Devido à ação limitada da β -amilase sobre

compostos ramificados, a atuação de enzimas desramificadoras é também, fator relevante para que a hidrólise possa ocorrer de modo eficiente na superfície do grânulo (ZEMANN et al, 2007^a; ZEEMAN, SMITH e SMITH, 2007^b).

1.6 Enzimas desramificadoras

As enzimas desramificadoras catalisam a hidrólise das ligações α -1,6 removendo os pontos de ramificação presentes na amilopectina. No genoma de *Arabidopsis* estão presentes três classes de isoamilases e uma de dextrinase-limite. A última parece estar envolvida no processo de hidrólise das ligações α -1,6 (desramificação) do amido durante a germinação de cereais, já que neste órgão ela possui alta atividade. Contudo em folhas de *Arabidopsis* a sua ausência não afeta a velocidade de degradação do amido (SMITH, ZEEMAN e SMITH, 2005).

As isoamilases (E.C.3.2.1.68) podem atuar tanto no sentido de síntese quanto de degradação de amido, o que dificulta a elucidação de qual isoforma está operante no processo de degradação de amido. Em diferentes partes da planta, a redução ou eliminação da atividade de isoamilase resultou no acúmulo anormal de amido (SMITH, ZEEMAN e SMITH, 2005).

A isoforma da isoamilase conhecida como ISA₃ (Figura 4) parece estar envolvida na degradação de amido em folhas de *Arabidopsis*, removendo os pontos de ramificação diretamente da superfície do grânulo. Neste modelo, a ação da ISA₃ ocorre concomitante com a β -amilase e a água-glicano diquinase (GWD – Glucan Water Dikinase). Esta última teria a função de fosforilar locais específicos da amilopectina promovendo uma desestruturação deste polímero tornando-o acessível para o processo de degradação (ZEEMAN et al., 2007^a).

Bierhals et al. (2004) verificaram que polpa de banana possui uma enzima desramificadora provavelmente do tipo isoamilase. A atividade da enzima, durante o amadurecimento, se manteve praticamente constante, contudo a enzima isoamilase obtida apresentou similaridades com a isoforma 3, importante no processo de degradação de amido transitório ((SMITH, ZEEMAN e SMITH, 2005; ZEEMAN et al, 2007^a).

1.7 Amido-fosforilase

As amido-fosforilases (E.C. 2.4.1.1) catalisam de maneira reversível a transferência de moléculas de glicose a partir da extremidade não redutora de α -1,4 oligo- ou poliglicano para um ortofosfato (Pi) liberando unidades de glicose-1-fosfato (Glc 1P) (SCHUPP e ZIEGLER, 2004). Em plantas superiores, geralmente, estão presentes as duas formas da amido-fosforilase, uma plastidial e outra citosólica, que diferem tanto estruturalmente quanto pela especificidade por substrato (ALBRECHT et al., 2001).

Cloroplastos isolados de *Arabidopsis* possuem uma baixa atividade da amido-fosforilase, claramente insuficiente para sustentar o processo de degradação do amido, diferente do observado para cloroplastos de espinafre e ervilhas que são capazes de manter a degradação pela via fosforolítica ((SMITH, ZEEMAN e SMITH, 2005). Schupp e Ziegler (2004) observaram distintos perfis de atividade da amido-fosforilase em folhas de trigo. Duas formas da enzima tiveram a atividade mais pronunciada em folhas jovens (P1 e P2) enquanto outra esteve presente somente em folhas maduras (P3). Contudo, não foi observada atividade da enzima durante a germinação deste cereal.

Mota et al.(2002) observaram que durante o desenvolvimento de banana, a atividade da amido-fosforilase aumentou concomitante com o acúmulo de amido evidenciando a importância desta enzima no período anterior à colheita do fruto. Durante o amadurecimento, foi possível verificar que os perfis de atividade da enzima em ambos os sentidos (síntese e degradação) foram semelhantes. Entretanto um aumento no início de degradação do amido foi observado indicando a importância da via fosforolítica durante o processo de mobilização do amido. Mais tarde, Mainardi et al. (2006), obtiveram evidências de que a atividade da amido-fosforilase em polpa da banana é regulada negativamente pelo etileno.

1.8 Outras enzimas envolvidas na degradação de amido

A ação da β -amilase pode produzir pequenas quantidades de maltotriose devido a sua incapacidade de atuar em cadeias com menos de quatro resíduos de glicose (SMITH, ZEEMAN e SMITH, 2005). No interior do plastídeo do amido transitório, esta maltotriose é convertida em maltose com a liberação de uma molécula de glicose pela enzima α -1,4 glucosiltransferase (D-enzima, DPE1-disproportionating enzyme) (ZEEMAN, SMITH e SMITH, 2007^B). Bresolin et al. (2006) identificaram uma suposta enzima-D com peso molecular de aproximadamente 60 kDa em endosperma de trigo. Foi demonstrado que a proteína está presente no amiloplasto e possui atividade, sendo capaz de clivar maltotriose e/ou maltoheptose liberando unidades de glicose, durante a germinação da semente.

A maltose, liberada pela ação da β -amilase é, possivelmente exportada para o citosol via um transportador específico ao invés de ser metabolizada dentro do plastídio (SMITH, ZEEMAN e SMITH, 2005; LU e SHARKEY, 2006). No citosol, a

maltose é metabolizada por uma glucosiltransferase denominada DPE₂ (Figura 4), que transfere um resíduo de glicosil para um aceptor de molécula enquanto o outro é liberado na forma de glicose. A glicose é então convertida à hexose fosfato via uma hexoquinase (SMITH, ZEEMAN e SMITH, 2005; ZEEMAN, SMITH e SMITH, 2007^b).

A natureza do receptor dos resíduos de glicosil liberados pela ação da DPE₂, não é totalmente elucidado, entretanto de acordo com Smith, Zeeman e Smith (2005) em amido transitório ele é constituído principalmente de arabinose, galactose e outros componentes minoritários.

MAINARDI (2007) determinaram por PAGE-nativo a atividade das DPE₁ e DPE₂ em polpa de banana. No início da degradação do amido, a DPE₁ teve maior atividade, sendo reduzida com o avanço da degradação, enquanto a DPE₂ apresentou o aumento de atividade concomitante com o máximo de produção de açúcares solúveis. Neste mesmo estudo, o uso de um antagonista do etileno (1-MCP) demonstrou que possivelmente a DPE₁ possui relação intrínseca com este hormônio, uma vez que os frutos tratados com 1-MCP tiveram inibição da atividade desta enzima, o que não foi observado para a DPE₂.

A α -glicosidase hidrolisa a maltose e a maltodextrina produzindo glicose. No genoma de *Arabidopsis* foram encontrados cinco genes que codificam para a α -glicosidade. A forma citosólica desta enzima não apresentou atividade maltásica, indicando outro modo de ação de enzima, possivelmente sobre heteroglicanos presentes no citosol liberando glicose, que pode ser convertida à glicose-6-fosfato via hexoquinase (LU e SHARKEY, 2006).

A fosforilação promovida pela GWD no grânulo de amido ocorre em carbonos na posição C6. Em folhas de batata, esta enzima encontra-se associada ao grânulo de amido (ZEEMAN et al. 2007^a; ZEEMAN, SMITH e SMITH, 2007^b; RITTE,

LORBERTH, STEUP, 2000^b). Entretanto, amido previamente fosforilado pela ação da GWD pode atuar como substrato para outra enzima, recentemente identificada com *Phosphoglucan Water Dikinase* (PWD), que atua em carbonos na posição C3 (KOTTING et al, 2005; LIU e SHAKEY, 2006; RITTE et al. 2006).

A degradação do amido envolve a ação de diversas enzimas, contudo, a maioria dos estudos, até o presente momento, possui como objeto de pesquisa o amido transitório, que é sintetizado durante o dia e degradado a noite. A lacuna de informações existentes para outros órgãos que também acumulam amido, como a banana, torna-a um objeto importante para a elucidação deste processo em frutos.

Uma forma de tentar correlacionar eventos e enzimas é tentar “silenciar” ou “super-expressar” determinada enzima e observar as consequências em termos de degradação do amido, ou síntese de sacarose. Outra maneira é tentar identificar mutantes entre as plantas existentes, que se comportem de maneira distinta quanto ao acúmulo ou degradação do amido. Como não são ferramentas viáveis por enquanto, este projeto teve como objetivo geral a identificação de cultivares de banana que se diferenciem em características da cultivar Nanicão, tanto no diz respeito aos teores de amido, ou seja, que acumulem quantidades expressivamente maiores ou menores, ou ainda, que apresentem padrão de degradação distinto, tanto por taxas de mobilização mais lentas ou rápidas, como por incapacidade de degradar o amido. Quatro cultivares de banana, pertencentes a diferentes grupos genômicos, foram escolhidas, com base em testes preliminares de acúmulo e degradação de amido. Tanto a polpa da banana, quanto seu amido isolado foram estudados.

2 OBJETIVO

O objetivo geral deste projeto é identificar e caracterizar fisiológica, enzimática e estruturalmente (em relação ao grânulo de amido) cultivares de banana que se diferenciem da Nanicao, em acúmulo e degradação de amido, no sentido de auxiliar na compreensão dos eventos ligados à degradação do amido durante o amadurecimento da banana.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material

As cultivares, Nanicão, Terra, Mysore e Figo, no estágio pré-climatérico, foram obtidas de fornecedores da Companhia de Entrepósitos e Armazenamento do Estado de São Paulo (CEAGESP). A cultivar Pacovan foi obtida na Estação Experimental de Pariquera-Açú do Instituto Agrônomo de Campinas, localizada na região de Registro (SP). Os frutos foram previamente selecionados levando em conta danos físicos na casca e desinfestados superficialmente por imersão em solução de hipoclorito de sódio a 1%. Os frutos selecionados, limpos e secos com papel-toalha foram acondicionados em Câmara de Demanda de Oxigênio (BOD), com umidade (~90%) e temperatura (~20°C) monitoradas.

As cultivares analisadas, resumidas na Tabela 1, apresentam as seguintes características (NUNES, ALVES e OLIVEIRA, 2001):

- Cultivar Terra (AAB) - do subgrupo Plátano, também é conhecida como Chifre-de-Boi, pelo formato do fruto. É uma planta de porte alto, com mais de 6 m de altura, que produz cachos (~35 kg) e com frutos grandes (até 500g cada). É uma cultura muito exigente em nutrientes. É razoavelmente tolerante ao Mal-de-Sigatoka e é tolerante ao Mal-do-Panamá. Devido ao alto teor de amido residual depois de madura, deve ser consumida depois de cozida ou frita.
- Cultivar Mysore (AAB) – é considerada uma planta de porte alto, com aproximadamente 5 m de altura. Produz cachos muito compactos pesando em média 26 kg, com aproximadamente 18 pencas roliças e gordas, junto com outras magras. É uma cultivar de sabor muito agradável, semelhante à Maçã, porém mais ácida e com maior tolerância ao Mal-de-Sigatoka e ao Mal-do-Panamá.

- Cultivar Pacovan (AAB) - do subgrupo Prata, também é uma planta de porte alto (até 8 m), que produz frutos com sabor semelhante à Prata, tendo, porém mais aptidão para diversos tipos de solos. É muito comum no Nordeste do Brasil, sendo uma das cultivares mais plantada na região do Vale do São Francisco. É tolerante ao Mal-do-Panamá e ao Mal-de-Sigatoka. Por ser uma das cultivares mais ricas em amido, é utilizada para diversos produtos processados: doces, banana-passa, farinhas, além do consumo ao natural.

- Cultivar Figo Cinza (ABB) - do subgrupo Figo, tem planta de porte médio com cerca de 3 m de altura, que produz cachos com peso médio de 16 kg. Relativamente tolerante ao Mal-de-Sigatoka e ao Mal-do-Panamá. Banana de mesa, muito consumida no país e excelente para fritar. Trata-se do único cultivar comestível pertencente ao grupo genômico ABB.

Tabela 1. Resumo dos principais dados de classificação das cultivares estudadas neste trabalho.

Cultivares	Subgrupo	Grupo Genômico
Nanicão	Cavendish	AAA
Terra	Plátano	AAB
Mysore		AAB
Pacovan	Prata	AAB
Figo	Figo	ABB

Os grânulos de amido utilizados nas análises foram isolados das cultivares, nos seguintes estágios:

- **estágio 1-** correspondeu ao primeiro dia pós-colheita;

- **estágio 2-** dia em que foi verificado o início do processo de degradação de amido;
- **estágio 3-** correspondeu ao dia em que o amido se encontrava em pleno processo de degradação.

3.2 Métodos

3.2.1 Medidas de etileno e CO₂

As medidas de etileno e CO₂ foram realizadas diariamente. Os frutos (5 para a cultivar Terra e 15 para as demais cultivares) eram mantidos, por aproximadamente 1 hora, em frascos fechados. Dos gases acumulados nos frascos, foram coletadas amostras de 10 mL para as estimativas de etileno e 1 mL para as de respiração (CO₂). As injeções foram feitas manualmente em cromatógrafo a gás (HP 6890). Para a detecção do etileno foi utilizado um detector de Ionização de Chamas (FID) e para o CO₂ um detector de Condutividade Térmica (TCD). A coluna utilizada tinha 30m de comprimento e 0,053 mm de diâmetro interno. O hélio foi utilizado como gás de arraste, no volume de 1 mL para etileno e 4 mL para CO₂.

As condições de trabalho para o etileno foram: temperatura isotérmica a 30°C, temperatura do injetor de 200°C e do detector de 250°C; fluxo de 1mL/min; injeção em modo *pulsed split*, com taxa de split de 12,5:1 e volume de injeção de 10mL.

As condições de trabalho para o CO₂ foram: temperatura isotérmica a 30°C, temperatura do injetor e do detector de 250°C; fluxo de 4mL/min; injeção em modo split, com taxa de split de 50:1 e volume de injeção de 1mL.

Para cultivar Nanicão foram utilizados os dados obtidos por Peroni (2007).

3.2.2 Carboidratos

3.2.2.1 Determinação de amido

3.2.2.1.1 Método enzimático

O amido foi determinado por método enzimático otimizado para bananas por Arêas e Lajolo (1981). Aproximadamente 0,5g de polpa (cultivares Terra, Pacovan, Mysore e Figo) foi homogeneizada em 5mL de NaOH 0,5N, seguido por neutralização por 5mL de ácido acético 0,5N. A solução foi então transferida para balão volumétrico (25 mL ou 50 mL), tendo sido o volume completado com água destilada. Uma alíquota de 1mL foi colocada em tubo de centrifuga (15mL), adicionado de 4mL de etanol absoluto e centrifugada por 15 min a 12000 xg. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com 4mL de etanol 80%, por duas vezes. Após evaporação total do etanol à temperatura ambiente, 1mL de solução de amiloglicosidase (14 U/mL, pH 4,8) foi adicionada ao precipitado, seguido por incubação a 37°C por 2 horas. A reação foi interrompida com 100 μ L de ácido perclórico 0,6N. A glicose resultante foi quantificada através do método de glicose/peroxidase/ABTS, segundo Bergmeyer (1974). A glicose foi utilizada como padrão.

Para cultivar Nanicão foram utilizados os dados obtidos por Peroni (2007).

3.2.2.1.2 Método químico

A determinação de amido pelo método químico foi realizada nas cultivares Terra e Figo. O precipitado foi obtido da mesma maneira como descrita para o método enzimático, sendo, entretanto hidrolisado pela adição de 10 mL de ácido sulfúrico 0,5N a 100°C por 1h, com agitação ocasional. Após a hidrólise, o volume foi ajustado com a adição de água, em balão volumétrico de 10mL. Uma alíquota de

200µL foi retirada e adicionada de 1mL do reagente de antrona e fervida por 10min. Glicose foi utilizada como padrão.

3.2.2.2 Açúcares solúveis

Os açúcares solúveis foram extraídos, homogeneizando-se aproximadamente 1g de amostra em 5mL de etanol 80% a 80°C. O homogenato foi mantido sob agitação mecânica a 80°C por 15min e centrifugado 11952 x g por 15min. A extração foi repetida três vezes, os sobrenadantes foram combinados e o volume completado com etanol 80% em balão volumétrico de 25mL. Uma alíquota de 1mL foi retirada e submetida à evaporação do etanol em sistema speed vac. O volume foi reconstituído com água deionizada. As análises de glicose, frutose, sacarose e maltose foram feitas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC-Dionex), utilizando um detector de pulso amperométrico e coluna CarboPac PA1(4x250 mm), em corrida isocrática com fluxo de 1mL/min de NaOH (18mM).

Para cultivar Nanicão foram utilizados os dados obtidos por Peroni (2007).

3.2.3 Determinação de atividade das enzimas

Para a extração das proteínas, aproximadamente 0,5 g de amostra foi homogeneizada em 5 volumes (g/mL) de tampão Hepes-KOH 50mM pH 7,0, contendo cisteína 20 mM previamente neutralizada, polivinilpirrolidona 40000 (PVP-40) 1% (m/v) e benzamidina 1mM. A amostra foi homogeneizada, por aproximadamente 1min, em homogeneizador tipo Waring blender. O homogenato foi então centrifugado por 15 minutos a 10.000 xg, a 4°C. O sobrenadante foi dialisado em tampão Hepes-KOH 50mM pH 7,0 contendo cisteína 20 mM, previamente

neutralizada, e benzamidina 1mM. O volume do extrato bruto resultante foi medido e utilizado para as estimativas de atividade das enzimas.

O ensaio enzimático para atividade endoamilolítica foi conduzido conforme método descrito por McCleary e Sheehan (1987). O extrato enzimático (20 μ L) foi incubado com 20 μ L do reagente *Ceralpha* (Megazyme) à 30°C por 30 min ou 60 min. A adição de 160 μ L de Tris 1,1% (m/v) interrompeu a reação e permitiu que a cor fosse desenvolvida. A leitura foi conduzida a 410nm. Uma unidade de atividade enzimática (1U) foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 μ mol de p-nitrofenol por minuto sob condições definidas, a partir de uma curva de calibração obtida com uma solução padrão de p-nitrofenol em 1,1% de Trizma-base. O reagente *Ceralpha* (Megazyme) contém o substrato p-nitrofenil-maltoheptaosídeo bloqueado na extremidade não redutora (BPNPG7) e α -glicosidases, que têm a função de liberar o composto p-nitrofenol, que desenvolve uma coloração amarela em pH alcalino. O bloqueio do terminal não-redutor impede a ação de β -amilases e fosforilases, tornando este substrato específico para α -amilases.

Para a estimativa da atividade da β -amilase, foi utilizado o método descrito por McCleary e Codd (1989). Neste método, o reagente *Betamy I* (Megazyme) contendo p-nitrofenil-maltopentaosídeo (PNPG5), é utilizado como substrato para as β -amilases. As condições da reação foram as mesmas descritas para atividade da α -amilase. A cor desenvolvida nos extratos contendo atividade foi lida a 410nm. O p-nitrofenol foi utilizado como padrão.

A quantificação do teor de proteína no extrato protéico foi feita utilizando-se o reagente Protein Assay (Bio-Rad), com base no método descrito por Bradford (1976). Neste, o Coomassie Brilliant Blue G-250 reage com resíduos de aminoácidos básicos e aromáticos, desenvolvendo uma coloração azul, lida a 595

nm. Uma alíquota de 10 µL de amostra foi adicionada de 990 µL de água e 200 µL do reagente. Após 15 min, a absorbância foi lida a 595 nm. Soro albumina bovina foi utilizada como padrão.

3.2.4 Isolamento dos grânulos de amido

O amido presente na polpa das cultivares foi isolado nos estágios descritos no item 2.1.1. Estes estágios foram selecionados por representarem etapas relevantes no processo de degradação de amido.

O isolamento foi feito segundo a metodologia descrita por Ritte et al. (2000)^a. Aproximadamente 100g de banana foi homogeneizada em 300mL de tampão de extração (Hepes-KOH 100mM pH 8,0, EDTA 1mM, DTT 5mM e Triton X-100 0,05%) em Waring blender, por 3 minutos à 4°C. O homogenato foi filtrado por uma membrana *Miracloth* (Calbiochem) e o filtrado foi decantado *overnight* a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ainda aquoso foi passado através de uma solução de 95% Percoll (American Biosciences) e 5% de Tampão (Hepes-KOH 0,5 mM pH 7,0) por 30 min, e centrifugado por 15 min a 2000g a 4 °C. O *pellet* com os grânulos foi lavado (seguido por centrifugação) por três vezes com tampão de extração, seco sob vácuo (*spped vac*) e armazenado à -20°C.

3.3 Eletroforese em condições não-desnaturantes (PAGE nativo)

Atividade hidrolítica total: A eletroforese em condições não-desnaturante foi realizada em géis de acrilamida 7,5% e com 1,5 mm de espessura, adicionados de amilopectina (0,1%) para revelar a atividade das enzimas que degradam o amido. O tampão de corrida foi Tris 25 mM, pH 8,3, glicina 192 mM (HAMES e RICKWOOD, 1990). A eletroforese inicialmente ocorreu a 15V (até o corante atingir o gel de

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

Atividade amido-fosforilases: A eletroforese em condições não-desnaturante foi realizada em géis de acrilamida 6% e com 1,5mm de espessura, adicionados de 0,4% de glicogênio de ostra. O tampão de corrida foi Tris 25 mM, pH 8,3, glicina 192 mM (HAMES e RICKWOOD, 1990). Após a eletroforese os géis foram lavados, durante 15 minutos, com 40 mL em tampão citrato-NaOH 100mM pH 6,0 e, então foram incubados por 1h a 37 °C em 40mL deste mesmo tampão acrescido de 0,05% de amido solúvel de batata e glicose- 1- fosfato 20mM. Após a incubação os géis foram lavados, novamente, com tampão citrato-NaOH 100mM pH 6,0. Os géis foram corados com solução aquosa de iodeto (I₂ 13 mM e KI 40 mM) para revelação das bandas.

3.3.1 Extração das proteínas do grânulo para atividade em gel de poliacrilamida

A atividade em gel de poliacrilamida foi realizada utilizando o amido isolado das cultivares que foram extraídos de acordo com Ritte et al. (2000b). Aproximadamente 40 mg de amido foi homogeneizado em 120µL de tampão (HEPES- KOH 50 mM, pH 7,0), contendo CaCl₂ 1mM e benzamidina 1mM para extração das proteínas ligadas ao grânulo de amido. Após agitação em vortex, toda suspensão foi aplicada diretamente no gel.

3.3.2 Determinação dos teores de amilose e amilopectina do amido isolado.

As determinações do teor de amilose e amilopectina foram feitas utilizando-se o método enzimático da Megazyme, como descrito abaixo.

Pré-tratamento do amido: o amido (25 mg) foi adicionado de 1 mL de dimetilsulfóxido e conduzido à completa dispersão em banho fervente, após o que foi agitado em alta velocidade por 20 segundos em vortex. O amido disperso foi então, levado a banho fervente por 15 minutos, sendo periodicamente agitado. Após 5 minutos a temperatura ambiente, foi adicionado de 6 mL de etanol 95% (v/v), sob agitação contínua por 1 minuto, repousando depois a temperatura ambiente por aproximadamente 15 minutos para precipitação do amido. Após centrifugação a 2000 x g por 10 minutos e total remoção do etanol, 2 mL de dimetilsulfóxido foram adicionados ao pellet e levados a banho fervente por 15 minutos, sob agitação. Logo em seguida, foram adicionados 4 mL do Tampão ConA (Tampão 3), transferido para balão volumétrico de 25 mL e completado o volume com o mesmo tampão (Solução1).

Para determinação de amilose: 1 mL da Solução 1 foi transferida para tubo de 1,5 mL e adicionada de 500 µL de Solução ConA (Frasco 1). Após 1 hora em repouso à temperatura ambiente e centrifugação a 14000 x g por 10 minutos, 1 mL do sobrenadante foi transferido para tubo de centrifuga de 15 mL e adicionado de 3 mL de tampão acetato de sódio 100 mM (pH 4,5). Após 5 minutos sob fervura, as amostras tiveram a temperatura equilibrada a 40°C por 5 minutos e foram adicionadas de 100 µL de amiloglucosidase/ α -amilase (Solução 2), incubados por 30 minutos e centrifugados a 2000 x g por 5 minutos. A 1 mL do sobrenadante foi

adicionado 4 mL de GOD-POD (Reagente B), incubados por 20 minutos a 40°C e a absorbância lida a 510 nm.

Para determinação de amido total: A 500 µL da Solução 1 foram adicionados 4 mL de tampão acetato de sódio 100 mM (pH 4,5) e 100 µL de amiloglucosidase/ α -amilase (Solução 2). Após incubação por 10 minutos a 40°C, uma alíquota de 1 mL foi retirada e 4 mL de GODPOD (Reagente B) foram adicionados, incubados por 20 minutos a 40°C e a absorbância lida a 510 nm. O cálculo do teor de amilose (%) foi feito através da divisão da absorbância da amilose pela absorbância do amido total multiplicado por um fator de 66,8. E o da amilopectina foi obtido por diferença.

3.3.3 Determinação da distribuição de tamanho da cadeia da amilopectina

As cadeias de amilopectina do amido foram desramificadas com isoamilase de *Pseudomonas* sp, de acordo com o procedimento descrito por Jane et al. (1992). A determinação dos comprimentos médios das cadeias ramificadas da amilopectina e sua distribuição foram determinadas de acordo com Koch et al. (1998) e Franco et al. (2002) através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a um detector de pulso amperométrico (HPAEC-PAD), de acordo com os parâmetros descritos por Jayakody et al. (2007). 50 mg de amido mais 2 mL de DMSO 90% foi aquecida em banho com agitação por 1h e resfriada com agitação a temperatura ambiente por 24h. 8 mL de etanol foram adicionados e centrifugados a 4500 rpm por 30 minutos. O sobrenadante foi descartado e ao amido precipitado foram adicionados 9 mL de água deionizada quente. A mistura permaneceu em banho de água fervente sob agitação por 1 h. Após resfriamento, 1 mL de tampão acetato (0,1M, pH 3,5) + 5,63 µL (900 unidades) de isoamilase de *Pseudomonas* foram adicionados. A mistura foi incubada a 40°C por 48h para reação de desramificação.

A enzima foi inativada através da elevação do pH para 6-7 com NaOH 0,1M. A mistura foi novamente aquecida por 15 minutos, resfriada rapidamente e dividida em frascos de vidro com 3 mL cada e congelado. Uma alíquota de 3 mL da amostra congelada contendo 15 mg de amido desramificado foi fervido por 30 minutos, resfriada, sendo apenas 500 µl filtrados (em filtro de 0,45 U de poro, Millipore) e 25 µl injetados no HPLC. O tempo de retenção da maltohexose foi utilizado como padrão.

3.3.4 Caracterização do grânulo de amido por técnicas microscópicas

As micrografias das amostras de amidos isolados das cultivares foram feitas no Laboratório de Caracterização Tecnológica no Departamento de Engenharia de Minas e de Petróleo da Escola Politécnica da USP e, também, no Laboratório de Ultraestrutura Vegetal na Universidade Federal do Rio de Janeiro sob supervisão do prof. Dr. Ricardo Louro.

As amostras foram fixadas em “stubs” de alumínio com fita de carbono dupla face. Em seguida, foi feita a metalização com platina ou ouro (aproximadamente 10 nm de espessura) em equipamento Bal-tec MED-020 Coating System. Os microscópios eletrônicos de varredura utilizados foram:

- LEO Stereoscan 440, onde as imagens obtidas são de elétrons secundários, operando em modo 10 kV.
- FEI (marca) Quanta 600 FEG (modelo); as imagens foram obtidas de elétrons secundários, em modo alto vácuo, operando em 10kV, 5kV e 2kV.
- JEOL JSM-5310, operando em modo 10 KV.

A análise por Microscopia de Força Atômica (AFM), não demanda preparo da amostra, exceto por sua dispersão em água e fixação em placas de silício. As imagens foram obtidas em Microscópio Topometrix Accurex II (Topometrix, Santa Clara, USA), equipado com uma sonda de não-contato. As imagens foram feitas com o auxílio da Profa. Dra. Renata Antoun Simão do Instituto Alberto Luiz Coimbra de Pós-Graduação e Pesquisa de Engenharia-Centro de Tecnologia da UFRJ/RJ

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Etileno e CO₂

A julgar pelo aumento inicial dos teores de respiração e etileno o princípio do climatério das cultivares ocorreu de 6 a 14 dias pós colheita (DPC). O período mais curto foi o da cultivar Mysore e o maior da Pacovan (Figura 5) e nenhuma correlação foi observada com o grupo genômico, uma vez que, cultivares do mesmo grupo genômico tiveram o começo do climatério em períodos distintos, enquanto cultivares inseridas em diferentes classes genômicas foram semelhantes (Figura 5)

Os climatérios das cultivares também foram diferentes, com taxas de produção de etileno e de respiração muito variadas (Figura 5 e Tabela 2). Nas cultivares Nanicão, Terra e Pacovan a taxa respiratória máxima ocorreu junto ou logo após o pico de etileno. Na Mysore este aumento ocorreu um dia antes do pico de etileno (6º DPC). A produção de etileno na cultivar Figo foi crescente alcançando o máximo no 15º DPC e, um pico bem definido de respiração foi visualizado no 11º DPC (Figura 5).

O máximo de produção de etileno (pico) observada nas cultivares foi bem distinto (Tabela 2), indicando que cada cultivar possui o seu próprio ritmo de produção deste regulador e, neste estudo, parece ser independente do grupo genômico. Estas diferenças poderiam estar associadas a fatores de resposta de cada cultivar a presença endógena de etileno.

Figura 5. Perfis de produção de CO_2 ($\blacksquare$) e etileno ($\circ$) das cultivares durante o amadurecimento. Símbolos representam a média ($n=5$) de estimativas e as barras de erro padrão. A seta pontilhada indica o pico de etileno e a seta continua o máximo de respiração. Os grupos genômicos das cultivares são: Nanicação (AAA), Terra (AAB), Mysore (AAB), Pacovan (AAB) e Figo (ABB). A figura da cultivar Nanicação foi adaptada de Peroni (2007).

Tabela 2. Máxima produção de etileno e CO₂ das cultivares de banana

Cultivar	Máxima prod. etileno ($\mu\text{L.kg}^{-1}.\text{h}^{-1}$)	Máxima prod. CO ₂ ($\text{mg.kg}^{-1}.\text{h}^{-1}$)
Nanicão (AAA)	4,0 $\pm$ 0,57* (18)	183,5 $\pm$ 3,64 (20)
Terra (AAB)	10,9 $\pm$ 0,90 (8)	162,3 $\pm$ 18,4 (10)
Mysore (AAB)	12,5 $\pm$ 0,21 (6)	144,8 $\pm$ 5,4 (5)
Pacovan (AAB)	13,3 $\pm$ 1,65 (20)	41,6 $\pm$ 2,58 (23)
Figo (ABB)	7,6 $\pm$ 0,83 (15)	98,6 $\pm$ 5,49 (11)

*Cada valor representa a média de 5 análises e ($\pm$) o erro padrão.

O número entre parênteses corresponde ao DPC onde a máxima produção de etileno e CO₂ ocorreram.

A produção de etileno durante o amadurecimento é altamente regulada pela ação das ACC sintase (ACS) e ACC oxidase (ACO) (PATHAK et al., 2003). Choudhury et al. (2008) analisaram 5 cultivares de banana e observaram que os perfis de atividade da ACO foram similares em todas e condizentes com a produção de etileno. Assumindo que este comportamento da ACO, também, possa ter ocorrido nas cultivares presentes neste estudo, a diferença na produção de etileno, possivelmente, pode estar associada à comportamentos distintos no que se refere a ação da ACS.

Embora a produção de etileno tenha um papel fundamental no processo de amadurecimento de frutos climatéricos (GIOVANNONI, 2001), outros reguladores podem contribuir e/ou atuar conjuntamente com o etileno, influenciando os eventos relacionados ao amadurecimento. Fatias de banana tratadas com ácido indol acético (AIA) (PURGATTO et al., 2002) e com ácido giberélico (ROOSSETTO et al., 2003),

tiveram atraso no seu amadurecimento, juntamente com um retardo na degradação de amido.

Em pêras um aumento na expressão de genes relacionados à biossíntese de auxinas e síntese de etileno foi verificado durante a fase pré-climatérica (anterior ao pico de etileno), indicando uma possível existência de outros mecanismos regulatórios na maturação de frutos climatéricos, além da ação do etileno (TRAINOTTI, TADIELLO, CASADORO, 2007).

Não foi observada qualquer correlação entre a produção máxima de CO₂ e a produção máxima de etileno. O fato de a Nanicão ter tido a mais baixa produção de etileno e a mais alta produção de CO₂ e a Pacovan a mais alta produção de etileno e a mais baixa de CO₂, poderia indicar uma correlação negativa, contudo as cultivares Mysore e a Terra tiveram altas taxas de produção de ambos os gases, o que dificulta estabelecer uma correlação desta natureza nas cultivares aqui analisadas.

4.2 Amido e Açúcares Solúveis

O início da degradação do amido nas cultivares Nanicão e Terra, ocorreu 3 dias antes do pico de etileno enquanto que na Pacovan se iniciou aos 11 DPC, 9 dias antes do pico de etileno (Figuras 5 e 6). Esta diferença pode estar associada à maturidade fisiológica do fruto, que não é bem estabelecida. As cultivares Terra e Figo foram as que acumularam mais amido e as que tiveram os menores percentuais de degradação. Como consequência, os teores residuais de amido no fruto maduro foram altos, o que justifica a necessidade de processamento do fruto antes do consumo. As cultivares Nanicão, Mysore e Pacovan tiveram os maiores percentuais de degradação de amido e os menores teores residuais de amido (Tabela 3).

Figura 6. Perfis de (■) degradação do amido e de (○) acúmulo de açúcares solúveis nas cultivares durante o amadurecimento. As linhas representam à média ($n=3$) de determinações e as barras o erro padrão. Os grupos genômicos das cultivares são: Nanicão (AAA), Terra (AAB), Mysore (AAB), Pacovan (AAB) e Figo (ABB). A figura da cultivar Nanicão foi adaptada de Peroni (2007).

Tabela 3. Teores de amido e de sacarose acumulados nos estágios 1 e 3 e percentual de degradação do amido das cultivares.

Cultivar	Grupo Genômico	Amido (%)		Sacarose (mg.g ⁻¹)		Degradação amido (%)
		Estágio 1	Estágio 3	Estágio 1	Estágio 3	
Nanicao	AAA	19,5±0,4*	5,4±0,29	0,6±0,10	137,2±21,7	72
Terra	AAB	30,7±0,4	15,7±0,2	3,7±1,3	80,2±0,01	49
Mysore	AAB	10,6±0,04	1,4±0,005	3,0±0,2	41,9±0,8	87
Pacovan	AAB	16,0±0,04	1,3±0,054	1,49±0,80	68,2±0,7	92
Figo	ABB	24,6±0,3	8,9±0,3	6,72±0,6	56,5±0,6	64

*Cada valor representa a média (n=3) determinações ± erro padrão. ** foram determinadas comparando os valores médios obtidos entre as matrizes (amido e sacarose) durante o amadurecimento das cultivares. Os DPC correspondentes ao estágio1 são: 0 para Nanicao, 2 para Terra, 1 para Mysore, 1 para Pacovan e 2 para Figo. Os DPC correspondentes ao estágio 3 são: 21 para Nanicao, 10 para Terra, 7 para Mysore, 25 para Pacovan e 16 para Figo

O amido é um polissacarídeo composto por moléculas de glicose unidas por ligações glicosídicas (α -1,4 e α -1,6) e os métodos utilizados para sua quantificação baseiam-se na sua hidrólise a glicose, que pode ser quantificada por diferentes metodologias (McCLEARY et al., 2006; GRANT et al., 2003).

Normalmente utilizamos a hidrólise enzimática, por ser mais específica para amido, e a quantificação da glicose resultante pelo sistema enzimático glicose-oxidase/peroxidase/ABTS. Quando quantificamos o amido das cultivares pelo método enzimático, observamos que os teores de açúcares solúveis do fruto maduro podiam ser explicados pelos teores de amido degradado, para as cultivares Mysore, Nanicão e Pacovan. Entretanto, as cultivares com alto teor de amido residual tinham teores de açúcares solúveis muito maiores do que os teores de amido degradado.

Estas cultivares poderiam ter amido resistente à ação das enzimas, decidimos refazer as análises com a hidrólise ácida e a glicose resultante foi quantificada por Antrona. Pela Figura 7 e a Tabela 4 pode-se ver que o método enzimático estava subestimando o teor de amido das cultivares Terra e Figo.

Figura 7. Degradação de amido das cultivares Terra (AAB) e Figo (ABB) utilizando o método químico (coluna cinza) e enzimático (coluna branca) durante o amadurecimento. As colunas representam à média (n=3) e as barras o erro padrão.

Tabela 4. Comparação e percentual de degradação entre o método enzimático e químico utilizados na determinação de amido nas cultivares de banana

Cultivar	Grupo Genômico	Percentual de degradação de amido (%)	
		Método enzimático	Método químico
Nanicão	AAA	83	77
Terra	AAB	39	49
Mysore	AAB	87	88
Pacovan	AAB	92	91
Figo	AAA	62	64

Associado, a este fato, a grande quantidade de amido residual no final do amadurecimento verificado nestas cultivares, fornece subsídios para duas hipóteses: (1) que a estrutura do amido destas cultivares é diferente das outras cultivares, de maneira que é mais resistente às enzimas que o degradam, ou (2) que o aparato de degradação do amido destas cultivares não é eficiente ou suficiente para a degradação deste amido. Ambas as hipóteses são interessantes e vem de encontro aos objetivos deste trabalho: de encontrar cultivares que se diferenciem do modelo Nanicão no que se refere ao metabolismo do amido.

A sacarose foi o açúcar solúvel predominante em todas as cultivares durante o amadurecimento, sendo acumulado antes da glicose e da frutose. A cultivar com os maiores teores de sacarose no estágio maduro foi a Nanicão, seguida pela Terra, Pacovan, Figo e Mysore (Tabela 3). Nas fases iniciais do amadurecimento, os teores de sacarose da cultivar Figo foram cerca de 3 vezes maiores do que as demais cultivares, contudo este perfil não se manteve e, juntamente com a Pacovan sofreu uma redução em estágios avançados do amadurecimento. Isso indica que outras

enzimas pertencentes ao metabolismo da sacarose, como as invertases, podem, também, estar atuando nesta fase (Tabela 3 e Figura 8).

Figura 8. Acúmulo de glicose (■), frutose (○) e sacarose (▲) das cultivares durante o amadurecimento. Os símbolos representam à média (n=3) e as barras o erro padrão. Os grupos genômicos das cultivares são: Nanicão (AAA), Terra (AAB), Mysore (AAB), Pacovan (AAB) e Figo (ABB)

A sacarose pode ser clivada de modo irreversível pela invertase, ou reversivelmente pela sacarose sintase (SuSy). Entretanto, já foi demonstrado que esta enzima tem sua atividade diminuída durante o amadurecimento da banana (CORDENUNS e LAJOLO, 1995). Apesar de não poder ser descartada uma atividade remanescente da SuSy, já que a degradação da sacarose foi superior ao acúmulo de glicose e frutose neste mesmo período, é mais provável que a

degradação da sacarose observada nas cultivares Figo e Pacovan esteja associada à ação das invertases (WINTER e HUBER, 2000).

Os teores de glicose e frutose mantiveram-se numa proporção de 1:1 durante o amadurecimento, em todas as cultivares, como já observado antes por Cordenunsi e Lajolo, (1995) e Mota et al., (1997). Neste estudo, os percentuais de açúcares solúveis nas cultivares foram de 18% na cultivar Nanicão, seguida pelas cultivares Figo (14%), Pacovan (11%), Terra (9%) e Mysore (8%). Os teores para a Nanicão e Mysore foram semelhantes aos encontrados anteriormente por Mota et al (1997).

4.3 Atividade das amido-fosforilases no sentido de síntese de amido

Com base nos teores de amido foram escolhidas algumas amostras representativas das diferentes fases de amadurecimento das cultivares, para determinar a atividade das enzimas que atuam na degradação do amido e tentar estabelecer sua importância na degradação do amido da banana.

A atividade das amido-fosforilases, no sentido de síntese do amido, foi determinada em gel de poliacrilamida contendo glicogênio como substrato, que permite diferenciar entre as isoformas plastidial e citosólica. Não foi detectada atividade de nenhuma isoforma de fosforilase na cultivar Mysore, nas condições utilizadas. Nas cultivares Nanicão, Terra, Pacovan e Figo foram visualizadas duas bandas com atividade. A primeira banda corresponde a amido-fosforilase citosólica (PHO2) e a segunda a forma plastidial da enzima (PHO1), variando somente a intensidade entre elas (Figura 9). A amido-fosforilase presente no citosol, participaria do metabolismo da maltose juntamente com a DPE2 (LU E SHARKEY, 2006), já forma plastidial (PHO1) pode ter a sua função desempenhada por outras enzimas.

As bandas de atividade referentes à forma citosólica da amido-fosforilase nas cultivares Nanicão, Terra e Figo indicam uma atividade praticamente constante ao longo amadurecimento, resultado similar ao observado por Mota et al. (2002) e Mainardi et al. (2006). A forma plastidial, que teria um papel mais ligado à degradação do amido, apresentou um aumento juntamente com o início do processo de degradação de amido na cultivar Nanicão (15 DPC), indicando um possível papel nesta fase inicial do amadurecimento. Os resultados foram similares aos obtidos por Mainardi et al., (2006).

Figura 9. Atividade das amido-fosforilases obtidas por PAGE-nativo contendo glicogênio (6%) após 1h de incubação em tampão citrato-NaOH 100mM a 37°C os géis foram corado com solução aquosa de iodeto. Os números indica os DPC (dias pós colheita) em que se realizaram os ensaios. Os grupos genômicos das cultivares são: Nanicão (AAA), Terra (AAB), Mysore (AAB), Pacovan (AAB) e Figo (ABB).

4.4 Atividade das α -amilase e β -amilase solúveis

A atividade da α -amilase variou pouco durante o amadurecimento em todas as cultivares, mas variou bastante de intensidade entre cultivares (Figura 10). A Nanicão e a Pacovan teve os menores valores, a Terra e a Mysore valores intermediários e a Figo, valores muito altos. Mas, em geral, a α -amilase teve atividades mais baixas que a β -amilase, na maioria das cultivares, exceto na Figo, que foram muito semelhantes.

O entendimento da degradação de amido, em linhas gerais, é de que existe a necessidade da ação de uma enzima que seja capaz de iniciar a degradação atacando a superfície dos grânulos nativos, seguida pela hidrólise das ligações α -1,6 (enzimas desramificadoras) e finalmente a degradação dos glucanos lineares a monômeros (TETLOW, MORELL e EMES, 2004). A α -amilase é, ainda, a única enzima conhecida capaz de iniciar a degradação de grânulos nativo sendo, mesmo com baixa atividade, capaz de liberar substratos para a ação de outras enzimas. Mas, nos últimos anos, têm surgido na literatura provas de que a degradação do amido transitório de folhas de *Arabidopsis* não depende da ação inicial da α -amilase, o que sugere a presença de outra endoamilase ainda não identificada, ou que neste tecido, a degradação ocorre de maneira independente da α -amilase (SMITH, ZEEMAN, e SMITH, 2005; ZEEMAN et al, 2007^a).

Com os dados obtidos é difícil estabelecer se a enzima é importante no processo de degradação do amido da banana, uma vez que está presente em todos os estágios do amadurecimento, sem aumento detectável de atividade (Figura 10)

Figura 10. Atividade solúvel de alfa-amilase (coluna branca) e beta-amilase (coluna cinza) obtida na polpa das cultivares durante o amadurecimento. DPC (dias pós colheita). As colunas representam à média (n=4) de determinações e a barra o erro padrão. Os grupos genômicos das cultivares são: Nanicao (AAA), Terra (AAB), Mysore (AAB), Pacovan (AAB) e Figo (ABB)

Fica mais fácil estabelecer a importância da β -amilase, que teve uma correlação direta e positiva de atividade com a degradação do amido em todas as cultivares (Figura 10). A atividade da enzima parece ser regulada positivamente pelo etileno já que o máximo de atividade foi obtido no mesmo período em que se observou a maior produção de etileno (Figuras 5 e 10).

As atividades de ambas as amilases foram mais altas na Figo e na Terra, cultivares cujo amido parece ser mais resistente à degradação. Também, a atividade da β -amilase foi também bastante alta na Mysore, cultivar que iniciou a degradação do amido logo após a colheita.

O que reforça a idéia de que a β -amilase é importante na degradação do amido da banana e, associado ao fato de que, com exceção da Mysore, nas demais cultivares foi encontrada a maltose (Figura 11), produto da ação da β -amilase.

Os teores de maltose não refletem a atividade da β -amilase, talvez porque a maquinaria de utilização deste açúcar tenha sido muito mais eficiente na Mysore (não detectada) do que na Pacovan ($0,94 \text{ mg.g}^{-1}$) por exemplo.

A maltose é o principal produto da ação da β -amilase em folhas e parece ser um dos principais produtos da degradação de amido transitório, veiculado do cloroplasto para o citosol (SMITH, ZEEMAN e SMITH, 2005). Lu e Sharkey (2006) verificaram um aumento do conteúdo de maltose concomitante com uma indução da expressão da β -amilase em amido transitório (folha *Arabidopsis*), mas em outros tecidos, como diferentes híbridos de milho, houve uma baixa correlação entre o conteúdo de amido e a presença da maltose (ORAK, 2006). A baixa concentração de maltose observada nas bananas provavelmente indica que este açúcar é exportado para o citosol onde, possivelmente, é utilizado como substrato pela DPE2

ou é rapidamente utilizado como substrato por outras enzimas, como já descrito na literatura para amido transitório (LU e SHARKEY, 2006).

BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

Figura 10. Perfis de acúmulo de maltose durante o amadurecimento das cultivares. Na cultivar Mysore (AAB) não foi detectada maltose. As colunas representam à média (n=3) e as barras o erro padrão. Os grupos genômicos das cultivares são: Nanicão (AAA), Terra (AAB), Pacovan (AAB) e Figo (ABB).

Para que a degradação do grânulo de amido nativo ocorra, é necessário que a(s) enzimas responsáveis por este processo estejam associadas à superfície dos grânulos (BECK e ZIEGLER, 1989; SMITH, ZEEMAN e SMITH, 2005). Com este intuito, foram selecionadas amostras que representassem estágios importantes do amadurecimento (estágio verde (1), estágio intermediário (2) e estágio maduro (3)), para extração das proteínas associadas à superfície dos grânulos e posterior quantificação de atividade das α e β -amilases. Destas amostras, os grânulos de amido foram isolados de maneira a preservar a atividade das enzimas possivelmente

associadas à sua superfície e também evitar a ligação espúria de proteínas que estivessem solúveis no momento da extração.

4.5 Atividade de α e β -amilases ligadas ao grânulo de amido

Para ter uma idéia inicial da atividade hidrolítica total das proteínas associadas à superfície dos grânulos, os grânulos de amido isolados das cultivares, foram aplicados diretamente em gel de poliacrilamida contendo como substrato amilopectina.

Todas as cultivares tiveram, após revelação com iodo, exposições de bandas claras indicando a presença de atividade hidrolítica associada aos grânulos de amido em todos os estágios analisados, variando somente a intensidade das mesmas (Figura 11). As bandas protéicas com maior intensidade foram observadas na cultivar Mysore, seguida pela Terra, Figo e Pacovan.

Figura 11. Atividade hidrolítica total associada ao grânulo de amido obtida por eletroforese em condições não-desnaturantes em gel de acrilamida (7,5%), contendo 0,1% de amilopectina. Em (A) o perfil da cultivar Nanicão(AAA) adaptado de Peroni (2007). Em (B) perfis das cultivares Terra (AAB), Figo (ABB), Pacovan (AAB) e Mysore (AAB). Em (C) perfil da Cultivar Mysore(AAB). Em (A) e (B) as bandas foram reveladas após a coloração com solução de iodo. O gel foi incubado *overnight* em tampão Tris-HCl 100 mM, pH 7,0, contendo $MgCl_2$ 1 mM, DTT 1 mM e $CaCl_2$ 1 mM a 20°C. Em (C) o tempo de incubação foi reduzido (3h) para uma melhor visualização das bandas, as demais condições foram mantidas de acordo com o descrito acima. Os números correspondem aos DPC analisados.

Além da diferença de intensidade, diferentes bandas protéicas estiveram presentes nos estágios analisados (Figura 11). Este fato indica que, possivelmente, diferentes hidrolases ou isoformas estão associadas ao grânulo de amido de banana e, com provável participação no processo de degradação deste amido.

Na cultivar Nanicão, segundo Peroni (2007), as bandas com maior intensidade foram observadas nas fases iniciais que foram diminuindo com o avanço do amadurecimento. Neste estudo, contudo, as demais cultivares tiveram um comportamento diferente.

As bandas protéicas com atividade na cultivar Mysore, tiveram o máximo de intensidade no estágio maduro (4), enquanto que para Terra, Pacovan e Figo as mais intensas foram obtidas juntamente com aumento na produção de etileno e da taxa respiratória (Figura 5), apontando, que o ataque à superfície do grânulo de amido necessita de um desencadeador, e que o etileno e a respiração podem atuar como estes agentes.

A visualização das bandas com atividade hidrolítica total mostrou que havia enzimas com atividade hidrolítica associadas aos grânulos de amido, mas não era possível identificá-las. Assim, os extratos enzimáticos foram ensaiados para atividade das α e β -amilases, utilizando substratos específicos.

A atividade da β -amilase foi mais alta que a da α -amilase nas cultivares Pacovan, Terra e Figo (Figura 12). Nestas cultivares, tanto os perfis de atividade da enzima solúvel quanto os da enzima associada aos grânulos foram semelhantes, aumentando concomitantemente com o amadurecimento (Figura 10 e 12).

Na Mysore, ambas as enzimas tiveram atividade alta desde o primeiro dia após a colheita, que foram mantidas em todos os estágios analisados, condizente com

observado para a atividade hidrolítica total (Figura 11), onde os maiores valores de atividade esteve presente no estágio3 (4 DPC).

Figura 12. Atividade de α e β -amilases associada ao grânulo de amido diferentes estágios do amadurecimento das cultivares. DPC (dias pós colheita). As colunas representam à média (n=3) e a barra o erro padrão. Os grupos genômicos das cultivares são: Nanicão (AAA), Terra (AAB), Mysore (AAB), Pacovan (AAB) e Figo (ABB). Os DPC analisados, em todas cultivares, correspondem aos estágios 1, 2 e 3, respectivamente.

A atividade da α -amilase foi baixa, exceto na Mysore, e compatível com uma suposta ação inicial de degradação do grânulo de amido, que dá lugar à β -amilase e isoamilases, com o avanço do processo da degradação. Supõe-se que na Mysore a atividade da α -amilase seja mais exacerbada pela ausência do aparato auxiliar das fosforilases (Figura 9). A julgar pelos resultados mostrados na Figura 10, as hidrolases tem um papel bastante importante na degradação do amido da cultivar Mysore.

A presença de atividade associada aos grânulos de α e β -amilases concomitante com a atividade hidrolítica obtida dos grânulos de amido isolados das cultivares indicam que as enzimas já estão associadas à superfície do grânulo de amido de banana desde o estágio verde, como já descrito por Peroni (2007).

Peroni (2007), utilizando técnicas de imunolocalização, confirmou a presença de proteínas relativas às α - e β -amilases na superfície dos grânulos de amido isolados da cultivar Nanicão. Estas observações abrem espaço para questionamentos como o que segue: “se as enzimas já estão associadas ao grânulo de amido, qual é o sinal que desencadeia o início do processo de degradação de amido?”. Este assunto é ainda muito pouco conhecido.

Os resultados obtidos até o momento apontam para uma efetiva participação tanto da α -amilase quanto da β -amilase na degradação do amido da banana. Mas ainda se desconhece quantas isoformas das enzimas conseguem transpor a membrana do amiloplasto e participar deste processo. Acredita-se que para transpor esta membrana, a enzima deve possuir em sua estrutura um peptídeo de trânsito (SPARLA et al, 2006) que seria responsável pelo transporte da proteína para o interior do plastídio onde ocorre a degradação.

Outra maneira de conhecer mais sobre o processo de degradação do amido é estudar a estrutura do grânulo e as modificações que sofre pela ação das enzimas. A estrutura do grânulo do amido pode ser mais ou menos acessível à associação de enzimas à sua superfície para o processo de degradação. Por exemplo, em turions (REIMAN et al 2002), a ligação da α -amilase à superfície do grânulo antecede o início da degradação de amido. Contudo, outros fatores como teor de amilose, distribuição de tamanho da cadeia de amilopectina e a presença de componentes minoritários, também, podem influenciar na associação de proteínas a superfície dos grânulos bem como, na susceptibilidade do mesmo à degradação. Assim, associado ao estudo da atividade das enzimas ligadas à degradação do amido investigamos as propriedades dos grânulos de amido das cultivares, isolada de amostras em pontos chave da degradação.

4.6 Estrutura do grânulo

4.6.1 – Amilose

As mudanças que ocorrem nos grânulos de amido são mais pronunciadas nas fases finais do amadurecimento. Por esta razão, para esta análise, somente os estágios 1 e 3 foram selecionados. Os teores de amilose nos grânulos de amido variaram de 15 a 24% entre cultivares. As cultivares Pacovan e Terra tiveram os maiores teores de amilose enquanto a Nanicão e a Mysore tiveram os menores (Tabela 5).

Tabela 5. Teores de amilose e amilopectina obtidos nas cultivares nos estágio verde e maduro.

Cultivar	Grupo genômico	Amilose %	
		Estágio 1**	Estágio 3
Nanicão	AAA	15,14 $\pm$ 0,46*	15,60 $\pm$ 0,32
Terra	AAB	21,21 $\pm$ 3,12	21,68 $\pm$ 0,85
Mysore	AAB	15,18 $\pm$ 0,70	14,84 $\pm$ 0,55
Pacovan	AAB	18,90 $\pm$ 1,20	20,70 $\pm$ 0,84
Figo	ABB	24,10 $\pm$ 1,00	18,50 $\pm$ 0,32

*Cada valor representa a média de 2 extrações $\pm$ erro padrão. **Os DPC correspondentes ao estágio 1:são: 0 para Nanicão, 2 para Terra, 1 para Mysore, 1 para Pacovan e 2 para Figo. Os DPC correspondentes ao estágio 3 são: 21 para Nanicão, 10 para Terra, 7 para Mysore, 25 para Pacovan e 16 para Figo

As cultivares Nanicão e Mysore tiveram teores de amilose muito próximos e com pouca variação entre os estágios de amadurecimento. O mesmo foi verificado para as cultivares Terra e Pacovan. Este fato indica uma distribuição uniforme da superfície ao centro do grânulo. A Figo teve o maior teor de amilose entre cultivares que diminuiu, aproximadamente, 23% com o amadurecimento. Existem duas possíveis razões para esta variação: distribuição desigual da amilose na estrutura do grânulo ou atuação de enzimas que degradam preferencialmente amilose, ao invés da amilopectina.

Normalmente, o teor de amilose varia entre 20 e 30% no total de polissacarídeos do grânulo de amido (SMITH, DENYER e MARTIN, 1997). A literatura reporta valores entre 16 e 41% para o amido da banana (KYISU e HOOD, 1981; GARCIA e LAJOLO, 1988; WALISZEWSKI et al, 2003). Esta grande variação

entre os teores de amilose observados em banana pode ter várias razões: metodologias de determinação, diferentes cultivares, diferentes estágios de amadurecimento do fruto, etc. Dentre os métodos são utilizados para determinação de amilose em amido os quais se diferenciam, principalmente, nas propriedades dos componentes majoritários presentes no amido. A habilidade do iodo de formar complexos com a amilose é base para alguns métodos, contudo o iodo também pode se ligar a cadeias longas de amilopectina ($DP < 60$), o que pode superestimar o valor de amilose presente na amostra. Outros métodos como o utilizado neste estudo, se baseiam na ligação e conseqüente precipitação da amilopectina na presença de concavalina-A (CHEN e BERGMAN, 2007).

Como as cultivares Terra e Figo têm uma degradação parcial do amido, procuramos selecionar por tamanho o amido destas cultivares, porque, supostamente, grânulos menores teriam estrutura ainda em formação e mais susceptíveis à degradação. A escolha destas cultivares foi baseada no seu alto teor de amido inicial e final e pelos teores de amilose dos grânulos (Figura 8 e Tabela 5). A Nanicão foi utilizada como parâmetro para comparação

Os amidos isolados das cultivares Terra, Nanicão e Figo foram fracionados em tamises e os teores de amilose nas frações geradas (maiores que 140 μm , entre 140 e 30 μm , menores que 30 μm), foram estimados para verificar se grânulos com tamanhos diferentes teriam alteração em sua estrutura nos diferentes estágios do amadurecimento.

A cultivar Nanicão não teve variação dos valores de amilose nas diferentes frações de tamanho do amido. Como os valores das frações obtidas no estágio 1 não tiveram grandes variações quando comparadas com os grânulos sem fracionamento, optou-se por não realizar a análise no estágio 3 (Tabela 6).

Tabela 6. Teores de amilose (%) obtidos em amido isolado e fracionado das cultivares Terra, Figo e Nanicao nos estágio verde e maduro.

Cultivar	Grupo Genômico	Estágio 1			Estágio 3		
		>140 µm	<140 e >30 µm	<30 µm	>140 µm	<140 e >30 µm	<30 µm
Nanicao	AAA	15,4±1,4*	17,3±1,0	15,3±0,8			
Terra	AAB	21,5±0,6	22,5±0,1	23,1±0,5	22,1±0,6	22,1±0,04	10,1±0,1
Figo	ABB	23,7±0,9	24,0±1,3	22,7±0,1	20,5±0,5	22,0±0,5	23,2±0,7

*Cada valor representa a média de 2 extrações e (±) o desvio padrão. Os DPC correspondentes ao estágio 1: são: 0 para Nanicao, 2 para Terra e 2 para Figo. Os DPC correspondentes ao estágio 3 são: 22 para Nanicao, 10 para Terra e 16 para Figo.

Na cultivar Terra, a fração que continha grânulos menores que 30 µm no estágio 3, teve um teor de amilose aproximadamente 2 vezes menor que as outras frações que tiveram valores próximos, enquanto que no estágio verde estas diferenças entre as frações não foram observadas (Tabela 5 e 6).

Na cultivar Figo (Estágio 1), as frações que continham grânulos maiores de 140 µm e entre 140-30 µm tiveram os maiores teores de amilose do que as respectivas frações, no estágio maduro. Contudo a fração com grânulos menores de 30 µm, teve o maior teor de amilose no estágio 3 (Tabela 6).

Terra e Figo tiveram alterações no teor de amilose na fração que continha grânulos menores que 30 µm, indicando que o tamanho dos grânulos também pode influenciar no processo de degradação de amido, já que segundo Jenkis e Donald (1995) a amilose têm um possível papel na desestruturação do grânulo através da redução da região amorfa do grânulo.

4.6.2 – Amilopectina x cristalinidade

A amilopectina tem um papel importante na formação da estrutura do grânulo de amido e também, contribui nas suas propriedades funcionais (BELLO-PEREZ et al, 1995).

Neste estudo todas as cultivares tiveram cristalinidade tipo C, ou seja, ambos os polimorfos A e B foram encontrados, variando somente a proporção de cada um. No estágio 1, nas cultivares Terra e Nanicão, os polimorfos do tipo B foram predominantes e aumentaram ligeiramente com o avanço do amadurecimento (Tabela 7).

Tabela 7. Grau de cristalinidade e proporção de polimorfos (A e B) presentes nas cultivares nos estágios 1 e 3.

Grau de cristalinidade (%)	NANICÃO			TERRA			MYSORE			PACOVAN			FIGO		
	Estágio*			Estágio			Estágio			Estágio			Estágio		
	1	3		1	3		1	3		1	3		1	3	
Cristalinidade	23.6	21.1		30.5	26.2		21.8	21.5		19.9	19.3		24.7	23.8	
Cristal A	45	39		40	38		59	59		35	34		95	56	
Cristal B	55	61		60	62		41	41		65	66		5	44	

*Os DPC correspondentes ao estágio 1: são: 0 para Nanicão, 2 para Terra, 1 para Mysore, 1 para Pacovan e 2 para Figo
Os DPC correspondentes ao estágio 3 são: 21 para Nanicão, 10 para Terra, 7 para Mysore e 25 para Pacovan e 16 para Figo

Nas cultivares Pacovan e Mysore as proporções entre os polimorfos mantiveram-se entre os dois estágios, sendo o polimorfo A predominantes na Mysore e o polimorfo B predominante na Pavovan. A maior mudança na proporção de polimorfos foi a ocorrida na cultivar Figo (Tabela 7). Os polimorfos B aumentaram de 5% para 44% com a degradação do amido, o que mostra uma degradação preferencial de regiões dos grânulos em que os polimorfos A eram predominantes.

Segundo Bogracheva et al.1998, em amido tipo C (ervilha) o polimorfo B estão arranjados no centro dos grânulos enquanto o A esta na parte externa. Assumindo que este arranjo também acontece na cultivar Nanicão, é possível concluir que tanto o aumento do polimorfo B no estágio 3 como a redução da cristalinidade são conseqüência da degradação do polimorfo A da parte externa dos grânulos.

Nas cultivares Mysore e Pacovan, provavelmente, outro arranjo dos polimorfos deve ocorrer, ou ambos são degradados ao mesmo tempo, já que nos estágios 1 e 3 pouca alteração foi verificada.

A Figo teve um aumento considerável de polimorfo tipo B no estágio maduro, o qual pode ser resultado da degradação do polimorfo tipo A segundo o modelo de distribuição dos polimorfos proposto por Bogracheva et al. (1998) em amido de ervilha, contudo, pouca mudança no padrão de cristalinidade foi visto. De acordo com Sanderson et al (2006) outro fator relevante que interfere no grau de cristalinidade é a distância entre o ponto da ramificação e o início da dupla hélice. Este espaço contribui para uma maior ou menor rigidez (cristalinidade) do empacotamento da estrutura da dupla hélice (DANIELS e DONALD, 2003), o que poderia resultar como visto nesta cultivar numa não alteração no perfil de cristalinidade.

Amidos do tipo A tem como característica a predominância de cadeias curtas de amilopectina, quanto comparadas com amidos do tipo B (HANASHIRO, ABE e HIZUKURI, 1985). A distribuição de tamanho das ramificações da amilopectina reflete a sua organização dentro do grânulo e as cultivares não tiveram grandes alterações na sua distribuição (Figura 13), com exceção da Figo. Nesta cultivar, ocorreu uma redução acentuada de cadeias com DP12-13 (em inglês, degree of polymerization) no estágio 3. Nas demais cultivares, cadeias curtas (DP 12-14) foram predominantes em ambos os estágios. Contudo um pequeno pico na região próxima DP 40 foi obtido em todas as cultivar.

De acordo com LINDEBOOM, CHANG e TYER (2004) esta distribuição, onde distintas populações são encontradas, é conhecida como bimodal e amidos de diferentes fontes botânicas apresentam esta mesma característica (HANASHIRO, ABE e HIZUKURI, 1985; BELLO-PEREZ et al., 1995).

Figura 13. Distribuição de tamanho da cadeia de amilopectina nas cultivares de banana nos estágios 1 e 3. DPC (dias pós-colheita). Os números representam os DPC correspondentes aos estágios analisados. Os grupos genômicos das cultivares são: Nanicão (AAA), Terra (AAB), Mysore (AAB), Pacovan (AAB) e Figo (ABB). DP (Grau de Polimerização).

A diferença entre a distribuição de tamanho de cadeia da amilopectina é apresentada na Figura 14. As cultivares Nanicão e Figo foram as que tiveram maior redução das cadeias curtas, seguida pela demais cultivares. Estas mudanças indicam que durante o amadurecimento de banana o grânulo de amido sofre alterações, que são independentes da cultivar.

Figura 14. Diferenças na distribuição de tamanho da cadeia de amilopectina nas cultivares de banana. A diferença foi calculada subtraindo os valores de distribuição de tamanho de cadeia entre os estágios 1 e 3. Os grupos genômicos das cultivares são: Nanicão (AAA), Terra (AAB), Mysore (AAB), Pacovan (AAB) e Figo (ABB). DP (grau de Polimerização).

Entretanto, quando se observa (Tabela 8) a porcentagem de distribuição das cadeias curtas (DP 6-12), médias (DP 13-24), longas (DP- 25-36) e muito longas (DP >37), é possível constatar que não há grandes variações entre os estágios 1 e 3. Isto indica que, possivelmente, as alterações verificadas na distribuição das cadeias de amilopectina ocorrem ao longo do grânulo de maneira uniforme.

Tabela 8. Porcentagem de distribuição das frações de cadeia da amilopectina nos dois estágios de amadurecimento.

DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHO DE CADEIA (%)	NANICÃO			TERRA			MYSORE			PACOVAN			FIGO		
	Estágio * 1	Estágio 3	Estágio 1	Estágio 3	Estágio 1	Estágio 3	Estágio 1	Estágio 3	Estágio 1	Estágio 3	Estágio 1	Estágio 3	Estágio 1	Estágio 3	Estágio 3
DP 6-12	26	25	27	28	25	27	25	27	29	28	28	25	28	25	
DP 13-24	56	56	55	52	56	54	56	54	52	52	52	54	52	54	
DP 25-36	13	13	14	13	13	13	13	13	12	13	13	14	13	14	
DP ≥ 37	4	5	6	6	6	6	6	6	7	7	7	4	7	4	

*Os dia pós-colheita correspondentes ao estágio1são: 0 para Nanicao,2 para Terra, 1 para Mysore, 1 para Pacovan e 2 para Figo. Para o estágio 3 são: 21 para Nanicao, 10 para Terra, 4 para Mysore, 21 para Pacovan e 14 para Figo.

4.7 Caracterização microscópica da superfície dos grânulos de amido

4.7.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A utilização da Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) teve como objetivo caracterizar o amido das cultivares durante o período de degradação quanto ao tamanho, formato e a natureza da superfície dos grânulos.

A comparação das imagens dos amidos isolados de bananas nos estágios 1 e 3, permitiu a observação de depressões e exposições dos anéis de crescimento os quais podem fornecer informações sobre a atuação das enzimas de degradação, com o avanço do amadurecimento

As micrografias obtidas através da MEV revelaram que a maioria das cultivares no estágio 1 (recém colhidas), era composta por grânulos com superfície lisa, sem sinais visíveis de corrosão (Figura 15). Somente em grânulos isolados da Mysore apareceram depressões (Figura 15H), que interpretamos como o início da degradação do amido, o que é coerente com a mobilização do amido imediatamente após a colheita (Figuras 5 e 6), desta cultivar).

As micrografias revelaram que a forma predominante nas cultivares Nanicão e Pacovan é de grânulos regulares e pequenos. Na Mysore, além de pequenos os grânulos visualizados tiveram a superfícies irregulares.

As cultivares Terra e Figo foram as que apresentaram populações distintas de grânulos desde pequenos e arredondados a grandes e alongados e, contudo a superfície era muito lisa. Millan-Testa et al. (2005), também, observaram em grânulos de banana pertencente ao subgrupo *Musa paradisiaca* resultados semelhantes, contudo os grânulos variaram de 8 a 20 μm .

Nos grânulos isolados das cultivares em amadurecimento (estágio 3) (Figura 16), foi possível ver corrosões na forma de estrias e depressões, esta última mais pronunciado na Mysore. Garcia e Lajolo (1988) observaram uma predominância de grânulos alongados, esféricos ou ovais, e também, verificaram uma redução dos grânulos com 20-100 μm e aumento de grânulos menores ($<10 \mu\text{m}$) com o avanço do amadurecimento. Nas cultivares aqui estudadas, estas três formas também foram visualizadas. Garcia e Lajolo (1988) observaram que estas estrias seriam, provavelmente, produto da ação de enzimas na superfície do grânulo, indicando um mecanismo de exo-corrosão (Figura 16).

As estrias foram predominantes na região apical dos grânulos de amido das cultivares, contudo nas cultivares Figo e Terra (Figuras 16 e 17) estas evidências de degradação foram bem menos presentes, indicando que seus grânulos possuem uma arquitetura diferente ou que o aparato de degradação é diferente das demais cultivares (Figura 16). Além disso, não foram visualizados grânulos com extensiva degradação, como os vistos na Mysore, Nanicão e Pacovan, na Terra e Figo.

De acordo com Kim et al (2008) grânulos nativos de batata, milho e arroz quando submetidos à hidrólise apresentam uma velocidade de degradação inversamente proporcional ao tamanho dos grânulos, o que indica que, possivelmente, nas cultivares Terra e Figo a degradação pode ter ocorrido preferencialmente nos grânulos pequenos, mais susceptíveis, que teriam desaparecido com o avanço do amadurecimento, já que houve uma degradação de pelo menos 49% na Terra.

Outro fator que pode ter contribuído para uma preferencial degradação em grânulos pequenos, na cultivar Terra, é o baixo teor de amilose verificado na fração

que continha grânulos pequenos ($<30\mu\text{m}$), já que segundo Cheetham e Tao (1997) amido com reduzido teor de amilose tendem a ser mais frágeis.

Todas as cultivares apresentaram a exposição dos anéis de crescimento com intervalos mais ou menos regulares com o avanço do amadurecimento (Figura 17).

Figura 15. Micrografias por microscopia eletrônica de varredura da superfície do grânulo de amido das cultivares no estágio 1. De A-F têm-se uma visão geral da distribuição dos grânulos e de G-H detalhes da superfície dos grânulos. Os números indicam os DPC correspondentes ao estágio 1. DPC (dias pós-colheita). Grupos genômicos das cultivares são: Nanicao (AAA), Terra (AAB), Mysore (AAB), Pacovan (AAB) e Figo (ABB).

Figura 16. Micrografias da superfície do grânulo de amido das cultivares no estágio 3.. De A-E têm-se uma visão geral da distribuição dos grânulos. De F-L detalhes do perfil de degradação visualizado nos grânulos de amido das cultivares. Os números indicam os DPC correspondentes ao estágio 3. DPC (dias pós-colheita). Grupos genômicos das cultivares são: Nanicao (AAA), Terra (AAB), Mysore (AAB), Pacovan (AAB) e Figo (ABB).

Figura 17. Micrografias da superfície do grânulo de amido das cultivares no estágio 3 destacando-se os a exposição dos anéis de crescimentos. Os números indicam os DPC correspondentes ao estágio 3. Grupos genômicos das cultivares são: Nanica (AAA), Terra (AAB), Mysore (AAB), Pacovan (AAB) e Figo (ABB).

4.7.2 Microscopia de Força Atômica

A utilização da microscopia de força atômica (MFA) teve como objetivo auxiliar no entendimento das mudanças que ocorreram na estrutura dos grânulos de amido e se estas mudanças eram apenas resultado da corrosão da superfície como sugeriam as imagens obtidas por MEV. Assim, grânulos nativos e íntegros obtidos de banana verde e madura foram analisados por MFA.

Por ser uma análise muito demorada, optou-se pelas cultivares Nanicão, Terra e Figo, já que cada uma representa um grupo genômico diferente e também, devido ao comportamento das cultivares durante o processo de degradação de amido.

As imagens topográficas (Figura 18B) apontam para diferenças no arranjo dos componentes na superfície do grânulo de amido. A cultivar Nanicão teve a exposição de uma superfície mais lisa quando comparada com as demais cultivares (Terra e Figo) onde as presenças de pequenas estruturas foram vistas, dando a superfície um caráter mais rugoso. Entretanto quando as imagens foram analisadas por contraste de fase, a rugosidade não foi muito acentuada, principalmente, nas cultivares Nanicão e Figo. A ausência de uma imagem com uma contraste de fase intenso indica, como já esperado, superfícies lisas pouca alteração na superfície dos grânulos de amido, como já visto por MEV (Figura 18A). O que condiz com as amostras de bananas recém colhidas

A utilização de técnicas microscópicas na investigação da superfície dos grânulos de amido tem sido extensivamente reportada pela literatura (Garcia e Lajolo, 1988; Cordenunsi, 2004). Entretanto, estas técnicas demandam preparo de amostra que podem interagir ou alterar a superfície do amido conduzindo a falsas

interpretações. A MFA é uma técnica relativamente nova utilizada para exploração de superfícies. A vantagem desta técnica é a possibilidade de usar material sem necessidade de preparo, minimizando assim a interferência da superfície com outros materiais (JUSZCZAK, FORTUNA e KROK, 2003).

Baldwin et al. (1998), analisaram por MFA amido de diferentes fontes botânicas. O amido de batata revelou uma superfície mais rugosa enquanto a do trigo foi mais macia (lisa). Neste mesmo estudo, foi relatada a exposição de estruturas denominadas bloquetes. Nos amidos da cultivar Terra (Figura 18A), apareceram estruturas que podem ser interpretadas como sendo bloquetes.

B I B L I O T E C A
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

Figura 18. Imagens de MFA obtidas por modo não contanto mostrando a superfície de grânulo de amido das cultivares no estágio 1. Em (A) imagens de contraste de fase em (B) imagens topográficas. Parâmetros das imagens. Nanicão (AAA): varredura de 5,0 μm x 5,0 μm e variação de 396,7 nm altura de; Figo (ABB): varredura 4,2 μm x 4,2 μm e variação de altura de 352,4 nm; Terra (AAB): varredura de 3,0 μm x 3,0 μm e variação de altura 369,5 nm. Os DPC correspondentes ao estágio 1 são: 0 para a Nanicão, 2 para Terra e 2 para Figo.

No estágio 3, foi possível verificar mudanças na superfície dos grânulos de amido das cultivares Nanicão, Terra e Figo como já demonstrando anteriormente pela micrografias obtidas por MEV (Figura 16 e 17). Contudo com uso da técnica de Microscopia de Força Atômica algumas informações adicionais da superfície puderam ser obtidas (Figura 19).

As imagens de contraste de fase indicam que, possivelmente, os componentes expostos na superfície dos grânulos de amido possuem diferença na sua composição (Figura 19A). Segundo Ridout et al. (2004) as regiões claras são menos rígidas que as escuras, ou seja, correspondem a diferentes regiões do grânulo de amido.

A imagem de contraste de fase da Nanicão não teve grandes variações como observada na Figo e Terra, o que indica que, embora os componentes presente do grânulo possuem a mesma composição, possivelmente estão arranjos de diferentes maneiras que por sua vez influenciaria no processo de degradação de amido (Figura 19A).

Estruturas esféricas, condizente com os bloquetes observados por Ridout et al. (2002) em ervilha, também, foram visualizadas em todas as cultivares (Figura 20). Ayoub, Ohtani e Sugiyama (2006) observaram a presença de estruturas globulares com diâmetro de aproximadamente 70nm as quais os autores denominaram como bloquetes. Valores próximos foram observados nos bloquetes da cultivar Nanicão que tiveram tamanhos de aproximadamente 70-100nm, enquanto a Terra e a Figo os tamanhos dos bloquetes foram maiores com valores acima de 150nm.

Ridout et al (2004) observaram que mutantes de ervilha com maior teor de amilose possuem uma alteração na formação dos bloquetes os quais tendem a serem mais largos e alongados, como aos observados na cultivar Figo (Figura 20).

Figura 19. Imagens de MFA obtidas por modo não-contato mostrando a superfície de grânulo de amido das cultivares Nanicão, Figo e Terra no estágio 3. Em (A) imagens de contraste de fase em (B) imagens topográficas. Parâmetros das imagens. Nanicão (AAA): varredura de 5,0 μm x 5,0 μm e a diferença de cor indica uma variação de 1,5 μm de altura; Figo (ABB): varredura 5,3 μm x 5,3 μm e a diferença de cor indica uma variação de altura de 593,4 nm; Terra (AAB): varredura de 6,0 μm x 6,0 e a diferença de cor indica uma variação 413,4 nm de altura. Os DPC correspondentes ao estágio 3 são: 21 para a Nanicão, 10 para Terra e 14 para Figo.

Figura 20. Imagens de MFA obtidas por modo não-contato mostrando detalhes da superfície de grânulo de amido das cultivares Nanicão, Figo e Terra no estágio 3. Há exposição de estruturas globulares e uniformes por toda a superfície. Parâmetros da varredura. Nanicão (AAA): varredura de $2,6\text{ }\mu\text{m} \times 2,6\text{ }\mu\text{m}$ e a diferença de cor indica mudança na rigidez do material; Figo (ABB): varredura $2,8\text{ }\mu\text{m} \times 2,8\text{ }\mu\text{m}$ e a diferença de cor indica mudança na rigidez do material; Terra (AAB): varredura de $2,0\text{ }\mu\text{m} \times 2,0\text{ }\mu\text{m}$ e a diferença de cor indica mudança na rigidez do material. Os DPC correspondentes ao estágio 3 são: 21 para a Nanicão, 10 para Terra e 14 para Figo.

A exposição de regiões com diferentes contrastes de fase e com intervalos regulares de aproximadamente 200nm, que podem ser associadas aos anéis de crescimento foram vistos somente na cultivar Terra (Figura 21). Em ervilhas, a visualização dos anéis de crescimento observado por Ridout et al. (2004) apresenta algumas regiões descontínuas, o que também foi visto na Terra, neste estudo. Segundo os autores uma provável razão para visualização destas regiões, ocorre devido à orientação do campo de varredura.

Baker, MILLES e HELBERT (2001) analisando a estrutura do grânulo de amido de milho por MFA observaram a presença de anéis de crescimento com diferentes comprimentos, aqueles com espaçamento de 450nm e anéis mais finos com comprimento de 100-200nm.

Figura 21. Imagens de MFA obtidas por modo não-contato mostrando detalhes da superfície de grânulo de amido da cultivar Terra. Em (A) há exposição de estruturas semelhantes aos anéis de crescimento. Em (B) histograma onde pode ser visto o comprimento e altura dos anéis de crescimento e a sua regularidade. Terra (AAB): varredura de 6,0 μm x 6,0 μm e a diferença de cor indica mudança na rigidez do material. Análise realizada no estágio 3 e o correspondente ao 10 DPC.

Estruturas diferentes dos bloquetes com formatos alongados com aproximadamente 1 μm foram observados nas cultivares Nanicão e Figo (Figura 21) indicando que a estrutura fina do grânulo de amido possui, possivelmente, um outro arranjo ainda pouco explorado neste estudo e desconhecido na literatura.

Figura 22. Imagens de MFA obtidas por modo não-contato mostrando detalhes da superfície de grânulo de amido das cultivares Nanicão e Figo. Estruturas alongadas com diferentes tamanhos podem observadas. Nanicão (AAA): varredura de 8,0 μm x 8,0 μm e a diferença de cor indica mudança na rigidez do material; Figo (ABB): varredura 10 μm x 10 μm e a diferença de cor indica mudança na rigidez do material; Terra (AAB): varredura de 2,0 μm x 2,0 μm e a diferença de cor indica mudança na rigidez do material. Análise realizada no estágio 3 e os correspondentes são: 21 para Nanicão e 14 para Figo.

Embora a MFA tenha mostrado detalhes da estrutura do amido que são ainda desconhecidos, é preciso muito mais análises para que sejam representativas de maneira que possamos tirar conclusões.

Baseando-se nos dados disponíveis na literatura para a cultivar Nanicão e os dados gerados nesse estudo, é possível propor o seguinte esquema de degradação de amido em bananas

Figura 23. Esquema proposto para o mecanismo de degradação de amido em bananas. DPE. (Transglicosidade). Glicose-1P(Glicose 1-Fosfato). A linha tracejada indica a parte da via de degradação que possivelmente ocorre e, a linha contínua indica a parte da via de degradação conhecida. Em vermelho- possíveis produtos, principais, da degradação de amido. Em negrito- enzimas com atividade já mensurada em bananas. Os círculos tracejados representam os transportadores responsáveis pela passagem dos produtos de degradação para o citosol.

5 CONCLUSÕES

As cultivares se diferenciaram quanto aos teores de amido acumulado no crescimento e degradado no amadurecimento. A sacarose foi o açúcar predominante em todas as cultivares, em consequência da degradação do amido, seguidas de glicose e frutose, embora os teores individuais dos açúcares tenham sido diferentes entre cultivares.

Foram detectadas atividades de α e β -amilases solúveis e associadas aos grânulos de amido, o que indica que estas enzimas participam de maneira efetiva da degradação do amido da banana. As cultivares se diferenciaram quanto às atividades máximas de ambas as enzimas. A β -amilase parece ser regulada positivamente pelo etileno. As fosforilases parecem ter um papel secundário nesta degradação. O aparato enzimático parece ser mais reforçado nas cultivares mais resistentes à degradação.

Os grânulos de amido das cultivares resistentes à degradação, Terra e Figo, se diferenciaram das demais cultivares, pelo tamanho (maiores), formato (mais longos e arredondados), pelo teor de amilose (Figo) e pelos sinais de corrosão superficial dos grânulos. A cristalinidade dos grânulos destas cultivares também foi diferente entre estágios de amadurecimento, o que pressupõe maior dificuldade à degradação enzimática. Assim, a estrutura dos grânulos talvez seja a chave para sua resistência à degradação.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Pesquisa de Orçamentos Familiares - (POF-2002-2003) site: www.ibge.gov.br.
2. AYOUB, A.; OHTANI, T.; SUGIYAMA, S., Atomic Force Microscopy Investigation of Disorder Process on Rice Starch Granule Surface, **Starch/Stärke**, v.58, p. 475-479, 2006.
3. BALDWIN, P. M.; ADLER, J.; DAVIEST, M. C.; MELIA, C. D. High resolution imaging of starch granule surfaces by Atomic Force Microscopy, **Journal of Cereal Science**, v. 27, p. 255-265, 1998.
4. BALLESTERO, S. M. *Bananos: Cultivo y comercialización*. 2.ed. San José, Costa Rica: Litografia e Imprenta Lil, p.674, 1992.
5. BARRY, C. S.; GIOVANNONI, J. J., Ethylene and fruit ripening, **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 26(2), p.143-159, 2007.
6. BAKER, A. A.; MILES, M. J.; HELBERT, W., Internal structure of the starch granule revealed by AFM. **Carbohydrate Research**, v.330, p. 249-256, 2001.
7. BEAUDRY, R. M.; SEVERSON, R. F.; BLACK, C. C.; KAYS, S. J., Banana Ripening: Implications of changes in Glicolity and Gluconeogenic Carbon Flux, and Fructose 2,6- Biphosphate Concentration, **Plant. Physiology**, v. 91, p 1436-1444, 1989.
8. BECK, E.; ZIEGLER, P., Biosynthesis and Degradation Of Starch In Higher Plants, *Annu. Rev. Plant Physiol.* **Plant Molecular Biology**, vol.40. p. 95-117, 1989.
9. BEECKER, A.B; KENDE, H, Ethylene: A gaseous signal molecule in plants **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 18, p. , 2000.
10. BELLO-PÉREZ, L. A.; PAREDES- LÓPEZ, O.; ROGER, P; COLLONNA, P, Amylopectin properties and fine structure, **Food Chemistry**, v.56 (2), p. 171-176, 1995.
11. BELLO-PÉREZ, L.A.; DE FRANCISCO, A.; AGAMA-ACEVEDO, E.; GUTIERREZ-MERAZ, F.; GARCÍA-SUAREZ, F.J.L., Morphological and Molecular Studies of

Banana Starch, **Food Science Technology International**, v. 11(5), p. 367-372, 2005.

New York, 2º edição, 1974.

12. BOZONNET, S.; BONSAGER, B.; KRAMHOFT, B.; MORI, H.; HACHEM, M. A.; WILLEMO, M.; JENSEN, M.; FUKUDA, K.; NIELSEN, P. K.; JUGE, N.; AGHAJARI, N.; TRANIER, S.; ROBERT, X.; HASER, R.; SVENSSON, B., Review: Binding of carbohydrates and protein inhibitors to the surface of α -amylases, **Biologia Bratislava**, v.60(16). p. 27-36, 2005 .
13. BIERHALS, J.D.; LAJOLO, F.M. CORDENUNSI, B.R.; NASCIMENTO, J.R.O. Activity, cloning and expression of an isoamylase-type starch-debranching enzyme from banana fruit. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.52, p.7412-7418, 2004).
14. BULEON, A.; COLONNA, P.; PLANCHOT, V.; BALL, S. Starch granules: structure and biosynthesis. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.23, p.85-112, 1998.
15. BRADFORD, M.M. Rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, San Diego, v.72, p.248-254, 1976.
16. BRESOLIN, N. S. ;LI, Z. ;KOSAR-HASHEMI, B.;TETLOW I. J. ;CHATTERJEE, M.; RAHMAN, S. ;MORELL, M. K.;HOWITT, C. A., Characterisation of disproportionating enzyme from wheat endosperm, **PLANTA**, v.224(1), p. 20-31, 2006.
17. BOGRACHEVA, T.Y.; MORRIS, V. J.; HEDLEY, C. L.; RING, S. G., The Granular Structure of C-Type Pea Starch and Its Role in Gelatinization, **Biopolymers**, v. 45, p. 323-332, 1998.
18. CANO, M. P.; ANCOS,B.; MATALLANA, M. C.; MONTANA, C.; REGLERO, G.; TABERA, **Journal of Food Chemistry**, v.59(3), p.411-419,1997.

19. CHEN, M.-H.; BERGMAN, C. J., Method for determining the amylose content, molecular weights, and weight- and molar-based distributions of degree of polymerization of amylose and fine-structure of amylopectin, **Carbohydrate Polymers**, v.69, p. 562-578, 2007.
20. CHOUDHURY, S. R.; ROY, S.; SAHA, P. P.; SINGH, S. K.; DIBYENDU N. S., Characterization of differential ripening pattern in association with ethylene biosynthesis in the fruits of five naturally occurring banana cultivars and detection of a GCC-box-specific DNA-binding protein, **Plant Cell Reports**, v.27, 1235–1249, 2008.
21. CORDENUNSI, B.R., LAJOLO, F.M. Starch breakdown during banana ripening: sucrose synthase and sucrose phosphate synthase. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 43: 347-351, 1995.
22. CORDENUNSI, B.R. Aspectos químicos, bioquímicos e ultraestruturais do grânulo de amido durante o amadurecimento da banana. Tese de Livre-docência (FCF/USP), 2004.
23. CORDENUNSI, B. R.; SHIGA, T. M.; LAJOLO, F. M., Non-starch polysaccharide composition of two cultivars of banana (*Musa acuminata* L.: cvs Mysore and Nanicão), **Carbohydrate Polymers**, v. 71, p. 26–31, 2008.
24. DONALD, A. M.; KATO, K. L.; PERRY, P.; WAIGH, T., Scattering Studies of the Internal Structure of Starch Granules, **Starch/Stärke**, v. 53, p. 504–512, 2001.
25. DANIELS, D. R.; DONALD, A. M., An Improved Model for Analyzing the Small Angle X-Ray Scattering of Starch Granules, **Biopolymers**, v.69, p. 165-175,. 2003.
26. EDNER, C.; LI, J.; ALBRECHT, T.; MAHLOW, S.; HEJAZI, M.; HUSSAIN, H.; KAPLAN, F.; GUY, C.; SMITH, S. M.; STEUP, M.; RITTE, G., Glucan, Water Dikinase Activity Stimulates Breakdown of Starch Granules by Plastidial β -Amylases, **Plant Physiology**, v. 145, p. 17-28, 2007.
27. FABI, J. P.; CORDENUNSI, B. R.; BARRETO, G. P. M.; MERCADANTE, A. Z.; LAJOLO, F. M.; NASCIMENTO, J. R. O., Papaya Fruit Ripening: Response to

- Ethylene and 1-Methylcyclopropene (1-MCP), **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 6118–6123, 2007.
28. GALLANT, D. J.; BOUCHET, B.; BALDWIN, P. M., Microscopy of starch: evidence of a new level of granule organization, **Carbohydrate Polymers**, v.32, p. 177-191, 1997.
29. GARCIA, E, LAJOLO, F.M. Starch transformation during banana ripening: the amylase and glucosidase behavior, **Journal of Food Science**, 53:1181-1186, 1988.
30. GIOVANNONI, J., Molecular biology of fruit maturation and ripening, **Annual Review Plant Physiology Plant Mol. Biol.**, v.52, p. 725–749, 2001.
31. GOLDING, J. B.; SHEARER, D.; WYLLIE, S. G.; MCGLASSON, W. B., Application of 1-MCP and Propylene to identify ethylene-dependent ripening process in mature banana Fruit, **Postharvest Biology and technology**, v. 14, p. 87-98, 1998.
32. GRANT, G.A.; FRISON, S.L.; YEUNG, J.; VASANTHAN, T.; SPORNS, P., Comparison of MALDI-TOF mass spectrometric to enzyme colorimetric quantification of glucose from enzyme-hydrolyzed starch, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51(21), p. 6137-6144, 2003.
33. HAMES, B.D.; RICKWOOD, D. Gel electrophoresis of proteins: a practical approach / edited by. Oxford; New York: IRL Press at Oxford University Press, 1990.
34. HANASHIRO, I.; ABE, J.I.; HIZUKURI, S. A periodic distribution of the chain length of amylopectin as revealed by high-performance anion-exchange chromatography, **Carbohydrate Research**, v. 283, p. 151-159, 1985.
35. HOOVER, R. Composition, molecular structure, and physicochemical properties of tuber and root starches: a review. *Carbohydrate Polymers*, v.45, p.253-267, 2001.
36. JENKINS, P.J.; DONALD, A. M., The influence of amylose on starch granule structure, **International Journal of Biology. Macromolecules**, v.17(6), p. 315-321, 1995.

- 37 JIANG, W.; ZHANG, M.; HE, J.; ZHOU, L., Regulation of 1-MCP treated banana fruit quality by exogenous ethylene and temperature, **Journal of Food Science Technology** v. 10, p. 15-20, 2004.
- 38 JUSZCZAK, L.; FORTUNA, T.; KROK, F., Non-contact Atomic Force Microscopy of Starch, Granules Surface Part I: Potato and Tapioca Starches, **Starch/Stärke**, v. 55, p. 1-7, 2003.
- 39 KAPLAN, F.; SUNG, D.Y.; GUY, C.L. Roles of β -amylase and starch breakdown during temperatures stress. **Physiologia Plantarum**, v.126, p.120-128, 2006.
- 40 KIM, J. C.; KONG, B. W.; KIM, M. J.; LEE, S. H., Amylolytic Hydrolysis of Native Starch Granules Affected by Granule Surface Area, **Journal of Food Science**, v.73(9), p. 621-624, 2008.
- 41 KOTTING, O.; PUSCH, K.; TIESSEN, A.; GEIGENBERGER, P.; STEUP, M.; RITTE, G., Identification of a Novel Enzyme Required for Starch Metabolism in Arabidopsis Leaves: The Phosphoglucan, Water Dikinase, **Plant Physiology**, v. 137, p. 242-252, 2005.
- 42 KOSSMANN, J.; LLOYD, J, Understanding and Influencing Starch Biochemistry, **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 19(3), p. 171-266, 2000.
- 43 KYISU, K.; HOO, L. F., Molecular structure of Banana starch, **Journal of Food Science**, v. 46(6), p. 1894-1897, 1981.
- 44 LINDEBOOM, N.; CHANG, P. R.; TYER, R. T., Analytical, Biochemical and Physicochemical Aspects of Starch Granule Size, with Emphasis on Small Granule Starches: A Review, **Starch/Stärke**, v. 56, p 89–99, 2004.
- 45 LIU, X.; SHIOMI, S; NAKATSUKA, A.; KUBO, Y.; NAKAMURA, R.; INABA, A. Characterization of ethylene biosynthesis associated with ripening in banana fruit, **Plant Physiology**, v.121, p. 1257-1265, 1999.
- 46 LIU, S.; YANG, Y.; MURAYAMA H.; TAIRA, S.; FUKUSHIMA, T., Effects of CO₂ on Respiratory Metabolism in ripening banana Fruti, **Postharvest Biology and Technology** ,v.33, p 2734-, 2004.

- 47 LU, Y; SHARKEY, T. H.. The importance of maltose in transitory starch breakdown, **Plant Cell Environment**, 29: 353-366, 2006.
- 48 MANICA, I. Fruticultura tropical 4. - banana. Porto Alegre: Cinco Continentes, 1997. 485 p.
- 49 MAINARDI, J. A. O efeito do 1-metilciclopropeno sobre enzimas ligadas ao metabolismo de carboidratos de bananas (*Musa acuminata* AAA cv. Nanicao). Tese de Doutorado (FCF/USP), 2007.
- 50 MAINARDI, J.A.; PURGATTO, E.; VIEIRA JÚNIOR, A.; BASTOS, W.A.; CORDENUNSI, B.R.; NASCIMENTO, J.R.O.; LAJOLO, F.M. The effects of ethylene and 1-MCP on gene expression and activity profile of starch phosphorylase during banana ripening. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54(19), p 7294-7299, 2006.
- 51 MARTIN, C.; SMITH, A.M., Starch Biosynthesis, **Plant Cell**, v. 7(7), 971-985, 1995.
- 52 McCLEARY, B.V.; CODD, R. Measurement of β -amylase in cereal flours and commercial enzyme preparations. **Journal of Cereal Science**, v.9, p.17-33, 1989.
- 53 McCLEARY, B.V.; SHEEHAN, H. Measurement of cereal α -amylase: a new assay procedure. **Journal of Cereal Science**, v.6, p.237-251, 1987.
- 54 McCLEARY B.V.; CHARNOCK, S.J.; ROSSITER, P. C.; O'SHEA, M. F.; POWER A. M.; LLOYD, R. M., Measurement of carbohydrates in grain, feed and food, **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v 86, p.1648-1661, 2006.
- 55 McMURCHIE, E. J.; McGLASSO, W. B.; EAKS, I.L., Treatment of fruit with propylene gives information about biogenesis of ethylene, **Nature**, v. 237(5352), p 235-236, 1972
- 56 MILLAN- TESTA, C. E.; MENDEZ-MONTEALVO, M. G.; OTTENHOF, M. A.; FARHAT, I. A.; BELLO- PÉREZ, L. A., Determination of the Molecular and Structural Characteristics of Okenia, Mango and Banana Starches, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, p. 495-501, 2005.

- 57 MOTA, R.V.; LAJOLO, F.M.; CORDENUNSI, B.R. Composição em carboidratos de alguns cultivares de banana (*Musa* spp.) durante o amadurecimento. **Ciência Tecnologia de Alimentos**, 117:94-97, 1997.
- 58 MOTA, R. V.; CORDENUNSI, B. R.; NASCIMENTO, J. R. O.; PURGATTO, E.; ROSSETO, M. R. M.; LAJOLO, F. M.; Activity and expression of banana starch phosphorylases during fruit development and ripening, **Planta**, v. 216, p. 325-333, 2002.
- 59 NASCIMENTO, J.R.O.; VIEIRA JÚNIOR, A.; BASSINELLO, P.Z.; CORDENUNSI, B.R.; MAINARDI, J.A.; LAJOLO, F.M. Beta-amylase expression and degradation during banana ripening, **Postharvest Biology and technology** , v.40, p.41-77, 2006.
- 60 NUNES, R. F. M.; ALVES. É. J.; OLIVEIRA. C. V., Comportamento de cultivares de banana no Vale do São Francisco, documentos 173, EMBRAPA, 2001.
- 61 ORAK, H. H. Determination of starch and maltose content in some hybrid maize varieties by using HPLC, **Cereal Research Communications**, 34(4): 1261-1266, 2006.
- 62 PARKER, M. L.; KIRBY, A. R.; MORRIS, V. J., In situ Imaging of Pea Starch in Seeds, **Food Biophysics**, v. 3 , p. 66-76, 2008.
- 63 PATHAK, N.; ASIF, M.; DHAWAN, P.; SRIVASTAVA, M. K.; NATH, P., Expression and activities of ethylene biosynthesis enzymes during ripening of banana fruits and effect of 1-MCP treatment, **Plant Growth Regulation**, v.40, p. 11-19, 2003.
- 64 PERONI, F.H.G., Estrutura do grânulo de amido de banana e sua relação com as enzimas que atuam no metabolismo amido-sacarose, Tese de Doutorado (FCF/USP), 2007.
- 65 PURGATTO, E.; LAJOLO, F.M.; NASCIMENTO, J.R.O.; CORDENUNSI, B.R. Inhibition of b-amylase activity, starch degradation and sucrose formation by indole-3-acetic acid during banana ripening. **Planta**. 212:823-828, 2001.

- 66 PURGATTO, E., LAJOLO, F.M., NASCIMENTO, J.R.O., CORDENUNSI, B.R. The onset of starch degradation during banana ripening is concomitant to changes in the content of free and conjugated forms of indole-3-acetic acid. **Journal of Plant Physiology**, 159: 1105-111, 2002.
- 67 PHABA, T.N.; BHAGYALAKSHMI, N., Carbohydrate Metabolism in banana fruit, **Phytochemistry**, v. 48, p.915-919, 1998.
- 68 REIMANN, R.; RITTE, G.; STEUP, M.; APPENROTH, K-J., Association of α -amilase and R1 protein with starch granules precedes the ignition of net starch degradation in turions of *Spirodela polyrhiza*, **Physiologia Plantarum**, v.114, p. 2-12, 2002.
- 69 RIDOUT, M. J.; PARKER, M. L.; HEDLEY, C. L.; BOGRACHEVA, T. Y.; MORRIS V. J., Atomic Force Microscopy of Pea Starch: Origins of Image Contrast, **Biomacromolecules**, v.5, p.1519-1527, 2004.
- 70 RIDOUT, M. J.; PARKER, M. L.; HEDLEY, C. L.; BOGRACHEVA, T. Y.; MORRIS V. J., Atomic Force Microscopy of Pea Starch: Granule architecture of the rug3-a, rug4-b, rug5-a and lam-c mutants, **Carbohydrate Polymers**, v.65(1), p.164-74, 2006.
- 71 RIDOUT, M. J.; PARKER, M. L.; HEDLEY, C. L.; BOGRACHEVA, T. Y.; MORRIS V. J., Atomic force microscopy of pea starch granules: granule architecture of wild-type parent, r and rb single mutants, and the rrb double mutant, **Carbohydrate Research**, v.338(20), p.2135-2147, 2003.
- 72 RIDOUT, M. J.; GUNNING, A. P.; PARKER, M. L.; WILSON, R. H.; MORRIS V. J., Using AFM to image the internal structure of starch granules, **Carbohydrate Polymers**, v.50(2), p.123-132, 2002.
- 73 RITTE, G.; ECKERMANN, N.; HAEBEL, S.; LORBERTH, R.; STEUP, M. Compartmentation of the starch-related R1 protein in higher plants. **Starch/Stärke**, v.52, p.179-185, 2000a.

- 74 RITTE, G.; LORBERTH, R.; STEUP, M. Reversible binding of the starch-related R1 protein to the surface of transitory starch granules, *The Plant Journal*, 21: 387-391, 2000 in higher plants. **Starch/Stärke**, v.52, p.179-185, 2000b.
- 75 RITTE, G.; HEYDENREICH, M.; MAHLOWA, S.; HAEBEL, S.; KOTTING, O.; STEUP, M., Phosphorylation of C6- and C3-positions of glucosyl residues in starch is catalysed by distinct dikinases, **FEBS Letters**, v. 580, p. 4872-4876, 2006.
- 76 ROSSETTO, M.R.M.; PURGATTO, E.; NASCIMENTO, J.R.O.; LAJOLO, F.M.; CORDENUNSI, B.R. Effects of giberellic acid on sucrose accumulation and sucrose biosynthesizing enzymes activity during banana ripening. **Plant Growth Regulation** 41:207-214, 2003.
- 77 ROSSETTO, M.R.M.; LAJOLO, F.M.; CORDENUNSI, B.R. Influência do ácido giberélico na degradação do amido durante o amadurecimento da banana. **Ciência Tecnologia de Alimentos**, 24(1):076-081, 2004.
- 78 SANDERSON, J. S.; DANIELS, R. D.; DONALD, A. M.; BLENNOW, A., ENGELSEN S. B., Exploratory SAXS and HPAEC-PAD studies of starches from diverse plant genotypes, **Carbohydrate Polymers**, v.64, p.433-443, 2006.
- 79 SCHUPP, N.; ZIEGLER, P., The relation of starch phosphorylases to starch metabolism in wheat, **Plant and Cell Physiology**, v. 45(10), p. 1471-1484, 2004
- 80 SEYMOUR, G.; TAYLOR, J.; TUCKER, G. **Biochemistry of Fruit Ripening**. London: Chapman & Hall, 1993, 454p.
- 81 SMITH, A. M.; DENYER, K.; MARTIN, C., The Synthesis of Starch Granule, **Annual Review Plant Physiol. Plant mol. Biology**, v.48, p67-87, 1997.
- 82 SMITH, A. M.; ZEEMAN, S.; C., SMITH, S. M., Starch degradation, **Annual Review Plant Biology**, v.56, p73-98, 2005.
- 83 SPARLA, F.; COSTA, A.; LO SCHIAVO, F.; PUPILLO, P.; TROST, P., Redox Regulation of a Novel Plastid-Targeted β -Amylase of Arabidopsis, **Plant Physiology**, v.141, p. 840-850, 2006.

84. STANLEY, D.; FARNDEN, K. J. F.; MACRAE, E. A., Plant α -amilase: Functions and Roles in Carbohydrate Metabolism, **Biologia Bratislava**, v.60, p. 65-71, 2005.
85. SUJKA. M.; JAMROZ, J., Starch granule porosity and its changes by means of amyolysis, **Agrophysics International**, v. 21, p. 107-113, 2007.
86. SZYMONSKA, J.; KROK, F., Potato starch granule nanostructure studied by high resolution non-contact AFM, **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 33, p. 1-7, 2003.
87. TANG, H.; MITSUNAGA, T.; KAWAMURA, Y. Molecular arrangement in blocklets and starch granule architecture. **Carbohydrate Polymers**, v.63, p.555-560, 2006.
88. TETLOW, I. J.; MORELL, M. K.; EMES, M. J., Recent developments in understanding the regulation of starch metabolism in higher plants, **Journal of Experimental Botany**, v. 55 (406), p.2131-2145, 2004.
89. TETLOW, I. J., Understanding Storage Starch Biosynthesis in plants: a means to quality improvement, **Canadian Journal of Botanical**, v.84, p. 1167- 1185, 2006.
90. TESTER, R.F.; KARKALAS, J.; QI, X., Review Starch—composition, fine structure and architecture, **Journal of Cereal Science**, v. 39, p. 151-165, 2004.
91. TRAINOTTI, L.; TADIELLO, A.; CASADORO, G., The involvement of auxin in the ripening of climacteric fruit comes of age: the hormone plays a role of its own and has an intense interplay with ethylene in ripening peaches, **Journal of Experimental Botany**, p. 1-10, 2007.
92. VIEIRA-JÚNIOR, A.; NASCIMENTO, J.R.O.; LAJOLO, F.M. Molecular cloning and characterization of an α -amylase occurring in the pulp of ripening bananas and its expression in *Pichia pastoris*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.54, p.8222-8228, 2006.

- 93 VENDRELL, M.; MCGLASSO, W.B. , Inhibition of ethylene production in banana fruit tissue by ethylene treatment, **Australian Journal of Biological Sciences**, v. 24(5), p. 885, 1971.
- 94 VILAS BOAS; E.V.B., ALVES, R.E., FILGUEIRAS, H.A.C., MENEZES, J.B. Características da fruta. In: MATSUURA, F.C.A.U., FOLEGATTI, I.S. *Banana: Pós-colheita*. Brasília: **Embrapa** Informação Tecnológica, 2001, p.15-19.
- 95 WALISZEWSKI, K. N.; APARICIOA, M. A.; BELLO, L. A.; MONROYA, J. A. Changes of banana starch by chemical and physical modification, **Carbohydrate Polymers**, v. 52, p. 237-242, 2003.
- 96 WINTER, H.; HUBER, S. C. Regulation of Sucrose Metabolism in Higher Plants: Localization and Regulation, of Activity of Key Enzymes, **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 19(1), p.31-67, 2000.
- 97 YOUNG, R. Y.; ROMANI, R. J.; BIALE, J. B., Carbon Dioxide Effects on Fruit Respiration '. II. Response of Avocados, Bananas and Lemons, **Plant Physiology**, p416-422,. 1962.
- 98 , ZEEMAN^a, S. C.; DELATTE, T.; MESSERLI, G.; UMHANG, M.; STETTLER, M.; METTLER, T.; STREB S.; REINHOLD, H.; KOTTING, O., Review: Starch breakdown: recent discoveries suggest distinct pathways and novel mechanisms, **Functional Plant Biology**, v. 34, p. 465–473, 2007.
- 99 . ZEEMAN^b, S. C.; SMITH, S. M.; SMITH, A. M., The diurnal metabolism of leaf starch **Biochemical Journal**, v.401, p.13-28, 2007.
- 100, ZHANG, P; WHISTLER, R.L.; BEMILLER, J. N.; HAMAKER, B., Banana starch: production, physicochemical properties, and digestibility- a review. **Carbohydrate Polymers**, v.59, p.443-458, 2005.