

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

**Atividade e expressão gênica da  $\alpha$ -1,4 glicosidase  
durante o amadurecimento da banana  
(*Musa acuminata* AAA cv. Nanicão)**

**Denise Perez Vieira**

Dissertação para obtenção do grau de  
**MESTRE**

Orientadora:

Profa. Dra. Beatriz Rosana Cordenunsi

**São Paulo**

**2006**

(Nota da BCQ: Não foi possível capturar fielmente a imagem das figuras desta dissertação)

**DEDALUS - Acervo - CQ**



30100011558

**Ficha Catalográfica**

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

Perez-Vieira, Denise

P438a Atividade e expressão gênica da  $\alpha$ -1,4 glicosidase durante o amadurecimento da banana (*Musa acuminata* AAA cv. Nanicão / Denise Perez-Vieira. -- São Paulo, 2005.  
78p.

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

Orientador: Cordenunsi, Beatriz Rosana

1. *Musa acuminata* : Bioquímica de alimentos 2. Enzima : Ciência dos alimentos 3. Biologia molecular I. T. II. Cordenunsi, Beatriz Rosana, orientador.

641.3477 CDD

**Denise Perez Vieira**

**Atividade e expressão gênica da  $\alpha$ -1,4 glicosidase  
durante o amadurecimento da banana  
(*Musa acuminata* AAA cv. Nanicão)**

Comissão Julgadora  
da  
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

---

Profa. Dra. Beatriz Rosana Cordenunsi  
orientadora/presidente

---

Prof. Dr. João Roberto Oliveira do Nascimento  
1º. examinador

---

Prof. Dr. Marco Aurélio Silva Tiné  
2º. examinador

São Paulo, 07 de fevereiro de 2006.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, meu Pai Eterno, pelo dom da vida, pela oportunidade, inspiração e fortalecimento da minha jornada.

Aos iluminados amigos espirituais, conselheiros, incentivadores e intuitores; responsáveis por minha coragem e confiança; incansáveis no amor e na dedicação.

Aos meus pais Myriam e Luiz origem de minha jornada pelo apoio e incentivo e pela oportunidade de direcionar a minha escalada em busca do conhecimento.

Ao meu querido irmão Gabriel Luiz companheiro inestimável cujo amparo e estímulo são e sempre foram os grandes pilares do meu ainda pretendido sucesso.

Meus sinceros agradecimentos à Prof<sup>ª</sup>. Beatriz Rosana Cordenunsi, minha orientadora e amiga incansável. Que acreditou na minha escolha e determinação, abrindo todas as portas e oferecendo todas as oportunidades, amparando e estimulando durante todo o processo. Registro a minha admiração e reconhecimento pela grande pesquisadora que tem os maiores atributos de um cientista: idealismo e humanidade.

Ao Professor Eduardo Purgatto, pelo apoio, co-orientação, dedicação em ensinar, paciência e amizade, essenciais ao avanço deste trabalho.

Ao Professor João Roberto Oliveira do Nascimento e Renato Astorino por emprestarem a seqüência gênica, pelo auxílio e esclarecimentos técnicos.

Ao Professor Franco Maria Lajolo, pela oportunidade de realizar o mestrado junto ao Laboratório de Química e Bioquímica de Alimentos, pela ajuda e conselhos sempre que necessários.

Ao Professor Fernando Moreno pela disponibilidade no uso de seu laboratório.

Aos colegas de trabalho: Adair, Aderuza, Adriana, Amanda, Ana Cristina, Ana Paula, Andréia, Eliana, Fernanda, Gisseli, Gracielli, Grazieli, João Paulo,

Lena, Márcia, Milana, Neuza, Ricardo, Rosecler e Tânia pela amizade, apoio, paciência e tolerância.

Agradeço ainda, o carinho e paciência de duas pessoas que foram muito importantes: Jana e Malu. Se hoje este trabalho existe devo a vocês.

Aos iniciantes (Claudia, Claudinéia, Lucile, Patrícia, Roberta, Selma) e aos estagiários que deixo ao encerrar o mestrado, meus sinceros votos de sucesso nesta caminhada sempre na busca do ideal pela Ciência e pelo conhecimento.

À Lúcia Helena, Márcia Moraes e Alberto Bernal, pelo suporte técnico, grande amizade e dedicação, sem os quais meu trabalho não teria o mesmo tempero.

Aos funcionários Edison, Tânia e Mônica, da Secretaria do Departamento, Jorge, Elaine e Majô, da Secretaria da Pós-Graduação, a Joana e Lurdinha, pela, ajuda, carinho e atenção.

À bibliotecária Leila, pela correção das referências bibliográficas e afeto.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudo e a FAPESP, pelo auxílio financeiro e crédito neste trabalho.

Aos porteiros da faculdade, pela proteção, segurança e amizade.

A todos que não concordam comigo, se me opõem, não me apóiam e, por isso, são meu maior incentivo porque constituem obstáculos e dificuldades a transpor e superar no sentido do meu crescimento.

A todo muito obrigada!!

## *Quanto Mais*

*Quanto mais alto estejas.*

*Mais apto a prestar.*

*De quanto mais disponhas.*

*Mais poder de sentir.*

*Quem possui mais cultura.*

*Pode ensinar melhor.*

*Não recuses doar.*

*Do que tenhas ou sejas.*

*Virtude sem trabalho.*

*Lembra riqueza morta.*

*Recorda: Deus te dá.*

*Para que também dês.*

*(Emmanuel)*

Aos meus amados pais, Myriam e Luiz,  
ao meu irmão Gabriel Luiz e  
aos meus avós  
pelo amor, estímulo, dedicação,  
incentivo, confiança incondicionais em  
todos os momentos.

**DEDICO...**

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
1.1 Amadurecimento de frutos.....	1
1.2 Degradação do amido.....	6
1.2.1 Fosforilases .....	8
1.2.2 Alfa-amilases .....	9
1.2.3 Beta-amilases .....	10
1.2.4 Glicosidases .....	11
1.2.4.1 Alfa 1,6-glicosidases .....	11
1.2.4.2 Alfa 1,4-glicosidases .....	12
1.2.4.2.1 Propriedades moleculares e especificidade ao substrato de alfa-glicosidases purificadas de plantas .....	15
<b>2. OBJETIVO.....</b>	<b>24</b>
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>25</b>
3.1 Material.....	25
3.2 Métodos.....	27
3.2.1 Medidas dos gases: carbônico (CO <sub>2</sub> ) e etileno (C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> ).....	27
3.2.2 Determinação de amido e proteína solúvel.....	28
3.2.3 Determinação de açúcares solúveis.....	28
3.2.4 Extração de proteína.....	29
3.2.5 Atividade enzimática.....	29
3.2.6 Extração de RNA total .....	30
3.2.7 Obtenção de DNA completar (cDNA) .....	31
3.2.8 Planejamento dos <i>primers</i> .....	31
3.2.9 Reação de cadeia de polimerase (PCR).....	33
3.2.10 Eletroforese de DNA em gel de agarose e purificação de bandas resultantes.....	34
3.2.11 Clonagem e transformação de bactérias .....	34
3.2.12 Mini-preparação de DNA plasmidial e seqüenciamento .....	35
3.2.13 <i>Northern Blot</i> .....	36

3.2.14 Obtenção da seqüência de cDNA de $\alpha$ -glicosidase.....	37
3.2.14.1 Varredura da biblioteca de cDNA ( <i>Screening</i> ) .....	37
3.2.14.1.1 Varredura da biblioteca em meio líquido.....	37
3.2.14.1.2 Varredura da biblioteca em meio sólido.....	40
3.2.14.2 Race ( <i>Rapid Amplification of cDNA Ends</i> ) .....	41
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>44</b>
4.1 Caracterização da amostra .....	44
4.2 Perfis da atividade enzimática .....	47
4.2.1 Alfa (1,4)-glicosidase neutra .....	47
4.2.2 Alfa (1,4)-glicosidase ácida.....	50
4.3 Amplificação, clonagem e seqüenciamento do gene da alfa (1,4)-glicosidase neutra .....	54
4.3.1 Amplificação por reação em cadeia da polimerase (PCR).....	54
4.3.2 Clonagem .....	56
4.3.3 RACE ( <i>Rapid Amplification cDNA Ends</i> ) .....	59
4.3.4 Varredura da biblioteca de cDNA ( <i>Screening</i> ) .....	60
4.4 Análise de transcrito da alfa 1,4-glicosidase durante o amadurecimento de bananas.....	61
4.4.1 <i>Northern Blot</i> .....	61
<b>5. CONCLUSÕES .....</b>	<b>63</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>64</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Representação esquemática do metabolismo amido-sacarose em amiloplasto	7
<b>Figura 2:</b> Substratos típicos para $\alpha$ -glicosidase	14
<b>Figura 3:</b> Alinhamento de múltiplas seqüências de glicosídeo hidrolases da família 31	22
<b>Figura 4:</b> Plano amostral elaborado para a coleta e estocagem de amostras de banana cv. Nanicão da região de Minas Gerais	26
<b>Figura 5:</b> Seqüência de aminoácidos de $\alpha$ -glicosidase utilizados para o planejamento dos <i>primers</i>	32
<b>Figura 6:</b> Placa de microtitulação com combinações de poços de linhas e de colunas utilizada em varredura em biblioteca de cDNA	39
<b>Figura 7:</b> Fluxograma da técnica RACE	42
<b>Figura 8:</b> Medidas de respiração e etileno de bananas controle e tratadas com 100 ppm de etileno durante o amadurecimento	45
<b>Figura 9:</b> Teores de amido, glicose, frutose e sacarose de bananas controle e tratadas com 100 ppm de etileno durante o amadurecimento	46
<b>Figura 10:</b> Atividade específica da isoforma neutra da $\alpha$ -(1,4) glicosidase em frutos controle e tratados (etileno 100 ppm) durante o amadurecimento da banana	48
<b>Figura 11:</b> Atividade específica da isoforma neutra da $\alpha$ -(1,4) glicosidase e perfil de etileno em frutos controle e tratados (etileno 100 ppm) durante o amadurecimento da banana	49
<b>Figura 12:</b> Atividade específica da isoforma ácida da $\alpha$ -(1,4) glicosidase em frutos controle e tratados (etileno 100 ppm) durante o amadurecimento da banana	52
<b>Figura 13:</b> Atividade específica da isoforma ácida da $\alpha$ -(1,4) glicosidase e perfil de etileno em frutos controle e tratados (etileno 100 ppm) durante o amadurecimento da banana	53

<b>Figura 14:</b> Eletroforese em gel de agarose (1,0%) de produtos de PCR (em pares de bases) das combinações de <i>primers</i> Sentido e Reverso com base nas seqüências de $\alpha$ -glicosidases de cevada, beterraba e arroz depositadas no GenBank .....	55
<b>Figura 15:</b> Eletroforese em gel de agarose (1,0%) de produtos amplificados por PCR de um fragmento de $\alpha$ -glicosidase a partir de cDNA de polpa de bananas maduras.....	56
<b>Figura 16:</b> Seqüência deduzida de aminoácidos para o fragmento da MaAgli .....	57
<b>Figura 17:</b> Alinhamento da seqüência de aminoácidos deduzida a partir do fragmento de $\alpha$ -glicosidase obtido por amplificação a partir de cDNAs sintetizados a partir de RNA total de tecido da polpa de banana.....	58
<b>Figura 18:</b> Autoradiografias dos mRNAs hibridizados com sonda de $\alpha$ -glicosidase (A) e do RNA ribossomal 18S (B) das amostras de polpa de bananas controle e tratadas com etileno em pontos variados do amadurecimento dos frutos.....	62

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Propriedades moleculares e especificidade ao substrato de $\alpha$ -glicosidases purificadas de plantas.....	17
<b>Tabela 2:</b> Relação de <i>primers</i> utilizados em PCR para amplificação de insertos de $\alpha$ -glicosidase .....	33
<b>Tabela 3:</b> Seqüência de bases de <i>primers</i> utilizados na técnica RACE.....	43

## ABREVIATURAS E SIGLAS

ABTS	2,2'-azino-di-(3-etilbenzotiazolina)-6-sulfonato
ADP	5'-difosfato de adenosina
AIA	ácido indol acético
ATP	adenosina 5'-trifosfato
BSA	albumina sérica bovina
cDNA	DNA complementar
CEAGESP	Companhia de Entrepósitos e Armazéns Gerais do Estado de São Paulo
DNA	ácido desoxiribonucléico
dNTP	2'-desoxinucleotídeo 5'-fosfato
dpc	dias pós-colheita
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
Frutose-6-P	frutose-6-fosfato
FID	detector de ionização de chama
Glicose-1-P	glicose-1-fosfato
Glicose-6-P	glicose-6-fosfato
HEPES	ácido N-[2-hidroxi-etil]-piperazina-N'-[2-ethanosulfônico]
HPLC	cromatografia líquida de alto desempenho
IPTG	isopropil tiogalactopiranosídeo
Kb	Quilobase
kDa	quilo Dalton
LB	Lúria-Bertani
mRNA	RNA mensageiro
N <sub>2</sub>	Nitrogênio líquido
NaCl	cloreto de sódio
O.D.	densidade óptica
pb	pares de bases
pfu	unidades formadoras de colônia
PPi	Pirofosfato

ppm	parte por milhão
PVP-40	polivinilpirrolidona 40.000
RNA	ácido ribonucléico
SDS	lauril sulfato de sódio
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TCD	Detector de condutividade
TE	Tris-EDTA
TPE	Tris-fosfato-EDTA
TRIS	2-amino-2-(hidroximetil)-1,3-propanodiol
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil galactopiranosídeo
2-ME	2-mercaptoetanol

## RESUMO

Dependendo da cultivar, a banana acumula entre 15 e 22% de amido de reserva, durante o desenvolvimento. Este amido é degradado durante o amadurecimento, com a síntese e acúmulo concomitantes de 12 a 20% de açúcares solúveis. Dentre as várias mudanças que a banana sofre durante o amadurecimento, esta é uma das mais complexas e ainda muito pouco conhecida. Dentre as várias enzimas possivelmente relacionadas à degradação do amido, foi detectada a atividade da  $\alpha$ -(1,4) glicosidase em extratos de polpa de banana em amadurecimento. Neste trabalho, estudou-se a atividade da  $\alpha$ -(1,4) glicosidase, a clonagem do seu gene e a transcrição do respectivo mRNA da  $\alpha$ -(1,4) durante o amadurecimento da banana tratada ou não com 100 ppm de etileno. Ambas as isoformas, neutra e ácida, tiveram perfis de atividade paralela à degradação do amido, compatível com uma possível atuação sobre compostos derivados da degradação do amido. Já que nenhuma das isoformas atua sobre a maltose, parece não tratar-se de uma maltase típica. Além disso, o seqüenciamento de parte do gene da isoforma neutra mostrou alta homologia com glicosidases de outros vegetais, confirmando a sua identidade. Em amostras de banana não tratadas foi observada um aumento no nível de transcrito de  $\alpha$ -glicosidase neutra, contudo, com alterações no perfil de atividade. Quando as amostras de banana foram tratadas com 100 ppm de etileno, foi observado um aumento nos níveis de transcrito de  $\alpha$ -glicosidase constante durante todo o amadurecimento.

## ABSTRACT

Banana fruit accumulates between 15 and 22% of reserve starch, during development, depending on the cultivar. The starch is degraded during banana ripening, in concomitance with soluble sugars accumulation (12-20%). Among the changes that banana fruit suffers during ripening, this is one of most complex and still very little known. Alpha-(1,4) glucosidase activity was already detected before in banana pulp extracts. Here we report the study of the  $\alpha$ -(1,4) glucosidase activity, the clone of its gene and the transcription of respective mRNA of  $\alpha$ -(1,4) during the banana (treated or not with 100 ppm of ethylene) ripening. Both isoformas, neutral and acid, had an increase in activity concomitant with starch degradation. Since both forms do not act on maltose, it is possible that they utilize oligossacharides derived from starch degradation as substrate. Moreover, a partial cDNA sequence of neutral isoform, showed high similarity with glucosidases of other vegetables. Bananas samples treated with 100 ppm of ethylene, showed an increase in the constant transcript levels of  $\alpha$ -(1,4) glucosidase during all the ripening.

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Amadurecimento de frutos

O uso da filogenia fundamentada na biologia molecular, tem revelado momentos na evolução das formas e na bioquímica dos frutos que podem ser utilizados para informar a manipulação de espécies comerciais (KNAPP, 2002). O conhecimento da identidade e a função de genes genéricos que regulam o amadurecimento podem permitir meios para a manipulação do amadurecimento, qualidade e durabilidade dos frutos (MOORE e col., 2002; SEYMOUR e col., 2002). Os frutos frescos são colhidos no estágio de maturação fisiológica, no pré-climatério, o mesmo continuará a sua ontogenia, mesmo que destacado da planta mãe, amadurecendo após a colheita (WHITE, 2002).

As transformações ocorridas no amadurecimento dos frutos, etapa final do estágio de maturação, envolvem uma multiplicidade de vias bioquímicas que afetam toda a estrutura celular, evidenciando que se trata de um processo dinâmico e altamente coordenado. As alterações mais perceptíveis são referentes à textura, cor, sabor e aroma dos frutos que os tornam aptos ao consumo. Vários hormônios estão envolvidos na iniciação e regulação do amadurecimento, ocasionando um aumento nos níveis de mRNAs específicos e síntese *de novo* de proteínas que caracterizam as transformações nesse estágio (SEYMOUR, 1993).

Qualquer etapa do desenvolvimento das plantas, assim como o amadurecimento, está sob controle hormonal. As auxinas, giberelinas e citocininas geralmente atuam retardando o amadurecimento, enquanto o etileno e o ácido abscísico aceleram o processo.

A evidência da ação hormonal no controle do amadurecimento é percebida pelo fato de que frutos ligados à planta-mãe amadurecem de forma mais lenta que aqueles amadurecidos fora da planta (ABELES; MORGAN; SALTVEIT, 1992; SEYMOUR, 1993; CORDENUNSI; LAJOLO, 1995). Cordenunsi e Lajolo (1995) observaram que, bananas ligadas à planta-mãe demoraram mais para amadurecer e as mudanças nas atividades de duas enzimas fundamentais para o metabolismo da sacarose, a sacarose sintase e a sacarose fosfato sintase, ocorreram mais lentamente, alcançando no caso desta última, apenas 50% do valor máximo obtido em frutos amadurecidos após a colheita. A razão mais provável é que haja alguma relação destes eventos com a veiculação de fitohormônios para o fruto, os quais atuariam como inibidores do amadurecimento.

Por sua vez, é a presença de etileno que parece determinar as alterações fisiológicas mais importantes durante o amadurecimento dos frutos, tanto é que esse fitoregulador endógeno é considerado o "hormônio do amadurecimento". É uma molécula orgânica simples ( $C_2H_4$ ) com atividade biológica importante em concentrações muito reduzidas (AWAD, 1993). Este processo depende, em parte, do aumento da sensibilidade ou da diminuição da resistência do fruto à ação de etileno e também do desaparecimento, ou inativação, de alguns fitoreguladores (DAVIES, 1995). O etileno é produzido pela maioria dos tecidos vegetais em níveis relativamente baixos, algo em torno de  $0,05 \mu L$  por quilograma por hora de fruto, em base fresca e atua numa 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 (TUCKER, 1993).

Biale e Young (1962) verificaram mudanças significativas entre as espécies e dividiram os frutos em dois grandes grupos: climatéricos (abacate, ameixa, azeitona,

banana, caqui, cherimoya, figo, manga, maçã, pêra, pêssego e tomate) e não-climatéricos (abacaxi, abobrinha, berinjela, cereja, caju, carambola, citros, morango e uva). Tal classificação baseou-se no padrão respiratório e na produção de etileno que antecede o amadurecimento. Desta maneira, os climatéricos apresentam um pico de respiração após atingirem a maturidade fisiológica e também possuem uma elevação na produção de etileno, que precede o incremento respiratório. Por sua vez os não-climatéricos, não apresentam um aumento brusco nos níveis de CO<sub>2</sub> provenientes da respiração e também não produzem uma quantidade elevada de etileno. Contudo, o etileno, mesmo em um nível basal, atua na regulação do metabolismo desses frutos (ABELES; MORGAN; SALTVEIT, 1992).

Além do etileno, os inibidores naturais, auxinas, giberelinas e citocininas, também parecem estar envolvidos nas transformações decorrentes do amadurecimento podendo representar fatores de “juvenildade” dos frutos (AWAD, 1993).

O ácido indol-3-acético (AIA) tem sido reconhecido como a principal auxina encontrada nas plantas, sendo sintetizada em folhas jovens e sementes. Davies (1995) relatou que, dentre outros efeitos, o AIA pode influenciar no amadurecimento de frutos. Ele é capaz de retardar algumas transformações como amolecimento, climatério respiratório, degradação de clorofila da casca, formação de antocianinas, degradação do amido, síntese de sacarose em frutos de abacate, banana, pêra e uva (TINGWA; YOUNG, 1975; VENDRELL, 1969; FRENKEL; DYCK, 1973; DAVIES; BOSS; ROBINSON, 1997; PURGATTO e col., 2001).

As giberelinas também atuam como reguladores hormonais do amadurecimento, não existindo, contudo, uma relação positiva generalizada entre o conteúdo de giberelinas das sementes e o crescimento dos frutos (AWAD, 1993). Elas são encontradas

principalmente em sementes, porém Gillaspy, Hilla e Gruissem (1993) e Rossetto (2001) verificaram que frutos partenocárpicos (sem semente) continham uma quantidade maior de giberelinas, apresentando textura mais firme e maior teor de sólidos solúveis, quando comparados a frutos com semente.

A banana é um fruto climatérico desenvolvido por partenocarpia, tem seu metabolismo influenciado pela presença de etileno e apresenta um pico de respiração, descrito como climatérico respiratório, a partir do qual grande parte dos eventos relativos ao amadurecimento se processa (ABELES; MORGAN; SALTVEIT, 1992). O climatério, que é parte do processo de desenvolvimento deste fruto, é caracterizado pelo aumento dos teores de etileno e CO<sub>2</sub>. O aumento do CO<sub>2</sub>, observado para a banana, é de cerca de 4 a 10 vezes, concomitante ao aumento na produção de etileno (VENDRELL, 1970). Dentre as alterações que o etileno influencia durante o amadurecimento, o metabolismo de carboidratos tem especial destaque, por ser um importante atributo de qualidade pós-colheita.

Os carboidratos presentes nos frutos constituem-se, normalmente, no grupo mais abundante de compostos, após a água. Eles provêm da translocação de sacarose produzida nas folhas pela fotossíntese e são armazenados na forma de amido (polímeros de alto peso molecular), ou açúcares solúveis (baixo peso molecular), que podem ser rapidamente metabolizados conforme a demanda energética da planta. Esse processo é mediado pela ação sincronizada de várias enzimas, que são transcritas e/ou ativadas em momentos específicos do ciclo de vida da planta. Através da ação das enzimas sacarose sintase e invertase, a sacarose é fonte de glicose e frutose que são transportadas do citosol ao interior dos amiloplastos, servindo de substrato para, entre outras, as enzimas de síntese de amido (amido-sintases e enzimas ramificadoras), num processo

dependente de ATP. Durante o amadurecimento, o amido acumulado pode ser mobilizado através de enzimas fosforolíticas (amido-fosforilases) e hidrolíticas (amilases, glicosidases e enzimas desramificadoras) liberando resíduos de glicose, que podem ser interconvertidos em frutose e utilizados na síntese de sacarose, pela ação da sacarose fosfato sintase, ou podem ser distribuídos entre as diferentes vias catabólicas presentes no amadurecimento como a respiração, via glicolítica e via das pentoses-fosfato (ZEEMAN; SMITH; SMITH, 2004)

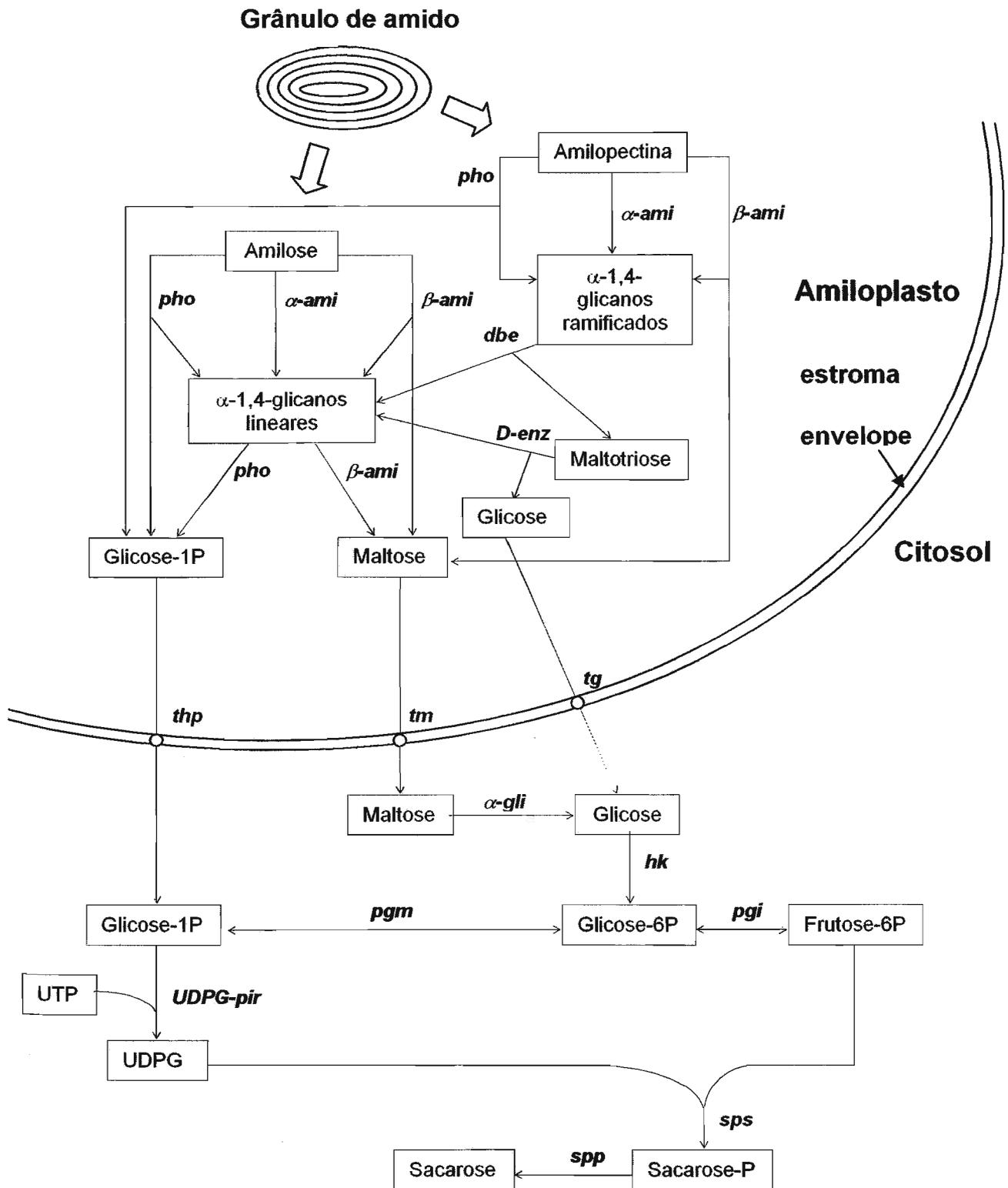
A banana tem sido um bom modelo para o estudo de enzimas do metabolismo amido-sacarose pelo alto teor de amido encontrado no fruto imaturo (12-20% do peso fresco da polpa). No período de amadurecimento, o nível de amido declina até menos que 1% em algumas cultivares, concomitante ao acúmulo de açúcares que aumenta de um total de 1 a 2% nos frutos imaturos, para 10-20% no fruto maduro, variação dependente da cultivar (MOTA; LAJOLO; CORDENUNSI, 1997).

A hidrólise do amido é acelerada logo após o pico de produção de etileno sendo paralela ao pico respiratório (CORDENUNSI; LAJOLO, 1995; SIVAK; PREISS, 1998). Já foram identificadas em banana as enzimas:  $\alpha$ -amilase (GARCIA; LAJOLO, 1988; BASSINELLO; CORDENUNSI; LAJOLO, 2002),  $\beta$ -amilase (GARCIA; LAJOLO, 1988; MEDINA-SUÁREZ e col., 1997),  $\alpha$ -(1,4) e  $\alpha$ -(1,6) glicosidases (GARCIA; LAJOLO, 1988; KONISHI e col., 1991), amido-fosforilases (MOTA, 2001), sacarose sintase e sacarose fosfato sintase (CORDENUNSI; LAJOLO, 1995; NASCIMENTO; CORDENUNSI; LAJOLO, 1997; NASCIMENTO; CORDENUNSI; LAJOLO, 2000). Conjuntamente, Purgatto e col. (2001), Mota e col. (2002), Rossetto e col. (2003), Rossetto, Lajolo e Cordenunsi (2004) verificaram a influência das auxinas e giberelinas na expressão e atividade de algumas dessas enzimas no metabolismo amido-sacarose de bananas.

## 1.2 Degradação do amido

São várias as enzimas, que podem contribuir para a degradação do amido (Figura 1). Elas têm sido descritas e suas atividades detectadas em diversos tecidos vegetais, contudo a maneira pela qual a atividade destas enzimas é coordenada para converter o amido em maltooligossacarídeos, ainda não foi compreendida (SIVAK; PREISS, 1998). Além disso, a degradação do amido depende também da estrutura do grânulo, do tipo de cristalinidade encontrada, do teor de amilose, da presença de poros na superfície do grânulo de amido e da presença de lípidos e proteínas.

As enzimas fosforolíticas e hidrolíticas, de ambas as vias de degradação, vêm sendo pesquisadas e identificadas em bananas e podem, em teoria, atuar sincronizadamente na degradação total do amido. Dentre elas se destacam as amido-fosforilases, as amilases, as  $\alpha$ -(1,4) glicosidases e as  $\alpha$ -(1,6) glicosidases, atualmente denominadas enzimas desramificadoras (BIERHALS e col., 2004).



**Figura 1.** Representação esquemática do metabolismo amido-sacarose em amiloplasto. As principais enzimas envolvidas estão representadas pelas seguintes abreviações:  $\alpha$ -amilase ( $\alpha$ -ami),  $\beta$ -amilase ( $\beta$ -ami), amido fosforilase (pho), desramificadora (dbe),  $\alpha$ -glicosidase ( $\alpha$ -gli), D-enzima (D-enz), glucano água diquinase (dk), hexoquinase (hk), fosfoglicomutase (pgm), fosfoglicose isomerase (pgi), UDPG pirofosforilase (udpg-pir), sacarose fosfato sintase (sps), sacarose fosfato fosfatase (spp). Os transportadores de hexose-P (thp), maltose (tm) e de glicose (tg) estão indicados pelos círculos.

### 1.2.1 Fosforilases

As fosforilases (E.C. 2.4.1.1) podem atuar na síntese e na degradação do amido. No sentido de degradação, elas atuam em conjunto com as amilases e glicosidases, sendo, portanto responsáveis pela clivagem fosforolítica do polímero, atuando nas ligações glicosídicas  $\alpha$ -(1,4) das suas extremidades não-redutoras, liberando glicose-1-fosfato. A faixa ótima de pH encontrada para a enzima, tanto em animais como vegetais, situa-se entre 6,0 e 7,0, sendo rapidamente inativada na faixa de pH abaixo de 4,9 (NIGHOJKAR; KUMAR, 1997).

As pesquisas apontam a presença de duas formas das fosforilases, uma citossólica e outra associada ao plastídeo. A forma citossólica ou forma H tem afinidade por glicanos ramificados e de elevado peso molecular (amido, amilopectina, glicogênio), já a forma plastidial ou forma L tem afinidade por glicanos lineares (amilose e maltodextrinas) e baixa afinidade por glicanos de cadeia longas e ramificadas. O peso molecular médio da subunidade é de 105 kDa para a isoforma L e de 90 kDa para a isoforma H (NIGHOJKAR; KUMAR, 1997).

Em bananas, a atividade das fosforilases aumenta antes do início da degradação do amido e decresce durante o período climatérico, não havendo, no entanto, uma variação pronunciada (ARÊAS; LAJOLO, 1981; MOTA e col., 2002). Foram identificadas, purificadas e caracterizadas, em polpa de bananas, as duas formas de fosforilase (MOTA, 2001). Não foi confirmada ainda a participação de amido-fosforilases na degradação do amido durante o amadurecimento da banana.

### 1.2.2 Alfa-amilases

As  $\alpha$ -amilases (E.C. 3.2.1.1) são as endoamilases mais freqüentemente encontradas em tecidos vegetais. Hidrolisam aleatoriamente as ligações  $\alpha$ -(1,4) tanto da amilose quanto da amilopectina, gerando uma mistura de glicose, oligossacarídeos (maltose e maltotriose) e dextrinas. Porém, as  $\alpha$ -amilases não possuem atividade hidrolítica sobre as ligações glicosídicas  $\alpha$ -(1,6) sendo, assim incapazes de atuar nas ramificações da amilopectina. Todas as formas de  $\alpha$ -amilases têm um átomo de  $\text{Ca}^{2+}$  por molécula, o que confere estabilidade e conformação à enzima. O pH ótimo para a atividade de várias  $\alpha$ -amilases de plantas superiores situa-se entre 5,5 e 8,0 (WHITAKER, 1994).

Até o momento, as  $\alpha$ -amilases parecem ter um papel essencial na hidrólise de amido, sendo a enzima responsável pelo ataque inicial aos grânulos nos cereais (IRVING, 1999). As  $\alpha$ -amilases de plantas demonstram capacidade de atacar grânulos de amido intactos, porém, a degradação do amido parece depender do sinergismo entre as  $\alpha$ -(1,4) glicosidases e  $\alpha$ -amilases. Hallet, Wegrzyn e MacRae (1995), observaram que grânulos de amido isolados de kiwi submetido à hidrólise por diferentes misturas de enzimas, mostraram melhores resultados quando a  $\alpha$ -(1,4) glicosidase foi incubada em conjunto com a  $\alpha$ -amilase, comparativamente à hidrólise proporcionada somente pela  $\alpha$ -amilase.

Em bananas, Garcia e Lajolo (1988) detectaram atividade de 3  $\alpha$ -amilases durante o amadurecimento, que apresentaram um sensível aumento de atividade no climatérico. Conforme verificado por Vieira-Jr (2001), a  $\alpha$ -amilase de banana parece ter um peso molecular por volta de 45 kDa, sendo similar à maioria das endoamilases de

outras plantas, com subunidades que variam de 42 a 45 kDa (WITT; SAUTER, 1995). Embora tenha sido detectada a atividade da enzima na polpa da banana, ainda não foram encontradas evidências concretas de que a  $\alpha$ -amilase inicie o processo de degradação do grânulo de amido da banana.

### 1.2.3 Beta-amilases

As  $\beta$ -amilases (E.C. 3.2.1.2) clivam somente a penúltima ligação glicosídica  $\alpha$ -(1,4), da extremidade não-redutora de cadeias lineares de  $\alpha$ -glicanos, liberando moléculas de maltose. São capazes de atuar sobre o amido, em dextrinas de baixo peso molecular e também em maltooligossacarídeos.

Durante o amadurecimento da banana, a  $\beta$ -amilase tem um aumento expressivo de atividade, que se deve, provavelmente, a um estímulo na transcrição de seu gene (PURGATTO e col., 2001; NASCIMENTO e col., 2005). Bananas tratadas com AIA, tiveram um atraso na degradação do amido e no acúmulo de mRNA da  $\beta$ -amilase (PURGATTO e col., 2001).

Não foram apresentadas evidências ainda de que a  $\beta$ -amilase possa atuar sobre o grânulo intacto do amido. Em princípio, haveria necessidade de que uma endo-hidrolase como a  $\alpha$ -amilase, iniciasse a degradação do grânulo nativo. As duas juntas, mais a ação de uma enzima desramificadora, teriam, em teoria, a capacidade de hidrolisar o grânulo de amido a glicose e oligossacarídeos. Pesquisas desenvolvidas por Garcia e Lajolo (1988), Medina-Suárez e col. (1997) e Purgatto e col. (2001), demonstraram que a atividade enzimática e o nível de transcrito de  $\beta$ -amilase aumentaram de forma mais pronunciada que a  $\alpha$ -amilase, indicando a necessidade dessa enzima no processo de

degradação do amido da banana. A  $\beta$ -amilase de banana parece ser um dímero composto de subunidades de 56 kDa e tem um aumento pronunciado de atividade e de expressão durante a fase de degradação do amido (PURGATTO e col., 2001).

## 1.2.4 Glicosidases

### 1.2.4.1 Alfa 1,6-glicosidases

As  $\alpha$ -(1,6) glicosidases, também conhecidas como enzimas desramificadoras, são as únicas capazes de catalisar a quebra das ligações glicosídicas do tipo  $\alpha$ -(1,6) da amilopectina e atuar sobre as dextrinas-limite e oligossacarídeos ramificados produzidos pela ação das demais enzimas do metabolismo do amido.

Segundo Manners (1989) elas podem ser divididas de acordo com a sua especificidade por substrato em: a) pululanases (microorganismo) ou dextrinases limite (vegetais) (E.C. 3.1.2.41), que atuam sobre ligações  $\alpha$ -(1,6) de pululano, amilopectina e suas dextrinas, mas não sobre o glicogênio; e b) as isoamilases (E.C. 3.1.2.68), que clivam ligações  $\alpha$ -(1,6) de amilopectina e glicogênio, porém, não atuam sobre pululano. O pululano é um polímero formado por resíduos de maltotriose unidos por ligações  $\alpha$ -(1,6), existente somente em microrganismos.

As  $\alpha$ -(1,6) glicosidases já foram identificadas em batata, beterraba, espinafre e cereais. Garcia e Lajolo (1988) identificaram a presença da atividade de  $\alpha$ -(1,6) glicosidases na polpa de bananas pela atividade hidrolítica sobre a isomaltose. Através do isolamento do cDNA e de testes de atividade com substratos específicos, foi possível identificar uma enzima desramificadora do tipo isoamilase que está presente durante todo

o amadurecimento da banana (BIERHALS e col., 2004). É provável que estas enzimas desempenhem importante papel na degradação completa do amido em bananas, devido a grande proporção de amilopectina encontrada no amido destes frutos (aprox. 60%, de acordo com MOTA e col., 2000).

#### 1.2.4.2 Alfa 1,4-glicosidases

As  $\alpha$ -glicosidases (E.C. 3.2.1.20) ou  $\alpha$ -D-glicosídeo-glicohidrolases são constituídas por um grupo de glicosídeo-hidrolases de exo-ação, de especificidade diversa, que catalisam a liberação de  $\alpha$ -D-glicose da porção terminal não-redutora de substratos  $\alpha$ -ligados (amilose e amilopectina). As oligo-1,6-glicosidases (E.C. 3.2.1.10) e sacarose-isomaltases (E.C. 3.2.1.48 e E.C. 3.2.1.10) também são classificadas como  $\alpha$ -glicosidases. As glicosídeos-hidrolases em geral, são classificadas em mais de 60 famílias, mas as  $\alpha$ -glicosidases são classificadas nas famílias 31 e 13, contudo, ainda não foram identificadas  $\alpha$ -glicosidases desta última família em plantas.

Alfa-glicosidases de animais, microrganismos e plantas foram purificadas e divididas em três classes: as do **tipo I** hidrolisam substratos heterogêneos, como aril-glicosídeos e sacarose, mais eficientemente que maltose; as do **tipo II** preferem maltose e isomaltose e tem baixa atividade sobre aril-glicosídeos; as do **tipo III** têm a mesma especificidade do tipo II e, em adição, atuam sobre polissacarídeos como amilose e amido (CHIBA, 1997; FRANSEN; SVENSSON, 1998).

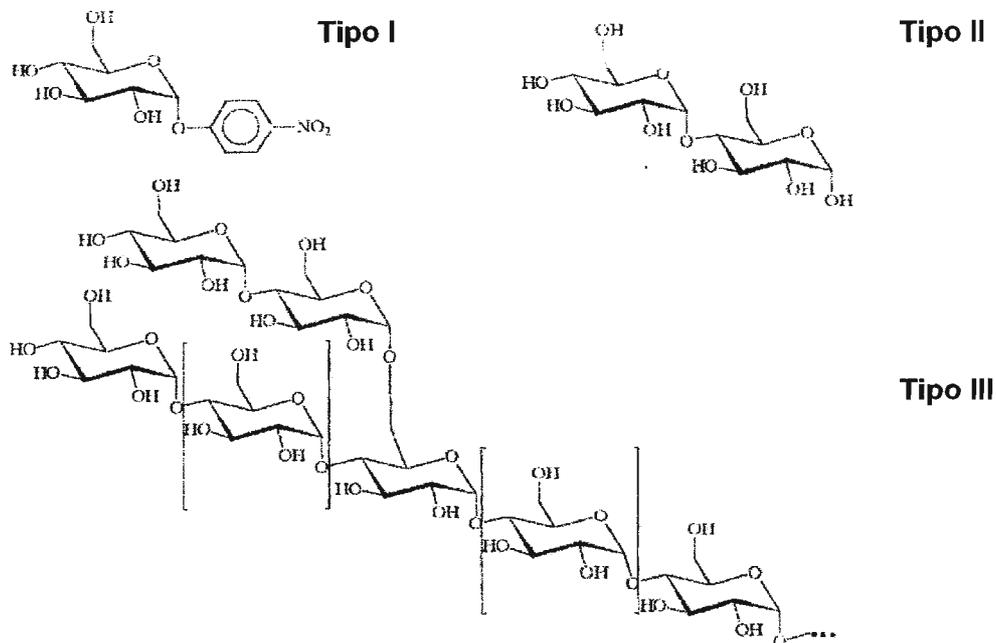
Em plantas as  $\alpha$ -glicosidases hidrolisam primariamente oligossacarídeos produzidos na degradação do amido pela  $\alpha$ -amilase,  $\beta$ -amilase e dextrinase limite, produzindo glicose (MacGREGOR, 1987), fonte de energia para a planta em

desenvolvimento. No entanto, na década de 1990, surgiram alguns trabalhos sugerindo que as  $\alpha$ -glicosidases atuariam diretamente sobre o grânulo de amido (SUN; HENSON, 1990). Foi observada a capacidade destas enzimas atuarem na degradação de grânulos nativos de amido no centeio (SUN; HENSON, 1991) e em sementes de cevada e cloroplasto de ervilha (SISSONS; MacGREGOR, 1994; SUN; HENSON, 1990; SUN; DUKE; HENSON, 1995).

Existem relatos sobre a existência de sinergismo entre a atividade de  $\alpha$ -glicosidase e  $\alpha$ -amilase na hidrólise do amido granular. Hallet, Wegrzyn e MacRae (1995), submeteram grânulos de amido de kiwi à hidrólise *in vitro* por diferentes coquetéis de enzimas e verificaram grande aumento da degradação quando a  $\alpha$ -(1,4) glicosidase era incubada junto com  $\alpha$ -amilase, em comparação com a degradação proporcionada pela  $\alpha$ -amilase isoladamente. A aceleração da degradação do grânulo de amido pela combinação de  $\alpha$ -(1,4) glicosidases e  $\alpha$ -amilases pode ser, em parte, devido à redução da concentração de maltose pela ação da  $\alpha$ -glicosidase (SISSONS; MacGREGOR, 1994; SUN; HENSON, 1990; SUN; DUKE; HENSON, 1995), que acima de determinadas concentrações, pode inibir a  $\alpha$ -amilase (SUN; HENSON, 1991). Em sementes de trigo germinadas na presença de Bay M1099, um inibidor de  $\alpha$ -(1,4) glicosidase, o índice de degradação inicial de amido foi reduzido a 48% e o crescimento de plântulas foi inibido a 89% quando comparado com as plântulas controles. O decréscimo na atividade da  $\alpha$ -glicosidase, também permitiu um acúmulo de maltose na semente (KONISHI e col., 1994).

A maioria das  $\alpha$ -glicosidases de plantas utiliza preferencialmente como substratos a maltose ou  $\alpha$ -(1,4) maltooligossacarídeos maiores pertencendo, portanto, aos tipos II e III (Figura 2). Com excessão de duas  $\alpha$ -glicosidases neutras da polpa de

banana, que foram classificadas como sendo do tipo I, por atuarem preferencialmente sobre o substrato 4-metilumbeliferil- $\alpha$ -D-glicosídeo (KONISHI e col., 2001). A maior parte das  $\alpha$ -glicosidases é capaz de hidrolisar amido solúvel, algumas até em índices comparáveis à hidrólise de maltooligossacarídeos e algumas, em adição, parecem atuar sobre grânulos nativos de amido, uma propriedade usualmente encontrada apenas em  $\alpha$ -amilases (FRANSEN; SVENSSON, 1998).



**Figura 2:** Substratos típicos para  $\alpha$ -glicosidase: **tipo I:** p-nitrofenil- $\alpha$ -D-glicopiranosídeo; **tipo II:** maltose, **tipo III:** parte de amilopectina (m=20-25) (FRANSEN; SVENSSON, 1998).

Foi detectada a atividade de  $\alpha$ -(1,4) e  $\alpha$ -(1,6) glicosidases em todos os estádios do amadurecimento da banana (GARCIA; LAJOLO, 1988). Constatou-se que as atividades aumentaram significativamente no pico climatérico, quando uma grande parte do amido já tinha sido degradado, sugerindo que essas enzimas atuam em moléculas solúveis, tais como maltose e isomaltose, respectivamente. A atividade máxima de

$\alpha$ -amilase precedeu o aumento de atividade da glicosidase. Essa pequena diferença no tempo pode resultar da ação da  $\alpha$ -amilase, que libera produtos que servirão de substrato para as glicosidases e, em teoria, induziriam a sua expressão protéica. A soma das atividades de  $\alpha$ -amilase e glicosidases foi menor que a atividade hidrolítica total, o que sugere que há outras enzimas que participam dessa hidrólise (GARCIA; LAJOLO, 1988).

#### **1.2.4.2.1 Propriedades moleculares e especificidade ao substrato de $\alpha$ -glicosidases purificadas de plantas**

Entre as plantas, a  $\alpha$ -glicosidase foi purificada de arroz (FRANSEN; SVENSSON, 1998), milho (CHIBA; SHIMOMURA, 1975), alfafa (CHIBA e col., 1979), beterraba (CHIBA e col., 1978), ervilha (SUN; DUKE; HENSON, 1995), espinafre (SUGIMOTO; FURUI; SUZUKI, 1995), cevada (FRANSEN; SVENSSON, 1998), tubérculo de *Colocasia esculanta* (HIDEYUKI, 1998), banana (KONISHI; KITASATO; NAKATANI, 1992) e brócoli (MONROE e col., 1999). A enzima foi facilmente purificada de beterraba e de arroz, enquanto houve necessidade de várias etapas de purificação para se obter quantidades pouco expressivas de  $\alpha$ -glicosidase homogênea de cloroplastos de ervilha, cevada e sementes de espinafre.

A maioria das  $\alpha$ -glicosidases de plantas é constituída de proteínas grandes (65 a 150 kDa), com notória exceção de  $\alpha$ -glicosidase de cloroplastos de ervilha, folhas de cebola e polpa de banana, todas com um peso molecular de 40-50 kDa (KONISHI; KITASATO; NAKATANI, 1992; SUN; DUKE; HENSON, 1995; SUZUKI; UCHIDA, 1984). Não há informações sobre as seqüências dessas enzimas, que, provavelmente, pertencem à família 13 das glicosídeo-hidrolases (enzimas amilolíticas), que possuem

peso molecular de 40 a 60 kDa. A  $\alpha$ -glicosidase de malte de cevada, com alto pI e 33 kDa, foi purificada em dois únicos passos (IM; HENSON, 1995). Aplicando um protocolo similar de purificação, foi obtida uma proteína de 33 kDa separada da atividade das  $\alpha$ -glicosidases por filtração em gel e identificada uma  $\alpha$ -glicosidase de alto pI com 92 kDa (Tabela 1) (FRANSEN; SVENSSON, 1998).

Em plantas, as  $\alpha$ -glicosidases ocorrem em múltiplas formas, com diferentes pontos isoelétricos, pesos moleculares e algumas vezes, até pH ótimo (Tabela 1). Ainda são necessárias investigações genéticas e de química de proteínas, para elucidar se essas formas são produtos de diferentes genes, ou se são resultado de modificação pós-tradução.

Grande parte das  $\alpha$ -glicosidases de plantas têm atividade ótima entre pH 4,0 e 5,0, embora existam formas que atuam preferencialmente em pH entre 6,0 e 7,0 (Tabela 1). As  $\alpha$ -(1,4) glicosidases de plantas em geral não requerem íons metálicos para terem atividade (FRANSEN; SVENSSON, 1998).

**Tabela 1:** Propriedades moleculares e especificidade ao substrato de  $\alpha$ -glicosidases purificadas de plantas.

Origem	Tamanho (kDa)	Forma	pH ótimo	Preferência ao substrato	Ref.
Polpa banana <sup>a</sup>	70	AAG	4,5	G5 (130%) <sup>b</sup>	KONISHI; KITASATO; NAKATANI, 1992
	42	NAG I	6,5	4MU $\alpha$ G <sup>c</sup> (430)%	"
	42	NAG II	6,5	4MU $\alpha$ G (360)%	"
Malte cevada	105	pl baixo	5,7	G2	FRANDSEN; SVENSSON, 1998
	92 <sup>a</sup>	pl alto	4,5	G2	"
	67 <sup>a</sup>	pl baixo	4,5	G2	IM; HENSON, 1995 SUN; HENSON, 1990
	33 <sup>a</sup>	pl alto	4,0	G2	"
Sem. Alfafa	88		5,0	G8 (870%)	KANAYA e col., 1976
Sem. Milho	65		3,6	G2	CHIBA e col., 1978
Sem. Grama	45	$\alpha$ -Glu I	5,0	G2	FRANDSEN; SVENSSON, 1998
	105	$\alpha$ -Glu II-1	5,0	G2	"
	65	$\alpha$ -Glu II-2	5,0	G2	"
Uva <sup>a</sup>	100		5,1	G2	"
Clorop. Ervilha	49	homodímero	7,0	Nigerose (170%)	SUN; DUKE; HENSON, 1995
Sem. ervilha <sup>a</sup>	125	$\alpha$ -G 1	4,5	G2	FRANDSEN; SVENSSON, 1998
	150	$\alpha$ -G 2	5,5	G2	"
	110	$\alpha$ -G 3	7,0	G2	"
Tub. batata <sup>a</sup>	120		6,5-7,0	pNPG (n.d.)	"
Sem. Arroz	100	I	4,3	G6 (400%)	"
	100	II	4,0	G6 (250%)	"
Calo de soja	70	I	4,5	G3 (140%)	"
	150	II	4,5	G4 (150%)	"
Sem. Espinafre	78	I	4,5-5,5	G5 (390%)	SUGIMOTO; FURUI; SUZUKI, 1995
	78	II	4,5-5,5	G5 (390%)	"
	82	III	4,5-5,0	G3 (150%)	"
	82	IV	4,5-5,0	G3 (130%)	"
Sem. Beterraba	91		4,2	G7 (2470%)	FRANDSEN; SVENSSON, 1998
	98	I	5,0	G2	CHIBA e col., 1978
	60	II	4,5	G2	"
Folhas cebola	40	I	5,0	G2	FRANDSEN; SVENSSON, 1998
	41	II	5,0	G2	"
	49	III	5,0	G2	"

<sup>a</sup>Parcialmente purificada; <sup>b</sup>Entre parênteses: atividade do substrato preferencial comparado com a maltose; <sup>c</sup>4-metilumbeliferil- $\alpha$ -D-glicosídeo; n.d. não determinado; AAG alfa-glicosidase ácida; NAG I alfa-glicosidase neutra isoforma I; NAG II alfa-glicosidase neutra isoforma II; G2 maltose, G3 triose, G4 maltotriose, G5 maltopentose, G6 maltohexose, G7 maltoheptose.

Baseando-se em seu pH ótimo, as  $\alpha$ -(1,4) glicosidases podem ser classificadas em  $\alpha$ -glicosidases ácidas (AAG) e  $\alpha$ -glicosidases neutras (NAG). Uma AAG e duas isoformas de NAG, com pH ótimo de atividade de 4,5 e 6,5 e peso molecular de 70 kDa e 42 kDa, respectivamente, foram parcialmente purificadas e caracterizadas de banana pré-climatérica (KONISHI; KITASATO; NAKATANI, 1992). A forma ácida apresentou atividade maltásica típica, como observado na maioria das plantas, enquanto a forma neutra parece ser pouco importante para o metabolismo do amido, devido a sua deficiência de atividade maltásica. A classificação de  $\alpha$ -(1,4) glicosidases como sendo do tipo II (CHIBA, 1997), pressupõe que a enzima seja capaz de hidrolisar isomaltose. Controversamente, apesar da isoforma encontrada na banana por Konishi, Kitasato e Nakatani (1992) não hidrolisar isomaltose, trealose e sacarose, ela foi classificada como sendo do tipo II.

A  $\alpha$ -glicosidase ácida de banana é, provavelmente, uma glicoproteína devido a sua capacidade de ligação à Concanavalina-A, porém, não há informações acerca de que tipo de carboidratos estão ligados à proteína, nem suas posições na molécula (KONISHI; KITASATO; NAKATANI, 1992).

Aparentemente, as isoformas de AAG e NAG de banana e seus pontos isoelétricos mudam durante o amadurecimento da fruta (KONISHI e col., 1991). A AAG e NAG de banana verde tiveram pI maiores que 7,4, enquanto que nas isoformas de banana madura o pI era de 5,0. Resultados similares foram obtidos com bananas verdes após 24 horas do final do tratamento com etileno (0 e 1º dia de armazenamento).

Konishi e col. (2001) purificaram as formas solúvel (70 kDa) e ligada (90 kDa) da  $\alpha$ -(1,4) glicosidase ácida, em polpa de bananas pré e pós-climatéricas. Os dados relativos a  $\alpha$ -(1,4) glicosidase ácida de banana sugerem que a isoforma tem papel importante no processo de degradação do amido.

As formas de  $\alpha$ -(1,4) glicosidases ligadas à 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 à ação desta forma de enzima (MONROE e col., 1999). Porém, até o momento, somente uma  $\alpha$ -glicosidase plastidial foi encontrada. Em cloroplastos de plântulas de ervilha, foi encontrada uma  $\alpha$ -glicosidase capaz de hidrolisar maltose e malto-oligossacarídeos com mais de 7 resíduos (BEERS; DUKE; HENSON, 1990). Contudo, nos cloroplastos de *Arabidopsis*, não foram encontradas evidências da presença de  $\alpha$ -glicosidases, e nenhum dos 5 genes relativos a ela codificam seqüências com alguma similaridade com as  $\alpha$ -glicosidases já conhecidas. Assim, para que uma  $\alpha$ -glicosidase seja encontrada no amiloplasto é necessário que possua um peptídeo de trânsito para plastídeos nas seqüências deduzidas de aminoácidos, o que não foi encontrado até o momento. Não tendo sido encontrada formas da  $\alpha$ -glicosidases no amiloplasto e nem peptídeo de trânsito em sua seqüência, é razoável supor que ela esteja localizada no citosol. Corroborando esta suposição, Weise, Weber e Sharkey (2004) demonstraram que no período noturno, a maltose é a principal forma de carbono exportado dos cloroplastos de folhas de espinafre e Niittylä e col. (2004) verificaram em folhas de *Arabidopsis* um transportador para a maltose (MEX1). O conjunto de resultados sugere que as  $\alpha$ -glicosidases estariam no citosol atuando em seu principal substrato, a maltose.

Várias seqüências de  $\alpha$ -glicosidases foram publicadas de beterraba (MATSUI e col., 1997), *Arabidopsis* (MONROE e col., 1997) e espinafre (SUGIMOTO; FURUI; SUZUKI, 1997), e a sua identidade foi deduzida da similaridade com a seqüência de  $\alpha$ -glicosidase previamente caracterizada. As formas apoplásticas de  $\alpha$ -glicosidase com pH ótimo ácido, foram descritas em muitas plantas, porém a função dessas formas é

desconhecida, pois houve falta de substrato aparente no apoplasto (MONROE e col., 1999).

Todos os polipeptídios de  $\alpha$ -glicosidase apresentaram massas moleculares acima de 100 kDa, mas os produtos seqüenciados de quatro genes foram todos sujeitos a modificações pós-tradução, incluindo proteólise e glicosilação, provavelmente na via secretora. Em sementes de cevada, anticorpos contra o clone de  $\alpha$ -glicosidase expressa em *E. coli* reconheceu polipeptídios de 81 e 95 kDa (TIBBOT; HENSON; SKADSEN, 1998). O genoma da cevada mostrou uma única forma do gene que codifica  $\alpha$ -glicosidase, induzido pelo ácido giberélico e dois genes relacionados ou pseudogenes (TIBBOT; SKADSEN, 1996). A clonagem da  $\alpha$ -glicosidase do espinafre também mostrou a presença de um único gene, sugerindo que quatro formas múltiplas de especificidades a substratos diferentes (SUGIMOTO; FURUI; SUZUKI, 1995) aparecem via modificação pós-tradução (SUGIMOTO; FURUI; SUZUKI, 1997). Destas, as  $\alpha$ -glicosidases I e II tem massa molecular de 78 kDa e hidrolisam amido solúvel cerca de 100 vezes mais eficientemente que as  $\alpha$ -glicosidases III e IV de 82 kDa (SUGIMOTO; FURUI; SUZUKI, 1995). Porém, as seqüências de peptídeos de três das formas, foram todas encontradas em uma única seqüência deduzida de cDNA (SUGIMOTO; FURUI; SUZUKI, 1997).

A diferença nas especificidades ao substrato das  $\alpha$ -glicosidases é dependente da sua estrutura. Conforme já foi mencionado anteriormente, as glicosídeos-hidrolases são classificadas em mais de 60 famílias e as  $\alpha$ -glicosidases pertencem às famílias 13 e 31, baseadas em suas seqüências de aminoácidos. Isso fornece informações na estrutura do sítio catalítico e, para muitas enzimas, a estrutura tridimensional (FRANDSEN; SVENSSON, 1998).

A família 31 das glicosídeos-hidrolases atualmente contém  $\alpha$ -glicosidases de sementes de cevada (TIBBOT; SKADSEN, 1996), beterraba (MATSUI e col., 1997), espinafre (SUGIMOTO; FURUI; SUZUKI, 1997), tubérculo de batata (TAYLOR e col., 1998) e *Arabidopsis thaliana*, muitas  $\alpha$ -glicosidases de fungos, sacarose isomaltases ligadas á membranas de mamíferos de  $\alpha$ -glicosidases lisossomais ácidas (FRANSEN; SVENSSON, 1998). Portanto, a maioria das informações sobre a seqüência de aminoácidos é de mamíferos e microrganismos.

As cinco seqüências deduzidas de cDNA clonados de  $\alpha$ -glicosidases de plantas pertencem à família 31 das glicosídeos-hidrolases (FRANSEN; SVENSSON, 1998). A figura 3 mostra um alinhamento que cobre duas regiões de consensos nessa família (regiões 1 e 2) e inclui, além das 5 seqüências das  $\alpha$ -glicosidases de plantas, mais 8 enzimas digestivas de mamíferos e formas ligadas à membrana (sacarose-isomaltase, maltase-glicoamilase, e  $\alpha$ -glicosidases lisossomais), 5  $\alpha$ -glicosidases de fungos, uma  $\alpha$ -glicosidase de *Tetrahymena pyriformis*, e uma provável seqüência de  $\alpha$ -glicosidase do nematodo *Caenorhabditis elegans*. Cada uma das regiões 1 e 2 têm um alto grau de similariedade: 5 resíduos na região 1, e 9 resíduos na região 2 são invariantes, enquanto 21 resíduos são conservados em mais de 50% das 24 seqüências listadas no total.

## Região 1

## Região 2

A.  $\alpha$ -glicosidases de hidrólise de oligossacarídeos

$\alpha$ -glicosidase de alto pl de cevada	428	TIPVDGLWIDMNEISNFY	445	557	MPMIGADICGFNGNTTEELCGRW	594	QILGAFYPF	SRD	HSA
$\alpha$ -glicosidase de baixo pl de cevada					-----WYQAGIWL		PFYR		
$\alpha$ -glicosidase de beterraba	460	ILPIDGIWIDMNEASNFI	477	591	MPMIGADICGF	628	AE	STTEELCCRW	QILGAFYPF
$\alpha$ -glicosidase de espinafre	456	LLPLDGLWIDMNEISNFI	473	587	IPMVGADICGFLGNTTEELCRRW	624	QILGAFYPF	SRD	HSS
$\alpha$ -glicosidase de <i>thaliana</i>	450	ILPLDGLWIDMNEISNFI	467	581	IPMVGADICGF	618	SHD	TTEELCRRW	QILGAFYPF
$\alpha$ -glicosidase de batata	507	STKYLYIWNMNEPSVFN	524	615	IVFSGADVGGFFGNPDKLLV	652	RWYQV	GAYY	PF
isomaltase humana	496	EVQYDGLWIDMNEVSSEFI	514	627	IPLVGADICGFVAETTEELCRRW	664	QILGAFYPF	SRN	H
sacarose humana	1385	KMKFDGLWIDMNEPSSEFV	1402	1523	ISYTGADICGFFNNEYHLCTR	1560	WMLGAFY	PYS	RNH
isomaltase de coelho	496	EVNYDGLWIDMNNVSSFEV	513	627	MPLVGADICGFLAETTEELCRRW	664	QILGAFYPF	SRN	H
sacarose de coelho	1385	YMKFDGLWIDMNEPSSEFV	1402	1523	ISYTGADICGFFNNEYHLCTR	1560	WMLGAFY	P	FARNHN
maltose humana	520	QVEFDGIWIDMNEVSSEFV	537	651	IPMVGADICGFALDTPPEELCRRW	688	QILGAFYPF	SRN	H
glicoamilase humana	1411	SLKFDGMWIDMNEPSSEFV	1428	1549	XSYTGADICGFFQDAEYEMCV	1586	RWMLGAFY	P	SRNH
$\alpha$ -glicosidase lisossomal humana	509	QVPFDGMWIDMNEPSNFI	526	639	VPLVGADVCGFLGNTSEELCVR	676	WMLGAFY	P	FMRNH
$\alpha$ -glicosidase lisossomal de camundongo	509	QVPFDGMWIDMNEPSNFV	526	639	VPLVGADICGFIGDTSEELCVR	676	WMLGAFY	P	FMRNH
provável glicosidase de <i>C. elegans</i>	1271	TLPFDGMWIDMNEPSNFD	1288	1422	VPYVGSIDICGFNGVSNEELCLR	1459	WHLQFGAF	SP	SRDHS
<i>Tetrahymena pyriformis</i>	446	GITPSGFWIDMNEFSNFS	463	564	IPMTGADICGFAQNTTAE	601	LCAR	W	QV
glicoamilase de <i>S. occidentalis</i>	461	LTPFDGIWADMNEVSSEFV	467	661	LPFFGADVCGFNGNSDSEELC	698	SRWML	Q	LS
$\alpha$ -glicosidase de <i>C. tsukubaensis</i>	517	IVDFSGIWLDMNEPSSEFV	534	765	IHLGADICGFNRNSDEELCNR	802	WMLGAF	L	P
$\alpha$ -glicosidase de <i>C. tsukubaensis</i> , subun. P2	215	KVAFDGVWYDMSEVSSEFV	232	417	IPMFGADTCGFFNGNSDEELCNR	454	WML	Q	SA
$\alpha$ -glicosidase de <i>Aspergillus oryzae</i>	483	KLHYDGVWYDMAEVSSEFC	500	638	IPMFGVDTCGFNGNTDEELCNR	720	WML	Q	SA
$\alpha$ -glicosidase de <i>Mucor javanicus</i>	421	MLGVDGLWIDMNEPASFC	438	590	VSYSGADVCGFNSDTTEELCTR	627	WMEI	GAFY	P

## B. Enzimas de processamento de oligossacarídeos ligados a Asparagina

$\alpha$ -glicosidase II de camundongo, a-sub.	555	SAPNLYVWNMNEPSVFN	572	663	LSFCGADVGGFFKNPEPELLV	700	RWYQ	M	GAYQ
$\alpha$ -glicosidase humana	532	SAPNLFVWNMNEPSVFN	549	640	LSFCGADVGGFFKNPEPELLV	677	RWYQ	M	GAYQ
$\alpha$ -glicosidase de <i>cerevisiae</i>	528	DLTNLFVWNMNEPSIEFD	545	637	MPFIGADIAGFAEDPTPELIAR	674	WYQAGL	WY	PF
CONSENSO		dg WiDMnE s F			GaDicGF n eelc RW qlgafyPF RnH				

**Figura 3:** Alinhamento de múltiplas seqüências de glicosídeo hidrolases da família 31, cobrindo as duas regiões de maior consenso (regiões 1 e 2).  $\alpha$ -glicosidase de cevada de alto pl (TIBBOT; SKADSEN, 1996);  $\alpha$ -glicosidase de cevada de baixo pl (FRANDSEN; SVENSSON, 1998);  $\alpha$ -glicosidase de beterraba (MATSUI e col., 1997);  $\alpha$ -glicosidase de espinafre (SUGIMOTO; FURUI; SUZUKI, 1997);  $\alpha$ -glicosidase de *Arabidopsis thaliana* (GenBank AP014806);  $\alpha$ -glicosidase de batata (TAYLOR e col., 1998); sacarose-isomaltase humana (CHANTRET e col., 1992); sacarase-isomaltase de coelho (HUNZILER e col., 1986); maltase-glicoamilase humana (NICHOLS e col., 1997);  $\alpha$ -glicosidase lisossomal humana (HOEFSLOOT, 1988);  $\alpha$ -glicosidase lisossomal de camundongo (GenBank U49351); provável glicosidase de *Caenorhabditis elegans* (GenBank 440800);  $\alpha$ -glicosidase ácida de *Tetrahymena pyriformis* (ALAM e col., 1996);

glicoamilase de *Schwanniomyces occidentalis* (DOHMEN e col., 1990);  $\alpha$ -glicosidase *Candida tsukubaensis* (KINSELLA e col., 1991);  $\alpha$ -glicosidase de *Aspergillus niger*, subunidade P2 (KIMURA e col., 1992);  $\alpha$ -glicosidase de *Aspergillus oryzae* (MINETOKI e col., 1995);  $\alpha$ -glicosidase de *Mucor javanicus* (SUGIMOTO; SUZUKI, 1996);  $\alpha$ -glicosidase II de camundongo (FRANDSEN; SVENSSON, 1998);  $\alpha$ -glicosidase II humana (GenBank D42041); provável glicosidase de *Saccharomyces cerevisiae* (Swiss-Prot P38138). A,  $\alpha$ -glicosidases de hidrolise de oligossacarídeos; B, Enzimas de processamento de oligossacarídeos ligados a Asparagina. Resíduos invariantes são mostrados em negrito.

Os resíduos mais prováveis correspondentes ao sítio catalítico e de ligação ao substrato são encontrados nas regiões 1 e 2. Até o momento, a estrutura tridimensional de membros da família 31 não está disponível (FRANDSEN; SVENSSON, 1998).

Apesar das  $\alpha$ -glicosidases de plantas serem conhecidas há muito tempo e de terem sido purificadas até a homogeneidade a partir de várias plantas, as informações sobre os resíduos do sítio ativo e segmentos que determinam a especificidade ao substrato são limitadas. A determinação das 5 primeiras seqüências tornou capaz a classificação em glicosídeo-hidrolase da família 31, a qual obviamente aumenta a informação em relação a estrutura/função (FRANDSEN; SVENSSON, 1998). Entretanto, a determinação da estrutura tridimensional, acoplada com a análise mutacional é necessária para o conhecimento do mecanismo de ação e especificidades representadas na família 31 das glicosídeos-hidrolases. Para as  $\alpha$ -glicosidases de plantas, em particular, isso pode fornecer informações sobre como elas agem em relação às diferentes enzimas de degradação do amido *in vivo* (FRANDSEN; SVENSSON, 1998).

Dentro desse contexto, o trabalho teve por finalidade, obter informações que auxiliem no entendimento do papel das  $\alpha$ -(1,4) glicosidases no metabolismo do amido durante o amadurecimento da banana, medindo sua atividade e seu nível de transcrito.

## 2. OBJETIVO

O presente trabalho teve por objetivo estudar a atividade enzimática, realizar a clonagem do gene e acompanhar a transcrição do respectivo mRNA da  $\alpha$ -(1,4) glicosidase de banana durante o amadurecimento.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Material

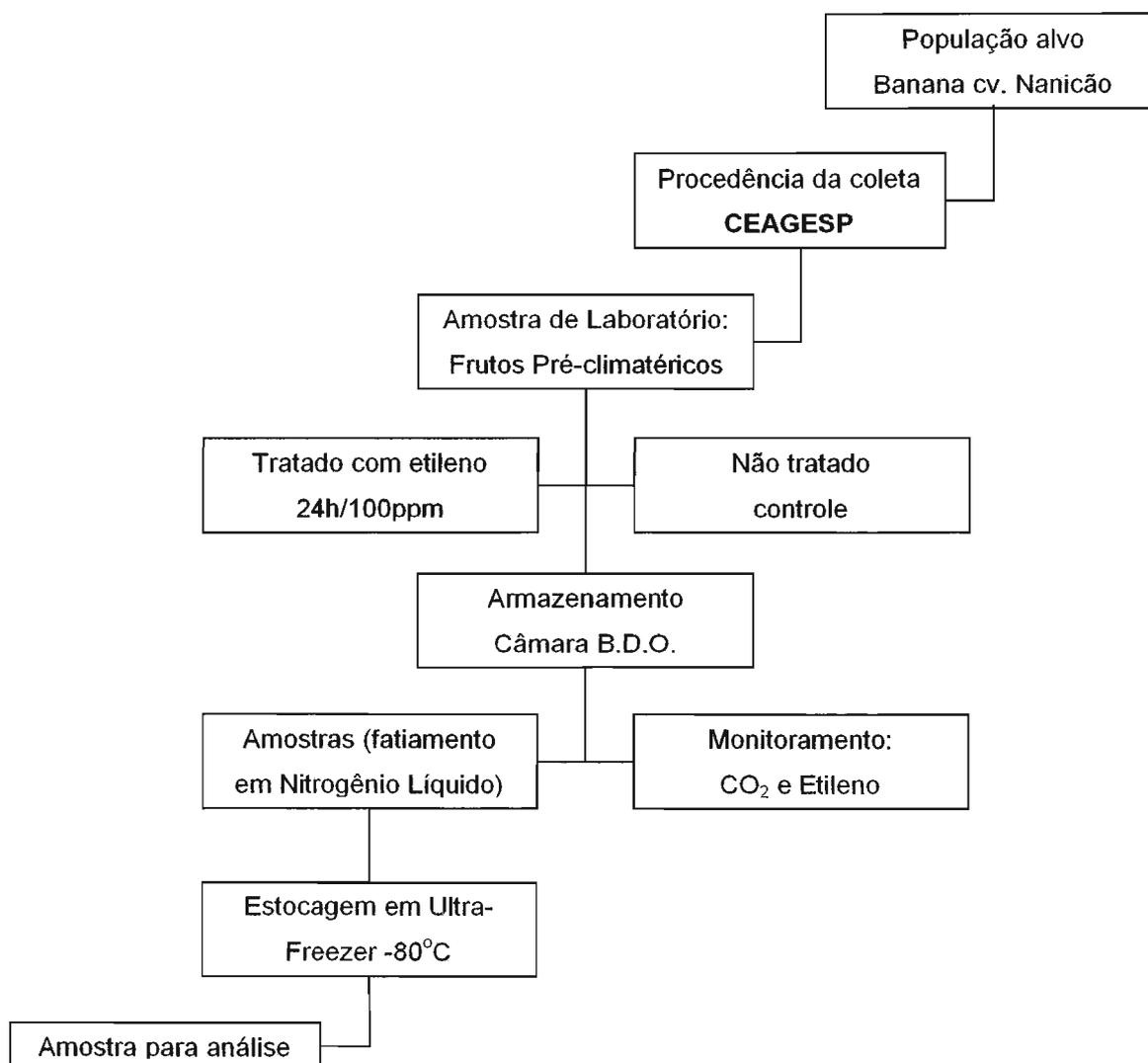
##### Frutos de banana

As bananas (*Musa acuminata*, grupo AAA, subgrupo Cavendish, cultivar Nanicão) com um dia pós-colheita, foram adquiridas no entreposto terminal de São Paulo (CEAGESP - Jaguaré/Bananika), originárias da região de Janaúba (MG). Os frutos pré-climatéricos foram lavados em solução comercial de hipoclorito de sódio a 5% por alguns minutos para diminuir a contaminação superficial. Uma parte dos frutos foi alocada em dessecadores vedados para o tratamento com gás etileno a 100 ppm/24 horas em laboratório, com a finalidade de homogeneizar o amadurecimento. Os frutos controle e os tratados foram armazenados em câmara com temperatura ( $18^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ ) e umidade relativa ( $75\% \pm 5\%$ ) controladas, até o amadurecimento.

Diariamente os frutos foram amostrados, descascados, fatiados e congelados em nitrogênio líquido e armazenados à  $-80^{\circ}\text{C}$  até sua utilização. Frutos visualmente contaminados com fungos foram descartados.

Paralelamente, um conjunto de seis frutos tratados e quatro controles foram aleatoriamente selecionados do lote e mantidos, também em câmara controlada, desde o início até o fim do período de amadurecimento. Esses frutos foram diariamente analisados quanto à produção de  $\text{CO}_2$  e etileno, após um período de 1 hora mantidos em frascos hermeticamente fechados, contendo 2 frutos por frasco, em quadruplicata.

O esquema de amostragem, utilizado para a coleta e armazenamento das amostras de banana é apresentado na Figura 4.



**Figura 4:** Plano amostral elaborado para a coleta e estocagem de amostras de banana cv. Nanicao da região de Minas Gerais.

## 3.2 Métodos

### 3.2.1 Medidas dos gases: carbônico (CO<sub>2</sub>) e etileno (C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>)

Os perfis de respiração dos frutos foram estimados pela produção de CO<sub>2</sub> medida por cromatografia a gás (Hewlett-Packard modelo GC-6890), com detecção por condutividade térmica (TCD). A coluna utilizada foi a HP-Plot Q (30 m, D.I. 0,53 mm). As condições cromatográficas foram: injeção com divisor de amostra (*split*) em taxa 50:1 e temperatura de 250°C; volume de injeção 1 mL; corrida isotérmica a 30°C empregando hélio como gás carreador em fluxo constante de 4 mL/min; temperatura do detector a 250°C utilizando como referência fluxo de hélio a 7 mL/min. A estimativa da quantidade de CO<sub>2</sub> foi feita em relação à injeção de 1 mL de padrão de CO<sub>2</sub> 326 ppm em ar sintético da Air Liquid.

O mesmo equipamento e a mesma coluna cromatográfica foram empregados para a análise dos perfis de etileno, exceção feita ao modo detecção utilizado: ionização de chama (FID). O volume injetado foi de 10 mL utilizando o modo de injeção *pulsed splitless*. 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 foram: corrida isotérmica a 30°C empregando hélio como gás carreador em fluxo de ar e hidrogênio no detector em 450 mL/min e 50 mL/min, respectivamente. A estimativa da quantidade de etileno produzida pelos frutos foi feita em relação à injeção de um padrão de 0,1 ppm de etileno em N<sub>2</sub> da Air Liquid.

As alíquotas do ar produzido após uma hora no interior dos frascos hermeticamente vedados, foram retiradas com o auxílio de seringas *GAS Tigth* apropriadas para a injeção manual dos gases. Os frascos continham, em média, 300g de banana cada. As medidas de CO<sub>2</sub> e etileno foram calculados com base no volume livre do frasco, levando em consideração a massa de banana contida nos frascos e o tempo de respiração. Os valores foram expressos em mg de CO<sub>2</sub>.KgPF<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> e µL de etileno.KgPF<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>, respectivamente, onde PF corresponde ao peso fresco do fruto.

### **3.2.2 Determinação de amido e proteína solúvel**

O teor de amido foi determinado enzimaticamente pelo método otimizado por Arêas e Lajolo (1981), para banana. O amido foi solubilizado com hidróxido de sódio 0,5 N, neutralizado com ácido acético 0,5 N, precipitado com etanol 80% e hidrolisado com amiloglicosidase. A glicose liberada foi determinada através do sistema glicose-oxidase/peroxidase/ABTS (GOD/POD/ABTS), segundo Bergmeyer e Bernt (1974), a 450nm, utilizando glicose como padrão.

A proteína total foi quantificada pelo método descrito por Bradford (1976), a 595nm, usando albumina sérica bovina (BSA) como padrão.

### **3.2.3 Determinação de açúcares solúveis**

Os açúcares solúveis (glicose, frutose e sacarose) foram extraídos com etanol 80% a 80°C por três vezes. Os sobrenadantes foram combinados, o etanol evaporado por sistema a vácuo à 45°C (*speed vac*) e o volume reconstituído com água. Os açúcares

foram estimados por HPLC utilizando-se cromatografia de troca iônica (DIONEX modelo DX-500) detectado por amperometria pulsada (modelo ED-40). A coluna utilizada foi a CARBOPAC PA-1 (4,0 x 250,0 mm) e a fase móvel foi constituída 100% de NaOH 18 mM em fluxo de 1,0 mL/min.

### 3.2.4 Extração de proteína

As amostras congeladas foram trituradas em 5 volumes (m/v) de tampão Hepes-KOH 50 mM pH 7,0 contendo cisteína 20 mM recentemente neutralizada, polivinilpirrolidona 40000 (PVP-40) 1% (m/v),  $\text{CaCl}_2$  1 mM e benzamidina 1 mM. O homogenato resultante foi centrifugado a 4°C por 40 minutos a 10500 xg. O sobrenadante constituiu o extrato enzimático. Quando necessário, conforme será destacado, o extrato foi dialisado ou aplicado em coluna Sephadex G-25 Hytrap (Armesham Biosciences) para dessalinização.

### 3.2.5 Atividade enzimática

A atividade  $\alpha$ -glicosídica foi determinada fluorimetricamente, utilizando-se o 4-metilumbeliferil- $\alpha$ -D-glicosídeo ( $4\text{MU}\alpha\text{G}$ ; Sigma) como substrato sintético e o produto fluorescente 4-metilumbeliferona (4MU) como padrão, de acordo com Konishi e col. (1991). Para o ensaio da isoforma neutra, a mistura de reação (1 mL) era constituída de 100  $\mu\text{L}$  do extrato enzimático, 600  $\mu\text{L}$  de tampão citrato-fosfato de sódio 100 mM pH 6,5 e 300  $\mu\text{L}$  substrato  $4\text{MU}\alpha\text{G}$  330 mM. Após incubação a 30°C por 45 minutos, a reação foi interrompida com a adição de 3 mL de tampão glicina-NaOH 500 mM pH 10,5. O produto

formado (4MU) foi medido fluorimetricamente utilizando comprimentos de onda de excitação de 366 nm e de emissão de 450 nm. Uma unidade de atividade correspondeu à quantidade de enzima que produz 1  $\mu$ mol de 4MU por minuto a 30°C. A concentração foi calculada com base em curva-padrão de 4-metilumbeliferona. Para o ensaio da isoforma ácida, as condições foram as mesmas acima descritas, exceto pelo pH do tampão citrato-fosfato de sódio 100 mM, que era de 4,5.

### **3.2.6 Extração de RNA total**

A extração de RNA total das amostras congeladas foi realizada através da metodologia descrita López-Gómez e Gómez-Lim (1992), com modificações. Amostras com três gramas de polpa de banana foram trituradas em gral de porcelana com nitrogênio e adicionadas de 10 mL de solução extratora (tampão de lise Tris-HCl pH 7,5 150 mM, 2% SDS, 1% 2-ME e EDTA 50 mM). Após homogeneização do material até o descongelamento, com auxílio de gral e pistilo e centrifugação a 12.000 x g por 10 min, foi adicionado ao sobrenadante 0,25 volumes de etanol absoluto e 0,11 volumes de acetato de potássio 5 M, com agitação por 1 minuto. A essa mistura foi adicionado 1 volume de clorofórmio, com agitação por 1 minuto. Após centrifugação a 12.000 x g por 10 min, a fase aquosa (superior) foi recolhida em um tubo limpo, adicionada de 1 volume de fenol/clorofórmio e centrifugada por 10 min a 12.000 x g, novamente separada e extraída com 1 volume de clorofórmio e centrifugada a 12.000 x g por 10 min.

Após centrifugação a 12.000 x g por 10 min, a fase aquosa foi cuidadosamente removida para um tubo de vidro COREX<sup>®</sup> e o RNA foi precipitado por adição de 0,43 volumes de LiCl 10M, mantendo-se o tubo a -20°C por 12 h. O tubo contendo o RNA

precipitado foi centrifugado por 1 h a 12.000 x g, o sobrenadante foi descartado e o RNA precipitado, retomado em 2 mL de tampão TE. Ao RNA solubilizado foram adicionados 3 volumes de etanol e 0,1 volume de acetato de potássio 3M. O tubo foi mantido por 2 h a -20°C, centrifugado por 1 h a 12.000 x g e o precipitado foi retomado em 200 µL de TE. Após quantificação por espectrofotometria, o RNA foi dividido em alíquotas e estocado em ultra-freezer a -80°C.

### 3.2.7 Obtenção de DNA complementar (cDNA)

A primeira fita de cDNA foi sintetizada a partir de 10 µg de RNA total de bananas climatéricas, utilizando a reação com transcriptase reversa e iniciadores oligo dT<sub>(12-18)</sub> através do *Kit Superscript II* da Invitrogen, segundo instruções do fabricante.

### 3.2.8 Planejamento dos *primers*

Os *primers* foram desenhados a partir do alinhamento das seqüências de aminoácidos das  $\alpha$ -glicosidases de espinafre (*Spinacea oleracea* - D86624), cevada (*Hordeum vulgare* - U22450), arroz (*Oryza sativa* cv. japonica - CA754452) e beterraba (*Beta vulgaris* - D89615) como apresentados na Figura 5. As seqüências estão no Genbank e foram alinhados usando o programa CrustalW. Os *primers* sense e reverso foram desenhados levando em consideração as regiões de consenso encontradas entre as seqüências que foram alinhadas e a partir das regiões de consenso construiu-se os *primers* utilizados em PCR para amplificação de insertos de  $\alpha$ -glicosidase relacionados na Tabela 2, com as respectivas temperaturas de hibridização (T<sub>m</sub>).

SoAgli	414	VFLKRNGKPYLGSVWPGPVYFPDFLKPSALTFWTDEIKRFLNLLPVD	GLWIDMNEISNFI
HvAgli	389	I FLKRNGTNEVGNVWPGDVYFPDFMHPRAAEFWAREISLFRRTIPVD	GLWIDMNEISNFY
OsAgli	392	I FLKWNGSNYLGVVWPGNVYFPDFLNPRAAEFWAREIAAFRRTL PVD	GLWVDMNEISNFV
BvAgli	418	VFIKRNGNPYLGSVWPGPVYYPDFLDPAARSFWVDEIKRFRDILPID	GIWIDMNEASNFI
SoAgli	474	SSPPIPGSTLDNPPYKINNSGVMLPIINKTIPPTAMHYGDIPEYNVHNLFGYLEARVTRA	
HvAgli	449	NPEPMN..ALDDPPYRINNDGTGRPINNKTVPASAVHYGGVTEYDAHNLFGLLEARATHR	
OsAgli	452	DPPPLN..AIDDPYRINNSGVRP PINNKTVPASAVHYGGVAEYDAHNLFGFLEARATHD	
BvAgli	478	TSAPTPGSTLDNPPYKINNSGGRVPINSKTI PATAMHYGNVTEYNAHNLYGFLESQATRE	
SoAgli	534	ALIKLTEKRPFVLSRSTFSGSGKYTAHWTGDNAATWNDLVYSIPSMDFGLFGIPMV	GAD
HvAgli	507	ALLRDTGRRPFVLSRSTFVSGGRYTAHWTGDNAATWGDLRYSINTMLS FGLFGMPMI	GAD
OsAgli	510	ALLRDTGRRPFVLSRSTFVSGGRYTAHWTGDNAATWEDLHYSINTMLS FGLFGIPMI	GAD
BvAgli	538	ALVRPATRGPFLLSRSTFAGSGKYTAHWTGDNAARWDDLQYSIPTMLNFGLFGMPMI	GAD
SoAgli	594	ICGFLGNTTEELCRRWIQLGAFYPFSRDHSSLGTTYQELYRWESVAASARKVLGLRYTLL	
HvAgli	567	ICGFNGNTTEELCGRWIQLGAFYPFSRDHSAIFTVRRELYLWPSVAASARKALGLRYQLL	
OsAgli	570	ICGFGGNTTEELCSRWIQLGAFYPFSRDHSAIGTVRRELYLWESVARSAKALGLRYRLL	
BvAgli	598	ICGFAESTTEELCCRWIQLGAFYPFSRDHSARDTTHQELYLWESVAASARTVLGLRYELL	

**Figura 5:** Seqüência de aminoácidos de  $\alpha$ -glicosidase utilizados para o planejamento dos primers. Legenda: **SoAgli:**  $\alpha$ -glicosidase de *Spinacia oleracea* (espinafre); **HvAgli:**  $\alpha$ -glicosidase de *Hordeum vulgare* (cevada); **OsAgli:**  $\alpha$ -glicosidase de *Oryza sativa* (arroz); **BvAgli:**  $\alpha$ -glicosidase de *Beta vulgaris* (beterraba). Verde - primers sentido 10 e 11; Marrom - primers reverso 12; Azul - primers reverso 13 e 14 e Amarelo - primers reverso 15 e 16.

**Tabela 2:** Relação de *primers* utilizados em PCR para amplificação de insertos de  $\alpha$ -glicosidase.

<i>Primer</i>	Seqüência	T <sub>m</sub> (°C)
Sentido 10	5'-GGC CT[C/G] TGG AT[C/T] GA[C/T] ATG AAC GA-3'	60
Sentido 11	5'-GGC CT[C/G] TGG AT[C/T] GA[C/T] ATG AAT GA-3'	58
Reverso 12	5'-GGC GGC [A/G]TT [A/G]TC GCC [A/G]GT CCA-3'	62
Reverso 13	5'-GAA GCC GCA GAT [A/G]TC [A/G]GC GCC-3'	64
Reverso 14	5'-GAA GCC GCA GAT [A/G]TC [A/G]GC CCC-3'	64
Reverso 15	5'-GAA [G/T]GG GTA GAA [A/G]GC GCC-3'	52
Reverso 16	5'-GAA [G/T]GG GTA GAA [A/G]GC CCC-3'	52

### 3.2.9 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

As reações de PCR foram realizadas com uma mistura de reação composta de tampão Tris-HCl (pH 8,3) 10 mM, dNTP 0,25 mM, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, *primer* sense 0,5  $\mu$ M, *primer* reverso 0,5  $\mu$ M, 2,5 U *Taq polimerase*, 0,5  $\mu$ L de DNA molde e água, completando um volume final de reação de 25  $\mu$ L.

As condições do termociclador foram:

**1º passo:** pré-aquecimento a 94°C por 5 min;

**2º passo:** desnaturação a 94°C por 30 s;

**3º passo:** anelamento do *primer* ou hibridização a 50°C-72°C por 30 s;

**4º passo:** extensão ou alongação a 72°C por 90 s;

**5º passo:** incubação a 72°C por 7 min;

**6º passo:** resfriamento a 4°C.

Do 2º passo ao 4º passo o termociclador totalizou de 30 a 35 ciclos. As reações foram otimizadas com relação às temperaturas de hibridização conforme os *primers*

utilizados e tempo de alongação de acordo com o tamanho de fragmento a ser amplificado. O mesmo tempo de anelamento foi utilizado para todas as reações utilizando as diversas combinações de *primers*, ou seja, 30 segundos.

### 3.2.10 Eletroforese de DNA em gel de agarose e purificação de bandas resultantes

Para visualização os produtos de PCR, as amostras foram submetidas a eletroforese em gel de agarose 1,0%, contendo 0,5 µg/mL de brometo de etídio, em tampão TPE e tensão constante de 80 volts por 15-30 min (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989). Foi usado o padrão de peso molecular LowMass (Invitrogen) com fragmentos de 2000, 1200, 800, 400, 200 e 100 pb.

As bandas de interesse, após recortadas, foram purificadas a partir do gel usando o *GFX<sup>TM</sup> PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (Amersham Biosciences) segundo instruções do fabricante.

### 3.2.11 Clonagem e transformação de bactérias

Os produtos de PCR purificados foram ligados em vetor pGEM-T Easy ou em vetor pCR<sup>®</sup>4-TOPO, conforme instruções dos fabricantes.

A ligação em vetor pGEM-T foi feita por meio da T4-DNA ligase, numa reação conduzida a 4°C, durante 16 h. Na seqüência, o vetor contendo o inserto foi utilizado para transformação de células competentes de *Escherichia coli*, seguindo o método do CaCl<sub>2</sub> descrito por Cohen, Chang e Hsu (1972). A 100 µL de células foram adicionados 8 µL de reação de ligação e incubados a 42°C por 50 segundos. A essa suspensão foram

adicionados 100  $\mu$ L de meio LB, que foi mantida a 37°C por 1 h. Em seguida, as células foram transferidas para placas de Petri contendo meio LB-ágar, ampicilina (100  $\mu$ g/mL), 4  $\mu$ L de IPTG (200 mg/mL) e 44  $\mu$ L de X-gal (20 mg/mL) e incubadas durante a noite a 37°C. A identificação das células transformadas com o plasmídeo contendo o fragmento de interesse foi feita pelo crescimento de colônias de coloração branca.

Quando usado o vetor pCR<sup>®</sup>4-TOPO, o produto de PCR foi ligado diretamente ao vetor pela ação de uma topoisomerase associada ao vetor, numa reação à 22°C, durante 5 min. Dois microlitros da reação de ligação foram adicionados em tubos contendo 50  $\mu$ L células competentes de *E. coli* TOP 10 (proveniente do kit), incubados em gelo por 30 min, adicionados de 250  $\mu$ L meio SOC e incubados a 37°C por mais 1 h. Nesse sistema, somente células transformadas crescem em meio LB-ágar contendo ampicilina (100  $\mu$ g/mL).

As colônias de células transformadas obtidas nas placas foram transferidas individualmente para tubos contendo cerca de 50  $\mu$ L de meio LB e ampicilina (100  $\mu$ g/mL) e incubadas por 2 h a 37°C. A seguir, fez-se PCR dessas amostras para verificar a presença dos insertos, com *primers* específicos da glicosidase e *primers* flanqueadores dos vetores (M13 sense e reverso, T7 e SP6).

### 3.2.12 Mini-preparação de DNA plasmidial e seqüenciamento

Em tubos contendo 3 mL de meio LB com 100  $\mu$ g/mL de ampicilina foram adicionados 5  $\mu$ L das colônias positivas (já testadas por PCR), previamente enriquecidas em meio LB com ampicilina, os quais foram incubados durante 16 h a 37°C. A extração e purificação do plasmídeo que continha o fragmento de interesse foram feitas através de

mini-preparação utilizando kit Qiagen. A quantificação do DNA plasmidial foi feita a 260 nm, considerando que 50 µg DNA/mL apresentam uma O.D. de 1,0.

A partir do vetor purificado foi feito o seqüenciamento em seqüenciador automático ALF Express, utilizando *Thermo Sequenase Cy5 Dye Terminator Cycle Sequencing Kit* Amersham Biosciences. A eletroforese foi desenvolvida a 55°C, com potência constante de 25 W e tempo de corrida de 750 min.

### **3.2.13 Northern Blot**

As amostras com 22 µg de RNA total de cada estágio de amadurecimento foram separadas em gel de agarose 1,5% desnaturante em tampão MOPS-NaOH 50 mM pH 7,0 e contendo 2,2 M de formaldeído (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989). As amostras foram primeiramente incubadas para desnaturação a 65°C por 15 minutos, resfriadas em gelo e adicionadas de tampão de corrida contendo MOPS-NaOH, formaldeído e formamida, além de corante (azul de bromofenol) e glicerol. Foi feita a eletroforese a 45 V por cerca de 2h. Após a eletroforese, as amostras de RNA foram transferidas por capilaridade (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989) para membrana de Nylon (Hybond N+, Amersham Biosciences) e nela fixadas por exposição a radiação ultra-violeta (120.000µJ/cm<sup>2</sup>) no UV Crosslinker (Hoefler). A verificação da presença dos RNAs na membrana foi feita com coloração de azul de metileno 0,04% em tampão acetato de sódio 0,5M (pH 5,2) (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989).

Para a hibridização foi utilizada uma sonda de DNA específica de banana, com cerca de 1Kb, obtida por PCR, com os *primers* sense e reverso usada sob condições convencionais de hibridização a 65°C. A marcação da sonda foi feita com  $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP,

conforme *Ready-To-Go DNA Labelling Beads Kit* (Amersham Biosciences) e a reação de hibridização conduzida durante 12h, a 65°C. As lavagens da membrana obedeceram a seguinte ordem: 2x SSC/0,1%SDS, por 15 min (2 vezes); 1x SSC/0,1%SDS, por 15 min e 0,1x SSC/0,1%SDS, por 15 min. A revelação foi feita por auto-radiografia, após 3 dias de exposição da membrana a -80°C.

### **3.2.14 Obtenção da seqüência de cDNA de $\alpha$ -glicosidase**

Para a obtenção do cDNA completo de glicosidase foi utilizada a metodologia de varredura de uma biblioteca de cDNA, construída em vetor *ZAP Express* (fago  $\lambda$ ) através de *ZAP Express cDNA Synthesis Kit* (Stragene) e a metodologia *GeneRacer*.

#### **3.2.14.1 Varredura da biblioteca de cDNA (*Screening*)**

Com base na metodologia descrita por Israel (1993), com modificações, foi feita a varredura da biblioteca de cDNA baseada na reação em cadeia da polimerase (PCR) em duas etapas consecutivas: **varredura em meio líquido e em meio sólido**. Foram feitos sucessivos enriquecimentos do fago que carregava o cDNA da  $\alpha$ -glicosidase de banana, conforme monitorado por PCR, tanto para a seleção em meio líquido quanto para a seleção em meio sólido, como descrito a seguir.

### 3.2.14.1.1 Varredura da biblioteca em meio líquido

Uma suspensão de 200  $\mu\text{L}$  de *Escherichia coli* infectada com 1  $\mu\text{L}$  da biblioteca de cDNA de banana foi diluída para 6,5 mL de meio de cultura LB e distribuída em 64 poços de uma placa de microtitulação, sendo 100  $\mu\text{L}$  em cada poço. A partir de uma alíquota de 10  $\mu\text{L}$  de cada poço foram montadas combinações das alíquotas resultando em *pools* de 8 poços de linhas e 8 de colunas (Figura 6). Uma primeira amplificação foi realizada utilizando iniciadores construídos com base na seqüência de um fragmento de  $\alpha$ -glicosidase isolada no laboratório, com uma alíquota de cada um dos 16 poços mais um controle positivo (fragmento  $\alpha$ -1,4 glicosidase de banana com 486 pb). Foi considerada positiva a amostra cuja reação de PCR, após eletroforese em gel de agarose, originou a banda característica para o par de iniciadores testado. Havendo mais de uma reação com este resultado, foi escolhida aquela onde a banda mostrava-se mais intensa. Diluições do poço positivo ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  e  $10^{-4}$ ) foram testadas para identificar a maior diluição com resultado positivo e em seguida uma alíquota desta diluição foi usada para preparação de nova placa de microtitulação. O intuito disso foi diminuir a presença dos demais fagos de cDNAs e enriquecer o fago que carregava a seqüência da  $\alpha$ -glicosidase. A varredura em meio líquido foi repetida até que todos os poços mostrassem resultado positivo por PCR indicando enriquecimento relativo ao fago com o fragmento de interesse, passando-se então para o meio sólido.

	1	2	3	4	5	6	7	8	↷ combinação de linhas
A	○	○	○	○	○	○	○	○	●
B	○	○	○	○	○	○	○	○	●
C	○	○	○	○	○	○	○	○	●
D	○	○	○	○	○	○	○	○	●
E	○	○	○	○	○	○	○	○	●
F	○	○	○	○	○	○	○	○	●
G	○	○	○	○	○	○	○	○	●
H	○	○	○	○	○	○	○	○	●
	●	●	●	●	●	●	●	●	⇒ combinação de colunas

### Varredura em meio líquido:

#### Fase 1:

- amplificação de cada poço por PCR;
- eletroforese dos produtos de PCR;
- seleção de um poço positivo, infecção de bactérias e crescimento dos fagos.

#### Fase 2:

- distribuição em novos poços e amplificação por PCR;
- eletroforese dos produtos de PCR;
- seleção de um poço positivo, infecção de bactérias e crescimento dos fagos.

#### Fase 3:

- distribuição em novos poços e amplificação por PCR;
- eletroforese dos produtos de PCR;
- seleção de um poço positivo, infecção de bactérias e crescimento dos fagos.

**Figura 6:** Placa de microtitulação com combinações de poços de linhas e de colunas utilizada em varredura em biblioteca de cDNA, segundo Israel (1993).

### 3.2.14.1.2 Varredura da biblioteca em meio sólido

Tendo todos os poços em meio líquido mostrado resultado positivo, foi feita PCR com diluições das lacunas onde a banda amplificada apresentou-se mais intensa. Uma alíquota de 0,5 µL da maior diluição com resultado positivo foi incubada por 15 min com 200 µL de *E. coli* XL1-Blue MRF' e após incubação a suspensão de células foi misturada com 3 mL de meio NZY top-ágar, plaqueada em meio NZY-ágar e incubada a 37°C por 12 horas. Algumas das unidades formadoras de placas de lise (pfu) obtidas após incubação foram dispersas em 20 µL de tampão SM (NaCl 0,1 M, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 8 mM, Tris-HCl 50 mM pH 7,5 e gelatina 0,01%). Alíquotas destas suspensões foram testadas por PCR com iniciadores específicos (S1 e R1 para a α-glicosidase) e identificada a pfu positiva. Uma alíquota de 0,5 µL da dispersão da pfu positiva foi adicionada a 200 µL de células *E. coli* MRF' e após incubação por 15 min a 37°C, a suspensão de células foi misturada com 3 mL de meio NZY top-ágar, plaqueada em NZY-ágar e incubada a 37°C por 12 horas. Das pfu originadas, 10 foram testadas por PCR como descrito acima e este procedimento foi repetido até que se obtivesse resultado positivo para todas as pfu selecionadas de uma placa.

Uma alíquota da dispersão da pfu selecionada em tampão SM foi adicionada a 200 µL de *E. coli* MRF', plaqueada e incubada por 24 horas a 37°C. A esta placa foram adicionados 2 mL de tampão SM e deixados sob leve agitação para dispersão dos fagos no meio líquido. O tampão SM foi recolhido constituindo o estoque de fagos, que após titulação, foi utilizado para a excisão *in vivo* usando o fago *Exassist Helper*, conforme descrito no manual da biblioteca de cDNA.

### **Varredura em meio sólido:**

#### Fase 1:

- incubação e plaqueamento de suspensão de células;
- amplificação por PCR a partir das placas de lise (pfu);
- eletroforese dos produtos de PCR;
- seleção de uma pfu e infecção de bactérias.

#### Fase 2:

- incubação e plaqueamento de suspensão de células;
- dispersão dos fagos em tampão SM;
- estoque de fagos para excisão.

### **3.2.14.2 RACE (*Rapid Amplification of cDNA Ends*)**

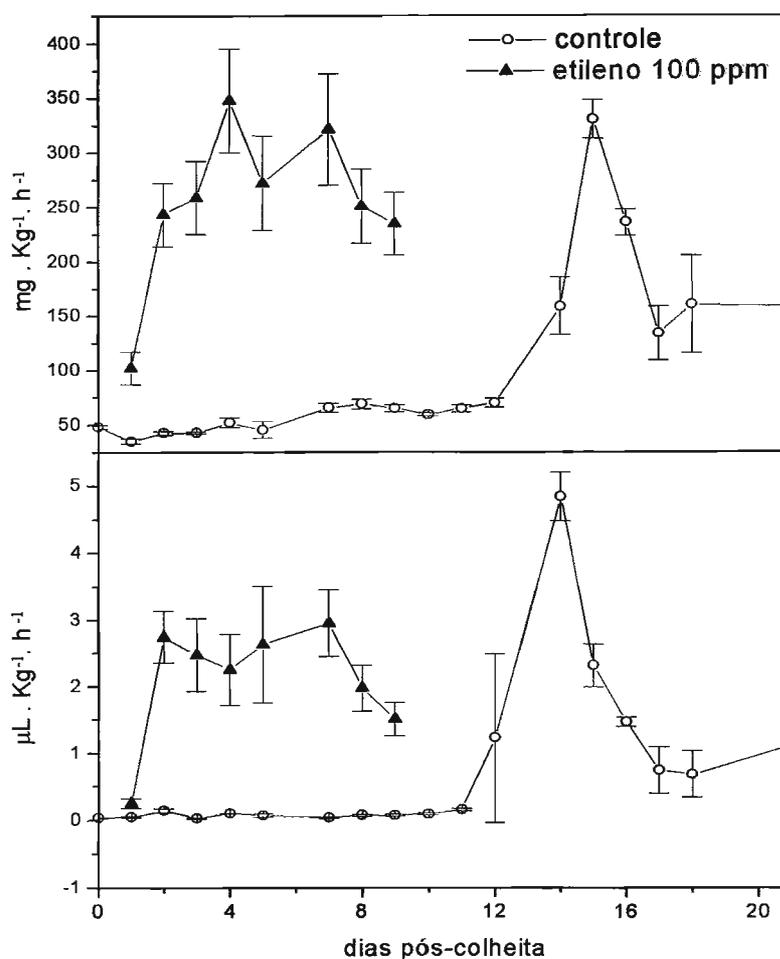
Para clonagem do gene de glicosidade a partir das extremidades 5' e 3' do cDNA de bananas, utilizou-se o *GeneRacer™ Kit - For full-length, RNA ligase-mediated rapid amplification of 5' end 3' cDNA ends* (RLM-RACE - Invitrogen). Esse método permite a amplificação de fragmentos do gene de interesse a partir das extremidades do cDNA, através de PCR, usando uma combinação de *primers* do kit específicos e do gene de interesse. A técnica promove uma ligação seletiva de um oligo ribonucleotídeo de RNA à extremidade 5' do mRNA, que posteriormente é submetido à transcrição reversa, para obtenção do cDNA. Para a reação de transcrição reversa utiliza-se um *primer* contendo uma seqüência oligo dT para pareamento com a cauda de poliadenina do mRNA. Este *primer* contém ainda uma seqüência de 36 nucleotídeos desenhados pelo fabricante de modo a permitir a realização de reações de PCR com alta estringência. O fluxograma da técnica RACE utilizado para clonagem, descrito em detalhes, é apresentado na Figura 7.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Caracterização da amostra

As amostras utilizadas neste trabalho foram obtidas de experimento conjunto no laboratório, em que parte das bananas foi tratada com etileno (100 ppm) e ambos os grupos, controle e tratado, foram amostrados durante o amadurecimento. Para esta amostragem, foram consideradas a respiração (CO<sub>2</sub>) e a produção de etileno (Figura 8). Tanto as amostras controle quanto as tratadas, tiveram comportamentos típicos de frutos climatéricos, com aumento dos níveis de etileno, seguido de um incremento na produção de CO<sub>2</sub> conforme já descrito por SEYMOUR (1993). Como esperado, sendo a banana um fruto climatérico, com a exposição ao etileno exógeno, os frutos tiveram uma antecipação em ambos os eventos.

A aplicação de etileno na amostra normalmente tem por objetivo uniformizar o grau de amadurecimento dos frutos, uma vez que dentro de uma mesma penca de bananas, há diferença de vários dias na maturação em virtude das diferentes épocas de floração e desenvolvimento dos frutos. Neste trabalho, a aplicação exógena de etileno teve como objetivo identificar eventos do amadurecimento que sejam regulados pelo etileno.

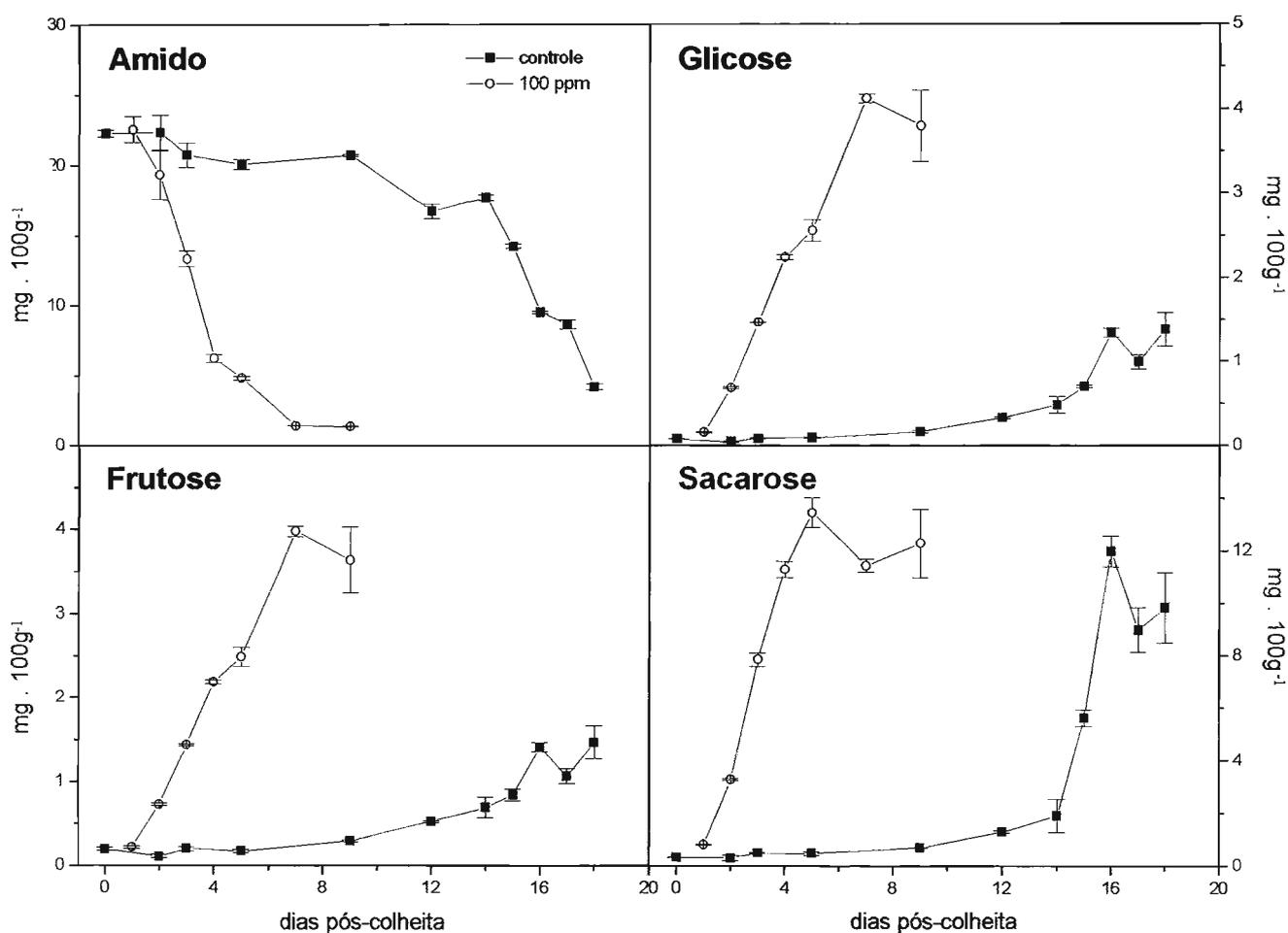


**Figura 8:** Medidas de respiração e etileno de bananas controle e tratadas com 100 ppm de etileno durante o amadurecimento. Os valores representam a média e o erro padrão de 4 repetições (para análises de CO<sub>2</sub> e etileno).

As amostras selecionadas pelos perfis de etileno e de respiração, foram analisadas quanto aos teores de amido e de açúcares solúveis (Figura 9) e, com base nestes teores, foram escolhidas as amostras para determinação de atividade das  $\alpha$ -(1,4) glicosidases e extração de RNA.

A degradação do amido foi iniciada aos 14 dias pós-colheita (dpc), nos frutos controle e aos 2 dpc nos frutos tratados com etileno, coincidente com o aumento nos teores de açúcares solúveis acumulados. Até o presente momento, não se conhece

claramente como o aumento no teor de etileno sinaliza a transcrição das enzimas relacionadas ao metabolismo de carboidratos, mas acredita-se que, em parte, a degradação do amido seja um dos eventos influenciados por esse hormônio.



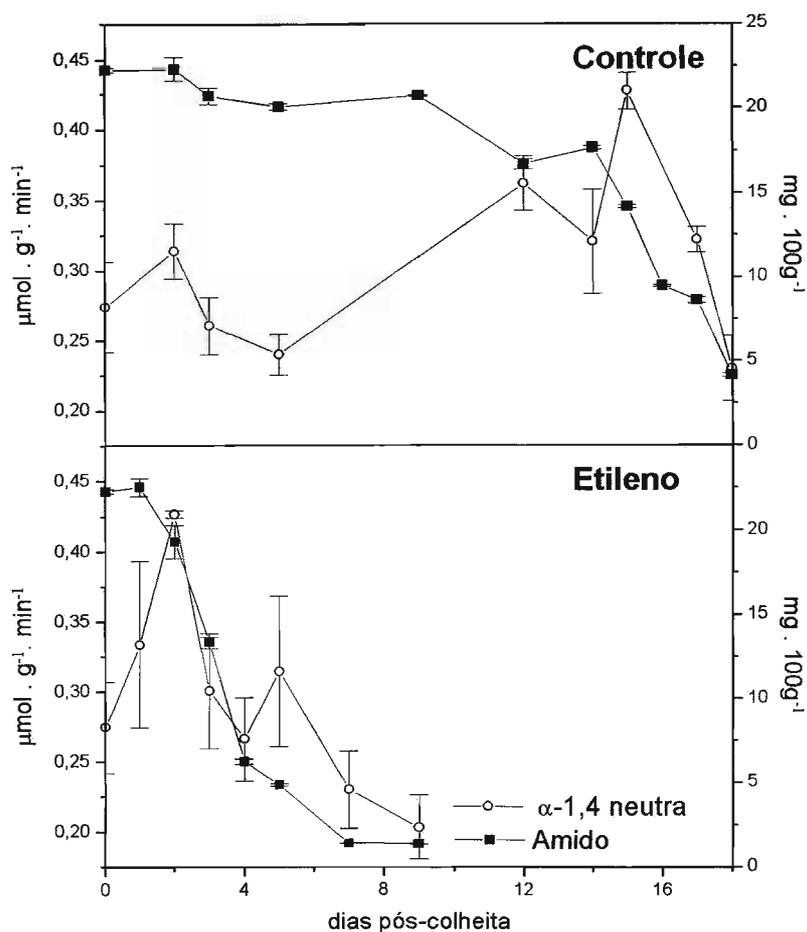
**Figura 9:** Teores de amido, glicose, frutose e sacarose de bananas controle e tratadas com 100 ppm de etileno durante o amadurecimento. Os valores representam a média e o erro padrão de 3 repetições (para análises de % amido e açúcares solúveis).

## 4.2 Perfis da atividade enzimática

### 4.2.1 Alfa 1,4-glicosidase neutra

Os resultados da Figura 10 mostram os perfis de atividade da  $\alpha$ -(1,4) glicosidase neutra, durante o amadurecimento de frutos controle e tratados, utilizando o substrato sintético o 4-metilumbeliferil- $\alpha$ -D-glicosídeo (4MU $\alpha$ G). Observou-se um pico de atividade aos 15 dias pos-colheita (dpc) em frutos controle, concomitante aos picos de respiração e etileno (14 dpc). Nos frutos tratados, o pico de atividade da  $\alpha$ -(1,4) glicosidase neutra foi adiantado em 13 dias. A atividade máxima total foi da mesma magnitude em ambas as amostras 0,43 Unidades (U) Konishi e col. (1991), observaram que a atividade inicial da  $\alpha$ -glicosidase neutra de amostras não-tratadas com etileno foi de 0,2 U, aumentando cerca de 2 a 3 vezes quando os frutos foram tratados com etileno. Apesar da atividade inicial neste experimento ter sido similar (0,27 U aos zero dpc), não foi observado aumento equivalente na atividade máxima, que foi de 0,43 U após tratamento com etileno.

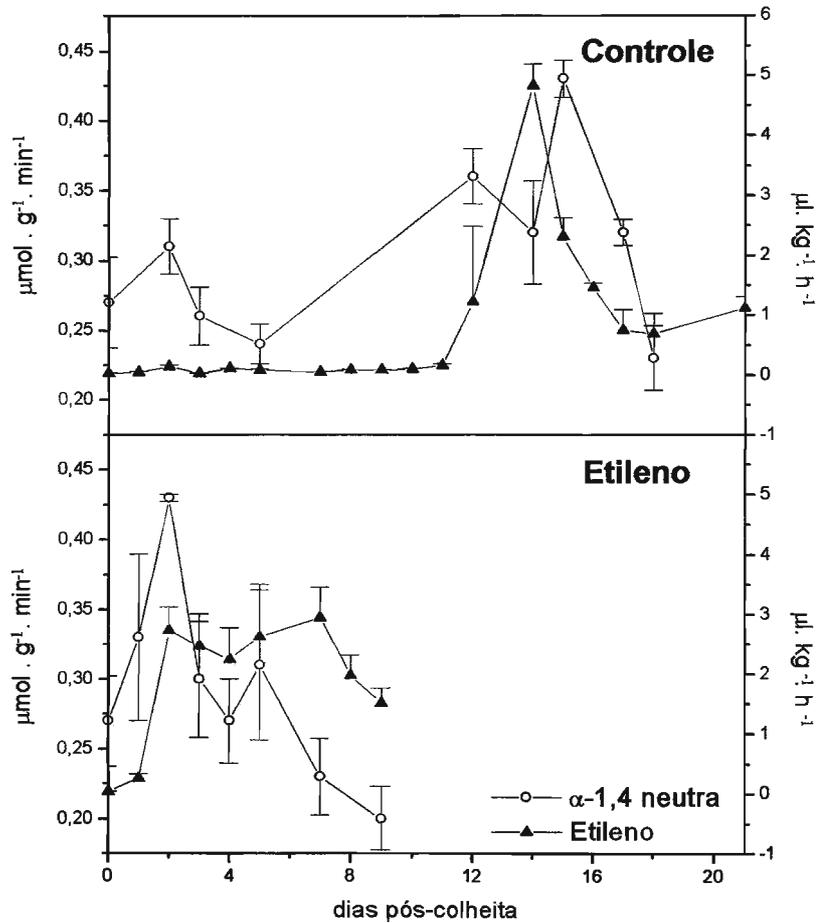
Ao contrário do que se espera de uma enzima envolvida somente na fase de degradação do amido, não houve um aumento de atividade muito grande da isoforma neutra durante todo este processo (Figura 10). Porém, seu perfil de atividade foi paralelo ao do amido, ou seja, após um aumento de atividade, ela decaiu até ser indetectável ao final da degradação do amido. Como já constatado por Lloyd; Kossmann e Ritte (2005), isto talvez seja uma indicação de que a enzima que teve sua atividade medida por esta metodologia, não utilize os produtos de degradação do amido como substrato.



**Figura 10:** Atividade específica da isoforma neutra da  $\alpha$ -(1,4) glicosidase em frutos controle e tratados (etileno 100 ppm) durante o amadurecimento da banana. Os valores representam a média e o erro padrão de 3 repetições.

O perfil de atividade de  $\alpha$ -(1,4) glicosidase neutra (Figura 10), com dois picos de atividade, sugere a existência de pelo menos duas isoformas da enzima, com uma delas atuando em substratos de alto peso molecular, no início da degradação do amido e a outra isoforma atuando posteriormente, em substratos resultantes da degradação do amido. O etileno parece influenciar a atividade da enzima (Figura 11), já que houve um aumento de atividade imediatamente após, ou concomitante ao pico de etileno nas amostras controles e nas tratadas.

Konishi; Kitasato e Nakatani (1992) constataram que as formas neutras das  $\alpha$ -glicosidases de banana têm maior atividade sobre o substrato sintético 4MU $\alpha$ G do que sobre a maltose, sendo por isso classificada como uma enzima do tipo I, que apresenta especificidade por substratos heterogêneos, como aril glicosídeos e sacarose.



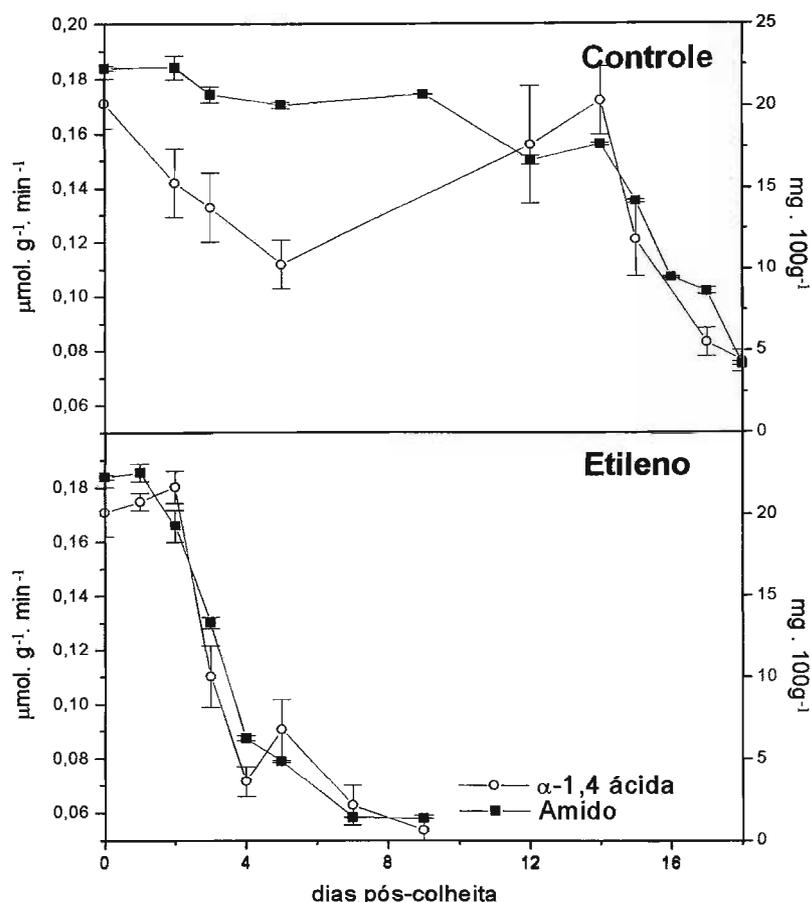
**Figura 11:** Atividade específica da isoforma neutra da  $\alpha$ -(1,4) glicosidase e perfil de etileno em frutos controle e tratados (etileno 100 ppm) durante o amadurecimento da banana. Os valores representam a média e o erro padrão de 3 repetições.

#### 4.2.2. Alfa 1,4-glicosidase ácida

Os perfis de atividade da  $\alpha$ -(1,4) glicosidase ácida (Figuras 12 e 13), utilizando o 4MU $\alpha$ G, durante o amadurecimento de frutos controle e tratados, foram semelhantes aos da  $\alpha$ -(1,4) glicosidase neutra. O pico de atividade verificado aos 14 dpc, é da mesma magnitude do primeiro dia do experimento (0 dpc), concomitante aos picos de etileno e de respiração (15 dpc). Tanto nos frutos tratados quanto nos não tratados, a atividade máxima da enzima foi de 0,18 U aos 2 dpc. Também aqui não foi encontrado o aumento de atividade relatado por Konishi e col. (1991), para a  $\alpha$ -(1,4) glicosidase ácida. Como os procedimentos de extração e determinação de atividade foram os mesmos utilizados por Konishi e col. (1991), pode-se especular que as diferenças podem ser devidas as amostras utilizadas, já que os mesmos utilizaram a espécie *Musa sapientum* cultivar *Giant* pertencente ao subgrupo *Cavendish* e neste experimento foram utilizadas bananas *Musa acuminata* cultivar Nanicão pertencentes ao subgrupo *Cavendish*.

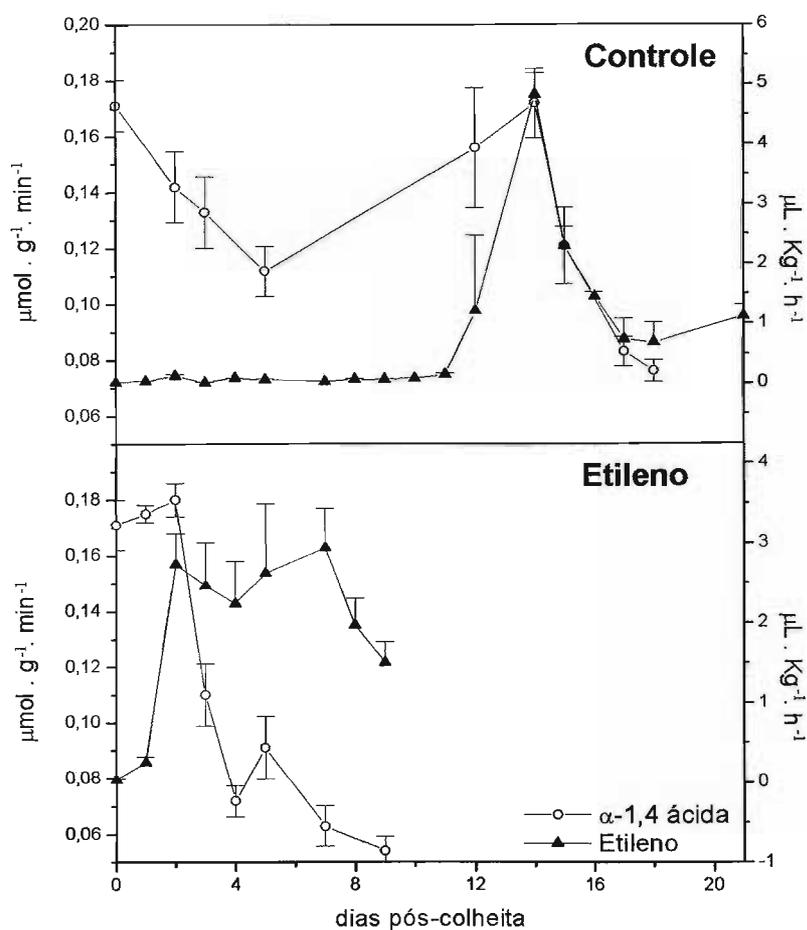
Segundo Garcia e Lajolo (1988), os produtos de atividade da  $\alpha$ - e  $\beta$ -amilases poderiam ser utilizados como substratos pelas  $\alpha$ -glicosidases, que tiveram um aumento de atividade quando a maior parte do amido já tinha sido degradado. Posteriormente, Konishi, Kitasato e Nakatani (1992), verificaram que a  $\alpha$ -glicosidase ácida de banana não hidrolisa isomaltose, trealose ou sacarose, sendo, portanto classificada como pertencente ao tipo II com característica maltásica. Seria assim responsável pela hidrólise de maltose ou maltooligossacarídeos, produzidos pelas  $\alpha$ - e  $\beta$ -amilases ou pelas enzimas desramificadoras do amido. Tanto Garcia e Lajolo (1988) quanto Konishi e col. (2001) não encontraram maltose ou maltooligossacarídeo como produto de degradação do amido, concluindo assim que, apesar destes produtos provavelmente existirem, a via de

degradação do amido, com enzimas atuando em seqüência, não permite a detecção destes compostos. Baseados nos resultados encontrados Konishi e col. (1991), concluíram ser a  $\alpha$ -(1,4) glicosidase ácida a isoforma atuante na degradação do amido e não a neutra. Apesar de haver atividade decrescente da isoforma ácida durante o período de degradação do amido (Figura 12), existe uma alta correlação entre elas como pode ser observado pelos seus perfis. Também não foi detectada atividade da  $\alpha$ -(1,4) glicosidase ácida sobre a maltose, o que contribui para a suposição desta isoforma não ser uma maltase, apesar do relato da literatura (GARCIA; LAJOLO, 1988; KONISHI; KITASATO; NAKATANI, 1992; CHIBA, 1997; FRANSEN; SVENSSON, 1998). Os ensaios de atividade da enzima sobre a maltose, foram feitos tanto em pH 4,5, que é o pH supostamente ótimo para essa enzima, quanto em pH 6,5.



**Figura 12:** Atividade específica da isoforma ácida da  $\alpha$ -(1,4) glicosidase em frutos controle e tratados (etileno 100 ppm) durante o amadurecimento da banana. Os valores representam a média e o erro padrão de 3 repetições.

Quando os perfis de produção de etileno e de atividade da  $\alpha$ -(1,4) glicosidase ácida são confrontados (Figura 13), fica evidente a influencia do etileno sobre sua atividade tanto nos frutos controle quanto nos tratados. Também aqui a curva de atividade da isoforma ácida, com dois picos de atividade, sugere a existência de duas isoformas (Figura 10 e 12).



**Figura 13:** Atividade específica da isoforma ácida da  $\alpha$ -(1,4) glicosidase e perfil de etileno em frutos controle e tratados (etileno 100 ppm) durante o amadurecimento da banana. Os valores representam a média e o erro padrão de 3 repetições.

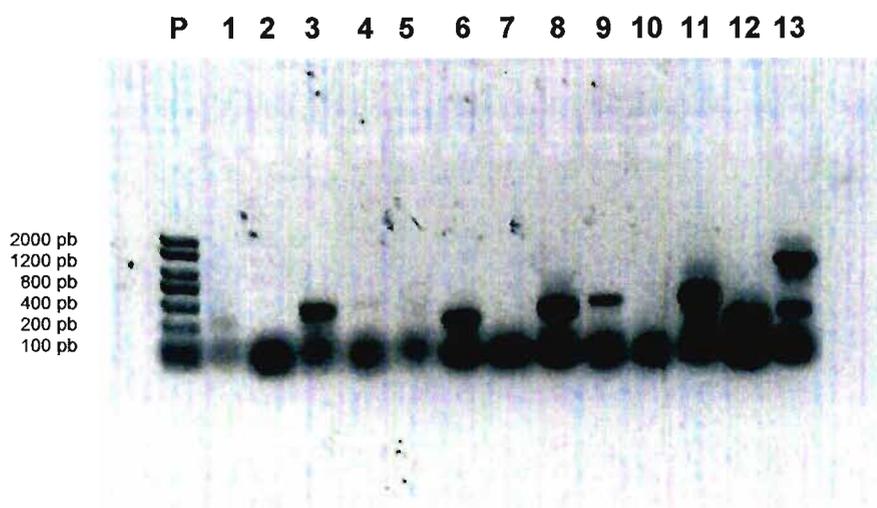
Pelo fato da atividade das isoformas neutra e ácida terem sido avaliados utilizando o mesmo substrato, poderia-se especular que a baixa atividade da isoforma ácida é somente um reflexo da atividade da isoforma neutra em condições não ideais de pH (4,5). O que sugere existir de fato a isoforma ácida é o deslocamento da curva no tempo, isto é, a atividade máxima da forma neutra ocorre aos 15 dpc, enquanto a da ácida ocorre aos 14 dpc.

No entanto, de modo geral o perfil de atividade enzimática de ambas isoformas, quando comparado com o perfil de CO<sub>2</sub>, não parece ser muito alterado durante o amadurecimento tanto para frutos tratados quanto para os frutos controle.

### **4.3 Ampliação, clonagem e seqüenciamento do gene da alfa-1,4-glicosidase neutra**

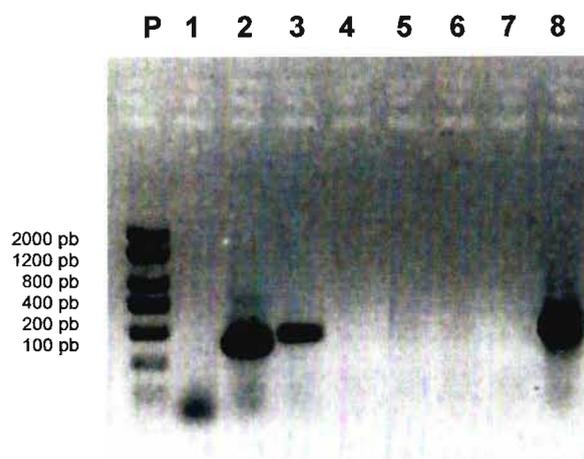
#### **4.3.1 Amplificação em reação em cadeia da polimerase (PCR)**

As primeiras tentativas de amplificação e clonagem de uma  $\alpha$ -glicosidase foram feitas com cDNAs obtidos a partir de RNA total de bananas climatéricas, provenientes de experimentos anteriores. Os ensaios de atividade enzimática foram conduzidos anteriormente às PCR, e não havendo informações conclusivas sobre qual dos tipos de  $\alpha$ -glicosidase estava presente em frutos de banana, foram testadas várias combinações de *primers* planejados sense e reverso em PCR, buscando o melhor resultado. O tamanho esperado de fragmentos após amplificação por PCR está descrito na Figura 14.



**Figura 14:** Eletroforese em gel de agarose (1,0%) de produtos de PCR (em pares de bases) das combinações de *primers* Sentido e Reverso desenhados com base nas seqüências de  $\alpha$ -glicosidases de cevada, beterraba e arroz depositadas no GenBank. Onde P - padrão *Low DNA Mass*; de 1 a 13, combinações de *primers*: 1 - 10S e 12R (330 pb); 2 - 10S e 13R (423 pb); 3 - 10S e 14R (423 pb); 4 - 10S e 15R (486 pb); 5 - 10R e 16R (486 pb); 6 - 11S e 12R (330 pb); 7 - 11S e 13R (432 pb); 8 - 11S e 14R (432 pb); 9 - 11S e 15R (486 pb); 10 - 11R e 16R (486 pb); (11 – actina (550 pb); 12 -  $\beta$  - amilase (200 pb); 13 – SPS (1100 pb) - controles positivos das condições de amplificação).

As combinações que apresentaram resultados positivos foram: 11S com 14R e 11S com 15R, que geraram os maiores fragmentos (~486 pb), entre todas as possíveis combinações (Figura 15). Quando a reação de PCR foi feita com apenas um dos *primers* (controles negativos), não ocorreu nenhuma amplificação, o que descartou a possibilidade de reações inespecíficas dos *primers* com o cDNA.



**Figura 15:** Eletroforese em gel de agarose (1,0%) de produtos amplificados por PCR de um fragmento de  $\alpha$ -glicosidase a partir de cDNA de polpa de bananas maduras. Onde P - padrão *Low DNA Mass*; de 1 a 3, combinações de *primers*: 1 - 11S e 12R; 2 - 11S e 14R; 3 - 11S e 15R; controles negativos: 4 - 11S + H<sub>2</sub>O; 5 - 12R + H<sub>2</sub>O; 6 - 14R + H<sub>2</sub>O; 7 - 15R + H<sub>2</sub>O; 8 - actina (controle positivo: fragmento de actina amplificado com *primers* específicos para actina de banana).

#### 4.3.2 Clonagem

O maior fragmento obtido pelo conjunto de *primers* 11S e 15R foi purificado do gel de agarose e utilizado na reação de ligação com o vetor *pGEM-T Easy*. Posteriormente, as bactérias foram transformadas com o vetor e as colônias transformantes foram selecionadas e testadas utilizando-se os *primers* do vetor M13S e M13R, com os *primers* da seqüência da  $\alpha$ -glicosidase 11S e 15R. Dentre várias colônias positivas foram selecionadas algumas para o crescimento em meio LB e posterior purificação do plasmídeo. Em seguida, foram realizadas as reações para o sequenciamento do fragmento clonado.

A seqüência parcial de  $\alpha$ -glicosidase de banana foi comparada com outras seqüências no GenBank, utilizando o algoritmo BLASTN e BLASTX, que retornaram



A seguir, a seqüência deduzida de aminoácidos foi alinhada com a seqüência de aminoácidos das  $\alpha$ -glicosidases das mesmas espécies de plantas utilizadas no alinhamento empregado para o desenho dos *primers* (espinafre, cevada, arroz e beterraba). A figura 17 mostra o alinhamento através do programa CrustalW destacando as regiões de identidade entre todas as cinco seqüências.

MaAgli	1	.....LWIDMNEISNFI
SoAgli	414	VFLKRNGKPYLGSVWPGPVYFPDFLKP SALT FW TDEIKRFLNLLPVDGLWIDMNEISNFI
HvAgli	389	I FLKRNGT N FVGNVWPGDVYFPDFMFH PRAAE FWAREISLFRRTI PVDGLWIDMNEISNFY
OsAgli	392	I FLKWN GSNYLGVVWPGNVYFPDFLN PRAAE FWAREIAA FRRTLPVDGLWVDMNEISNFV
BvAgli	418	VFIKRNGNPYLGSVWPGPVYYPDFLDP AARS FWVDEIKRFRDILPIDGIWIDMNEASNEI
MaAgli	13	TSPFVN. .SIDEPSY SVNNA G VRRPINNKTV PASAVHFCNVTEY DAHNL YG LLESRA THD
SoAgli	474	SSPPIPGSTLDNPPYKINNSGVMLPIINKTIPP TAMHYCDIPEYNVHNLFCYLEARVTRA
HvAgli	449	NPEPMN. .ALDDPPYRINNDCTGRPINNKTV PASAVHYCGVTEY DAHNL FGLLEARATHR
OsAgli	452	DP PPLN. .AIDDEPPYRINNSGVRRPINNKTV PASAVHYCGVAEY DAHNL FGFLEARATHD
BvAgli	478	TSAPTPGSTLDNPPYKINNSGGRVPINSKTIIPATAMHYGNVTEYNAHNL YG FLESQATRE
MaAgli	71	GLIKT T GKRPFVLSRSTFVGVCKYCAHCTGDNAAKWDDLRYSLPSILNSGIFGIPMVGAD
SoAgli	534	ALIKLTEKRPFVLSRSTFSGSGKETAHWTDGNAATWNDLVYSIPSMDFGLFGIPMVGAD
HvAgli	507	ALLRDTGRRPFVLSRSTFVGSGRYTAHWTDGNAATWGDLYSINTMLS FGLFGMPMIGAD
OsAgli	510	ALLRDTGRRPFVLSRSTFVGSGRYTAHWTDGNAATWEDLHYSINTMLS FGLFGIPMIGAD
BvAgli	538	ALVRPATRGPFLLSRSTFAGSGKETAHWTDGNAARWDDLQYSIPTMLNFGLFGMPMIGAD
MaAgli	131	ICGFADDTTEELCSRWIQLGAFYPF.....
SoAgli	594	ICGFLGNTTEELCRRWIQLGAFYPF SRDHSSIGTTYQELYRWESVAASARKVLGLRYTLL
HvAgli	567	ICGFNGNTTEELCGRWIQLGAFYPF SRDHSAIFTVRRELYLWPSVAASARKALGLRYQLL
OsAgli	570	ICGFGGNTTEELCSRWIQLGAFYPF SRDHSAIGTVRRELYLWESVARSAKALGLRYRLL
BvAgli	598	ICGFAESTTEELCCRWIQLGAFYPF SRDHSARDTTHQELYELWESVAASARTVLGLRYELL

**Figura 17:** Alinhamento da seqüência de aminoácidos deduzida a partir do fragmento de  $\alpha$ -glicosidase obtido por amplificação a partir de cDNAs sintetizados a partir de RNA total de tecido da polpa de banana. **MaAgli:**  $\alpha$ -glicosidase de *Musa acuminata* (banana); **SoAgli:**  $\alpha$ -glicosidase de *Spinacia oleracea* (espinafre); **HvAgli:**  $\alpha$ -glicosidase de *Hordeum vulgare* (cevada); **OsAgli:**  $\alpha$ -glicosidase de *Oryza sativa* (arroz); **BvAgli:**  $\alpha$ -glicosidase de *Beta vulgaris* (beterraba). Aminoácidos similares - em azul; Aminoácidos idênticos - em vermelho; Aminoácidos diferentes - pretos; Região conservada - sombreado.

O alinhamento utilizado no programa BLASTX retornou, na maior parte dos casos, índices de identidade entre 70 e 80% entre as seqüências de *Musa acuminata* e as demais espécies, demonstrando existir alta identidade entre elas. Os dados obtidos permitem identificar a enzima como sendo uma isoforma neutra da  $\alpha$ -glicosidase.

#### **4.3.3 RACE (*Rapid Amplification of cDNA Ends*)**

Baseados na seqüência do fragmento, foram desenhados *primers* para as reações de amplificação das regiões correspondentes às porções 5' e 3' do cDNA da  $\alpha$ -glicosidase, na tentativa de obter a seqüência completa desta. Para tal foi empregada a técnica de RACE com o kit *GeneRacer* da Invitrogen, cujo princípio foi detalhado na Figura 7 (Material e Métodos). Apesar de várias tentativas, não foi possível obter o fragmento na porção 5' do cDNA. Uma das prováveis explicações residiria em problemas na preparação de cDNA, visto que uma das etapas críticas é a ligação do RNA-Oligo (ver Figura 7 em Material e Métodos). Não é raro que esta reação de ligação ocorra com baixa eficiência, comprometendo o sucesso da amplificação do fragmento de interesse, visto se tratar de uma reação precedida por duas outras etapas: uma para remoção dos fosfatos da extremidade 5' de mRNAs truncados ou RNAs não-mRNA, seguida de outra para a remoção do cap de 7-metil-guanosina. Em alguns casos, as reações podem ocorrer com baixa eficiência, comprometendo a etapa posterior de ligação do RNA-Oligo. Além disso, entre cada uma destas etapas, o material obtido é extraído com fenol:clorofórmio, seguido de outra extração com clorofórmio. Estas extrações, em alguns casos também, podem levar a perdas dos mRNAs e, possivelmente, à diminuição do nível do mRNA de interesse, o que dificultaria o sucesso da amplificação.

O fragmento esperado para a porção 3' teria em torno de 600 a 900 pb, baseados no resultado do alinhamento da seqüência do fragmento de  $\alpha$ -glicosidase de banana com as seqüências das  $\alpha$ -glicosidases das plantas já citadas.

#### 4.3.4 Varredura da biblioteca de cDNA (*Screening*)

Como a técnica de RACE (*Rapid Amplification cDNAs Ends*) não apresentou resultados satisfatórios, foi feita uma varredura em biblioteca de cDNA, constituída a partir do RNA extraído de bananas com 3 dpc tratadas com etileno, utilizando a metodologia de Israel (1993).

Através de *primers* específicos das extremidades 5' e 3' do fragmento de MaAgli de  $\alpha$ -glicosidase, planejados em função do sequenciamento do fragmento de 487 pb, denominados 11S e 15R, o clone completo foi rastreado por PCR em placas de microtitulação conforme descrito em Material e Métodos.

Utilizando a metodologia de varredura da biblioteca de cDNAs (*Screening*) obteve-se resultados em meio líquido que foi o enriquecimento da biblioteca em relação ao fago contendo o clone de  $\alpha$ -glicosidase. Nesta fase, todas as combinações de linha e coluna da placa de microtitulação, apresentaram sinal positivo de amplificação do inserto de  $\alpha$ -glicosidase. Porém, várias tentativas foram realizadas em meio sólido e os resultados não foram satisfatórios (ausência de pfu).

Um dos fatores que podem ter interferido no rastreamento do gene de  $\alpha$ -glicosidase na biblioteca de cDNA, refere-se provavelmente a sua baixa freqüência na biblioteca, tornando-o pouco representativo no conjunto de cDNAs presentes na biblioteca, além de uma possível inviabilidade do fago.

## 4.4 Análise de transcrito da alfa 1,4-glicosidase durante o amadurecimento de banana

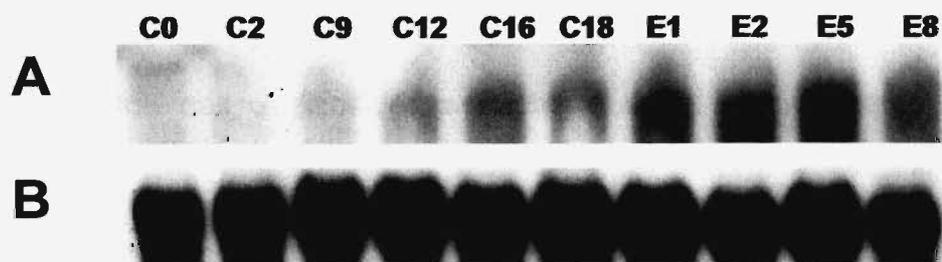
### 4.4.1 Northern Blot

Tendo em vista que a técnica descrita acima também não foi satisfatória, um novo protocolo baseado na metodologia desenvolvida por Astorino e Nascimento (comunicação pessoal), foi utilizado na tentativa de se obter a seqüência completa da  $\alpha$ -glicosidase.

A seqüência parcial de bases da  $\alpha$ -glicosidase assim obtida, foi comparada com outras seqüências do GenBank e, utilizando o algoritmo BLASTX, apresentou uma homologia de 61% com seqüências de  $\alpha$ -glicosidases de outros vegetais (arroz, beterraba e *Arabipopis*).

Para se determinar o nível de transcrito da  $\alpha$ -glicosidase durante o amadurecimento, a partir deste fragmento (2562 pb), foi sintetizada uma sonda radioativa para hibridização com mRNAs fixados em membranas de nylon, por meio do protocolo de *Northern blot*.

O *Northern blot* desenvolvido com as amostras controle e tratadas de banana, indicou que a sonda homóloga obtida a partir do cDNA reconheceu um transcrito de  $\alpha$ -glicosidase com tamanho aproximado de 4000 pb. O nível de transcrito aumenta durante todo o período de amadurecimento, nos frutos controle, a partir dos 12 dpc, antes dos picos de etileno (14 dpc) e respiração (15 dpc) (Figura 18A). Este aumento, praticamente constante, não foi coincidente com a atividade (Figura 10). Yu e col. (2005), também não encontraram paralelo entre o aumento dos níveis de mRNA com a proteína e a atividade amilolítica em extratos de folhas de *Arabidopsis*.



**Figura 18:** Autoradiografias dos mRNAs hibridizados com sonda de  $\alpha$ -glicosidase (A) e do RNA ribossomal 18S (B) das amostras de polpa de bananas controle e tratadas com etileno em pontos variados do amadurecimento dos frutos. Onde C = Frutos controles e E = Frutos tratados com 100 ppm de etileno e os números são dpc (dias pós-colheita).

No caso dos frutos tratados, observou-se um aumento nos níveis de transcrito de  $\alpha$ -glicosidase que se iniciou ao 1º dpc e foi constante durante todo o amadurecimento (Figura 18A). Esse comportamento destoa dos demais dados observados, pois o nível de transcrito é constante e a atividade enzimática não se mantém, decaindo durante o amadurecimento. O fato das bananas tratadas ter apresentado diferenças marcantes quanto ao nível de transcrito de  $\alpha$ -glicosidase em relação às bananas controle, pode indicar que essa enzima seja regulada pelo etileno.

## 5. CONCLUSÕES

(1) A atividade das  $\alpha$ -glicosidases neutra e ácida teve aumento de atividade correlacionado com a degradação do amido durante o amadurecimento da banana, compatível com uma possível atuação sobre compostos derivados da degradação do amido.

(2) Nenhuma das isoformas atuou sobre a maltose indicando não tratar-se de uma maltase típica.

(3) Apesar do aumento de transcritos de mRNA da  $\alpha$ -glicosidase neutra durante o amadurecimento da banana, não foi encontrada correspondência com sua atividade.

(4) O etileno parece influenciar no aumento de transcritos de mRNA da  $\alpha$ -glicosidase neutra.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABELES, F.B.; MORGAN, P.W.; SALTVEIT Jr., M.E. **Ethylene in plant biology**. 2.ed. San Diego: Academic Press, 1992. 414p.
- ALAM, S.; NAKASHIMA, S.; DEYASHIKI, Y.; BANNO Y.; HARA, A.; NOZAWA, Y. Molecular cloning of a gene encoding acid  $\alpha$ -glucosidase from *Tetrahymena pyriformis*. **J. Eukaryotic Microbiol.**, Lawrence, v.43, p.295-303, 1996.
- ARÊAS, J.A.G.; LAJOLO, F.M. Starch transformation during banana ripening. I. The phosphorylase and phosphatase behavior in *Musa acuminata*. **J. Food Biochem.**, Malden, v.5, p.19-37, 1981.
- AWAD, M. **Fisiologia pós-colheita de frutos**. São Paulo: Nobel, 1993. 114p.
- BASSINELLO, P.Z.; CORDENUNSI, B.R.; LAJOLO, F.M. Amylolytic activity in fruits: comparison of different substrates and methods using banana as model. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.50, n.21, p.5781-5786, 2002.
- BEERS, E.P.; DUKE, S.H.; HENSON, C.A. Partial characterization and subcelular localization of three  $\alpha$ -glucosidase isoforms in pea (*Pisum sativum* L.) seedlings. **Plant Physiol.**, Rockville, v.94, p.738-744, 1990.

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. Weinheim: Verlag Chemie; New York: Academic Press, 1974. v.2, p.1212-1215.

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, 1975. cap.3, p.19-34.

BIERHALS, J.D.; LAJOLO, F.M.; CORDENUNSI, B.R.; NASCIMENTO, J.R.O. Activity, cloning and expression of an isoamylase-type starch-debranching enzyme from banana fruit. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.52, p.7412-7418, 2004.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, New York, v.72, n.1/2, p.248-252, 1976.

CHANTRET, I.; LACASA, M.; CHEVALIER, G.; RUF, J.; ISLAM, I.; MANTEI, N.; EDWARDS, Y.; SWALLOW, D.; ROUSSENT, M. Sequence of the complete cDNA and the 5' structure of the human sucrase-isomaltase gene: possible homology with a yeast glucoamylase. **Biochem. J.**, Colchester, v.285, pt.3, p.915-923, 1992.

CHIBA, S. Molecular mechanism in  $\alpha$ -glucosidase and glucoamylase. **Biosci. Biotechnol.**

**Biochem.**, Tokyo, v.61, p.1233-1239, 1997.

CHIBA, S.; SHIMOMURA, T. Purification and some properties of flint corn  $\alpha$ -glucosidase.

**Agric. Biol. Chem.**, Tokyo, v.39, p.1033-1044, 1975.

CHIBA, S.; KANAYA, K.; HIROMI, K.; SHIMOMURA, T. Substrate specificity and subsite

affinities of buckwheat  $\alpha$ -glucosidase. **Agric. Biol. Chem.**, Tokyo, v.43, p.237-242,

1979.

CHIBA, S.; INOMATA, S.; MATSUI, H.; SHIMOMURA, T. Purification and properties of an

$\alpha$ -glucosidase (glucoamylase) in sugar beet seeds. **Agric. Biol. Chem.**, Tokyo, v.42,

p.241-245, 1978.

COHEN, S.N.; CHANG, A.C.Y.; HSU, L. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **69**: 2110-2114.

1972. In: CLARK, M.S., ed. **Plant molecular biology**: a laboratory manual. Berlin: Springer-Verlag, 1997. 529p.

CORDENUNSI, B.R.; LAJOLO, F.M. Starch breakdown during banana ripening: sucrose

synthase and sucrose phosphate synthase. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.43,

n.2, p.347-351, 1995.

DAVIES, P.J.; BOSS, P.K.; ROBINSON, S.P. Treatment of grape berries, a non-climateric

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: \_\_\_\_\_, eds. **Plant hormones: physiology, biochemistry, and molecular biology**. Dordrecht, Boston: Kluwer Academic Publishers, 1995. cap.A1, p.1-12.

DOHMEN, J.R.; STRASSER, A.W.M.; DAHLEMS; U.M.; HOLLENBERG, C.P. Cloning of the *Schwanniomyces occidentalis* glucoamylase gene (GAM1) and its expression in *Saccharomyces cerevisiae*. **Gene**, Amsterdam, v.95, n.1, p.111-121, 1990.

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. [Review].

FRENKEL, C.; DYCK, R. Auxin inhibition of ripening in bartlett pears. **Plant Physiol.**, Rockville, v.51, n.1, p.6-9, 1973.

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

GILLASPY, G.; HILLA, B.D.; GRUISSEM, W. Fruits: a developmental perspective. **Plant Cell**, Rockville, v.5., p.1439-1451, 1993.

HALLET, 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.

HOEFSLOOT, L.H.; HOOGEVEEN-WESTERVELD, M.; KROOS M.A.; VAN BEEUMEN, J.; REUSER, A.J.J.; OOSTRA, B.A. Primary structure and processing of lysosomal  $\alpha$ -glucosidase; homology with the intestinal sucrase isomaltase complex. **EMBO J.**, Basingstoke, v.7., n.6, p.1697-1704, 1988.

HUNZIKER, W.; SPIESS, M.; SEMENZA, G.; LODISH, H.F. The sucrase-isomaltase complex: primary structure, membrane-orientation, and evolution of a stalked, intrinsic brush border protein. **Cell**, New York, p.46, p.227-234, 1986.

IM, H.; HENSON, C.A. Characterization of high pI  $\alpha$ -glucosidase from germinated barley seeds: substrate specificity, subsite affinities and active-site residues. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v.277, p.145-159, 1995.

IRVING, D.E. Starch degradation in buttercup squash (*Cucurbita maxima*). **J. Am. Soc. Hortic. Sci.**, Alexandria, v.124, n.6, p.587-590, 1999.

ISRAEL, D.I. A PCR-based method high stringency screening of DNA libraries. **Nucleic Acids Res.**, Oxford, v.21, n.11, p.2727-2631, 1993.

KNAPP, S. Tobacco to tomatoes: a phylogenetic perspective on fruit diversity in the Solanaceae. **J. Exp. Bot.**, Oxford, v.53, p.2001-2022, 2002.

KANAYA, K.; CHIBA, S.; CHIMOMURA, T.; NISHI, K. Improved method for purification of buckwheat  $\alpha$ -glucosidase and some kinetic properties. **Agric. Biol. Chem.**, Tokyo, v.40, n.10, p.1929-1939, 1976.

KIMURA, A.; TAKATA, M.; SAKAI, O.; MATSUI, H.; TAKAI, N.; TAKAYANAGAI, T.; NISHIMURA, T.; UOZUMI, T.; CHIBA, S. Complete amino acid sequence of crystalline  $\alpha$ -glucosidase from *Aspergillus niger*. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, Tokyo, v.56, p.1368-1370, 1992.

KINSELLA, B.T.; HOGAN, S.; LARKIN, A.; CANTWELL, B.A. Primary structure and processing of the *Candida tsukubaensis*  $\alpha$ -glucosidase: homology with the rabbit intestinal sucrase-isomaltase complex and human lysosomal  $\alpha$ -glucosidase. **Eur. J. Biochem.**, Berlin, v.202, p.657-664, 1991.

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

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.

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

KONISHI, Y.; KITASATO, S.; ASANO, R.; NAKATANI, N. Polymorfirsm of acid and neutral alpha-glucosidase in banana pulp - changes in apparent pls and affinity to Con-A of the enzymes during ripening. **Agric. Biol. Chem.**, Tokyo, v.55, n.4, p.1089-1094, 1991.

LLOYD, J.R.; KOSSMANN, J.; RITTE, G. Leaf starch degradation comes out of the shadows. **Trends Planta Sci.**, Kidlington, v.10, n.3, p.130-137, 2005.

LÓPEZ-GÓMEZ, R.; GÓMEZ-LIM, M.A. A method for extracting intact RNA from Fruits rich in polisaccharides using ripe mango mesocarp. **HortScience**, Alexandria, v.27, n.5, p.440-442, 1992.

MacGREGOR, A.W.  $\alpha$ -amilase, limit dextrinase and  $\alpha$ -glucosidase enzymes in barley and malt. **Crit. Rev. Biotechnol.**, Philadelphia, v.5, p.117-128, 1987.

MANNERS, D.J. Recent developments in our understanding of amylopectin structure. **Carbohydr. Polym.**, Amsterdam, v.11, p.87-112, 1989.

- MATSUI, H.; IWANAMI, S.; ITO, H.; MORI, H.; HONMA, M.; CHIBA, S. Cloning and sequencing of a cDNA encoding  $\alpha$ -glucosidase from sugar beet. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, Tokyo, v.61, n.5, p.875-880, 1997.
- 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-relate mRNAs. **Plant Physiol.**, Rockville, v.115, n.2, p.453-461, 1997.
- MINETOKI, T.; GOMI, K.; KITAMOTO, K.; KUMAGAI, C.; TAMURA, G. Nucleotide sequence and expression of  $\alpha$ -glucosidase encoding gene (*agdA*) from *Aspergillus oryzae*. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, Tokyo, v.59, p.1516-1521, 1995.
- 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, p.385-397, 1999.
- MONROE, J.D.; HALL, B.D.; GOUGH, C.M.; STEPHEN, A.L. Nucleotide sequence of an alpha-glucosidase gene (accession n.AF014806) from *Arabidopsis thaliana*. **Plant Physiol.**, Rockville, v.115, p.863, 1997.

MOORE, S.; VREBALOV, J.; PAYTON, P.; GIOVANNONI, J. Use of genomics tools to isolate key ripening genes and analyse fruit maturation in tomato. **J. Exp. Bot.**, Oxford, v.53, p.2023-2030, 2002.

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

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

MOTA, R.V.; LAJOLO, F.M.; CIACCO, C.; CORDENUNSI, B.R. Composition and functional properties of banana flour from different varieties. **Starch/Staerke**, Weinheim, v.52, n.2/3, p.63-68, 2000.

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

NASCIMENTO, J.R.O.; VIEIRA Jr., A.; BASSINELLO, P.Z.; CORDENUNSI, B.R.; MAINARDI, J.A.; PURGATTO, E., LAJOLO, F.M. Effect of ethylene and 1-methyl-

cyclopropene on banana  $\beta$ -amylase expression and starch degradation during fruit ripening. **Planta**, Heidelberg, 2004. [No Prelo].

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. Partial purification and characterization of sucrose phosphate synthase from preclimacteric and climacteric banana. **Agric. Food Chem.**, Washington, v.45, p.1103-1107, 1997.

NASCIMENTO, J.R.O.; VIEIRA Jr., A.; BASSINELLO, P.Z.; CORDENUNSI, B.R.; MAINARDI, J.A.; PURGATTO, E., LAJOLO, F.M. Beta-amylase expression and starch degradation during banana ripening. **Postharvest Biol. Technol.**, Amsterdam, 2005. [No Prelo].

NICHOLS, B.L.; QUARONI, A.; AVERY, S.A.; ELDERING, J.A.; STERCHI, E.E. Homology of human maltase-glucoamylase (MGA) with sucrase-isomaltase (SIM). **FASEB J.**, Bethesda, v.11, n.3, p.3518, abstr.A609, 1997. [Meeting Abstract].

NIGHOJKAR, S.A.; KUMAR, A. Starch phosphorylase: biochemical, molecular and biotechnological aspects. **Genet. Eng. Biotechnol.**, Swansea, v.17, n.4, p.189-202, 1997.

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

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

ROSSETTO, M.R.M. **Efeito do ácido giberélico no metabolismo amido-sacarose durante o amadurecimento da banana (Musa acuminata var. Nanicão)**. São Paulo, 2001. 79p. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

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

ROSSETTO, M.R.M.; LAJOLO, F.M.; CORDENUNSI, B.R. Influência do ácido giberélico na degradação do amido durante o amadurecimento da banana. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v.24, n.1, p.76-81, 2004.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratorial manual**. 2.ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989. v.1-3.

SEYMOUR, G.B. Banana. In: SEYMOUR, G.B.; TAYLOR, J.E.; TUCKER, G.A., eds. **Biochemistry of fruit ripening**. London: Chapman & Hall, 1993. cap.3, p.83-106.

SEYMOUR, G.B.; MANNING, K.; ERIKSSON, E.M.; POPOVICH, A.H.; KING, G.J. Genetic identification and organization of factors affecting fruit texture. **J. Exp. Bot.**, Oxford, v.53, p.2065-2071, 2002.

SISSONS, M.J.; MacGREGOR, A.W. Hydrolysis of barley starch granules by  $\alpha$ -glucosidase from malt. **J. Cereal Sci.**, Sidcup, v.19, p.161-169, 1994.

SIVAK, M.N.; PREISS, J. Starch degradation. In: \_\_\_\_\_, eds. **Starch: basic science to biotechnology**. San Diego: Academic Press, 1998. p.153-162. (Advances food and nutrition reseach, v.41).

SUGIMOTO, M.; FURUI, S.; SUZUKI, Y. Multiple molecular forms of  $\alpha$ -glucosidase from spinach seeds, *Spinacea oleracea* L. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, Tokyo, v.59, n.4, p.673-667, 1995.

SUGIMOTO, M.; FURUI, S.; SUZUKI, Y. Molecular cloning and characterization of a cDNA encoding  $\alpha$ -glucosidase from spinach. **Plant Mol. Biol.**, Dordrecht, v.33, p.765-768, 1997.

- SUGIMOTO, M.; SUZUKI, Y. Molecular cloning, sequencing, and expression of a cDNA encoding  $\alpha$ -glucosidase from *Mucor javanicus*. **J. Biochem.**, Tokyo, v.119, p.500-505, 1996.
- SUN, Z.; HENSON, C.A. Degradation of native starch granules by barley  $\alpha$ -glucosidases **Plant Physiol.**, Rockville, v.94, p.320-327, 1990.
- SUN, Z.; DUKE, S.H.; HENSON, C.A. The role of pea chloroplast  $\alpha$ -glucosidase in transitory starch degradation. **Plant Physiol.**, Rockville, v.108, p.211-217, 1995.
- SUN, Z.; 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.**, New York, v.284, n.2, p.298-305, 1991.
- SUZUKI, Y.; UCHIDA, K. Three forms of  $\alpha$ -glucosidase from welsh onion (*Allium fistulosum* L.). **Agric. Biol. Chem.**, Tokyo, v.84, p.1343-1345, 1984.
- TAYLOR, M.A.; GEORGE, L.A.; ROSS, H.A.; DAVIES, H.V. cDNA cloning and characterization of an  $\alpha$ -glucosidase gene from potato (*Solanum tuberosum* L.). **Plant J.**, Oxford, v.13, n.3, p.419-425, 1998.
- TIBBOT, B.K.; SKADSEN, R.W. Molecular cloning and characterization of a gibberelin-inducible, putative gene from barley. **Plant Mol. Biol.**, Dordrecht, v.30, p.229-241, 1996.

- TIBBOT, B.K.; HENSON, C.A.; SKADSEN, R.W. Expression of enzymatically active, recombinant barley  $\alpha$ -glucosidase in yeast and immunological detection of  $\alpha$ -glucosidase from seed tissue. **Plant Mol. Biol.**, Dordrecht, v.38, p.379-391, 1998.
- TINGWA, P.O.; YOUNG, R.E. Effect of indole-3-acetic and other growth-reulators on ripening of avocado fruits. **Plant Physiol.**, Rockville, v.55, n.5, p.937-940, 1975.
- 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.1-51.
- VENDRELL, M. Relationship between internal distribution of exogenous auxin and accelerated ripenininf of banana fruit. **Aust. J. Biol. Sci.**, Melbourne, v.23, n.6, p.1133-1142, 1970.
- VENDRELL, M. Reversion of senescence: effects of 2,4 dicholorophenoxyacetic acid and indoleacetic acid on respiration ethylene of banana fruit slices. **Aust. J. Biol. Sci.**, Melbourne, v.22, n.3, p.601-610, 1969.
- VIEIRA Jr., A. **Seqüência e caracterização molecular do cDNA de uma  $\alpha$ -amilase expressa durante o amadurecimento da banana (*Musa spp.*)**. São Paulo, 2001. 88p. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

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

WHITAKER, J.R. **Principles of enzymology for the food sciences**. 2.ed. New York: Marcel Dekker, 1994. 625p. (Food science and technology, v.61).

WHITE, P.J. Recent advances in fruit development and ripening: an overview. **J. Exp. Bot.**, Oxford, v.53, n.377, 1995-2000, 2002.

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

YU, T.S.; ZEEMAN, S.C.; THORNEYCROFT, D.; FULTON, D.C.; DUNSTAN, H.; LUE, W.L.; HEGEMANN, B.; TUNG, S.T.; UMEMOTO, T.; CHAPPLE, A.; TSAI, D.L.; WANG, S.M.; SMITH, A.M.; CHEN, J.; SMITH, S.M.  $\alpha$ -Amylase is not required for breakdown of transitory starch in Arabidopsis Leaves. **J. Biol. Chem.**, v.280, n.11, p.9773-9779, 2005.

ZEEMAN, S.C.; SMITH, S.M.; SMITH, A.M. Tansley review: the breakdown of starch in leaves. **New Phytol.**, Oxford, v.163, p.247-261, 2004.