

INFLUÊNCIA DO ÁCIDO GIBERÉLICO NA DEGRADAÇÃO DO AMIDO DURANTE O AMADURECIMENTO DA BANANA¹

Maria Rosecler Miranda ROSSETTO², Franco Maria LAJOLO², Beatriz Rosana CORDENUNSI^{2,*}

RESUMO

O ácido giberélico (GA₃) tem sido estudado com particular interesse na pós-colheita, pois melhora a qualidade e retarda a senescência dos frutos através de um complexo mecanismo de sinalização, interligado à atividade de enzimas responsáveis pelo processo do amadurecimento. Este hormônio vegetal, quando aplicado exogenamente, desempenha um papel importante no atraso da atividade de enzimas de parede celular, na síntese de carotenóides, degradação da clorofila e, em mangas, o GA₃ diminuiu a atividade de amilases e peroxidases. A banana, fruto climatérico, tem como principal fonte de energia o amido. Este polissacarídeo é reduzido durante o climatério de teores que variam de 12 a 20%, dependendo da cultivar de banana, a menos de 1%, e o teor de sacarose pode aumentar até 12 vezes quando a fruta está amadurecida. No metabolismo de hidrólise do amido, as amilases parecem desempenhar um papel fundamental no início desta degradação, pois acredita-se que só endoamilases são capazes de atacar grânulos inteiros, fornecendo substrato para atuação de outras enzimas até a formação de açúcares. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da infiltração de giberelina A₃ em fatias de banana no amadurecimento e degradação do amido. Observou-se que o fitohormônio não interferiu no climatério respiratório, porém atrasou a degradação do amido e o acúmulo de açúcares solúveis em pelo menos dois dias e o pico de atividade amilásica também foi atrasado.

Palavras-chave: banana; amadurecimento; ácido giberélico; amilases.

SUMMARY

INFLUENCE OF GIBBERELIC ACID IN THE STARCH BREAKDOWN DURING BANANA RIPENING. The gibberellic acid (GA₃) has been studied with particular interest in the posharvest, therefore it improves the quality and it delay the senescence of the fruits through a complex mechanism of signaling, linked to the activity of responsible enzymes for the process of the ripening. This phytohormone, when applied exogenous, it plays an important role in the delay of the activity of enzymes, especially of the cellular wall, in the synthesis of carotene, degradation of chlorophyll and in mangoes the GA₃ was responsible for decrease the activity of amylases and peroxidases. The banana, climacteric fruit, have as main power plant the starch. The starch of banana, depending of the variety, is reduced during the climaterium of value that vary of 12 the 20% to less than 1%, when the fruit is ripened, and the sacharose can increase up to 12 fold, in this time. In hydrolysis of the starch, the amylases seems to play a basic role in the beginning of this degradation, therefore it is given credit that only endoamylases is capable to attack entire granules, supplying substratum performance of other enzymes until the formation of sugars. The aim of this employment was to evaluate the effect of the gibberelin A₃ in the ripening of the banana, focusing the degradation of the starch. It was observed that the infiltrated phytohormone did not be under influence of the respiratory climacteric, however delayed the degradation of the starch and the accumulation of soluble sugars in at least two days and the peak of total activity of amylases also it was been slow.

Keywords: banana; ripening; gibberellic acid; amylases.

1 - INTRODUÇÃO

O amadurecimento dos frutos é controlado por várias classes de hormônios vegetais num processo ainda pouco conhecido. Dentre eles, o etileno é de longe o mais estudado devido a sua importância na maturação e senescência de folhas, flores e frutos [2]. Este processo depende em parte do aumento da sensibilidade ou da diminuição da resistência do fruto à ação do etileno e também do desaparecimento, ou inativação, de alguns fitoreguladores [7]. O fato de algumas substâncias, como as auxinas, giberelinas, citocininas, jasmônatos e poliaminas, entre outros, agirem como retardadoras da senescência é muito atrativo em termos tecnológicos [7].

De acordo com a sua sensibilidade ao etileno, os frutos podem ser divididos em dois grandes grupos: os

não climatéricos, que mantêm um nível de etileno basal durante toda a fase pós-colheita e os climatéricos, onde a maior parte dos processos bioquímicos relativos ao amadurecimento ocorre a partir da sinalização promovida pelo etileno e após o pico de respiração. A mobilização dos carboidratos de reserva na forma de amido, ácidos orgânicos ou na própria forma de sacarose translocada da planta para o fruto, levando ao acúmulo de açúcares, é um dos principais eventos bioquímicos que ocorre durante esta fase [24].

A banana, fruto desenvolvido por partenocarpia, faz parte da classe climatérica e tem como principal fonte de carbono o amido, que durante o climatério é reduzido de teores que variam de 12 a 20%, a menos de 1% quando a fruta está madura [17]. Concomitante à hidrólise do amido, o teor de sacarose aumenta até 12 vezes podendo chegar a 16%, com concentrações finais variando de acordo com o cultivar [6, 17].

O amido é um polissacarídeo de reserva, único nos vegetais, por se constituir de grânulos que podem ser isolados e que estão organizados dentro de plastídeos específicos: os amiloplastos. Por microscopia ótica e também eletrônica, foi observado que os grânulos de banana, tanto em amido isolado quanto em células

¹ Recebido para publicação em 16/09/2002. Aceito para publicação em 23/10/2003 (000987).

² Laboratório de Química, Bioquímica e Biologia Molecular de Alimentos, Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental, FCF/USP, Avenida Lineu Prestes, 580, bloco 14, CEP 05508-900, São Paulo-SP. E-mail: hojak@uso.br.

*A quem a correspondência deve ser enviada.

intactas, têm formatos e tamanhos diferenciados, tanto em relação ao grau de amadurecimento do fruto, quanto em relação ao cultivar [8, 17]. Além disso, foi visto que a superfície de grânulos isolados de banana verde era lisa, enquanto que a de grânulos de banana madura apresentava estriações, provavelmente devido ao resultado da ação de enzimas degradativas, que começaram a aparecer bem antes do climatério.

A degradação do amido ocorre através de um complexo mecanismo enzimático, onde as enzimas envolvidas podem coexistir em múltiplas formas e estar localizadas fora do plastídeo, o que dificulta o estabelecimento da via metabólica predominante [25]. As amilases, as fosforilases e as glicosidases atuam sobre o mesmo substrato, o amido, de maneira diferente, produzindo uma mistura de oligossacarídeos e açúcares solúveis. As α -amilases (EC 3.2.1.1) hidrolisam, ao acaso, as ligações α -1,4 da amilose e amilopectina, produzindo uma mistura de oligossacarídeos (dextrinas). A β -amilase (EC 3.2.1.2) atua somente na penúltima ligação da extremidade não redutora dos homopolissacarídeos de glicose, liberando maltose. As enzimas desramificadoras, que atuam nas ligações α -1,6, podem liberar maltotriose, maltose e outros oligossacarídeos, fornecendo substratos para a atuação de outras enzimas, até açúcares solúveis, com geração de energia para a manutenção do fruto. Durante o amadurecimento da banana, as α e β -amilases [1, 22], as fosforilases [18] e as α -1,4 e α -1,6-glicosidases [3,11] têm aumento de atividade, concomitante com a degradação do amido. Apesar de existirem evidências de que as amilases iniciam a degradação do amido da banana [12], as fosforilases não podem ser ainda descartadas, porque praticamente não existem trabalhos focalizando o assunto.

A via de síntese da sacarose está razoavelmente estabelecida para a banana. A sacarose fosfato-sintase (SPS) é a enzima-chave na síntese da sacarose, com aumento de atividade e de expressão concomitante ao acúmulo de sacarose [6, 19], durante o amadurecimento da banana. A participação da sacarose sintase (Suzy), enzima também capaz de sintetizar sacarose, está praticamente descartada neste processo na banana, já que tem a atividade e expressão diminuídas no período de acúmulo de sacarose [6, 20].

O metabolismo de carboidratos de plantas tem um mecanismo complexo de sinalização envolvendo açúcares e hormônios capazes de controlar enzimas envolvidas em síntese/degradação do amido e acúmulo de sacarose [12]. As giberelinas, as auxinas e as citocininas têm sido estudadas com particular interesse por funcionarem total ou parcialmente como retardadores da senescência dos frutos. VENDRELL [26] observou que quando fatias de banana foram infiltradas com auxinas, o amadurecimento da fruta foi retardado. PURGATTO et al. [22] demonstraram que fatias de banana infiltradas com ácido indolacético (AIA) tiveram seu amadurecimento retardado e algumas enzimas, como a β -amilase, tiveram seu perfil de atividade alterado durante o amadurecimento. Em geral, as giberelinas

apresentam efeito oposto ao do ácido abscísico (ABA) com relação ao aumento na síntese de hidrolases, responsáveis pelos processos degradativos de folhas e tecidos de frutos [7]. O ácido giberélico parece ter papel especialmente importante como regulador de enzimas hidrolíticas. Foi observado que o balanço entre os níveis de ácido giberélico e ácido abscísico endógenos controla a expressão gênica das α -amilases de sementes em germinação e, no caso da cevada, aumenta a transcrição dos genes e a atividade das α -amilases [23].

Devido à ausência de informações sobre o assunto, o objetivo deste trabalho foi verificar a influência do ácido giberélico exógeno na degradação do amido e na atividade das enzimas hidrolíticas do amido, através da infiltração de fatias de banana com GA₃ (0,1mM).

2 - MATERIAL E MÉTODOS

2.1 - Material

As bananas (*Musa spp.* cv Nanicão) foram obtidas no CEASA (SP), com aproximadamente 110 dias após a antese (dpa), no ponto de colheita comercial, sem terem sido submetidas à climatização com etileno. Os frutos foram escolhidos aleatoriamente de cerca de 10 pencas do mesmo estágio fisiológico.

2.2 - Métodos

2.2.1- Infiltração de fatias de banana com ácido giberélico

Os frutos foram lavados e depois imersos em solução de hipoclorito de sódio (1%) durante três minutos, para diminuir a contaminação superficial. Em seguida foram secos com papel absorvente e cortados na porção central com lâmina de aço inoxidável, em fatias de aproximadamente 6mm de espessura e as fatias com casca foram selecionadas por peso ($\pm 5g$). As infiltrações foram feitas em condições assépticas, em capela de fluxo laminar, submergindo as fatias tratadas em solução de manitol (120mM) juntamente com 0,1mM de ácido giberélico (Sigma). As fatias controle foram infiltradas apenas com manitol (120mM). O manitol foi utilizado para evitar o estresse osmótico das células, evitando, portanto, a perda de água. As infiltrações foram controladas pelo aumento de peso, sendo considerado satisfatório de 6 a 10%. As fatias foram acondicionadas em frascos de vidro de 500mL, contendo esferas de vidro para isolar as fatias da água contida no fundo dos frascos. A água foi colocada com o objetivo de manter a umidade relativa do ar em torno de 90% no interior do frasco. O ar que entrava nos frascos em fluxo constante (1L/h), foi mantido livre de CO₂ e em meio asséptico pela passagem em solução de KOH 20%. Todo material utilizado nas infiltrações foi autoclavado e/ou esterilizado com etanol 70%. O amadurecimento das fatias foi monitorado através das medidas de respiração (CO₂) e etileno, subjetivamente pela coloração da casca e o desenvolvimento de aroma de fruta madura. Com base na curva de respiração, as

fatias foram amostradas em intervalos de três dias até o pico climatérico, a partir do qual as coletas foram feitas todos os dias, até o completo amadurecimento dos dois grupos. As amostras foram descascadas, congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em ultrafreezer (- 80°C) até a utilização.

2.2.2. Medidas de CO₂ e etileno

O CO₂ e o etileno foram medidos por cromatografia gasosa utilizando um detector de ionização de chama (FID) para o etileno e um detector de condutividade térmica (TCD) para o CO₂. A coluna utilizada para medida dos gases foi a HP-PLOT (comprimento de 30m, espessura do filme: 40,0µm e diâmetro interno: 0,53mm). A injeção dos gases foi manual e realizada com uma seringa GAS Tigth, própria para injeção de gases. As amostras de gás foram retiradas de 4 frascos (1,4L) por grupo, que continham em média 60g de banana, lacrados por 1 hora. As medidas de CO₂ e de etileno foram feitas utilizando-se as mesmas fatias de banana durante todo o amadurecimento. O hélio foi utilizado como gás de arraste para ambas as análises. As condições cromatográficas para o etileno foram: temperatura isotérmica (forno): 30°C; temperatura do injetor: 200°C; temperatura do detector: 250°C; fluxo: 1mL/min; e volume de injeção: 5mL. Para o CO₂, as condições cromatográficas foram: temperatura isotérmica do forno: 30°C; temperatura do injetor/detector: 250°C, fluxo: 4mL/min, modo de injeção: split, e volume de injeção: 1mL. As medidas de CO₂ e etileno foram calculadas com base no volume livre do frasco, levando-se em consideração a massa de banana contida nos frascos de respiração. Os valores foram fornecidos em mg de CO₂.kg⁻¹.PF.h⁻¹ e em µl de etileno. kg⁻¹ PF.h⁻¹.

2.2.3 - Determinação de carboidratos

Os açúcares solúveis (glicose, frutose e sacarose) foram extraídos com etanol 80% a 80°C por três vezes e os sobrenadantes foram combinados. O etanol de uma alíquota foi evaporado por sistema a vácuo sob baixas temperaturas (*speed vac*) e o volume foi reconstituído com água. Os açúcares solúveis foram estimados em CLAE por cromatografia de troca iônica (DIONEX modelo DX500) acoplado com detector amperométrico de pulso, modelo ED40, utilizando a coluna CARBOPAC PA 1 (4 x 250mm). A fase móvel foi constituída de 100% de NaOH 18mM e o fluxo da fase móvel foi de 1,0mL/min. O doseamento do amido foi feito por método enzimático segundo descrito por CORDENUNSI & LAJOLO [6]. O amido foi solubilizado com hidróxido de sódio 0,5N, precipitado com etanol 80% e hidrolisado com amiloglicosidase. A glicose liberada foi determinada pelo sistema glicose oxidase/peroxidase/ABTS.

2.2.4 - Determinação da atividade amilásica total

A extração da proteína para atividade amilásica total foi realizada de acordo com GARCIA & LAJOLO [8],

onde cerca de 0,5g de amostra congelada de banana foi homogeneizada em 1,25mL de solução extratora no Turrax por 30 segundos em velocidade média. Os homogenatos foram centrifugados a 12.000g durante 30 minutos e a atividade foi medida no sobrenadante. O meio extrator era composto por tampão Tris-HCl 100mM (pH 7,0), contendo cisteína 20mM, benzamidina 1mM e PVP (40.000) 1%. O tampão Tris-HCl foi utilizado para inibir a atividade das glicosidases, evitando a interferência dessas enzimas sobre a atividade amilolítica [8]. A atividade amilolítica total foi medida pelo método iodométrico, de acordo com CARAWAY [5]. O meio de atividade continha 100µL de extrato enzimático e 1mL de solução de amido solúvel de batata (0,4mg/mL) estabilizado em tampão fosfato (pH 7,0). Após a incubação da amostra/substrato a 37°C por 30 minutos, a reação foi interrompida com 1mL da solução de iodeto 0,01N em meio fortemente ácido (HCl). Em seguida, a solução foi diluída com 4mL de água. A atividade amilásica foi estimada (a 660nm) medindo a cor azul formada pelo amido remanescente e a solução de iodeto. Uma unidade de atividade da enzima foi arbitrariamente definida como a quantidade de enzima presente em 1mL da amostra que hidrolisa 1mg de amido de batata a 37°C em 15min. A determinação de proteína foi feita segundo BRADFORD [4], utilizando soro albumina bovina (BSA) como padrão.

3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 - Respiração e etileno durante o amadurecimento da banana

A *Figura 1* mostra que, as diferenças no perfil de CO₂ do grupo tratado em relação ao grupo controle, não foram significativas durante todo o processo de amadurecimento. Estes resultados foram diferentes dos obtidos por VENDRELL [27], que observou um atraso no pico respiratório quando infiltrou GA₃ (0,1mM) em bananas inteiras. As metodologias de infiltração talvez possam explicar a diferença encontrada, pois VENDRELL [26, 27] utilizou o sistema de infiltração a vácuo (66cm de Hg/minuto). O elevado teor inicial de etileno, cerca de 0,5µL/Kg/h nas 6 primeiras horas de medida após o corte das fatias, encontrado por VENDRELL [26, 27], demonstra que a infiltração a vácuo causou um estresse muito maior no tecido do que o sistema utilizado neste trabalho, que foi a simples imersão. Os resultados apresentados na *Figura 1* deixam claro que não houve aumento significativo do etileno em consequência do corte e da infiltração, o que depõe a favor do método de infiltração por imersão. Em outros sistemas modelo, como por exemplo, na suspensão de células de pêra, foi observado que o ácido giberélico pode inibir a produção de etileno, reduzindo em até 33% o nível de etileno basal no meio de cultura tratado com 1mM GA₃ [2].

A *Figura 1* torna claro também que o ácido giberélico não afetou a produção de etileno, já que os perfis dos dois grupos foram muito semelhantes.

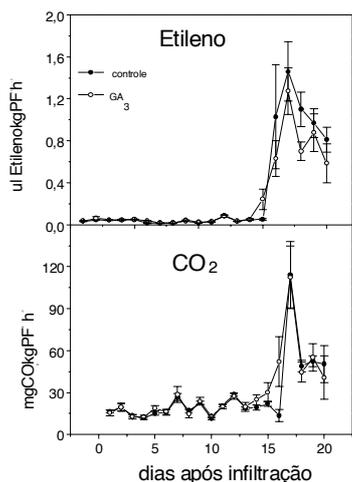


FIGURA 1. Curvas de etileno e respiração em fatias de banana tratadas com GA₃ (0,1mM GA₃ + 120mM manitol) comparadas ao grupo-controle (120mM manitol). Cada ponto representa a média de quadruplicata (4 jarros com 60g de fatias de banana por grupo) de determinação ± desvio padrão.

3.2 - Perfis de amido e açúcares solúveis durante o amadurecimento da banana

As amostras tratadas com GA₃ apresentaram atraso visível no amadurecimento, observado pela ausência de aroma de banana madura e pela cor da casca que permaneceu verde por mais tempo. O retardo na degradação da clorofila, causado pelo tratamento com ácido giberélico, já foi observado também em frutas cítricas [9], em manga [10], em morangos [14] e em salsa [13].

As amostras tratadas com GA₃ apresentaram redução na velocidade de degradação do amido, concomitante com o acúmulo de açúcares solúveis em relação às fatias controle, conforme resultados mostrados na Figura 2.

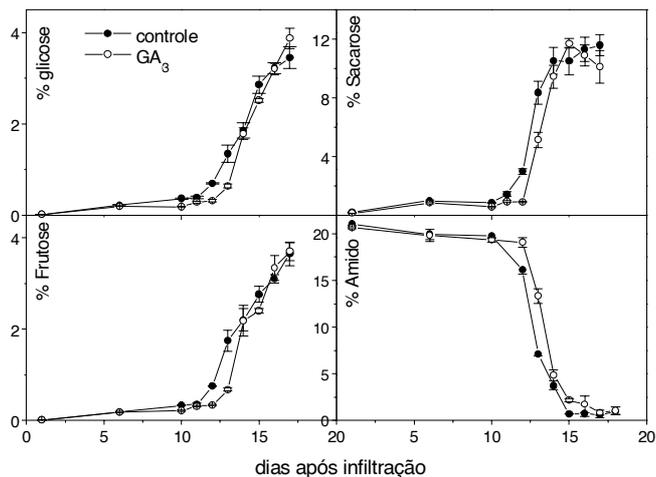


FIGURA 2. Perfil de açúcares solúveis e amido em fatias de banana tratadas com GA₃ (0,1mM GA₃ + 120mM manitol) comparadas às fatias controle (120mM manitol). Cada ponto representa a média de triplicata de extração ± desvio padrão.

A hipótese mais provável para estes resultados foi de que o hormônio poderia afetar as enzimas que degradam o amido, principalmente as amilases e, por consequência, a síntese dos açúcares solúveis, que dependem dos produtos da degradação do amido (maltose, dextrinas, glicose, etc.), para serem sintetizados. Assim, faz sentido que o início do acúmulo da sacarose, quantitativamente o principal açúcar solúvel da banana, também tenha se deslocado na mesma proporção. Uma vez iniciada a degradação do amido nas fatias tratadas com GA₃, os perfis de amido e de açúcares solúveis foram muito semelhantes aos do controle no final da degradação, mostrando que a influência exercida pelo GA₃ foi revertida cerca de 12 dias após o tratamento, pelo menos no que se refere aos carboidratos analisados.

A inexistência de literatura relacionando a influência de hormônios sobre a degradação de amido em frutos, torna difícil a comparação dos resultados aqui obtidos no que se refere ao amido, mas no que se refere aos açúcares solúveis, eles podem ser parcialmente comparados e são diferentes aos encontrados em que reduziram o conteúdo de sólidos solúveis totais em manga. Mas em frutos como o mirtilo [16], onde o GA₃ é o responsável pela indução da partenocarpia, o acúmulo de hexoses não foi influenciado e o desenvolvimento do fruto foi atrasado, quando comparado a frutos polinizados. Em nectarina [28] e em tangerina [15], o amadurecimento foi atrasado com a aplicação exógena de GA₃, em relação à coloração da casca, à manutenção da textura, enquanto que o conteúdo de sólidos solúveis da nectarina foi mantido.

O fato da produção de etileno e de CO₂ não terem sido afetadas pelo tratamento com GA₃, descarta a possibilidade de que as alterações no metabolismo dos carboidratos sejam devidas a mudanças na produção de etileno.

3.3 - Atividade amilolítica total

A Figura 3 mostra que houve um aumento da atividade amilásica total no grupo-controle logo no início da degradação do amido e outro no meio do processo, o que pode ser visto como uma soma de atividades de enzimas hidrolíticas diferentes ou de isoformas de uma mesma enzima, atuando em fases diferentes do amadurecimento.

A hipótese faz sentido, uma vez que elas atuam sobre substratos diferentes: a α -amilase sobre o grânulo de amido e a β -amilase sobre os produtos de degradação das α -amilases. Acredita-se que apenas as α -amilases atuem sobre o amido intacto [1, 21], apesar de não ser descartada a ação cooperativa das β -amilases neste processo [22]. Assim, o primeiro aumento de atividade poderia ser creditado às α -amilases e o segundo aumento à β -amilase. Apesar das fosforilases também utilizarem o amido como substrato, podendo, teoricamente, iniciar a sua degradação, não há relatos na literatura até o momento que comprovem que as fosforilases o façam. Além disso, não foi fornecido fósforo no meio de atividade, o que inviabiliza a ação das fosforilases.

ses no sentido de hidrólise do amido. Também as glicosidases estão parcialmente inibidas porque o meio extrator das enzimas era composto por Tris-HCl, que apresenta um efeito inibitório em relação às glicosidases.

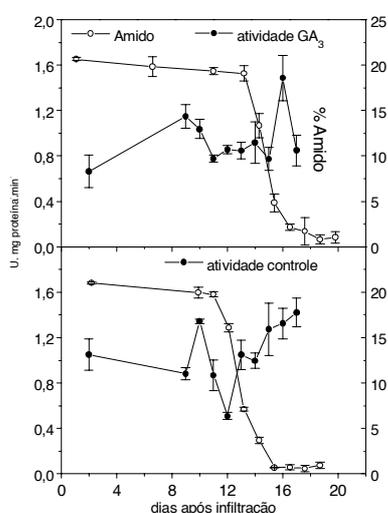


FIGURA 3. Perfil de atividade amilásica total específica em fatias de banana tratadas com ácido giberélico (0,1mM GA₃ + 120mM manitol) comparada às fatias controle (120mM manitol). Cada ponto representa a média de triplicata de extração ± desvio padrão.

Os perfis de atividade amilolítica total mostrados na Figura 3 relatam que as atividades das enzimas doseadas por este método, predominantemente α e β -amilases, foram afetadas pelo GA₃.

Os perfis de atividade, as atividades inicial e final e a atividade máxima dos dois picos encontrados em ambos os grupos, foram diferentes. O perfil do grupo controle mostra um pico de atividade nítido no dia 10, logo antes do início da degradação do amido (entre os dias 11 e 12), uma queda de atividade no dia 12 e logo após um aumento constante de atividade até o fim da amostragem (dia 18). Resultados anteriores mostram que este primeiro pico pode ser creditado à α -amilase [dados ainda não publicados] e o segundo à β -amilase [22]. No grupo-GA₃ existe um platô de atividade entre os dois picos e um nítido segundo pico com atividade diminuindo logo em seguida, enquanto nas amostras controle não foi observada nenhuma diminuição de atividade. Se o segundo pico for o relativo à β -amilase ou isoformas de α -amilases, que só aparecem em pleno processo de degradação do amido, a sua diminuição demonstra que a expressão destas enzimas, ou o desaparecimento de inibidores relativos a sua atividade, ou mesmo o aparecimento de um ativador de atividade, foi bastante afetada pelo tratamento com o hormônio. Estudos com mangas demonstraram que o GA₃ influenciou a atividade amilásica total [10] e, talvez em consequência disso, as frutas que foram tratadas com essa giberelina tiveram maior tempo de prateleira quando comparadas às que não receberam tratamento [10].

4 – CONCLUSÕES

O metabolismo amido-sacarose da banana foi afetado pelo tratamento com GA₃, tanto em relação à degradação do amido, quanto à síntese dos açúcares solúveis e à atividade de algumas enzimas que degradam o amido, possivelmente as α e β -amilases.

Novos estudos serão necessários no sentido de verificar a influência do hormônio sobre a atividade/expressão de algumas enzimas-chave na degradação do amido e na síntese da sacarose.

5 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] 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. and Food Chem.** v.50, n. 21, p.5781-5786, 2002.
- [2] BEN-ARIE, R.; FERGUSON, B. Ethylene production by growing and senescing pear fruit cell suspensions in response to gibberellin. **Plant Physiol.**, v.95, p.943-947, 1991.
- [3] BIERHALS, J. D. **Estudo da enzima desramificadora de amido tipo-isoamilase durante o amadurecimento de bananas (*Musa spp.*)**. São Paulo, 2002. 87p. Exame de Qualificação (Doutor em Ciência dos Alimentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo (USP).
- [4] 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.**, v.72, p.248-54, 1976.
- [5] CARAWAY, W. T. A stable starch substrate for the determination of amylase in serum and other body fluids. **American Journal of Clinical Pathology**, v.32, n.1, p.97-99, 1959.
- [6] CORDENUNSI, B. R.; LAJOLO, F. M. Starch breakdown during banana ripening: sucrose synthase and sucrose phosphate-synthase. **J. Agric. Food Chem.**, v.43, n.2, p.347-351, 1995.
- [7] DAVIES, P. J. **Plant Hormones: Physiology, biochemistry an molecular biology**. Boston: Kluewer Academic Publishers, 833p., 1995.
- [8] GARCIA, E. & LAJOLO, F.M. Starch transformation during banana ripening: the amylase and glucosidase behavior. **J. Food Sci.**, v.53, n.4, p.1181-1186, 1988.
- [9] GARCIALUIS, A.; HERREROVILLEN, A.; GUARDIOLA, J. L. Effect of application of gibberellic acid on late growth, maturation and pigmentation of the clementine mandarine. **Scientia Horticulturae**, v.49, n.(1-2), p. 71-82, 1992.
- [10] KHADER, S. E. S. A. Effect of preharvest application of GA₃ on postharvest behavior of mango fruits. **Scientia Horticulturae**, v.47, p.317-321, 1991.
- [11] KONISHI, Y.; HARADA, M.; D' INNOCENZO, M.; LAJOLO, M. F. Purification and characterization of soluble and cell wall-bound acid α -glucosidases of ripe yellow banana pulp. **J. Appl. Glycosci.**, v.48, n.1, p.19-25, 2001.
- [12] KOCH, K. E. Carbohydrate-modulated gene expression in plants. **Annu. Rev. Plant Physiol.**, v.47, n.509-540, 1996.
- [13] LERS, A.; JIANG, W.B.; LOMANIEC, E.; AHARONI, N. Gibberellic acid and CO₂ additive effect in retarding

- postharvest senescence of parsley. **J. Food Sci.**, v.63, n.1, p. 66-68, 1998.
- [14] MARTÍNEZ, G. A.; CHAVES, A. R.; and AÑÓN, M. C. Effect of exogenous application of gibberellic acid on color change and phenylalanine ammonia-lyase, chlorophyllase, and peroxidase activities during ripening of strawberry fruit. **J. Plant Growth Regul.**, v.15, p.139-146, 1996.
- [15] MARUR, C.J.; STENZEL, N.M.C.; RAMPAZZO, E.F.; SCHOLZ, M.B.S. Gibberellic acid (GA₃) and ripening of Ponkan and Montenegrina mandarin fruits. **Scientia Agrícola**, v.56, n.3, 1999.
- [16] MEDRANO, C. R. & DARNELL, L. R. Sucrose metabolism and fruit growth in parthenocarpic vs seeded blueberry (*Vaccinium ashei*) fruits. **Physiol. Plant.**, v. 99, p. 439-446, 1997.
- [17] MOTA, R. V. **Metabolismo amido-sacarose e determinação de açúcares solúveis em alguns cultivares de banana (*Musa spp.*)**. São Paulo, 1997. 75p. Tese de Mestrado (Mestre em Ciência dos Alimentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo (USP).
- [18] MOTA, R. V.; CORDENUNSI, B. R.; NASCIMENTO, J. R. O. N.; PURGATTO, E.; ROSSETTO, M. R. M.; LAJOLO, F. M. Activity and expression of banana starch phosphorylases during fruit development and ripening. **Planta**, v.216, p.325-333, 2002.
- [19] NASCIMENTO J.R.O., CORDENUNSI B.R., LAJOLO F.M. AND ALCOCER M.J.C. Banana sucrose-phosphate synthase gene expression during fruit ripening. **Planta**, n. 203, p. 283-288, 1997.
- [20] NASCIMENTO J.R.O, CORDENUNSI B.R. AND LAJOLO F.M. Sucrose synthase activity and expression during development and ripening in banana. **J. Plant Physiol.** v. 156, p. 605-611, 2000.
- [21] OATES, C. G; POWEL, A. D. Bioavailability of carbohydrate material stored in tropical fruit seeds. **Food Chem.**, v.56, n.4, p.405-414, 1996.
- [22] PURGATTO, E.; LAJOLO, F. M; NASCIMENTO, J. R. O.; CORDENUNSI, B. R. Inhibition of β -amylase activity, starch degradation and sucrose formation by IAA during banana ripening. **Planta**, v. 212, n.5-6, p.823-828, 2001.
- [23] ROGERS, S. W., ROGERS, J. C. Cloning and characterization of a gibberellin-induced Rnase expressed in barley aleurone cells. **Plant Physiol.**, Bethesda, v.119, p.1457-1464, 1999.
- [24] SEYMOUR G. B. Banana. In Seymour G. B., Taylor J. E., Tucker G. A., eds. **Biochemistry of Fruit Ripening**, Ed 2, Chapman & Hall, London, 1996.
- [25] STEUP, M. Starch degradation. In: Sumpf, P. K and Conn E. E. (eds). **Carbohydrates, in The biochemistry of plants. a comprehensive treatise.**, San Diego: Academic Press. v.14, p. 255-296, 1988.
- [26] VENDRELL, M. Reversion of senescence: effects of 2,4-dichlorophenoxyacetic and indoleacetic acid on respiration, ethylene production, and ripening of banana fruit slices. **Aust. J. Biol. Sci.**, v.22, p.601-610, 1969.
- [27] VENDRELL, M. Acceleration and delay of ripening in banana fruit tissue by gibberellic acid. **Aust. J. Biol. Sci.**, v. 23, p. 553-559, 1970.
- [28] ZILKAH, S.; LURIE, S.; LAPSKER, Z.; ZUTHI, Y.; DAVID, L.; YESSELSON, Y.; ANTMAN, S.; BEN-ARIE, R. The ripening and storage quality of nectarine fruits in response to preharvest application of gibberellic acid. **J. Hort. Science**, v. 72, n. 3, p. 355-362, 1997.

6 – AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à FAPESP pelo financiamento do projeto e pela bolsa de mestrado. Agradecem também ao Dr. Eduardo Purgatto e à Dra Priscila Zaczuk Bassinello pelo auxílio técnico e discussões.