

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

Efeito do ácido indol-3-acético no metabolismo amido-sacarose
durante o amadurecimento da banana (*Musa spp.*)

Eduardo Purgatto

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientadora:
Profa. Dra. Beatriz Rosana Cordenunsi

Co-orientador:
Prof. Dr. João R. O. do Nascimento

São Paulo
2001

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

Efeito do ácido indol-3-acético no metabolismo amido-sacarose
durante o amadurecimento da banana (*Musa spp.*)

Eduardo Purgatto

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientadora:
Profa. Dra. Beatriz Rosana Cordenunsi

Co-orientador:
Prof. Dr. João R. O. do Nascimento

São Paulo
2001

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

P985e Purgatto, Eduardo
Efeito do ácido indol-3-acético no metabolismo amido-sacarose durante o amadurecimento da banana (*Musa spp*) / Eduardo Purgatto. -- São Paulo, 2001. 131p.

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

Orientador : Cordenunsi, Beatriz Rosana

1. Carboidrato : Ciências dos Alimentos 2. Carboidrato : Bioquímica 3. Banana : Bioquímica vegetal I. T. II. Cordenunsi, Beatriz Rosana, orientador.

641.13 CDD

Eduardo Purgatto

Efeito do ácido indol-3-acético no metabolismo amido-sacarose durante o amadurecimento da banana (*Musa spp.*).

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Profa. Dra. Beatriz Rosana Cordenunsi
orientador/presidente

Prof. Titular Franco Maria Lajolo
1º. examinador

Profa. Dra. Tullia Maria Clara Caterina Filisetti
2º. examinador

Prof. Dr. Carlos Alberto Labate
3º. examinador

Prof. Dr. Cesar Valmor Rombaldi
4º. examinador

São Paulo, 13 de dezembro de 2001.

Agradecimentos

Muitas foram as contribuições que recebi durante a minha formação, não só na edificação de minha carreira, mas durante toda a minha vida. Seria difícil lembrar o nome de todas as pessoas que me deram um pouco de sua experiência e de seus pensamentos para que eu chegasse até este ponto. Alguns talvez nem o saibam mas aprendi muito com todos, e sei que ainda há muito a aprender. Longe de ser uma tarefa árdua, é um motivo de prazer.

Agradeço a meus pais e irmãos que me possibilitaram este momento. Sem eles, creio que tudo isto que agora vivo não teria acontecido.

À minha namorada, Vanessa. Seu amor tornou tudo muito mais fácil. Obrigado por todo o carinho e apoio incondicionais.

Sinceros agradecimentos à Profa. Beatriz, minha orientadora. Mas em primeiro lugar uma amiga que acreditou em mim, até nas vezes em que eu mesmo não acreditava. Devo a ela não só minha formação acadêmica mas também conselhos e exemplos de grande valia pra minha vida.

Ao Prof. João, meu co-orientador que dividiu muito de sua experiência profissional e de seu conhecimento. E mais que isso, por ser um grande amigo.

Ao Prof. Franco Lajolo pelos valiosos conselhos e sugestões ao trabalho.

Agradeço a todo pessoal do laboratório, de hoje e de ontem, Malu, Ana Paula, Priscila, Rose, Jacqueline, Inês, Lúcia Adair, Paola, Ana Cristina,

Márcia, Ricardo, Guilherme, Márcia, Marisa, Alberto, Renata pela convivência agradável e por toda ajuda.

À Sônia, Gyvair, William, Rosângela, Reynaldo e Rosália, amigos dos quais me orgulho muito em ter. À Edlaine, por essa mesma amizade e pelo apoio fundamental na decisão de fazer este doutorado.

Aos funcionários da faculdade por todo o apoio técnico.

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

À minha mãe Genebra e meu pai Lázaro.
Meus irmãos Roberto, Norberto, Valdir, Lázaro,
José e Gerson e minhas irmãs Maria e Odete
À Vanessa

"...Em algum lugar, a uma distância de tempo imensa:
divergiam em um bosque duas estradas
e eu escolhi a menos viajada
e esta escolha fez toda a diferença."

(Robert Frost)

Índice

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. O AMADURECIMENTO DE FRUTOS.....	1
1.2. O ETILENO E O AMADURECIMENTO DE FRUTOS	3
1.3. O ÁCIDO INDOL-3-ACÉTICO E O AMADURECIMENTO DE FRUTOS	6
1.4. O METABOLISMO AMIDO-SACAROSE NO AMADURECIMENTO	13
1.4.1. <i>Degradação do amido</i>	15
1.4.1.1. Alfa-amilases.....	16
1.4.1.2. Beta-amilases	17
1.4.1.3. Alfa-1,4-glicosidases	17
1.4.1.4. Alfa-1,6-glicosidases	19
1.4.1.5. Fosforilases.....	20
1.4.2. <i>Síntese de sacarose no amadurecimento</i>	22
1.4.2.1. Sacarose sintase.....	23
1.4.2.2. Sacarose-fosfato sintase.....	24
1.5. METABOLISMO AMIDO-SACAROSE E SUA REGULAÇÃO HORMONAL.....	26
2. OBJETIVOS	29
3. MATERIAIS	30
3.1. FRUTOS.....	30
4. MÉTODOS.....	31
4.1. PREPARO DAS FATIAS DE BANANAS	31

4.2. MEDIDAS DE RESPIRAÇÃO E ETILENO.....	32
4.3. DETERMINAÇÃO DE AMIDO, AÇÚCARES SOLÚVEIS E PROTEÍNA SOLÚVEL ..	34
4.4. EXTRAÇÃO DAS ENZIMAS.....	34
4.5. ATIVIDADE ENZIMÁTICA.....	35
4.6. EXTRAÇÃO DE RNA E NORTHERN BLOTING.	38
4.7. ANÁLISE DE AIA LIVRE E CONJUGADO.....	39
4.8. INFILTRAÇÃO DE [¹⁴ C]-GLICOSE EM BATOQUES DE BANANA.....	42
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	44
5.1. OTIMIZAÇÃO DO MODELO DE INFILTRAÇÃO EM FATIAS DE BANANAS.....	44
5.2. AVALIAÇÃO DA RESPIRAÇÃO, DEGRADAÇÃO DO AMIDO E SÍNTESE DA SACAROSE APÓS O TRATAMENTO COM AIA.	46
5.3. ATIVIDADE DE α -AMILASE, α -1,4-GLICOSIDASE E FOSFORILASE.	59
5.4. INCORPORAÇÃO DE [¹⁴ C]-GLICOSE NO AMIDO.....	72
5.5. DETERMINAÇÃO DE AIA LIVRE, AIA CONJUGADO E ETILENO.....	75
6. CONCLUSÕES.....	90
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	91
8. RESUMO	115
9. ABSTRACT	117

Lista de Figuras

- Figura 1:** Diagrama simplificado da biossíntese do AIA mostrando as vias de biossíntese dependente (setas abertas) e independente (seta tracejada) de triptofano..... 8
- Figura 2:** Efeito do AIA sobre a respiração (A), conteúdo de amido (B), sacarose (C) e atividade amilásica total (D) em fatias de bananas durante o amadurecimento 47
- Figura 3:** Atividade de β -amilase (A), SuSy (B) e SPS (C) em fatias de bananas em 0, 7, 12 e 16 dias pós infiltração com manitol 120 mM (Controle) e AIA 0,1mM em manitol 120 mM (AIA) durante o amadurecimento.. 53
- Figura 4:** *Northern blot* de RNA total extraído de fatias de bananas infiltradas com manitol 120 mM (Controle) e AIA 0,1mM em manitol 120 mM (AIA) nos dias 0, 7, 12 e 16 pós-inifiltração..... 54
- Figura 5:** Teores de amido (A), atividade de α -amilase (B) e atividade de α -1,4-glicosidase (C) de fatias de bananas infiltradas com manitol 120 mM (Controle) e AIA 0,1mM em manitol 120 mM (AIA) durante o amadurecimento 61
- Figura 6:** Teores de amido (A) e atividade de fosforilase de amido (B) de fatias de bananas infiltradas com manitol 120 mM (Controle) e AIA 0,1mM em manitol 120 mM (AIA) durante o amadurecimento 69
- Figura 7:** Relação entre a radioatividade encontrada no amido e nos açúcares de batoques de bananas controle e batoques tratados com AIA

submetidos a infiltração com [¹⁴C]-glicose. A infiltração com glicose marcada foi realizada 48 horas depois do tratamento com manitol 120 mM (Controle) e AIA 0,1 mM em manitol 120 mM (AIA) a fim de proporcionar tempo a recuperação do estresse do corte e da infiltração a que o tecido foi submetido. 74

Figura 8: Teores de amido e produção de etileno de fatias de bananas infiltradas com manitol 120 mM (Controle) e AIA 0,1mM em manitol 120 mM (AIA) durante o amadurecimento. 76

Figura 9: Teores de amido e níveis de AIA livre e conjugados éster e amida de fatias de bananas infiltradas com manitol 120 mM (**Controle**) durante o amadurecimento. 80

Figura 10: Teores de amido e níveis de AIA livre e conjugados éster e amida de fatias de bananas infiltradas com AIA 0,1 mM em manitol 120 mM (**Tratadas**) durante o amadurecimento. 81

Figura 11: Teores de amido e níveis de AIA livre e conjugados éster e amidade **bananas inteiras** durante o amadurecimento. As bananas foram colhidas com aproximadamente 110 dias pós-antese. 88

Abreviaturas

[¹³ C ₆]-AIA	ácido indol-3-acético marcado com carbono-13 no anel benzênico do núcleo indólico.
[U- ¹⁴ C]-glicose	glicose uniformemente marcada com carbono-14
¹⁴ C	carbono-14
2,4-D	ácido 2,4-diclorofenóxi-acético
4MUona	4-metilumbeliferilona
4MU α G	4-metilumbeliferil- α -D-glicosídeo
ABA	ácido abscísico
ABTS	2,2'-azino-di-(3-etilbenzotiazolina)-6-sulfonato
ACC	ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico
ADPGlc	adenosina 5'-difosfo-glicose
AGPase	adenosina 5'-difosfo-glicose pirofosforilase
AIA	ácido indol-3-acético
ATP	adenosina 5'-trifosfato
B.O.D.	demanda bioquímica de oxigênio
BNPG7-EPS	<i>p</i> -nitrofenil-maltoheptaosídeo bloqueado
cDNA	DNA complementar
CG-EM-MSI	cromatografia a gás com detecção por espectrometria de massa utilizando monitoramento seletivo de íons.
CLAE	cromatografia líquida de alta eficiência
CPM	contagens por minuto
DNS	ácido dinitrosalicílico

EDTA	ácido etilenodiaminotetraacético
EPC	controle pneumático eletrônico
Fru	frutose
G-1-P	glicose-1-fosfato
GA ₃	ácido giberélico
Hepes	ácido N-(2-hidroxi-etil)-piperazina-N'-(2-etanosulfúrico)
LEACS1A	1-aminociclopropano-1-carboxilato sintase do <i>Lycopersicon esculentum</i> - forma 1A.
LEACS2	1-aminociclopropano-1-carboxilato sintase do <i>Lycopersicon esculentum</i> - forma 2.
LEACS4	1-aminociclopropano-1-carboxilato sintase do <i>Lycopersicon esculentum</i> - forma 4.
LEACS6	1-aminociclopropano-1-carboxilato sintase do <i>Lycopersicon esculentum</i> - forma 6.
m/z	relação massa/carga
Mes	ácido 2-(N-morfolino)-etanosulfônico
NADPH	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida
<i>Nr</i>	<i>Never ripe</i>
PNPG5	<i>p</i> -nitrofenil-maltopentaosídeo
PPi	pirofosfato
ppm	partes por milhão
PVP	polivinilpirrolidona
<i>rin</i>	<i>ripening inhibitor</i>
RNA	ácido ribonucléico

SPS	sacarose-fosfato sintase
SuSy	sacarose sintase
Tris	2-amino-2-(hidroximetil)-1,3-propanodiol
UDP	uridina 5'-difosfato
UDPGlc	uridina 5'-difosfo-glicose
UDPGlc-pirofosforilase	uridina 5'-difosfo-glicose pirofosforilase
UTP	uridina 5'-trifosfato
$\alpha(\text{Glc})_n$	oligoglicosídeo α -ligado.

1. Introdução

1.1. *O amadurecimento de frutos*

Estudos a respeito dos mecanismos que regulam o amadurecimento em frutos vem sendo realizados desde o início do século XX. A teoria dominante até meados da década de 60, tratava o amadurecimento como um processo predominantemente catabólico, sendo conseqüência da diminuição da resistência do fruto a uma série de mudanças de natureza degenerativa. Neste modelo, a desorganização intracelular no fruto levaria várias enzimas a entrar em contato com seus substratos, antes compartimentalizados, tendo como conseqüência a formação de compostos como o etileno, os constituintes do aroma, os açúcares e os pigmentos. Tais mudanças ocorreriam de forma randômica, sem nenhum mecanismo de controle aparente. (Blackman e Parija 1928).

No final da década de 60, estudos usando traçadores radioativos mostraram evidências do aumento da síntese de RNA e proteínas no amadurecimento de maçãs (Hulme 1968) e pêras (Frenkel 1968). Brady e col. (1970) infiltraram soluções de aminoácidos marcados com ^{14}C em fatias de bananas, a fim de avaliar a extensão da síntese protéica durante o amadurecimento deste fruto. Seus resultados demonstraram haver grande captação de lisina e valina e incorporação destes aminoácidos em proteínas extraídas da polpa das fatias de banana infiltradas. Estes e outros estudos,

demonstraram haver síntese organizada de proteínas e outros compostos durante o amadurecimento de frutos e serviram de suporte para outra teoria que, ao contrário da anterior, tratava este período de desenvolvimento do vegetal como um conjunto de mudanças bem ordenadas, que compreenderiam tanto processos anabólicos quanto catabólicos, catalisados por enzimas específicas sintetizadas durante esta fase.

Embora tenha-se verificado que estas mudanças variam de espécie para espécie, os frutos foram divididos em dois grandes grupos: climatéricos e não climatéricos (Biale e Young 1962). Tal classificação derivou da observação do marcado aumento de respiração que certos frutos apresentam durante a fase de transição do estágio do fruto verde para o fruto maduro. Deste modo, os frutos climatéricos foram agrupados por apresentarem, caracteristicamente, este pico respiratório, o mesmo não ocorrendo nos frutos não climatéricos. Pelo contrário, tais frutos apresentam declínio na taxa respiratória durante o amadurecimento. Como exemplo característicos de frutos climatéricos temos a banana, o abacate, maçã, a pêra, a manga e o tomate, e de frutos não climatéricos o morango, a laranja, a uva, o abacaxi e a cereja. Outra característica marcante dos frutos climatéricos, inexistente nos frutos não climatéricos, é o elevado aumento na produção de etileno, hormônio vegetal que desempenha importante papel na coordenação dos eventos bioquímicos que dirigem o amadurecimento, conforme revelado por uma grande quantidade de estudos em diversos frutos.

1.2. O etileno e o amadurecimento de frutos

O etileno é produzido pela maioria dos tecidos vegetais em níveis relativamente baixos, algo em torno de $0,05 \mu\text{l}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{Kg}^{-1}$ em base fresca (Tucker 1993). Este hormônio exerce efeito em uma série de processos do desenvolvimento vegetal como a quebra de dormência em sementes, a indução floral, o crescimento e diferenciação de raízes, a abertura do botão floral e a senescência de folhas e flores, porém seu efeito mais marcante ocorre no amadurecimento de frutos, o que o levou a ser designado como “hormônio do amadurecimento”.

Observações a respeito dos efeitos do etileno no amadurecimento de frutos datam do início do século XX, quando Denny identificou que o etileno, um componente da fumaça de combustão do querosene queimado em aquecedores, era o agente causador da perda de coloração verde em limões plantados em algumas regiões na Califórnia e, assim, o descreveu como um agente de amadurecimento (Theologis 1992).

Durante as últimas décadas, muitos grupos de pesquisa tem centrado esforços na compreensão da biossíntese, sinalização e genes alvo do etileno (Yang e Hoffman 1984, Lincoln e col. 1987, Sato e Theologis 1989, Spanu e col. 1991, Abeles e Biles 1991, Ecker 1995). Tal acúmulo de informação fez dos mecanismos que regem sua ação, um dos mais bem compreendidos dentre os hormônios vegetais, embora, quando comparado a informação que temos do modo de ação dos hormônios em animais, percebe-se que ainda há muito a ser feito. No entanto, tal conhecimento já

tem gerado produtos comerciais, como frutos nos quais o amadurecimento é retardado pelo controle da síntese das enzimas responsáveis pela produção do etileno.

O etileno é sintetizado a partir de intermediários do ciclo da metionina ou ciclo de Yang (Theologis 1992). O passo limitante na sua produção é a conversão da S-adenosil-metionina no ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC), pela ACC sintase (S-adenosil-L-metionina metiltioadenosina liase, EC 4.4.1.14). Em seguida o ACC é convertido pela ACC oxidase (1-aminociclopropano carboxilato oxidase, E.C. 1.4.3) em etileno, gás carbônico e ácido cianídrico, na presença de oxigênio.

Tanto os frutos climatéricos como os não climatéricos são capazes de produzir etileno, mas apenas nos primeiros esta síntese pode ocorrer de maneira autocatalítica, ou seja, o próprio hormônio induz a expressão das enzimas responsáveis por sua produção. Esta observação levou a proposta da existência de dois sistemas de produção do hormônio (McMurchie e col. 1972). O chamado Sistema I, responsável pela produção de níveis basais de etileno que atua tanto nos frutos climatéricos como nos não-climatéricos e também nos tecidos vegetativos. O Sistema II, atuando exclusivamente nos frutos climatéricos e caracterizado pelo elevado aumento na produção de etileno, em níveis muito acima dos basais. Esta teoria tem ganho força em anos recentes, em vista da caracterização da expressão diferencial de isoenzimas da ACC sintase associadas a cada um dos sistemas (Barry e col. 2000). Tais estudos tem demonstrado que tanto a ACC sintase como a ACC oxidase pertencem a famílias gênicas com vários indivíduos, cuja expressão

de cada um ocorre de modo diferenciado em resposta a diferentes tipos de estímulo tais como a injúria mecânica, a infecção viral, a injúria pelo frio, a anaerobiose e o tratamento com auxina.

Recentemente, Barry e col. (2000) propuseram um modelo no qual os frutos climatéricos passariam do Sistema I para o Sistema II de produção de etileno. Utilizando os mutantes de tomate *rin* (*ripening inhibitor*) e *Nr* (*Never ripe*), os autores identificaram 4 formas da ACC sintase ligadas a produção de etileno no amadurecimento do tomate. Duas delas, chamadas LEACS6 e LEACS1A atuariam na fase pré-climatérica ou no Sistema I. A forma LEACS1A atuaria também numa fase que os autores chamaram de fase de transição entre os dois sistemas. Nesta fase, a forma LEACS6 não é transcrita, porém ocorreria o aparecimento de outra forma, a LEACS4. Em conjunto com a LEACS1A, esta forma estimularia o aparecimento de outra forma, a LEACS2, esta sim responsável pela produção de etileno no Sistema II. Por tal modelo proposto, é possível observar que a regulação hormonal no amadurecimento é de fato um mecanismo complexo que está apenas começando a ser explicado.

Apesar dos muitos avanços registrados, pouco se sabe a respeito dos fatores que coordenam as mudanças que tornam as células dos frutos climatéricos competentes para responder ao etileno. Pelo modelo proposto por Barry e col., um fator importante para a transição do Sistema I para o Sistema II seria o fator *rin*, ausente ou inativo nos tomates com esta mutação. Porém, o que vem a ser este fator e como seu aparecimento é regulado ainda não se sabe.

Outra questão diz respeito ao receptor de etileno. Payton e col (1996) demonstraram que há aumento na síntese do receptor durante o amadurecimento de frutos, mas não identificaram quais fatores são capazes de estimular este aumento de expressão.

Uma idéia que vem sendo defendida mais intensamente em anos recentes, é a da coexistência de vias de regulação gênica dependentes e independentes de etileno nos frutos climatéricos (Lelievre e col. 1997, Golding e col. 1998; Hadfield e col. 2000). Embora este hormônio desempenhe papel chave no amadurecimento, é muito provável que os mecanismos de controle de tal processo sejam o resultado de uma complexa interação entre o etileno e outros hormônios como ácido abscísico, giberelinas e auxinas bem como com outros grupos de substâncias como carboidratos e poliaminas (Tucker 1993, Lufford 1995, Giovannoni 2001).

1.3. O ácido indol-3-acético e o amadurecimento de frutos

A observação da capacidade do ácido indol-3-acético (AIA) de retardar o amadurecimento de frutos foi bem detalhada nos clássicos estudos de Nitsch (1955).

O AIA exerce efeitos em processos ligados ao crescimento e desenvolvimento vegetal, incluindo o alongamento e a diferenciação celular, gravitropismo, dominância apical e o crescimento e amadurecimento de frutos (Davies 1995). Sua síntese pode ocorrer através de duas vias: uma dependente e outra independente de triptofano (Figura 1). Apesar de ambas

as vias coexistirem nas plantas, a importância relativa de cada uma para o conteúdo de AIA nos tecidos vegetais ainda não foi esclarecida.

Os estudos de Darwin e sua filha Francis, no século XIX, sobre o fototropismo de coleóptilos, serviram de base para a descoberta das auxinas por Went em 1928 e sua subsequente identificação como o ácido indol-3-acético. Anos mais tarde, o AIA foi reconhecido como sendo a principal auxina encontrada na maioria das plantas (Davies 1995). Sintetizado em folhas jovens e sementes por vias dependentes e independentes de triptofano, o ácido indol-acético, tem seus níveis celulares controlados pelas taxas relativas de biossíntese, catabolismo, conjugação e transporte (Catalá e col. 1994). O AIA em plantas pode ser metabolizado através de duas vias: a) uma via de oxidação descarboxilativa, catalisada por peroxidases cujos principais produtos são o 3-metilenoxindol, o 3-hidroximetilenoindol, o indol-3-aldeído e o indol-3-metanol (Brandurski 1995), sendo a formação dos vários produtos, dependente de fatores como a razão enzima/substrato, cofatores e pH da reação (Catalá e col. 1992); b) uma via de oxidação não-decarboxilativa, onde o principal produto formado é o ácido oxindol-3-acético. A predominância de uma via sobre a outra varia de espécie para espécie e de órgão para órgão. Durante o amadurecimento em frutos, a via descarboxilativa tem sido apontada como importante no decréscimo dos níveis de AIA (Brooks 1986; Rothan e Nicholas 1989; Da Silva e col. 1990), porém em tomates a principal via no metabolismo de AIA parece ser a oxidação não-decarboxilativa (Catalá e col. 1992).

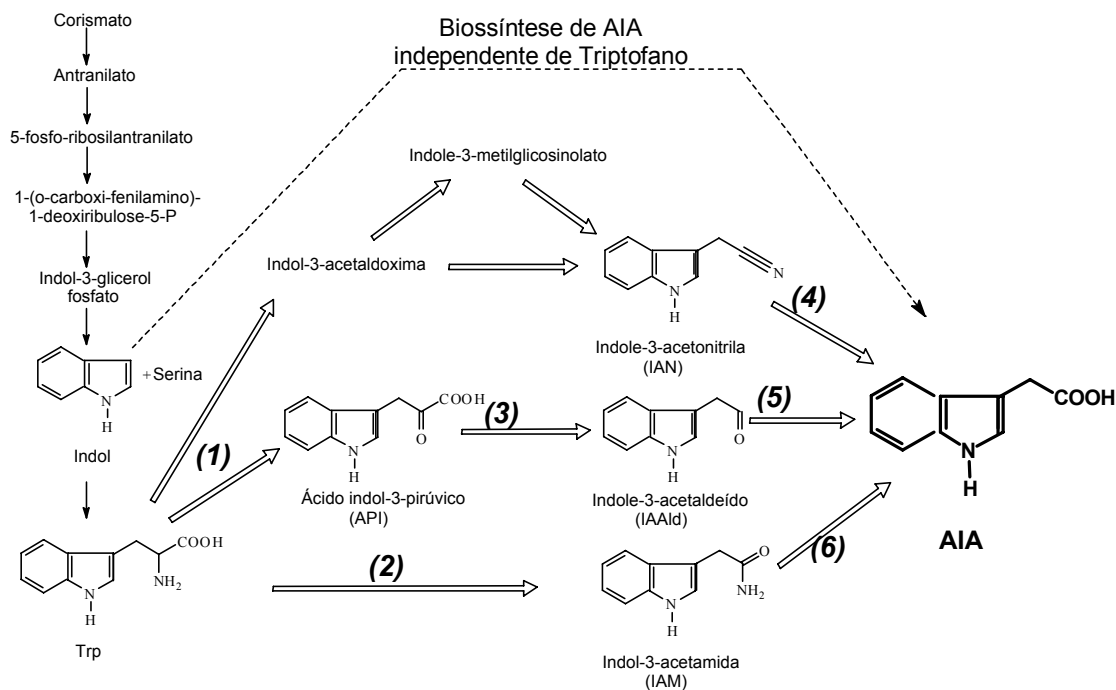


Figura 1: Diagrama simplificado da biossíntese do AIA mostrando as vias de biossíntese dependente (setas abertas) e independente (seta tracejada) de triptofano. Os números representam as enzimas identificadas até o momento na via de biossíntese dependente de triptofano. (1) – Triptofano-aminotransferase; (2) – Triptofano monoxigenase; (3) – Ácido indol-3-pirúvico descarboxilase; (4) – Nitrilase; (5) – Indol-3-acetaldeído oxidase; (6) – Indol-3-acetamida hidrolase. (Normanly e Bartel 1997)

Hipóteses a respeito do papel biológico dos catabólitos de auxinas foram levantadas durante a década de 70. Em relação aos frutos, Frenkel (1975) sugeriu que o metilenoindol poderia ser um fator de estímulo do amadurecimento. Deste modo, o AIA, após seu catabolismo, levaria o fruto do estado de juvenildade para o estado de senescência. Porém, estudos posteriores não comprovaram esta hipótese, sendo inclusive demonstrado que alguns catabólitos formados a partir do AIA eram inativos, conforme revelado em ensaios biológicos (Brandurski 1995).

As plantas regulam o nível de AIA livre, a forma ativa do hormônio, através de uma complexa rede de vias que além da síntese incluem o transporte, a degradação, a conjugação com os aminoácidos, as proteínas, a glicose e o mio-inositol e a hidrólise destes conjugados (Normanly 1997). A conjugação do AIA é um processo que ocorre em praticamente todos os vegetais superiores (Cohen e Brandurski 1982) e os conjugados de AIA formam-se rapidamente quando a homeostase do hormônio é perturbada como, por exemplo, na aplicação externa de AIA no tecido vegetal.

Estudos em pericarpo de tomates infiltrados com AIA (Catalá e col. 1992), mostraram a formação predominante de conjugados de AIA com glicose e com ácido aspártico, sendo o primeiro, potencial produto de armazenagem do hormônio, e o segundo, um passo inicial necessário para a degradação.

A aplicação exógena de AIA tem sido usada há anos em vários modelos que buscam revelar informações a respeito de seu metabolismo e modo de ação (Theologis 1986, Normanly 1997, Normanly e Bartel 1999).

Esta tem sido a abordagem experimental mais aplicada para os estudos dos efeitos do AIA sobre o amadurecimento de frutos.

A hipótese de que o AIA atua como um fator de inibição do amadurecimento ou, segundo alguns autores (Vendrell 1969, Frenkel e Dick 1973, Tingwa e Young 1975), um fator de juvenilidade, vem sendo testada. Porém uma das dificuldades encontradas nessa avaliação provém do fato do AIA induzir a síntese de etileno podendo, desta forma, modificar a resposta do tecido a este hormônio. Em maçãs, Mousdale e Knee (1982) detectaram um pico de AIA antes do início da produção de etileno pelo Sistema II. O mesmo também foi detectado em melões (Dunlap et al. 1996) e pêssegos (Miller et al. 1987).

Nitsch (1955), utilizando bioensaios, mostrou que os aquênios dos morangos são importantes fontes produtoras de auxinas e que sua remoção acelera o amadurecimento dos frutos. Em contrapartida, a aplicação de auxina sintética no local onde os aquênios foram removidos, provoca atraso no amadurecimento de morangos, como demonstraram os estudos de Given e col. (1988). De fato, a evidência mais clara do envolvimento do AIA em processos relacionados ao amadurecimento de frutos, vem da produção de antocianinas nos morangos, conforme demonstrado por Given e col. (1988). A produção destes pigmentos é regulada pela síntese *de novo* da L-fenilalanina-amônia liase (E.C. 4.3.1.5) que é inibida pela aplicação de auxina nos frutos. Os aquênios foram removidos da metade de um fruto de morango da cultivar Brighton, no estágio denominado, no trabalho, “verde-maduro”. A metade de onde os aquênios não foram removidos teve o

amadurecimento retardado em relação a metade onde estes o foram. O amadurecimento foi avaliado pela medida do acúmulo de antocianina, pela indução de fenilalanina-amônia liase e pela perda de firmeza. A aplicação da auxina sintética, ácido 2,4-diclorofenóxi-acético (2,4-D), na metade do fruto sem aquênios reverteu o quadro observado.

Outros estudos com AIA foram realizados em diferentes frutos, incluindo abacates (Tingwa e Young 1975), bananas (Vendrell 1969), pêras (Frenkel e Dyck 1973) e uvas (Davies et al. 1997). Foram observados atrasos em processos relacionados ao amadurecimento como o amolecimento, climatério respiratório, a degradação da clorofila na casca e a formação de antocianinas, destes frutos.

Utilizando um modelo de cultura *in vitro* de frutos de tomate, Cohen (1996) demonstrou que níveis elevados de AIA atrasam a degradação de clorofila e a formação de carotenóides na casca.

Tingwa e Young (1975) realizaram experimentos onde infiltraram abacates fisiologicamente maduros e recém-colhidos com AIA, GA₃, ABA e cinetina. Foi observada uma sensibilidade significativa do fruto a pequenas concentrações de AIA, devido ao retardo no amadurecimento julgado pelo atraso no climatério respiratório e na produção de etileno.

Outros trabalhos têm relatado o efeito das auxinas sobre a expressão gênica e atividade de várias enzimas ligadas a outros eventos que se processam no amadurecimento de frutos como, alterações na composição da parede celular (Cohen 1996) e o metabolismo de ácidos orgânicos (Esaka e col. 1992).

Cordenunsi e Lajolo (1995) estudaram a variação na atividade de duas enzimas fundamentais para o metabolismo da sacarose durante o desenvolvimento e amadurecimento da banana: sacarose sintase (SuSy; UDP-glicose:D-frutose 2-glicosiltransferase, EC 2.4.1.13) e a sacarose-fosfato sintase (SPS; UDP-glicose:D-glicose-6-fosfato 2-glicosiltransferase, EC 2.4.1.14). Foi observado que a atividade de SuSy foi alta durante o período de desenvolvimento do fruto, caindo após a colheita. O contrário foi observado para a atividade da SPS e seu pico de máximo de atividade coincidiu com o pico de síntese de sacarose no amadurecimento das bananas estudadas. Neste mesmo estudo, os autores verificaram que, em bananas amadurecidas ligadas à planta mãe, a atividade da SuSy decaía com velocidade menor, e que a SPS aumentava sua atividade mais lentamente, em comparação com bananas que foram colhidas antes do amadurecimento. Os autores argumentaram que tal observação poderia estar relacionada a translocação de hormônios da planta para o fruto que poderiam retardar o amadurecimento, como o já mencionado ácido indol-3-acético. Um típico exemplo deste fenômeno é o abacate uma vez que este fruto climatérico é incapaz de amadurecer quando ligado à planta-mãe (Tingwa e Young 1975).

Estudos a respeito do efeito do AIA no metabolismo de carboidratos em frutos, foram realizados por Lingle e Dunlap (1991) em melões e Lee e col. (1997) em berinjelas. Ambas equipes buscaram evidenciar o efeito do AIA nas atividades de SuSy e SPS nestes frutos, porém nenhuma correlação foi encontrada. No entanto, foi observado que as atividades de invertase

ácida ligada a parede e invertase ácida citossólica, também importantes enzimas do metabolismo da sacarose, tiveram a atividade aumentada após o tratamento com AIA em segmentos de tecido cortados de berinjelas (Lee e col. 1997).

Dentre as mudanças que ocorrem no amadurecimento da banana, as alterações na composição de açúcares estão entre as mais importantes, tanto do ponto de vista bioquímico quanto organoléptico, uma vez que os açúcares são componentes fundamentais do sabor e do aroma, importantes atributos para aceitabilidade do fruto como alimento.

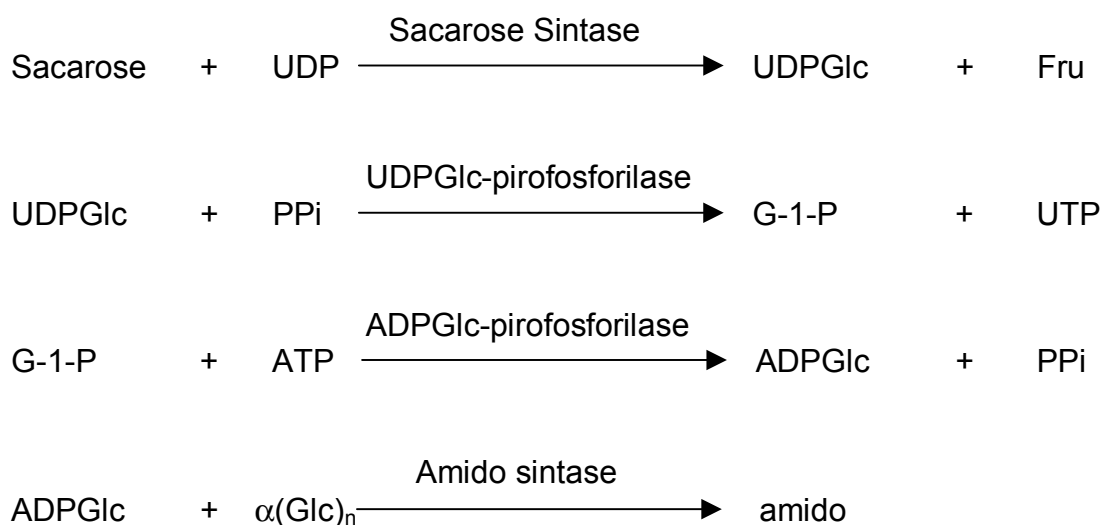
1.4. O metabolismo amido-sacarose no amadurecimento

Na banana, a hidrólise do amido, mediada por várias enzimas atuando de maneira coordenada, fornece substrato necessário para a síntese de açúcares no amadurecimento.

O amido representa uma das formas de reserva de carboidratos mais encontradas nas plantas superiores. Trata-se de uma macromolécula formada por dois polímeros de glicose: a amilose, um polissacarídeo linear, composto por longas cadeias onde os monômeros de glicose encontram-se unidos por ligações α -(1,4) glicosídicas; e a amilopectina, um polissacarídeo ramificado, composto por cadeias com ligações glicosídicas α -1,4 e α -1,6. Estas cadeias se organizam para formar o grão de amido, uma macroestrutura altamente condensada que preenche o amiloplasto, uma das organelas especializadas na sua síntese. A estrutura dos grãos de amido

varia de planta para planta e mesmo de tecido para tecido na mesma planta e, embora muitos estudos tenham se concentrado na elucidação do processo de formação do grão de amido, a forma como ocorre o empacotamento das cadeias de amilose e amilopectina para sua formação ainda não está clara.

Várias vias parecem contribuir com a formação dos substratos para síntese do amido, mas atualmente o passo aceito como chave é a formação do precursor adenosina 5'-difosfo-glicose (ADPGlc) pela adenosina 5'-difosfo-glicose pirofosforilase (AGPase; glicose-1-fosfato adenilil-transferase - E.C. 2.7.7.27), através da seguinte seqüência de reações:



Durante o desenvolvimento, a banana acumula amido, podendo atingir concentrações acima de 20% do peso fresco do fruto (Arêas e Lajolo, 1981). Garcia e Lajolo (1988) ao caracterizarem o amido produzido pela banana, observaram que este possuía aproximadamente 16% de amilose e

o tamanho dos grãos variava entre 20-60 μm . Tal reserva é rapidamente mobilizada durante o amadurecimento, podendo cair para níveis abaixo de 1%. A queda acontece de forma abrupta logo após o pico de produção de etileno e paralelo ao pico respiratório. Neste mesmo período a concentração de sacarose sobe rapidamente podendo atingir 12% do peso do fruto fresco (Arêas e Lajolo 1981). Em contrapartida, em frutos de kiwi, MacRae e col. (1992) demonstraram que a degradação de amido precede o pico respiratório, havendo, neste caso, dissociação entre os dois eventos.

1.4.1. Degradação do amido

Várias enzimas, que parecem contribuir para a degradação do amido, tem sido descritas e suas atividades detectadas em diversos tecidos vegetais, porém a maneira pela qual a atividade destas enzimas é coordenada para converter o amido em maltooligossacarídeos, ainda não foi compreendida (Sivak e Preiss 1998).

Estudos tem demonstrado, até o momento, que somente as endoamilases, como as α -amilases, são capazes de atacar o grão de amido intacto (Sivak e Preiss 1998). Em bananas, Garcia e Lajolo (1988) detectaram a atividade de três α -amilases e 4 β -amilases, além de α -1,4 e α -1,6-glicosidases e fosforilases.

1.4.1.1. Alfa-amilases

As α -amilases (1,4- α -D-glicano glicanohidrolase, E.C. 3.2.1.1) são as endoamilases mais freqüentemente encontradas em tecidos vegetais. Atuam na hidrólise de ligações α -1,4 na amilose e na amilopectina de maneira randômica e não possuem atividade hidrolítica sobre ligações α -1,6 glicosídicas sendo, assim, incapazes de atuar nas ramificações da amilopectina. Várias α -amilases já foram cristalizadas e a elucidação de sua estrutura terciária revelou características comuns entre os diversos tipos, como a presença de um sítio de ligação para cálcio. Estudos posteriores revelaram que este íon desempenha importante papel na manutenção da estrutura secundária e terciária da enzima (Whitaker 1994). O pH ótimo para a atividade de várias α -amilases de plantas superiores se situa entre 5.5 e 8.0. Os produtos iniciais formados após sua ação sobre o amido são principalmente dextrinas. Os produtos finais são principalmente maltose e maltotriose (Whitaker 1994).

Até o momento, a maioria das α -amilases de plantas descritas demonstraram capacidade de atacar grãos de amido intactos. Seu papel na degradação do amido, pela visão corrente, seria o de iniciar o ataque aos grãos intactos permitindo, desta forma, a ação de outras enzimas (β -amilases, por exemplo) sobre os glicanos por ela liberados.

1.4.1.2. *Beta-amilases*

As β -amilases (1,4- α -D-glicano maltohidrolase, EC 3.2.1.2) catalizam a remoção de sucessivas unidades de maltose da extremidade não-redutora de cadeias de α -glicanos. São capazes de atuar sobre o amido, em dextrinas de baixo peso molecular e também em maltooligossacarídeos. Beta-amilases de cevada, trigo, arroz, soja, batata e batata-doce tem sido estudadas e algumas delas foram cristalizadas (Whitaker 1994). A caracterização de várias β -amilases de plantas demonstrou haver dois grupos localizados no sítio catalítico envolvidos na atividade da enzima: um com pK entre 2,5 e 3,5 e outro com pK entre 8,0 e 8,5. Um grupo sulfidrílica parece também ser essencial para a atividade, tendo em vista que a maioria das β -amilases sofre inibição por reagentes que oxidam grupamentos sulfidrílicos, e que esta pode ser revertida com reagentes como ditioneitol ou cisteína (Whitaker, 1994). Seu papel na degradação do amido ainda não foi totalmente esclarecido porém, Garcia e Lajolo (1988) observaram grande aumento da atividade desta enzima durante o período de amadurecimento da banana.

1.4.1.3. *Alfa-1,4-glicosidases*

Garcia e Lajolo (1988) também reportaram, neste estudo, a presença de glicosidases com atividade α -1,4-amilolítica, na polpa de bananas, em vários estádios do amadurecimento e que durante o climatério ocorre

aumento significativo desta atividade. As α -1,4-glicosidases hidrolisam maltose e maltooligossacarídeos de baixo peso molecular produzindo glicose. Enzimas com esta atividade típica já foram detectadas em batata (Killilea e Clancy 1978), milho (Matsui e col. 1981), beterraba (Suzuki e Ushida 1985) e arroz (Matsui e col. 1988).

Konishi e col. (1992) purificaram, a partir de polpa de bananas pré-climatéricas, formas de α -1,4-glicosidases ácida e neutra com pHs ótimos em torno de 4,5 e 6,5, respectivamente. A forma ácida apresentou atividade maltásica típica, o mesmo não ocorrendo para a forma neutra.

Posteriormente, Konishi e col (2001) purificaram formas ácidas de α -1,4 glicosidases solúvel e ligada a parede celular em bananas pré e pós-climatéricas. Formas de α -1,4-glicosidases ligadas a parede celular já foram encontradas em outros vegetais, mas sua função nos tecidos em que foi detectada ainda não é clara, uma vez que não foram encontrados os substratos adequados a ação desta forma da enzima (Monroe e col. 1999).

Apesar da atividade de α -1,4-glicosidases estar associada a hidrólise dos produtos de degradação de α -amilases e β -amilases, foi observada a capacidade destas enzimas de atuarem em grãos nativos de amido no centeio (Sun e Henson 1991). Estudos tem relatado a existência de um grande sinergismo entre as atividades de α -1,4-glicosidases e α -amilases na degradação dos grãos de amido. Hallet e col. (1995) submeteram grãos de amido de kiwi a hidrólise *in vitro* por diferentes coquetéis de enzimas. Estes autores observaram grande aumento da degradação quando a α -1,4-glicosidase era incubada junto com α -amilase, em comparação com a

degradação proporcionada pela α -amilase isoladamente. Konishi e col. (1994) observaram a redução em aproximadamente 50% na taxa de hidrólise do amido em sementes de trigo germinadas na presença de Bay M1099, um inibidor de α -1,4-glicosidase. Sun e Henson (1991) sugerem que este sinergismo entre as enzimas ocorreria, ao menos em parte, devido a remoção de maltose pela α -1,4-glicosidase, que, em determinadas concentrações, pode inibir α -amilase.

1.4.1.4. Alfa-1,6-glicosidasas

Outro grupo de glicosídeo-hidrolases ligados à degradação do amido é o das α -1,6-glicosidasas, enzimas que catalizam a quebra das ligações α -1,6-glicosídicas da amilopectina. Várias destas enzimas já foram descritas em vegetais, muitas delas com variada especificidade por substratos dentre elas a pululanase e a isoamilase. Tais enzimas já foram identificadas em cereais, batata, beterraba e espinafre. A única descrição da atividade de α -1,6-glicosidasas em frutos provém do trabalho de Garcia e Lajolo (1988), que identificaram a presença destas enzimas na polpa de bananas pela atividade hidrolítica sobre a isomaltose. É provável que estas enzimas desempenhem importante papel na degradação completa do amido em bananas, devido a grande proporção de amilopectina encontrada no amido deste frutos (aprox. 60% , Mota e col. 2000), e também pelo fato das demais enzimas envolvidas não serem capazes de atuar em ligações α -1,6-glicosídicas.

1.4.1.5. Fosforilases

Somada a atividade hidrolítica, a alta atividade das fosforilases (1,4- α -D-glicano:phosphate α -D-glicosiltransferase, E.C. 2.4.1.1) encontrada em diversos tecidos vegetais sugere importante papel destas enzimas no metabolismo do amido.

Na presença de fosfato inorgânico, as fosforilases degradam cadeias de glicanos unidos por ligações α -1,4 formando glicose-1-fosfato. Em cloroplastos de ervilha (Stitt e col. 1978) e tubérculos de batata (Morell e ap Rees, 1986), a degradação do amido foi apontada como fosforolítica em função da ausência de amilases nestes tecidos, embora neste último caso trabalhos posteriores tenham detectado atividade amilolítica (Nielsen e col. 1997). Kruger e ap Rees (1983) observaram que as fosforilases de cloroplastos de ervilhas são capazes de liberar glicose-1-fosfato marcada de grãos de amido marcados com [14 C]-glicose.

A maioria dos estudos, tem apontado a presença de duas formas das fosforilases: uma citossólica e outra associada aos plastídeos (Nighojkar e Kumar 1997). Esta compartimentalização parece apontar diferenças em relação a atividade, uma vez que as fosforilases também são capazes de catalisar a transferência de glicose da glicose-1-fosfato a cadeias de α -1,4-glicanos liberando fosfato inorgânico, promovendo o alongamento destas cadeias e contribuindo, deste modo, para a síntese do amido.

Em frutos, a atividade das fosforilases de amido foram detectadas em bananas (Arêas e Lajolo 1981), mangas (Fuchs e col. 1980) e abóboras-

morangas (Irving e col. 1999). Mota (2001) identificou, purificou e caracterizou as duas formas de fosforilase em polpa de bananas. Resultados obtidos por Arêas e Lajolo (1981) e Mota (2001) não mostraram variação pronunciada da atividade de fosforilases de amido durante o amadurecimento de bananas no entanto, a atividade detectada foi alta o que indica a relevância destas enzimas para o metabolismo de amido. Tais resultados contrastam com os obtidos por Hubbard e col. (1990) onde a atividade das fosforilases aumentou constantemente durante a degradação do amido. No entanto, os frutos foram submetidos a tratamento com 1000 ppm de etileno por 36h, o que pode explicar a diferença em relação aos trabalhos anteriormente citados, onde os frutos amadureceram naturalmente.

O papel das fosforilases de amido não foi elucidado, provavelmente pelo fato destas enzimas serem capazes de atuar tanto na síntese como na degradação do amido, o que sugere diferentes funções, dependentes do estágio de desenvolvimento do fruto. Dados a respeito de sua regulação também são escassos. O que se sabe até o momento é que, como as hidrolases, estas enzimas não parecem estar sujeitas à regulação alostérica.

Apesar dos avanços registrados na compreensão do processo de degradação do amido, muito estudos ainda serão necessários para chegar a um modelo que o descreva de modo geral. A visão corrente propõe que as α -amilases devam ser as enzimas iniciadoras do processo de degradação e que as demais enzimas atuariam nos produtos liberados pela sua ação. No entanto, algumas observações parecem indicar que este esquema não é

válido para todos os casos, como o já citado trabalho de Kruger e ap Rees (1983), que mostrou a capacidade da fosforilase de cloroplastos de ervilha de atacar grãos intactos de amido, a mesma atividade detectada para a fosforilase citossólica de *Populus alba*, conforme descrito por Witt e Sauter (1995).

Outra enzima ligada a degradação do amido é a enzima-D (do inglês *D-enzyme*, *disproportionating enzyme*, E.C. 2.4.1.25) uma α -1,4-glicanotransferase, cujo papel proposto, é o de remodelar os maltooligossacarídeos liberados pelas α -amilases, gerando substratos mais adequados para a ação das β -amilases e fosforilases do amido. Critchley e col. (2001) reportaram os resultados de estudos com plantas de *Arabidopsis thaliana* que não expressavam esta enzima nas folhas, onde observaram acúmulo do amido transitório nos cloroplastos . A enzima-D ainda não foi descrita em frutos.

1.4.2. Síntese de sacarose no amadurecimento

Concomitante a degradação do amido em bananas ocorre aumento na produção de açúcares, sendo o principal a sacarose que após sofrer clivagem produz glicose e frutose (Arêas e Lajolo 1981).

Segundo Leloir e Cardini (1953) a sacarose pode ser sintetizada nos vegetais por duas vias. A primeira mediada pela sacarose sintase (SuSy) utiliza uridina-difosfato-glicose (UDP-glicose) como doador de glicose e

frutose e a segunda mediada pela sacarose-fosfato sintase (SPS) utilizando frutose-6-fosfato no lugar de frutose.

1.4.2.1. *Sacarose sintase*

Embora possa catalisar a síntese da sacarose, a SuSy pode também catalisar sua clivagem e esta tem sido apontada como a principal atividade desta enzima (Pozueta-Romero e col. 1999, Sturm e Tang 1999).

Na maioria das plantas, o carbono assimilado na fotossíntese é transportado na forma de sacarose. A clivagem deste açúcar regula a entrada da sacarose em diversas vias bioquímicas como a respiração, a biossíntese da parede celular e a biossíntese de compostos de reserva, como o amido. A atividade da SuSy nestes processos tem sido considerada fundamental e junto a invertase, tem sido apontada como a enzima responsável pela força de dreno nos vegetais (Sturm e Tang 1999).

Estudos onde esta atividade foi reduzida através de técnicas de silenciamento de genes, produziram cenouras com baixa utilização de sacarose, acúmulo deste açúcar em níveis elevados e baixos níveis de UDP-glicose, glicose, frutose, amido e celulose (Tang e Sturm 1999). O mesmo tipo de abordagem foi utilizado em tubérculos de batata por Zrenner e col. (1995). Além da diminuição no rendimento de tubérculos por planta, as batatas expressando mRNA antisentido da SuSy, também apresentaram baixo acúmulo de amido. Wang e col. (1993) também correlacionaram a atividade da SuSy ao acúmulo de amido em tomates.

Cordenunsi e Lajolo (1995) observaram que a atividade da SuSy, durante o desenvolvimento de bananas, no período de enchimento do fruto, foi elevada e declinou marcadamente após a colheita. Nascimento e col. (2000) mostraram que tanto a expressão gênica como a atividade de SuSy aumentavam em bananas durante a fase de desenvolvimento, seguida de declínio pronunciado após a colheita. Tais padrões tornam possível correlacionar esta atividade a síntese de amido neste fruto, mais do que a síntese de sacarose, que após o climatério é elevada. Nesta fase, porém, a atividade de SuSy detectada nos dois trabalhos foi baixa sugerindo que esta enzima não deve ter participação na síntese de sacarose no amadurecimento.

1.4.2.2. *Sacarose-fosfato sintase*

Hubbard e col. (1990) e Cordenunsi e Lajolo (1995) mostraram que a atividade da SPS aumentava durante a síntese de sacarose em bananas. Esta enzima, atualmente é apontada como a principal enzima de síntese de sacarose sendo encontrada amplamente distribuída pelos tecidos vegetais.

Além da banana já citada, outros frutos onde a SPS foi detectada incluem tomates (Miron e Schaffer 1991), pêssegos, morangos, mangas (Hubbard e col. 1991, Bernardes-Silva 2000), kiwis (MacRae e col. 1992), abóboras (Irving e col. 1999), berinjelas (Lee e col, 1997).

A regulação da atividade de SPS parece contar com mecanismos distintos. Doehlert e Huber (1983) mostraram que a SPS de folhas de

espinafre é ativada alostericamente por glicose-6-fosfato e inibida por fosfato inorgânico.

Huber e Huber (1992) evidenciaram a regulação da SPS de folha de espinafre por fosforilação no resíduo de serina de número 158. Este processo seria responsável pela inativação da enzima quando o vegetal se encontrasse na ausência de luz. A incidência de luz provocaria a ativação de uma fosfatase que, ao remover o grupo fosfato do referido resíduo de serina, ativaria novamente a enzima. Este mecanismo de controle estaria, deste modo, coordenando a formação de sacarose durante a fotossíntese. A fosforilação da SPS foi proposta como mecanismo de regulação também em kiwis por MacRae e col. (1992) porém o sinal envolvido não envolveria luz, mas outro não evidenciado pelos autores.

Outro mecanismo de regulação da atividade da SPS, proposto em kiwis (Langenkämper e col. 1998) e bananas (Nascimento e col. 1997), envolve a síntese *de novo* da enzima conforme evidenciado pelo aumento do seu mRNA e também do aumento da proteína SPS. Durante o amadurecimento de bananas, Nascimento e col. (1997) encontraram pronunciado aumento de transcrição do gene da SPS correlacionado com aumento na síntese da proteína e de sua atividade.

Vários mecanismos de regulação para a mesma enzima poderiam ser a consequência da necessidade de flexibilizar a síntese de sacarose, processo fundamental para o desenvolvimento vegetal, atendendo, desta forma, a necessidades específicas de cada tecido.

1.5. *Metabolismo amido-sacarose e sua regulação hormonal*

Embora muitos avanços tenham sido registrados na compreensão da estrutura e do modo de ação das enzimas envolvidas no metabolismo amido-sacarose em plantas, dados sobre a regulação espacial e temporal do processo, fundamental para frutos como a banana, carecem de mais informações. Uma das principais diz respeito a quais sinais regulatórios estão envolvidos neste processo.

Estudos recentes tem demonstrado que o metabolismo de carboidratos parece ser regulado por uma complexa teia de sinais. Esta teia envolve não apenas as várias classes de hormônios conhecidas mas também açúcares, como glicose e sacarose, capazes de controlar a expressão dos genes das enzimas ligadas a síntese e degradação do amido e da síntese e clivagem da sacarose (Koch 1996, Smeekens 2000, Gibson 2000). Levando isto em conta, é provável que o controle do metabolismo de carboidratos em frutos não se deva a um único fator e sim a um balanço de sinais provindos de hormônios e metabólitos.

Existe correlação temporal entre o aumento do etileno durante o climatério e a mobilização do amido em bananas com concomitante aumento de síntese de sacarose (Seymour 1993). Além disso, o tratamento de bananas com etileno, induz o aumento de atividade das enzimas envolvidas no metabolismo amido-sacarose (Hubbard e col. 1990). Porém, não está claro se o mecanismo envolve a atuação direta do etileno na regulação da expressão destas enzimas ou se o aumento da demanda por energia,

provocado pelo etileno, seria o responsável por sua indução. Até o momento não há trabalhos na literatura que mostrem o etileno como o único sinal regulador do metabolismo de carboidratos no amadurecimento de frutos. Uma evidência do envolvimento de outros sinais regulatórios, durante a mobilização do amido, é encontrada no kiwi. Estes frutos são classificados como climatéricos em função do aumento da produção de etileno acompanhado do aumento na respiração, durante o amadurecimento (Pratt e Reid 1974). Porém a degradação do amido, nestes frutos, precede o climatério, conforme mostrado por MacRae e col. (1992), o que indica a existência de uma dissociação entre os dois processos. Não se sabe se este é um comportamento único deste fruto porém, observações como esta reforçam a discussão sobre um possível controle multi-hormonal do metabolismo de carboidratos, justificando estudos a respeito do efeito de substâncias como o AIA neste processo.

Em bananas, não existem estudos sobre os efeitos das auxinas no metabolismo de carboidratos e enzimas correlacionadas. Estudos como os conduzidos por Cordenunsi e Lajolo (1995), onde foram observados diferentes perfis de atividade para enzimas envolvidas no metabolismo da sacarose em bananas amadurecidas na planta e bananas destacadas, levantam questões a respeito do possível envolvimento do AIA no metabolismo de carboidratos nestes frutos. A inibição do aumento respiratório observada por Vendrell (1969) durante o amadurecimento de fatias de bananas infiltradas com AIA também aponta nesta direção, em vista da relação existente entre o climatério respiratório e o metabolismo de

carboidratos (Tucker 1993). O efeito inibitório das auxinas sobre a respiração também foi observado em pêras (Frenkel e Dyck 1973) e abacates (Tingwa e Young 1975). Vendrell também observou o atraso no aumento do teor de sólidos solúveis em fatias de banana infiltradas com AIA, indicando uma possível interferência do hormônio no metabolismo de carboidratos. Em vista destas observações, a infiltração de fatias de bananas com auxinas, além de revelar detalhes sobre seu envolvimento no metabolismo de carboidratos, provê um modelo de estudos interessante sobre as mudanças que ocorrem durante a degradação do amido e a síntese de sacarose durante o amadurecimento deste fruto.

Apesar da notória importância do metabolismo amido-sacarose, particularmente no amadurecimento da banana, muitos pontos deste metabolismo ainda são obscuros. Quase não existem trabalhos na literatura que mostrem como o AIA pode influenciar tal metabolismo, alterando os padrões de atividade e expressão gênica das enzimas correlacionadas, bem como sua relação com outros sinais hormonais.

Dentro do contexto da fisiologia pós-colheita de frutos e também da fisiologia vegetal de modo geral, o estudo do metabolismo primário (no qual o metabolismo amido-sacarose se insere) e como ele é regulado é de fundamental importância para o desenvolvimento de tecnologias de melhoramento genético.

2. Objetivos

O presente trabalho teve por objetivo estudar o efeito do ácido indol-3-acético (AIA) sobre o metabolismo amido-sacarose e algumas enzimas correlacionadas, durante o amadurecimento da banana.

3. Materiais

3.1. Frutos

As bananas (*Musa acuminata* AAA cv. Nanicão) utilizadas na infiltração do AIA, sem tratamento com etileno e com aproximadamente 110 dias pós-antese, foram obtidos junto ao Ceagesp/São Paulo com dois dias pós-colheita. Os frutos foram lavados com água e mantidas por 1 minuto em solução de hipoclorito de sódio a 1% (v/v) para redução da carga microbiana superficial, lavadas novamente com água e imediatamente utilizados.

Para análise de AIA endógeno, foram utilizados frutos colhidos com aproximadamente 110 dias pós-antese junto ao herbário do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. As bananas desta procedência foram lavados e higienizados como descrito acima. Os frutos foram mantidos em câmara B.O.D. a 20°C durante todo o período de amadurecimento, estimado por medidas de respiração e etileno. Amostras de cinco bananas, escolhidas aleatoriamente, foram coletadas em espaços de 24 horas, descascadas, congeladas em N₂ líquido e armazenadas a -80°C.

4. Métodos

4.1. *Preparo das fatias de bananas*

Para a infiltração de AIA, foram cortadas fatias de bananas da porção central do fruto com aproximadamente 6mm de espessura, utilizando uma lâmina de aço inoxidável. As fatias foram pesadas e mergulhadas em solução de manitol 120mM contendo 0,1mM de AIA, onde permaneceram até que o peso inicial aumentasse em 8%. As fatias de bananas controle foram tratadas apenas com manitol 120mM. As fatias, foram então acondicionadas em jarros de vidro contendo no fundo uma camada de bolas de vidro. Para manter a umidade relativa dentro dos frascos em torno de 85%, 10 ml de água destilada foram adicionados no fundo dos jarros. Cada jarro continha 10 fatias, e cada grupo (controle e tratado com AIA) 6 jarros. Os jarros foram mantidos a 20°C ventilados com ar (fluxo de 1L/h) tratado com KOH 20% (m/v) para a remoção de CO₂. Amostras coletadas em espaços de 24 horas (3 fatias, cada uma retirada de jarros diferentes) foram descascadas, congeladas em N₂ líquido e armazenadas em freezer a -80°C. Todo o procedimento de preparo e amostragem das fatias foi conduzido em condições assépticas.

No primeiro experimento, onde foram determinados conteúdo de amido, açúcares (glicose, frutose e sacarose), atividade enzimática, extração de RNA e Northern Blot de SuSy, SPS e β -amilase, foram utilizados jarros de vidro de 1,5 L e a respiração foi estimada pela medida da produção de

CO₂ contido no fluxo de ar proveniente dos frascos utilizando análise de gases por infravermelho.

Nos experimentos posteriores, foi empregada a cromatografia gasosa para estimar a respiração e a produção de etileno das fatias, durante o amadurecimento. A diluição no espaço de ar livre do interior do jarro reduz o sinal cromatográfico do CO₂ e do etileno dificultando sua estimativa. Para contornar tal problema, foram realizados ensaios para a otimização da técnica e os melhores resultados foram obtidos com fatias mantidas em jarros de 0,5 L. Os jarros foram mantidos fechados por 1 hora a fim de concentrar o CO₂ e o etileno no espaço de ar livre. Alíquotas do ar foram retiradas com seringas do tipo *gas tight*, adequadas para este tipo de análise, e injetadas no cromatógrafo.

Devido ao grande número de amostras em cada experimento foi preciso escolher pontos-chave para as análises de hormônios e enzimas. Os pontos foram escolhidos tendo como base os perfis de amido, açúcares solúveis, respiração e etileno.

4.2. Medidas de respiração e etileno

No primeiro experimento realizado, a respiração foi estimada pela produção de CO₂ medida no fluxo de ar proveniente dos frascos utilizando um analisador de gases por infravermelho da Analytical Development, Co. A quantidade de CO₂ foi estimada em comparação com um padrão de CO₂ 326 ppm em ar sintético (Air Liquid).

Nos experimentos subseqüentes, a estimativa de CO₂ foi realizada pela injeção de amostras de ar do interior dos jarros com as fatias em cromatógrafo a gás da Hewlett-Packard modelo GC-6890 equipado com detetor de condutividade térmica. A coluna utilizada foi a HP-Plot Q (30 m, D.I. 0,53 mm). As condições cromatográficas empregadas foram: injeção com divisor de amostra (*split*) em taxa de 50:1 e temperatura de 250°C; volume de injeção 1ml; corrida isotérmica a 30°C empregando hélio como gás carregador em fluxo constante de 4ml/min; temperatura do detetor em 250°C utilizando como referência fluxo de hélio a 7ml/min. A estimativa da quantidade de CO₂ foi feita em relação a injeção de 1 mL de padrão de CO₂ 326 nL/L em ar sintético da Air Liquid.

Na análise de etileno, foi empregado o mesmo equipamento e a mesma coluna cromatográfica, porém com detecção por ionização de chama. O volume de injeção foi de 10 mL e para injetar tal quantidade de ar, foi empregado o modo de injeção *pulsed splitless*, desenvolvido pela Hewlett-Packard, opcional das válvulas de injeção com EPC utilizadas nos modelos de cromatógrafo a gás desta empresa. As condições de injeção empregadas foram: pressão de 20 psi por 2 minutos, fluxo de ventilação de 5 ml/min após 30 segundos de injeção e temperatura do injetor em 200°C. As demais condições cromatográficas empregadas foram: corrida isotérmica a 30°C empregando hélio como gás carregador em fluxo constante de 1 ml/min; temperatura do detetor em 250°C, fluxo de ar e hidrogênio no detetor em 450 ml/min e 50 ml/min, respectivamente. A estimativa da quantidade de

etileno produzida pelas fatias foi feita em relação a injeção de um padrão de 0,1 nL/L de etileno em ar sintético da Air Liquid.

4.3. Determinação de amido, açúcares solúveis e proteína solúvel

O teor de amido foi determinado enzimaticamente pelo método descrito por Arêas & Lajolo (1981). O amido foi extraído com hidróxido de sódio 0,5N, neutralizado com ácido acético 0,5N, precipitado com etanol 80%, hidrolisado com amiloglicosidase e a glicose liberada determinada pelo sistema glicose oxidase/peroxidase/ABTS, segundo método de Bergmeyer (1974). O cálculo foi baseado em curva-padrão de glicose.

Os açúcares solúveis foram extraídos com etanol 80% a 80°C por três vezes, os sobrenadantes foram combinados, o etanol evaporado em *speed vac* a 45°C e o volume reconstituído com água. Os açúcares solúveis foram determinados enzimaticamente conforme descrito por Cordenunsi e Lajolo (1995).

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

4.4. Extração das enzimas

Para a atividade de SuSy e SPS, as polpas das fatias de bananas congeladas foram trituradas em gral de porcelana. Aproximadamente 0,25 gramas de amostra foram homogeneizadas com 1 ml de solução extratora

contendo Hepes-KOH 100 mM pH 7,0, contendo NaF 1 mM, EDTA 20 mM, cisteína 20 mM, benzamidina 1 mM e polivinilpirrolidona 40000 (PVP 40) 1% (m/v). Os homogenatos obtidos foram centrifugados a 12000 x g por 15 minutos. Os sobrenadantes foram dialisados ou aplicados em coluna Sephadex G-50 Hytrap (Pharmacia) para dessalinização.

Para a atividade amilásica total, os extratos dessalinizados foram obtidos do mesmo modo, a solução extratora utilizada foi a mesma apenas omitindo o EDTA e o NaF e acrescentando o NaCl 0,3% (m/v).

Para a atividade de α -amilase a solução extratora usada era Hepes-KOH 50 mM pH 7,0, contendo cisteína 20 mM, benzamidina 1 mM, polivinilpirrolidona 40000 (PVP 40) 1% (m/v). Para a atividade de β -amilase e α -glicosidase foi usada a mesma composição para solução extratora com o acréscimo de EDTA 20 mM. A preparação do extrato para a atividade de fosforilase empregou essa mesma composição de solução extratora exceto pelo tampão Hepes-KOH 50 mM pH 7,5. Para cada uma destas extrações, os extratos obtidos após a homogeneização, foram centrifugados a 12000 x g e o sobrenadante recolhido e utilizado nos ensaios de atividade.

4.5. Atividade enzimática

A atividade de SuSy foi medida no sentido de síntese de sacarose, em meio de reação contendo 40 μ L do extrato enzimático, Tris-HCl 100 mM pH 7,6, NaF 1 mM, frutose 10 mM, UDP-glicose 5 mM, $MgCl_2$ 15 mM, num volume final de 100 μ L. A atividade de SPS, em condições saturantes de

substrato, foi realizada com 20 μL de extrato enzimático, HEPES-KOH 50 mM pH 7,5, NaF 1 mM, UDP-glicose 10 mM, frutose-6-fosfato 5 mM, glicose-6-fosfato 15 mM, MgCl_2 15 mM, em um volume total de 50 μL de meio de reação. Em ambos os casos, após incubação a 37°C, a reação foi interrompida e a frutose remanescente destruída pela adição de 200 μL de NaOH 0,1N e incubação em banho fervente por 10 minutos. A sacarose (atividade de SuSy) e a sacarose-6-fosfato (atividade de SPS) produzidas, foram determinadas através da reação da frutose liberada em meio ácido e reação com ácido tiobarbitúrico (Percheron 1962).

A atividade **amilásica total** foi determinada pela reação do ácido dinitrosalicílico (DNS; Bernfeld 1955) com as extremidades redutoras dos oligossacarídeos formados na reação de 50 μL do extrato enzimático com 50 μL de solução de amido 1% em tampão acetato de sódio 100 mM pH 5,9. Após 30 minutos de incubação a 37°C, a reação foi interrompida pela adição da solução de DNS e incubação em banho fervente por 10 minutos. A absorbância da solução foi lida a 410 nm e a concentração do produto formado foi calculada com base em curva-padrão de maltose.

A atividade **α -amilásica** foi medida utilizando o reagente Ceralpha (Megazyme International Ireland, Ltd) composto do substrato *p*-nitrofenil-maltoheptaosídeo, bloqueado na extremidade não-redutora (BPNPG7-EPS), e α -glicosidase. O bloqueio do terminal não-redutor impede a ação de β -amilases e fosforilases, tornando este substrato específico a ação de α -amilases. Após incubação a 37°C por 1 hora de 50 μL do extrato enzimático com 50 μL do reagente, a reação foi interrompida com a adição de 750 μL

de Tris 1%. A absorvância do *p*-nitrofenol liberado foi lida a 410 nm e sua concentração determinada com base em curva-padrão de *p*-nitrofenol

A atividade **β -amilásica** foi medida conforme descrito por McCleary e Codd (1989). A mistura de reação (100 μ L) constituiu-se de tampão fosfato de sódio 36 mM (pH 7,0) 2 U de α -glicosidase (Sigma), 0,25 μ mol de *p*-nitrofenil-maltopentaosídeo (PNPG5; Sigma) e 50 μ L do extrato enzimático. O meio de reação foi incubado a 37°C por 1 hora e a reação foi interrompida pela adição de 750 μ L de Tris 1%. A absorvância do *p*-nitrofenol, liberado do substrato, foi lida a 410 nm e a concentração calculada com base em curva-padrão de *p*-nitrofenol.

Para estimar a atividade de **α -glicosidases** utilizou-se o substrato sintético 4-metilumbeliferil- α -D-glicosídeo (4MU α G; Sigma) que, após ação da enzima, libera 4-metilumbeliferona, um produto fluorescente. A mistura de reação (1 mL) constituiu-se de 100 μ L do extrato enzimático, 600 μ L tampão citrato-fosfato de sódio 100 mM pH 6,5 e 300 μ L substrato 4MU α G 330 mM . A reação foi interrompida, após incubação a 37°C por 40 minutos, com a adição de 3 mL de tampão glicina-NaOH 500 mM pH 10,5. O produto formado, 4-metilumbeliferona, foi medido fluorimetricamente utilizando comprimentos de onda de excitação de 366 nm e de emissão de 450 nm. A concentração foi calculada com base em curva-padrão de 4-metilumbeliferona.

A atividade de **fosforilases do amido** foi medida no sentido da degradação do amido pela liberação de glicose-1-fosfato a partir de amido solúvel de batata a 2% em água, conforme descrito por Arêas e Lajolo

(1981). O meio de reação (500 μ L constituiu-se de 50 μ L de extrato enzimático, tampão Tris-maleato 50 mM pH 7,5, NaF 50 mM, amido 2% (m/v), Na_2HPO_4 500 mM. Após 30 minutos a 37°C, a reação foi interrompida por incubação em banho fervente por 1 minuto. A glicose-1-fosfato formada foi medida enzimaticamente após a sua conversão em glicose-6-fosfato, pela fosfoglicomutase (Sigma) seguida da formação de glicuronídeo mais NADPH pela glicose-6-fosfato desidrogenase (Sigma). A concentração de NADPH foi medida pela leitura de absorvância a 340 nm. Pela estequiometria das reações, cada molécula de NADPH formada foi originada de uma molécula de glicose-1-fosfato.

4.6. Extração de RNA e Northern blotting.

Os RNAs totais das polpas das fatias controle e infiltradas com AIA foram obtidos conforme descrito por López-Gómez e Gómez-Lim (1992) e separados em gel de agarose 1% contendo formaldeído conforme descrito por Sambrook e col. (1989). Foram aplicados 20 μ g de RNA total de cada amostra no gel. Após o fracionamento, os RNAs totais e os padrões de RNA (Sigma) foram transferidos à vácuo para membranas de nylon (Hybond N+; Amersham-Pharmacia Biotech) e visualizados pela coloração com azul de metileno. As membranas, nas quais não foram observadas diferenças no carregamento dos poços, foram submetidas à hibridização. Para o preparo de sondas de cDNA utilizou-se os insertos de SPS (Nascimento e col. 1997), SuSy (Nascimento e col. 2000) e β -amilase (Medina-Suárez e col. 1997;

clone pBAN-UU32) isolados por restrição dos respectivos vetores, separados em gel de agarose e purificados usando o sistema de purificação Prep-a-Gene (BioRad). As sondas de cDNA foram marcadas com ^{32}P utilizando o Ready-To-Go Labeling Kit (Amersham-Pharmacia Biotech), hibridizadas a 42°C em condições padrão em formamida 50%, lavadas e expostas a filmes de raios X a -80°C (Sambrook e col. 1989). As membranas foram lavadas, entre uma hibridização e outra, conforme as instruções do fabricante.

4.7. Análise de AIA livre e conjugado.

O método empregado para a extração e purificação parcial do AIA livre e conjugado éster e amida-ligados das fatias de bananas controle e tratadas com AIA, bem como das bananas *in natura*, foi o descrito por Chen e col. (1988).

Aproximadamente 1 g da polpa de banana foi homogeneizada em 4 ml de tampão imidazol 0,2 M em isopropanol e 1 μg de padrão interno de [$^{13}\text{C}_6$]-AIA (Cambridge Isotopes, Inc) por 1 minuto em homogeneizador Polytron. O homogenato foi centrifugado a $12000 \times g$ por 15 minutos e o sobrenadante coletado e dividido em 3 partes iguais, uma para análise do AIA livre, outra para análise dos conjugados éster e a última para os conjugados amídicos. A fração reservada para a análise do AIA livre foi aplicada em coluna de troca aniônica aminopropil (LC-NH₂; Supelco) previamente lavada e condicionada com tampão imidazol 0,2M, pH 7,0. A

fração contendo o AIA foi eluída com ácido acético a 2% em metanol, seca em *speed vac*, retomada em metanol e submetida a purificação parcial por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em cromatógrafo Hewlett-Packard modelo 1100, com coluna octadecil-sílica (ODS-3 Whatman). A fase móvel empregada foi acetonitrila 20% (v/v) em água acidificada com 1% de ácido acético. O monitoramento de cada corrida foi feito fluorimetricamente (λ de excitação 280 nm, λ de emissão 350 nm) e a fração contendo o AIA foi coletada, seca em *speed vac*, ressuspensa em metanol e metilada com diazometano etéreo. O extrato metilado foi submetido a análise por cromatografia gasosa-espectrometria de massa com monitoramento seletivo de íons (CG-EM-MSI).

Para a obtenção dos conjugados do AIA éster-ligados, o isopropanol contido nesta fração foi evaporado em *speed vac* e foi adicionada do mesmo volume de NaOH 1N e submetido a hidrólise a temperatura ambiente por 1 hora. Após a hidrólise as amostras foram tituladas com HCl 1N até obter-se pH 2,5. Esta fração então foi aplicada em uma coluna de extração em fase sólida de octadecil-sílica (Supelclean LC₁₈ –Supelco) previamente lavada e condicionada com ácido acético 1% em água. A fração contendo o AIA foi eluída com acetonitrila. As amostras foram secas em *speed vac* e retomadas em metanol. A partir desse momento, a marcha analítica seguiu os mesmos passos empregados para a análise do AIA livre. A concentração de AIA éster-ligado foi obtido pela subtração do valor encontrado para a fração livre.

Para análise dos conjugados amídicos o procedimento empregado foi o mesmo dos conjugados éster, diferenciando no procedimento de hidrólise

que, empregou NaOH 7N a 100°C por 3 horas. Após a hidrólise, as amostras foram tituladas com HCl 4N até pH 2,5. A partir desse momento a marcha analítica empregou os mesmos passos da análise dos conjugados éster-ligados. A concentração dos conjugados amídicos foi obtida pela subtração do valor da concentração do AIA livre mais AIA éster-ligado.

As análises por CG-EM-MSI foram realizadas em cromatógrafo a gás Hewlett-Packard modelo 6890 acoplado a detetor por espectrometria de massa modelo 5973. A coluna utilizada nas separações foi a HP-1701 (30 m, D.I. 0,25 mm, 0,50 µm de espessura do filme interno) tendo hélio como gás carreador, com fluxo de 4 ml/min. As injeções foram feitas automaticamente por meio do injetor Hewlett-Packard modelo LS-1100 e o volume injetado foi de 2 µL, sem utilização do divisor de amostras (*splitless*), com fluxo de ventilação de 10 ml/min após meio minuto da injeção. A coluna foi mantida a 160°C por 2 minutos seguida de rampa de temperatura de 40°C/min até 200°C. Foram monitorados os íons com relação massa/carga (*m/z*) em 130 e 136 correspondentes ao AIA endógeno e 136 e 195 correspondentes ao padrão interno de [¹³C₆]-AIA. A concentração de AIA endógeno foi obtida pela relação entre as áreas dos picos de AIA nos cromatogramas extraídos em *m/z* 130 e 136.

4.8. Infiltração de [^{14}C]-glicose em batoques de banana

Batoques foram extraídos de bananas pré-climatéricas, lavadas e higienizadas com hipoclorito a 1%, utilizando um furador de rolhas de aço inoxidável com 6 mm de diâmetro interno. O furador foi aplicado transversalmente na porção central dos frutos e pressionado de modo a retirar um batoque, que continha em ambas as extremidades a casca do fruto e entre estas a polpa. Os batoques foram pesados e mergulhados em solução de manitol 120 mM (controle) e manitol 120 mM com 0,1 mM de AIA sendo uma triplicata para cada condição do ensaio. Após atingirem 6 a 8% de ganho de peso em base fresca, os batoques foram retirados das soluções e colocados em jarros de vidro de 0,5 L. Cada jarro continha uma camada de bolas de vidro sobre a qual os batoques foram colocados, separando-os de uma camada de 10 mL de água contida no fundo dos jarros para manter a umidade relativa no interior destes em torno de 85%. Os batoques foram mantidos por 48 horas no interior dos jarros sob corrente de ar umidificado, foram retirados e mergulhados por 4 horas em tampão Mes 10 mM pH 5,5 contendo 0,3 mM de [$\text{U-}^{14}\text{C}$]-glicose. Ao fim do tempo estipulado, os batoques foram lavados 5 vezes com 2 mL de tampão Mes 10 mM pH 5,5, secos com papel absorvente e congelados em N_2 líquido.

Aproximadamente 500 mg da polpa de cada batoque, trituradas em gral de porcelana com N_2 líquido, foram usadas para a extração de açúcares solúveis com etanol 80% a 80°C por três vezes. Os sobrenadantes de cada

extração foram combinados, o etanol evaporado em *speed vac* e o resíduo reconstituído em água. Os açúcares solúveis foram determinados por CLAE com detecção por amperometria de pulso (Cromatógrafo Dionex 5500, Coluna CarboPac PA-1, fase móvel NaOH 18 mM, fluxo 1ml/min, volume de amostra injetado 25 μ L). Foi considerado como teor de açúcares totais, a soma das concentrações de glicose, frutose e sacarose.

Para a extração de amido, adicionou-se 4 mL de água ao resíduo da extração de açúcares e a suspensão foi autoclavada por 2 horas a 121°C. Alíquotas de 100 μ L da suspensão resultante foram incubadas com 1 ml de solução de amiloglicosidase 28U/ml (Sigma) e α -amilase pancreática 0,4U/mL (Sigma) por duas horas. A glicose resultante foi determinada pelo sistema glicose oxidase/peroxidase/ABTS, segundo método de Bergmeyer (1974). O cálculo foi baseado em curva-padrão de glicose.

Alíquotas de 1 mL do extrato de açúcares e da suspensão do resíduo autoclavado, foram misturadas com líquido de cintilação miscível com água (Amersham-Pharmacia Biotech) e a radioatividade foi medida em um cintilador modelo TriCarb 3000 da Packard (Montreal, Canadá). A radioatividade incorporada foi expressa em contagens por minuto (CPM) por miligrama de açúcares ou amido por grama de peso em base fresca. A relação entre a radioatividade incorporada no amido e nos açúcares serviu de base para a avaliação do efeito do AIA na síntese *de novo* do amido.

5. Resultados e Discussão

5.1. *Otimização do modelo de infiltração em fatias de bananas*

A utilização de fatias de bananas para estudos sobre o amadurecimento foi empregada por vários autores (Palmer e MacGlasson 1969, Vendrell 1969, Areas e Lajolo 1981). Estes estudos mostraram que o amadurecimento de fatias do fruto se processa de modo similar ao do fruto intacto, conforme revelado pelas medidas de respiração, produção de etileno (Palmer e MacGlasson 1969), teores de sólidos solúveis (Vendrell 1969) e atividade de fosforilase de amido e fosfatase (Arêas e Lajolo, 1981).

As principais críticas ao emprego de métodos que utilizam partes de frutos para o estudo do amadurecimento e efeitos de substâncias teste, referem-se ao estresse provocado no tecido durante o corte e a infiltração, evidenciado pelo aumento respiratório e na produção de etileno, e a penetração da substância no tecido. Frenkel e Dyck (1973) demonstraram que o estresse osmótico é reduzido quando as infiltrações são feitas com solução de manitol ao invés de água, conforme mostrado por diferenças no padrão de degradação de clorofila, perda de firmeza na casca e produção de etileno durante o amadurecimento de pêras infiltradas com manitol e infiltradas com água.

A infiltração à vácuo foi sugerida como a melhor maneira de obter alta penetração da solução da substância teste (Palmer e MacGlasson, 1969, Frenkel e Dyck 1973). No entanto, o uso do vácuo foi apontado como um

fator de estresse adicional ao tecido (Catalá e col. 1992). Por outro lado o uso da infiltração por imersão foi apontado como insuficiente para garantir um grau de penetração satisfatório da substância teste (Vendrell 1970).

Dada a controvérsia existente, foram realizados testes para a otimização do modelo, visando encontrar condições onde o estresse ao qual o tecido seria submetido pudesse ser reduzido. O método de corte e armazenamento das fatias durante o amadurecimento foi baseado no protocolo de Palmer e MacGlasson (1969). Em vista dos resultados de Frenkel e Dyck (1973), foi escolhido o manitol como solução carreadora do AIA. Como não há dados a respeito da pressão osmótica encontrada em tecidos de bananas da cultivar Nanicão empregada nos estudos, a concentração escolhida foi calculada com base em valores médios de pressão osmótica de frutos, encontrados na literatura (Schaffer e Andersen 1997). Para todas as infiltrações tanto das fatias controle como das fatias tratadas com AIA foram utilizadas soluções contendo manitol 120 mM. O valor da concentração do AIA a ser empregado nos testes foi baseado no trabalho de Vendrell (1969) que observou ser 0,1 mM a menor concentração capaz de induzir efeito retardador do amadurecimento em fatias de bananas.

A comparação entre a infiltração à vácuo e por imersão das fatias, foi feita tomando por base a respiração das fatias durante o amadurecimento após a infiltração. Os resultados indicaram que o estresse inicial era reduzido nas fatias infiltradas por imersão devido a menor indução da respiração. Para avaliar se a infiltração da substância teste era adequada quando utilizada a imersão, foram infiltradas fatias de bananas com manitol

120 mM mais AIA 0,1 mM e avaliado se havia diminuição da respiração no fruto, conforme descrito por Vendrell (1969). Foi observada a redução no climatério respiratório das fatias infiltradas com o hormônio quando comparadas a fatias controle infiltradas apenas com manitol 120 mM mostrando, assim, que a infiltração por imersão reproduzia os efeitos observados na infiltração à vácuo.

5.2. Avaliação da respiração, degradação do amido e síntese da sacarose após o tratamento com AIA.

A Figura 2 mostra a taxa respiratória, os níveis de amido e sacarose e a atividade amilásica total em fatias de bananas infiltradas com AIA em manitol e fatias controle, infiltradas apenas com manitol. Os resultados relativos a evolução da respiração durante o amadurecimento estão em acordo com os estudos de Vendrell (1969) em fatias de bananas tratadas com AIA, que mostraram o atraso no aumento da taxa respiratória promovido pelo hormônio. O corte e a infiltração provocaram pequeno aumento da taxa respiratória logo no início do experimento (Figura 2A) que declinou e estabilizou entre o 2^o e o 4^o dia pós-infiltração. A repetição deste padrão foi observada em experimentos posteriores. O aumento respiratório esperado durante o amadurecimento das bananas ocorreu em ambos os grupos e atingiu o pico no 11^o dia pós-infiltração. Porém a quantidade de CO₂ detectada nas fatias infiltradas com AIA foi 40% menor em relação as fatias controle.

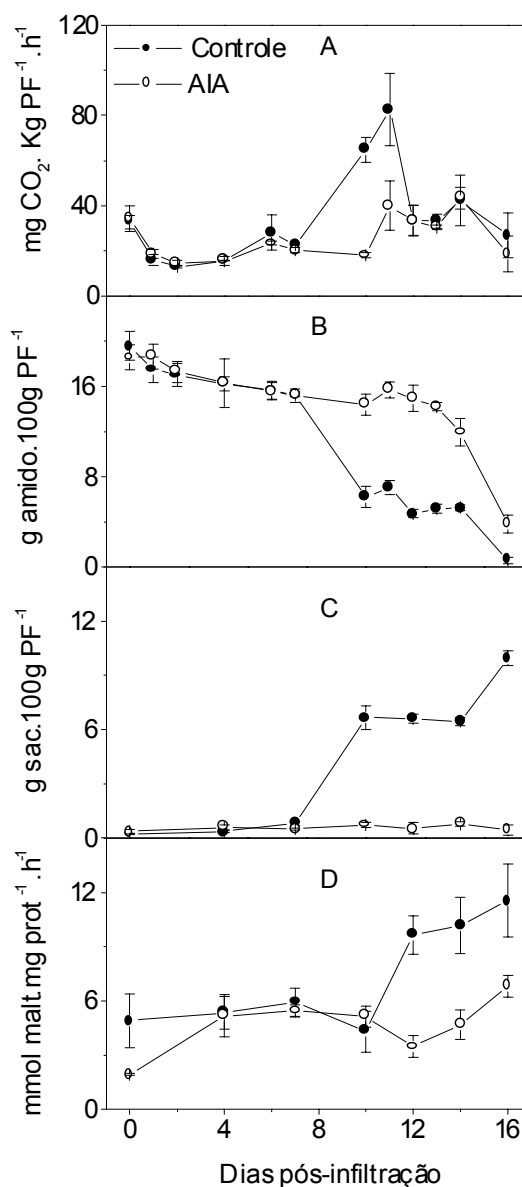


Figura 2: Efeito do AIA sobre a respiração (A), conteúdo de amido (B), sacarose (C) e atividade amilásica total (D) em fatias de bananas durante o amadurecimento. As fatias controle foram infiltradas com manitol 120 mM e as fatias tratadas com o hormônio infiltradas com AIA 0,1 mM em manitol 120 mM. Cada ponto representa a média \pm erro-padrão ($n = 3$, exceto pela respiração onde $n = 6$) malt., maltose; sac., sacarose.

Frenkel e Dyck (1973) e Vendrell (1969) observaram a inibição da respiração em pêras e bananas, respectivamente, quando infiltradas com AIA, porém correlacionaram o efeito do hormônio a inibição da síntese de etileno. Nas pêras tratadas com auxina não foi observada alteração na evolução do etileno em comparação com pêras não tratadas e nos estudos de Vendrell (1969), embora o hormônio tenha atrasado o pico respiratório em fatias infiltradas com soluções de 0,001 a 10 mM de AIA, a evolução do etileno só foi atrasada em fatias de bananas infiltradas com soluções de AIA acima de 1mM, ou seja, dez vezes a concentração empregada em nossos experimentos.

O aumento da taxa respiratória durante o climatério de bananas está relacionado a massiva conversão do amido em açúcares (Marriott e col. 1981) e a oxidação destes, principalmente pela via glicolítica (Beaudry e col. 1989). Trabalhos anteriores tentaram correlacionar o atraso do amadurecimento de frutos provocado pelo AIA a uma possível inibição da produção de etileno (Vendrell 1969, Frenkel e Dyck 1973), porém, não encontraram efeito inibitório da auxina sobre o aumento do etileno durante o climatério. Tomando por base estes precedentes da literatura, e também tendo em vista a estreita ligação entre a respiração e o metabolismo de carboidratos, foi avaliada a hipótese da inibição do amadurecimento de bananas tratadas com auxina ocorrer em função do efeito do hormônio sobre o metabolismo amido-sacarose.

As Figuras 2B e 2C mostram que os perfis de degradação de amido e síntese de sacarose foram afetados nas fatias tratadas com AIA. A

degradação do amido sofreu forte inibição, começando a declinar apenas no 14^o dia pós-infiltração, ou seja, 7 dias após as fatias controle. Interessante notar que o pico respiratório ocorreu no 11^o dia pós-infiltração, onde o conteúdo de amido nas fatias tratadas ainda era alto. Este mesmo padrão foi observado em mais três experimentos independentes. Nas fatias controle, a degradação do amido e a síntese de sacarose ocorreram de modo concomitante seguindo os padrões já observados em bananas inteiras (Arêas e Lajolo 1981). Iniciando no 7^o dia pós infiltração, a degradação levou os conteúdos de amido de teores em torno de 16% em média a menos de 1%, com forte queda entre o 7^o e o 11^o dia, onde foi registrado o pico respiratório. Já o conteúdo de sacarose, que até o 7^o dia pós-infiltração era inferior a 1%, passou rapidamente a 6% entre o 7^o e o 11^o dia atingindo ao fim do experimento teores próximos a 11% em média. Estes valores encontram-se em acordo com os já observados em bananas inteiras (Cordenunsi e Lajolo 1995).

A síntese de sacarose foi fortemente inibida nas fatias tratadas com AIA e mesmo durante a degradação do amido, que ocorreu entre o 14^o e o 16^o dia pós-infiltração, não foi observado aumento concomitante de sacarose.

Os resultados obtidos sugerem que a inibição na respiração observada nas fatias de bananas tratadas com AIA provavelmente ocorreu em função do menor aporte de substratos respiratórios (açúcares), como consequência da inibição do metabolismo amido-sacarose promovida pelo hormônio.

Em vista da correlação existente entre a degradação de amido e mudanças na atividade de enzimas amilolíticas, foram buscadas evidências que apontavam como causa da inibição da degradação do amido nas fatias tratadas com AIA, a alteração nos padrões de atividade de enzimas envolvidas nesta degradação. A Figura 2D mostra que o perfil de atividade amilásica total, determinado pelo método descrito por Bernfeld (1955), foi muito similar entre os dois grupos até o 10^o dia pós-infiltração. A partir deste ponto até o fim do experimento, no entanto, a atividade amilásica evoluiu de forma diferente entre os grupos. Enquanto o grupo controle apresentou aumento de quase 3 vezes neste período, as fatias tratadas com AIA só começaram a apresentar aumento na atividade amilásica a partir do 12^o dia pós-infiltração e mesmo assim em taxas menores que as observadas nas fatias controle. Tal resultado mostrou que, ao menos em parte, o efeito inibitório do AIA no metabolismo do amido foi consequência da inibição da atividade de enzimas envolvidas na degradação do amido. Na Figura 2D, observa-se, nas fatias controle, uma aparente falta de sincronia entre a degradação do amido e o aumento da atividade amilásica, no período entre o 7^o e o 10^o dia pós-infiltração. O método de Bernfeld possui limitações na avaliação da atividade amilolítica, quando aplicado a extratos com várias enzimas capazes de atuar sobre o amido, como é o caso dos extratos de bananas. Outra limitação se refere a incapacidade do método em detectar atividade de fosforilases de amido. Porém este método serviu de base e ponto de partida para a exploração mais detalhada dos efeitos do AIA sobre as enzimas envolvidas na degradação do amido em bananas.

Dentre os efeitos do AIA sobre enzimas relacionadas a mobilização do amido, encontram-se a estimulação da secreção de amilases em células da camada de aleurona de cevada (Klamt 1993) e o estímulo da atividade de uma α -amilase em cotilédones de ervilha (Hirasawa e Yamamoto 1991). O efeito inibitório de auxinas sobre a atividade amilolítica, porém, ainda não foi descrito.

Garcia e Lajolo (1988) detectaram a atividade de várias enzimas capazes de atuar na degradação do amido em extratos enzimáticos durante o amadurecimento de bananas e observaram que estas enzimas aumentavam de atividade durante este período. Dentre as enzimas, observou-se que a β -amilase aumentava significativamente sua atividade paralelamente a degradação do amido e foi sugerida como sendo importante no processo. Outra evidência que aponta nesta direção foi fornecida pelo trabalho de Medina-Suárez e col. (1997) que detectou o aumento na transcrição do mRNA de β -amilase durante o amadurecimento de bananas.

As Figuras 3 e 4 mostram as atividades e níveis de transcrição, respectivamente, de enzimas ligadas a síntese de sacarose (SuSy e SPS) e a degradação do amido (β -amilase).

Os resultados das Figuras 3A e 4 mostram que tanto a atividade quanto o nível de mRNA de β -amilase foram afetados pelo AIA. Enquanto nas fatias controle foi observado um acúmulo pronunciado do mRNA da enzima no 12º dia pós-infiltração, nas fatias tratadas com AIA este aumento foi fortemente inibido acontecendo com 4 dias de atraso. A atividade máxima de β -amilase foi detectada no 12º dia pós-infiltração nas fatias controle e

apenas no 16º dia nas fatias infiltradas com o AIA. Em ambos os grupos, a atividade máxima da enzima coincidiu com o máximo acúmulo do mRNA. Também observou-se que as atividades máximas de β -amilase encontradas em ambos os grupos, correlacionaram-se com os aumentos na atividade amilolítica total detectados no ensaio mostrado na Figura 2D.

Witt e Sauter (1995) mostraram que a ação combinada de β -amilase e endoamilases, como a α -amilase, é capaz de converter rapidamente, *in vitro*, grãos de amido extraídos de *Populus alba* em maltose. Foi observado que sozinha a β -amilase possui discreta atividade contra grãos de amido intactos. A alta afinidade da enzima por oligoglicanos e sua capacidade de degradar rapidamente os produtos do ataque inicial das endoamilases sugerem que esta enzima deve desempenhar papel importante na hidrólise subsequente ao ataque inicial do grão de amido, promovido por endoamilases. Por outro lado, outros autores (Beck e Ziegler 1989, Wang e col. 1995) não apontam a β -amilase como relevante na degradação do amido contido nos amiloplastos em vista de observações que mostram a localização desta enzima completamente, ou na maior parte, fora dos plastídeos em algumas plantas. Em sementes, a β -amilase foi apontada mais como uma proteína de reserva, não sendo colocado nenhum papel metabólico significativo, pela observação em mutantes deficientes em β -amilase que germinam e crescem normalmente (Sivak e Preiss, 1998).

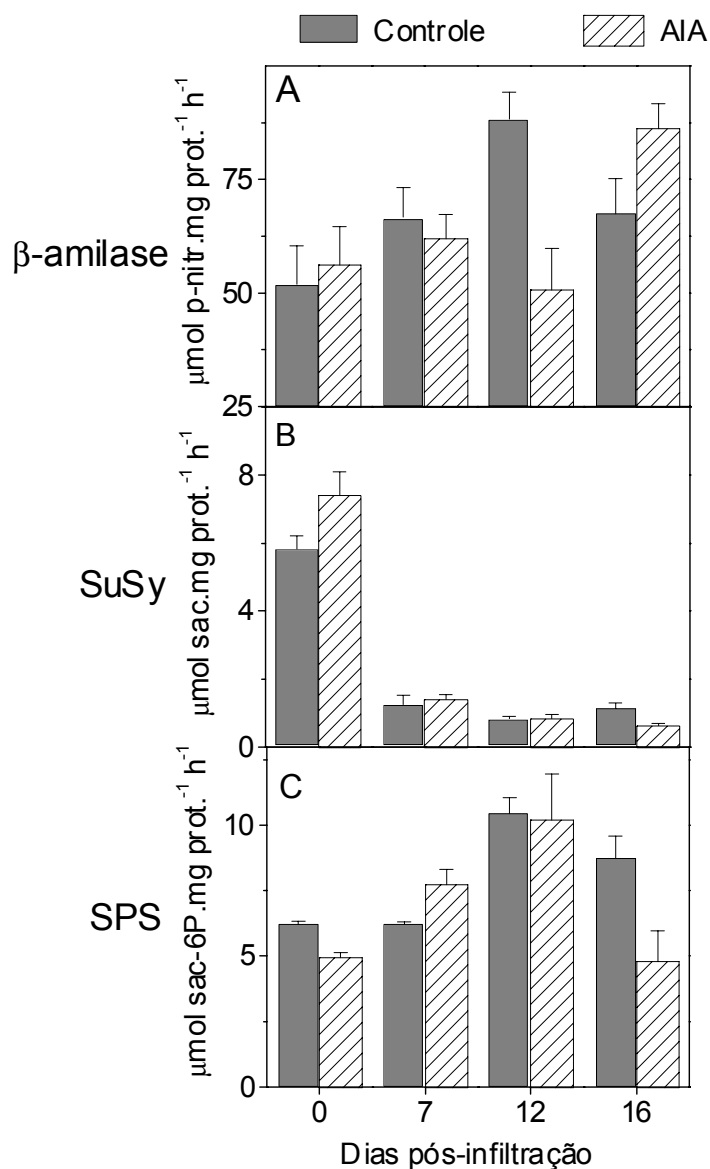


Figura 3: Atividade de β -amilase (A), SuSy (B) e SPS (C) em fatias de bananas em 0, 7, 12 e 16 dias pós infiltração com manitol 120 mM (Controle) e AIA 0,1mM em manitol 120 mM (AIA) durante o amadurecimento. Os dados correspondem a média \pm erro-padrão ($n = 3$). *p-nitr.*, *p*-nitrofenol; *sac.*, sacarose; *sac-6-P*, sacarose-6-fosfato.

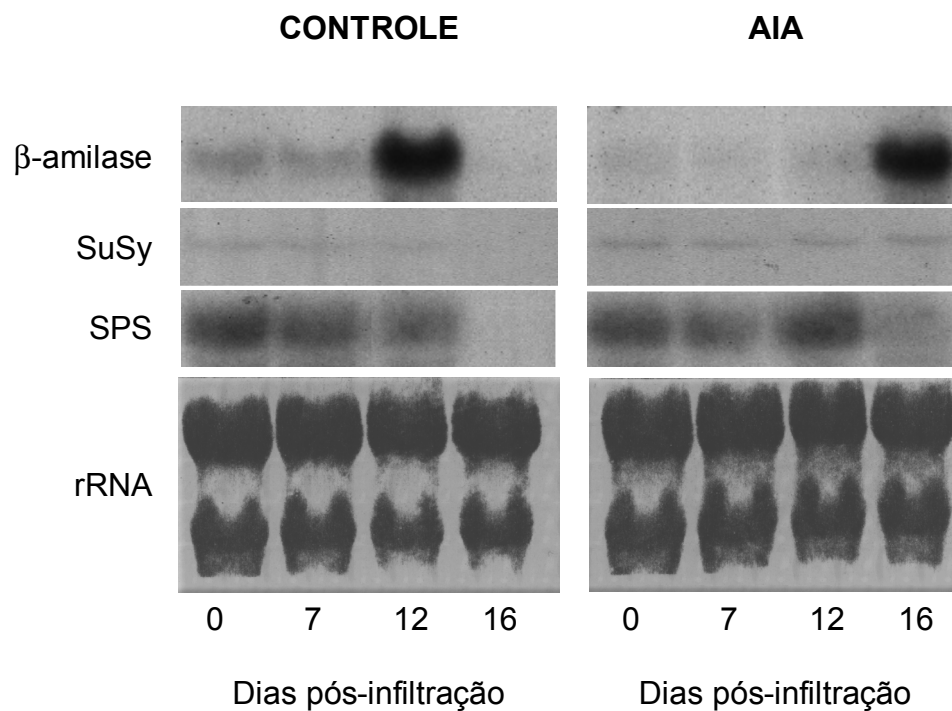


Figura 4: *Northern blot* de RNA total extraído de fatias de bananas infiltradas com manitol 120 mM (Controle) e AIA 0,1mM em manitol 120 mM (AIA) nos dias 0, 7, 12 e 16 pós-infiltração. As membranas foram submetidas à hibridização com sondas de β -amilase, SuSy e SPS marcadas com [32 P]-dCTP. Para a certificação de que a mesma quantidade de RNA total de cada amostra foi aplicada nos géis, as membranas foram coradas com azul de metileno. As bandas dos rRNAs reveladas pelo corante estão apresentadas na figura.

Porém, em bananas, a β -amilase parece contribuir de maneira significativa para a mobilização do amido durante o amadurecimento, conforme apontam os resultados obtidos mostrando o efeito do AIA na degradação do amido, na atividade amilásica total e na atividade e nível de transcrição de β -amilase. Outra evidência da atuação desta enzima foi fornecida pelo trabalho de Garcia e Lajolo (1988) que mostrou haver aumento na atividade de β -amilase durante o amadurecimento e a detecção de acúmulo significativo de maltose, produto da atividade da enzima, quando a atividade de α -glicosidase foi inibida. Irving e col. (1999) mostraram que a atividade hidrolítica sobre o amido em abóboras após a colheita, era alta e se correlacionava com aumento nas atividades de α -amilase e β -amilase. O trabalho mostrou também que o aumento das concentrações de maltose durante o amadurecimento era coincidente com o aumento na atividade β -amilolítica. Além de sugerir o papel relevante da β -amilase na mobilização do amido durante o amadurecimento, os resultados obtidos também indicam que, ao menos parcialmente, esta enzima é regulada transcricionalmente.

Em estudos anteriores, Cordenunsi e Lajolo (1995) mostraram que as atividades de duas das principais enzimas ligadas ao metabolismo da sacarose, a SuSy e a SPS, sofriam profundas alterações logo após a colheita da banana. A SuSy apresentava alta atividade enquanto estava ocorrendo o acúmulo do amido. Ao cessar este processo, a atividade da SuSy decaía lentamente até a colheita e aceleradamente após a colheita. O oposto foi observado para a atividade de SPS, que aumentava durante o

amadurecimento e cujo máximo de atividade detectado coincidia com o acúmulo máximo de sacarose.

Cordenunsi e Lajolo (1995) estudaram também as mudanças nas atividades de SuSy e SPS em bananas amadurecidas ligadas a planta-mãe em comparação com bananas destacadas da mesma planta. Foi observado que as mudanças que ocorriam no perfil de atividade das duas enzimas se processavam em velocidades diferentes para as bananas ligadas à planta-mãe, em comparação com as mudanças detectadas nas bananas destacadas, sendo mais lentas no primeiro grupo. Foi sugerido, deste modo, o possível envolvimento de hormônios na regulação da atividade destas enzimas e que afetariam também a mudança nos conteúdos de amido e sacarose no fruto.

Dado este precedente da literatura, e também a observação (Figura 2C) dos níveis de sacarose produzidos nas fatias de bananas infiltradas com AIA claramente diferentes das fatias controle, foram avaliados os níveis de atividade e transcrição de SuSy e SPS. Os resultados mostrados nas Figuras 3 e 4 não apontam diferenças significativas tanto na atividade quanto nos níveis de transcrição dos mRNAs das duas enzimas.

A atividade de SuSy (Figura 3B) tanto para o grupo controle quanto para o grupo infiltrado com AIA foi muito menor no 7^o dia pós-infiltração em comparação como o dia 0, e se manteve nestes níveis até o fim do experimento. O nível de mRNA também se manteve baixo durante todo o experimento tanto nas fatias tratadas como nas fatias controle e não teve nenhuma variação aparente durante o período amostrado.

Os valores de atividade encontrados para SuSy nas fatias de bananas, assim como os níveis de mRNAs foram baixos em função dos valores encontrados por Cordenunsi e Lajolo (1995) e Nascimento e col (2000) e uma explicação talvez resida no tempo de colheita das bananas utilizadas no experimento. As bananas encontravam-se com dois dias pós-colheita quando foram realizadas as infiltrações e é provável que o mRNA de Susy, que é abundante antes da colheita (Nascimento e col. 2000), já houvesse declinado, o mesmo ocorrendo com a atividade enzimática que é, antes da colheita, 7 vezes maior em comparação com a atividade pós-colheita (Nascimento e col 2000).

A atividade de SPS (Figura 3C) aumentou durante o amadurecimento nas fatias controle, sendo detectada a atividade máxima durante o período de acúmulo de sacarose (Figura 1C) após 7^o dia pós-infiltração. A atividade se manteve alta até o 12^o dia quando começou a declinar. A atividade nas fatias infiltradas com AIA seguiu o mesmo padrão de evolução diferenciando-se das fatias controle apenas na magnitude do declínio ao 16^o dia pós-infiltração. Os níveis de transcrição de SPS (Figura 4) foram similares nos dois grupos mantendo-se altos até o 12^o dia pós-infiltração e declinando para níveis praticamente indetectáveis no 16^o dia.

Em bananas, a atividade e a transcrição do mRNA da SPS aumentam durante o amadurecimento antes do acúmulo de sacarose (Nascimento e col 1997). Foi observada a correlação direta entre o nível de atividade e a transcrição do mRNA da enzima. Após o acúmulo de sacarose o nível de mRNA de SPS é reduzido drasticamente porém com redução menor na

atividade enzimática. Este mesmo perfil foi encontrado nas fatias controle e tratadas. Outros mecanismos regulatórios contribuem para o aumento da atividade de SPS. A fosforilação da proteína SPS tem sido apontada (MacRae e col 1992, Huber e Huber 1996) como importante forma de controle do estado de ativação da enzima. Os experimentos conduzidos nas fatias de bananas não avaliaram a possibilidade do AIA provocar mudanças neste estado de ativação e que poderiam explicar, pelo menos em parte, a falta de correlação entre o aumento da atividade da SPS nas fatias tratadas e os baixos níveis de sacarose detectados. A contribuição da expressão gênica para o aumento da atividade de SPS em frutos foi mostrada em bananas (Nascimento e col. 1997), kiwis (Langenkämper e col. 1998) e citrus (Komatsu e col. 1999). Em bananas, Nascimento (1997) propôs que o aparecimento de sacarose também poderia ser dependente da disponibilidade de substrato e não apenas do aumento na atividade da SPS. Esta observação parece se encaixar nos resultados observados nas fatias tratadas com AIA, onde a inibição da degradação do amido muito provavelmente limitou o fornecimento de substratos para síntese da sacarose explicando assim os baixos níveis do açúcar encontrados. Além disso, a atividade da SPS já havia começado a declinar quando começou a degradação do amido (Figura 2 e 3).

Em conjunto, os dados obtidos permitem concluir que, ao menos em parte, a redução na taxa respiratória e o atraso no amadurecimento de bananas provocado pelo AIA, deve-se ao seu efeito na inibição da degradação do amido e, conseqüentemente, na formação da sacarose.

De modo a aprofundar estes resultados, foram avaliadas as atividades de outras enzimas envolvidas no processo de degradação do amido em bananas. Além da β -amilase, Garcia e Lajolo (1988), identificaram em bananas a atividade de α -amilase, α -1,4 e α -1,6- glicosidases que aumentavam durante o amadurecimento. Arêas e Lajolo (1981) por sua vez, mostraram também que a atividade da fosforilase de amido em bananas era alta (apesar de não variar significativamente durante o amadurecimento da banana), apontando para um papel de relevância desta enzima no metabolismo do amido.

5.3. Atividade de α -amilase, α -1,4-glicosidase e fosforilase.

Os resultados apresentados na Figura 5 mostram o perfil de degradação de amido e a atividade de α -amilase em fatias de bananas infiltradas com AIA e fatias controle em um segundo experimento independente. O conteúdo de amido no início do experimento foi similar em ambos os grupos até o 18^o dia pós infiltração onde, então, a degradação foi intensa nas fatias controle indo de teores próximos a 20% do peso do fruto em massa fresca até próximo de 2% ao 22^o dia pós-infiltração. Já nas fatias tratadas com AIA, a degradação iniciou-se com 4 dias de atraso, no 22^o dia pós-infiltração, confirmando o padrão observado no experimento anterior.

Tendo como base o perfil de degradação do amido em ambos os grupos, foram tomadas amostras para as análises de atividade de α -amilase em pontos relevantes do processo. A atividade α -amilásica (Figura 5), em

ambos os grupos, aumentou durante o amadurecimento, sendo o máximo detectado no 16º dia pós-infiltração para as fatias controle, após a qual sofreu ligeiro declínio até o 18º dia e manteve o mesmo nível durante a degradação do amido, sofrendo novo declínio ao término do experimento, quando a maior parte do amido já havia sido degradada. Nas fatias tratadas com AIA o padrão de evolução da atividade seguiu o mesmo perfil das fatias controle até o 8º dia pós-infiltração, porém a partir deste ponto não foi detectado aumento na atividade de α -amilase até o fim do experimento. Comparando a atividade inicial com a atividade máxima alcançada por ambos os grupos, é possível notar que o aumento na atividade nos dois casos foi de aproximadamente 2 vezes, porém o modo como esta atividade evoluiu foi diferente entre os grupos.

O papel da α -amilase na degradação do amido em cereais tem sido estudado há vários anos, porém em frutos existe pouca informação a respeito do papel desta enzima na mobilização do amido, embora tenha sido reconhecida como sendo a única capaz de atacar grãos intactos de amido (Sivak e Preiss 1998). As exceções são cotiledones de ervilha (Kruger e ap Rees 1983) e *Populus alba* (Witt e Sauter 1995), onde foi detectado o ataque a grãos de amido promovido por fosforilases. Além da banana, a atividade de β -amilases foi descrita em vários frutos, entre os quais abacates (Pesis e col. 1978), mangas (Fuchs e col. 1980), pêras (Pech e col. 1979), pêssegos (Merlo e Passera 1991), kiwis (Wegrzyn e MacRae, 1995) e abóboras (Irving e col. 1999).

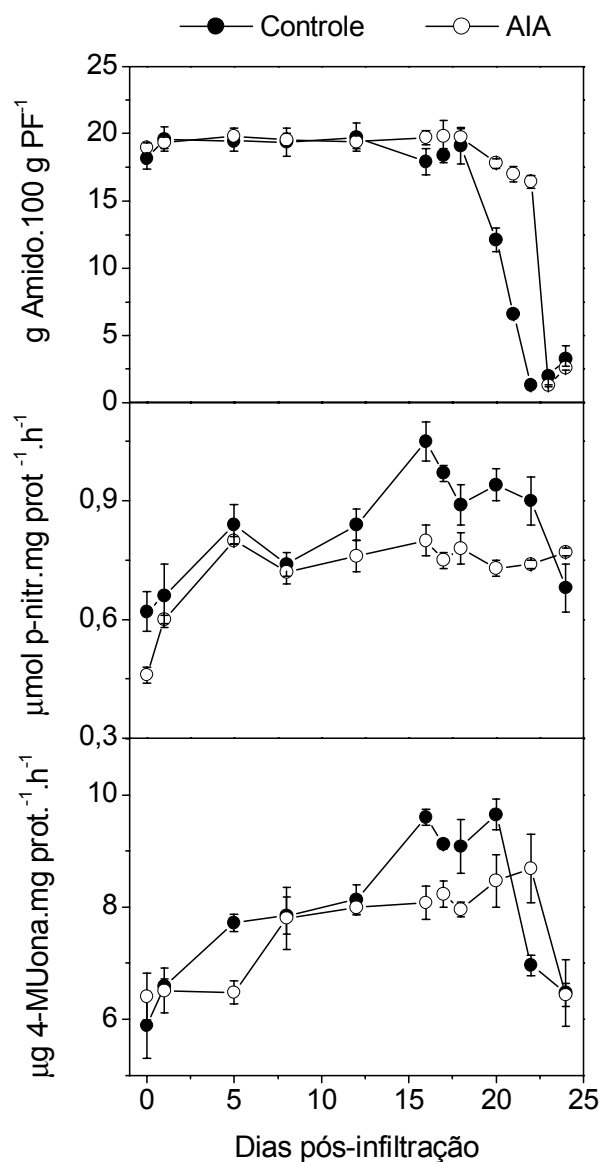


Figura 5: Teores de amido (A), atividade de α -amilase (B) e atividade de α -1,4-glicosidase (C) de fatias de bananas infiltradas com manitol 120 mM (Controle) e AIA 0,1mM em manitol 120 mM (AIA) durante o amadurecimento. Cada ponto representa a média \pm erro-padrão ($n = 3$). *p-nitr.*, *p*-nitrofenol, *4MUona.*, 4-metilumbeliferona.

Não há dados sobre a proporção da proteína α -amilase em relação a outras enzimas envolvidas na degradação do amido em frutos, porém é possível que pequenas quantidades de α -amilase sejam suficientes para iniciar o ataque ao grão de amido intacto, permitindo o acesso a outras enzimas, como a β -amilase, que podem, então, prosseguir com a degradação total do grão. Em maçãs Wegrzyn e col. (2000), estudaram a transcrição do mRNA de α -amilase e observaram que o níveis de transcritos eram praticamente indetectáveis nos frutos amadurecidos naturalmente, no entanto a atividade da enzima foi detectada. Desta forma, é possível que as pequenas diferenças encontradas na evolução da atividade α -amilolítica entre as fatias de bananas controle e as tratadas com AIA, contribuam para determinar o atraso na degradação do amido observado no experimento

Não há relatos na literatura que comprovem a ocorrência da síntese *de novo* de α -amilase durante o amadurecimento de frutos. Em cereais, contudo, foi demonstrado que a síntese de proteína α -amilase é necessária para a degradação do amido durante a germinação e que esta é regulada pelo ácido giberélico, hormônio envolvido em vários processos de crescimento e desenvolvimento vegetal.

Em cotiledones de ervilha (Hirasawa e Yamamoto, 1991) e em células da camada de aleurona de sementes de cevada (Klambt, 1993), o AIA induz a atividade de α -amilase, ou seja, o oposto do efeito encontrado nas fatias de bananas infiltradas com o hormônio como mostrado na Figura 5B. No entanto o efeito inibitório de AIA sobre a atividade de endoamilases, a classe das α -amilases, foi demonstrado por Elle e Sauter (2000) em *Populus alba*,

que observaram marcada perda de atividade endoamilolítica em segmentos de tecidos desta árvore tratados com AIA sugerindo o controle da atividade destas enzimas pelo hormônio.

Os dados obtidos permitem visualizar que a atividade de α -amilase foi afetada durante o amadurecimento das fatias de bananas infiltradas com AIA e que as diferenças encontradas em relação as fatias controle, sugerem que este efeito contribue para o atraso na degradação do amido induzido pelo hormônio.

A Figura 5C mostra os dados de atividade da forma neutra da α -1,4-glicosidase (ensaiada a pH 6,5) medida no mesmo experimento onde foi avaliada a atividade da α -amilase. De modo semelhante a esta enzima, a atividade da α -1,4-glicosidase aumentou durante amadurecimento de ambos grupos de fatias de bananas, atingindo o mesmo valor até o 12º dia pós-infiltração. Após este dia, porém, a atividade da α -1,4-glicosidase no grupo controle continuou a subir atingindo o valores próximos ao máximo no 16º dia pós-infiltração e mantendo-se neste patamar até o 20º dia onde, paralelamente a queda no conteúdo do amido, declinou voltando aos valores registrados no começo do experimento. No grupo tratado com AIA, a partir do 12º dia pós-infiltração não foi registrado nenhum acréscimo na atividade da α -1,4-glicosidase até o 22º dia, quando começou a cair paralelamente a queda nos teores de amido, voltando a valores próximos aos registrados no início. Desta forma, o perfil obtido na evolução da atividade da α -1,4-glicosidase lembrou o obtido para a α -amilase, onde nos dois grupos houve aumento inicial semelhante, porém a partir de pontos intermediários no

amadurecimento, a evolução na atividade prosseguiu de modo diferente entre os grupos de fatias.

Garcia e Lajolo (1988) detectaram o aumento na atividade da forma neutra da α -1,4-glicosidase durante o amadurecimento da banana, cujo pH ótimo próximo a 6,5, foi determinado por Konishi e col. (1991). Neste mesmo trabalho, foi detectada a presença de uma forma ácida da α -1,4-glicosidase, cujo pH ótimo era próximo a 4,5. Em trabalho posterior (Konishi e col. 2001) foi demonstrado que se tratavam de duas formas ácidas da enzima, uma solúvel e outra ligada a parede celular isolada quando a polpa de banana foi homogeneizada com tampão contendo 1 M de cloreto de sódio. A forma neutra da α -1,4-glicosidase parece apresentar atividade maltásica muito menor que a forma ácida (Konishi e col. 1992) e deste modo não parece estar ligada a degradação da maltose, produto formado pela ação da α -amilase que se acumula no tecido de bananas pré-climatéricas quando a atividade da α -1,4-glicosidase é inibida com Tris (Garcia e Lajolo, 1988). Konishi e col. (1991), porém, mostraram que a atividade da forma neutra aumentava em bananas tratadas com etileno enquanto a atividade da forma ácida diminuía, sendo, no ponto máximo de sua atividade, 5 vezes menor do que o máximo da forma neutra, em ensaios que utilizaram o mesmo substrato para ambas formas. Não foram realizados ensaios para a atividade da forma ácida da α -1,4-glicosidase nas fatias de bananas do experimento mostrado na Figura 5C, porém foi detectado o aumento da atividade da forma neutra durante o amadurecimento, e esta também parece sofrer os

efeitos do AIA, conforme mostrado no perfil da atividade nas fatias tratadas como o hormônio.

Em cereais, foi observado que a ação conjunta de α -1,4-glicosidases com α -amilase e β -amilase é necessária para a rápida mobilização do amido do endosperma (MacGregor, 1989). Sun e Henson (1991) mostraram haver grande sinergismo entre a α -1,4-glicosidase e a α -amilase na degradação do amido de cevada. Hallet e col. (1995) mostraram que a ação conjunta destas duas enzimas também era mais efetiva na degradação do amido do kiwi, em comparação com a ataque promovido apenas pela α -amilase. Dada a semelhança na evolução da atividade da forma neutra da α -1,4-glicosidase e da α -amilase nas fatias controle neste experimento e levando em conta que a maior parte das α -1,4-glicosidases tem atividade contra oligossacarídeos (Frandsen e Svensson 1998), é possível que este tipo de interação também ocorra na banana.

Os resultados obtidos nos dois experimentos mostram que as atividades de α e β -amilase e α -1,4-glicosidase são afetadas pelo AIA. Importante notar que todas as atividades determinadas nos dois experimentos mostram que estas enzimas possuem níveis significativos de atividade no ponto de colheita da banana e que os incrementos que sofrem ao longo do amadurecimento estiveram entre 1,5 e 2 vezes atingindo valores máximos pouco antes do início da degradação do amido (α -amilase e α -1,4-glicosidase) ou quando a maior parte do amido já tinha sido degradado (β -amilase). Dentro dos limites deste modelo experimental, é difícil avaliar se

este incremento pode ser considerado significativo ou não, visto que o incremento de atividade amilolítica em cereais é várias vezes maior durante a germinação. Isto, porém, parece apontar para um efeito aditivo entre as atividades apresentadas que se traduzem em rápida mobilização do amido durante o amadurecimento do fruto. A constatação de que o AIA é capaz de afetar a atividade destas enzimas, também aponta para um possível mecanismo regulatório comum. Para a β -amilase, ao menos em parte, o mecanismo regulatório parece envolver a síntese *de novo* da enzima. Não foram obtidos dados sobre a transcrição dos genes da α -amilase e da α -1,4-glicosidase, porém não está excluída a possibilidade de que este também seja um mecanismo importante na regulação da atividade destas enzimas durante a mobilização do amido da banana no amadurecimento e que também possa ser afetado pelo AIA.

Além da atividade amilolítica, a fosforolítica parece também ser relevante durante a mobilização do amido no amadurecimento de bananas. Arêas e Lajolo (1981) observaram que a atividade da fosforilase de amido era alta. Esta enzima é capaz de catalisar tanto a síntese como a degradação do amido e a ação nesta última direção depende da presença de fosfato inorgânico, ao qual a enzima transfere um grupo glicosídico, derivado de maltooligossacarídeos, formando glicose-1-fosfato. Hubbard e col. 1990 também observaram que a atividade da fosforilase aumentava em bananas tratadas com etileno.

Para verificar se o atraso na degradação do amido provocado pelo AIA, ocorreu devido a inibição da atividade fosforolítica, além da amilolítica, foram medidas as atividades da fosforilase nas fatias preparadas no mesmo experimento onde foram determinadas as atividades de α -amilase e α -1,4-glicosidase. Os dados mostrados na Figura 6 mostram que a atividade da fosforilase aumentou durante o amadurecimento para ambos os grupos, porém não foram observadas diferenças significativas durante todo o período amostrado. A atividade observada nas fatias controle e tratada aumentou aproximadamente duas vezes, sendo detectada a atividade máxima no 17^o dia pós-infiltração nas fatias controle, um dia antes da degradação do amido neste grupo, e no 16^o dia nas fatias tratadas com AIA, 6 dias antes do início da degradação do amido.

Os resultados obtidos sugerem que o mecanismo regulatório da atividade da fosforilase não foi afetado pelo AIA, o que indica a possibilidade das mudanças na atividade desta enzima serem reguladas por meio de uma via de sinalização diferente das enzimas amilolíticas. Além disso, apesar do aumento da atividade nas fatias tratadas acompanhar o aumento nas fatias controle, a mobilização do amido foi atrasada. Supondo que a enzima estivesse atuando normalmente, o atraso sugere que a atividade da fosforilase pode ser dependente da atuação de outra enzima, possivelmente a α -amilase. Os perfis obtidos mostram também que a evolução da atividade de fosforilase parece seguir um programa bem definido, onde apesar da falta do substrato para sua atuação nas fatias tratadas com AIA, ele se desenvolveu de modo semelhante ao das fatias controle.

Segundo Hubbard e col. (1990) e Hill e ap Rees (1994) a degradação do amido na banana deve ser um processo predominantemente fosforolítico. Estes autores basearam suas afirmações em cálculos sobre a demanda de energia necessária para a mobilização do amido durante o amadurecimento e o quanto o climatério seria capaz de fornecer para suprir esta demanda. Sendo a degradação fosforolítica mais econômica do que a degradação amilolítica, os autores afirmaram que a atividade amilolítica não contribuiria de maneira significativa para a mobilização do amido na banana. Os resultados apresentados parecem demonstrar o oposto destas afirmações pois, apesar da atividade fosforolítica se desenvolver do mesmo modo em ambos os grupos de fatias, a degradação do amido é atrasada naquelas tratadas com AIA. Por outro lado, sabe-se que a atividade fosforolítica é dependente da presença de fosfato inorgânico, em concentrações adequadas dentro do amiloplasto (Manners, 1985).

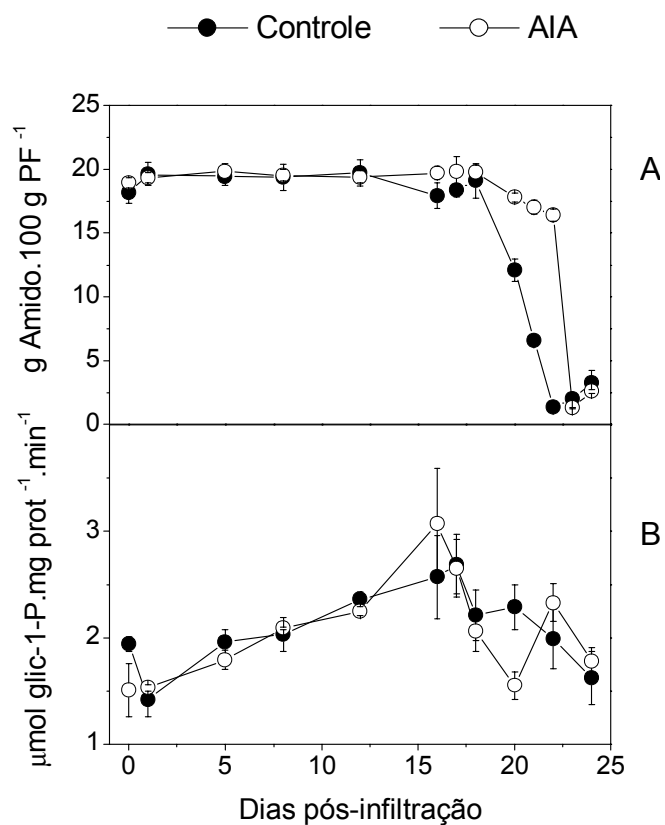


Figura 6: Teores de amido (A) e atividade de fosforilase de amido (B) de fatias de bananas infiltradas com manitol 120 mM (Controle) e AIA 0,1mM em manitol 120 mM (AIA) durante o amadurecimento. Cada ponto representa a média \pm erro-padrão ($n = 3$). *glic-1-P.*, glicose-1-fosfato.

Os ensaios conduzidos não permitem avaliar se o AIA é capaz de perturbar a homeostase do fosfato levando a sua diminuição no amiloplasto e, conseqüentemente, inibindo a atividade degradativa da fosforilase. Mesmo que isto tenha ocorrido e que a fosforilase tenha sido inibida pela limitação de fosfato inorgânico, a contribuição das enzimas amilolíticas para o processo não deve ser descartada. As atividades enzimáticas obtidas mostram o aumento da atividade amilolítica e sua inibição pelo AIA, com conseqüente inibição na degradação do amido, suportam esta afirmação. Outras observações também parecem confirmar que a β -amilase desempenha importante papel na degradação do amido por ser mais efetiva que a fosforilase neste processo, conforme mostrado em batatas (Liddle e col. 1961) e em *Populus alba* (Witt e Sauter 1995).

Tomados em conjunto, os resultados obtidos permitem obter um quadro geral da degradação do amido em bananas. As atividades de α -amilase, α -1,4-glicosidase e fosforilase, nas fatias controle, aumentaram antes da degradação do amido sendo detectados os máximos destas atividades pouco antes do início da degradação do amido. A atividade máxima da β -amilase foi obtida quando a maior parte do amido já tinha sido degradada. Estes resultados apontam para a noção geral, tomada em outros sistemas, de que a degradação inicial do amido deve ocorrer em função da atividade de α -amilase contra o grão intacto do amido, permitindo o acesso das demais enzimas que efetuariam a dissolução completa deste. É importante notar que dentre as atividades determinadas, apenas a atividade

β -amilolítica aumentou durante o período de mobilização rápida do amido enquanto as demais diminuíram paralelamente a degradação, sugerindo papel de grande relevância desta enzima no processo, contrário a afirmações (ap Rees, 1988) que colocam a atividade β -amilolítica como não essencial na mobilização do amido. A diminuição da atividade das demais enzimas paralela a quebra do amido sugerem sua importância nos estágios iniciais desta mobilização.

Desta forma, o efeito do AIA no atraso da degradação do amido deve-se, ao que parece, a sua interferência na atividade das enzimas amilolíticas, sendo que para a β -amilase, a interferência parece ocorrer no mecanismo de síntese da enzima. A extensão da inibição, em uma primeira análise, pode parecer pequena em termos da atividade de cada enzima tomada isoladamente, sendo desproporcional ao atraso observado na degradação do amido. Porém, parece provável que é da soma destes efeitos inibitórios que venha a capacidade do AIA em inibir o processo degradativo do amido no amadurecimento da banana. Embora não tenham sido realizados ensaios sobre a atividade de α -1,6-glicosidases, também presentes na polpa da banana, não está descartada a hipótese de que estas enzimas também possam ser afetadas pelo AIA.

5.4. Incorporação de [¹⁴C]-glicose no amido.

Adicionalmente às análises no sentido da degradação do amido, foram realizados ensaios para verificar o efeito do AIA na síntese do amido durante o amadurecimento da banana. Conforme observado por Hill e ap Rees (1994), mesmo em bananas climatéricas, a síntese do amido ocorre em certa extensão podendo ser incrementada pelo aumento na concentração de glicose dentro da célula. Wegrzin e MacRae (1995) especularam que o acúmulo de amido em kiwis poderia ser consequência de um ciclo de síntese e degradação porém com o acúmulo líquido do amido ocorrendo em uma etapa do desenvolvimento onde a síntese fosse favorecida. Já no amadurecimento, a taxa de degradação superaria a de síntese resultando em perda do amido no fruto. Muito provavelmente, este favorecimento, numa ou noutra direção, ocorreria por sinalização hormonal e metabólica que induziria a síntese das enzimas de cada processo, sendo dependente também da disponibilidade dos substratos destas enzimas.

Estudos demonstraram haver diminuição na transcrição dos genes da amido sintase ligada ao grânulo na polpa de bananas, durante o amadurecimento (Medina-Suárez e col. 1997, Clendennen e May, 1997), o que apóia a hipótese levantada por Wegrzin e MacRae.

Para testar a hipótese de que o atraso na mobilização do amido provocado pelo AIA, além da inibição da degradação, possa ter ocorrido em função de um estímulo da síntese, foram infiltrados batoques extraídos de bananas pré-climatéricas, previamente tratados com AIA 0,1 mM, com [^{14}C]-glicose em um pulso de 4 horas. Os açúcares e o amido foram extraídos e a radioatividade em cada fração foi contada em cintilador líquido. Os resultados obtidos (Figura 7), expressos pela razão entre a quantidade de radioatividade contada no amido e a contada nos açúcares, mostram haver maior incorporação de [^{14}C]-glicose nos batoques infiltrados previamente com AIA do que nos batoques controle. Os dados foram expressos em termos da relação entre a radioatividade no amido e nos açúcares, a fim de verificar a proporcionalidade entre a quantidade de [^{14}C]-glicose que entrou no tecido e permaneceu inalterada (ou foi convertida em outros açúcares) com a que foi realmente incorporada ao amido. Os resultados da Figura 6 mostram que, proporcionalmente, os batoques infiltrados com AIA tiveram maior incorporação de glicose marcada no amido que os batoques controle.

O experimento dá algumas indicações de que o AIA é capaz de induzir aumento na síntese de amido. Sendo esta observação verdadeira, é provável que o atraso na mobilização do amido observado nas fatias de bananas tratadas com AIA, seja não só uma consequência da inibição da degradação mas também um aumento na síntese do amido durante o amadurecimento. Isto parece coerente com a idéia do AIA ser um fator de juvenilidade, trazendo o fruto a um estado que, bioquimicamente, remete ao que ocorre quando este está ligado a planta-mãe.

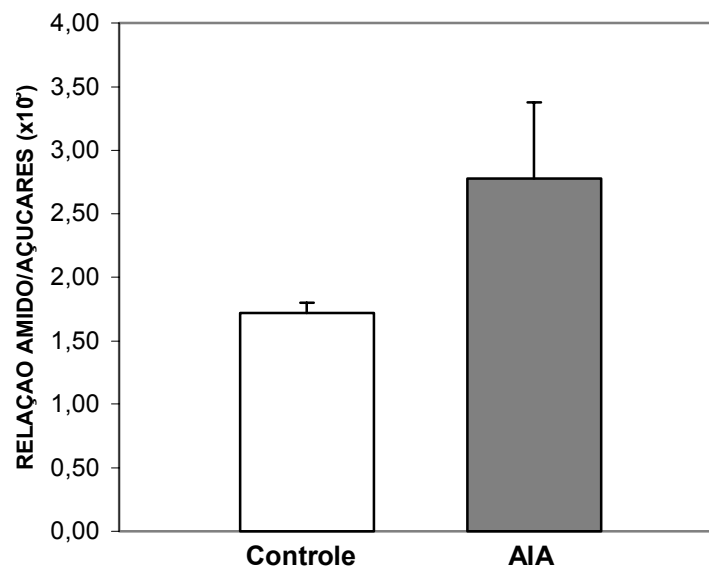


Figura 7: Relação entre a radioatividade encontrada no amido e nos açúcares de batoques de bananas controle e batoques tratados com AIA submetidos a infiltração com [¹⁴C]-glicose. A infiltração com glicose marcada foi realizada 48 horas depois do tratamento com manitol 120 mM (Controle) e AIA 0,1 mM em manitol 120 mM (AIA) a fim de proporcionar tempo a recuperação do estresse do corte e da infiltração a que o tecido foi submetido. Os dados representam a média ± erro-padrão ($n = 3$).

5.5. Determinação de AIA livre, AIA conjugado e etileno.

Tendo em vista que o AIA infiltrado nas fatias de bananas afeta o metabolismo amido-sacarose e algumas das enzimas envolvidas, outro experimento foi realizado no sentido de determinar os níveis de AIA livre e conjugado durante o amadurecimento das fatias controle e infiltradas com o hormônio e também de sua correlação com a produção de etileno. Os resultados apresentados na Figura 8 mostram o perfil de degradação de amido e a produção de etileno em fatias controle e tratadas com AIA 0,1mM, preparadas de modo semelhantes às utilizadas nos experimentos anteriores.

A produção de etileno não foi afetada pelo tratamento com AIA, sendo detectada a máxima produção no 9º dia pós-infiltração, um dia antes da máxima taxa respiratória obtida para os dois grupos. Os níveis de etileno foram altos no início do experimento em ambos os tratamentos, em resposta, muito provavelmente, ao estresse do corte e infiltração dos tecidos, não apresentando diferenças entre as fatias controle e tratadas com AIA. Isto indica que a inibição do AIA sobre a degradação do amido não é consequência da inibição da produção de etileno.

Resultado semelhante foi obtido por Frenkel e Dick (1973) que observaram o atraso do amadurecimento de pêras provocado pelo AIA, porém sem nenhum efeito na síntese do etileno.

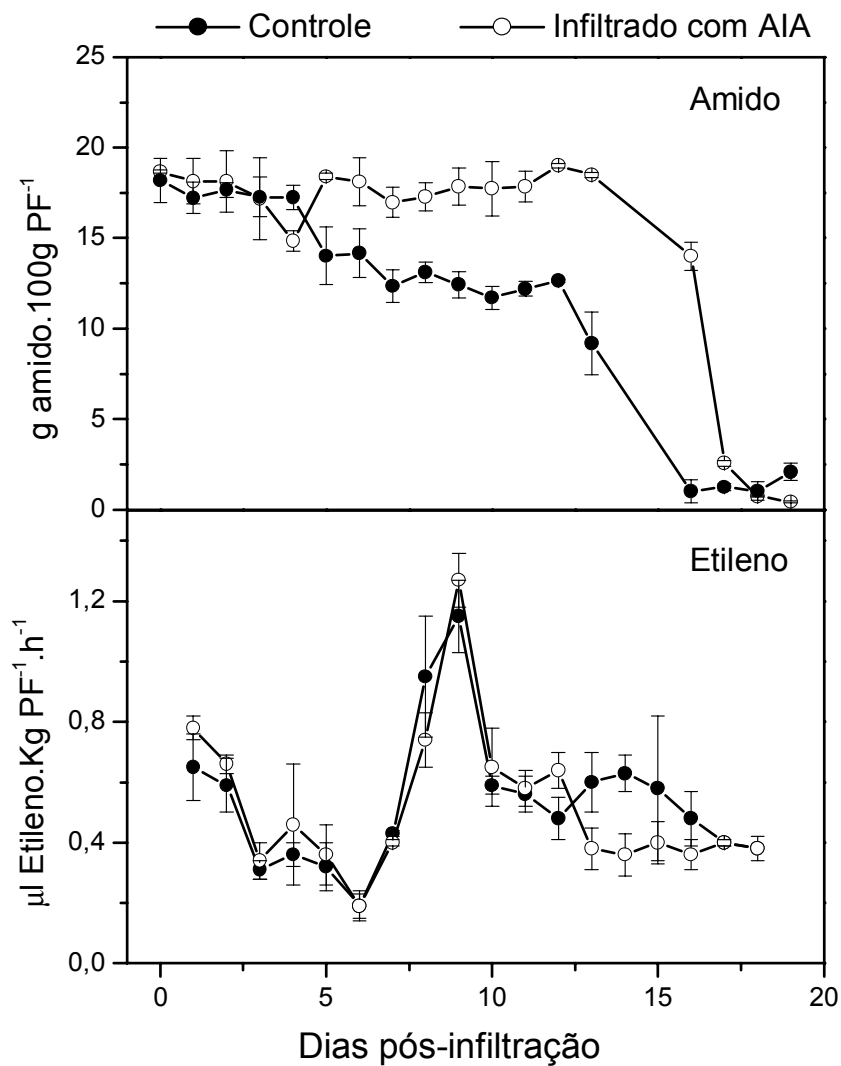


Figura 8: Teores de amido e produção de etileno de fatias de bananas infiltradas com manitol 120 mM (Controle) e AIA 0,1mM em manitol 120 mM (AIA) durante o amadurecimento. Cada ponto representa a média \pm erro-padrão ($n = 3$).

No entanto, supondo que a degradação do amido seja um evento dependente de etileno, os resultados não excluem a possibilidade do AIA interferir na sua sinalização, bloqueando a percepção da célula ao etileno e interferindo nas mudanças de atividade enzimática necessárias para a mobilização do amido.

De fato, Vendrell (1969) observou que fatias de bananas tratadas com AIA só respondem a aplicação de etileno exógeno depois de vários dias da infiltração da auxina. Anteriormente, Burg e Burg (1965) observaram que a concentração de etileno necessária para induzir o amadurecimento de bananas decrescia com a idade do fruto. Adicionalmente, sabe-se que frutos jovens são pouco sensíveis a aplicação de etileno conforme demonstrado em melões (MacGlasson e Pratt, 1964) e tomates (Lyons e Pratt, 1964). Por se tratar de frutos em desenvolvimento, os frutos jovens apresentam teores de AIA endógenos mais elevados que os frutos no ponto de colheita e devem, por isso, ser menos sensíveis a aplicação do etileno. Desta forma, o tratamento com AIA colocaria as bananas infiltradas em um estado de “juvenildade”, no que se refere ao conteúdo de AIA infiltrado, e assim retomariam algumas das características do fruto em desenvolvimento, como a menor sensibilidade ao etileno exógeno.

A regulação da produção de etileno durante o amadurecimento tem sido amplamente estudada e revelado complexos padrões de indução das enzimas responsáveis por sua síntese. Barry e col. (2000) revelaram que a transição do Sistema I de produção de etileno para o Sistema II, exclusivo dos frutos climatéricos, é mediada por diferentes formas da ACC sintase e

que a indução da expressão destas enzimas é mediada pelo receptor de etileno, conforme revelado no mutante de tomate *Nr (never ripe)*, que expressa um receptor de etileno não funcional. Tomando isto por base, se existe alguma interferência do AIA na sinalização do etileno, resultando no atraso da degradação do amido em bananas, esta provavelmente não passa pelo receptor, uma vez que o experimento mostrado na Figura 8 revela que o Sistema II de produção de etileno não foi afetado pelo AIA, indicando que a expressão do receptor não foi prejudicada pela auxina.

Supondo que a mobilização do amido seja um processo etileno-dependente, também pode-se intuir que, se o AIA for capaz de afetar algum componente da cascata de transdução de sinal do etileno que controle a expressão das enzimas requeridas para a degradação do amido, o componente prejudicado talvez seja algum fator no final da cadeia de sinalização, pois tem-se observado que apenas neste ponto da cascata ocorre a indução de fatores de transcrição diferenciados para as respostas do etileno (Stepanova e Ecker 2000).

Isto aparentemente não explicaria porque a banana fica insensível a um tratamento com etileno exógeno como mostrado por Vendrell (1969), que provocou um pulso de etileno em fatias de bananas 96 horas após a infiltração com AIA 0,1mM, e não verificou nenhum aumento na produção de etileno em resposta ao etileno exógeno. Esta resposta só aconteceu quando foi realizado um segundo pulso 14 dias depois do primeiro, evidenciando que durante o primeiro pulso havia algum fator, induzido pelo AIA, que diminuía a sensibilidade do fruto à ação do etileno.

Conforme mostram os dados das Figuras 9 e 10, o nível de AIA encontrado nas fatias tratadas com 0,1mM do hormônio, nas primeiras 96 horas de tratamento, foi elevado em comparação com as fatias não infiltradas (~130 ng AIA/g PF contra 7 ng de AIA/g PF), porém o nível declinou nos dias subsequentes atingindo os mesmos níveis do controle. Quando o máximo de produção de etileno foi registrado (Figura 8), a concentração de AIA livre nas fatias tratadas com auxina atingiu os valores encontrados nas fatias controle por volta do dia 0 no experimento (~16 ng AIA/g PF), enquanto que nas fatias controle o valor encontrado no mesmo período alcançou seu menor valor (~3 ng AIA/g PF), permanecendo neste patamar até o fim do experimento. Apesar do nível de AIA livre, nas fatias infiltradas, ser 5 vezes maior que o das fatias controle não houve inibição na produção de etileno nas fatias tratadas. Estes resultados parecem indicar que a insensibilidade do tecido provocado pelo AIA, pode ser diferenciada para cada tipo de resposta estudada.

Este tipo de modulação de resposta, em função de variações na quantidade do hormônio presente no tecido, dentro de certas faixas de concentração, vem sendo estudada nos últimos anos e tem-se revelado como um padrão comum a vários tecidos vegetais, indicando complexas interações entre diferentes tipos de sinais hormonais (McAinsh e Hetherington, 1998).

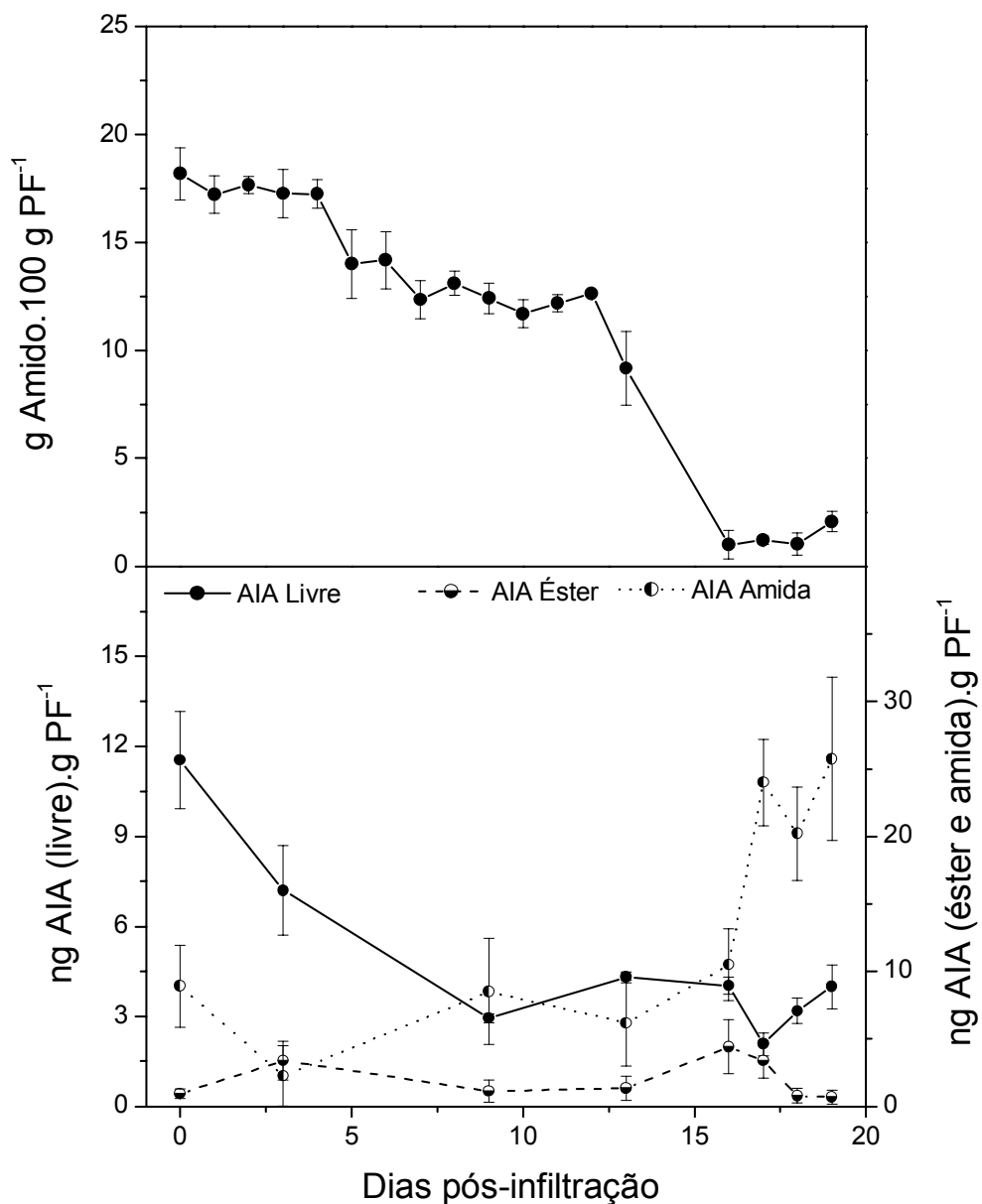


Figura 9: Teores de amido e níveis de AIA livre e conjugados éster e amida de fatias de bananas infiltradas com manitol 120 mM (**Controle**) durante o amadurecimento. Cada ponto representa a média \pm desvio padrão.

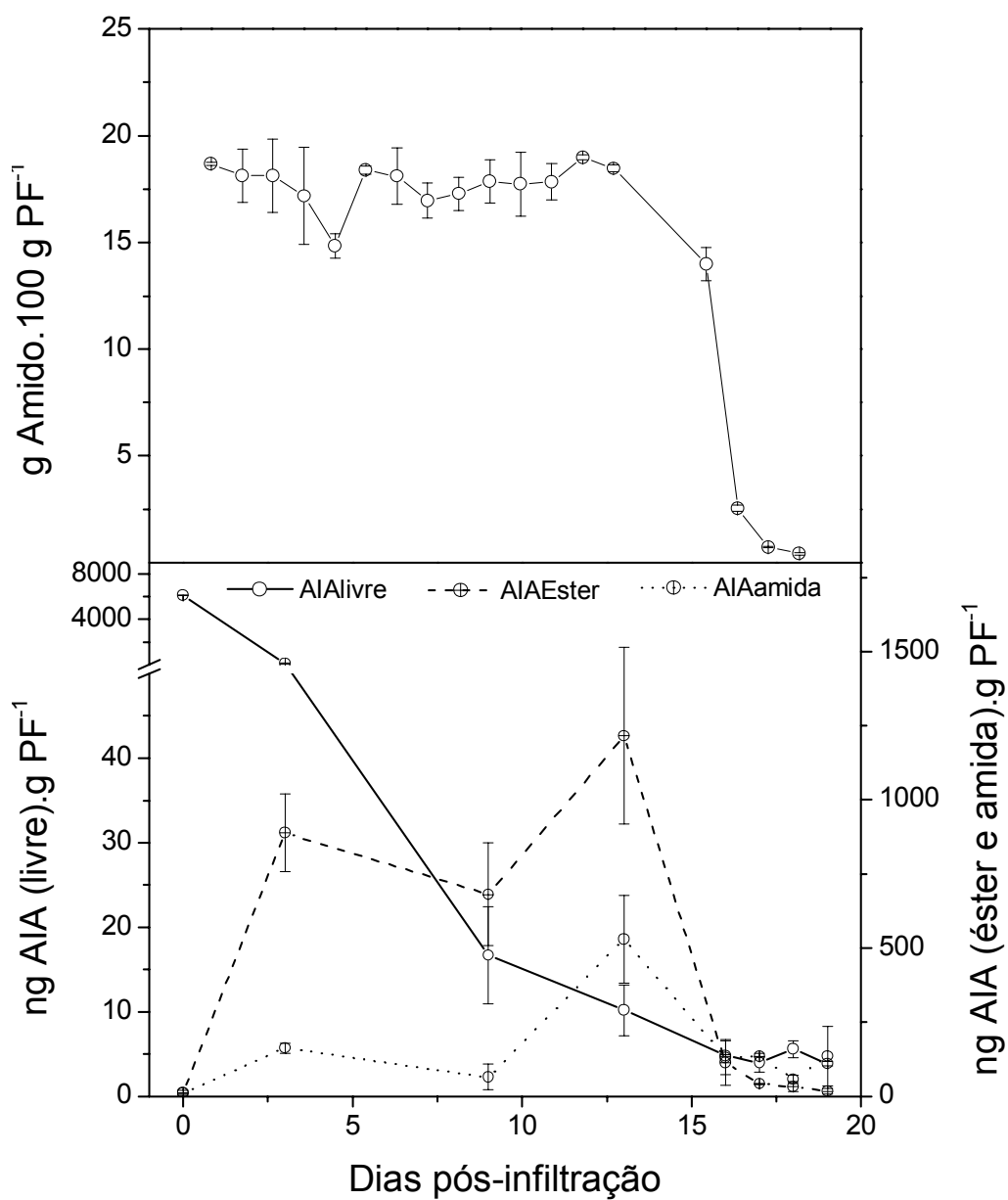


Figura 10: Teores de amido e níveis de AIA livre e conjugados éster e amida de fatias de bananas infiltradas com AIA 0,1 mM em manitol 120 mM (**Tratadas**) durante o amadurecimento. Cada ponto representa a média \pm desvio padrão.

Em relação aos níveis de AIA livre e conjugado nas fatias de banana, as Figuras 9 e 10 mostram as variações destas frações durante o amadurecimento e sua correlação com os teores de amido. Observou-se que nas fatias controle o nível de AIA livre decresceu continuamente até o 9º dia pós-infiltração, atingindo valor médio 4 vezes menor que o encontrado no dia 0, permanecendo neste patamar (~3 ng de AIA/g PF). Nas fatias infiltradas com AIA, o mesmo decréscimo foi observado, porém de uma forma marcante.

Os níveis de AIA livre encontrados nas fatias tratadas no dia 0 (Figura 10) correspondem a mais de 500 vezes o valor do AIA encontrado nas fatias controle. No entanto, de maneira muito rápida, estes decaíram para aproximadamente 130 ng de AIA por grama de peso fresco 72 horas após a infiltração, demonstrando uma grande capacidade do tecido em mobilizar o excesso do hormônio. Após esse período, a velocidade de queda diminuiu atingindo, ao 13º dia pós infiltração, o mesmo nível encontrado no dia 0 nas fatias controle e caindo logo em seguida para o mesmo patamar encontrado nestas fatias.

Esta mobilização do hormônio parece encontrar correlação muito próxima com a degradação do amido, pois no mesmo período em que o nível da forma livre do AIA atingiu o patamar próximo a 3 ng por grama de peso fresco, iniciou-se a fase de rápida degradação do amido.

Tal observação parece estar em acordo com o proposto por Frenkel e Dyck (1973), onde a queda do nível de AIA livre deve ser um fator determinante para que certos eventos do amadurecimento de frutos

ocorram. Buta e Spaulding (1994) observaram em tomates, que após alcançar um pico 7 dias pós-antese, os níveis de AIA decaíam rapidamente atingindo os menores valores durante o estágio de quebra da cor da casca, evento que aponta para o início do amadurecimento neste fruto. Slovin e Cohen (1993) aventaram a hipótese de que a entrada nos estágios finais do amadurecimento em tomates pode ser sinalizada por baixos níveis de AIA livre.

Os resultados também mostram similaridade com o que ocorre em morangos, no qual a diminuição na produção de AIA pelos aquênios é o fator que dispara os eventos do amadurecimento neste fruto (Archbold e Dennis 1984). A hipótese de que frutos climatéricos e não-climatéricos compartilhem de mecanismos semelhantes para o controle de alguns dos eventos associados ao amadurecimento vem ganhando atenção nos últimos anos (Lélievre e col. 1997, Giovannoni 2001). Os resultados obtidos parecem apontar nesta direção.

A fim de obter um quadro mais detalhado a respeito da mobilização do AIA durante o amadurecimento da banana, foram realizadas também medidas das formas conjugadas do hormônio.

Durante o desenvolvimento vegetal, vários mecanismos concorrem para a modulação nos níveis do AIA livre, a forma ativa do hormônio. Um dos mais importantes é a conjugação. Segundo Brandurski e col. (1995), a maioria dos tecidos vegetais possui capacidade para formar conjugados do AIA, seja com açúcares ou mio-inositol (éster-ligados) ou com aminoácidos, peptídeos e proteínas (amida-ligados). A formação de conjugados de AIA é

tecido-específica e regulada por fatores ligados ao desenvolvimento, sendo que suas funções incluem armazenamento, transporte, proteção contra peroxidação e catabolismo do AIA (Kleczkowski e Schell 1995).

A Figura 9 apresenta as variações do AIA conjugado tanto na forma éster como amida nas fatias controle. A primeira não mostrou variações marcadas durante o amadurecimento, a não ser durante a fase de mobilização do amido, no 16º dia pós infiltração, onde o nível aumentou em cerca de 4 vezes em relação ao valor obtido no 13º dia. Porém este aumento na conjugação do tipo éster, parece ter pouco reflexo nos níveis de AIA livre nestas fatias, pois os mesmos não apresentaram mudanças significativas durante o aumento dos níveis de AIA-éster conjugado. A forma éster dos conjugados de AIA, tem sido apontada como uma forma para o armazenamento e rápida mobilização para manutenção do nível de AIA livre (Normanly 1997), sendo observada sua importância em situações onde o nível de AIA é aumentado. Um dos casos mais ilustrativos da atuação desta forma de conjugados foi encontrado nos mutantes de *Arabidopsis thaliana trp 2* e *trp 3*, que apresentam bloqueios nos últimos passos de síntese do triptofano, acumulando precursores da via de biossíntese de AIA triptofano-independente. Estes mutantes apresentam níveis de AIA livre semelhantes aos encontrados na planta normal, porém os níveis de conjugados éster são da ordem de 20 vezes mais elevados (Normanly e col. 1993).

Esta capacidade que a conjugação éster tem em promover a rápida mobilização dos níveis de AIA livre, está claramente mostrada na Figura 10,

onde 72 horas após a infiltração das fatias tratadas com o hormônio os níveis de conjugados éster alcançam um patamar 80 vezes maior que o encontrado nas primeiras horas da infiltração. Concomitantemente, o nível de AIA livre nestas fatias apresenta queda acentuada no mesmo período. Este patamar foi mantido em nível elevado até o 13^o dia pós-infiltração a partir do qual sofre marcado declínio até o fim do experimento.

Esta rápida mobilização do AIA infiltrado para a forma éster parece atuar em conjunto com o outro tipo de conjugação, a amídica, no sentido de acomodar os níveis de AIA livre aos mesmos encontrados nas fatias controle. Nestas observou-se (Figura 9) que os conjugados amídicos permanecem praticamente constantes ao longo do amadurecimento. Esta forma de conjugação tem sido apontada, em alguns casos, como uma forma de liberação lenta do AIA (Bialek e col. 1983) e na maioria deles, como uma etapa intermediária ao catabolismo do hormônio, sendo a forma AIA-aspartato um intermediário chave neste catabolismo (Normanly 1997).

A partir do 16^o dia pós-infiltração, observou-se, nas fatias controle, um aumento constante nos conjugados amídicos do AIA, paralelo à degradação do amido. A literatura não aponta nenhuma correlação entre estes eventos em outros modelos experimentais, porém recentemente discute-se a respeito da atividade biológica que alguns conjugados amídicos do AIA apresentam sob certas condições (Bartel 1997). Dunlap e col. (1996) observaram o elevado aumento nos conjugados amídicos do AIA em melões nos estádios de maturidade plena deste fruto, porém não chegaram a uma hipótese a respeito do papel destes para o amadurecimento deste fruto.

Para as fatias infiltradas com AIA, no entanto, os dados da Figura 10 mostram o rápido aumento na concentração da forma amídica dos conjugados de AIA logo nas primeiras horas pós-infiltração, de modo semelhante ao encontrado para as formas éster. Östin e col. (1998) observaram em *Arabidopsis* a rápida conversão de AIA exógeno para as formas AIA-glicose (éster) e AIA-aspartato (amida). Como discutido anteriormente, a primeira representa uma forma de armazenagem de AIA, enquanto que a segunda parece ser um importante intermediário do catabolismo do AIA. Recentemente Tam e col. (2000) relataram que em *Arabidopsis thaliana* estas formas de conjugação estão presentes em quantidades muito pequenas, e que seu acúmulo apenas ocorreria em situações de aumento excessivo de AIA, como nos casos de aplicação exógena do hormônio. Estes autores sugerem a hipótese de que estas formas teriam pouca relevância para o metabolismo do AIA durante o desenvolvimento vegetal normal.

Os resultados apresentados na Figura 10 mostram a existência de um eficiente sistema de manutenção da homeostase do AIA presente nas células da polpa de bananas. O gráfico sugere a idéia de que a conjugação éster atuaria como uma espécie de “tampão” atuando em conjunto com a via de conjugação amídica que dirigiria o excesso de AIA para a degradação. No 13º dia pós-infiltração, nas fatias tratadas, observou-se a ocorrência de um pico, tanto nos níveis de conjugados éster quanto de conjugados amídicos, seguido de marcado declínio das duas formas no 16º dia. Estas mudanças parecem indicar alterações no padrão de catabolismo do

hormônio, sugerindo a sua intensificação, podendo estar ligada ao aumento na atividade de peroxidases induzidas pelo etileno, visto que esta queda ocorreu após o pico de produção deste hormônio.

Para verificar se o padrão observado nas fatias controle também poderia ser encontrado em frutos de banana inteiros, foram utilizadas bananas de outra fonte, diferente daquelas empregadas nos estudos com fatias, e realizadas as medidas dos teores de amido, AIA livre e de suas formas conjugadas. Os resultados mostrados na Figura 11 mostraram perfis muito semelhantes àqueles encontrados nas fatias controle, com uma queda constante nos níveis de AIA livre, pouca variação nos conjugados ésteres. Os conjugados amídicos também apresentaram perfil muito semelhante, mantendo-se constantes durante a fase pré-climatérica e aumentando constantemente em paralelo a fase de rápida mobilização do amido.

Estes resultados validam os encontrados no modelo experimental de fatias, e parecem condizentes com a hipótese do AIA ser um fator de inibição para o amadurecimento normal da banana, como parece ocorrer em tomates, sendo que a diminuição nos níveis da fração livre do hormônio pode representar um sinal para o desenvolvimento normal de processos que levam às mudanças típicas dessa fase.

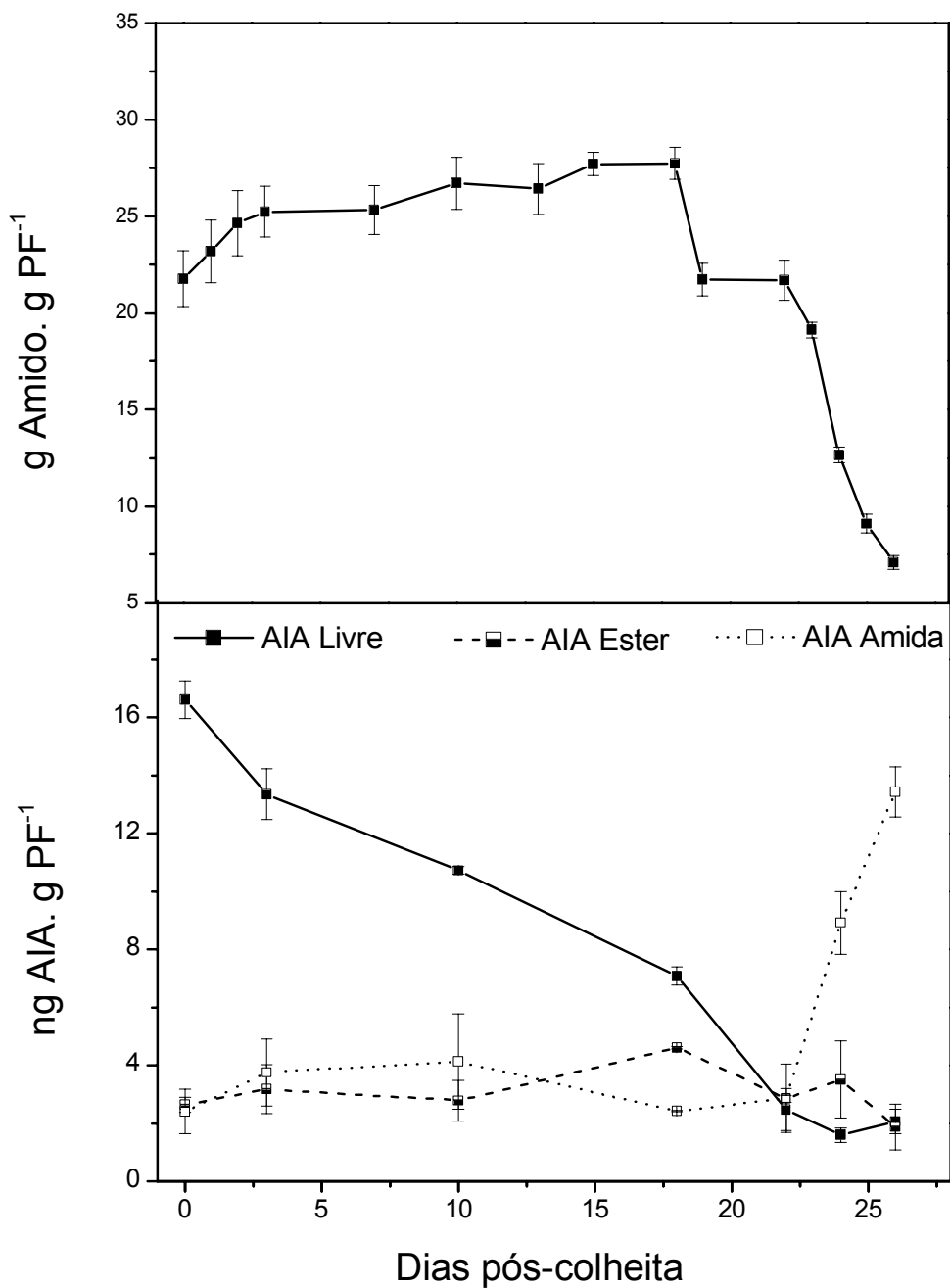


Figura 11: Teores de amido e níveis de AIA livre e conjugados éster e amidade **bananas inteiras** durante o amadurecimento. As bananas foram colhidas com aproximadamente 110 dias pós-antese. Cada ponto representa a média \pm desvio-padrão.

Os resultados obtidos mostram indicações do efeito do AIA em um modelo experimental, onde as respostas obtidas devem ser analisadas dentro dos limites permitidos pelas metodologias empregadas. Isto, no entanto, não diminui a validade das análises conduzidas, se levarmos em conta que se trata de uma abordagem exploratória com o intuito de compreender os efeitos que o AIA pode produzir no tecido vegetal bem como de adquirir maiores informações a respeito do metabolismo amido-sacarose em bananas.

Além disso, o estudo provê indicações acêrca da complexidade envolvida na sinalização para o desenvolvimento do fenótipo do fruto maduro.

6. Conclusões

Os dados apresentados permitem concluir que:

- O modelo experimental de fatias de banana é válido por apresentar comportamento similar ao encontrado no fruto inteiro, nos vários aspectos abordados no presente estudo, conforme evidenciado nas análises das fatias controle.

- O AIA atrasa a conversão de amido em açúcares solúveis e o amadurecimento da banana. O atraso na degradação do amido pode, em parte, ser explicado por alterações nas atividades das enzimas amilolíticas como a α -amilase, a β -amilase e a α -1,4-glicosidase neutra. O atraso na síntese e acúmulo da sacarose foram afetados, provavelmente, pelo atraso na degradação do amido, já que as atividades das enzimas diretamente relacionadas a este processo, como a SPS e a SuSy, não foram alteradas.

- A transcrição do mRNA de β -amilase foi afetada pelo AIA, indicando que a atividade desta enzima é regulada, pelo menos em parte, em nível transcricional.

- As análises de AIA livre e de suas formas conjugadas nas fatias tratadas com o hormônio indicam a existência de um eficiente sistema capaz de regular a homeostase do AIA na banana. O nível da forma livre do AIA parece ser importante para o desenvolvimento dos processos relacionados a degradação do amido durante o amadurecimento da banana.

7. Referências Bibliográficas

ABELES, F.B., BILES, C.L. Cellulase activity in developing apple fruits. **Sci. Hort.-Amsterdam**, Amsterdam, v.47, n.1-2, p.77-87, 1991.

AP REES, T. Hexose phosphate metabolism by nonphotosynthetic tissues of higher plants. In: DAVIES, D.D., ed. **The biochemistry of plants**. New York: Academic Press, 1988, v.14, p.1-33.

ARCHBOLD, D.D., DENNIS, F.G. Quantification of free ABA and free and conjugated IAA in strawberry achene and receptacle tissue during fruit-development. **J. Amer. Soc. Hort. Sci.**, Alexandria, v.109, n.3, p.330-335, 1984.

ARÊAS, J.A.G., LAJOLO, F.M. Starch transformation during banana ripening .1. The phosphorylase and phosphatase behavior in *Musa acuminata*. **J. Food Biochem.**, Trumbull, v.5, n.1, p.19-37, 1981.

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

BARTEL, B. Auxin biosynthesis. **Annu. Rev. Plant Physiol.**, Palo Alto, v.48, p.51-66, 1997.

BEAUDRY, R.M., SEVERSON, R.F., BLACK, C.C., KAYS, S.J. Banana ripening - Implications of changes in glycolytic intermediate concentrations, glycolytic and gluconeogenic carbon flux, and fructose 2,6-bisphosphate concentration. **Plant Physiol.**, Rockville, v.91, n.4, p.1436-1444, 1989.

BECK, E., ZIEGLER, P. Biosynthesis and degradation of starch in higher plants. **Annu. Rev. Plant Physiol.**, Palo Alto, v.40, p.95-117, 1989.

BERGMEYER, H.U., BERNT, E. D-glucose. Determination with glucose oxidase and peroxidase. In: BERGMEYER, H.U., GAWEHN, K., eds. *Methods of enzymatic analysis*. 2.ed. New York: Academic Press, 1974, v.2, p.1212-1215.

BERNARDES-SILVA, A.P.F. **Perfil de carboidratos de diferentes cultivares de manga durante o desenvolvimento e amadurecimento**. São Paulo, 2000. 91p. (Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP)

BERNFELD, P. Amylases, alpha and beta. **Meth. Enzymology**, San Diego, v.1, n.149-158, 1955.

BIALE, J., YOUNG, R.E. 1962. The biochemistry of fruit maturation. *Endeavour* 21, 164-174. Apud: FRENKEL, C., DYCK, R., HAARD, N.F. Role of auxin in the regulation of fruit ripening. In: HAARD, N.F.,

SALUNKHE, D.K., eds. **Postharvest biology and handling of fruits and vegetables**. Westport: The AVI Publishing Company, Inc. 1975. cap.3, p.19-34.

BIALEK, K, MICHALCZUK, L., COHEN, J.D. Indole-3-acetic acid (IAA) and IAA conjugates applied to bean stem sections. **Plant Physiol.**, Rockville, v.73, n.1, p.130-134, 1983.

BLACKMAN, F.F., PARIJA, P. (1928) Analytical studies in plant respiration: I: The respiration of a population of senescent ripening apples. *Proc. R. Soc. Biol. Sci.*, 103, 412-418. Apud: TUCKER, G.A. Introduction. In: SEYMOUR, G.B., TAYLOR, J.E., TUCKER, G.A., eds. **Biochemistry of fruit ripening**. London: Chapman & Hall, 1993. cap.1, p.1-43.

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

BRADY, C.J., PALMER, J.K., OCONNELL, P.B., SMILLIE, R.M. An increase in protein synthesis during ripening of banana fruit. **Phytochemistry**, Oxford, v.9, n.5, p.1037-&, 1970.

BRANDURSKI, R.S., COHEN, J.D., SLOVIN, J.P., REINECKE, D.M. Auxin biosynthesis and metabolism. In: DAVIES, P.J. ed. **Plant hormones**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1995. cap. B1, p.39-65.

- BROOKS, J.L. Oxidase reactions of tomato anionic peroxidase. **Plant Physiol.**, Rockville, v.80, n.1, p.130-133, 1986.
- BURG, S.P., BURG, E.A. Relationship between ethylene production and ripening in bananas. **Bot. Gaz.**, Chicago, v.126, n.3, p.200-&, 1965.
- BUTA, J.G., SPAULDING, D.W. Changes in indole-3-acetic-acid and abscisic-acid levels during tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill) fruit development and ripening. **J. Plant Growth. Regul.**, New York, v.13, n.3, p.163-166, 1994.
- CATALA, C., CROZIER, A., CHAMARRO, J. Decarboxylative metabolism of [1'-C-14]-indole-3-acetic acid by tomato pericarp disks during ripening - Effects of wounding and ethylene. **Planta**, New York, v.193, n.4, p.508-513, 1994.
- CATALÁ, C., OSTIN, A., CHAMARRO, J., SANDBERG, G., CROZIER, A. Metabolism of indole-3-acetic-acid by pericarp disks from immature and mature tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill). **Plant Physiol.**, Rockville, v.100, n.3, p.1457-1463, 1992.
- CLENDENNEN, S.K., MAY, G.D. Differential gene expression in ripening banana fruit. **Plant Physiol.**, Rockville, v.115, n.3, p.463-469, 1997.

- CHEN, K.H., MILLER, A.N., PATTERSON, G.W., COHEN, J.D. A rapid and simple procedure for purification of indole-3-acetic acid prior to GC-MS-SIM analysis. **Plant Physiol.**, Rockville, v.86, n.3, p.822-825, 1988.
- COHEN, J.D. In vitro tomato fruit cultures demonstrate a role for indole-3-acetic acid in regulating fruit ripening. **J. Amer. Soc. Hort. Sci.**, Alexandria, v.121, n.3, p.520-524, 1996.
- COHEN, J.D., BANDURSKI, R.S. Chemistry and physiology of the bound auxins. **Annu. Rev. Plant Physiol.**, Palo Alto, v.33, n.403-430, 1982.
- CORDENUNSI, B.R., LAJOLO, F.M. Starch breakdown during banana ripening - Sucrose synthase and sucrose-phosphate synthase. **J. Agr. Food Chem.**, Washington, v.43, n.2, p.347-351, 1995.
- CRITCHLEY, J.H., ZEEMAN, S.C., TAKAHA, T., SMITH, A.M., SMITH, S.M. A critical role for disproportionating-enzyme in starch breakdown is revealed by a knock-out mutation in arabidopsis. **Plant J.**, Oxford, v.26, n.1, p.89-100, 2001.
- DA SILVA, E., LOURENCO, E.J., NEVES, V.A. Soluble and bound peroxidases from papaya fruit. **Phytochemistry**, Oxford, v.29, n.4, p.1051-1056, 1990.

DAVIES, C., BOSS, P.K., ROBINSON, S.P. Treatment of grape berries, a non-climacteric fruit with a synthetic auxin, retards ripening and alters the expression of developmentally regulated genes. **Plant Physiol.**, Rockville, v.115, n.3, p.1155-1161, 1997.

DAVIES, P.J. The plant hormones: their nature, occurrence and functions. In: _____ **Plant hormones**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1995. cap. A1, p.1-12.

DOEHLERT, D.C., HUBER, S.C. Spinach leaf sucrose-phosphate synthase - activation by glucose-6-phosphate and interaction with inorganic-phosphate. **Febs Lett.**, Amsterdam, v.153, n.2, p.293-297, 1983.

DUNLAP, J.R., SLOVIN, J.P., COHEN, J.D. Indole-3-acetic acid, ethylene, and abscisic acid metabolism in developing muskmelon (*Cucumis melo*) fruit. **Plant Growth Regul.**, Dordrecht, v.19, n.1, p.45-54, 1996.

ECKER, J.R. The ethylene signal-transduction pathway in plants. **Science**, Washington, v.268, n.5211, p.667-675, 1995.

ELLE, D., SAUTER, J.J. Seasonal changes of activity of a starch granule bound endoamylase and of a starch phosphorylase in poplar wood (*Populus x Canadensis moench* Robusta) and their possible regulation by temperature and phytohormones. **J. Plant Physiol.**, Jena, v.156, n.5-6, p.731-740, 2000.

- ESAKA, M., FUJISAWA, K., GOTO, M., KISU, Y. Regulation of ascorbate oxidase expression in pumpkin by auxin and copper. **Plant Physiol.**, Rockville, v.100, n.1, p.231-237, 1992.
- FRANSEN, T.P., SVENSSON, B. Plant alpha-glucosidases of the glycoside hydrolase family 31. Molecular properties, substrate specificity, reaction mechanism, and comparison with family members of different origin. **Plant Mol. Biol.**, Dordrecht, v.37, n.1, p.1-13, 1998.
- FRENKEL, C., BRENNAN, T. Relation of peroxide activity in Bartlett pears to onset of fruit ripening. **Plant Physiol.**, Rockville, v.56, n.2, p.62-62, 1975.
- FRENKEL, C., DYCK, R. Auxin inhibition of ripening in bartlett pears. **Plant Physiol.**, Rockville, v.51, n.1, p.6-9, 1973.
- FRENKEL, C., KLEIN, I., DILLEY, D.R. Protein synthesis in relation to ripening of pome fruits. **Plant Physiol.**, Rockville, v.43, n.7, p.1146-&, 1968.
- FUCHS, Y., PESIS, E., ZAUBERMAN, G. Changes in amylase activity, starch and sugars contents in mango fruit pulp. **Sci. Hort.-Amsterdam**, Amsterdam, v.13, n.2, p.155-160, 1980.

- GARCIA, E., LAJOLO, F.M. Starch transformation during banana ripening - The amylase and glucosidase behavior. **J. Food Sci.**, Chicago, v.53, n.4, p.1181-1186, 1988.
- GIBSON, S.I. Plant sugar-response pathways. Part of a complex regulatory web. **Plant Physiol.**, Rockville, v.124, n.4, p.1532-1539, 2000.
- GIOVANNONI, J. Molecular biology of fruit maturation and ripening. **Annu. Rev. Plant Physiol.**, Palo Alto, v.52, n.725-749, 2001.
- GIVEN, N.K., VENIS, M.A., GRIERSON, D. Hormonal regulation of ripening in the strawberry, a non-climacteric fruit. **Planta**, New York, v.174, n.3, p.402-406, 1988.
- GOLDING, J.B., SHEARER, D., WYLLIE, S.G., MCGLASSON, W.B. Application of 1-MCP and propylene to identify ethylene-dependent ripening processes in mature banana fruit. **Postharvest Biol. Technol.**, Amsterdam, v.14, n.1, p.87-98, 1998.
- HADFIELD, K.A., DANG, T., GUI, M., PECH, J.C., BOUZAYEN, M., BENNETT, A.B. Characterization of ripening-regulated cDNAs and their expression in ethylene-suppressed Charentais melon fruit. **Plant Physiol.**, Rockville, v.122, n.3, p.977-983, 2000.

- HALLETT, I.C., WEGRZYN, T.F., MACRAE, E.A. Starch degradation in kiwifruit - *in-vivo* and *in-vitro* ultrastructural studies. **Int. J. Plant Sci.**, Chicago, v.156, n.4, p.471-480, 1995.
- HILL, S.A., APREES, T. Fluxes of carbohydrate metabolism in ripening bananas. **Planta**, Chicago, v.192, n.1, p.52-60, 1994.
- HIRASAWA, E., YAMAMOTO, S. Properties and synthesis *de novo* of auxin-induced alpha-amylase in pea cotyledons. **Planta**, New York, v.184, n.4, p.438-442, 1991.
- HUBBARD, N.L., PHARR, D.M., HUBER, S.C. Role of sucrose-phosphate synthase in sucrose biosynthesis in ripening bananas and its relationship to the respiratory climacteric. **Plant Physiol.**, Rockville, v.94, n.1, p.201-208, 1990.
- HUBBARD, N.L., PHARR, D.M., HUBER, S.C. Sucrose-phosphate synthase and other sucrose metabolizing enzymes in fruits of various species. **Physiol. Plant.**, Copenhagen, v.82, n.2, p.191-196, 1991.
- HUBER, S.C., HUBER, J.L. Role and regulation of sucrose-phosphate synthase in higher plants. **Annu. Rev. Plant Physiol.**, Palo Alto, v.47, n.431-444, 1996.

- HUBER, S.C., HUBER, J.L. Role of sucrose-phosphate synthase in sucrose metabolism in leaves. **Plant Physiol.**, Rockville, v.99, n.4, p.1275-1278, 1992.
- HULME, A.C., RHODES, M.J.C., GALLIARD, T., WOOLTORTLS Metabolic changes in excised fruit tissue .4. Changes occurring in discs of apple peel during development of respiration climacteric. **Plant Physiol.**, Rockville, v.43, n.7, p.1154-1156, 1968.
- IRVING, D.E., SHINGLETON, G.J., HURST, P.L. Starch degradation in buttercup squash (*Cucurbita maxima*). **J. Amer. Soc. Hort. Sci.**, Alexandria, v.124, n.6, p.587-590, 1999.
- KILLILEA, S.D., CLANCY, M.J. Properties of potato alpha-glucosidase. **Phytochemistry**, Oxford, v.17, n.8, p.1429-1431, 1978.
- KLAMBT, D. NPA inhibits secretion of amylases by barley aleurone cells and auxins can overcome this inhibition. **Bot. Acta**, Stuttgart, v.106, n.1, p.52-57, 1993.
- KLECZKOWSKI, K, SCHELL, J. Phytohormone conjugates: nature and function. . **Crit. Rev. Plant Sci.**, Boca Raton, v.14, n.3, p.283-298, 1995.
- KOCH, K.E. Carbohydrate-modulated gene expression in plants. **Annu. Rev. Plant Physiol.**, Palo Alto, v.47, n.509-540, 1996.

KOMATSU, A., TAKANOKURA, Y., MORIGUCHI, T., OMURA, M., AKIHAMA, T. Differential expression of three sucrose-phosphate synthase isoforms during sucrose accumulation in citrus fruits (*Citrus unshiu* Marc.). **Plant Sci.**, Clare, v.140, n.2, p.169-178, 1999.

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

KONISHI, Y., KITAZATO, S., ASANO, R., NAKATANI, N. Polymorphism of acid and neutral alpha-glucosidases in banana pulp - Changes in apparent pI s and affinity to Con-A of the enzymes during ripening. **Agr. Biol. Chem. Tokyo**, Tokyo, v.55, n.4, p.1089-1094, 1991.

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

KONISHI, Y., OKAMOTO, A., TAKAHASHI, J., AITANI, M., NAKATANI, N. Effects of Bay M-1099, an alpha-glucosidase inhibitor, on starch metabolism in germinating wheat seeds. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, Tokyo, v.58, n.1, p.135-139, 1994.

- KRUGER, N.J., AP REES, T. Properties of alpha-glucan phosphorylase from pea-chloroplasts. **Phytochemistry**, Oxford, v.22, n.9, p.1891-1898, 1983.
- LANGËNKAMPER, G., MCHALE, R., GARDNER, R.C., MACRAE, E. Sucrose-phosphate synthase steady-state mRNA increases in ripening kiwifruit. **Plant Mol. Biol.**, Dordrecht, v.36, n.6, p.857-869, 1998.
- LEE, T.H., SUGIYAMA, A., OFOSU-ANIM, J., TAKENO, K., OHNO, H., YAMAKI, S. Activation of sucrose-metabolizing enzymes and stimulation of sucrose uptake by auxin and sucrose in eggplant (*Solanum melongena*). **J. Plant Physiol.**, Jena, v.150, n.3, p.297-301, 1997.
- LELIÉVRE, J.M., LATCHÉ, A., JONES, B., BOUZAYEN, M., PÉCH, J.C. Ethylene and fruit ripening. **Physiol. Plant.**, Copenhagen, v.101, n.4, p.727-739, 1997.
- LELOIR, L.F., CARDINI, C.E. The biosynthesis of sucrose. **J. Amer. Chem. Soc.**, Washington, v.75, n.23, p.6084-6084, 1953.
- LIDDLE, A.M., MANNERS, D.J., WRIGHT, A. Studies on carbohydrate-metabolizing enzymes .6. Action of potato phosphorylase (P-enzyme) on starch-type polysaccharides. **Biochem. J.**, London, v.80, n.2, p.304-309, 1961.

- LINCOLN, J.E., CORDES, S.P., DEIKMAN, J., FISCHER, R.L. Regulation of gene-expression by ethylene during *Lycopersicon esculentum* (tomato) fruit development. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA**, Washington, v.84, n.9, p.2793-2797, 1987.
- LINGLE, S.E., DUNLAP, J.R. Sucrose metabolism and IAA and ethylene production in muskmelon ovaries. **J. Plant Growth Regul.**, New York, v.10, n.3, p.167-171, 1991.
- LÓPEZ-GÓMEZ, R., GÓMEZ-LIM, M.A. A method for extracting intact RNA from fruits rich in polysaccharides using ripe mango mesocarp. **Hortscience**, Alexandria, v.27, n.5, p.440-442, 1992.
- LUFFORD, P.M. Postharvest hormone changes in vegetables and fruit. In: DAVIES, P.J. ed. **Plant hormones**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1995. cap. G12, p.725-750.
- LYONS, J.M., PRATT, H.K. Effect of stage of maturity and ethylene treatment on respiration and ripening of tomato fruits. **Proc. Am. Soc. Hort. Sci.**, Geneva, v.84, n.5, p.491-500, 1964.
- MACGREGOR, A.W., DUSHNICKY, L. Starch degradation in endosperms of developing barley kernels. **J. Inst. Brew.**, London, v.95, n.5, p.321-325, 1989.

MACRAE, E., QUICK, W.P., BENKER, C., STITT, M. Carbohydrate metabolism during postharvest ripening in kiwifruit. **Planta**, New York, v.188, n.3, p.314-323, 1992.

MANNERS, D.J. Starch. In: DEY, P.M., DIXON, R.A. **Biochemistry of storage carbohydrates in green plants**. London: Academic Press, 1985, cap.4, p.149-204.

MARRIOTT, J., ROBINSON, M., KARIKARI, S.K. Starch and sugar transformation during the ripening of plantains and bananas. **J. Sci. Food Agr.**, W Sussex, v.32, n.10, p.1021-1026, 1981.

MATSUI, H., ITO, H., CHIBA, S. Low-molecular activity alpha-glucosidase from ungerminated rice seed. **Agr. Biol. Chem. Tokyo**, Tokyo, v.52, n.7, p.1859-1860, 1988.

MATSUI, H., YAZAWA, I., CHIBA, S. Purification and substrate-specificity of sweet corn alpha- glucosidase. **Agr. Biol. Chem. Tokyo**, Tokyo, v.45, n.4, p.887-894, 1981.

MCAINSH, M.R., HETHERINGTON, A.M. Encoding specificity in Ca²⁺ signalling systems. **Trends Plant Sci.**, Oxford, v.3, n.1, p.32-36, 1998.

- MCCLEARY, B.V., CODD, R. Measurement of beta-amylase in cereal flours and commercial enzyme preparations. **J. Cereal Sci.**, London, v.9, n.1, p.17-33, 1989.
- MCGLASSON, W.B., PRATT, H.K. Effects of ethylene on cantaloupe fruits harvested at various ages. **Plant Physiol.**, Rockville, v.39, n.1, p.120-124, 1964.
- MCMURCHIE, E.J., MCGLASSON, W.B., EAKS, I.L. Treatment of fruit with propylene gives information about biogenesis of ethylene. **Nature**, London, v.237, n.5352, p.235-236, 1972.
- MEDINA-SUÁREZ, R., MANNING, K., FLETCHER, J., AKED, J., BIRD, C.R., SEYMOUR, G.B. Gene expression in the pulp of ripening bananas - Two-dimensional sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis of in vitro translation products and cDNA cloning of 25 different ripening-related mRNAs. **Plant Physiol.**, Rockville, v.115, n.2, p.453-461, 1997.
- MERLO, L., PASSERA, C. Changes in carbohydrate and enzyme levels during development of leaves of *Prunus persica*, a sorbitol synthesizing species. **Physiol. Plant.**, 83, n.4, p.621-626, 1991.

- MILLER, A.N., WALSH, C.S., COHEN, J.D. Measurement of indole-3-acetic acid in peach fruits (*Prunus persica* L Batsch cv Redhaven) during development. **Plant Physiol.**, Rockville, v.84, n.2, p.491-494, 1987.
- MIRON, D., SCHAFFER, A.A. Sucrose-phosphate synthase, sucrose synthase, and invertase activities in developing fruit of *Lycopersicon esculentum* Mill and the sucrose accumulating *Lycopersicon hirsutum* Humb and Bonpl. **Plant Physiol.**, Rockville, v.95, n.2, p.623-627, 1991.
- MONROE, J.D., GOUGH, C.M., CHANDLER, L.E., LOCH, C.M., FERRANTE, J.E., WRIGHT, P.W. Structure, properties, and tissue localization of apoplastic alpha-glucosidase in crucifers. **Plant Physiol.**, Rockville, v.119, n.2, p.385-397, 1999.
- MORRELL, S., AP REES, T. Control of the hexose content of potato tubers. **Phytochemistry**, Oxford, v.25, n.5, p.1073-1076, 1986.
- MOTA, R.V. **Identificação, purificação e caracterização parcial da enzima amido fosforilase em bananas Nanicao (*Musa acuminata*. grupo Cavendish).** . São Paulo, 2001. 86p. (Tese de Doutorado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP).
- MOTA, R.V., LAJOLO, F.M., CIACCO, C., CORDENUNSI, B.R. Composition and functional properties of banana flour from different varieties. **Starch**, Berlin, v.52, n.2-3, p.63-68, 2000.

- MOUSDALE, D.M.A., KNEE, M. Indolyl-3-acetic acid and ethylene levels in ripening apple fruits. **J. Exp. Bot.**, Oxford, v.32, n.129, p.753-758, 1981.
- NASCIMENTO, J.R.O., CORDENUNSI, B.R., LAJOLO, F.M. Sucrose synthase activity and expression during development and ripening in bananas. **J. Plant Physiol.**, Jena, v.156, n.5-6, p.605-611, 2000.
- NASCIMENTO, J.R.O., CORDENUNSI, B.R., LAJOLO, F.M., ALCOCER, M.J.C. Banana sucrose-phosphate synthase gene expression during fruit ripening. **Planta**, New York, v.203, n.3, p.283-288, 1997.
- NIELSEN, T.H., DEITING, U., STITT, M. A beta-amylase in potato tubers is induced by storage at low temperature. **Plant Physiol.**, Rockville, v.113, n.2, p.503-510, 1997.
- NIGHOJKAR, S.A., KUMAR, A. Starch phosphorylase: biochemical, molecular and biotechnological aspects. **Genet. Eng. Biotechnol.**, Abingdon, v.17, n.4, p.189-202, 1997.
- NITSCH, J.P. (1955) Free auxins and free tryptophane in the strawberry. *Plant Physiology*, **30**, p.33-39. Apud: MANNING, K. Soft fruit. In: SEYMOUR, G.B., TAYLOR, J.E., TUCKER, G.A., eds. **Biochemistry of fruit ripening**. London: Chapman & Hall, 1993. cap.12, p.347-377.

NORMANLY, J. Auxin metabolism. **Physiol Plant**, Copenhagen, v.100, n.3, p.431-442, 1997.

NORMANLY, J., BARTEL, B. Redundancy as a way of life - IAA metabolism. **Curr. Opin. Plant Biol.**, v.2, n.3, p.207-213, 1999.

NORMANLY, J., COHEN, J.D., FINK, G.R. *Arabidopsis thaliana* auxotrophs reveal a tryptophan-independent biosynthetic pathway for indole-3-acetic acid. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA**, Washington, v.90, p.10355-10359, 1993.

ÖSTIN, A., KOWALYCZK, M., BHALERAO, R., SANDBERG, G. Metabolism of indole-3-acetic acid in *Arabidopsis*. **Plant Physiol.**, Rockville, v.118, n.2, p.285-296, 1998.

PALMER, J.K., MCGLASSON, W.B. Respiration and ripening of banana fruit slices. **Aust. J. Biol. Sci.**, Collingwood, v.22, n.1, p.87-99, 1969.

PAYTON, S., FRAY, R.G., BROWN, S., GRIERSON, D. Ethylene receptor expression is regulated during fruit ripening, flower senescence and abscission. **Plant Mol. Biol.**, Dordrecht, v.31, n.6, p.1227-1231, 1996.

PÉCH, J.C., LATCHÉ, A., FALLOT, J. Tissue and cell culture of Passe crassane pears - Amylase pattern of cultured tissues compared with whole fruit. **Physiol. Plant**, Copenhagen, v.46, n.3, p.260-264, 1979.

- PERCHERON, F. Chimie Biologique - Dosage colorimetrique du fructose et des fructofuranosides par l'acide thiobarbiturique. **C R Hebd Sean Acad Sci**, Paris, v.255, n.19, p.2521-2522, 1962.
- PESIS, E., FUCHS, Y., ZAUBERMAN, G. Starch content and amylase activity in avocado fruit pulp. **J. Amer. Soc. Hort. Sci.**, Alexandria, v.103, n.5, p.673-676, 1978.
- POZUETA-ROMERO, J., PERATA, P., AKAZAWA, T. Sucrose-starch conversion in heterotrophic tissues of plants. **Crit. Rev. Plant Sci.**, Boca Raton, v.18, n.4, p.489-525, 1999.
- PRATT, H.K., REID, M.S. Chinese gooseberry - seasonal patterns in fruit growth and maturation, ripening, respiration and role of ethylene. **J. Sci. Food Agr.**, W Sussex, v.25, n.7, p.747-757, 1974.
- ROTHAN, C., NICOLAS, J. Changes in acidic and basic peroxidase activities during tomato fruit ripening. **Hortscience**, Alexandria, v.24, n.2, p.340-342, 1989.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F., MANIATIS, T. Molecular cloning: a laboratory manual. 2.ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989, v.3.

SATO, T., THEOLOGIS, A. Cloning the messenger-RNA encoding 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase, the key enzyme for ethylene biosynthesis in plants. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA**, Washington, v.86, n.17, p.6621-6625, 1989.

SCHAFFER, B., ANDERSEN, P.D. **Handbook of environmental physiology of fruit crops: sub-tropical and tropical crops**. Boca Raton: CRC Press, 1997, v.2.

SEYMOUR, G.B. Banana. In: SEYMOUR, G.B., TAYLOR, J.E., TUCKER, G.A., eds. **Biochemistry of fruit ripening**. London: Chapman & Hall, 1993. cap.2, p.93-106.

SIVAK, M.N., PREISS, J. Starch degradation. In: ____ **Advances in food and nutrition research. Starch: basic science to biotechnology**. San Diego: Academic Press, 1998, p.153-162.

SLOVIN, J.P., COHEN, J.D.1993. Auxin metabolism in relation to fruit ripening. – *In* 7th International Symposium on Plant Growth Regulators in Fruit (S. Lavee and R. Goren, eds), pp. 84-89. Jerusalem, Israel/Wageningen, Netherlands. Apud: NORMANLY, J. Auxin metabolism. **Physiol Plant**, Copenhagen, v.100, n.3, p.431-442, 1997.

SMEEKENS, S. Sugar-induced signal transduction in plants. **Annu. Rev. Plant Physiol.**, Palo Alto, v.51, n.49-81, 2000.

- SPANU, P., REINHARDT, D., BOLLER, T. Analysis and cloning of the ethylene-forming enzyme from tomato by functional expression of its messenger-RNA in *Xenopus laevis* oocytes. **Embo J.**, Oxford, v.10, n.8, p.2007-2013, 1991.
- STEPANOVA, A.N., ECKER, J.R. Ethylene signaling: from mutants to molecules. **Curr. Opin. Plant Biol.**, London, v.3, n.5, p.353-360, 2000.
- STITT, M., AP REES, T. Pathways of carbohydrate oxidation in leaves of *Pisum sativum* and *Triticum aestivum*. **Phytochemistry**, Oxford, v.17, n.8, p.1251-1256, 1978.
- STURM, A., TANG, G.Q. The sucrose-cleaving enzymes of plants are crucial for development, growth and carbon partitioning. **Trends Plant Sci.**, Oxford, v.4, n.10, p.401-407, 1999.
- SUN, Z.T., HENSON, C.A. A quantitative assessment of the importance of barley seed alpha-amylase, beta-amylase, debranching enzyme, and alpha- glucosidase in starch degradation. **Arch. Biochem. Biophys.**, San Diego, v.284, n.2, p.298-305, 1991.
- SUZUKI, Y., UCHIDA, K. An alpha-glucosidase from endosperm of germinating edible beet seeds. **Agr. Biol. Chem. Tokyo**, Tokyo, v.49, n.3, p.863-865, 1985.

TAM, Y.Y., EPSTEIN, E., NORMANLY, J. Characterization of auxin conjugates in Arabidopsis. Low steady-state levels of indole-3-acetyl-aspartate, indole-3-acetyl-glutamate and indole-3-acetyl-glucose. **Plant Physiol.**, Rockville, v.123, n.6, p.589-595, 2000.

TANG, G.Q., STURM, A. Antisense repression of sucrose synthase in carrot (*Daucus carota* L.) affects growth rather than sucrose partitioning. **Plant Mol. Biol.**, Dordrecht, v.41, n.4, p.465-479, 1999.

THEOLOGIS, A. One rotten apple spoils the whole bushel - The role of ethylene in fruit ripening. **Cell**, Cambridge, v.70, n.2, p.181-184, 1992.

THEOLOGIS, A. Rapid gene-regulation by auxin. **Annu. Rev. Plant Physiol.**, Palo Alto, v.37, n.407-438, 1986.

TINGWA, P.O., YOUNG, R.E. Effect of indole-3-acetic-acid and other growth-regulators on ripening of avocado fruits. **Plant Physiol.**, Rockville, v.55, n.5, p.937-940, 1975.

TUCKER, G.A. Introduction. In: Introduction. In: SEYMOUR, G.B., TAYLOR, J.E., TUCKER, G.A., eds. **Biochemistry of fruit ripening**. London: Chapman & Hall, 1993. cap.1, p.1-43.

- VENDRELL, M. Relationship between internal distribution of exogenous auxins and accelerated ripening of banana fruit. **Aust. J. Biol. Sci.**, Collingwood, v.23, n.6, p.1133-1142, 1970.
- VENDRELL, M. Reversion of senescence - Effects of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and indoleacetic acid on respiration ethylene production and ripening of banana fruit slices. **Aust. J. Biol. Sci.**, Collingwood, v.22, n.3, p.601-610, 1969.
- WANG, F., SMITH, A.G., BRENNER, M.L. Characterization of tomato fruit sucrose synthase. **Plant Physiol.**, Rockville, v.102, n.1, p.72-72, 1993.
- WANG, Q., MONROE, J., SJOLUND, D. Identification and characterization of a phloem-specific beta-amylase. **Plant Physiol.**, Rockville, v.109, n.3, p.743-750, 1995.
- WEGRZYN, T., MACRAE, E. Alpha-amylase and starch degradation in kiwifruit. **J. Plant Physiol.**, Stuttgart, v.147, n.1, p.19-28, 1995.
- WEGRZYN, T., REILLY, K., CIPRIANI, G., MURPHY, P., NEWCOMB, R., GARDNER, R., MACRAE, E. A novel alpha-amylase gene is transiently upregulated during low temperature exposure in apple fruit. **Eur. J. Biochem.**, Oxford, v.267, n.5, p.1313-1322, 2000.

WHITAKHER, J.R. Principles of enzymology for the food sciences. 2.ed. New York: Marcel Dekker, Inc. 1994, cap.15, p.391-423.

WITT, W., SAUTER, J.J. Partial purification of amylases and starch phosphorylases from poplar wood. **J. Plant Physiol.**, Stuttgart, v.146, n.1-2, p.15-21, 1995.

YANG, S.F., HOFFMAN, N.E. Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. **Annu. Rev. Plant Physiol.**, Palo Alto, v.35, n.155-189, 1984.

ZRENNER, R., SALANOUBAT, M., WILLMITZER, L., SONNEWALD, U. Evidence of the crucial role of sucrose synthase for sink strength using transgenic potato plants (*Solanum tuberosum* L.). **Plant J.**, Oxford, v.7, n.1, p.97-107, 1995.

8. Resumo

Dentre os vários processos que concorrem para o amadurecimento da banana, a degradação do amido e sua conversão em açúcares solúveis, principalmente sacarose, são dois dos processos mais relevantes para a obtenção o sabor doce característico do fruto maduro. Embora venha sendo estudado há anos, ainda não foram esclarecidos quais os mecanismos regulatórios e os possíveis sinais hormonais envolvidos no controle da degradação do amido e na síntese da sacarose. O presente estudo objetivou avaliar o efeito do ácido indol-3-acético (AIA), um hormônio da classe das auxinas com reconhecido efeito retardador do amadurecimento, sobre o metabolismo amido-sacarose e algumas enzimas correlacionadas, em bananas. Observou-se um forte efeito retardador do hormônio sobre a degradação do amido no amido durante o amadurecimento de fatias de bananas infiltradas com uma solução contendo AIA em manitol, em comparação com fatias controle infiltradas apenas com manitol. As atividades de α e β -amilase e α -1,4-glicosidase neutra foram afetadas pelo AIA, apresentando atraso no desenvolvimento de suas atividades durante o amadurecimento, quando comparadas às fatias controle. A atividade da fosforilase de amido aparentemente não foi afetada. A transcrição do mRNA da β -amilase foi atrasada pelo AIA e pôde ser correlacionada ao atraso na degradação do amido. Os resultados sugerem que o atraso na mobilização do amido provocado pelo AIA deve decorrer de seus efeitos sobre as enzimas amilolíticas. O trabalho também sugere a relevância da β -amilase

para o processo e que esta enzima, ao menos em parte, é regulada por transcrição. No sentido da síntese de sacarose, as atividades de SuSy e SPS não mostraram alterações significativas. A transcrição do mRNA da SuSy e da SPS não foram afetadas. O atraso no acúmulo da sacarose, observado nas fatias infiltradas com o hormônio, pode ser conseqüência da limitação de substrato para a síntese deste açúcar devido ao atraso na degradação do amido. Medidas de etileno revelaram que a produção deste hormônio não foi afetada pelo AIA, sugerindo que a degradação do amido, pelo menos em parte possa ser um evento etileno-independente. Medidas da forma livre do AIA endógeno nas fatias controle e em bananas inteiras, mostraram que os níveis desta auxina decrescem durante o amadurecimento, atingindo os menores valores durante a mobilização do amido. Nas fatias tratadas, as medidas da forma livre do AIA e de seus conjugados mostraram a existência de um eficiente sistema capaz de mobilizar o excesso do hormônio no tecido e acomodando os níveis da forma livre aos mesmos encontrados nas fatias controle e nas bananas inteiras. Esta observação pode ser temporalmente correlacionada ao atraso na degradação do amido. O presente estudo mostrou não apenas a capacidade do AIA em afetar o metabolismo amido-sacarose em bananas mas também sugere que este hormônio pode ser parte dos sinais que regulam o amadurecimento em bananas.

9. Abstract

During banana ripening, starch degradation and sucrose formation are important processes responsible for the sweetening of ripe fruit. Although has been studied for several years, the regulation and hormonal signals that control these metabolic processes still remains not clear. The objective of this work has been evaluate the effect of indole-3-acetic acid (IAA), an auxin with inhibitory effect on ripening, on starch-to-sucrose metabolism and some correlated enzymes. The results showed a delay on starch degradation in slices infiltrated with IAA plus mannitol comparing to slices infiltrated only with mannitol. The activities of α - and β -amylase and α -1,4-glucosidase was delayed. Starch phosphorylase was not affected. These results suggest that IAA can delay starch degradation inhibiting, at least partially, the amylolytic activity. Synthesis of β -amylase mRNA was strong delayed on IAA-treated slices comparing to control slices, indicating that this enzyme could be, at least partially, regulated at the transcriptional level. In sucrose synthesis direction, sucrose synthase (SuSy) and sucrose-phosphate synthase (SPS) activities and mRNA transcription were not affected. This suggests that delay on sucrose formation could be a consequence of lack of substrate, since starch degradation was inhibited. Ethylene measurements didn't reveal any significant differences between control and IAA-treated slices suggesting that starch degradation on banana ripening could be a ethylene-independent event. Free endogenous IAA measurements on control slices and whole

banana fruit showed that this IAA fraction decrease continuously in the pulp of banana during ripening, reaching the lowest levels at the same time that starch degradation begun. On IAA-treated slices, the free plus conjugate IAA showed the existence of an efficient system that mobilized the hormone excess and brought the free IAA to the same levels of control and whole fruit. This could be timely correlated with the delay on starch degradation. This work shows not only that IAA can delay the starch degradation but also suggest that IAA could be part of regulatory signals involved on banana ripening.