

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
Programa de Pós-Graduação em Farmácia  
Área de Bromatologia

A degradação do amido da banana depende da ação combinada de  $\alpha$ -amilase e  $\beta$ -amilase em regiões de diferentes graus de cristalinidade do grânulo

Renata Shitakubo

Tese para a obtenção do grau de  
DOUTOR

Orientador  
Prof<sup>a</sup> Dra. Beatriz Rosana Cordenunsi

Co-Orientador  
Prof<sup>o</sup> Dr. João Roberto Oliveira do Nascimento

São Paulo  
2015

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
Programa de Pós-Graduação em Farmácia  
Área de Bromatologia

A degradação do amido da banana depende da ação combinada de  $\alpha$ -amilase e  $\beta$ -amilase em regiões de diferentes graus de cristalinidade do grânulo

Renata Shitakubo

Versão corrigida da Tese conforme resolução CoPGr 6018.

O original encontra-se disponível no Serviço de Pós Graduação da FCF/USP.

Tese para a obtenção do grau de  
DOUTOR

Orientador  
Prof<sup>a</sup> Dra Beatriz Rosana Cordenunsi

Co-Orientador  
Prof<sup>o</sup> Dr. João Roberto Oliveira do Nascimento

São Paulo

2015

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

S558d	<p>Shitakubo, Renata</p> <p>A degradação do amido da banana depende da ação combinada de <math>\alpha</math>-amilase e <math>\beta</math>-amilase em regiões de diferentes graus de cristalinidade do grânulo / Renata Shitakubo. - São Paulo, 2015. 138p</p> <p>Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental</p> <p>Orientador : Cordenunsi, Beatriz Rosana Co-orientador: Nascimento, João Roberto Oliveira do</p> <p>1. Bromatologia 2. Banana : Bioquímica de alimentos I. T. II. Cordenunsi, Beatriz Rosana, orientador. III. Nascimento, João Roberto Oliveira do, co-orientador.</p> <p style="text-align: right;">641 CDD</p>
-------	---

Renata Shitakubo

A degradação do amido da banana depende da ação combinada de  $\alpha$ -amilase e  $\beta$ -amilase em regiões de diferentes graus de cristalinidade do grânulo

Comissão Julgadora da  
Tese para obtenção do Título de DOUTOR

Prof. Dra. Beatriz Rosana Cordenunsi  
Orientador/presidente

---

1o. examinador

---

2o. examinador

---

3o. examinador

---

4o. examinador

São Paulo, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2015.

Aos meus pais, Ossamu e Márcia

Ao meu namorado Kadu

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Ossamu e Márcia pelo apoio, incentivo e estrutura para mais essa etapa da minha vida.

Ao meu namorado, Kadu pelo apoio, paciência e companheirismo durante esse período e em todos os outros.

A Profa Dra. Beatriz Cordenunsi pela confiança para esse trabalho e por todos esses anos, pelas oportunidades, pelos ensinamentos, pela amizade e pela orientação.

Ao Prof. Dr. João Roberto do Nascimento Oliveira pelos conselhos e co-orientação.

A Fernanda Peroni Okita pela amizade, pelos ensinamentos, pela companhia em todos os momentos desse trabalho, por toda a ajuda para a finalização desse trabalho, muito obrigada.

Aos técnicos e funcionários do laboratório Márcia, Lúcia, Tânia, Elias e Lurdinha, obrigada por todos esses anos e pela ajuda sempre que precisei.

Aos funcionários do departamento Edilson, Mônica, Cleo e Roberta, pela ajuda nos momentos em que precisei.

Aos professores do Laboratório de Química, Bioquímica e Biologia Molecular de alimentos Dr. João Paulo Fabi, Dr. Eduardo Purgatto, Dra. Nelza Hassimotto pelas conversas, ajudas e conselhos que me foram dados.

Aos amigos de ontem, hoje e que sempre estão comigo Raphael Verceze, Maria Carolina Pita, Juliana Feldman, Angelo Garbi, Ana Paula Oliveira, Ligia Ferraz, Murilo Biazzi, Clarissa Ferraz, Ana Carolina Garbi, Vinicius Deppman obrigada por estarem sempre presentes.

Aos amigos que compartilharam dessa etapa comigo Juliana Nunes da Cruz, Talita Pimenta, Afonso Maia e Manuela Siqueira, muito obrigada por estarem sempre presentes, por todos os momentos de ajuda e de alegria.

Aos amigos Roberta Ghedini, Mariana Souto, Ana Marla Duarte, Victor Castro, Samira Prado e Gabriela Schmitz obrigada pelos momentos de risadas, conversas, a hora do café, almoços, e momentos que se estenderam para fora da Universidade.

A Maria do Carma, José Maurício, Marcela, Luis Felipe, Luana e Rodrigo muito obrigada por todos os momentos em que vocês tiveram e estão presentes.

Aos amigos/colegas aqui estão e os que por aqui passaram Geovana Sagrado, Ana Claudia e Marcelo Sansone, Daniela Seixas, Elisa Brasili, Isabel Louro, Claudinéia Soares, Bruna Lima, Florence Castelan, Lorenzo Saraiva, Eric Tobaruela, Sabrina Broetto, Lais Moro, Vanessa Bonato.

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

A Dra. Jay-Lin Jane da Iowa State University - EUA e Profa. Dra. Renata Antoun Simão da COPE - UFRJ pelo apoio e permissão concedida, de ambos, para realização de parte deste trabalho em seus laboratórios.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	23
1.1. Banana.....	23
1.2. Metabolismo amido-sacarose – degradação dos grânulos de amido .....	25
<b>2. JUSTIFICATIVA</b> .....	35
<b>CAPÍTULO 1</b> .....	36
<b>OBTENÇÃO DA PROTEÍNA <math>\alpha</math>-AMILASE RECOMBINANTE</b> .....	36
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	37
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	39
<b>2.1. MATERIAL</b> .....	39
2.1.1. Para expressão da proteína $\alpha$ -amilase recombinante em <i>Pichia Pastoris</i> : .....	39
2.1.2. Para expressão da proteína recombinante em <i>Escherichia coli</i> :.....	40
<b>2.2. MÉTODOS</b> .....	40
2.2.1. Propagação de clones de <i>Pichia pastoris</i> transformados e indução da expressão de proteína recombinante .....	40
2.2.2. Purificação parcial do extrato proteico.....	41
2.2.3. Ensaio de atividade com substrato específico.....	41
2.2.4. Determinação do teor de proteína por Bradford .....	41
2.2.5. Extração de RNA e síntese do cDNA .....	42
2.2.6. Análise qualitativa e quantitativa de ácidos nucleicos .....	42
2.2.7. Produção de $\alpha$ -amilase recombinante em <i>P. pastoris</i> .....	42
2.2.8. Clonagem e expressão em sistema eucarioto <i>Pichia pastoris</i> .....	43
2.2.9. Propagação da cultura de <i>E.coli</i> transformada e a indução da expressão do gene de $\alpha$ -amilase de banana .....	43
2.2.10. Purificação e Solubilização dos corpos de inclusão .....	44
2.2.11. Purificação da proteína $\alpha$ -amilase recombinante por cromatografia de afinidade .....	45
2.2.12. Eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	45
2.2.13. Western blotting .....	45
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	47
3.1. Sistema de expressão <i>Pichia pastoris</i> .....	47
3.2. Inserção do gene da $\alpha$ -amilase em <i>Pichia pastoris</i> .....	48
3.3. Indução e Expressão da proteína recombinante $\alpha$ -amilase em <i>Escherichia coli</i> .....	50
3.4. Purificação da proteína $\alpha$ -amilase recombinante .....	55
<b>CAPÍTULO 2</b> .....	61

<b>ENZIMAS RELACIONADAS COM A DEGRADAÇÃO DE AMIDO DE BANANA</b> .....	61
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	62
1.1. Degradação do amido na banana.....	62
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	68
<b>2.1. Material:</b> .....	68
2.1.1. Obtenção de amostras de banana em diferentes graus de amadurecimento para isolamento do amido:.....	68
<b>2.2. Métodos:</b> .....	68
2.2.1. Medida de Etileno .....	68
2.2.2. Caracterização dos açúcares solúveis .....	69
2.2.3. Determinação do teor de amido .....	69
2.2.4. Isolamento dos grânulos de amido de banana .....	70
2.2.5. Análises para quantificação de fósforo em grânulos de amido de banana .....	70
2.2.5.1. Determinação de fósforo total em grânulos de amido de banana .....	70
2.2.5.2. Determinação de fósforo em grânulos de amido de banana por Ressonância Magnética Nuclear de Fósforo ( <sup>31</sup> P-RMN).....	70
2.2.6. Identificação das proteínas ligadas a superfície do grânulos de amido....	71
2.2.6.1. Eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	71
2.2.6.2. Western blotting.....	71
2.2.6.3. Microscopia de Imunofluorescência .....	72
2.2.7. Procedimentos para a obtenção das proteínas hidrolíticas ligada aos grânulos de amido .....	73
2.2.7.1. Extração de proteína ligada ao grânulo de amido por eletroforese em condições não desnaturantes (PAGE-NATIVO). .....	73
2.2.7.2. Extração das proteínas ligadas aos grânulos de amido.....	73
2.2.7.3. Extração de proteínas por eletroeluição.....	74
2.2.7.4. Sequenciamento de proteínas .....	74
2.2.8. Ensaios in vitro com enzimas comerciais e grânulos de amido isolados de banana.....	75
2.2.8.1. Desproteínização dos grânulos de amido .....	75
2.2.8.2. Hidrólise dos grânulos de amido com as enzimas $\alpha$ -amilase e $\beta$ -amilase .....	75
2.2.8.3. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	76
2.2.8.4. Análise dos produtos de hidrólise das enzimas $\alpha$ -amilase e $\beta$ -amilase.....	76
2.2.8.5. Microscopia de Força Atômica (MFA) .....	76
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	77
3.1. Amostras de banana em diferentes estágios de amadurecimento .....	77

3.2. Quantificação dos carbonos fosforilados.....	78
3.3. Análise das proteínas ligadas à superfície dos grânulos de amido de banana.....	82
3.4. Hidrólise dos grânulos de amido com enzimas comerciais .....	94
<b>4. CONCLUSÕES</b> .....	121
<b>5. REFERÊNCIA BIBLIOGRAFICAS</b> .....	122

## ÍNDICE DE TABELA

<b>TABELA 1:</b> TEOR DE FÓSFORO TOTAL (%) EM DIFERENTES ESTÁGIOS E TAMANHOS DE GRÂNULOS DE AMIDO DE BANANA COMPARANDO O MÉTODO QUÍMICO COM O MÉTODO DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE FÓSFORO.....	79
<b>TABELA 2:</b> QUANTIDADE DE FÓSFORO EM CADA CARBONO FOSFORILADO, EM DIFERENTES ESTÁGIOS DE AMADURECIMENTO DA BANANA.....	81
<b>TABELA 3:</b> IDENTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS, PROTEÍNAS REFERENTES A BANDAS DO PAGE-NATIVO (FIGURA 27A SETA N° 1).....	90
<b>TABELA 4:</b> IDENTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS, PROTEÍNAS REFERENTES A BANDAS DO PAGE-NATIVO (FIGURA 27A SETA N° 2).....	91
<b>TABELA 5:</b> IDENTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS, PROTEÍNAS REFERENTES A BANDAS DO PAGE-NATIVO (FIGURA 27A SETA N°3).....	92
<b>TABELA 6:</b> IDENTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS, PROTEÍNAS REFERENTES A BANDAS DO PAGE-NATIVO (FIGURA 27B). ....	93

## ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1: (A) MODELO DE ESTRUTURA INTERNA DO GRÂNULO DE AMIDO COM VISUALIZAÇÃO DOS ANÉIS DE CRESCIMENTO E HILO, (B) MODELO DA CADEIA DE AMILOPECTINA; (C) ESTRUTURA DA AMILOPECTINA, (D) ESTRUTURA DA AMIOLOSE.....	24
<b>FIGURA 2:</b> MODELOS DE DEGRADAÇÃO DE AMIDO. (A) MODELO DE DEGRADAÇÃO DE AMIDO EM GERMINAÇÃO DE CEREAIS, ADAPTADO DE BERTOLDO E ANTRANIKIAN 2002. (B) MODELO DE DEGRADAÇÃO DE AMIDO TRANSITÓRIO EM FOLHAS, ONDE QUADRO A REPRESENTA A CADEIA DE AMILOPECTINA; O QUADRO B REPRESENTA O MODELO DE FOSFORILAÇÃO DO AMIDO PELA GLICANO-ÁGUA-DIQUINASE (GWD) E DA FOSFOGLICANO-ÁGUA-DIQUINASE (PWD); O QUADRO C A HIDRÓLISE DO GRÂNULO PELA B-AMILASE (BAM) E O QUADRO D HIDRÓLISE DOS GRÂNULOS PELA ISOAMILASE (ISA) ADAPTADO DE ZEEMAN ET AL (2007).....	26
FIGURA 3: MODELO DE DEGRADAÇÃO DE AMIDO EM FOLHAS DE <i>ARABIDOPSIS</i> . ADAPTADO DE SMITH 2012.....	32
FIGURA 4: VETOR DE EXPRESSÃO PPICZ B (INVITROGEN, 2010),.....	39
FIGURA 5: VETOR DE EXPRESSÃO PPICZA. (INVITROGEN, 2010).....	39
FIGURA 6: VETOR DE EXPRESSÃO PET45B(+) (NOVAGEN, 2009).....	40
FIGURA 7: ELETROFORESE EM SDS-PAGE, 12% DE POLIACRILAMIDA, CORADO COM COMASSIE. AMOSTRAS: PRECIPITADO RESSUSPENDIDO EM TAMPÃO HEPES-NAOH 20MM PH 7, CISTEÍNA 10 MM, CACL2 1MM, BENZAMIDINA 1 MM APÓS A LISE DA CÉLULA DA <i>PICHIA PASTORIS</i> . A SETA INDICA A POSSÍVEL BANDA DA PROTEÍNA RECOMBINANTE A- AMILASE DE BANANA. ....	47
<b>FIGURA 8:</b> ELETROFORESE EM AGAROSE 1% (P/V), PREPARADO EM TAMPÃO TAE 1X (TRIS-ACETATO-EDTA), PH 8,0, CORADO COM SYBERSAFE GREEN (1:10000) E VISUALIZADO EM LUZ ULTRAVIOLETA. AS BANDAS INDICADAS COM A SETA INDICAM A INSERÇÃO DO GENE A-AMILASE NO VETOR PPICZAB, APÓS A REAÇÃO DE PCR COM OS PRIMERS 5´AOX E 3´AOX. ....	49
<b>FIGURA 9:</b> ELETROFORESE EM SDS-PAGE, 10% DE ACRILAMIDA, CORADO COM COMASSIE. CONSTRUÇÃO PET45B(+):AMY5 INDUZIDA COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE IPTG PARA A EXPRESSÃO DA PROTEÍNA (A - 0,1 MM DE IPTG; B - 0,5 MM DE IPTG; C - 1 MM DE IPTG) PM – PADRÃO DE PESO MOLECULAR; NI – MEIO DE CULTURA NÃO INDUZIDO; I – MEIO DE CULTURA INDUZIDO A SETA INDICA A POSIÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE EXPRESSA.....	51
FIGURA 10: WESTERN BLOTTING COM ANTICORPO ANTI-A-AMILASE DE BANANA. CONSTRUÇÃO PET45B(+):AMY5 INDUZIDA COM 0,5 MM DE IPTG PARA A EXPRESSÃO DA PROTEÍNA (PM – PADRÃO DE PESO MOLECULAR; A – ALÍQUOTA DE 2 HORAS DE INDUÇÃO; B – ALÍQUOTA DE 4 HORAS DE INDUÇÃO).....	52
FIGURA 11: ELETROFORESE EM SDS-PAGE, 10% DE ACRILAMIDA, CORADA COM COMASSIE. CONSTRUÇÃO PET45B(+):AMY5 A DIFERENTES TEMPERATURAS E AGITAÇÃO DO MEIO	

DE CULTURA PARA A EXPRESSÃO DA PROTEÍNA. PM – PADRÃO DE PESO MOLECULAR, T0 – TEMPO ZERO, I – MEIO DE CULTURA INDUZIDO, NI MEIO DE CULTURA NÃO INDUZIDO. AS SETAS INDICAM A EXPRESSÃO DA PROTEÍNA. ....	53
FIGURA 12: WESTERN BLOTTING COM ANTICORPO ANTI-A-AMILASE DE BANANA. CONSTRUÇÃO PET45B(+): AMY5 INDUZIDA A DIFERENTES TEMPERATURAS E AGITAÇÃO DO MEIO DE CULTURA PARA A EXPRESSÃO DA PROTEÍNA. PM – PADRÃO DE PESO MOLECULAR.....	54
FIGURA 13: ELETROFORESE EM SDS-PAGE, 10% DE ACRILAMIDA, CORADA COM COMASSIE. CONSTRUÇÃO PET45B(+): AMY5 INDUÇÃO COM 0,5 MM DE IPTG A 37°C POR 4 HORAS. PM – PADRÃO DE PESO MOLECULAR. A SETA INDICA A PROVÁVEL BANDA PROTEICA RELATIVA À EXPRESSÃO DA PROTEÍNA DA A-AMILASE.....	55
<b>FIGURA 14– ROMPIMENTO DA PAREDE CELULAR COM SONICADOR E LISOZIMA:</b> ELETROFORESE EM SDS-PAGE, 10% DE ACRILAMIDA, CORADA COM COMASSIE. CONSTRUÇÃO PET45B(+):AMY5 INDUZIDA COM 0,5 MM DE IPTG A 37°C EM 6 HORAS DE INDUÇÃO. PM – PADRÃO DE PESO MOLECULAR. A SETA INDICA A LINHA EM QUE HOUVE A PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA. ....	56
FIGURA 15– ROMPIMENTO DA PAREDE CELULAR COM BUGBUSTER®: ELETROFORESE EM SDS-PAGE, 10% DE ACRILAMIDA, CORADA COM COMASSIE. CONSTRUÇÃO PET45B(+):AMY5 INDUZIDA COM 0,5 MM DE IPTG A 37°C EM 6 HORAS DE INDUÇÃO. PM – PADRÃO DE PESO MOLECULAR. A SETA INDICA A LINHA EM QUE HOUVE A PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA.....	57
FIGURA 16: ELETROFORESE EM SDS-PAGE, 10% DE ACRILAMIDA, CORADA COM COMASSIE. CONSTRUÇÃO PET45B(+):AMY5 INDUZIDA COM 0,5 MM DE IPTG A 37°C EM 6 HORAS PARA A EXPRESSÃO DA PROTEÍNA (PM – PADRÃO DE PESO MOLECULAR; 1 – EXTRATO PROTEICO DA CULTURA NÃO INDUZIDO; 2 – EXTRATO PROTEICO DA CULTURA INDUZIDO). A SETA INDICA A PROTEÍNA RECOMBINANTE DE 33 KDA. ....	58
FIGURA 17: SEQUÊNCIA DE NUCLEOTÍDEOS E AMINOÁCIDOS DA A-AMILASE DE BANANA (GENBANK AF533648-1). EM NEGRITO ESTÁ A SEQUÊNCIA DE NUCLEOTÍDEOS QUE COMPÕE A CONSTRUÇÃO NO CLONE, VERIFICADA PELO MÉTODO DE SANGER. EM AMARELO ESTÁ A SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS DA PROTEÍNA RECOMBINANTE VERIFICADA POR ESPECTROMETRIA DE MASSA. EM VERMELHO OS RESÍDUOS ENVOLVIDOS NO SÍTIO ATIVO E COM A LIGAÇÃO DE SUBSTRATO SÃO INDICADOS.....	59
FIGURA 18: MODELO DE GRADAÇÃO DE AMIDO TRANSITÓRIO EM FOLHAS DE <i>ARABDOPSIS</i> . ADAPTADO DE SILVER ET AL.,2014). ....	67
FIGURA 19: FLUXOGRAMA DOS ENSAIOS DE HIDRÓLISE COM HIDROLASES.....	76
FIGURA 20: PERFIL DA PRODUÇÃO DE ETILENO DURANTE O AMADURECIMENTO DOS FRUTOS DE BANANA. A SETA INDICA O INÍCIO DO CLIMATÉRIO DO FRUTO. ....	77
FIGURA 21: PERFIL DE AÇÚCARES SOLÚVEIS DURANTE O AMADURECIMENTO DE FRUTOS DE BANANA (LADO DIREITO). PERFIL DE DEGRADAÇÃO DE AMIDO DURANTE O	

AMADURECIMENTO DE FRUTOS DE BANANA (LADO ESQUERDO). AS SETAS INDICAM AS AMOSTRAS SELECIONADAS PARA A EXTRAÇÃO DOS GRÂNULOS DE AMIDO. ....	78
<b>FIGURA 22:</b> ESPECTRO DE <sup>31</sup> P-RMN APÓS A HIDRÓLISE DE 1 G DE AMIDO DE BANANA EM DIFERENTES ESTÁGIOS DE AMADURECIMENTO E IDENTIFICAÇÃO DOS CARBONOS FOSFORILADOS. A - ESTÁGIO VERDE (3 DPC) NO DESLOCAMENTO QUÍMICO DE 5.263 PPM SE REFERE AO C3 E NOS DESLOCAMENTOS QUÍMICOS DE 4.993 PPM E 4.786 PPM SE REFERE AO C6. B - ESTÁGIO INTERMEDIÁRIO (6 DPC) NO DESLOCAMENTO QUÍMICO DE 5.268 PPM SE REFERE AO C3 E NOS DESLOCAMENTOS QUÍMICOS DE 4.839 PPM E 4.693 PPM SE REFERE AO C6. C - ESTÁGIO INTERMEDIÁRIO (7 DPC) NO DESLOCAMENTO QUÍMICO DE 5.296 PPM SE REFERE AO C3 E NOS DESLOCAMENTOS QUÍMICOS DE 4.858 PPM E 4.704 PPM SE REFERE AO C6. D - ESTÁGIO MADURO (9 DPC) NO DESLOCAMENTO QUÍMICO DE 5.266 PPM SE REFERE AO C3 E NOS DESLOCAMENTOS QUÍMICOS DE 4.914 PPM E 4.744 PPM SE REFERE AO C6. O NAD FOI USADO COMO REFERÊNCIA INTERNA NO DESLOCAMENTO QUÍMICO DE -10.365 PPM.....	80
<b>FIGURA 23:</b> ELETROFORESE EM SDS-PAGE, 10% DE ACRILAMIDA, CORADO COM COMASSIE G-250. PROTEÍNAS EXTRAÍDAS DA SUPERFÍCIE DE AMIDO ISOLADO DE BANANA. (A) EXTRAÇÃO COM TAMPÃO E TEMPERATURA CONTROLADA; P – PADRÃO DE PESO MOLECULAR; 1 – 20 MG DE AMIDO NO ESTÁGIO VERDE; 2 – 20 MG DE AMIDO NO ESTÁGIO INTERMEDIÁRIO; 3 – 20 MG DE AMIDO NO ESTÁGIO MADURO. (B) EXTRAÇÃO POR ELETROFORESE; P – PADRÃO DE MOLECULAR; 1 – 40 MG DE AMIDO NO ESTÁGIO VERDE; 2 – 40 MG DE AMIDO NO ESTÁGIO MADURO. ....	83
<b>FIGURA 24:</b> (A) WESTERN BLOTTING COM ANTICORPO ANTI GWD DE <i>ARABIDOPSIS</i> ; (B) WESTERN BLOTTING COM ANTI PWD DE BATATA. PROTEÍNAS EXTRAÍDAS DA SUPERFÍCIE DOS GRÂNULOS DE AMIDO DE BANANA. P – PADRÃO DE PESO MOLECULAR; 1 – PROTEÍNAS ISOLADAS DA SUPERFÍCIE DE 40 MG DE AMIDO DE BANANA VERDE; 2 – PROTEÍNAS ISOLADAS DA SUPERFÍCIE DE 40 MG DE AMIDO DE BANANA MADURA. ....	83
<b>FIGURA 25:</b> MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA (ESQUERDA) E MICROSCOPIA ÓPTICA (DIREITA) EM AMIDO DE BANANA VERDE E BANANA MADURA. FOI USADO ANTICORPO ESPECÍFICO ANTI-GWD DE <i>ARABIDOPSIS</i> . AUMENTO: 40X. ....	85
<b>FIGURA 26:</b> MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA (ESQUERDA) E MICROSCOPIA ÓPTICA (DIREITA) EM AMIDO DE BANANA VERDE E BANANA MADURA. FOI USADO ANTICORPO ESPECÍFICO ANTI-PWD DE BATATA. AUMENTO: 40X.....	86
<b>FIGURA 27:</b> MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA (ESQUERDA) E MICROSCOPIA ÓPTICA (DIREITA) EM AMIDO DE BANANA VERDE E BANANA MADURA. FOI USADO ANTICORPO ESPECÍFICO ANTI-A AMILASE DE BANANA. AUMENTO: 40X. ....	87
<b>FIGURA 28:</b> MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA (ESQUERDA) E MICROSCOPIA ÓPTICA (DIREITA) EM AMIDO DE BANANA VERDE E BANANA MADURA. FOI USADO ANTICORPO ESPECÍFICO ANTI-B AMILASE DE BANANA. AUMENTO: 40X. ....	88
<b>FIGURA 29:</b> ELETROFORESE PAGE-NATIVO, 10% DE POLIACRILAMIDA, 1 MM DE ESPESSURA COM 0,1% DE AMILOPECTINA, EXTRAÇÃO DE 2 G DE AMIDO EM AMBOS. A – EXTRAÇÃO	

DAS PROTEÍNAS DOS GRÂNULOS DE AMIDO POR ELETROELUIÇÃO; B – EXTRAÇÃO DAS PROTEÍNAS DOS GRÂNULOS DE AMIDO COM AGITAÇÃO E TEMPERATURA. ....	89
FIGURA 30: GRÂNULOS DE AMIDO ISOLADOS DE BANANA VERDE (3 DPC), SEM DESPROTEINIZAÇÃO E SEM TRATAMENTO (CONTROLE 1) VISUALIZADOS POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV). A – QUADRADO VERMELHO 1 INDICA A REGIÃO DE AUMENTO DA IMAGEM B; B – QUADRADO VERMELHO 2 INDICA A REGIÃO DE AUMENTO DA IMAGEM C. ....	94
FIGURA 31: GRÂNULOS DE AMIDO ISOLADOS DE BANANA VERDE (3 DPC), DESPROTEINIZADOS E SUBMETIDOS AO TRATAMENTO COM TAMPÃO POR 72 HORAS (CONTROLE 2) VISUALIZADOS POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV). A – QUADRADO VERMELHO INDICA A REGIÃO DE AUMENTO DA IMAGEM B. ....	95
FIGURA 32: GRÂNULOS DE AMIDO ISOLADOS DE BANANA VERDE (6 DPC), SEM DESPROTEINIZAÇÃO E SEM TRATAMENTO (CONTROLE 1) VISUALIZADOS POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV). A – QUADRADO VERMELHO 1 INDICA A REGIÃO DE AUMENTO DA IMAGEM B E QUADRADO VERMELHO 2 INDICA A REGIÃO DE AUMENTO DA IMAGEM C. ....	96
<b>FIGURA 33:</b> GRÂNULOS DE AMIDO ISOLADOS DE BANANA VERDE (6DPC), DESPROTEINIZADOS E SUBMETIDOS AO TRATAMENTO COM TAMPÃO POR 72 HORAS (CONTROLE 2) E VISUALIZADOS POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV). A – QUADRADO VERMELHO 1 INDICA A REGIÃO DE AUMENTO DA IMAGEM B, QUADRADO VERMELHO 2 INDICA A REGIÃO DE AUMENTO DA IMAGEM C. ....	97
<b>FIGURA 34</b> IMAGENS OBTIDAS POR MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA DE AMIDO ISOLADO DE BANANA NANIÇÃO CONTROLE 2 TRATADO COM TAMPÃO COM 6 DIAS PÓS-COLHEITA. (A) IMAGEM DE ERRO. AS IMAGENS DE TOPOGRAFIA (B), ERRO (C) E FASE (D) FORAM OBTIDAS DA ÁREA DEMARCADA EM (A). EM MAIOR RESOLUÇÃO, AS IMAGENS DE TOPOGRAFIA (E), ERRO (F) E FASE (G) REVELAM DETALHES DA ESTRUTURA DO GRÂNULO, COMO O TAMANHO DOS BLOQUETES (132-240 NM) DEMARCADOS EM (E). OS GRÁFICOS DE LINHA APRESENTADOS EM (D <sub>1</sub> ) E (G <sub>1</sub> ) DESTACAM AS DIFERENÇAS DE FASE DAS ÁREAS ANALISADAS EM (D) E (G), RESPECTIVAMENTE. ....	99
<b>FIGURA 35:</b> IMAGENS OBTIDAS POR MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA DE AMIDO ISOLADO DE BANANA NANIÇÃO CONTROLE1 TRATADO COM TAMPÃO COM 6 DIAS PÓS-COLHEITA. IMAGENS DE TOPOGRAFIA (A) E (D) E AS RESPECTIVAS IMAGENS DE ERRO (B) E (E), E FASE (C) E (F). OS GRÁFICOS DE LINHA APRESENTADOS EM (C <sub>1</sub> ) E (D <sub>1</sub> ) REVELAM DIFERENÇAS DE FASE E DETALHES DE PROFUNDIDADE NAS ÁREAS DEMARCADAS EM (C) E (D), RESPECTIVAMENTE. ....	101
FIGURA 36: GRÂNULOS DE AMIDO ISOLADOS DE BANANA VERDE (3 DPC), DESPROTEINIZADOS E SUBMETIDOS A TRATAMENTO COM TAMPÃO E ENZIMA A-AMILASE DE PORCINA PANCREÁTICA (SIGMA) POR 48 HORAS E E VISUALIZADOS POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV). A – QUADRADO VERMELHO INDICA A REGIÃO DE AUMENTO DA IMAGEM B. ....	103

**FIGURA 37:** GRÂNULOS DE AMIDO ISOLADOS DE BANANA VERDE (6 DPC), DESPROTEINIZADOS E SUBMETIDOS A TRATAMENTO COM TAMPÃO E ENZIMA A-AMILASE DE PORCINA PANCREÁTICA (SIGMA) POR 48 HORAS E VISUALIZADOS POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV). A – QUADRADO VERMELHO 1 INDICA A REGIÃO DE AUMENTO DA IMAGEM B, QUADRADO VERMELHO 2 INDICA A REGIÃO DE AUMENTO DA IMAGEM C E QUADRADO VERMELHO 3 INDICA A REGIÃO DE AUMENTO DA IMAGEM D. ....104

**FIGURA 38:** GRÂNULOS DE AMIDO ISOLADOS DE BANANA VERDE (3 DPC) DESPROTEINIZADOS E SUBMETIDOS A TRATAMENTO COM TAMPÃO E ENZIMA A-AMILASE DE PORCINA PANCREÁTICA (SIGMA) POR 72 HORAS E VISUALIZADOS EM UM MICROSCÓPIO ELETRÔNICO DE VARREDURA (MEV). A – INDICA A REGIÃO DE AUMENTO DA IMAGEM B; B – O QUADRADO VERMELHO 1 INDICA A REGIÃO DE AUMENTO DA IMAGEM C; C – QUADRADO VERMELHO 2 INDICA A REGIÃO DE AUMENTO DA IMAGEM D; E – AUMENTO DA IMAGEM D. ....106

**FIGURA 39:** GRÂNULOS DE AMIDO ISOLADOS DE BANANA VERDE (3 DPC) DESPROTEINIZADOS E SUBMETIDOS A TRATAMENTO COM TAMPÃO E ENZIMA A-AMILASE PORCINA PANCREÁTICA (SIGMA) POR 72 HORAS E VISUALIZADOS POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV). B – AUMENTO DA IMAGEM A, QUADRADO VERMELHO 1 INDICA A REGIÃO DE AUMENTO DA IMAGEM C, QUADRADO VERMELHO 2 INDICA A REGIÃO DE AUMENTO DA IMAGEM E, QUADRADO VERMELHO 3 INDICA A REGIÃO DE AUMENTO DA IMAGEM F E QUADRADO VERMELHO 4 INDICA A REGIÃO DE AUMENTO DA D. ....107

**FIGURA 40:** GRÂNULOS DE AMIDO ISOLADOS DE BANANA VERDE (6 DPC) DESPROTEINIZADOS E SUBMETIDOS A TRATAMENTO COM TAMPÃO E ENZIMA A-AMILASE PORCINA PANCREÁTICA (SIGMA) POR 72 HORAS E VISUALIZADOS POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV). A – QUADRADO VERMELHO 1 INDICA A REGIÃO DE AUMENTO DA IMAGEM B E QUADRADO VERMELHO 2 INDICA A REGIÃO DE AUMENTO DA IMAGEM E; C APROXIMAÇÃO DA IMAGEM B; D APROXIMAÇÃO DA IMAGEM C; E – QUADRADO VERMELHO 3 INDICA A REGIÃO DE AUMENTO DA IMAGEM G E QUADRADO VERMELHO 4 INDICA A REGIÃO DE AUMENTO DA IMAGEM F. ....108

**FIGURA 41:** GRÂNULOS DE AMIDO ISOLADOS DE BANANA VERDE (6 DPC) DESPROTEINIZADOS E SUBMETIDOS A TRATAMENTO COM TAMPÃO E ENZIMA A-AMILASE DE PORCINA PANCREÁTICA (SIGMA) POR 72 HORAS E VISUALIZADOS POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV). A – QUADRADO VERMELHO 1 INDICA A REGIÃO DE AUMENTO DA IMAGEM B E QUADRADO VERMELHO 2 INDICA A REGIÃO DE AUMENTO DA IMAGEM H; B – QUADRADO VERMELHO 3 INDICA A REGIÃO DE AUMENTO DA IMAGEM C, QUADRADO VERMELHO 4 INDICA A REGIÃO DE AUMENTO DA IMAGEM D, QUADRADO VERMELHO 5 INDICA A REGIÃO DE AUMENTO DA IMAGEM F; E – APROXIMAÇÃO DA IMAGEM D; G – APROXIMAÇÃO DA IMAGEM F. ....109

FIGURA 42: IMAGENS OBTIDAS POR MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA DE AMIDO ISOLADO DE BANANA NANICÃO COM 6 DIAS PÓS-COLHEITA, TRATADOS COM A-AMILASE DE PORCINE PANCREÁTICA. (A) IMAGEM DE ERRO DE UMA ÁREA CONTENDO 3 GRÂNULOS DE AMIDO DIFERENTES. AS IMAGENS DE TOPOGRAFIA (B) E (E) E AS RESPECTIVAS IMAGENS DE ERRO (C) E (F), E FASE (D) E (G) FORAM OBTIDAS EM MAIOR RESOLUÇÃO E REVELAM DETALHES DA ESTRUTURA DO GRÂNULO HIDROLISADO. O GRÁFICO DE LINHA APRESENTADO EM (B<sub>1</sub>) DESTACA A DIFERENÇA DE ALTURA DA ÁREA ANALISADA EM (B). .....111

FIGURA 43: GRÂNULOS DE AMIDO ISOLADOS DE BANANA VERDE (3 DPC) DESPROTEINIZADOS E SUBMETIDOS A TRATAMENTO COM TAMPÃO E ENZIMA B-AMILASE DE BATATA DOCE (SIGMA) POR 72 HORAS E VISUALIZADOS POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV). B – APROXIMAÇÃO DA IMAGEM A, QUADRADO VERMELHO INDICA O AUMENTO DA IMAGEM C; D – APROXIMAÇÃO DA IMAGEM C; E – APROXIMAÇÃO DA IMAGEM D.....113

**FIGURA 44:** GRÂNULOS DE AMIDO ISOLADOS DE BANANA VERDE (3 DPC) DESPROTEINIZADOS E SUBMETIDOS A TRATAMENTO COM TAMPÃO E ENZIMA B-AMILASE DE BATATA DOCE (SIGMA) POR 72 HORAS E VISUALIZADOS POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV). A – QUADRADO VERMELHO 1 INDICA A REGIÃO DE AUMENTO DA IMAGEM B; C – QUADRADO VERMELHO 2 INDICA A REGIÃO DE AUMENTO DA IMAGEM D.....114

FIGURA 45: GRÂNULOS DE AMIDO ISOLADOS DE BANANA VERDE (6 DPC) DESPROTEINIZADOS E SUBMETIDOS A TRATAMENTO COM TAMPÃO E ENZIMA B-AMILASE DE BATATA DOCE (SIGMA) POR 72 HORAS E VISUALIZADOS POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV). A – QUADRADO VERMELHO INDICA A REGIÃO DE AUMENTO DA IMAGEM B; C – APROXIMAÇÃO DA IMAGEM B; D – APROXIMAÇÃO DA IMAGEM C.....116

FIGURA 46: GRÂNULOS DE AMIDO ISOLADOS DE BANANA VERDE (6 DPC) DESPROTEINIZADOS E SUBMETIDOS A TRATAMENTO COM TAMPÃO E ENZIMA B-AMILASE DE BATATA DOCE (SIGMA) POR 72 HORAS E VISUALIZADOS POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV). A – QUADRADO VERMELHO INDICA A REGIÃO DE AUMENTO DA IMAGEM B; C – APROXIMAÇÃO DA IMAGEM B; D – QUADRADO VERMELHO 2 INDICA A REGIÃO DE AUMENTO DA IMAGEM E; F – APROXIMAÇÃO DA IMAGEM E; G – APROXIMAÇÃO DA IMAGEM F.....117

**FIGURA 47:** GRÂNULOS DE AMIDO ISOLADOS DE BANANA VERDE (6 DPC) DESPROTEINIZADOS E SUBMETIDOS A TRATAMENTO COM TAMPÃO E ENZIMA B-AMILASE DE BATATA DOCE (SIGMA) POR 72 HORAS E VISUALIZADOS POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV). A – QUADRADO VERMELHO 1 INDICA A REGIÃO DE AUMENTO DA IMAGEM B, QUADRADO VERMELHO 2 INDICA A REGIÃO DE AUMENTO DA IMAGEM C; D – APROXIMAÇÃO DA IMAGEM B.....118

FIGURA 48: IMAGENS OBTIDAS POR MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA DE AMIDO ISOLADO DE BANANA NANICÃO COM 6 DIAS PÓS-COLHEITA, TRATADOS COM B-AMILASE DE BATATA DOCE (SIGMA). IMAGENS DE ERRO (A), (C) E (E) E AS RESPECTIVAS IMAGENS DE CONTRASTE DE FASE (B), (D) E (F) REVELAM DETALHES DA ESTRUTURA DO GRÂNULO HIDROLISADO. O GRÁFICO DE LINHA APRESENTADO EM (B<sub>1</sub>, D<sub>1</sub> E F<sub>1</sub>) REVELAM DIFERENÇAS DE FASE DAS ÁREAS ANALISADAS EM (B), (D) E (F), RESPECTIVAMENTE.  
.....120

## LISTA DE ABREVIATURAS

ATP	5'-Trifosfato de adenosina (Adenosine 5'-triphosphate)
B.O.D.	Demanda bioquímica de oxigênio
BPNPG7	p-Nitrofenil-maltoheptaosideo bloqueado (Blocked p-nitrophenyl-maltoheptaoside)
BSA	Albumina de soro bovina
CEAGESP	Central de Entrepósitos e Armazéns Gerais do Estado de São Paulo
DPC	Dias pós-colheita
DTT	Ditiotreitol (tio-1,4-dimercapto-2,3-butanodiol)
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético (ethylenediaminetetraacetic acid)
FID	Detector de ionização de chama (Fire ionization detector)
GWD	glicano-água-diquinase (Glucan-Water Dikinase)
HEPES	N-[2-hydroxietil]-piperazina-N'-[ácido 2-ethanosulfônico] (N-[2-hydroxyethyl]-piperazine-N'-[2-ethanesulphonic acid])
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida (polyacrylamide gel electrophoresis)
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MFA	Microscopia de Força Atômica
TRIS	(Hidroximetil) aminometano (Hydroxymethylaminomethane)
<i>P. pastoris</i>	<i>Pichia pastoris</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
PWD	Fosfoglicano-água-diquinase (Phosphoglucan-Water Dikinase)
<sup>31</sup> P-RMN	Ressonância Magnética Nuclear de fósforo
NAD	Dinucleótido de nicotinamida e adenina
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Resolução
U	Unidades de enzima
TAE	Tampão Tris-Acetato-EDTA

PCR	Reação em cadeia da polimerase
IPTG	Isopropyl $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside
rpm	Rotação por minuto
D2O	Água Deuterada
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
PBS	Tampão Fosfato Salino
PBST	Tampão Fosfato Salino com Tween 20
P	Fósforo
Pi	Fósforo Inorgânico

## RESUMO

SHITAKUBO, R. **A degradação do amido da banana depende da ação combinada de  $\alpha$ -amilase e  $\beta$ -amilase em regiões de diferentes graus de cristalinidade do grânulo.** 2015. 138 páginas. (Tese de Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

A banana é considerada um bom modelo de estudo para a transformação amido-sacarose, já que acumula um teor alto de amido durante o desenvolvimento, que é degradado durante o amadurecimento. Já foram detectadas em polpa de banana atividade e proteína relativa a várias enzimas supostamente envolvidas no processo de degradação do amido. Entre elas, a  $\alpha$ -amilase, a  $\beta$ -amilase, a amido fosforilase e as glucano-água-diquinases (GWD). Estas enzimas estão envolvidas em dois processos distintos de degradação de amido em plantas: o dependente da ação inicial da  $\alpha$ -amilase e o dependente da fosforilação do grânulo pela GWD e PWD e posterior ação da  $\beta$ -amilase. A dificuldade do estabelecimento da participação efetiva de cada enzima no processo de degradação do amido está associada a muitos fatores, entre eles a não-correlação entre atividade e real envolvimento em um processo, e a acessibilidade da enzima ao seu substrato. Aliado ao estudo da morfologia do grânulo de amido e suas modificações sofridas durante o processo de degradação que ocorre durante o amadurecimento do fruto, estudos *in vitro* que simulem a ação da enzima sobre o seu substrato poderiam ser mais efetivos no estabelecimento da real ação de cada enzima sobre o suposto substrato. Tentativas no sentido de obter as proteínas relativa à degradação não foram bem sucedidas. Assim, os ensaios de grânulos de amido isolados versus enzimas foram feitos com  $\alpha$ -amilase e  $\beta$ -amilase comerciais. O grau de fosforilação da amilopectina nas posições Glic-6 e Glic-3 foi determinado, condição necessária para o início da degradação do grânulo pela  $\beta$ -amilase. Os resultados mostraram que os grânulos de amido isolados de bananas recém colhidas, ou verdes, já estão fosforilados e as enzimas responsáveis por esta fosforilação estão associadas aos grânulos. Após 72 h de incubação dos grânulos de amido com as enzimas hidrolítica, os grânulos foram separados do tampão contendo as enzimas e os produtos de hidrólise. Os sobrenadantes foram analisados por cromatografia líquida acoplada a detector amperométrico e os grânulos por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e microscopia de força atômica (MFA). Os resultados mostraram que a  $\alpha$ -amilase hidrolisa preferencialmente regiões amorfas dos grânulos, com predominância de amilose, expondo as regiões mais cristalinas dos anéis de crescimento, enquanto que a  $\beta$ -amilase parece atuar preferencialmente nas regiões cristalinas dos grânulos, degradando os bloquetes, que são formados por amilopectina. Pode-se concluir que ambas as enzimas parecem ser importantes no processo de degradação do amido da banana, com diferentes especificidades.

**Palavras-chave:** *Musa acuminata*, carboidrato, amadurecimento, enzimas hidrolíticas, microscopia.

## ABSTRACT

SHITAKUBO, R. **The banana starch degradation depends on the combined action of  $\alpha$ -amylase and  $\beta$ -amylase in regions of different degrees of crystallinity of the granules.** 2015. 138 páginas. (Tese de Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Banana is considered a good model to study the starch-sucrose metabolism, since it accumulates a high starch content during development, which is degraded during fruit ripening. It has been detected in banana pulp some proteins and activities of several enzymes supposedly involved in starch degradation process. Among them,  $\alpha$ -amylase,  $\beta$ -amylase, starch phosphorylase and glucan-water-dikinases (GWD). These enzymes are involved in two separate processes of starch degradation in plants: the initial action of  $\alpha$ -amylase dependent, and the starch granule phosphorylation by GWD and PWD enzymes and subsequent action of  $\beta$ -amylase. The difficulty of establishing the effective participation of each enzyme in the starch degradation process is associated with many factors, including the lack of correlation between real activity and involvement in the process, and accessibility of the enzyme to its substrate. Allied to study the morphology of the starch granule and its modifications suffered during the process of degradation, which occurs during the fruit ripening, in vitro studies that simulate the action of the enzyme on its substrate could be more effective in establishing the real action of a given enzyme on the argued substrate. However, attempts to obtain the proteins related to the degradation process were unsuccessful. Thus, assays of isolated starch granules versus enzymes were made with commercial  $\alpha$ -amylase and  $\beta$ -amylase enzymes. The degree of phosphorylation of amylopectin in the Gluc-6 and Gluc-3 positions was determined, a necessary condition for the start of degradation by  $\beta$ -amylase enzyme. The results showed that the starch granules isolated from freshly harvested bananas, or green, are already phosphorylated and the enzymes responsible for this phosphorylation is associated with the starch granules surface. After 72 h incubation of the starch granules with the hydrolytic enzymes, the granules were separated from the buffer containing the enzymes and the hydrolysis products. The supernatants were analyzed by liquid chromatography coupled with amperometric detector and the granules were visualized by scanning electron microscopy (SEM) and atomic force microscopy (AFM). The results showed that the  $\alpha$ -amylase preferentially hydrolyzes amorphous regions of the granule, especially amylose, exposing more crystalline regions of the growth rings, whereas  $\beta$ -amylase appears to act preferentially on crystalline regions of the granule, degrading blocklets that consist of amylopectin. It can be concluded that both enzymes appear to be important in the banana starch degradation process, with different specificities.

**Keywords:** *Musa acuminata*, carbohydrate, ripening, hydrolytic enzymes, microscopy

## 1. INTRODUÇÃO

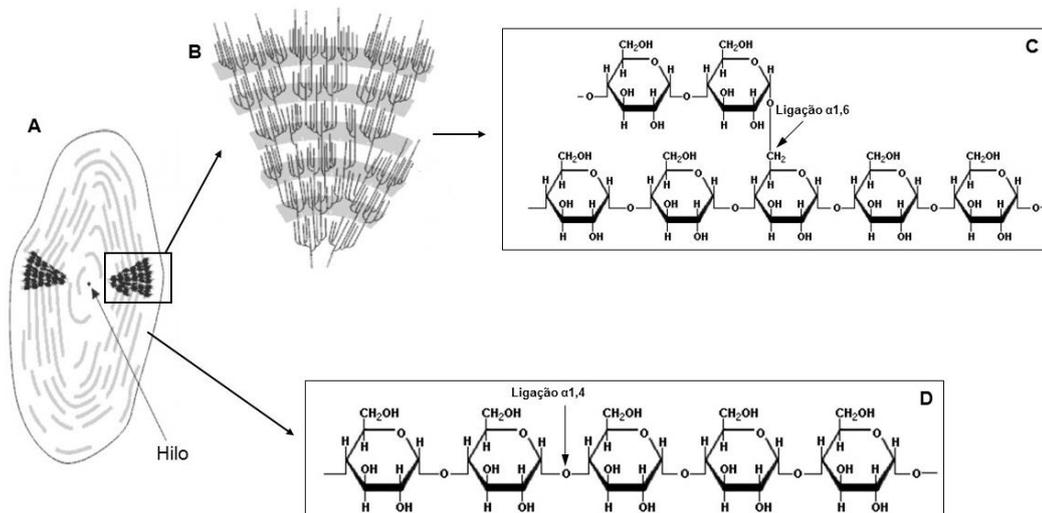
### 1.1. Amido de banana

A banana é um fruto climatérico, cujo amido acumulado durante o desenvolvimento (~12 a 35% do peso fresco da polpa) (SOARES et al., 2011) é rapidamente degradado durante a fase de amadurecimento, restando teores que variam, de 1 a 15%, dependendo da cultivar, no fruto completamente maduro. Como consequência, os açúcares solúveis se acumulam na polpa praticamente na mesma proporção que o amido é degradado (12 a 20%) (CORDENUNSI E LAJOLO, 1995; NASCIMENTO et al., 2006).

O amido é acumulado no fruto na forma de estruturas semi-cristalinas conhecidas como grânulos de amido que, majoritariamente são compostos por amilose e amilopectina, em proporções em torno de 20:80 (BULÉON et al., 1998).

A amilose (Figura 1A) é uma molécula praticamente linear, formada por unidades de  $\alpha$ -D-glicose unidas entre si por ligações  $\alpha$ -(1-4), tendo, porém, certo grau de ramificação em  $\alpha$ -(1-6) em sua estrutura (FRENCH, 1973; BULÉON et al., 1998; HOOVER, 2001). As ligações glicosídicas na configuração  $\alpha$ -(1,4), conferem à amilose uma estrutura helicoidal, na qual os grupos hidroxil-hidrofílicos estão voltados para o exterior da molécula e os grupos hidroxil-hidrofóbicos voltados para o interior. Essa conformação permite a complexação da amilose com moléculas apolares, como álcoois, lipídeos, e iodeto (HOOVER, 2001).

A amilopectina (Figura 1B), por sua vez, apresenta alto peso molecular e uma estrutura altamente ramificada (até 6%) na posição  $\alpha$ -(1-6), com peso molecular médio da ordem de  $10^7$ - $10^9$ . (WHISTLER E BeMILLER, 1997; BULÉON et al., 1998). A estrutura fina da amilopectina tem sido assunto de pesquisas durante os últimos anos. Vários modelos estruturais têm sido propostos para explicar como as cadeias unitárias agregam-se para proporcionar estrutura altamente ramificada, além de estudos envolvendo medidas de comprimento médio de cadeias e comprimento das cadeias internas e externas (WANG E WHITE, 1994; MYERS et al., 2000; FRANCO et al., 2002).



**Figura 1:** (A) Modelo de estrutura interna do grânulo de amido com visualização dos anéis de crescimento e hilo, (B) Modelo da cadeia de amilopectina; (C) Estrutura da amilopectina, (D) Estrutura da amilose.

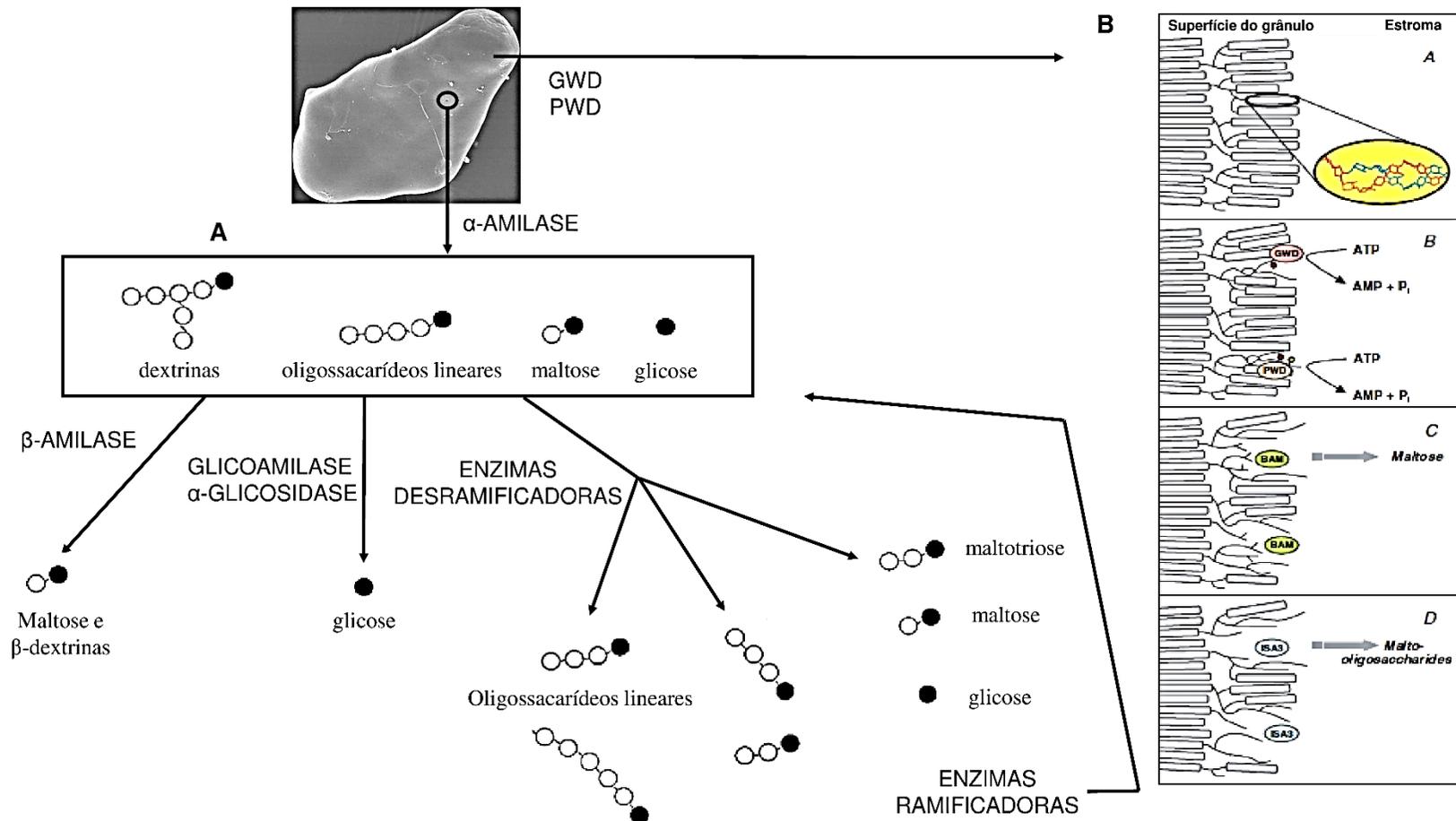
Os grânulos de amido são organizados em estruturas semicristalinas e amorfas, formando camadas. As frações lineares das cadeias de amilopectina estão envolvidas na formação das lamelas cristalinas, uma vez que as frações ramificadas do polímero são responsáveis pela formação das regiões amorfas. Repetidas e alternadas unidades de lamelas cristalinas e amorfas formarão os bloquetes, que apresentam tamanhos variados de 20 a 500 nm, dependendo do tipo do amido e da localização no grânulo (GALLANT, BOUCHET, BALDWIN, 1997). Em 2004, Ridout et al. definiram que os bloquetes são compostos por lamelas cristalinas de amilopectina imersos em uma matriz amorfa de amilose, que tem a capacidade de absorver mais água e inchar mais do que os bloquetes. Ridout et al. (2006), Parker, Kirby e Morris. (2008) e Peroni-Okita et al. (2015) estudaram grânulos de amido imobilizados em resina, que foram seccionados e visualizados por Microscopia de Força Atômica (MFA) e verificaram que a região central do grânulo é estruturalmente diferente das regiões mais externas. O interior do grânulo parece absorver menos água do que as demais regiões e é composto por bloquetes de tamanhos maiores (80 a 200 nm). Os bloquetes embebidos na matriz amorfa irão formar anéis concêntricos (denominados anéis de crescimento), irradiando da região central do grânulo, próximo ao hilum, até a superfície. Essas características de amilose e amilopectina, bem como o grau de cristalinidade e teor de água estrutural presente no amido tem um importante papel na resistência do grânulo na hidrólise enzimática (GALLANT, BOUCHET, BALDWIN, 1997; PERONI-OKITA et al., 2010, 2013, 2015; SOARES et al., 2011).

A estrutura do grânulo de amido também foi amplamente investigada por difração de raio-X de amplo ângulo (*wide-angle X-ray diffraction (WAXD)*) (CARDOSO et al., 2007; CHEETHAM & TAO, 1998; GALLANT et al., 1982; GLARING, KOCH, & BLENNOW, 2007; HOOVER, 2001; SHUJUN et al., 2008). Dependendo do empacotamento das duplas hélices da amilopectina, o amido pode ser classificado em alomorfo do tipo A ou B (BULÉON, COLONNA E BALL, 1998). O amido do tipo A é mais comumente encontrado em amidos de cereais, manga e tapioca e o padrão tipo B é comumente encontrado em amidos de tubérculos, e em amidos com alto teor de amilose. O padrão tipo C, que consiste de uma mistura de alomorfos tipo A e B, pode ser encontrado em amido de banana de diferentes cultivares e leguminosas (BULÉON, COLONNA, E BALL, 1998; BULÉON, GERARD, et al., 1998; THYS et al., 2008; PERONI-OKITA et al., 2010, 2013; SOARES et al., 2011).

## **1.2. Metabolismo amido-sacarose – degradação dos grânulos de amido**

Várias são as vias metabólicas e enzimas nos tecidos vegetais capazes de metabolizar o amido que é sintetizado exclusivamente por eucariotos fotossintetizantes (BALL E MORREL, 2003). Durante sua síntese, ocorre a participação de diversas isoformas da amido-sintase, havendo ainda, a participação de enzimas ramificadoras e desramificadoras em etapas subsequentes (MUKERJEA, YU, ROBYT, 2002). O amido pode ser transitório, sintetizado e degradado no cloroplasto das folhas, ou de reserva como o sintetizado em amiloplastos de órgãos e estruturas de armazenamento ou frutos (KOSSMANN E LLOYD, 2000). A conversão do amido a açúcares solúveis (sacarose, glicose e frutose) envolve várias enzimas em mais de uma via metabólica, representando um exemplo clássico de heterogeneidade da atividade enzimática (AGAMA-ACEVEDO et al., 2013).

A hidrólise completa do amido é resultado da ação conjunta de várias enzimas (Figura 2) e vem sendo estudado, ao longo da germinação de sementes de cereais, enquanto as vias de degradação de células de tecidos vegetais vivos e a participação de cada uma destas enzimas na hidrólise do amido permanecem pouco conhecidas (BECK E ZIEGLER, 1989; SARIKAYA et al., 2000). As principais enzimas hoje conhecidas envolvidas no processo de degradação do amido em vegetais, são as  $\alpha$ -amilases, as  $\beta$ -amilases, as amido-fosforilases, as enzimas desramificadoras, a glucano-água-diquinase (GWD) e a fosfoglucano-água-diquinase (PWD).



**Figura 2:** Modelos de degradação de amido. (A) Modelo de degradação de amido em germinação de cereais, adaptado de Bertoldo e Antranikian 2002. (B) modelo de degradação de amido transitório em folhas, onde quadro A representa a cadeia de amilopectina; o quadro B representa o modelo de fosforilação do amido pela Glicano-água-diquinase (GWD) e da Fosfoglicano-água-diquinase (PWD); o quadro C a hidrólise do grânulo pela β-amilase (BAM) e o quadro D hidrólise dos grânulos pela isoamilase (ISA) adaptado de Zeeman et al (2007).

**As  $\alpha$ -amilases** (EC 3.2.1.1), ou 1,4- $\alpha$ -D-glicanohidrolases, possuem atividade endoamilolítica hidrolisando aleatoriamente as ligações glicosídicas  $\alpha$ -(1,4) da amilose e amilopectina produzindo uma mistura de oligossacarídeos, maltose, glicose e dextrinas, podendo ser encontrada em animais, plantas, fungos e bactérias (Figura 2A).

São membros da família das amilases ou família 13 das glicosídeo hidrolases (GH-13), classificação esta, baseada na similaridade das sequências de aminoácidos (HENRISSAT E BAIROCH, 1996). Embora diferentes tipos de enzimas sejam capazes de liberar, *in vitro*, glicanos solúveis a partir de grânulos de amido purificados, acredita-se que a única enzima capaz de fazê-lo *in planta*, seja a  $\alpha$ -amilase (Figura 2A). Ela parece apresentar papel central no processo de hidrólise do amido por possuir atividade endo-amilolítica, promovendo alterações marcantes no grânulo de amido e fornecendo ou aumentando a disponibilidade de substrato para outras enzimas degradativas. É a enzima responsável por iniciar a degradação dos grânulos de amido nos cereais (PREISS, 1982; BECK E ZIEGLER, 1989; IRVING, SHINGLETON, HURST, 1999). As  $\alpha$ -amilases apresentam estrutura tridimensional, com quatro regiões relacionadas ao sítio catalítico e ao sítio de ligação ao substrato altamente conservadas em diferentes  $\alpha$ -amilases (PRAKASH E JAISWAL, 2010; CANGANELLA, ANDRADE, ANTRANIKIN, 1994). A estrutura básica consiste de uma cadeia polipeptídica única dobrada em três domínios A, B e C. O sítio ativo é localizado na interface entre o domínio A e o domínio B (MACGREGOR, JANEČEK, SVENSSON, 2001; KUMAR, 2010; MÓTYÁN et al., 2011; JANEČEK, SVENSSON, MACGREGOR, 2014).

Vários membros da família das  $\alpha$ -amilases formam ligações com íons cálcio, necessárias para a manutenção da rigidez estrutural entre domínios, que requerem no mínimo um íon para cada molécula da enzima. O cálcio não está envolvido na ligação do substrato ou na hidrólise deste, já que ele está localizado fora do sítio ativo, porém guarda proximidade das regiões catalíticas (VIERIA-JUNIOR, 2001). Na sua ausência, a formação do complexo enzima-substrato poderia gerar um estresse conformacional, que resultaria no colapso da estrutura do centro ativo.

A expressão da  $\alpha$ -amilase e a sua regulação são temas bastante estudados em cereais, com papel central entre os eventos bioquímicos na germinação de sementes, fornecendo a energia necessária ao embrião. Esta degradação é iniciada pela indução

da  $\alpha$ -amilase, responsável pela clivagem das ligações  $\alpha$ -1,4- endoglicolíticas da amilose e amilopectina. No entanto, a completa degradação do amido requer ainda a ação de outras enzimas glicolíticas (HUANG et al., 1990; SUTLIFF, DAITA, SHARMA, 1991; SUBBARAO, DATTA E SHARMA, 1998).

Algumas isoformas da  $\alpha$ -amilase já foram identificadas, tais como a AMY2 em cevada e a AMY1 e AMY3 em *Arabidopsis* (STANLEY, 2002). Em amido de arroz já foram identificadas e caracterizadas mais de vinte isoformas de  $\alpha$ -amilase (ASATSUMA et al., 2006). As massas moleculares das isoformas de  $\alpha$ -amilase variam, de 32 kDa em trigo (SINGH E KAYASTHA, 2014), 43 kDa em feijão (KOSHIBA E MINAMIKAWA, 1981), 45 kDa em cevada (LIU et al., 2012) e a 46 kDa em banana (VIEIRA-JUNIOR et al., 2006).

**As  $\beta$ -amilases** (EC 3.2.1.2), ou 4-alfa-D-glicano maltohidrolases, são exohidrolases que fazem parte da família 14 das glicosil hidrolases que atuam a partir das extremidades não-redutoras dos glicanos, liberando moléculas de  $\beta$ -maltose. Plantas superiores podem conter um ou mais genes de cada classe codificando para um grande número de  $\beta$ -amilases no genoma dessas plantas (ZEEMAN, KOSSMANN E SMITH, 2010).

Já foram encontradas algumas isoformas de  $\beta$ -amilase (BAM1, BAM2, BAM3, BAM4) em *Arabidopsis*, sendo que a BAM4 não apresentou atividade catalítica. O tamanho encontrado para as isoformas de  $\beta$ -amilase varia de 55 a 67 kDa (FULTON et al., 2008).

A  $\beta$ -amilase participa do processo de mobilização do amido durante a germinação das sementes de cereais. A enzima é acumulada durante o processo de desenvolvimento das sementes de cevada e permanece ligada aos grânulos de amido, sendo considerada a isoforma específica do endosperma (BECK E ZIEGLIER, 1989).

Já foi detectada uma isoforma presente em órgãos vegetativos como folhas e raízes (ZIEGLIER, 1999). Em maçãs e em tubérculos de batata em desenvolvimento, a enzima apresenta padrão similar de localização, sendo encontrada predominantemente ao redor dos grânulos de amido no interior dos amiloplastos (ZHANG E WANG, 2002).

**As amido-fosforilases** (EC. 2.4.1.1), catalisam a conversão reversível das ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,4 nas extremidades não redutoras de polímeros de glicanos

liberando  $\alpha$ -D-glicose-1-fosfato (Glic-1P) (SCHUPP E ZIEGLIER, 2004). Duas formas de amido-fosforilase podem ser encontradas em vegetais, uma forma plastidial e a outra citosólica (ALBRECHT et al., 2001).

As **Enzimas desramificadoras** hidrolisam ligações  $\alpha$ -1,6-glicanos nas ramificações e são essenciais para a mobilização completa dos grânulos de amido em plantas. Duas classes de desramificadoras são responsáveis pela desramificação das ligações  $\alpha$ -1,6 das moléculas de amilopectina: as pululanases (EC 3.2.1.41) e as isoamilases (EC 3.2.1.68). As mais comumente encontradas em plantas são as isoamilases que podem atuar tanto no sentido de síntese quanto de degradação de amido, o que dificulta o entendimento de qual isoforma está operante no processo de degradação (SMITH, ZEEMAN e SMITH, 2005).

Em *Arabidopsis* estão presentes as isoamilases e uma dextrina-limite, e em folhas de *Arabidopsis* a sua ausência não parece afetar a velocidade de degradação do amido (SMITH, ZEEMAN e SMITH, 2005). A isoforma da isoamilase conhecida como ISA3 parece estar envolvida na degradação de amido em folhas de *Arabidopsis*, removendo os pontos de ramificação diretamente da superfície do grânulo. Neste modelo, a ação da ISA3 ocorre concomitante com a  $\beta$ -amilase, GWD e PWD (ZEEMAN, KOSSMANN E SMITH, 2010).

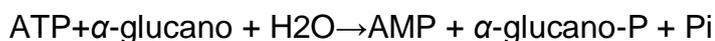
**As Enzimas Glicano-água-diquinase (GWD - EC 2.7.9.4) e Fosfoglicano-água-diquinase (PWD – EC 2.7.9.5)** atuam na fosforilação dos carbonos 6 e 3, respectivamente, das moléculas de D-glicose da amilopectina, dando acesso às enzimas hidrolíticas como a  $\beta$ -amilase (Figura 2B).

Os primeiros artigos relacionados à GWD nomearam uma proteína desconhecida supostamente relacionada ao metabolismo do amido como sendo a proteína R1 (RITTE et al., 2000; REIMANN et al., 2002). Posteriormente, RITTE et al., (2006) e Glaring, Koch, Blennow, (2007), estabeleceram ser a proteína R1 a enzima responsável pela transferência do  $\beta$ -fosfato proveniente da Adenosina Trifosfato (ATP) para os resíduos glicosil nas posições C<sub>3</sub> e C<sub>6</sub>, na presença de água, numa reação do tipo diquinase, sendo denominada água-glicano diquinase (glucan water dikinase – GWD) (E.C. 2.7.9.4).

A GWD atua nos substratos  $\alpha$ -poliglicano, utilizando ATP e H<sub>2</sub>O, produzindo  $\alpha$ -poliglicano-P, Adenosina Monofosfato (AMP) e ortofosfato (KÖTTING et al., 2010). A função da GWD seria a de fosforilar as moléculas de carbono 6 da D-glicose das

cadeias de amilopectina que compõe os grânulos de amido mediando a transição dos glicanos de uma forma altamente ordenada (cristalina) para uma forma menos ordenada e hidratada (HEJAZI et al., 2008; RITTE et al., 2003), permitindo a ação  $\beta$ -amilolítica sobre as duplas cadeias da amilopectina parcialmente desordenadas pela molécula de fosfato (Figura 2B).

Homólogos da proteína GWD foram relatados em uma variedade de plantas: em tubérculos de batata-doce e inhame, sementes de milho e cevada e em banana (RITTE et al., 2000). Isto sugere que a GWD está presente e exerce uma função geral em todo o reino vegetal, embora algumas plantas, por exemplo, milho e cevada, que acumulam carbono na forma de amido de reserva, produzam amido com baixa ou nenhuma fosforilação (MIKKELSEN et al., 2004). Mikkelsen et al., (2004) provaram que a amilopectina é um substrato melhor do que a amilose para a GWD de batata, o que explicaria o fato de que só foram encontradas cadeias de amilopectina fosforiladas em plantas. Demonstraram também que a forma ativa da GWD de batata existe como um homodímero de 155 kDa com atividade ótima em pH 7,0 a 35°C e teria cinco domínios em sua estrutura. Ela estaria ligada ao grânulo do amido, fosforilando a amilopectina de acordo com a reação:



Já foram encontradas massas moleculares de 180,3 kDa para GWD de mandioca (OPABODE et al., 2013) e 160 kDa em *Arabidopsis* (RITTE et al., 2000).

A outra enzima capaz de fosforilar resíduos de D-glicose na posição C3 nas cadeias de amilopectina foi encontrada pela primeira vez em *Arabidopsis*, foi nomeada de GWD3 (MIKKELSEN et al., 2004), e mais adiante, de fosfoglicano diquinase (PWD) (SMITH, 2012). No entanto, a PWD fosforila a D-glicose numa posição diferente da GWD, envolvendo a formação de uma ligação éster entre o C<sub>3</sub> da molécula com o grupo fosfato obtido a partir do ATP. De forma análoga ao papel da GWD, essa fosforilação também contribuiria com a alteração da estrutura da molécula de amilopectina de forma a permitir a ação da  $\beta$ -amilase na degradação do amido (KÖTTING et al., 2005; RITTE et al., 2006, SILVER, KÖTTING E MOORHEAD, 2014).

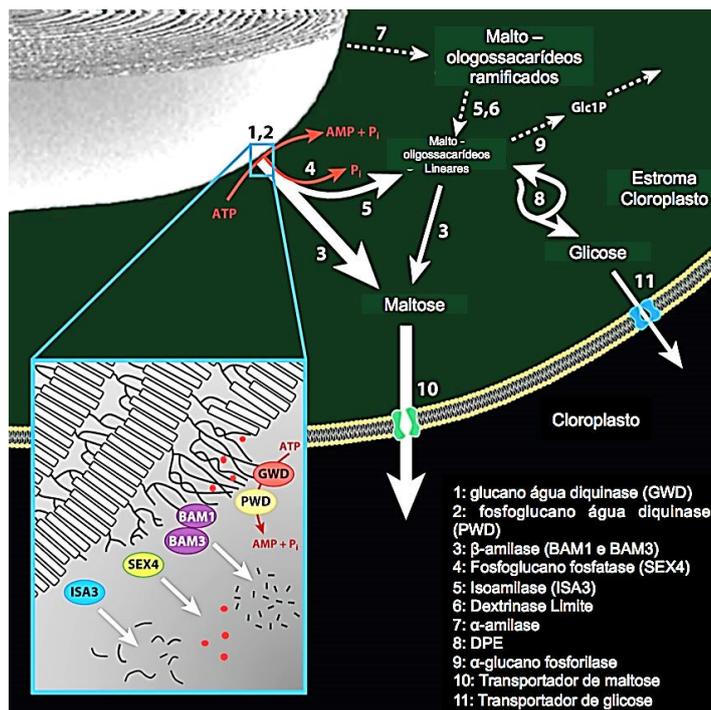
Os processos de degradação do amido mais estudados são os que envolvem a degradação do amido de reserva durante a germinação de cereais e a degradação do amido transitório presente nas folhas (BECK E ZIEGLER, 1989, EDNER et al., 2007, ZEEMAN et al., 2007). No primeiro, em resposta a um sinal hormonal, as células

da aleurona secretam as enzimas responsáveis pela degradação de amido e iniciam o processo de degradação, tendo a participação da  $\alpha$ -amilase como sendo fundamental no início da degradação (BECK E ZIEGLER, 1989) (Figura 2). No segundo, o amido é sintetizado durante o dia e degradado à noite, sendo o ciclo claro-escuro um fator importante e a participação das enzimas PWD e GWD como precursoras de todo o processo (ZEEMAN et al., 2007; REIMANN et al., 2002; SILVER, KÖTTING E MOORHEAD, 2014) (Figura 3).

Até o momento a  $\alpha$ -amilase é a única enzima conhecida como sendo capaz de iniciar sozinha o processo de degradação do grânulo de amido de reserva (Figura 2A), fornecendo ou aumentando a disponibilidade de substrato para outras enzimas degradativas (BECK E ZEIGLER, 1989).

Enquanto que para a degradação do amido transitório (Figura 4) de folhas de *Arabidopsis*, o início da degradação prescindiria da ação da  $\alpha$ -amilase, neste modelo, a GWD e a PWD seriam as enzimas-chave para iniciar a degradação do amido, desordenando as cadeias da amilopectina, tornando-as mais disponíveis para a ação da  $\beta$ -amilase sem a atuação anterior da  $\alpha$ -amilase (ZEEMAN et al., 2007, EDNER et al., 2007).

Um estudo demonstra que para a completa hidrólise dos grânulos de amido a atuação de outras enzimas além da  $\beta$ -amilase são necessárias. Para que essas enzimas também possam atuar é necessário que ocorra uma desfosforilação, removendo o grupo fosfato da cadeia de amilopectina cujas enzimas responsáveis são chamadas de fosfatases (STREB et al., 2012). Assim, para que ocorra a hidrólise do amido via  $\beta$ -amilase, a amilopectina que compõe os grânulos de amido precisa ser previamente fosforilada via GWD e PWD e, posteriormente, desfosforilados via *SEX4* (*Phosphoglucan Phosphatases Starch Excess 4*) and *LFS2* (*Like-SEX4 2*) (SILVER, KÖTTING, MOORHEAD, 2014).



**Figura 3: Modelo de degradação de amido em folhas de *Arabidopsis*. Adaptado de Smith 2012.**

Em razão das dificuldades de obtenção de quantidades suficientes das enzimas específicas originadas do próprio tecido, normalmente utiliza-se enzimas comerciais, purificadas de fungos, que fornecem pistas de como o processo de corrosão ocorre e quais são as consequências físicas para o grânulo de amido, mas existem limitações na interpretação dos resultados assim obtidos.

Uma exceção digna de nota na literatura, é o trabalho de Reimann et al., (2002) em que grânulos de amido contido em turions de *Spirodela polyrhiza* foram isolados e expostos à proteína α-amilase extraída e parcialmente purificada de turions adaptados ao escuro que foram submetidos à contínua luz vermelha para induzir a degradação do amido de reserva. A luz vermelha teve a função de induzir a GWD a se autofosforilar e iniciar sua atividade de fosforilar os grânulos de amido do turion. Os resultados mostraram que a irradiação resultou em fosforilação dos grânulos de amido, acompanhado por mudanças na capacidade do grânulo de se ligar à α-amilase endógena, bem como em mudanças nos níveis de degradação dos grânulos. Os autores também observaram que uma vez iniciada a degradação do amido, a α-amilase foi solubilizada, sugerindo que a enzima pode ser necessária apenas durante a fase inicial da degradação do amido (REIMANN et al., 2002 e 2007).

Um trabalho mais recente, ainda com amido de turions, mostrou que o sistema de degradação desse amido parece ser uma combinação de ambos os modelos de degradação já descritos (de reserva e transitório) (APPENROTH et al., 2011). Já outro artigo menciona a participação de enzimas desramificadoras e uma isoforma de  $\alpha$ -amilase, juntamente com as enzimas já descritas para a degradação do amido transitório, em mutantes de plantas de *Arabidopsis* (STREB, ELCHE E ZEEMAN, 2012).

A presença das amilases associadas ao grânulo desde as fases iniciais do amadurecimento da banana sem, no entanto, ser observada degradação do amido (PERONI-OKITA et al., 2010), é sugestiva da existência de um controle ou sinal para que esta enzima inicie o processo de degradação. Uma possibilidade seria que as enzimas já associadas aos grânulos dependeriam de ativação, resultante de fosforilação ou redução/oxidação, ou ainda da formação de um complexo enzimático para poder atuar de maneira sincronizada. Para complicar, deve-se também considerar que o processo pode depender de um arranjo preciso entre enzimas no sentido de prover maior eficiência catalítica. Já foi observado que a velocidade na degradação do amido isolado de *Arabidopsis* aumentou duas vezes quando uma mistura de isoamilase (ISA3) e  $\beta$ -amilase1 (BAM1) foi adicionada aos grânulos, ao invés de somente a BAM1, e de 2 a 3 vezes quando depois acrescentada a GWD e ATP (EDNER et al., 2007). Esses dados sugerem que a iniciação e a regulação do processo de degradação do amido pode ser algo extremamente complexo e relacionado tanto com alterações estruturais do grânulo como das interações entre as enzimas potencialmente envolvidas.

A grande dificuldade para a realização desse tipo de experimento é a necessidade de enzimas puras, sem contaminações, com preservação de suas propriedades catalíticas e a simulação das condições *in vivo*. A obtenção de enzimas puras em quantidades suficientes para os ensaios é um problema especialmente importante no caso da banana, cuja polpa contém menos de 1% de proteínas e as proteínas supostamente ligadas à degradação do amido perfazem uma parte muito pequena neste total. Além disso, o processo de purificação de enzimas é demorado e nem sempre resulta em pureza, quantidade e atividade esperadas. Assim, uma alternativa à extração e purificação a partir da banana é a obtenção das proteínas recombinantes em sistema heterólogo, uma vez que as sequências gênicas das principais hidrolases

de bananas já estão estabelecidas (ASTORINO FILHO, 2008 e VIEIRA JUNIOR, 2006). Ainda que não haja certeza quanto à preservação da atividade biológica das formas recombinantes das enzimas, em caso positivo poderiam ser obtidas quantidades adequadas à realização dos ensaios de atividade empregando grânulos de amido isolados da banana, assim como poderiam ser obtidos anticorpos policlonais capazes de indicar a presença e distribuição dessas, frente aos tecidos da banana.

## 2. OBJETIVO

Este trabalho tem como objetivo a caracterização morfológica, química e estrutural de grânulos de amido de banana submetidos a um modelo *in vitro* de degradação a partir de ensaios com as enzimas  $\alpha$ -amilase e  $\beta$ -amilase.

## **CAPÍTULO 1**

### **OBTENÇÃO DA PROTEÍNA $\alpha$ -AMILASE RECOMBINANTE**

## 1. INTRODUÇÃO

O princípio da metodologia do DNA recombinante é a clonagem molecular, que envolve o isolamento e a propagação de moléculas de DNA idênticas. Primeiramente o fragmento do DNA de interesse (inserto) é ligado a uma outra molécula de DNA (vetor) para formar o que se chama de DNA recombinante. Segundo, a molécula de DNA recombinante é introduzida numa célula hospedeira compatível, em um processo chamado de transformação. A célula hospedeira que adquirir a molécula do DNA recombinante é agora chamada de transformante ou célula transformada. Essas células transformadas podem ter duas finalidades: (1) aumento do número de cópias do gene de interesse e a consequente purificação (miniprep); (2) expressão desse gene em um sistema em que fará com que a bactéria reconheça o gene e a codifique na respectiva proteína.

Os microrganismos secretam quantidades limitadas de enzimas ou outras proteínas, assim a expressão heteróloga em outras células hospedeiras tem sido empregada para potencializar a obtenção dessas.

A obtenção de proteínas recombinantes em plantas vem sendo estudada há algum tempo. Em alguns casos essas proteínas são usadas para estudar e tentar elucidar alguns mecanismos das plantas (ZEEMAN et al, 2010; KÖTTING et al, 2005), em outros para a obtenção de enzimas com fins em processos industriais (PARK et al, 2014; LIN et al, 2006), e ainda existem estudos com a digestão de amidos com enzimas recombinantes purificadas, para verificar estrutura e a função das enzimas. (CELIŃSKA et al, 2015; REIMANN, ZIEGLER E APPENROTH 2007; JUGE et al, 1996).

Isoformas de  $\alpha$ -amilase recombinante foram expressas, caracterizadas e purificadas de cevada (JUGE et al, 1996). Nesse trabalho duas isoformas, AMY1 e AMY2, de cevada foram expressas em *Pichia pastoris*. As propriedades enzimáticas e estruturais dessas enzimas foram semelhantes às proteínas de cevada. A purificação dessas isoformas foi bem simples, uma vez que elas foram secretadas para o meio de cultura (JUGE et al, 1996).

Em arroz também já foram expressas  $\alpha$ -amilase recombinantes, em *Escherichia coli*, onde foram expressas cinco isoformas de  $\alpha$ -amilase. A intenção foi descobrir como essa  $\alpha$ -amilase é expressa durante o amadurecimento da semente de arroz

(ASATSUMA et al, 2006). Uma  $\alpha$ -amilase rcombinante de inseto de arroz foi expressa em *Yarrowia lipolytica*, purificada e sua atividade foi quantificada. Em seguida, grânulos de amido de batata, arroz, milho, ervilha, amaranto e trigo foram digeridos com essa proteína recombinante (CELIŃSKA et al, 2014).

Já para frutos de banana algumas tentativas de produzir amilases foram:  $\alpha$ -amilase (VIEIRA JUNIOR, et al 2006),  $\beta$ -amilase (ASTORINO FILHO, 2008) e a Isoamilase (BIERHALS et al, 2004), todas elas usando a cv. Nanicão.

Para a  $\alpha$ -amilase de banana a expressão foi feita em *Pichia pastoris*. O extrato protéico foi analisado por eletroforese, apresentando uma proteína de peso molecular de 46 kDa, indicando ser a  $\alpha$ -amilase recombinante. Isso se confirmou, pois o peso molecular é o mesmo indicado pela sequência de cDNA da  $\alpha$ -amilase de banana, sequência que também foi feito para esse trabalho (VIEIRA JUNIOR et al, 2006). Com essa proteína expressa, foi feito o teste de atividade amilolítica em eletroforese em condições não desnaturantes (PAGE-NATIVO) com substrato, e bandas de coloração branca, indicando a atividade amilolítica dessa enzima (VIEIRA JUNIOR et al, 2006).

A proteína relativa à  $\beta$ -amilase de banana, foi expressa em *E. coli*, gerando uma proteína recombinante de 50 kDa, cuja identidade foi checada com o auxílio de anticorpo anti- $\beta$ -amilase de banana. Porém, não teve atividade hidrolítica tanto *in vitro* como por eletroforese em condições não desnaturantes e usando substrato específico (ASTORINO FILHO, 2008). Porém, isoformas de  $\beta$ -amilase de *Arabidopsis* sem atividade também já foram reportadas literatura (FULTON et al, 2008).

Uma isoamilase de banana foi expressa em *E. coli*, com clone parcial, ou seja, não sendo a sequência de cDNA completa. Um estudo filogenético foi feito indicando que a isoforma dessa isoamilase era a isoforma 3. Porém a expressão dessa sequência parcial gerou uma proteína truncada.

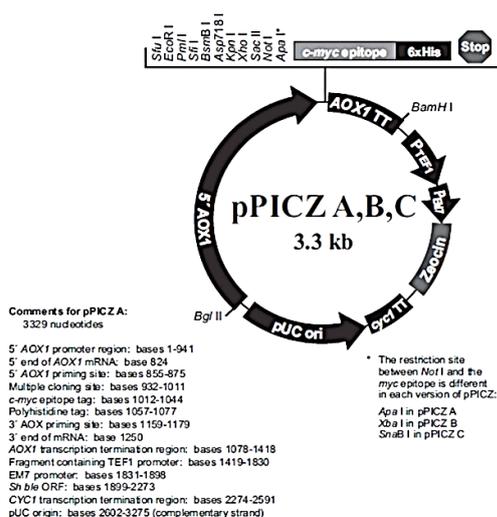
O objetivo desta parte do trabalho descrita neste capítulo, foi obter por expressão heteróloga a enzima  $\alpha$ -amilase com atividade, tanto para testes *in vitro* como para produção de anticorpos policlonais.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. MATERIAL

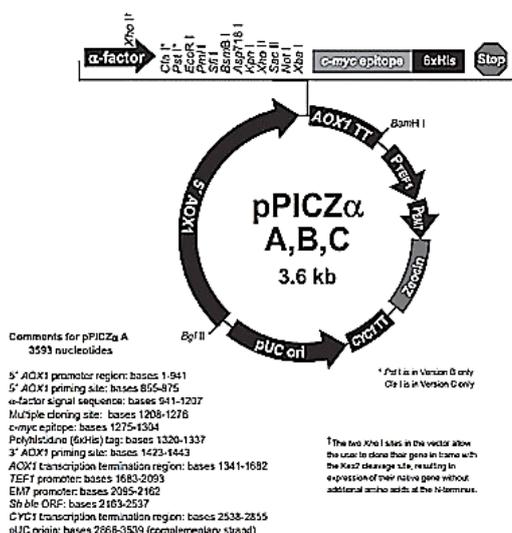
#### 2.1.1. Para expressão da proteína $\alpha$ -amilase recombinante em *Pichia Pastoris*:

Foi utilizado um clone de *Pichia pastoris* transformado com o vetor pPICZB (Figura 4) contendo o gene da  $\alpha$ -amilase de banana (GenBank AF533648) obtido por Vieira Junior (2006).



**Figura 4:** Vetor de expressão pPICZ B (Invitrogen, 2010),

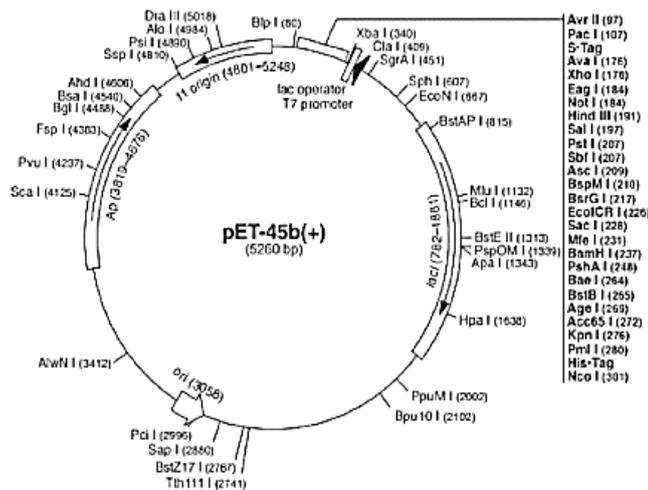
Polpa de banana madura, amostrada aos 17 dias pós colheita (dpc) (*Musa acuminata* AAA, cv. Nanicão). Além disso, foi utilizado o vetor pPICZ $\alpha$ B (Figura 5) contendo o gene de  $\alpha$ -amilase de banana (GenBank AF533648) obtido por Vieira Junior (2006).



**Figura 5:** Vetor de expressão pPICZ $\alpha$ . (Invitrogen, 2010).

### 2.1.2. Para expressão da proteína recombinante em *Escherichia coli*:

Bactérias *Escherichia coli* (*E.coli*) da linhagem Rosetta *pLysS* quimicamente competentes foram transformadas por choque térmico com o vetor pET45b(+) (Figura 6) contendo o gene da  $\alpha$ -amilase de banana (GenBank AF533648-1) obtido por Astorino Filho (2008) sítios de restrição das enzimas *PshAI* e *HindIII*.



**Figura 6:** Vetor de expressão pET45b(+) (Novagen, 2009).

## 2.2. MÉTODOS

### 2.2.1. Propagação de clones de *Pichia pastoris* transformados e indução da expressão de proteína recombinante

Os clones transformados de  $\alpha$ -amilase de banana positivos foram selecionados e inoculados em 250 mL de meio BMGY (extrato de levedura 1%; peptona 2%; tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 7,0; 1,34% de YNB (yeast nitrogen base), 4x de 10<sup>-5</sup>% de biotina e glicerol 1%, zeocina 25  $\mu$ g/mL, seguido de incubação a 30°C com agitação por 17 horas para gerar biomassa. As células foram centrifugadas a 1000 g por 5 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspenso em 62,5 mL de BMMY (extrato de levedura 1%; peptona 2%; tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 7,0; 1,34% de YNB (yeast nitrogen base), 4x10<sup>-5</sup>% de biotina e metanol 0,5%) e inoculado a 30°C com agitação por 4 dias para a indução da expressão. A cada 24 horas foi adicionado metanol a uma concentração final de 2% para a manutenção das condições de indução. Após crescimento, a cultura de expressão foi submetida a centrifugação a 3000 g durante 10 min a 4°C, os

precipitados das células foram retomados em 4 mL de tampão contendo HEPES-NaOH, pH 7,0, 20 mM, cisteína 10 mM, CaCl<sub>2</sub> 1mM, benzamidina 1 mM e 5% glicerol, e às células lisadas foram adicionados 500 mg de “acid-washed glass beads” e centrifugadas a 8000 g durante 20 min a 4°C. O sobrenadante foi precipitado com sulfato de amônio (0-80%) e centrifugado novamente a 10.000 g por 15 min a 4°C. O precipitado foi solubilizado com 2 mL de tampão HEPES-NaOH 20mM, pH 7,0, cisteína 10 mM, CaCl<sub>2</sub> 1mM e benzamidina 1 mM e posteriormente dialisado contra o mesmo tampão.

### **2.2.2. Purificação parcial do extrato proteico**

As células de *P. pastoris* foram centrifugadas a 1.045 g por 10 min a 4°C. O precipitado foi descartado e ao sobrenadante foi adicionado sulfato de amônio para 80% de saturação, seguido de repouso por uma noite. As proteínas foram coletadas por centrifugação a 12.857 g por 30 min. O precipitado foi ressuscitado em tampão HEPES-KOH 50 mM, pH 7,0 contendo cisteína 20 mM, CaCl<sub>2</sub> 1mM e benzamidina 1 mM e o extrato proteico foi dialisado contra o mesmo tampão. O conteúdo de proteína total foi estimado de acordo como descrito no item 2.2.4.

### **2.2.3. Ensaio de atividade com substrato específico**

Para a atividade enzimática de  $\alpha$ -amilase foi utilizado o método descrito por McCleary e Sheehan (1987) no qual é utilizado o reagente *Ceralpha* (Megazyme) que contém o substrato p-nitrofenil-maltoheptaosídeo bloqueado na extremidade não redutora (BPNPG7) e  $\alpha$ -glicosidases, que têm a função de liberar o composto p-nitrofenol, desenvolvendo uma coloração amarela em pH alcalino. O bloqueio do terminal não-redutor impede a ação de  $\beta$ -amilases e fosforilases, tornando este substrato específico para  $\alpha$ -amilases. O extrato enzimático (20 $\mu$ L) foi incubado com 20  $\mu$ L de reagente a 30°C por 90 minutos. A reação foi interrompida pela adição de 160 mL de Tris 1,1% (m/v) e a absorbância foi medida a 410nm.

### **2.2.4. Determinação do teor de proteína por Bradford**

A quantificação do teor de proteína no extrato proteico foi feita utilizando-se o reagente “Protein Assay” (Bio-Rad), com base no método descrito por Bradford (1976). Uma alíquota de 10  $\mu$ L de amostra foi adicionada de 990  $\mu$ L de água e 200  $\mu$ L

do reagente e após 15 min, a absorbância foi lida a 595 nm. Albumina de soro bovino foi utilizada como padrão.

#### **2.2.5. Extração de RNA e síntese do cDNA**

O RNA total foi extraído de 100 mg da polpa de banana madura da cv. Nanicão homogeneizada em N<sub>2</sub> líquido pelo método Concert™ Plant RNA Reagent (Invitrogen). Estes RNAs foram utilizados para a amplificação do cDNA com Improm-II Reverse Transcription System (Promega).

#### **2.2.6. Análise qualitativa e quantitativa de ácidos nucleicos**

O RNA total extraído foi quantificado pela determinação da absorbância a 260 nm e avaliado quanto à sua pureza pela razão entre as absorbâncias a 260 e 280 nm. A qualidade do RNA foi avaliada pela presença das bandas correspondentes ao RNA ribossomal 25S e 18S analisado através de eletroforese em gel de agarose 1% (p/v), preparado em tampão 1X TAE (Tris-acetato-EDTA), pH 8,0 conduzida sob voltagem constante (80 V) e visualizados por meio de coloração com *SybrSafe Green* (1:10000) (Invitrogen) sobre luz ultravioleta.

#### **2.2.7. Produção de $\alpha$ -amilase recombinante em *P. pastoris***

##### **Amplificação da sequência da $\alpha$ -amilase**

Os oligonucleotídeos utilizados para amplificar a sequência da  $\alpha$ -amilase apresentaram trechos adaptadores que contendo os sítios de restrição das enzimas *XbaI* e *PstI* (VIEIRA JUNIOR, 2006).

AMY<sub>XbaI</sub> 5'- CTCTCTCT**CTAG**AAATCTCTTCTCCCACACGCAGT -3'

AMYP<sub>PstI</sub> 5'- GAGAGAG**CTGCAGG**ACAGATACTCTTCCAGGGCTT-3'

As condições utilizadas para a PCR foram: 98 °C por 3 min, seguido de 35 ciclos consistindo de desnaturação a 98 °C por 10 s, pareamento a 58 °C a 72°C por 30s e de extensão a 72°C por 45 s, extensão final a 72°C por 1 min, mantidos a 4°C por 5 min. As reações consistiram de 0,5  $\mu$ M de oligonucleotídeos, 1,5 mM de MgSO<sub>4</sub>, 0,5 mM de dNTPs, 1  $\mu$ L de cDNA molde 17 dpc e 2 unidades de *Phusion hot Start II High-Fidelity DNA Polimerase* (Thermo Scientific) em 20  $\mu$ L de volume de reação. O

tamanho do produto da reação da PCR esperado era de, aproximadamente, 1.200 pb. Os fragmentos obtidos pela PCR foram purificados com o kit *NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up* (Macherey-Nagel).

### **2.2.8. Clonagem e expressão em sistema eucarioto *Pichia pastoris***

#### **Construção pPICZαB:AMY**

O fragmento e o vetor pPICZαB foram digeridos com as enzimas de restrição *XbaI* (Fermentas) e *PstI* (Thermo Cientific). O vetor foi desfosforilado por uma fosfatase alcalina overnight a 37°C (SAP, *Shrimp Alkaline Phosphatase*, Fermentas). O fragmento foi ligado ao vetor pPICZαB na proporção 1:1, 3:1 e 4:1 utilizando 2,5 unidades de *T4 DNA Ligase* em 10 ul de volume de reação overnight a 16°C. A mistura de ligação foi utilizada para transformação química de *E. coli* competentes (TOP 10 F', Invitrogen), conforme recomendações dos fabricantes. Os transformantes foram selecionados em placas de cultura com meio de cultura LB /agar suplementado com 25 µg. mL<sup>-1</sup> de zeocina como agente de seleção. O meio de cultura LB consistiu de extrato de levedura 1,0%, triptona 1,6% e cloreto de sódio 0,666%.

As colônias crescidas em meio LB/agar suplementado com 25 µg. mL<sup>-1</sup> de zeocina foram submetidas à PCR utilizando-se os oligonucleotídeos 5'AOX (5'-GACTGGTTCCAATTGACAAGC-3') e 3'AOX (5'-GCAAATGGCATTCTGACATCC-3') para a verificação das colônias positivamente transformadas. A identidade desta sequência foi confirmada após o seu sequenciamento, utilizando-se os oligonucleotídeos 5'AOX e 3'AOX, realizado no Centro de Estudos do Genoma Humano.

### **2.2.9. Propagação da cultura de *E.coli* transformada e a indução da expressão do gene de α-amilase de banana**

Os oligonucleotídeos utilizados para amplificar a sequência da α-amilase apresentaram trechos adaptadores contendo os sítios de restrição das enzimas *PshAI* e *HindIII* (ASTORINO FILHO, 2008), de modo a permitir a clonagem do inserto por ligação aos respectivos sítios do vetor.

AMY N-TERM 1 5' **GACAAGATGTTTCTGCTTCTGTTTCTTG** 3'

AMY C-TERM1 3' GAGAGAAAGCT**TTTTATCTCTTCTCCCACACGCAG** 5'

Clones transformados com  $\alpha$ -amilase de banana em *E. coli* foram selecionados e, em seguida, cultivados em 3 mL de meio de cultura Luria-Bertani (meio LB) contendo 0,1% de ampicilina e 0,1% de cloranfenicol, sob agitação de 200 rpm a 37°C, durante 16 horas. Em seguida, 1,2 mL da cultura foi transferida para 40 mL de meio LB, e novamente incubada sob agitação (200 rpm, a 37°C). Quando a densidade óptica em 600 nm dessa cultura alcançou o valor 0,6, foi induzida a expressão da proteína recombinante pela adição de isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosídeo (IPTG) em diferentes concentrações (0,1, 0,5 e 1 mM). As culturas foram incubadas por diferentes tempos (4, 6 e 8 horas), depois da adição do agente de indução em diferentes temperaturas (28, 30 e 37°C) e velocidade de agitação (100 e 200 rpm). Ao final desse período a cultura foi centrifugada em tubo estéril a 2057 g a 4°C por 10 min

#### **2.2.10. Rompimento da parede celular**

##### **Método empregando Lisozima e sonificador:**

As células dos clones transformados e induzidos para expressar a proteína recombinante foram descongeladas em banho de gelo e retomadas em 2 mL tampão *Lysis-Equilibration-Wash* (LEW), adicionadas de lisozima para concentração final de 1 mg/mL e agitadas por 30 min a 4°C. A suspensão foi colocada em um sonificador de haste para lise celular, com aplicações de 10 ciclos de 15 seg, com intervalos de 15 seg, sempre em gelo. A suspensão foi centrifugada a 10000 g a 4°C por 30 min, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi retomado em 2,5 mL em tampão LEW, por duas vezes. O precipitado obtido na repetição final foi ressuspensionado em 0,5 mL de tampão *Denaturing Solubilization* e incubado sob agitação a 4°C. Após 1h foi centrifugado a 10000 g a 20°C por 30 min e o sobrenadante foi recolhido e filtrado (0.45  $\mu$ m) antes de ser aplicado na coluna Protino® Ni-TED 1000 packed columns do Kit Purification of Polyhistidine – (Tagged Proteins, Machery-Nagel).

##### **Método empregando reagente comercial BugBuster®:**

As células dos clones transformados e induzidos foram descongeladas com a adição de 2,65 mL do reagente BugBuster®, sempre em banho de gelo e agitação. A suspensão foi incubada por 20 min a temperatura ambiente, sob agitação, e centrifugada a 16000 g a 4°C por 20 min, sendo o sobrenadante e o precipitado

separados. Em seguida o precipitado foi retomado em 2,65 mL do reagente BugBuster® e adicionado de 15,9 mL do reagente BugBuster® 1:10 e agitado em vortex por 1 min. A seguir a suspensão foi centrifugada a 5000 g a 4°C por 15 min e o sobrenadante foi removido com o auxílio de uma pipeta. Esta etapa foi repetida mais quatro vezes, para total purificação dos corpos de inclusão. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspenso em tampão LEW para lavagem, sendo centrifugado novamente a 10000 g por 30 min a 4°C, e o sobrenadante descartado. O precipitado foi ressuspenso com tampão de desnaturação e incubado com agitação a 4°C por 1 hora. Posteriormente, foi centrifugado a 10000 g a 20°C por 30 min, e o sobrenadante foi recolhido e passado em filtro de 0.45 µm antes de ser aplicado à coluna Protino® Ni-TED 1000 packed columns do Kit Purification of Polyhistidine – (Tagged Proteins, Machery-Nagel).

#### **2.2.11. Purificação da proteína α-amilase recombinante por cromatografia de afinidade**

Para purificação da proteína recombinante a partir dos extratos proteicos foi utilizada cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC), empregando as colunas Protino® Ni-TED 1000 do Kit Purification of Polyhistidine – Tagged Proteins, Machery-Nagel.

#### **2.2.12. Eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)**

As amostras de proteína dos extratos e das etapas de purificação foram submetidas à eletroforese em géis de poliacrilamida (10%) em condições desnaturantes (SDS-PAGE), como descrito por Hames e Rickwood (1990). Para visualização das proteínas, os géis foram corados com Coomassie Brilliant Blue R-250 (0,1%) em solução aquosa de ácido acético 7% e etanol 40% e descoradas em solução aquosa de ácido acético 7,5% e etanol 5%.

#### **2.2.13. Western blotting**

Os extratos proteicos purificados por cromatografia de afinidade foram separados por SDS-PAGE e eletroforéticamente transferidos para membrana de nitrocelulose, Amersham™ Hybond™ - ECL, GE Healthcare, em tampão Tris-glicina (25 mM/192 mM) (pH 8,3), com 20% de metanol. A voltagem utilizada para

transferência foi de 100V por, aproximadamente, 1 h a 4°C. A qualidade da transferência foi verificada através da visualização das bandas transferidas utilizando coloração temporária com o corante Ponceau. Em seguida, a membrana foi bloqueada com 5 mL de tampão fosfato salino (PBS) adicionada de leite desnatado 5% por 1 h a 4°C. O tampão foi descartado e a membrana foi lavada duas vezes com tampão fosfato salino com Tween (PBST) e incubada novamente com 5 mL do mesmo tampão, adicionado de anticorpo primário anti  $\alpha$ -amilase de banana (1:100) (VIEIRA JUNIOR, 2006) por, aproximadamente, 16 horas. A membrana foi lavada duas vezes com tampão PBST e incubada novamente com 5 mL do mesmo tampão contendo anticorpo secundário anti-coelho conjugado com peroxidase por 1 hora. A formação dos complexos antígeno-anticorpo foi revelada por coloração da membrana com uma solução de TMB Membrane Peroxidase Substrate, KPL.

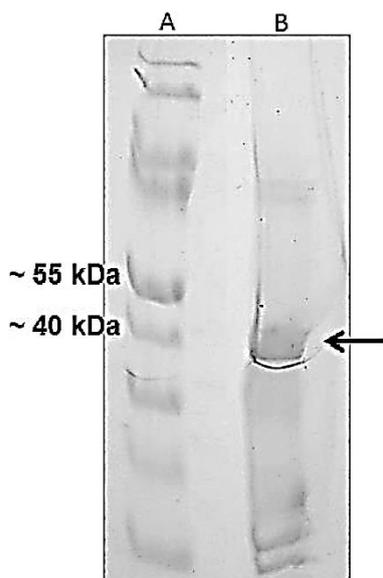
### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1. Sistema de expressão *Pichia pastoris*

Ensaio para a obtenção da proteína  $\alpha$ -amilase recombinante de banana foram realizados com a construção no vetor pPICZB para *P. pastoris*.

No meio de cultura produzido pela *P. pastoris*, foi necessária a lise das células para a obtenção da proteína uma vez que a construção utilizada para expressão não contém o fator  $\alpha$ , que exportaria a proteína para o meio de cultivo. Para a lise da célula foi seguido o protocolo usado por Vieira Junior et al (2006). Com a proteína obtida foi realizada uma eletroforese em SDS-PAGE. Uma banda entre 40-55 kDa foi observada, indicando que poderia ser a da  $\alpha$ -amilase, uma vez que o peso molecular dessa proteína foi descrito como sendo 46 kDa (VIEIRA JUNIOR, et al, 2006) (Figura 7).

Assim, para a confirmação da identidade dessa proteína, foi feito um Western Blotting usando soro anti- $\alpha$ -amilase de banana. Porém, não foi observada a proteína recombinante pelo anticorpo, resultado que pode nos adiantar que possivelmente a lise celular não foi eficaz ou então que a *P. pastoris* transformada com o gene de  $\alpha$ -amilase de banana realmente não está mais produzindo a proteína recombinante desejada.



**Figura 7:** Eletroforese em SDS-PAGE, 12% de poliacrilamida, corado com Comassie. Amostras: precipitado ressuspendido em tampão HEPES-NaOH 20mM pH 7, cisteína 10 mM, CaCl<sub>2</sub> 1mM, benzamida 1 mM após a lise da célula da *Pichia pastoris*. A seta indica a possível banda da proteína recombinante  $\alpha$ -amilase de banana.

### 3.2. Inserção do gene da $\alpha$ -amilase em *Pichia pastoris*

Devido aos resultados negativos dos clones de  $\alpha$ -amilase de banana em *Pichia pastoris*, foi feita uma construção em vetor diferente do construído por Vieira Junior (2006). O vetor pPICZ $\alpha$ B contém o fator alfa que sinaliza para a secreção da proteína para o meio de cultura o que facilita a sua posterior purificação.

O início da etapa de construção do gene da  $\alpha$ -amilase de banana em *P. pastoris* foi da extração e purificação de RNA, diretamente da polpa de banana madura. Posteriormente foi feita a etapa de obtenção do material genético de interesse, usando a técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

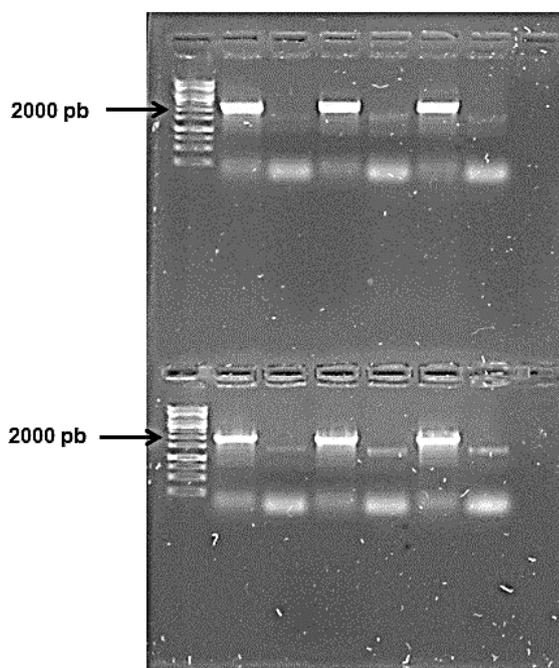
A padronização de um protocolo de PCR pode significar uma série de testes, alterando a concentração de reagentes básicos, adicionando algum potencializador, ou alterando as condições de amplificação, principalmente a temperatura de anelamento e o tempo de alongamento da nova fita de DNA formada.

Neste sentido, foram feitos testes com diferentes enzimas DNA polimerase, para uma melhor fidelidade e qualidade na amplificação do gene de interesse, o da  $\alpha$ -amilase de banana. A enzima de melhor resultado foi a *Phusion hot Start II High-Fidelity DNA Polymerase* (Thermo Scientific). O equilíbrio de nucleotídeos, a concentração dos reagentes, o pH, as temperaturas da reação, o sal, a concentração de metais bivalentes e a sequência do DNA-molde afetam significativamente a fidelidade da reação de PCR (PAVLOV *et al.*, 2004). Outra dificuldade na otimização da PCR foi devido à grande quantidade de pares de bases nitrogenadas G-C formando regiões muito longas, contidas na sequência da  $\alpha$ -amilase de banana.

Na etapa de construção e clonagem do gene da  $\alpha$ -amilase de banana em pPICZ $\alpha$ B, foram feitos testes da proporção entre o vetor e o fragmento, na tentativa de obter uma melhor construção. Bandas das colônias isoladas e amplificadas por PCR foram separadas por eletroforese em gel de agarose. Estas colônias cresceram em placas contendo meio LB/ágar/zeocina após a transformação do vetor e do fragmento com as células competentes de *E. coli*. As proporções usadas na transformação foram: 1:1, 3:1 e 4:1.

Nas razões 1:1 e 3:1, as bandas que foram vistas em gel de agarose após a reação da PCR tiveram peso molecular de aproximadamente 500 pb, o que significa a transformação somente da bactéria com o vetor e não da construção completa. Já nas colônias da razão 4:1, as bandas que foram vistas em gel de agarose após a

reação da PCR, estavam com o peso molecular de 2000 pb, o que confirma a inserção do gene da  $\alpha$ -amilase de banana no vetor escolhido (Figura 8).



**Figura 8:** Eletroforese em Agarose 1% (p/v), preparado em tampão TAE 1X (Tris-acetato-EDTA), pH 8,0, corado com SyberSafe Green (1:10000) e visualizado em luz ultravioleta. As bandas indicadas com a seta indicam a inserção do gene  $\alpha$ -amilase no vetor pPICZ $\alpha$ B, após a reação de PCR com os primers 5'AOX e 3'AOX.

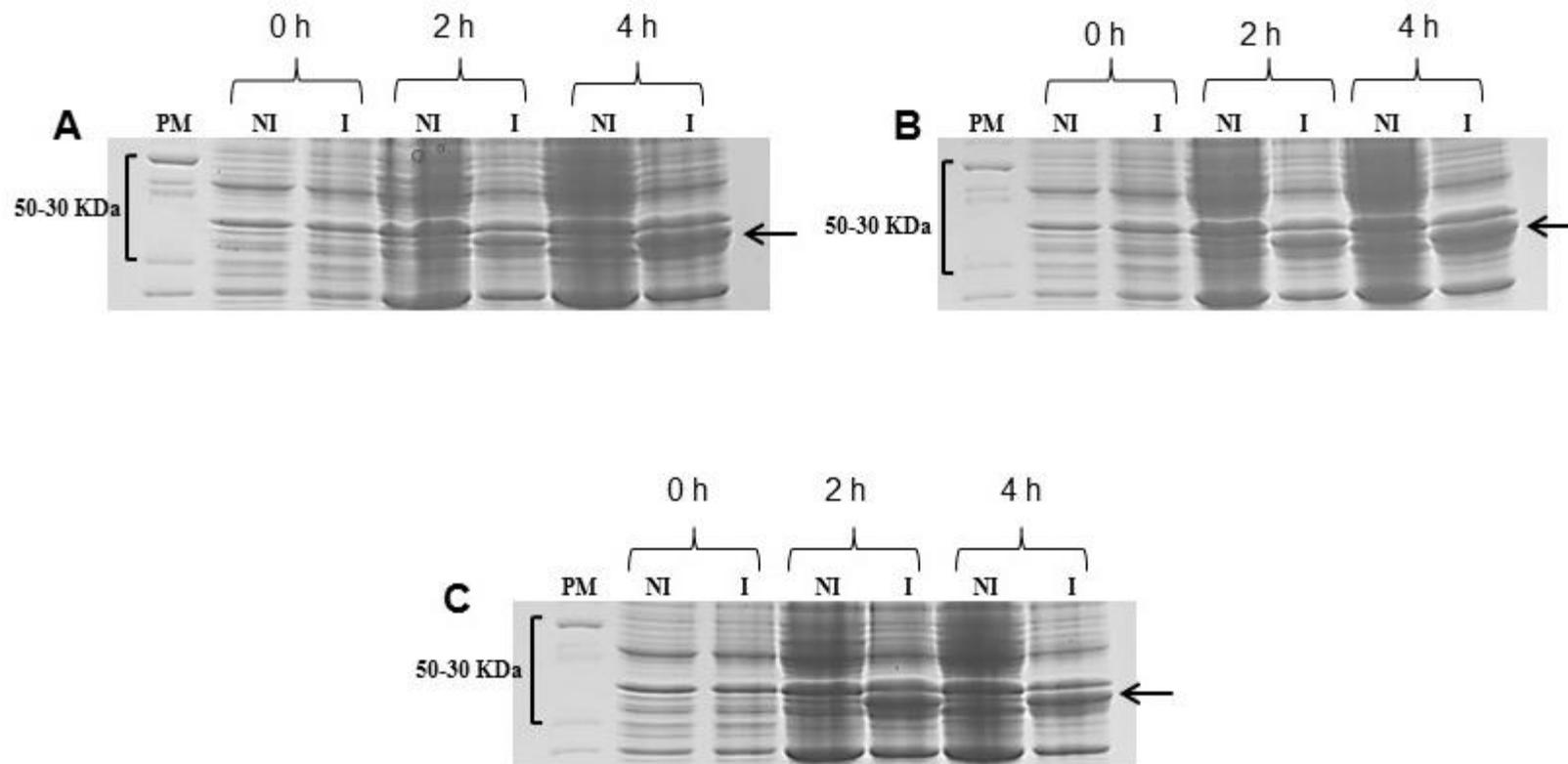
Após a confirmação da clonagem, colônias positivas da reação de PCR com os oligonucleotídeos 5'AOX e 3'AOX, para a confirmação da identidade da construção através do sequenciamento que foi realizado pelo Centro de Estudos do Genoma Humano.

Com o resultado do sequenciamento, a construção (gene + vetor de expressão) foi inserida em *P. pastoris*. Porém a indução e a produção da proteína recombinante  $\alpha$ -amilase de banana em *P. pastoris* com o vetor pPICZ $\alpha$ B não foi bem sucedido, pois novamente a proteína não foi produzida. Depois desses testes, resolvemos mudar o sistema de expressão.

### **3.3. Indução e Expressão da proteína recombinante $\alpha$ -amilase em *Escherichia coli***

A seguir alguns resultados serão apresentados com fim de estabelecer melhores parâmetros para o sistema de expressão usado (SAMBROOK et al, 1989). Nessa etapa do trabalho foi estabelecido a melhor maneira de fazer a indução e expressão da proteína e a purificação por cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC). Com relação à concentração de IPTG, foram feitos três testes com diferentes concentrações. Os resultados obtidos podem ser vistos na Figura 9 O primeiro foi com uma concentração mínima de indutor de 0,1 mM (ver perfil de indução Figura 9A), o segundo foi de 0,5 mM (ver perfil de indução Figura 9B), o terceiro e último teste foi feito com a concentração máxima de indutor nesse sistema, que seria de 1 mM (ver perfil de indução Figura 9C). Em todos os casos a seta indica a altura no gel em que houve a expressão de uma proteína com a massa molecular próxima à esperada. Tanto na figura 9B como na 9C pode-se notar uma maior intensidade da banda proteica com relação à figura 9A, indicando ter ocorrido uma maior expressão da proteína com as concentrações 0,5 mM e 1 mM de IPTG.

Com isso podemos afirmar que a concentração 0,5 mM de IPTG foi a melhor para a indução da expressão da  $\alpha$ -amilase, por ser a mínima suficiente para a indução e ser bem próxima da frequentemente reportada na literatura e a indicada pelo manual do vetor de expressão (NOVAGEN pET; BORTOLOSSI, 2007; SACHDEV E CHIRRGWIN, 1998)



**Figura 9:** Eletroforese em SDS-PAGE, 10% de acrilamida, corado com Comassie. Construção pET45b(+):Amy5 induzida com diferentes concentrações de IPTG para a expressão da proteína (A - 0,1 mM de IPTG; B - 0,5 mM de IPTG; C - 1 mM de IPTG) PM – Padrão de peso Molecular; NI – meio de cultura não induzido; I – meio de cultura induzido A seta indica a posição da proteína recombinante expressa.

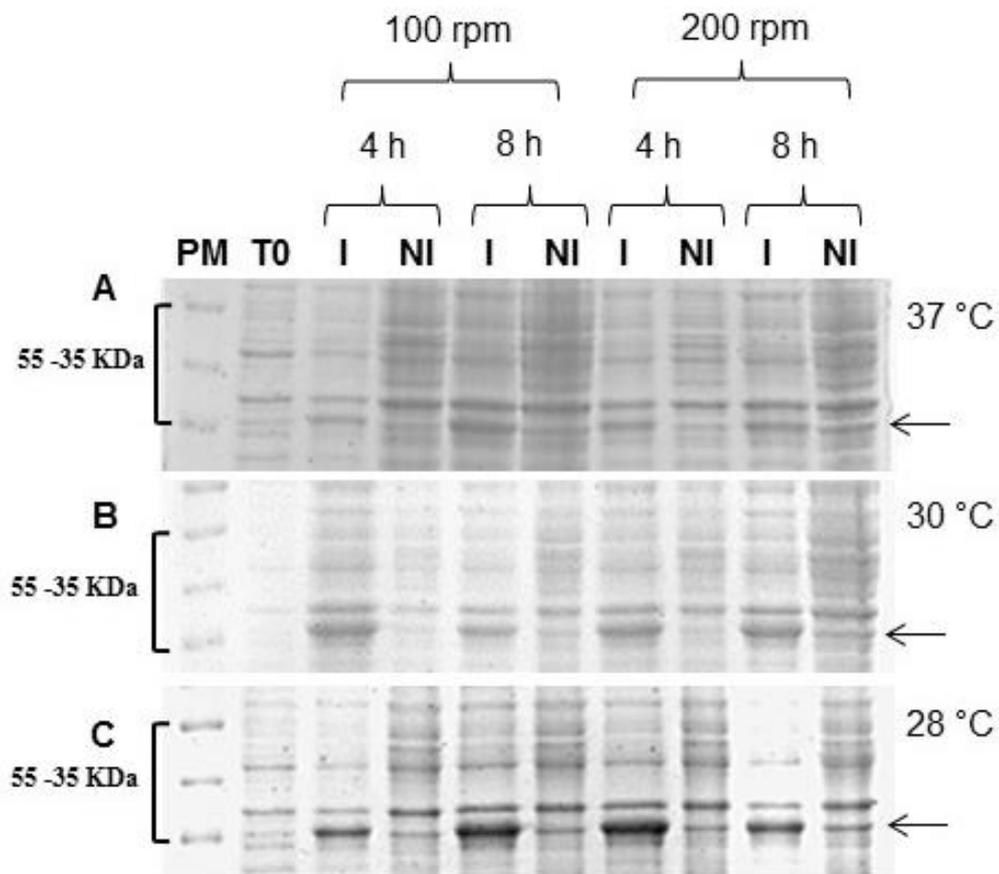
A identidade da proteína expressa foi confirmada por western blotting com anticorpo anti- $\alpha$ -amilase de banana (Figura 10), sendo testado o extrato obtido por indução com 0,5 mM de IPTG. Na Figura 10, as bandas observadas na membrana de nitrocelulose são das alíquotas retiradas do meio após 2 e 4 horas de indução, letras A e B respectivamente, confirmando, assim, a expressão da proteína  $\alpha$ -amilase de banana.



**Figura 10:** Western Blotting com anticorpo anti- $\alpha$ -amilase de banana. Construção pET45b(+):Amy5 induzida com 0,5 mM de IPTG para a expressão da proteína (PM – Padrão de peso Molecular; A – alíquota de 2 horas de indução; B – alíquota de 4 horas de indução)

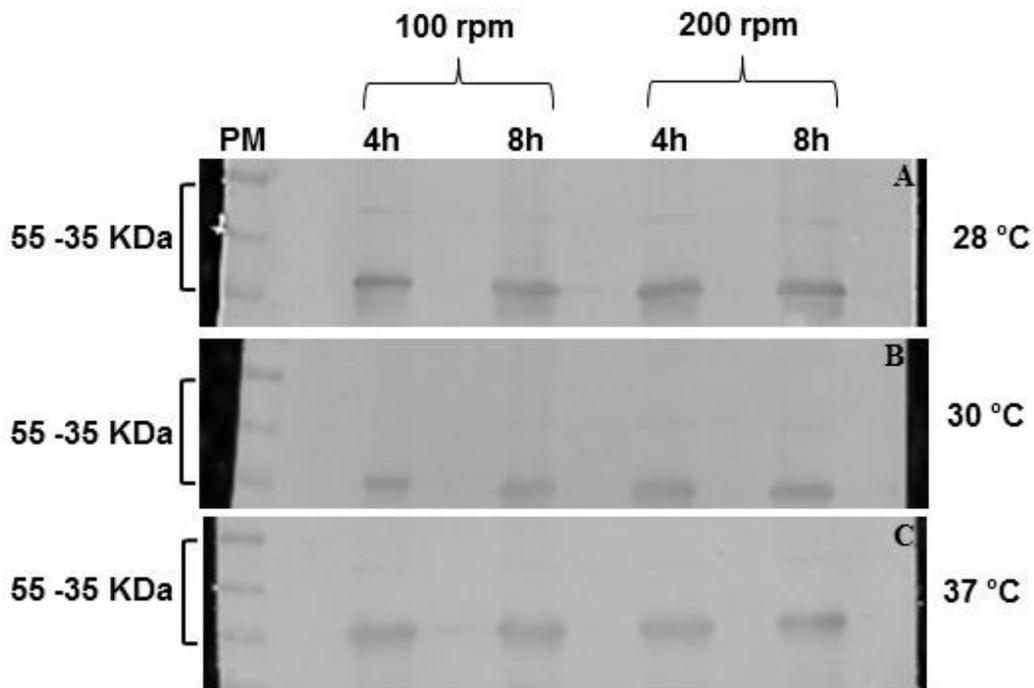
Depois de estabelecida a concentração de IPTG, os próximos parâmetros otimizados foram a temperatura de indução e a velocidade para agitação do meio de cultura.

Primeiro foram feitos testes com três temperaturas diferentes: 28°C (figura 11A), 30°C (figura 11B) e 37°C (figura 11C). Ao mesmo tempo a velocidade de agitação do meio de cultura também foi testada, que foi uma rotação de 100 rpm (figura 11 – números 2 a 5) e 200 rpm (figura 11 – números 6 a 9).



**Figura 11:** Eletroforese em SDS-PAGE, 10% de acrilamida, corada com Comassie. Construção pET45b(+):Amy5 a diferentes temperaturas e agitação do meio de cultura para a expressão da proteína. PM – Padrão de peso molecular, T0 – Tempo zero, I – meio de cultura induzido, NI meio de cultura não induzido. As setas indicam a expressão da proteína.

Foi verificada maior indução na banda proteica relativa à  $\alpha$ -amilase a 37°C e 200 rpm. Uma nova verificação da identidade da proteína expressa foi feita por western blotting com anti- $\alpha$ -amilase de banana, com todas as amostras nas diferentes temperaturas e agitação da indução, e foi verificada a presença da proteína nos meios de cultura induzidos (Figura 12).

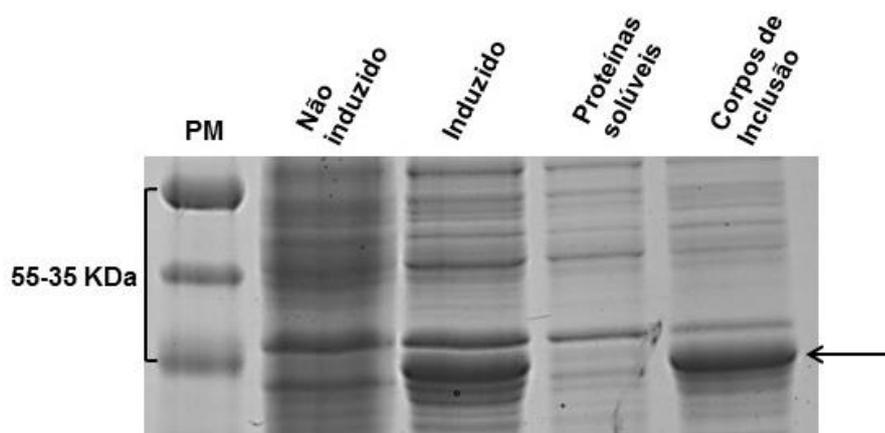


**Figura 12:** Western Blotting com anticorpo anti- $\alpha$ -amilase de banana. Construção pET45b(+): Amy5 induzida a diferentes temperaturas e agitação do meio de cultura para a expressão da proteína. PM – Padrão de Peso Molecular.

Com base nos resultados acima os melhores parâmetros para a indução da  $\alpha$ -amilase de banana em sistema procariótico, foram: IPTG na concentração de 0,5 mM, a uma temperatura de 37°C com 200 rpm de agitação e uma indução de 6 horas do meio de cultura.

A etapa seguinte da expressão da proteína recombinante foi identificar se a proteína expressa estava na forma solúvel ou na forma insolúvel (corpos de inclusão) dentro da bactéria. A expressão de proteínas recombinantes em *E. coli* pode produzir corpos de inclusão, que são formados pelo próprio sistema de defesa da bactéria. O fato de a bactéria estar super expressando proteínas que não são de origem bacteriana, ou não fazem parte do metabolismo da bactéria, faz com que a quantidade de proteína dentro da célula seja muito grande e acabe precipitando essas proteínas (SAMBROOK, 1989; SING E PANDA, 2005; BRAGA, 2008).

Para saber se a proteína expressa estava na forma solúvel ou insolúvel foi feito um tratamento químico para o rompimento da parede celular da bactéria e as frações solúvel e insolúvel resultantes desse tratamento foram separadas e analisadas por eletroforese (Figura 13). Através da separação das proteínas em gel de SDS-PAGE, foi possível detectar que grande parte da proteína expressa estava em corpos de inclusão. Sua solubilização foi feita por agente desnaturante e rompimento mecânico da parede celular, de modo a facilitar a purificação da proteína recombinante por colunas IMAC (SING E PANDA, 2005).



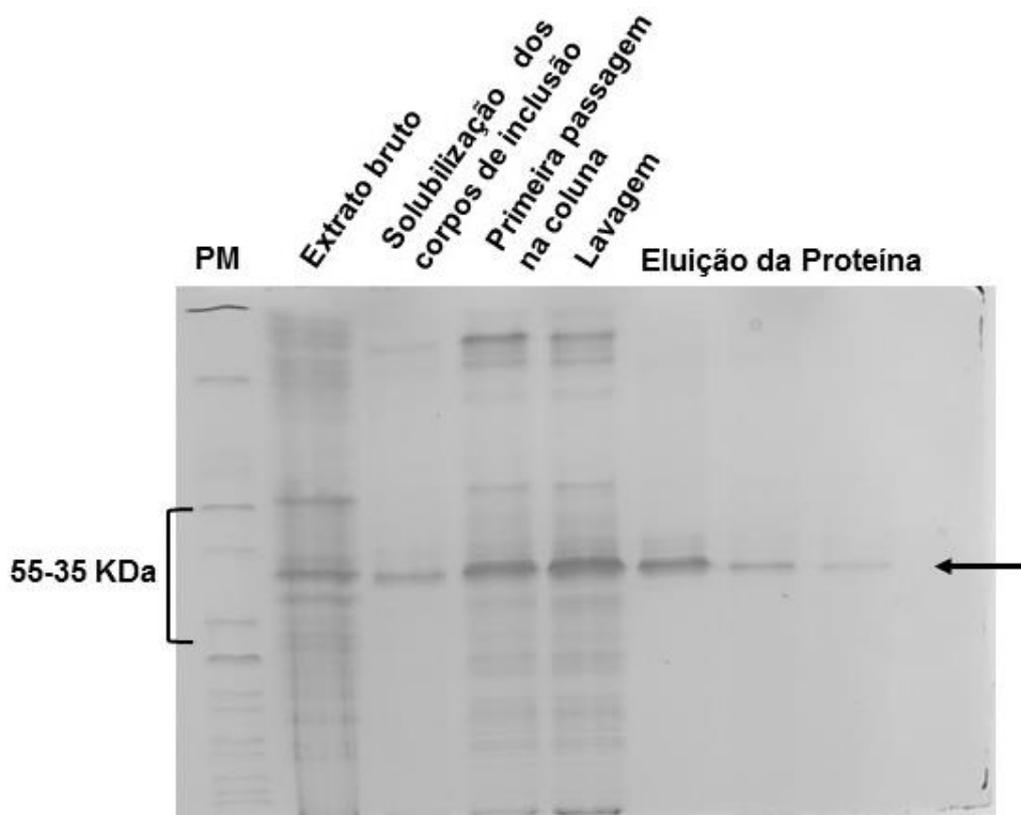
**Figura 13:** Eletroforese em SDS-PAGE, 10% de acrilamida, corada com Comassie. Construção pET45b(+): Amy5 indução com 0,5 mM de IPTG a 37°C por 4 horas. PM – Padrão de peso Molecular. A seta indica a provável banda proteica relativa à expressão da proteína da  $\alpha$ -amilase.

### 3.4. Purificação da proteína $\alpha$ -amilase recombinante

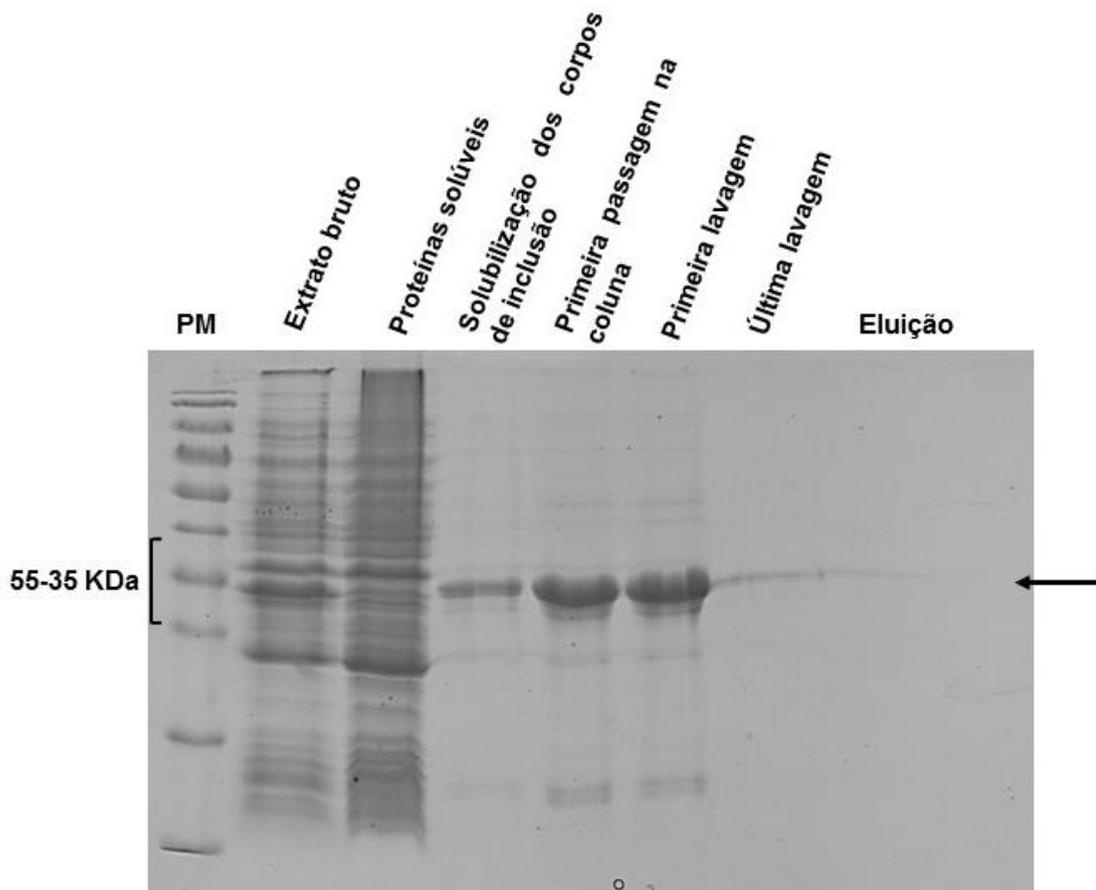
Dois técnicas de purificação e solubilização dos corpos de inclusão foram aplicadas, a primeira utilizando uma combinação de lisozima e um sonicador, a segunda utilizando o Reagente BugBuster® (SAMROOK, 1989; NOVAGEN pET).

As proteínas foram purificadas e solubilizados com o uso combinado do sonicador e da lisozima e aplicadas em coluna Protino® Ni-TED 1000 packed columns do Kit Purification of Polyhistidine – (Tagged Proteins, Machery-Nagel). Alíquotas de todas as etapas foram separadas e aplicadas em gel de SDS-PAGE (Figura 14).

O mesmo foi feito com os corpos de inclusão purificados e solubilizados com o reagente BugBuster® (Figura 15). Os resultados mostraram que o melhor método para a purificação e a solubilização dos corpos de inclusão foi a combinação de sonicador de haste e lisozima. A proteína então purificada pode ser vista na figura 14 números 5, 6 e 7.

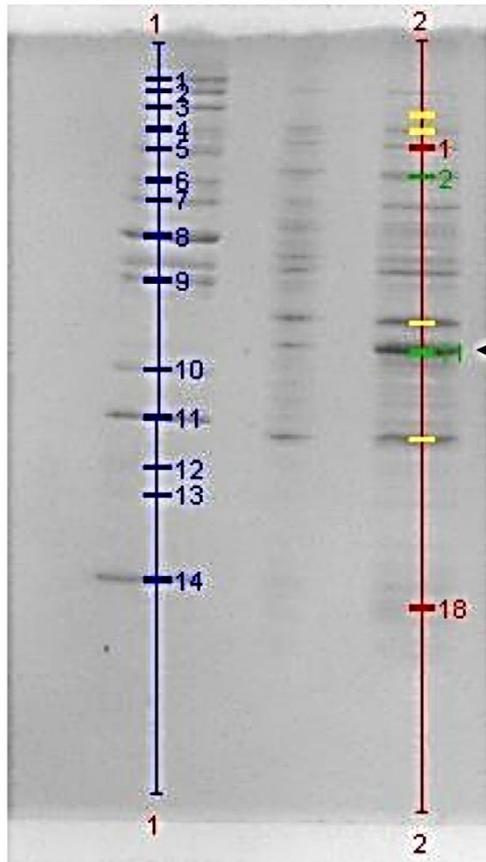


**Figura 14– Rompimento da parede celular com sonicador e lisozima:** Eletroforese em SDS-PAGE, 10% de acrilamida, corada com Comassie. Construção pET45b(+):Amy5 induzida com 0,5 mM de IPTG a 37°C em 6 horas de indução. PM – padrão de peso molecular. A seta indica a linha em que houve a purificação da proteína.



**Figura 15– Rompimento da parede celular com BugBuster®:** Eletroforese em SDS-PAGE, 10% de acrilamida, corada com Comassie. Construção pET45b(+):Amy5 induzida com 0,5 mM de IPTG a 37°C em 6 horas de indução. PM – Padrão de peso Molecular. A seta indica a linha em que houve a purificação da proteína.

Porém, apesar do sucesso na solubilização, o tamanho da proteína recombinante pareceu ser menor do que o esperado, pois na literatura e dados anteriores do laboratório o tamanho da  $\alpha$ -amilase de banana é estimado em, aproximadamente, 45 KDa. Para verificar com maior precisão o tamanho da  $\alpha$ -amilase recombinante de banana que estava sendo expressa, foi feito um cálculo a partir da análise de imagem do gel, sendo constatado em 33 KDa, aproximadamente, o tamanho da proteína recombinante (Figura 16).



**Figura 16:** Eletroforese em SDS-PAGE, 10% de acrilamida, corada com Comassie. Construção pET45b(+):Amy5 induzida com 0,5 mM de IPTG a 37°C em 6 horas para a expressão da proteína (PM – Padrão de peso molecular; 1 – Extrato proteico da cultura não induzido; 2 – Extrato proteico da cultura induzido). A seta indica a proteína recombinante de 33 KDa.

Pode acontecer da proteína ser expressa em tamanho menor do que o esperado, devido a mutações gênicas que podem levar à inserção de aminoácidos, a troca de aminoácidos ou uma deleção de aminoácidos na sequência de DNA, levando ao truncamento da proteína recombinante. Esse problema pode estar relacionado a construção inserida na bactéria.

Para confirmar a identidade da proteína que estava sendo expressa e se o possível truncamento da proteína estaria relacionado a um problema do clone, foram feitos os sequenciamentos da construção e o da proteína. Ambos os sequenciamentos deram bons resultados, sendo que o da construção confirmou a integridade com a sequência da  $\alpha$ -amilase depositada no GenBank (AF533648-1) (VIEIRA JUNIOR, 2006). Já o sequenciamento da proteína recombinante confirmou como sendo a  $\alpha$ -amilase da banana (Figura 17)

```

1   tccgacgccg cggcctacga tgectccgtt gccgccatct ctgcgacat cgcaggaaaa
61  agagggccaa caggtccgaa aattgaagca gtgcaagctc gatgcaaggc gcgagcagtg
121 gctctcccaa gtgaggaaca aggattgcat ggtgacgagc aggggagcgc ctgccgcctc
181 ttctccccct catgttgctc tttctaagaa gttggatcgc acatcgaagg aggaggagga
241 ggagaagcat cgggttgagg tggagccgga tgggttgagt tcccacgaaa gtgatgaagg
301 ttccccgact cactgcagcc acatgaatgg atgtgctaac aatagcatca gcagcgaag
361 cagcttcgga tcctcttcca gaagcttag cagtgccgaa gtggaggaag atatttgca
421 ggagagaggg aaatatagcg agatccggcg acgacacgga cggccaccag cgctggagaa
481 gagaaccgag ctagaagttg aggctgcggc ggcggagtct ttccttgggg atctgaaagt
541 gaaatcactt ggtccttcg   ATGTTTCTGCTTCTGTTTCTTGTCATTCTGAACTTGCTCA
                               M F L L L F L V I L N L A Q
601  GTCCAGATACTCTTCCAGGGCTTCAACTGGGAGTCGTGGAGGCAGCAAGGCGGCTGGTA
      S Q I L F Q G F N W E S W R Q G G W Y
661  TAACTTCTTGAAAGACAAAGTCTCTGATATAGCCAACGCTGGAGTCACCCACGTCTGGCT
      N F L K D K V S D I A N A G V T H V W L
721  ACCTCCGCCCTCGCACTCTGTCCGGCTTCAAGGTTACATGCCGGGGCGGCTCTACGACTT
      P P P S H S V G V Q G Y M P G R L Y D L
781  GGGTGCCTCCAAGTATGGAATCAGGATGAGTTGAAGGCGCTGATCGGCGCTTCCACGA
      G A S K Y G N Q D E L K A L I G A F H D
841  CAAGGGAGTCAAATGCGTGGCCGACATCGTCATCAACCATCGTTGCCGAGACAAGCAAGA
      K G V K C V A D I V I N H R C A D K Q D
901  CGGGAGAGGCATATGGTGCATCTTGAAGGCGGAACCGATGATGCCCGCTCGACTGGGG
      G R G I W C I F E G G T D D A R L D W G
961  TCCACACATGATCTGTAGGGATGACACACAGTACTCCGACGGCACC GGCAACCTCGACAC
      P H M I C R D D T Q Y S D G T G N L D T
1021 CGGCGAGGGCTTCGCGGCGGCTCCCGACATCGACCACCTCAACACGCAGGTCCAGCATGA
      G E G F A A A P D I D H L N T Q V Q H E
1081 GCTCAGGACTGGTTGAAGTGGCTTAAGACTGACATCGGCTTCGACGGGTGGAGGCTCGA
      L T D W L N W L K T D I G F D G W R L D
1141 CTTTGCAAGGGTTACTCCTCAAGCATCGCCAAGATCTACGTCGAACAGACGCAGCCAAA
      F A K G Y S S S I A K I Y V E Q T Q P N
1201 CTTTCGTTGGTGGTGGATCTGGAGTTCATTAGCTTACAGAAACGATGGGAAGCCAACATA
      F V V A E I W S S L A Y R N D G K P T Y
1261 CGATCAGAACGGCAACCCGCCAGGGGCTGGTTAATTGGGTTCCAGCAGGTCCGAGGCCAGT
      D Q N G N R Q G L V N W V Q Q V G G P V
1321 GACGGCTTCGATTTACCACAAAAGGGAATACTACAAGCTGCCGTGGAAGGTGAAGTGTG
      T A F D F T T K G I L Q A A V E G E L W
1381 GAGGATGCGTGTATCCCCAGGGGAAGGCGCCCGCATGATGGGGTGGTGGCCAGAGAAGGC
      R M R D P Q G K A P G M M G W W P E K A
1441 TGTCACCTTCGTCGACAACCACGATACCGGTTCAACGAAAAGTTGTGGCCTTTTCCTTC
      V T F V D N H D T G S T Q K L W P F P S
1501 TGATAAGGTCATGCAAGGTATGCTTATATACTCACGCATCCGGGAGTCCCTTCCATCTT
      D K V M Q G Y A Y I L T H P G V P S I F
1561 CTACGACCACATGTTGACTGGGATTGAAGGAGAAGATAACTCGGTTGGCTAAAACCAG
      Y D H M F D W G L K E K I T R L A K T R
1621 AACACGAAATAGAATTCATTCGGGTAGCTCTCTCAACATTCTGGCCTCTGACTGCTGACCT
      T R N R I H S G S S L N I L A S D A D L
1681 CTACATGGCAATGATCGATGGGAAGATATTGACAAAGCTAGGTCGAGATACGACGTGGG
      Y M A M I D G K I L T K L G S R Y D V G
1741 GAATCTGTTCTTCCAACCTCCACGTCGTTGCCTCTGGCAATGACTACTGCGTGTGGGA
      N L V L P T S T S L P L A M T T A C G R
1801 GAAGAGATAA agacgatgat gatgaatcat ggaagagact tttcgcttct ctttcgtaa
      R D
1861 cgtttctcat gtgttgtaag aaaaaatata gtattcccaac atgtacattt attcgtcctg
1921 cttgagaaaa gttatagaaa tgctatttta tat

```

**Figura 17:** Sequência de nucleotídeos e aminoácidos da α-amilase de banana (GenBank AF533648-1). Em negrito está a sequência de nucleotídeos que compõe a construção no clone, verificada pelo Método de Sanger. Em amarelo está a sequência de aminoácidos da proteína recombinante verificada por espectrometria de massa. Em vermelho os resíduos envolvidos no sítio ativo e com a ligação de substrato são indicados.

A partir dos resultados dos sequenciamentos pode-se fazer outra estimativa do tamanho da proteína que estava sendo expressa. A sequência de peptídeos foi analisada a partir da metionina inicial até o último peptídeo encontrado por espectrometria de massas, assinalado na Figura 17. O valor previsto para essa fração da proteína até o último peptídeo encontrado foi de 31,5 KDa, sendo um valor bem próximo do mencionado a partir da estimativa apresentada na figura 16.

Ainda com os dados do sequenciamento pode ser verificada a presença dos aminoácidos envolvidos com o sítio catalítico da  $\alpha$ -amilase de banana. Esses aminoácidos foram identificados de acordo com Vieira Junior, 2006 (Figura 17). Uma vez que peptídeos no final da construção não foram encontrados no sequenciamento por espectrometria de massas, pode-se pensar que não há a presença de todos os aminoácidos que participam do sítio catalítico. Isso é um problema, pois de nada adiantaria partir para o re-novelamento da proteína após a purificação, visando a sua renaturação e recuperação da atividade, pois essa seria inviabilizada pela ausência dos aminoácidos essenciais para a catálise. Com os resultados obtidos pelo sequenciamento e as análises em gel de eletroforese, pode-se pensar que a proteína estava sendo expressa de maneira truncada, pois todos os resultados analisados em conjunto chegaram a um tamanho diferente do que é mencionado pela literatura e do que já foi encontrado anteriormente.

## **CAPÍTULO 2**

### **ENZIMAS RELACIONADAS COM A DEGRADAÇÃO DE AMIDO DE BANANA**

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Degradação do amido na banana

A banana acumula altos teores de amido durante o seu desenvolvimento (20 a 35%), que é degradado durante o seu amadurecimento, com concomitante acúmulo de açúcares solúveis. Assim, o fruto é considerado um bom modelo para o estudo do metabolismo amido-açúcares (CORDENUNSI e LAJOLO 1995, PERONI-OKITA et al., 2010, SOARES et al., 2011).

Durante o processo de degradação do amido da polpa da banana, já foram detectadas atividade e proteína (com anticorpo específico) das enzimas  $\alpha$ -amilase,  $\beta$ -amilase, isoamilase, glicosidases e amido-fosforilases (MOTA et al., 2002; NASCIMENTO et al., 2006; MAINARDI et al., 2006, BIERHALS et al, 2004 e VIEIRA JUNIOR, et al, 2006). E associadas aos grânulos de amido da banana, as enzimas GWD (a proteína),  $\alpha$ -amilase e  $\beta$ -amilase (atividade e proteína) (PERONI-OKITA et al., 2010; SOARES, 2009).

A  $\alpha$ -amilase foi identificada e caracterizada na polpa da banana gerando informações quanto a sua sequência gênica, peso molecular e estrutura (VIEIRA JUNIOR, 2001; VIEIRA JUNIOR, 2006). Foi detectada também atividade da enzima associada aos grânulos de amido isolados em diferentes fases de amadurecimento da banana e a proteína relativa à enzima foi imunolocalizada (anticorpos específicos de banana) na superfície dos grânulos de amido e no tecido da polpa de banana (SOARES et al., 2011; PERONI-OKITA et al., 2013).

A atividade e a proteína relativas à  $\beta$ -amilase aumentam em estreita correlação com a degradação do amido durante o amadurecimento da banana (PURGATTO et al., 2001). Esta correlação foi confirmada quando fatias de banana foram tratadas com ácido indol acético e tiveram atraso na degradação do amido e na transcrição e atividade da  $\beta$ -amilase (PURGATTO et al., 2001) e em frutos submetidos a tratamento com 1-metilciclopropeno (1-MCP), um antagonista do etileno, quando foi obtido o mesmo resultado (NASCIMENTO et al, 2006). O conjunto de resultados faz supor que a transcrição da enzima e conseqüente atividade dependem de um equilíbrio de hormônios orquestrado pelo etileno.

Foram encontrados diferentes perfis de aumento de atividade da  $\beta$ -amilase solúvel em todos os estágios de amadurecimento de diferentes cultivares de banana (SOARES et al., 2011). Também foi detectada a presença de  $\beta$ -amilase na superfície

de grânulos de amido isolados de banana em diferentes graus de amadurecimento, tanto por imunolocalização quanto por atividade detectada por substrato específico. Em todos os casos a atividade específica da enzima associada aos grânulos de amido foi superior ao da enzima solúvel na polpa (PERONI-OKITA et al, 2013; SOARES et al., 2011).

Estudos feitos com *Arabidopsis* mostraram que as  $\beta$ -amilases também podem atuar em malto-oligossacarídeos, sendo o mais curto deles a maltotetraose, não atuando na extremidade não redutora de uma cadeia de glicano que transporta um grupo fosfato. Ou seja, existe a necessidade de desfosforilação da cadeia durante a degradação do amido devido aos requisitos de substrato dessa enzima, no que se refere à ausência de grupo fosfato próximo à extremidade não redutora, por onde se inicia sua atuação (LU et al, 2006; ZEEMAN, KOSSMANN E SMTIH, 2010; SILVER, KÖTTING E MOORHEAD, 2014).

A enzima responsável por desramificar a amilopectina do amido da banana é uma isoamilase (isoforma-3) com sequencia similar à da batata, milho e *Arabidopsis*, com atividade e expressão proteica alta e sem mudanças durante toda a fase de degradação do amido, no amadurecimento do fruto (BIERHALS et al., 2004). Isso faz supor que a enzima é pré-existente à fase de degradação do amido e pode ter participação também na sua síntese durante a fase de acúmulo de amido.

Em banana foi verificada a presença de proteína e atividade das duas formas durante todo o período de amadurecimento do fruto (MOTA et al, 2002). A que foi designada de Fosforilase I é caracterizada por alta afinidade por glicanos ramificados, massa molecular de 155 kDa e subunidades de 90 kDa. A fosforilase II, tem baixa afinidade por glicanos ramificados e peso molecular de 290 kDa com subunidade de 112 kDa.

Apesar das várias enzimas pertencentes aos dois sistemas de degradação, via  $\alpha$ -amilase ou via  $\beta$ -amilase, terem sido detectadas na polpa da banana e associadas ao grânulo de amido, ainda não está clara a participação ou contribuição de cada uma delas no processo de degradação, havendo características que o aproximam tanto do modelo de germinação de cereais, quanto do modelo de tecidos fotossintetizantes. São vários os fatores que contribuem para um quadro extremamente complexo e que dificultam o estabelecimento do papel efetivo de cada enzima no processo de degradação do amido. Dentre eles podem ser mencionados (1) a estrutura complexa

e ainda não estabelecida do grânulo de amido; (2) a dificuldade em fazer inferências a partir da medida da atividade enzimática, pois a maioria das enzimas capazes de participar da degradação do amido pode ter sua atividade medida em extratos enzimáticos, seja qual for a fonte de tecido vegetal analisada, sem que isso signifique uma efetiva contribuição para o processo; (3) a ocorrência de um padrão complexo de atividade das hidrolases do amido, havendo, por exemplo, múltiplas isoenzimas e múltiplas formas das endo-amilases, algumas das quais sem atividade aparente e em diferentes fases fisiológicas do vegetal; (4) a inexistência, até o momento, de substratos que permitam a realização de ensaios específicos para testar a ampla gama de enzimas potencialmente envolvidas; (5) a ação integrada, ou em cascata das enzimas, que dificulta encontrar o produto de catálise de uma enzima no tecido *in vivo* e servir como indicador de sua atividade; (6) dificuldade de avaliar a regulação gênica de algumas das enzimas em razão dos baixos níveis de expressão; (7) nem sempre é encontrada uma correlação óbvia entre os níveis de proteína, mRNA e atividade das enzimas e o evento temporal da degradação do amido. Esta ausência de correlação ocorre, entre outras razões, em função de diferentes formas das enzimas e do papel fisiológico desconhecido de algumas formas delas e também em função das diferentes localizações espaciais da enzima e do substrato. Além disso, existem mecanismos de regulação pós-transcrição e pós-tradução envolvidos na regulação da expressão gênica.

No caso de substratos que estão contidos em organelas que permanecem íntegras durante o processo, é preciso considerar que a enzima deve apresentar um peptídeo de trânsito que permita o seu ingresso nessa organela. A síntese do amido e, normalmente, sua degradação, ocorrem dentro do amiloplasto, que possui duas membranas a serem transpostas antes do acesso ao grânulo de amido ou aos os produtos da ação de outras enzimas. Já foi visto que  $\alpha$ -amilase, por exemplo, possui várias isoformas sem o peptídeo de trânsito predito em sua sequência (MUKERJEA et al., 2002), o que permite considerar que a ação dessas isoformas da enzima no processo de degradação do amido está relacionada com a perda da integridade do amiloplasto durante o processo. Por outro lado, como o amiloplasto parece manter-se íntegro durante o amadurecimento da banana, enzimas amilolíticas sintetizadas *de novo* dependem de um peptídeo de transporte para que passem para o interior da organela, o que possibilitaria sua ação nos grânulos do amido.

Além do transporte para o interior do amiloplasto, é preciso que a enzima seja capaz de se ligar ao grânulo, para que atue sobre o seu substrato. As enzimas que apresentam essa característica são conhecidas como “enzimas associadas ao grânulo” (em inglês, *starch granule associated protein -SGAP*) e estão fortemente ligadas tanto à superfície quanto ao interior dos grânulos. Assim, a detecção tanto da proteína específica quanto de sua atividade enzimática associada ao grânulo pode ser um bom indicador de que a enzima tem um papel importante na degradação do amido.

Devido à possibilidade das proteínas se ligarem artificialmente e de forma inespecífica aos grânulos durante o processo de isolamento do amido, as metodologias de extração devem minimizar esta possibilidade e, ao mesmo tempo, tentar preservar a atividade das enzimas associadas. Neste sentido, o processo utilizado em nossos trabalhos para evitar a associação indesejável de proteínas aos grânulos de amido durante o procedimento de isolamento dos grânulos tem sido eficiente, pois já foram detectadas atividade e proteína das isoformas citosólicas e amiloplásticas das amido-fosforilases em todos os estágios de degradação do amido da banana, mas nunca associadas aos grânulos de amido (SIMÃO et al, 2008, PERONI-OKITA et al, 2010, MAINARDI et al, 2006). Por outro lado, atividade/proteína das  $\beta$  e  $\alpha$ -amilases foram detectadas tanto solúveis quanto associadas aos grânulos.

Análises por diferentes técnicas microscópicas, tais como, Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Microscopia de Força Atômica (MFA) mostram parte da morfologia e estrutura do grânulo de amido da banana e como ocorre o processo de degradação do amido durante o amadurecimento da banana (PERONI-OKITA et al., 2010, 2013, 2015; SOARES et al., 2011).

Grânulos de amido de banana verde visualizados por MEV mostram uma morfologia única, com grânulos apresentando formatos ovais e alongados, grandes e pequenos, e no momento em que a degradação do amido inicia-se, a superfície que, aparentemente, apresentava-se praticamente lisa, adquire um aspecto estriado, em paralelo, em praticamente todo o grânulo. As camadas vão sendo expostas a intervalos regulares de aproximadamente 400 nm, até que uma região ou camada mais cristalina dos anéis de crescimento seja alcançada e assim o processo de degradação é finalizado ou torna-se mais lento. Esses estudos sugerem que a degradação do amido da banana ocorre preferencialmente na superfície dos grânulos, com a ação inicial da  $\alpha$ -amilase ou do sistema GWD/PWD e  $\beta$ -amilase, com o auxílio

das isoamilases em ambos os casos. Resta definir qual é o modo de sequência de atuação das enzimas e sua importância no processo.

Com base nas informações sobre as enzimas ligadas ao grânulo de amido de banana, e a resultados anteriores do grupo, mostrando a degradação “*in vivo*” dos grânulos de amido de banana, pode-se inferir que o processo de degradação pode ser similar ao que vem sendo proposto para a *Arabidopsis*, pois há a presença de grande parte das enzimas descritas como fazendo parte da degradação do amido, associadas à superfície dos grânulos (Figura 18).

Este trabalho teve como objetivo tentar elucidar a importância das hidrolases  $\alpha$ -amilase e  $\beta$ -amilase e enzimas associadas, nas vias de degradação do amido da banana durante o amadurecimento.

O objetivo nesse capítulo foi utilizar grânulos de amido previamente fosforilados e desproteinizados usados em ensaios *in vitro* com enzimas  $\alpha$ -amilase e  $\beta$ -amilase, para tentar estabelecer a via de degradação do amido de banana.

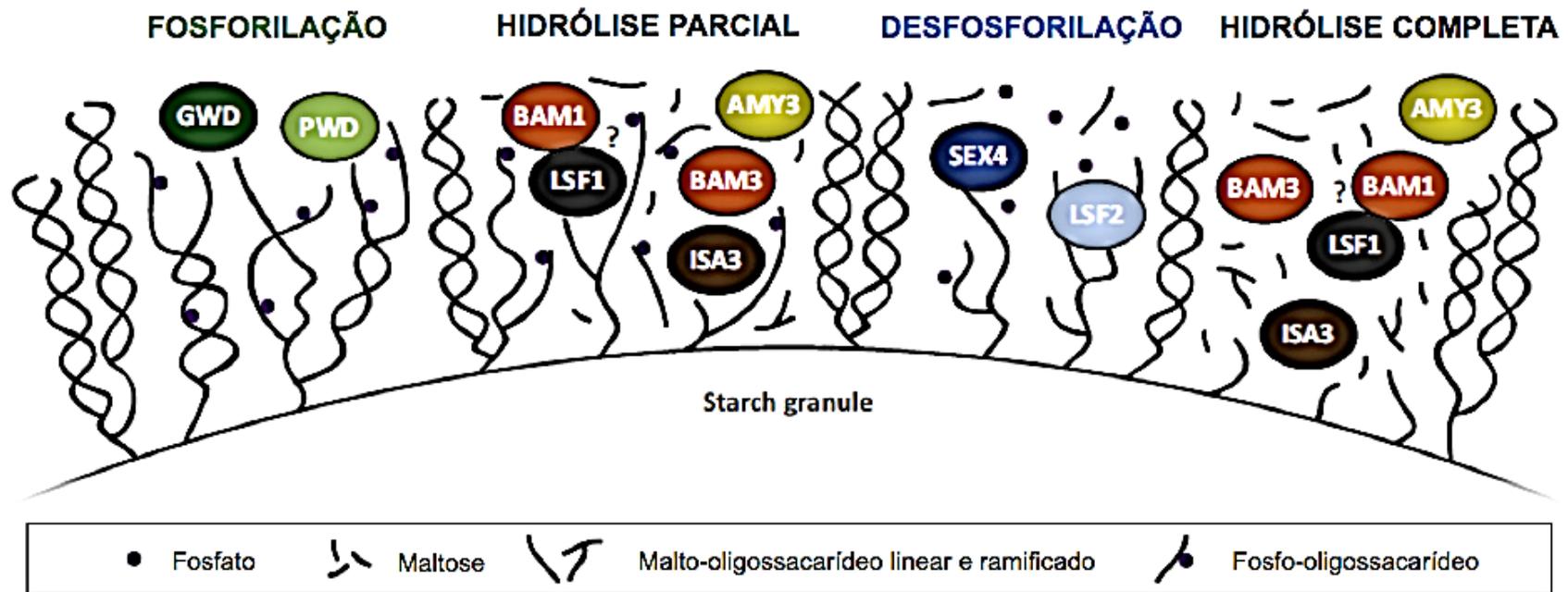


Figura 18: Modelo de gradação de amido transitório em folhas de *Arabidopsis*. Adaptado de SILVER et al., 2014).

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Material:**

#### **2.1.1. Obtenção de amostras de banana em diferentes graus de amadurecimento para isolamento do amido:**

Os frutos de bananas *Musa acuminata* AAA, cv. Nanicão, foram obtidos na Magário Comércio de Frutas Ltda (CEAGESP), imediatamente após a colheita. Os frutos foram selecionados por tamanho e danos na casca e lavados por imersão em água contendo 250 mg/L do fungicida Tebuconazol – Folicur 200 EC - Bayer®. Após serem limpos e secos foram armazenados em Câmara de Demanda de Oxigênio (BOD), com umidade (~90%) e temperatura (~20°C) monitoradas durante o período de amadurecimento (13 dias). Diariamente 3 frutos desses frutos foram aleatoriamente armazenados em frascos fechados, em triplicata, para a medida de etileno. Após a medida, as polpas dos frutos foram picadas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C.

Nas amostras armazenadas foi determinado o teor de amido em cada amostra e, de acordo com o perfil de amido, foram escolhidas as amostras que representassem diferentes estágios de amadurecimento da banana e, por consequência, diferentes graus de degradação do amido.

Os grânulos de amido utilizados nas análises foram isolados nos seguintes estágios (Figura 19):

- i. Estágio verde – 3 dias pós-colheita (3 dpc);
- ii. Estágio intermediário – correspondem ao 6 e ao 7 dias pós-colheita (6 dpc e 7 dpc), no qual o 7 dpc corresponde ao início do processo de degradação dos grânulos de amido;
- iii. Estágio maduro – corresponde ao amido em pleno estágio de degradação, 9 dias pós-colheita (9 dpc).

### **2.2. Métodos:**

#### **2.2.1. Medida de Etileno**

O amadurecimento dos frutos foi monitorado pela medida dos níveis de etileno, que foi quantificado diariamente. Os frutos foram mantidos, por aproximadamente 1 hora, em frascos fechados (aproximadamente 600 g/frasco). Dos gases acumulados nos frascos, foram coletadas amostras de 10 mL para as estimativas de etileno. As

injeções foram feitas manualmente em cromatógrafo a gás (HP 6890), acoplado a um detector de Ionização de Chamas (FID). Após a medição, as polpas dos frutos foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenados a -80°C para análises posteriores.

### **2.2.2. Caracterização dos açúcares solúveis**

Os açúcares solúveis foram extraídos, homogeneizando-se aproximadamente 100 mg de amostra em 0,5mL de etanol 80% seguido de agitação a 450 rpm em Termomixer durante 15 minutos à 80°C e centrifugado a 10.621 g por 10 min a temperatura ambiente. O sobrenadante foi transferido para um balão volumétrico de 2 mL, repetindo-se o procedimento mais duas vezes. O etanol de 1mL do extrato etanólico obtido foi evaporado em concentrador rotativo a vácuo. O volume foi retomado em 1mL de água deionizada, filtrado em membrana de PTFE 0,45 µm e transferido para vial de 2 mL. Os açúcares solúveis glicose, frutose, sacarose e maltose foram identificados e quantificados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC-Dionex), utilizando um detector de pulso amperométrico e coluna CarboPac PA1(4x250 mm), em corrida isocrática com fluxo de 1mL/min de NaOH (18mM) (GOMEZ et al., 2002).

### **2.2.3. Determinação do teor de amido**

O amido foi determinado por método enzimático otimizado para bananas por Arêas e Lajolo (1981). Aproximadamente 0,5 g de polpa foi homogeneizada em 5 mL de NaOH 0,5 N, seguido por neutralização por 5 mL de ácido acético 0,5 N. A solução foi transferida para balão volumétrico (25 mL), tendo sido o volume completado com água destilada. O amido contido em uma alíquota de 1 mL foi precipitado pela adição de 4 mL de etanol absoluto e centrifugado por 15 min a 12.000 g. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com 4 mL de etanol 80%, por duas vezes. Após evaporação total do etanol à temperatura ambiente, 1 mL de solução de amiloglicosidase (14 U/mL, pH 4,8) foi adicionada ao precipitado, seguido por incubação a 37°C por 2 horas. A reação foi interrompida pela adição de 100 µL de ácido perclórico 0,6 N. A glicose resultante foi quantificada através do método de glicose/peroxidase/ABTS, segundo Bergmeyer (1974). A glicose foi utilizada como padrão.

#### **2.2.4. Isolamento dos grânulos de amido de banana**

O isolamento do amido foi feito segundo a metodologia descrita por Ritte et al. (2000a). Aproximadamente 100 g de banana foi homogeneizada em 300mL de tampão de extração (Hepes-KOH 100mM pH 8,0, EDTA 1mM, DTT 5mM e Triton X-100 0,05%) em Turrax, por 3 min à 4°C. O homogenato foi filtrado por uma membrana *Miracloth* (Calbiochem) e o filtrado foi decantado *overnight* a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ainda aquoso foi passado através de uma solução de 95% Percoll (American Biosciences) e 5% de Tampão (Hepes-KOH 0,5 mM pH 7,0) por 30 min, e centrifugado por 15 min a 2.000 g a 4 °C. O precipitado com os grânulos foi lavado (seguido por centrifugação) por três vezes com tampão de extração, seco sob vácuo (*speed vac*) e armazenado à -20°C.

#### **2.2.5. Análises para quantificação de fósforo em grânulos de amido de banana**

##### **2.2.5.1. Determinação de fósforo total em grânulos de amido de banana**

Ao amido (1 g) foram adicionados etanol absoluto e misturados por aproximadamente 10 min, até homogeneização. As amostras foram carbonizadas em mufla a 600 °C por 3 horas, até completa obtenção de cinzas que, após resfriamento dos cadinhos à temperatura ambiente, foram adicionadas de 2 mL de HNO<sub>3</sub> (1:2), e incubadas em banho fervente por 30 min. A suspensão foi transferida para um balão volumétrico de 50 mL, adicionado de 1,5 mL de vanadato de amônio (0,25%), 1,5 mL de molibdato de amônio (5%) e o volume ajustado com água, mantido por 30 min, a temperatura ambiente. A curva padrão foi preparada com KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1, 2, 3, 4, 5 µg/mL, baseado no peso do fósforo), em 2 mL de HNO<sub>3</sub> (1:2), 1,5 mL de vanadato de amônio (0,25%) e 1,5 mL de molibdato de amônio (5%) em balão volumétrico de 50 mL. A absorbância foi lida a 355 nm (SMITH e CARUSO, 1964).

##### **2.2.5.2. Determinação de fósforo em grânulos de amido de banana por Ressonância Magnética Nuclear de Fósforo (<sup>31</sup>P-RMN)**

Ao amido (1 g) foram adicionados 4 mL de tampão acetato 50 mM, pH 6,5 contendo 0,25 mg de α-amilase de *Bacillus*, Tipo IIA (Sigma), incubado em banho fervente de água por 10 min sob agitação. O conteúdo foi resfriado e adicionado de 0,5 mg da α-amilase (Sigma), incubado a 70°C por 2 h sob agitação. O hidrolisado foi aquecido a 100°C por 5 min para inativação da enzima e em seguida centrifugado a

7.000 g a temperatura ambiente por 20 min, para remoção de material insolúvel. Foi recolhido 2 mL do sobrenadante e adicionado 1 mL de água deuterada (D<sub>2</sub>O) contendo ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) 20 mg e β-Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo (β-NAD) (Sigma) 1,071 mg (usado como referência interna, igual a 0,1 mg de fósforo). O pH da solução foi ajustado para 8,0 utilizando NaOH 0,5 M e a solução transferida para um tubo de RMN para análise de <sup>31</sup>P-RMN. O espectro de <sup>31</sup>P-RMN foi obtido pelo equipamento BRUKER 400 MHZ/52 MM CRYOMAGNET FOR NMR SPECTROSCOPY (USA Bruker Instruments, Billerica, MA) (LIM e SEIB,1993).

As análises para quantificação de fósforo em grânulos de amido de banana foram realizadas em estágio no Laboratório da Dra Jay-Lin Jane, do Department of Food Science and Human Nutrition, da Iowa State University, nos Estados Unidos da América. A Dra Jane tem uma longa experiência na caracterização de amido de diferentes fontes, especialmente na caracterização e quantificação de fósforo em amido.

## **2.2.6. Identificação das proteínas ligadas a superfície dos grânulos de amido**

### **2.2.6.1. Eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)**

Amostras de amido isolados em diferentes etapas de amadurecimento da banana foram utilizadas diretamente em géis de poliacrilamida 10% em condições desnaturantes (SDS-PAGE), para a extração das proteínas da superfície do grânulo de amido. Após a agitação em Vortex essa suspensão do amido foi aplicada diretamente no gel. O tampão de corrida utilizado foi o Tris 25 mM, pH 8,3, glicina 192 mM, SDS 1%, como descrito por Hames e Rickwood (1990). Para visualização das proteínas, os géis foram corados com Coomassie Brilliant Blue R-250 (0,1%) em solução aquosa de ácido acético 7% e etanol 40% e descoradas em solução aquosa de ácido acético 7,5% e etanol 5%.

### **2.2.6.2. Western blotting**

As proteínas isoladas dos grânulos de amido de banana em diferentes etapas de amadurecimento foram separadas por SDS-PAGE e eletroforicamente transferidas para membrana de nitrocelulose, Amersham™ Hybond™ - ECL, GE

Healthcare, em tampão Tris-glicina (25 mM/192 mM) (pH 8,3), com 20% de metanol. A voltagem utilizada para transferência foi de 25V por, aproximadamente, 16h à 4°C. A qualidade da transferência foi verificada através da visualização das bandas transferidas utilizando coloração temporária com o corante Ponceau. Em seguida, a membrana foi bloqueada com 5 mL de tampão fosfato salino (PBS) adicionada de Albumina de Soro Bovino (BSA) 5% por 2 h a 4°C. O tampão foi descartado e a membrana foi lavada duas vezes com tampão Fosfato Salino com Tween (PBST) e incubada novamente com 5 mL do mesmo tampão, adicionado de anticorpo primário anti GWD de *Arabidopsis* (1:100) e anti PWD de batata (1:50) (Ambos doados pelo Dr. Kotting – Zurich, Suíça) por, aproximadamente, 16 horas. A membrana foi lavada duas vezes com tampão PBST e incubada novamente com 5 mL do mesmo tampão contendo anticorpo secundário conjugado com Cy5 (anti-Mouse IgG) (1:2500) por 1 hora. A formação dos complexos antígeno-anticorpo foi detectada por fluorescência com o auxílio do analisador de imagens VersaDoc MP 4000 (Bio-Rad) através do programa Quantity One (Bio-Rad). As imagens das membranas foram detectadas através de excitação com LED vermelho 695±55 nm BP para as proteínas marcadas com Cy5.

### **2.2.6.3. Microscopia de Imunofluorescência**

A imunolocalização de proteínas ligadas à superfície dos grânulos de amido isolados de bananas em diferentes etapas foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Peroni (2007). Aproximadamente 50 mg de amido foi hidratado e bloqueado com 1 mL de tampão PBS/BSA (tampão Fosfato Salino pH 7,2 contendo BSA 3%(p/v)) por 2 horas a temperatura ambiente. Após centrifugação a 1.000 g por 5 min, o precipitado foi incubado com 200 µL de tampão PBS/BSA contendo o anticorpo primário contra GWD (1:100), PWD (1:50), α-amilase (1:100) e β-amilase (1:10) por aproximadamente 16 h a 4°C. Após nova centrifugação, o precipitado foi lavado três vezes com 1 mL de tampão PBS/BSA por 30 min cada lavagem e então incubado por aproximadamente 16 h à temperatura ambiente com 100 µL do mesmo tampão contendo o anticorpo secundário anti-rabbit IgG conjugado com Alexa Fluor® 488 (Life Technologies) diluído 1:50. O precipitado foi lavado repetidamente, com o tampão PBS pH 7,2 e os grânulos marcados foram observados em Microscópio Confocal de Varredura a Laser (CLSM, Zeiss, Jena, Turingia, Germany LSM 510) e

as imagens foram analisadas no programa Laser Scanning Microscopes (LSM) Image Browser. O mesmo procedimento foi feito para as amostras controle, porém sem a adição dos anticorpos.

### **2.2.7. Procedimentos para a obtenção das proteínas hidrolíticas ligada aos grânulos de amido**

#### **2.2.7.1. Extração de proteína ligada ao grânulo de amido por eletroforese em condições não desnaturantes (PAGE-NATIVO).**

A atividade hidrolítica foi analisada por eletroforese em condições não-desnaturantes, realizada em géis de acrilamida 8% e com 1,0 mm de espessura. O tampão de corrida foi Tris 25 mM, pH 8,3, glicina 192 mM (HAMES e RICKWOOD, 1990). Após a agitação em Vortex uma suspensão com aproximadamente 50 mg de amido foi aplicada diretamente no gel. A eletroforese inicialmente ocorreu a 50V (até o corante atingir o gel de separação) e, em seguida, aumentada para 200V. Todo o processo ocorreu à temperatura de 4°C. Após a corrida, esse gel foi colocado na superfície de outro gel de acrilamida 8%, 1 mm de espessura contendo 0,1% de amilopectina para revelar a atividade das enzimas que degradam o amido. O gel obtido, foi lavado duas vezes (15 minutos cada) com tampão Tris-HCl 100 mM (pH 7,0), contendo MgCl<sub>2</sub> 1mM, DTT 1mM e CaCl<sub>2</sub> 1mM e incubado overnight no mesmo tampão com agitação moderada a 20°C. O gel foi corado com solução aquosa de iodeto (I<sub>2</sub> 13 mM e KI 40 mM) para revelar as bandas proteicas com atividade hidrolítica. As bandas proteicas foram cortadas e congeladas para futura identificação por sequenciamento.

#### **2.2.7.2. Extração das proteínas ligadas aos grânulos de amido.**

Aproximadamente 2 g de amido no estágio verde foi adicionado de 10 mL de tampão (HEPES- KOH 50 mM, pH 7,0), contendo CaCl<sub>2</sub> 1mM e benzamidina 1mM, a suspensão foi agitada por 1 hora e 30 min a 37°C, centrifugada por 3 min a 6.000 g, o sobrenadante foi concentrado em filtro de ultracentrifugação Amicon® Ultra-30 kDa. O perfil das proteínas nativas foi analisado por eletroforese em condições não-desnaturantes, realizada em gel de acrilamida 8% e com 1 mm de espessura. O tampão de corrida foi Tris 25 mM, pH 8,3, glicina 192 mM (HAMES e RICKWOOD, 1990). Após a corrida, esse gel foi transferido para um outro gel de acrilamida 8%, 1

mm de espessura contendo 0,1% de amilopectina para revelar a atividade das enzimas que degradam o amido. O gel obtido, foi lavado duas vezes (15 minutos cada) com tampão Tris-HCl 100 mM (pH 7,0), contendo  $MgCl_2$  1mM, DTT 1mM e  $CaCl_2$  1mM e incubado overnight no mesmo tampão com agitação moderada a 20°C. O gel foi corado com solução aquosa de iodeto ( $I_2$  13 mM e KI 40 mM) para revelar as bandas proteicas com atividade amilásica. As bandas proteicas foram cortadas e armazenadas para futura identificação por sequenciamento.

#### **2.2.7.3. Extração de proteínas por eletroeluição**

Aproximadamente 2 g de amido isolado de banana verde (3dpc), foi adicionado de tampão (HEPES- KOH 50 mM, pH 7,0), contendo  $CaCl_2$  1mM e benzamidina 1mM, a suspensão foi aplicada no equipamento Centrilutor® - Micro-eletroeluidor- Amicon®. As proteínas da superfície dos grânulos de amido foram eletroeluidas por 5 horas, 100 V, 4°C. O perfil das proteínas nativas foi analisado por eletroforese em condições não-desnaturantes, realizada em gel de acrilamida 8% e com 1 mm de espessura. O tampão de corrida foi Tris 25 mM, pH 8,3, glicina 192 mM (HAMES e RICKWOOD, 1990). Após a corrida, esse gel foi transferido para um outro gel de acrilamida 8%, 1 mm de espessura contendo 0,1% de amilopectina para revelar a atividade das enzimas que degradam o amido. O gel obtido, foi lavado duas vezes (15 minutos cada) com tampão Tris-HCl 100 mM (pH 7,0), contendo  $MgCl_2$  1mM, DTT 1mM e  $CaCl_2$  1mM e incubado overnight no mesmo tampão com agitação moderada a 20°C. O gel foi corado com solução aquosa de iodeto ( $I_2$  13 mM e KI 40 mM) para revelar as bandas proteicas com atividade amilásica. As bandas proteicas foram cortadas e armazenadas para futura identificação por sequenciamento.

#### **2.2.7.4. Sequenciamento de proteínas**

As bandas proteicas identificadas nos itens 2.2.7.1 e 2.2.7.2 foram submetidas à identificação por espectrometria de massas. Primeiro as bandas foram descoradas com acetronitrila, seguido de redução com ditioneitol (DTT), alquilada com iodoacetemida e então digeridas com 100 ng de tripsina. Em seguida, esses peptídeos foram detectados por espectrometria de massa, usando o sistema MALDI-TOF Autoflex Speed (Bruker) utilizando o procedimento estabelecido no laboratório para análise de peptídeos CEFAP-USP.

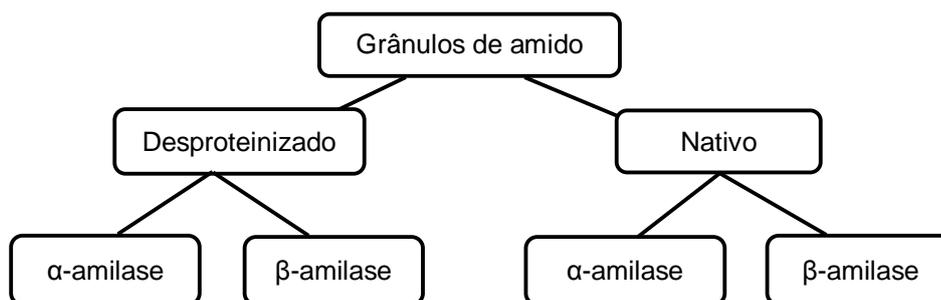
## **2.2.8. Ensaios *in vitro* com enzimas comerciais e grânulos de amido isolados de banana**

### **2.2.8.1. Desproteínização dos grânulos de amido**

A desproteínização dos grânulos de amido isolados de banana verde (3 dpc) foi realizada de acordo com Reimann et al, (2004), utilizando tolueno. Em 10 mg de amido, foi adicionado 1,2 mL de água:tolueno (3:1), misturado em Vortex por aproximadamente 30 s, separado por centrifugação, a 16.000 g por 5 min. Esse procedimento foi repetido quatro vezes. Em seguida, os grânulos de amido foram lavados com 1 mL de água, por três vezes. Ao final foi adicionado 100 µL de etanol P.A. e os grânulos de amido foram secos à temperatura ambiente.

### **2.2.8.2. Hidrólise dos grânulos de amido com as enzimas $\alpha$ -amilase e $\beta$ -amilase**

Para o ensaio *in vitro* com as enzimas comerciais foram utilizados 20 mg de amido desproteínizado e 20 mg de amido sem desproteínização, as amostras utilizadas foram as dos estágios 3 e 6 dpc. Às amostras de amido foram adicionados 500 µL de tampão Hepes-KOH 50 mM pH 7, Cisteína 20 mM, Benzamidina 100 mM, Azida 0,1% e enzimas comerciais: 528,36 U de  $\alpha$ -amilase porcina pancreática (Sigma) e 455,84 U de  $\beta$ -amilase de batata doce (Sigma). Esta quantidade foi determinada levando em conta os dados que tínhamos de atividade dessas enzimas em polpa de banana. As enzimas foram adicionadas separadamente. A hidrólise foi feita à 30°C por 48 e 72 horas com agitação branda, os grânulos e os sobrenadantes foram separados por centrifugação a 5.000 g por 5 min. Os grânulos foram analisados por microscopia eletrônica de varredura e microscopia de força atômica e o sobrenadante por cromatografia líquida com detector amperométrico, em busca de mudanças na superfície dos grânulos e produtos solúveis da hidrólise no sobrenadante. Os controles foram constituídos por grânulos desproteínizados e não desproteínizados submetidos ao mesmo tratamento porém, sem as enzimas. Os ensaios de hidrólise dos grânulos de amido foram realizados de acordo com o fluxograma mostrado na Figura 19.



**Figura 19:** Fluxograma dos ensaios de hidrólise com hidrolases.

### 2.2.8.3. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As amostras de amidos isolados e hidrolisados de bananas fixadas em “stubs” de alumínio com fita de carbono dupla face. Em seguida, foi feita a metalização com platina (aproximadamente 10 nm de espessura), em equipamento Bal-tec MED-020 Coating System. As micrografias foram obtidas por um microscópio eletrônico de varredura (LEO Stereoscan 440) e as imagens obtidas são de elétrons secundários, operando em modo 5 KV.

### 2.2.8.4. Análise dos produtos de hidrólise das enzimas $\alpha$ -amilase e $\beta$ -amilase

Os produtos solúveis da hidrólise das amostras de amido isoladas de banana foram separados por centrifugação. O volume foi filtrado em membrana de PTFE 0,45  $\mu$ m e transferidas para vials de 2 mL. Os produtos de hidrólise foram submetidos à Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC-Dionex), utilizando um detector de pulso amperométrico e coluna CarboPac PA 100 (4x250 mm), em corrida amperométrica com fluxo de 0,7 mL/min de NaOH (1M) (MORALES et al., 2008).

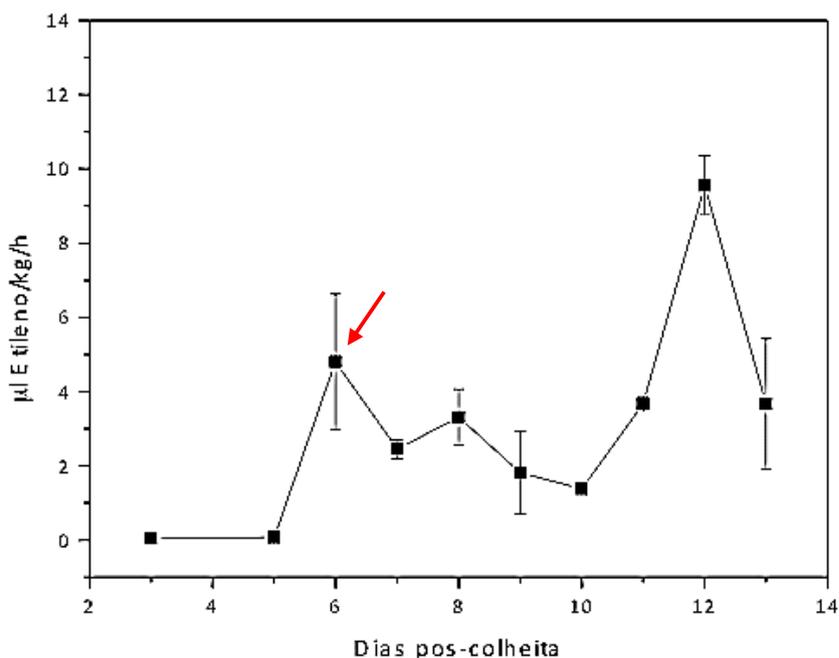
### 2.2.8.5. Microscopia de Força Atômica (MFA)

Grânulos de amido isolados foram dispersos em água e uma gota desta dispersão foi colocada em uma lâmina de silício tratada com plasma. Os grânulos foram examinados depois de a água evaporar naturalmente. A superfície do grânulo foi observada com o uso do aparelho JPK Nano Wizard II (JPK Instruments AG, Berlin, Germany), modo não-contato. Os “tips” (Ultrasharp microprobe) usados foram feitos de silício e montados no cantilever a força constante de 42N/m e frequência de ressonância de 100 a 160 KHz. O software usado para processar as imagens foi o SPM Image Processing 3.2.5.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

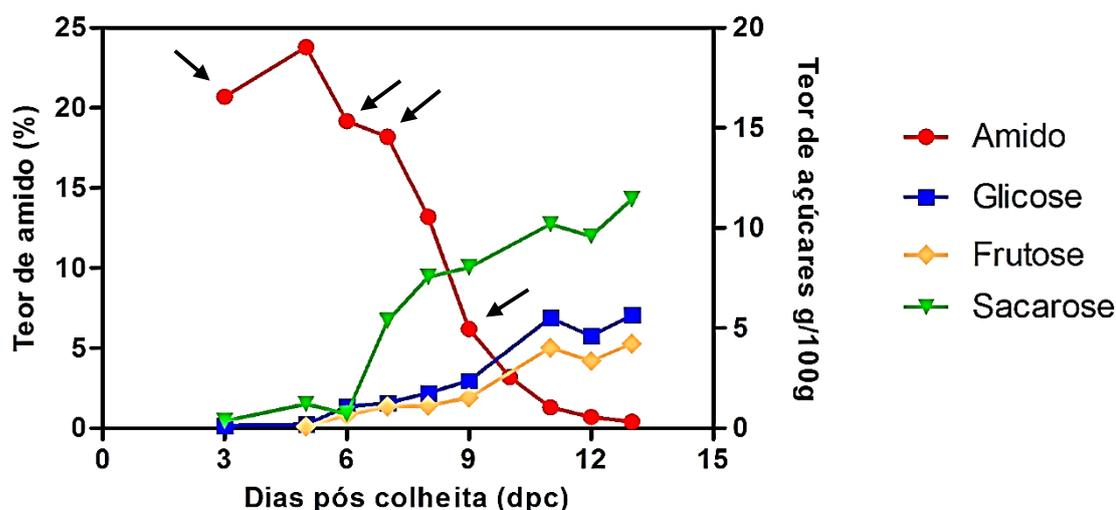
#### 3.1. Amostras de banana em diferentes estágios de amadurecimento

Frutos de banana *Musa acuminata* da cv. Nanicão, foram selecionados e armazenados sob temperatura de, aproximadamente, 20°C. Diariamente, a produção de etileno foi quantificada para identificar o início e fim do climatério (Figura 20).



**Figura 20:** Perfil da produção de etileno durante o amadurecimento dos frutos de banana. A seta indica o início do climatério do fruto.

As amostras selecionadas e armazenadas com base no perfil de etileno foram analisadas quanto aos teores de amido e açúcares solúveis (Figuras 21, respectivamente). Frutos recém-colhidos (verdes) tiveram teores de amido de, aproximadamente, 20% que, com a degradação durante o amadurecimento, chegaram a níveis de 0,4%. O acúmulo de açúcares solúveis foi concomitante ao da degradação do amido e similar ao encontrado anteriormente em nossos trabalhos para esta cultivar (CORDENUNSI E LAJOJO, 1995; NASCIMENTO et al, 2006). As setas em preto na Figura 21 indicam as amostras selecionadas para o isolamento do amido para as etapas posteriores.



**Figura 21:** Perfil de açúcares solúveis durante o amadurecimento de frutos de banana (lado direito). Perfil de degradação de amido durante o amadurecimento de frutos de banana (lado esquerdo). As setas indicam as amostras selecionadas para a extração dos grânulos de amido.

### 3.2. Quantificação dos carbonos fosforilados

No modelo de degradação de amido transitório proposto por Zeeman, Kossmann e Smtih et al. (2010), a ação das enzimas glucano-água-diquinase (GWD) e fosfoglucano-água-diquinase (PWD) são essenciais para a degradação do grânulo de amido pela ação da  $\beta$ -amilase, sem a ação prévia da  $\alpha$ -amilase.

Para não depender da complicada e demorada purificação das proteínas ou da produção heteróloga da GWD e PWD, nos testes com os grânulos de amido, foi preciso determinar se os grânulos já estavam fosforilados em etapa anterior à colheita dos frutos, o que foi feito por  $^{31}\text{P}$  RMN (RITTE et al, 2006; LIM, KASENSUWAN E JANE, 1994; LIM E SEIB, 1993; SONG E JANE, 2000), ao invés de HPLC-PAD (CARPENTER et al, 2012; RITTE et al, 2006).

Existem três formas de fósforo encontradas em amido: fosfato monoéster, fosfolípides e fosfato inorgânico. Essas formas dependem da fonte botânica, maturidade e condições de crescimento da planta (KASENSUWAN e JANE, 1994). Em amido de cereal a forma mais encontrada é o fosfolípido (SCHOCH, 1942; LIM, KASEMSUWAN E JANE, 1994) e em amido de tubérculos e raízes a forma mais encontrada é o fosfato monoéster (SCHOCH, 1942; LIM, KASEMSUWAN E JANE, 1994).

Para a realização dessas análises, foi escolhida a amostra com 3 dias pós-colheita por ser de frutos verdes, onde a quantidade de amido é maior e os grânulos ainda íntegros. A amostra 6 dpc foi escolhida por ser a de um dia anterior ao início da degradação do grânulo e 9 dpc frutos maduros, onde é provável que já tenha ocorrido a maior parte da degradação do amido.

O fósforo total nos grânulos de amido das amostras foi quantificado para estimar a quantidade de amido necessária para a análise de RMN. A quantidade de fósforo total encontrada pelo método colorimétrico e por RMN foi semelhante (Tabela 1) em todas as amostras, diminuindo com o grau de amadurecimento fruto. Já que só faz sentido que só a superfície do grânulo seja fosforilado é provável que o que está sendo quantificado sejam grânulos ainda íntegros, que diminuem em número conforme o processo de amadurecimento do fruto avança e a degradação do amido se acelera. Normalmente menos de 0,5% de resíduos de glicose são fosforilados, dependendo da espécie da planta (RITTE et al, 2006; KASEMSUWAN e JANE, 1996).

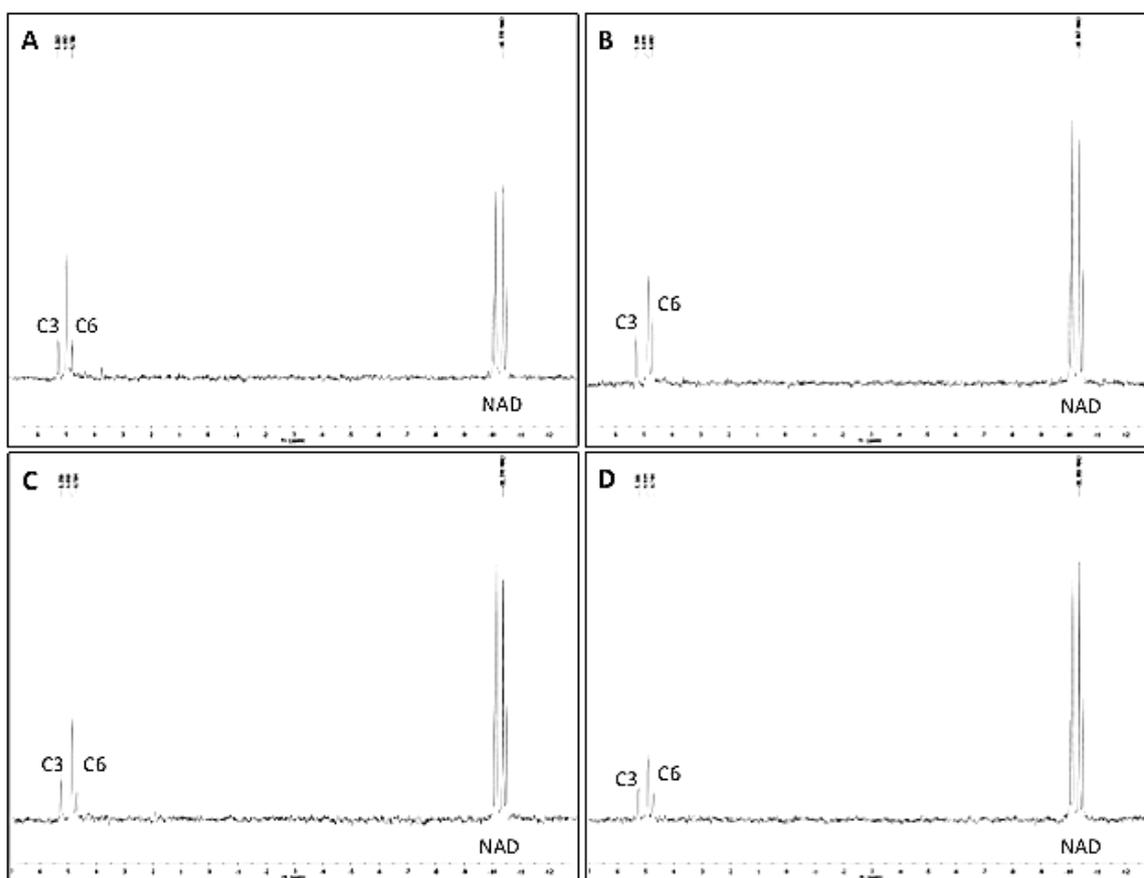
**Tabela 1:** Teor de fósforo total (%) em diferentes estágios de grânulos de amido de banana comparando o método químico com o método de ressonância magnética nuclear de fósforo.

Amostras (dpc)	Método	
	Análise Química	Análise RMN
3	0,00897	0,00796
6	0,00623	0,00578
7	0,00524	0,00509
9	0,00410	0,00372

A Figura 22 mostra a presença de três picos de fósforo nas amostras, no intervalo de 4 a 5 ppm. De acordo com Kasemsuwan and Jane, (1996) esses picos indicam a presença fosfato monoéster. Sabe-se que o amido de batata tem de 70 a 80% dos seus resíduos fosforilados localizados no C6 e de 20 a 30% estão no C3 (RITTE et al, 2006; MIKKELSEN et al, 2004; HAEBEL et al, 2008). Ainda na Figura

22é possível observar uma diminuição dos picos de fósforo conforme o grau de amadurecimento do fruto (Figura 22A – 22D), o que também pode ser notado na quantificação de fósforo total nas amostras de amido de banana pelos métodos colorimétrico e por RMN.

Na tabela 2, são apresentados os resultados de quantificação de fosforilação por cada resíduo de glicose fosforilada, utilizando NAD como um padrão interno. Nas amostras (3, 6, 7 e 9 dpc) pode-se notar uma diminuição de 58% para a glicose-6P do amido de banana no estágio verde para o estágio maduro, e ainda uma diminuição de 23% para a glicose-3P do amido de banana no estágio verde para o estágio maduro.



**Figura 22:** Espectro de <sup>31</sup>P-RMN após a hidrólise de 1 g de amido de banana em diferentes estágios de amadurecimento e identificação dos carbonos fosforilados. A - estágio verde (3 dpc) no deslocamento químico de 5.263 ppm se refere ao C3 e nos deslocamentos químicos de 4.993 ppm e 4.786 ppm se refere ao C6. B - estágio intermediário (6 dpc) no deslocamento químico de 5.268 ppm se refere ao C3 e nos deslocamentos químicos de 4.839 ppm e 4.693 ppm se refere ao C6. C - estágio intermediário (7 dpc) no deslocamento químico de 5.296 ppm se refere ao C3 e nos deslocamentos químicos de 4.858 ppm e 4.704 ppm se refere ao C6. D - estágio maduro (9 dpc) no deslocamento químico de 5.266 ppm se refere ao C3 e nos deslocamentos químicos de 4.914 ppm e 4.744 ppm se refere ao C6. O NAD foi usado como referência interna no deslocamento químico de -10.365 ppm.

**Tabela 2:** Quantidade de fósforo em cada carbono fosforilado, em diferentes estágios de amadurecimento da banana.

Amostras (dpc)	Fósforo (mg)	
	Glicose-6P	Glicose-3P
3	7,80338	1,43569
6	5,50628	1,11417
7	4,56317	1,04829
9	3,33832	1,03603

Umas das primeiras evidências da existência da proteína GWD, ainda denominada de R1, que pode aparecer de três diferentes formas, dentro dos grânulos, associadas à superfície do grânulo ou solúvel nos plastídios, foi relatada por Ritte et al, (2000), em folhas e tubérculos.

Atualmente sabe-se que as enzimas GWD e PWD são importantes na fosforilação dos grânulos de amido transitório, dando acesso à ação de outras enzimas, principalmente a  $\beta$ -amilase no processo de degradação dos grânulos de amido (RITTE et al, 2006; REIMANN et al, 2007). Foi Ritte et al, (2000), que relataram pela primeira vez a existência da GWD em amido de banana. As proteínas solúveis foram extraídas do amido de banana, analisadas por eletroforese em gel de SDS-PAGE e Western blotting. Foi estimado um valor de 0,2  $\mu$ g/g de amido para glicose-6P.

De acordo com trabalhos do nosso laboratório, algumas enzimas relacionadas à degradação de amido já foram encontradas em polpa de banana como a  $\alpha$ -amilase, a  $\beta$ -amilase, as isoamilases, as glicosidases e amido-fosforilases, todas com atividade catalítica. Associadas aos grânulos de amido foram encontradas a  $\alpha$ -amilase, a  $\beta$ -amilase (ambas atividade catalítica e proteína relativa), a GWD e a PWD (ambas a proteína relativa) (BASSINELLO, CORDENUNSI, LAJOLO, 2002; NASCIMENTO et al., 2006; MOTA et al., 2002; MAINARDI et al., 2006; BIERHALS et al., 2004; MAINARDI, 2007; PERONI-OKITA et al., 2013).

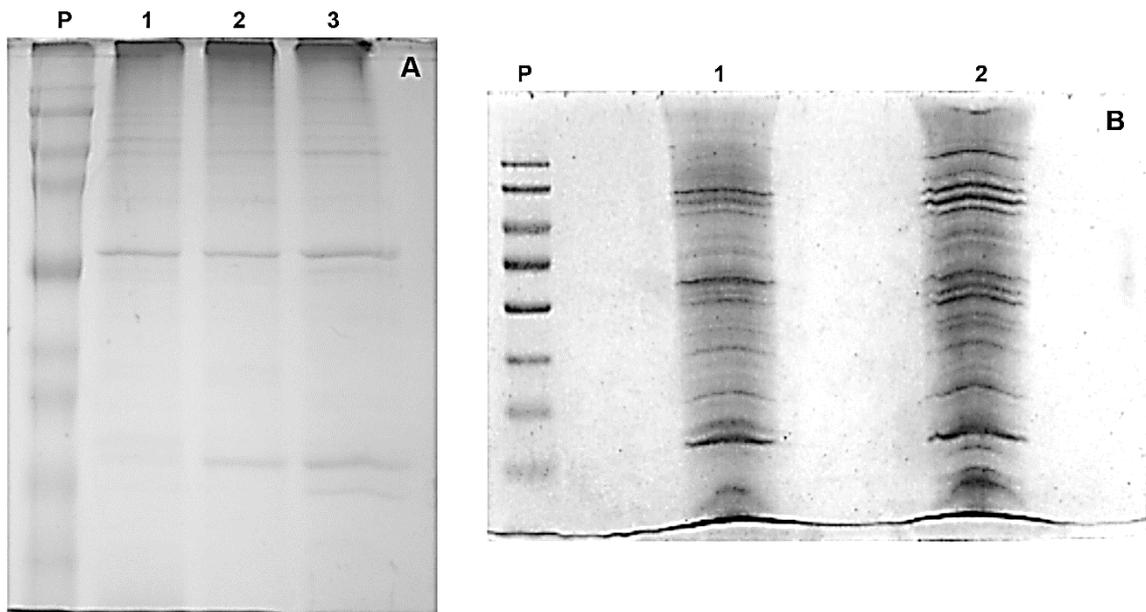
Peroni-Okita et al, (2013), também verificaram através de imunofluorescência, que o amido de banana é fosforilado na superfície e que o grau de fosforilação diminui

à medida que o amadurecimento do fruto evolui e a degradação do amido progride. Resultado semelhante aos obtidos agora por  $^{31}\text{P}$ -RMN.

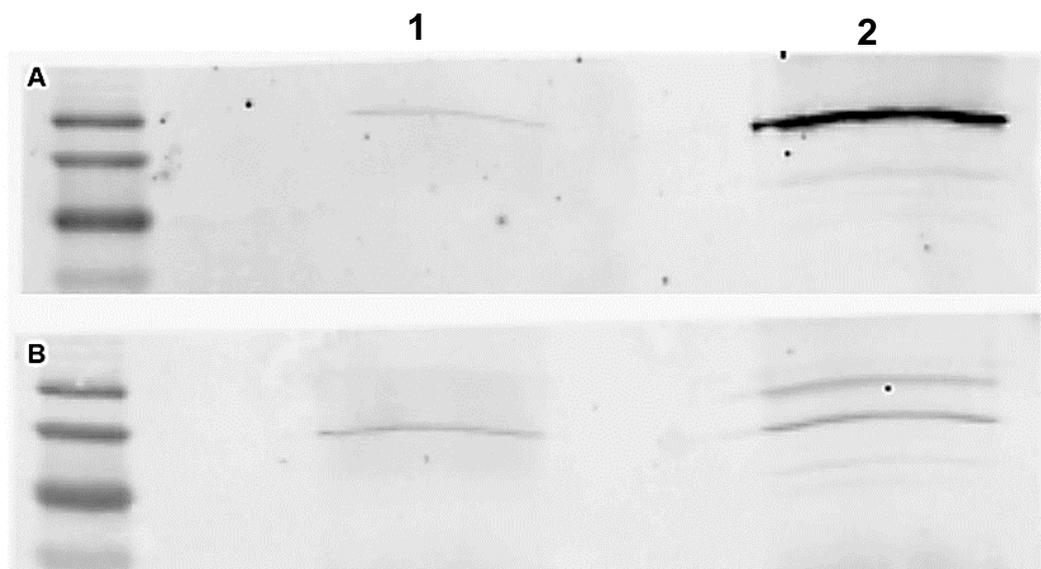
### **3.3. Análise das proteínas ligadas à superfície dos grânulos de amido de banana**

Devido à pequena quantidade de proteína associada aos grânulos de amido e à dificuldade de isolar grandes quantidades de amido de frutos em amadurecimento, otimizamos a metodologia para extração da proteína associada aos grânulos para posteriores testes de atividade e, se possível, a purificação das amilases para os testes com os grânulos isolados. Neste sentido, foram testadas diferentes quantidades de amido, diferentes métodos de extração e diferentes métodos de concentração das proteínas extraídas. Para evitar perdas de proteína nos processos de extração e concentração das proteínas presentes na superfície dos grânulos de amido, optamos por utilizar o próprio grânulo de amido no lugar do extrato proteico nas eletroforeses em condições desnaturantes (SDS-PAGE). O resultado obtido pela utilização dos grânulos de amido sem extração prévia foi o melhor (Figura 23). Assumimos que a corrente elétrica gerada pelo sistema de eletroforese foi suficiente para desassociar as proteínas presentes na superfície dos grânulos de amido (Figura 23B).

A eletroforese mostrada na Figura 23B foi feita em quadruplicata. Os géis resultantes contendo as proteínas foram separados por amostra, verde e madura, e cortados em intervalos, de acordo com o peso molecular do padrão utilizado: 170-100 kDa, 70-40 kDa e 35-10 kDa. As proteínas contidas nestas fatias de géis foram sequenciadas. Géis de eletroforese, feitos em duplicata, com metodologia semelhante à empregada no gel da Figura 23B, tiveram as proteínas transferidas para membranas de nitrocelulose, posteriormente hibridizada contra anticorpos de GWD e PWD (Figura 24).



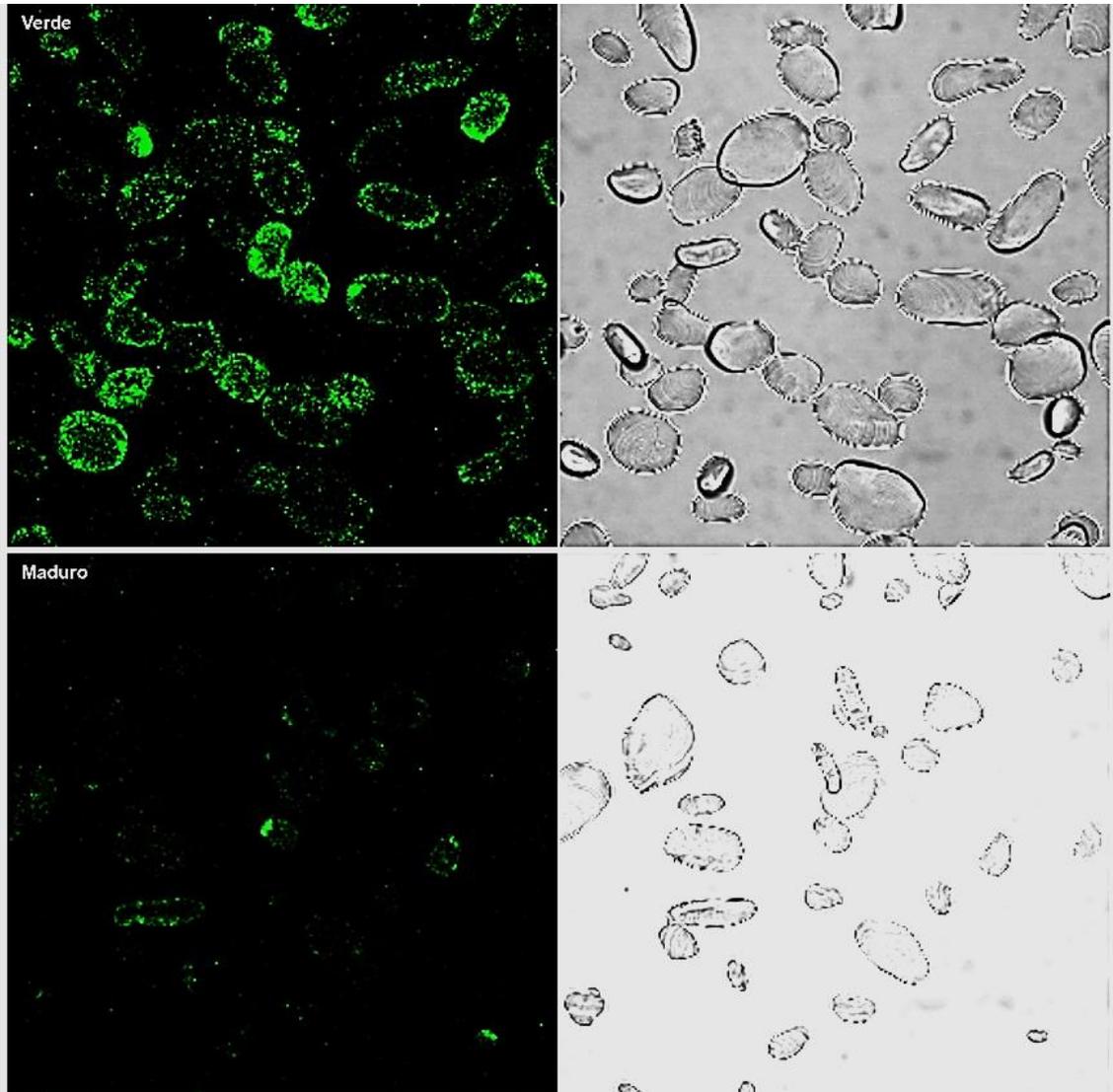
**Figura 23:** Eletroforese em SDS-PAGE, 10% de acrilamida, corado com Comassie G-250. Proteínas extraídas da superfície de amido isolado de banana. (A) Extração com tampão e temperatura controlada; P – padrão de peso molecular; 1 – 20 mg de amido no estágio verde; 2 – 20 mg de amido no estágio intermediário; 3 – 20 mg de amido no estágio maduro. (B) Extração por eletroforese; P – padrão de molecular; 1 – 40 mg de amido no estágio verde; 2 – 40 mg de amido no estágio maduro.



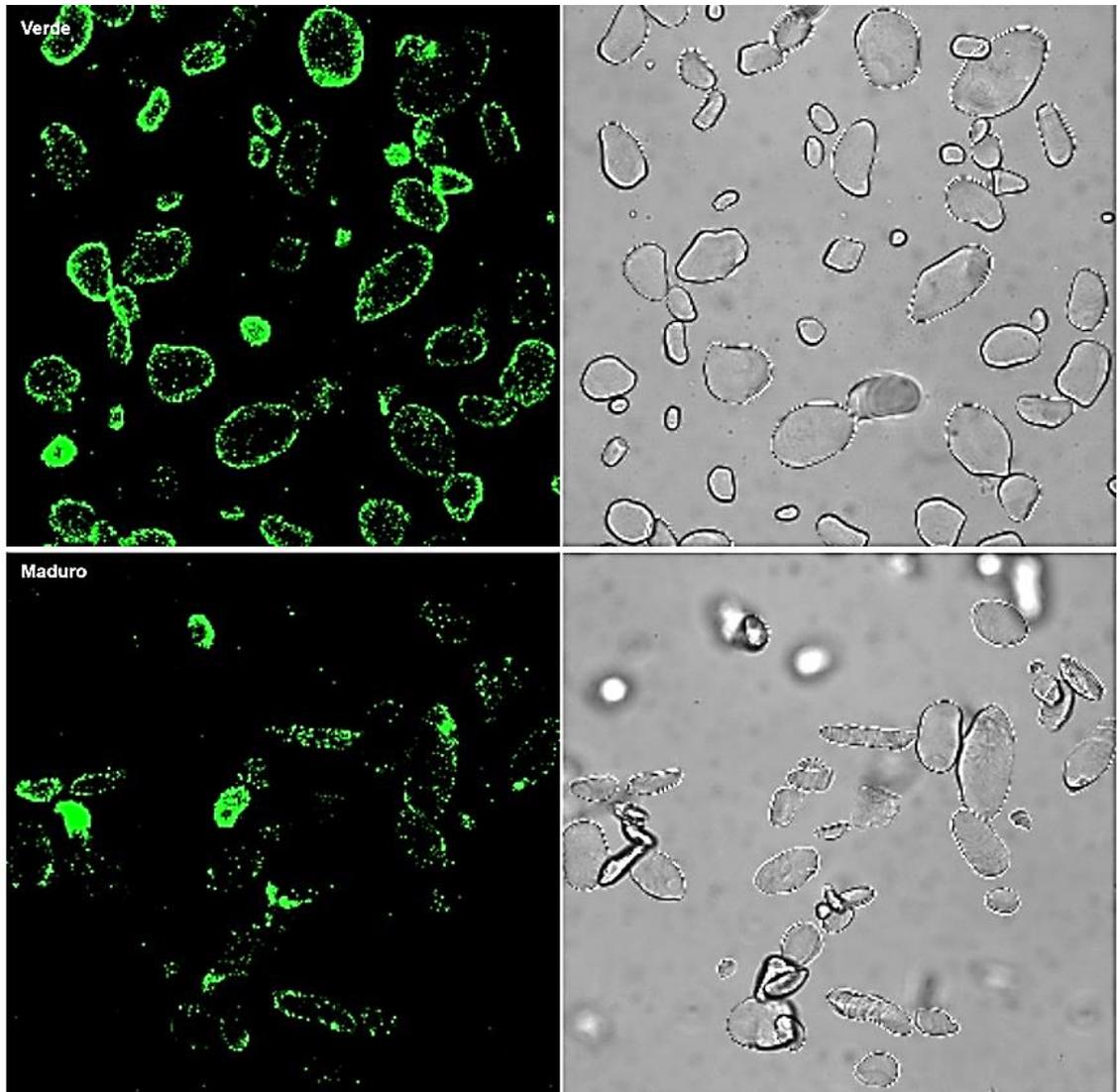
**Figura 24:** (A) Western Blotting com anticorpo anti GWD de *Arabidopsis*; (B) Western Blotting com anti PWD de batata. Proteínas extraídas da superfície dos grânulos de amido de banana. P – padrão de peso molecular; 1 – proteínas isoladas da superfície de 40 mg de amido de banana verde; 2 – proteínas isoladas da superfície de 40 mg de amido de banana madura.

O Western Blot revelou a presença da GWD e PWD tanto na amostra verde como na amostra madura, confirmando que a amilopectina dos grânulos de amido da banana é fosforilada por estas enzimas. Porém, a intensidade da proteína relativa à GWD na amostra relativa à amostra de banana madura é maior, resultado não confirmado pelos teores de Glic-6 fosforilados, que sofrem redução na quantidade. Como não parece fazer sentido uma contínua fosforilação do amido durante a degradação dos grânulos, já que só é necessária para o início do processo, não faria sentido também haver um aumento de proteínas relativas à GWD e PWD associadas aos grânulos de amido da banana mais madura. Assim, a explicação mais provável para este resultado é que a dissociação das enzimas da superfície dos grânulos ocorra de maneira mais fácil nos grânulos de amostras mais maduras, do que nas verdes. A presença das enzimas GWD, PDW,  $\alpha$ -amilase e  $\beta$ -amilase associadas à superfície dos grânulos de amido da banana foi confirmada por imunolocalização (Figuras 25 - 28 respectivamente). E aqui, pode-se notar uma diferença na quantidade de proteína das amostras verde e madura. Tanto a GWD quanto a PWD aparecem em maior quantidade nos amidos isolados de banana verde, o que reforça a hipótese de que as enzimas estão mais fortemente associadas nos grânulos de amido da banana verde que na madura (Figura 25 e 26).

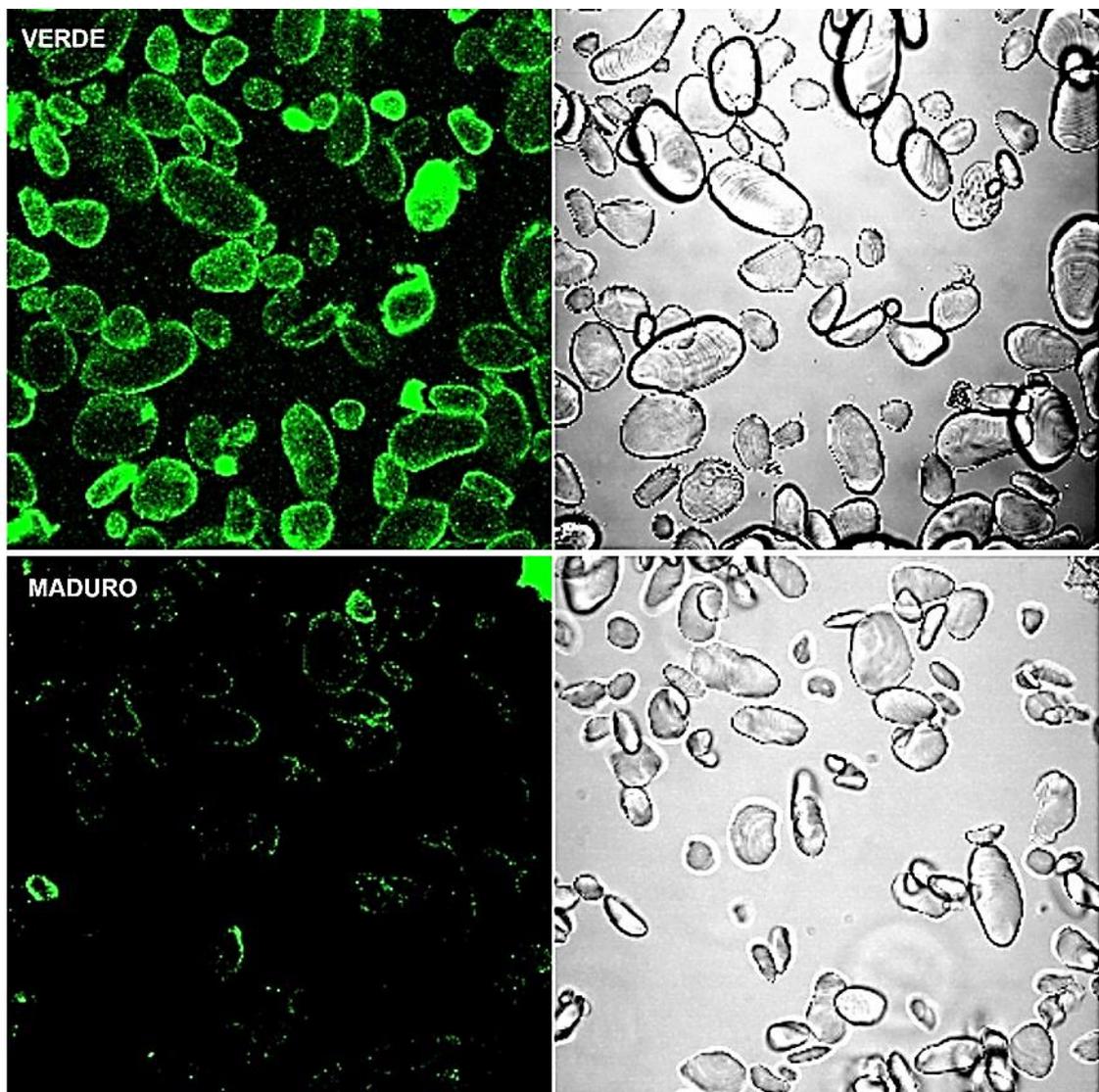
As Figuras 27 e 28 mostram que os grânulos de amido de banana verde estão fortemente marcados com os anticorpos das enzimas  $\alpha$ -amilase e  $\beta$ -amilase. A  $\alpha$ -amilase diminui drasticamente nos grânulos de amido de banana madura e a  $\beta$ -amilase permanece fortemente marcada, significando talvez que a presença da  $\alpha$ -amilase é mais importante nos passos iniciais da degradação do amido, enquanto a  $\beta$ -amilase atua durante todo o processo de degradação. Por outro lado, a  $\beta$ -amilase tem atividade exo-hidrolítica liberando moléculas de maltose e a  $\alpha$ -amilase atividade endo-hidrolítica liberando uma miríade de produtos em que vão atuar outras enzimas. Por esta razão, talvez haja maior demanda de  $\beta$ -amilase associada ao grânulo do que de  $\alpha$ -amilase.



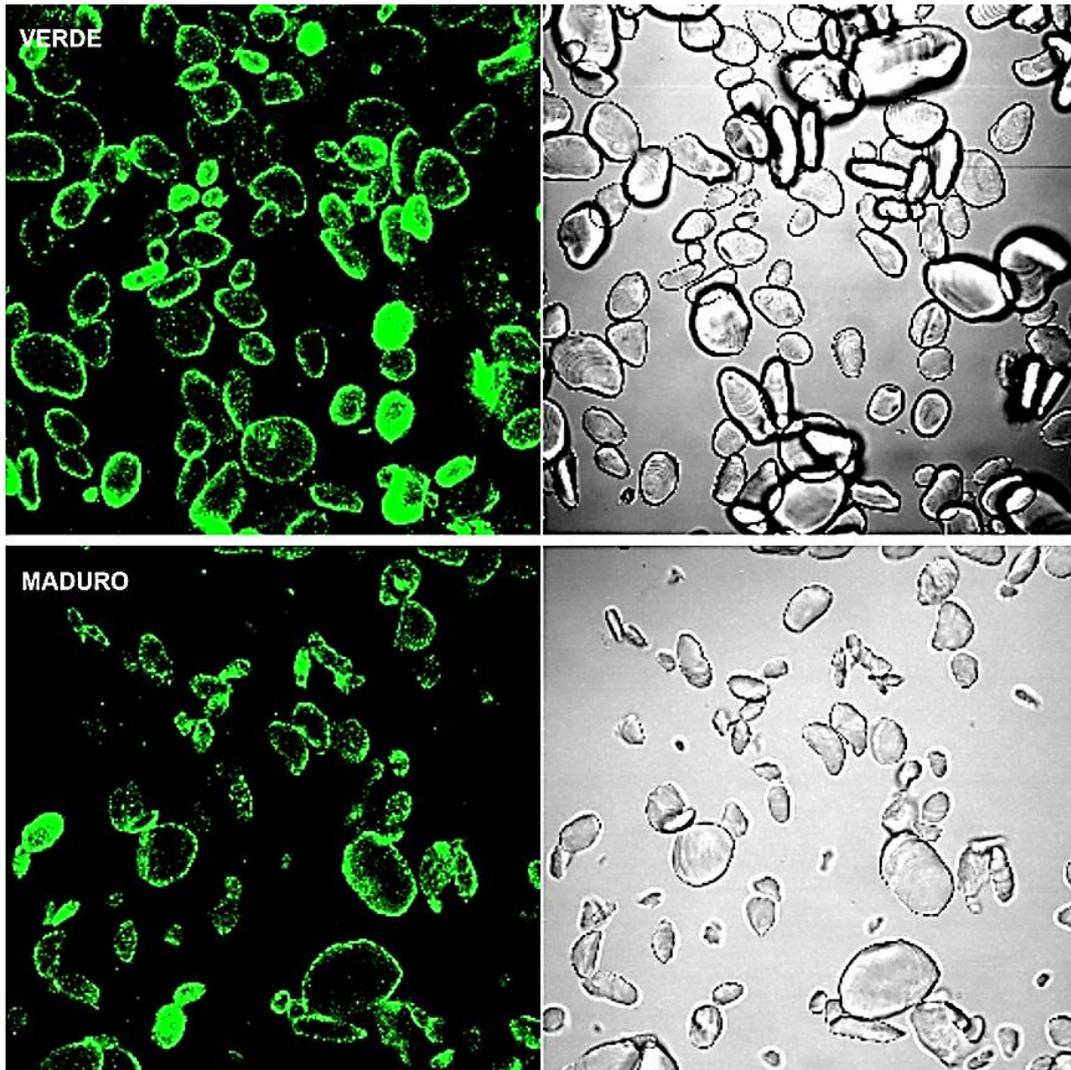
**Figura 25:** Microscopia de Fluorescência (esquerda) e Microscopia Óptica (direita) em amido de banana verde e banana madura. Foi usado anticorpo específico anti-GWD de *Arabidopsis*. Aumento: 40x.



**Figura 26:** Microscopia de Fluorescência (esquerda) e Microscopia Óptica (direita) em amido de banana verde e banana madura. Foi usado anticorpo específico anti-PWD de batata. Aumento: 40x.



**Figura 27:** Microscopia de Fluorescência (esquerda) e Microscopia Óptica (direita) em amido de banana verde e banana madura. Foi usado anticorpo específico anti- $\alpha$  amilase de banana. Aumento: 40x.

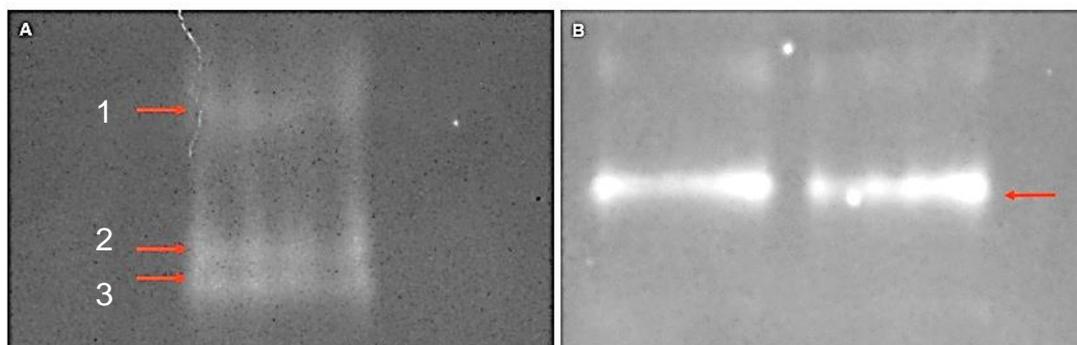


**Figura 28:** Microscopia de Fluorescência (esquerda) e Microscopia Óptica (direita) em amido de banana verde e banana madura. Foi usado anticorpo específico anti- $\beta$  amilase de banana. Aumento: 40x.

A atividade hidrolítica das proteínas ligadas ao grânulo foi estimada através de gel de eletroforese com amilopectina como substrato e as bandas com atividade foram recortadas e analisadas por espectrometria de massas.

Para evitar que o substrato retivesse as enzimas e não fossem separadas em PAGE-nativo, as proteínas foram previamente separadas através de gel nativo, sem substrato, e em seguida transferidas para PAGE-nativo, contendo 0,1% de amilopectina. Após um período de incubação, o segundo gel foi corado com iodo, para revelar a atividade das enzimas hidrolíticas. O aparecimento de três bandas indicam haver atividade de pelo menos três proteínas capazes de hidrolisar amilopectina

(Figura 29). A metodologia de extração das proteínas utilizando eletroeluição do amido parece ter sido mais eficiente na extração de mais proteínas.



**Figura 29:** Eletroforese PAGE-nativo, 10% de poliacrilamida, 1 mm de espessura com 0,1% de amilopectina, extração de 2 g de amido em ambos. A – extração das proteínas dos grânulos de amido por eletroeluição; B – extração das proteínas dos grânulos de amido com agitação e temperatura.

As bandas do gel com atividade foram recortadas e as proteínas que estavam nessas bandas foram sequenciadas, gerando os resultados apresentados nas Tabelas 3 a 6. Porém, dentre as proteínas identificadas não apareceram as enzimas hidrolíticas que são foco de nosso estudo. Isso pode ter ocorrido em decorrência da pequena quantidade de proteína sequenciada. Pode ser também que outras proteínas tenham prevalecido em quantidade, “mascarando” as proteínas-foco deste estudo. Uma solução seria aumentar a quantidade de amostra mandada para o sequenciamento.

Além da análise pelos códigos gerados, uma análise por fragmentos da sequência peptídica identificada pelo software foi feita. Esses resultados foram mais interessantes, mostrando a maioria das proteínas de interesse, porém, essa forma de análise não é ainda confiável, em decorrência do pequeno tamanho das sequências peptídicas, com e-value muito alto, tornando não confiável o alinhamento. É o que acontece para a  $\beta$ -amilase que aparece na Tabela 6.

**Tabela 3:** Identificação das proteínas por espectrometria de massas, proteínas referentes a bandas do PAGE-nativo (Figura 27A seta n° 1).

Código de acesso	Nome da proteína	E-value	Similaridade (%)
M0T8D1	PREDICTED: probable fatty acyl-CoA reductase 4 [Musa acuminata subsp. malaccensis]	0	100
M0U6P4	PREDICTED: muscle M-line assembly protein unc-89-like [Musa acuminata subsp. malaccensis]	2e-13	26
M0S9W3	PREDICTED: probable inorganic phosphate transporter 1-8 [Musa acuminata subsp. malaccensis]	8e-90	76
M0UBN2	PREDICTED: U11/U12 small nuclear ribonucleoprotein 25 kDa protein [Musa acuminata subsp. malaccensis]	3e-14	38
M0SGP2	PREDICTED: KH domain-containing protein At1g09660/At1g09670-like [Musa acuminata subsp. malaccensis]	1e-39	47
M0RQW0	PREDICTED: patatin-like protein 2 [Musa acuminata subsp. malaccensis]	0	97
M0T3S6	PREDICTED: scarecrow-like protein 28 isoform X2 [Musa acuminata subsp. malaccensis]	3,5	37
M0RRC3	PREDICTED: pentatricopeptide repeat-containing protein At5g56310-like [Musa acuminata subsp. malaccensis]	0	85
M0TT89	PREDICTED: nuclear pore complex protein NUP160 homolog [Musa acuminata subsp. malaccensis]	0,09	38
M0RFI9	PREDICTED: pyruvate kinase, cytosolic isozyme [Musa acuminata subsp. malaccensis]	0	95
M0TKU6	PREDICTED: cyclin-D2-1-like [Musa acuminata subsp. malaccensis]	0	99
B0JEJ5	NBS-LRR disease resistance protein [Musa acuminata subsp. malaccensis]	4e-128	100
M0SPT6	PREDICTED: probable D-2-hydroxyglutarate dehydrogenase, mitochondrial	0	97
M0S7G4	PREDICTED: GATA transcription factor 12-like [Musa acuminata subsp. malaccensis]	5e-144	81
M0TIG5	PREDICTED: cytochrome P450 94A1-like [Musa acuminata subsp. malaccensis]	0	83
M0RM12	PREDICTED: 40S ribosomal protein S3-3-like [Musa acuminata subsp. malaccensis]	3e-174	100
M0TFH4	PREDICTED: protein RRP5 homolog [Musa acuminata subsp. malaccensis]	0	100
M0TR08	PREDICTED: probable protein S-acyltransferase 6 [Musa acuminata subsp. malaccensis]	0	98
M0S348	PREDICTED: protein BREAST CANCER SUSCEPTIBILITY 1 homolog [Musa acuminata subsp. malaccensis]	0,034	31
M0U0D3	PREDICTED: annexin D7-like isoform X1 [Musa acuminata subsp. malaccensis]	0	100

**Tabela 4:** Identificação das proteínas por espectrometria de massas, proteínas referentes a bandas do PAGE-nativo (Figura 27A seta n° 2).

Código de acesso	Nome da proteína	E-value	Similaridade (%)
M0SW85	PREDICTED: diacylglycerol kinase 7-like [Musa acuminata subsp. malaccensis]	9e-168	100
M0TZN0	PREDICTED: auxin response factor 23-like isoform X2 [Musa acuminata subsp. malaccensis]	1,8	37
M0SC69	PREDICTED: chaperone protein dnaJ 16-like [Musa acuminata subsp. malaccensis]	0	100
M0S8N1	PREDICTED: probable serine/threonine-protein kinase WNK5 isoform X1 [Musa acuminata subsp. malaccensis]	3,8	67
M0TXF7	PREDICTED: ran-binding protein 1 homolog b-like [Musa acuminata subsp. malaccensis]	2e-160	100
M0TJP2	PREDICTED: protein FATTY ACID EXPORT 3, chloroplastic [Erythranthe guttatus]	4e-70	47
M0SDW9	PREDICTED: BTB/POZ domain-containing protein At5g47800-like [Musa acuminata subsp. malaccensis]	0	100
M0STQ3	PREDICTED: protein IQ-DOMAIN 1-like isoform X1 [Musa acuminata subsp. malaccensis]	0	100
M0U5W5	PREDICTED: zinc finger protein ZAT1-like [Musa acuminata subsp. malaccensis]	3e-154	81
M0T0S4	PREDICTED: small nuclear ribonucleoprotein Sm D1-like [Musa acuminata subsp. malaccensis]	6e-20	75
M0TV06	PREDICTED: ubiquinone biosynthesis protein COQ9, mitochondrial [Musa acuminata subsp. malaccensis]	0	100
M0T8D1	PREDICTED: probable fatty acyl-CoA reductase 4 [Musa acuminata subsp. malaccensis]	0	100
M0T3S6	PREDICTED: scarecrow-like protein 28 isoform X2 [Musa acuminata subsp. malaccensis]	3,5	37
M0TAW0	PREDICTED: nucleoporin GLE1 [Musa acuminata subsp. malaccensis]	4e-73	100
M0TRG2	PREDICTED: ras-related protein Rab11D-like [Musa acuminata subsp. malaccensis]	2e-163	100
M0UBN2	PREDICTED: U11/U12 small nuclear ribonucleoprotein 25 kDa protein [Musa acuminata subsp. malaccensis]	3e-14	38
M0TCV7	PREDICTED: vesicle-associated membrane protein 711-like [Musa acuminata subsp. malaccensis]	7e-164	100
M0RP39	PREDICTED: kinesin-like protein KIF3A isoform X1 [Musa acuminata subsp. malaccensis]	0	88
M0U560	PREDICTED: glycine-tRNA ligase 1, mitochondrial-like [Musa acuminata subsp. malaccensis]	0	100
X2FJQ4	granule-bound starch synthase, partial	0	98

**Tabela 5:** Identificação das proteínas por espectrometria de massas, proteínas referentes a bandas do PAGE-nativo (Figura 27A seta nº3).

Código de acesso	Nome da proteína	E-value	Similaridade (%)
M0SBG2	PREDICTED: probable membrane-associated kinase regulator 2 [Musa acuminata subsp. malaccensis]	0	100
M0U122	PREDICTED: cleavage stimulation factor subunit 3 [Musa acuminata subsp. malaccensis]	0	99
M0SUW1	PREDICTED: non-symbiotic hemoglobin 1-like [Musa acuminata subsp. malaccensis]	2e-121	100
M0S9W3	PREDICTED: non-symbiotic hemoglobin 1-like [Musa acuminata subsp. malaccensis]	3e-119	100
M0TPN3	PREDICTED: serine/threonine-protein kinase 3/4 [Musa acuminata subsp. malaccensis]	0	92
M0S849	PREDICTED: myosin-1-like [Musa acuminata subsp. malaccensis]	6,6	35
M0RV65	PREDICTED: ras-related protein Rab-21-like isoform X1 [Musa acuminata subsp. malaccensis]	8e-153	100
M0TL35	PREDICTED: pentatricopeptide repeat-containing protein At1g80880, mitochondrial [Musa acuminata subsp. malaccensis]	0	100
M0RQ10	hypothetical protein POPTR_0011s08570g [Populus trichocarpa]	3e-37	73
M0RMY8	PREDICTED: probable ubiquitin-like-specific protease 2B isoform X2 [Musa acuminata subsp. malaccensis]	15	73
M0S8W0	PREDICTED: heterogeneous nuclear ribonucleoprotein 1-like [Musa acuminata subsp. malaccensis]	2e-04	36
M0SIS9	PREDICTED: probable ribose-5-phosphate isomerase 2 [Musa acuminata subsp. malaccensis]	5e-192	90
M0S348	putative sucrose-phosphate synthase [Musa acuminata subsp. malaccensis]	0,029	44
M0TY01	PREDICTED: phosphoenolpyruvate carboxylase 2-like [Musa acuminata subsp. malaccensis]	0	87
M0TL09	PREDICTED: pentatricopeptide repeat-containing protein At4g16390, chloroplastic [Musa acuminata subsp. malaccensis]	0	67
M0T9V8	PREDICTED: SNAP25 homologous protein SNAP33-like isoform X1 [Musa acuminata subsp. malaccensis]	0	100
M0U555	PREDICTED: protein CHUP1, chloroplastic isoform X2 [Musa acuminata subsp. malaccensis]	0	82
M0TIC2	PREDICTED: dof zinc finger protein DOF5.6-like [Musa acuminata subsp. malaccensis]	0,35	36
M0TG75	PREDICTED: CUE domain-containing protein 5 [Musa acuminata subsp. malaccensis]	0	100
M0T3Z2	PREDICTED: diacylglycerol kinase 7-like [Musa acuminata subsp. malaccensis]	9e-168	100

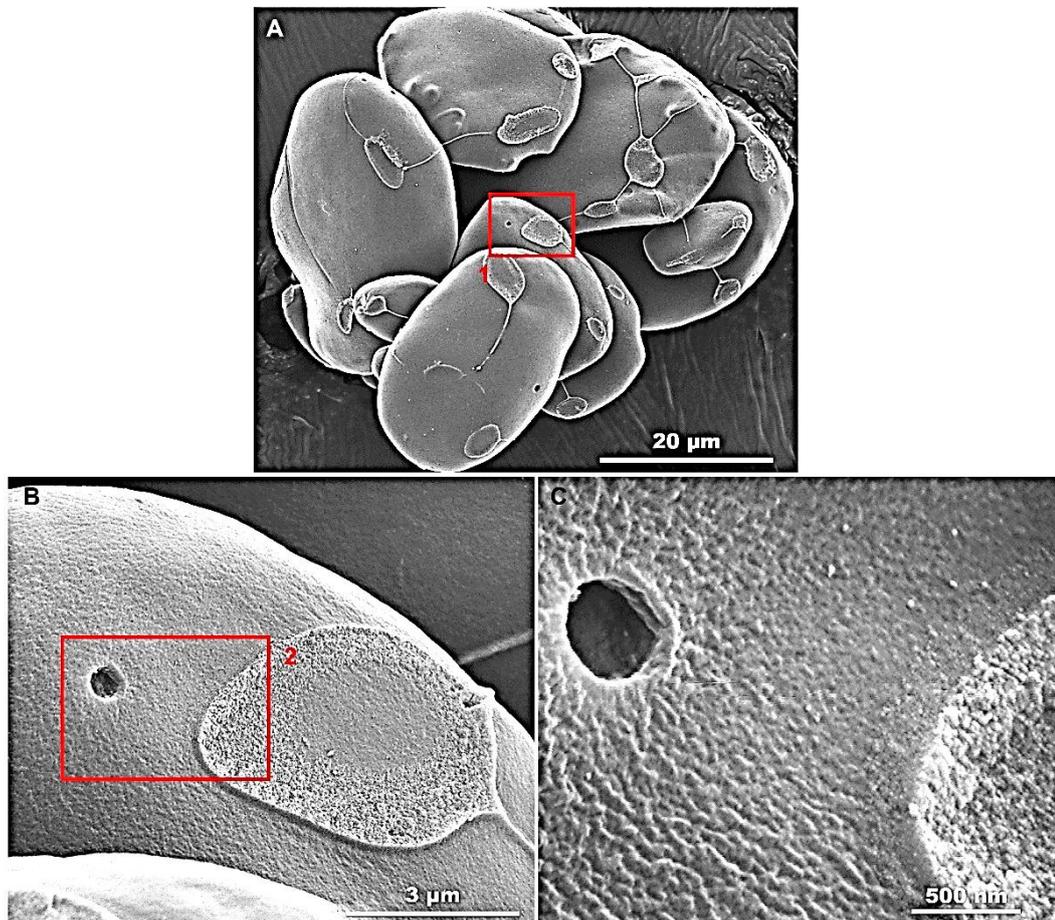
**Tabela 6:** Identificação das proteínas por espectrometria de massas, proteínas referentes a bandas do PAGE-nativo (Figura 27B).

Código de acesso	Nome da proteína	E-value	Similaridade (%)
M0SGG5	PREDICTED: multicopper oxidase LPR1-like [Musa acuminata]	0	100
M0RYZ3	putative threonine-tRNA ligase 2, cytoplasmic [Gossypium arboreum]	7e-27	60
M0THC1	NHL domain-containing protein isoform 1 [Theobroma cacao]	0	98
M0SXV0	PREDICTED: (+)-neomenthol dehydrogenase-like [Musa acuminata]	0	100
M0TG64	PREDICTED: ATP synthase subunit d, mitochondrial-like [Musa acuminata]	1e-74	100
M0TGH3	PREDICTED: protein SGT1 homolog isoform X2 [Musa acuminata]	0	100
M0U1V5	DNA-3-methyladenine glycosylase I [Zea mays]	7e-132	57
M0U2U2	PREDICTED: binding partner of ACD11 1-like [Setaria italica]	5e-131	78
M0U872	PREDICTED: ATP-dependent zinc metalloprotease FTSH 5, mitochondrial-like isoform X1 [Musa acuminata]	6,5	54
M0T6V1	PREDICTED: inactive beta-amylase 9-like [Musa acuminata]	4,9	32
M0UBW1	Envelope glycoprotein [Gossypium arboreum]	3e-17	61
M0U5K3	PREDICTED: myosin-17-like isoform X2 [Musa acuminata]	0	75
M0RPF9	PREDICTED: probable receptor-like protein kinase At2g42960 [Musa acuminata]	0	90
M0TJX2	PREDICTED: acyl-[acyl-carrier-protein] desaturase, chloroplastic-like [Musa acuminata]	0	91
B0FMR9	Protein kinase-like resistance protein [Musa acuminata]	3e-132	100
M0TH72	PREDICTED: type I inositol 1,4,5-trisphosphate 5-phosphatase 1-like [Musa acuminata]	0	85
M0U6L6	PREDICTED: alpha/beta hydrolase domain-containing protein 11 [Musa acuminata]	2,4	43
M0T105	PREDICTED: beta-1,3-galactosyltransferase 15-like [Musa acuminata]	0	100
M0T4R8	PREDICTED: elongation factor Tu, chloroplastic-like [Musa acuminata]	1e-101	76
M0TV59	PREDICTED: pollen-specific protein SF3-like [Musa acuminata]	8e-143	100

### 3.4. Hidrólise dos grânulos de amido com enzimas comerciais

#### Amostras Controle

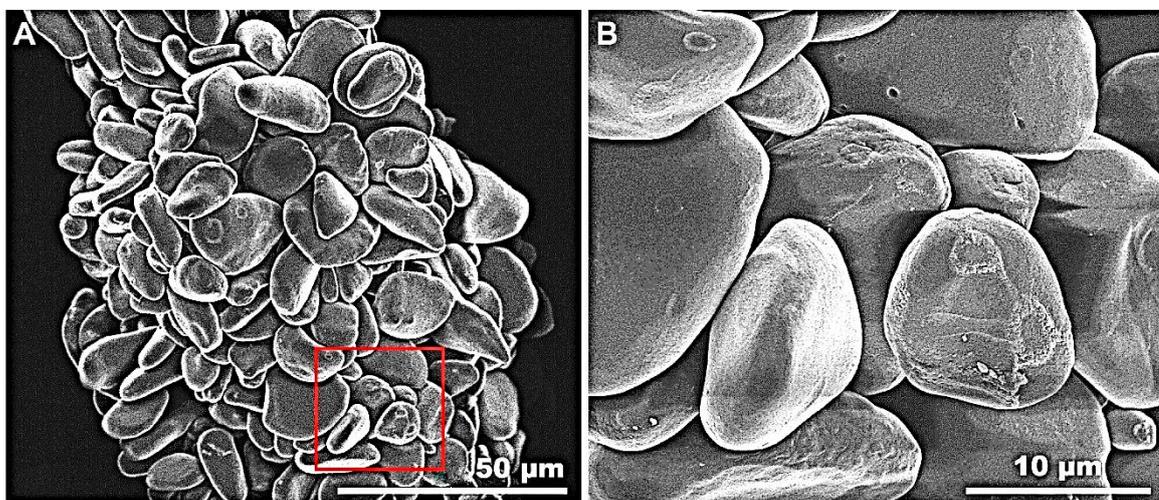
A Figura 30 mostra as micrografias visualizadas no MEV de grânulos de amido da amostra 3 dpc-Controle 1, recém isolado, sem desproteíntização e sem tratamento. Apesar de terem sido isolados de bananas completamente verdes, os grânulos de amido nativo mostram que já houve um início de degradação, demonstrado pelos buracos em sua superfície.



**Figura 30:** Grânulos de amido isolados de banana verde (3 dpc), sem desproteíntização e sem tratamento (Controle 1) visualizados por microscopia eletrônica de varredura (MEV). A – quadrado vermelho 1 indica a região de aumento da imagem B; B – quadrado vermelho 2 indica a região de aumento da imagem C.

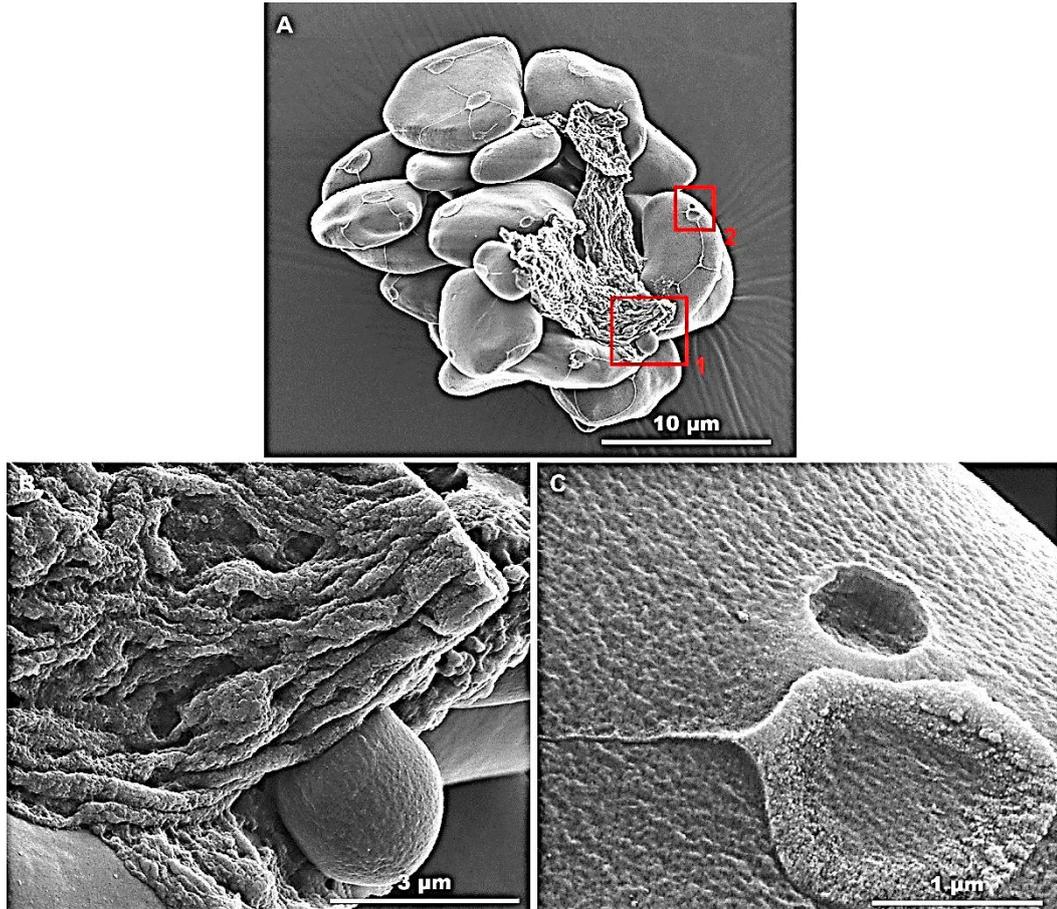
O mesmo pode ser visto na Figura 31, da amostra 3 dpc-Controle 2, com grânulos de amido desproteíntizados, tratados somente com tampão por 72 horas a 30 °C. Assume-se assim, que o tratamento de desproteíntização funcionou a contento já

que neste Controle foram observados os mesmos buracos que os observados nos Controles-sem desproteinização isolados de bananas recém colhidas.



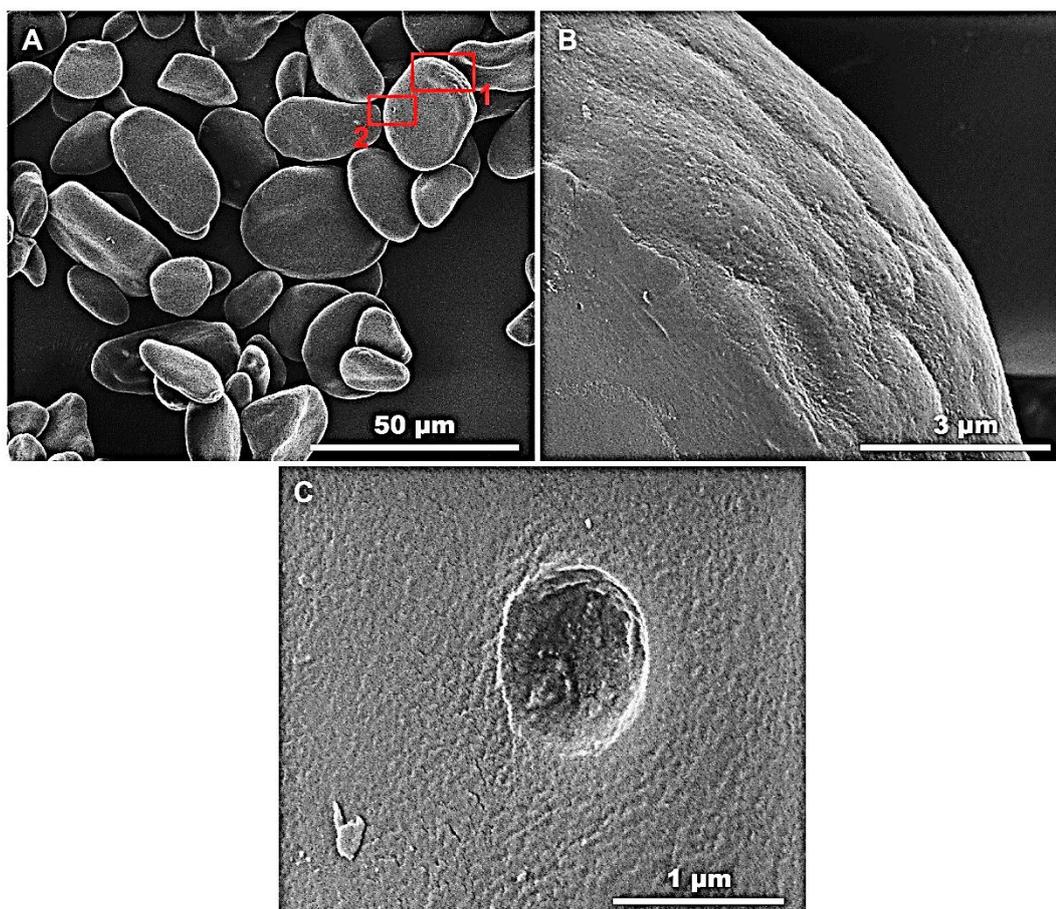
**Figura 31:** Grânulos de amido isolados de banana verde (3 dpc), desproteinizados e submetidos ao tratamento com tampão por 72 horas (Controle 2) visualizados por microscopia eletrônica de varredura (MEV). A – quadrado vermelho indica a região de aumento da imagem B.

A Figura 32 mostra micrografias obtidas em MEV de grânulos de amido da amostra 6 dpc–Controle 1, recém extraído, sem desproteinização e sem tratamento. De acordo com a curva de degradação do amido (Figura 21), os frutos com 6 dias pós colheita (um dia antes do início da degradação do amido) ainda encontravam-se verdes e com um alto teor de amido. Nesse estágio uma leve corrosão já pode ser notada na superfície desses grânulos. Em um maior aumento, as Figura 32B e 32C mostram: 1) prováveis resíduos de outros grânulos de amido degradados, encontrados posteriormente nos grânulos tratados com  $\beta$ -amilase (Figuras 43, 44 e 46) e 2) os mesmos buracos observados anteriormente nas Figuras 30 e 31, respectivamente.



**Figura 32:** Grânulos de amido isolados de banana verde (6 dpc), sem desproteíntização e sem tratamento (Controle 1) visualizados por microscopia eletrônica de varredura (MEV). A – quadrado vermelho 1 indica a região de aumento da imagem B e quadrado vermelho 2 indica a região de aumento da imagem C.

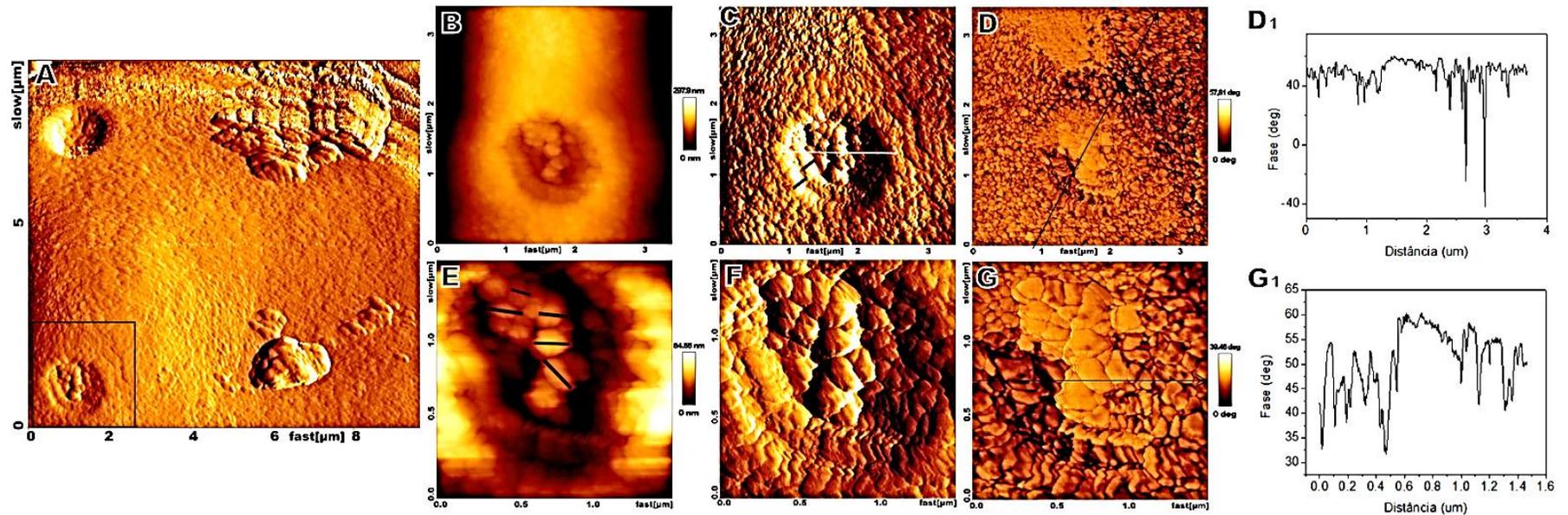
As micrografias apresentadas na Figura 33 (6 dpc-Controle 2), são de grânulos desproteíntizados e incubados somente com tampão, mostram grânulos sem degradação aparente, a não ser pelos mesmos buracos de início de degradação que aparecem no 6 dpc-Controle 1 (Figura 32).



**Figura 33:** Grânulos de amido isolados de banana verde (6dpc), desproteinizados e submetidos ao tratamento com tampão por 72 horas (Controle 2) e visualizados por microscopia eletrônica de varredura (MEV). A – quadrado vermelho 1 indica a região de aumento da imagem B, quadrado vermelho 2 indica a região de aumento da imagem C.

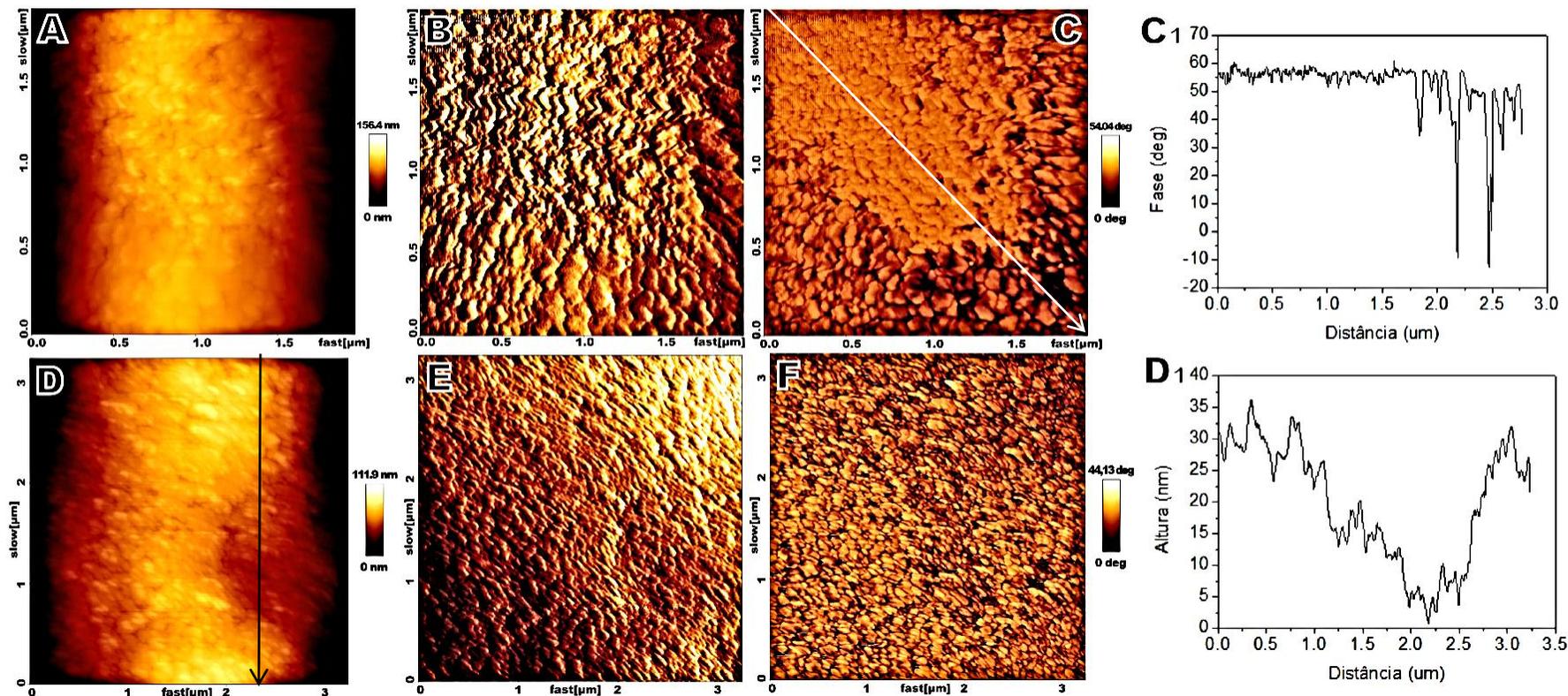
As mesmas amostras (6 dpc-Controle 2) foram visualizadas por microscopia de força atômica na tentativa de identificar e explorar algumas características estruturais dos grânulos de amido não visualizadas por MEV. A Figura 34A mostra uma superfície lisa de um grânulo em que são encontrados dois buracos característicos de início de degradação. Em maior resolução, as imagens observadas na Figura 34B-34D são provenientes da área demarcada na Figura 34A. As imagens topográficas (Figuras 34B e 34E) indicam que há uma diferença de altura na região do buraco analisado, em que as áreas mais claras são mais altas e as mais escuras são mais baixas. Nas imagens de erro (Figuras 34C e 34F) o buraco analisado apresenta uma distância de 1,53  $\mu\text{m}$  de uma borda à outra (linha branca), com profundidade de 80  $\mu\text{m}$  e distância entre os anéis de crescimento ao redor do buraco de 200 e 250 nm (linhas pretas),

revelando bloquetes com comprimento variando de 132 a 240 nm (Figura 34F). As imagens mostradas na Figura 34D e 34G revelam fortes diferenças de fase, principalmente no interior do buraco em relação ao restante da área analisada. Essa afirmação pode ser confirmada com os gráficos apresentados em D1 e G1 das respectivas áreas demarcadas nas imagens de fase apresentadas em D e G. As imagens de fase e os respectivos gráficos de força mostram diferenças nas propriedades viscoelásticas em regiões do interior do buraco que identificam mudanças de estado mais cristalinos (áreas mais rígidas - regiões mais escuras) para estados mais amorfos (áreas mais “moles” e mais claras). Isso seria compatível com um início de hidrólise das partes mais cristalinas, os bloquetes, constituídos por amilopectina.



**Figura 34** Imagens obtidas por microscopia de força atômica de amido isolado de banana Nanicão Controle 2 tratado com tampão com 6 dias pós-colheita. (A) imagem de erro. As imagens de topografia (B), erro (C) e fase (D) foram obtidas da área demarcada em (A). Em maior resolução, as imagens de topografia (E), erro (F) e fase (G) revelam detalhes da estrutura do grânulo, como o tamanho dos bloquetes (132-240 nm) demarcados em (E). Os gráficos de linha apresentados em (D<sub>1</sub>) e (G<sub>1</sub>) destacam as diferenças de fase das áreas analisadas em (D) e (G), respectivamente.

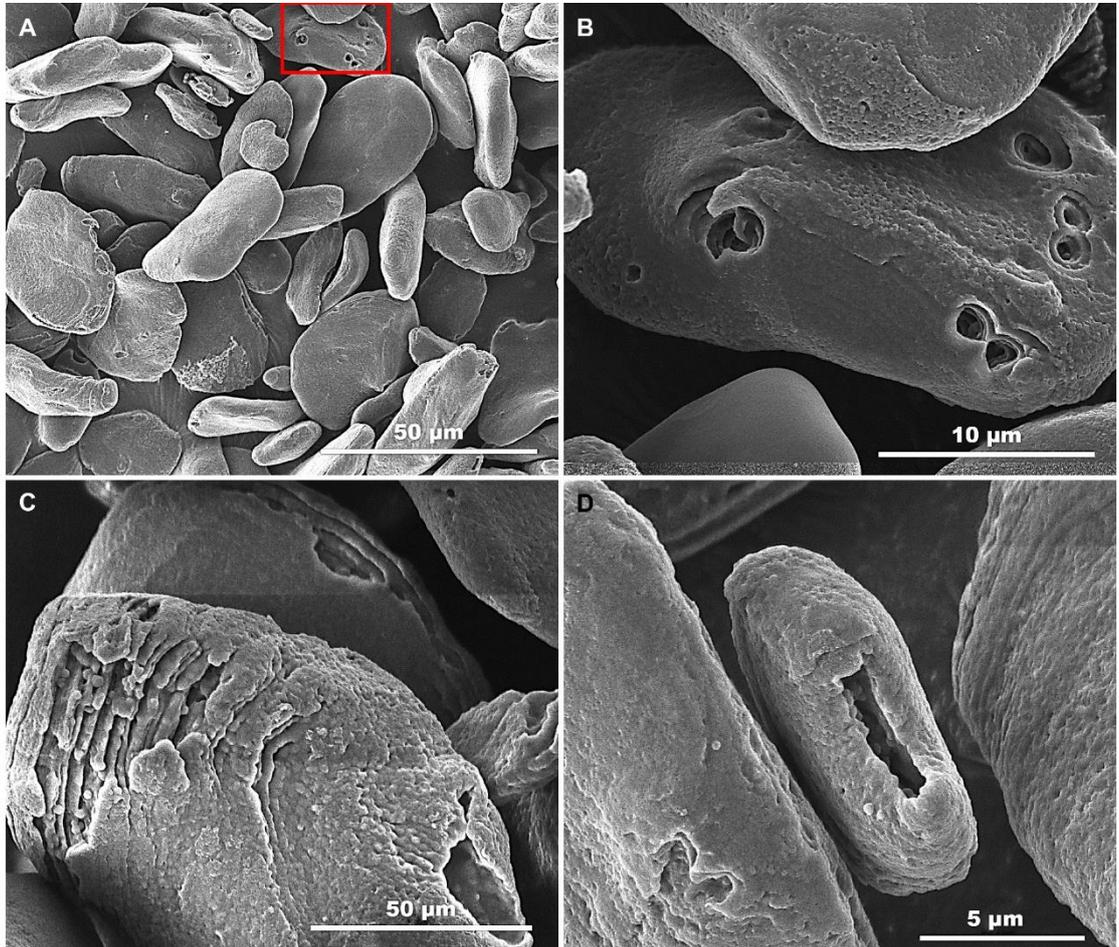
Na Figura 35 estão apresentadas imagens de outros grânulos analisados evidenciando outros estágios de degradação. As imagens de topografia (A) e as respectivas imagens de erro (B) e fase (C) revelam mudanças no tamanho e forma dos bloquetes, diferenças essas mais facilmente observadas em (C). A área analisada em (C) (no sentido da seta branca) está representada no gráfico de força em C1. Pode-se observar que a região analisada mais clara em (C) (distância de 0 a 1,8  $\mu\text{m}$  no eixo x) e a mesma área correspondente em (B) (que parece não apresentar estruturas com formas e tamanhos definidos), não apresentam diferenças de fases aparentes do restante da área analisada. A imagem apresentada de topografia (D) e nas respectivas imagens de erro (E) e fase (F) revelam que há uma região com um buraco aparente, embora seja muito superficial (35 nm, área demarcada em D e evidenciada pelo gráfico de profundidade em D1), já pode ser entendido como um início de degradação.



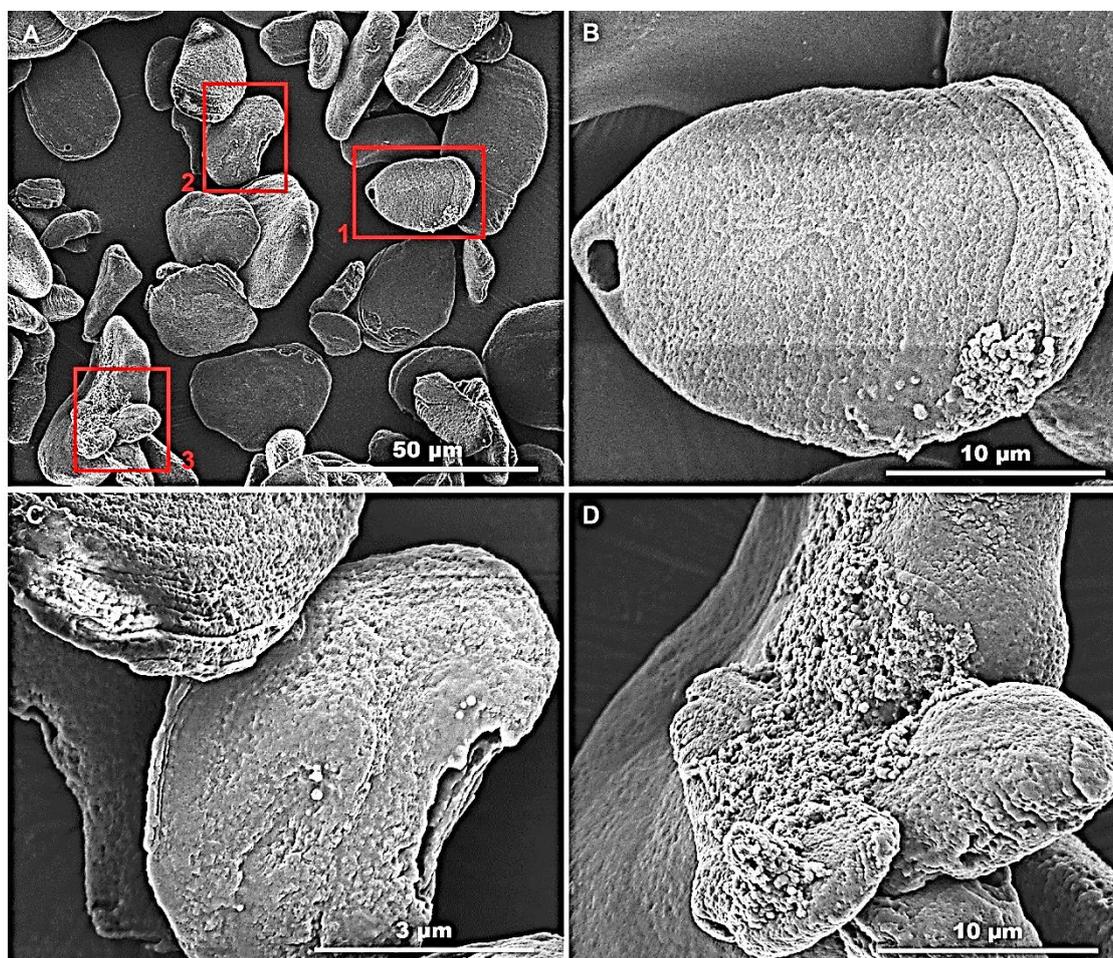
**Figura 35:** Imagens obtidas por microscopia de força atômica de amido isolado de banana Nanicão Controle1 tratado com tampão com 6 dias pós-colheita. Imagens de topografia (A) e (D) e as respectivas imagens de erro (B) e (E), e fase (C) e (F). Os gráficos de linha apresentados em (C<sub>1</sub>) e (D<sub>1</sub>) revelam diferenças de fase e detalhes de profundidade nas áreas demarcadas em (C) e (D), respectivamente.

### **Amostras de amido tratadas com $\alpha$ -amilase**

As Figuras 36 e 37 exibem micrografias de grânulos de amido extraídos de bananas recém colhidas (3 dpc e 6 dpc, respectivamente) tratados com  $\alpha$ -amilase em tampão por 48 horas. Em ambas as amostras é possível visualizar uma extensiva degradação de praticamente todos os grânulos. A degradação é característica da  $\alpha$ -amilase, que degrada preferencialmente regiões amorfas do grânulo (SHAIK, et al., 2014), onde predomina a amilose, com exposição dos anéis de crescimento e de bloquetes. A imagem apresentada na Figura 37D mostra um acúmulo de bloquetes soltos na superfície de outros grânulos. A entrada preferencial da enzima se dá pelo lado contrário ao do hilo, onde é provável que predominem regiões amorfas (Figura 36C e 37B) (LIN et al, 2006; MOORE et al, 2015).

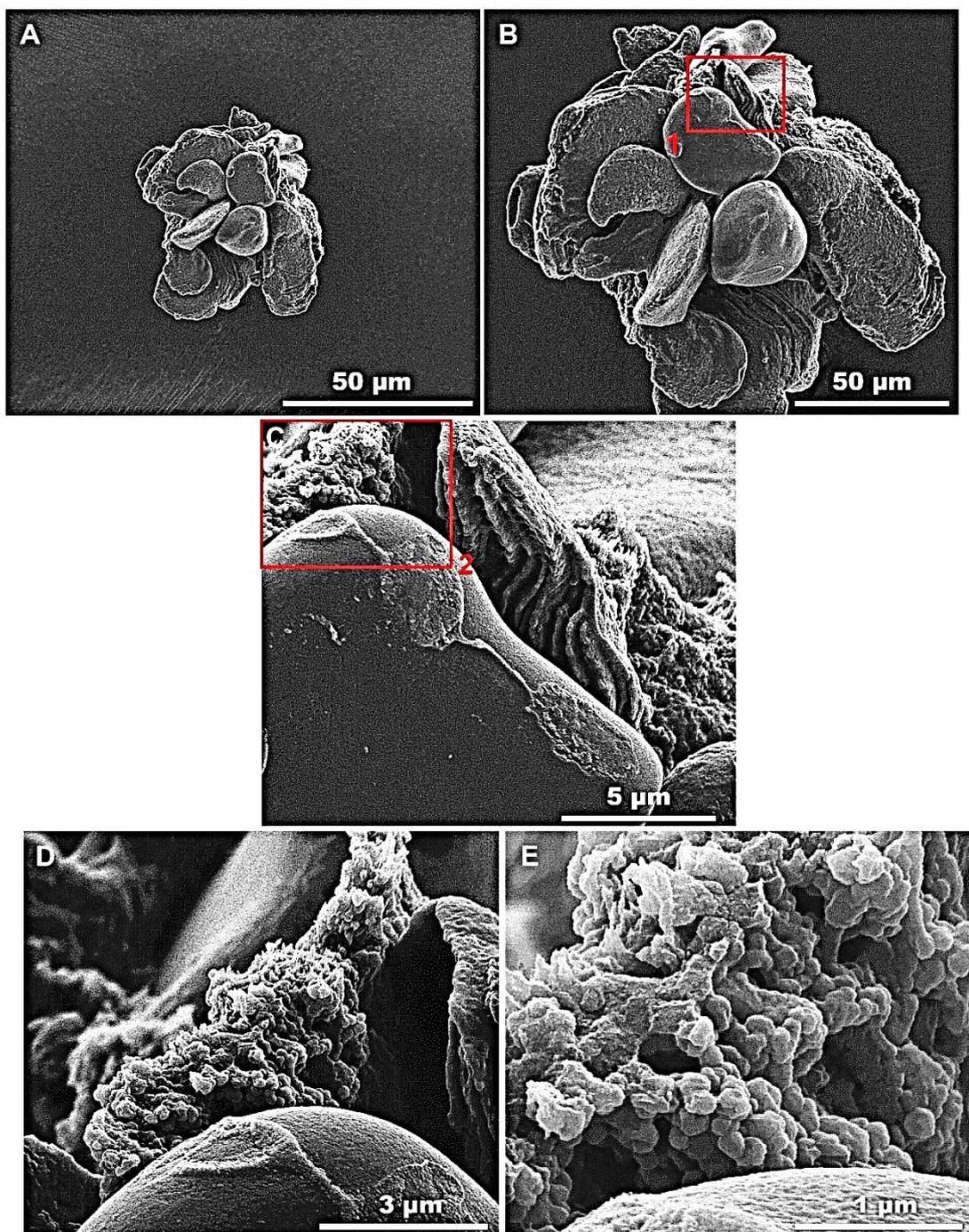


**Figura 36:** Grânulos de amido isolados de banana verde (3 dpc), desproteinizados e submetidos a tratamento com tampão e enzima  $\alpha$ -amilase de porcina pancreática (Sigma) por 48 horas e visualizados por microscopia eletrônica de varredura (MEV). A – quadrado vermelho indica a região de aumento da imagem B.

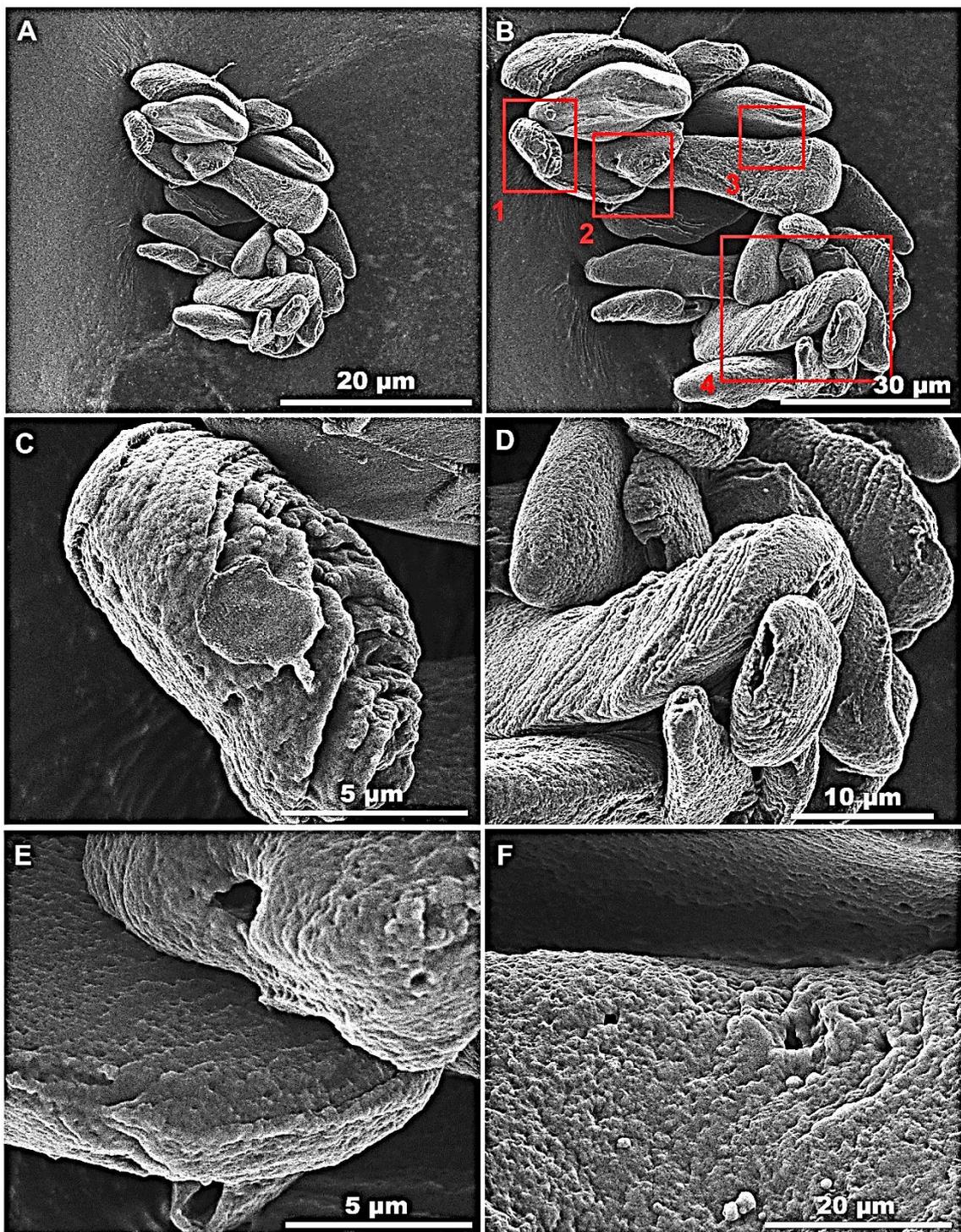


**Figura 37:** Grânulos de amido isolados de banana verde (6 dpc), desproteinizados e submetidos a tratamento com tampão e enzima  $\alpha$ -amilase de porcina pancreática (Sigma) por 48 horas e visualizados por microscopia eletrônica de varredura (MEV). A – quadrado vermelho 1 indica a região de aumento da imagem B, quadrado vermelho 2 indica a região de aumento da imagem C e quadrado vermelho 3 indica a região de aumento da imagem D.

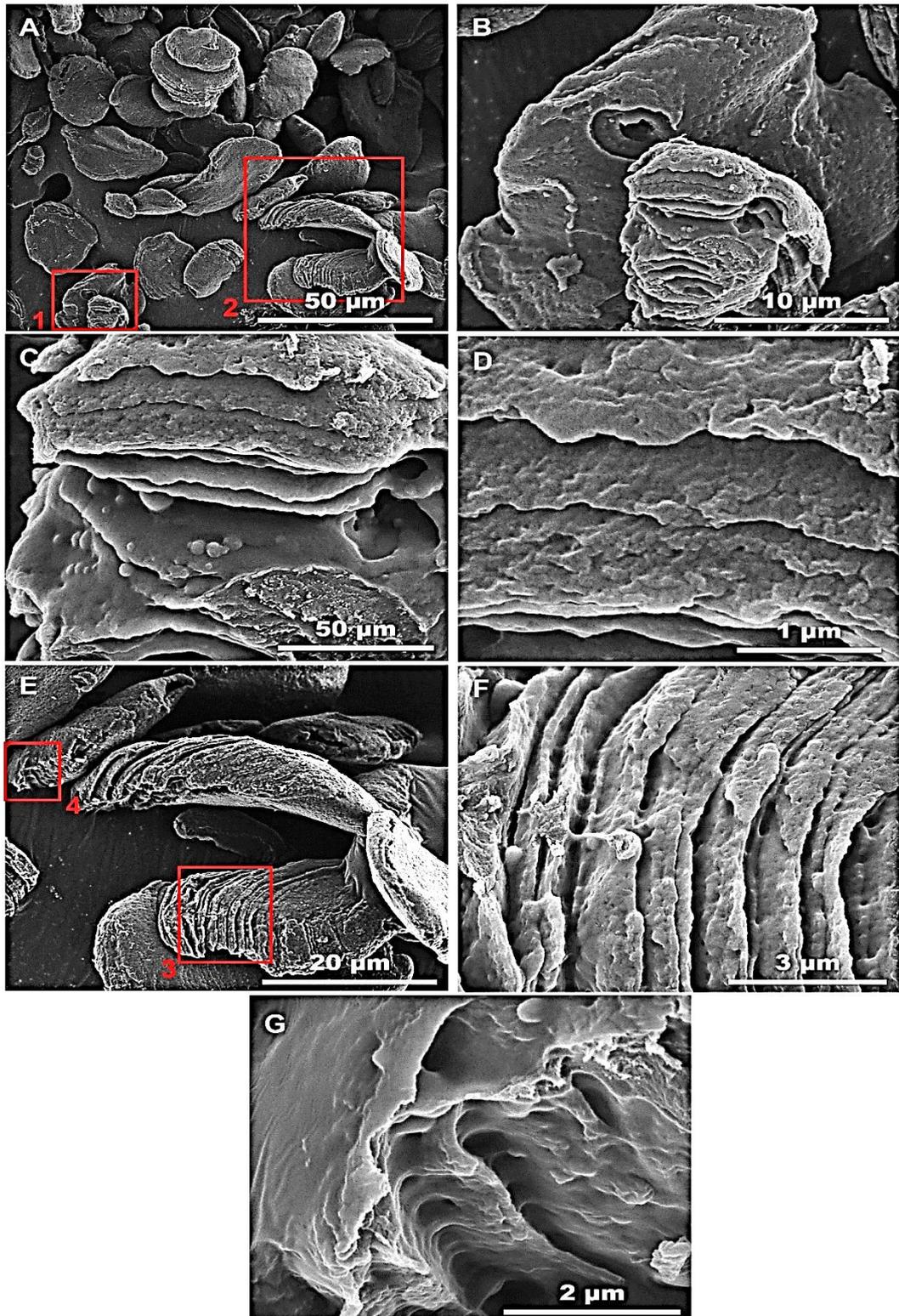
Já as micrografias contidas nas Figuras 38 e 39, são de grânulos de amido isolados de banana verde (3 dpc), enquanto que as Figuras 40 e 41, são de grânulos de amido isolados de banana verde (6 dpc), sendo todos esses amidos tratados com  $\alpha$ -amilase em tampão por 72 horas. Também aqui é bastante visível a degradação dos grânulos, com a mudança de tamanho, forma e com exposição das lamelas mais cristalinas dos anéis de crescimento, típicos da ação da  $\alpha$ -amilase, que age nas regiões mais amorfas dos anéis de crescimento (GALLANT, BOUCHET E BALDWIN, 1997; MOORE et al, 2015). Também é visível a exposição dos bloquetes (amilopectina cristalina ou nanocristais), tanto advindos de grânulos totalmente degradados (Figura 38 C, D e E), quanto do grânulo ainda em degradação (Figura 39F). Esse perfil de degradação visto nas amostras da Figura 40 e 41 também foi visto por Moore et al, 2015, em grânulos de amido de banana e trigo.



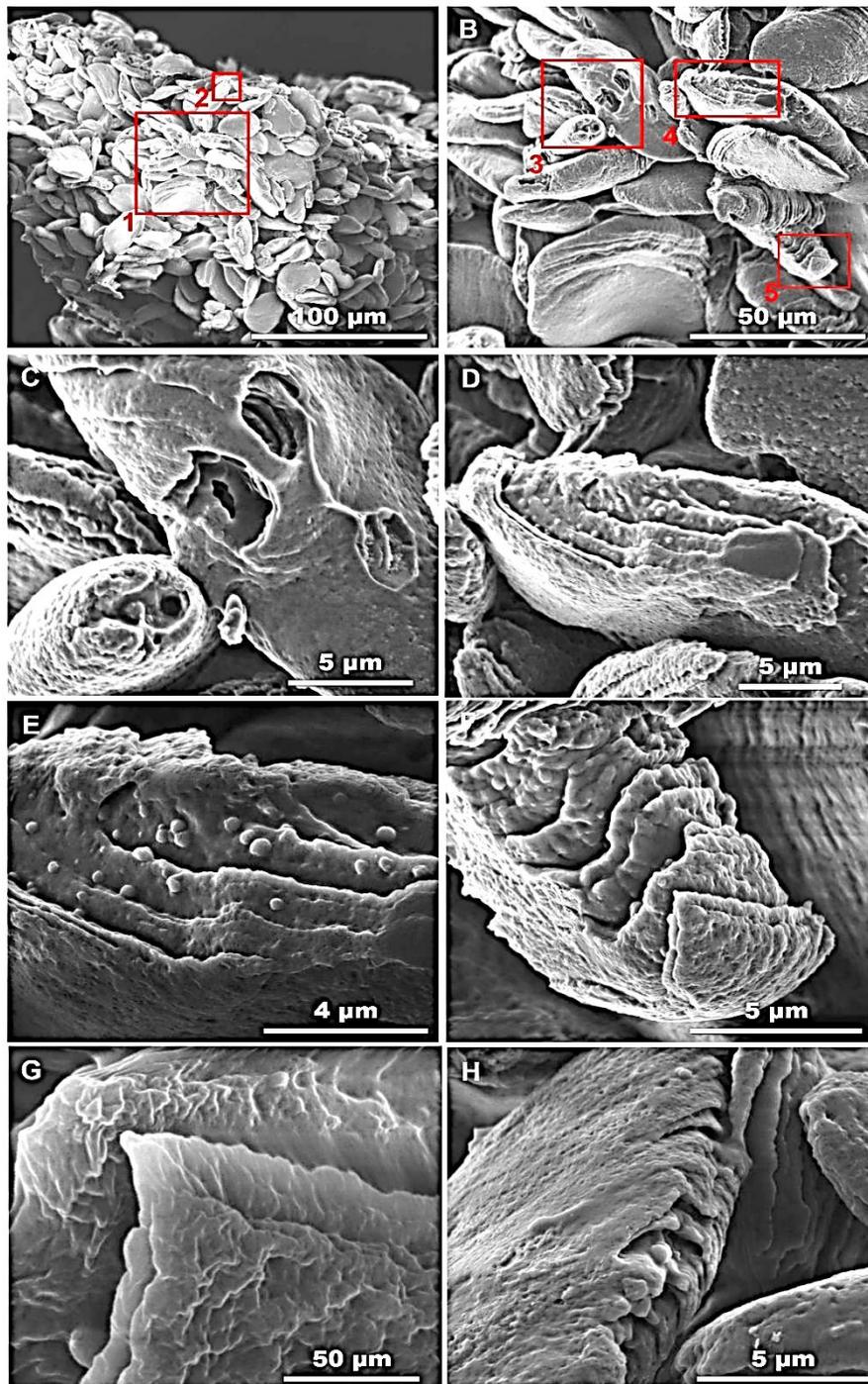
**Figura 38:** Grânulos de amido isolados de banana verde (3 dpc) desproteinizados e submetidos a tratamento com tampão e enzima  $\alpha$ -amilase de porcina pancreática (Sigma) por 72 horas e visualizados em um microscópio eletrônico de varredura (MEV). A – indica a região de aumento da imagem B; B – o quadrado vermelho 1 indica a região de aumento da imagem C; C – quadrado vermelho 2 indica a região de aumento da imagem D; E – aumento da imagem D.



**Figura 39:** Grânulos de amido isolados de banana verde (3 dpc) desproteinizados e submetidos a tratamento com tampão e enzima  $\alpha$ -amilase porcina pancreática (Sigma) por 72 horas e visualizados por microscopia eletrônica de varredura (MEV). B – aumento da imagem A, quadrado vermelho 1 indica a região de aumento da imagem C, quadrado vermelho 2 indica a região de aumento da imagem E, quadrado vermelho 3 indica a região de aumento da imagem F e quadrado vermelho 4 indica a região de aumento da D.



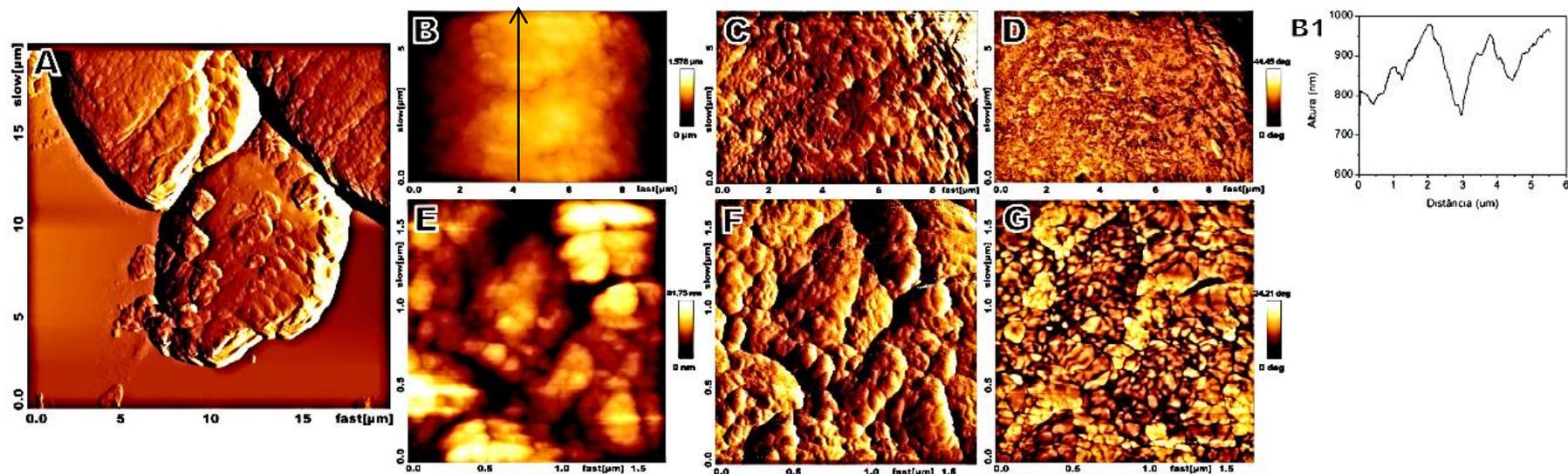
**Figura 40:** Grânulos de amido isolados de banana verde (6 dpc) desproteinizados e submetidos a tratamento com tampão e enzima  $\alpha$ -amilase porcina pancreática (Sigma) por 72 horas e visualizados por microscopia eletrônica de varredura (MEV). A – quadrado vermelho 1 indica a região de aumento da imagem B e quadrado vermelho 2 indica a região de aumento da imagem E; C aproximação da imagem B; D aproximação da imagem C; E – quadrado vermelho 3 indica a região de aumento da imagem G e quadrado vermelho 4 indica a região de aumento da imagem F.



**Figura 41:** Grânulos de amido isolados de banana verde (6 dpc) desproteinizados e submetidos a tratamento com tampão e enzima  $\alpha$ -amilase de porcina pancreática (Sigma) por 72 horas e visualizados por microscopia eletrônica de varredura (MEV). A – quadrado vermelho 1 indica a região de aumento da imagem B e quadrado vermelho 2 indica a região de aumento da imagem H; B – quadrado vermelho 3 indica a região de aumento da imagem C, quadrado vermelho 4 indica a região de aumento da imagem D, quadrado vermelho 5 indica a região de aumento da imagem F; E – aproximação da imagem F; G – aproximação da imagem F.

Quando visualizados por microscopia de força atômica, os grânulos de amido também revelam extensa degradação em toda a superfície dos grânulos. A Figura 42A apresenta a imagem de erro contendo três diferentes grânulos na mesma área analisada. Em maior resolução, outras duas diferentes áreas foram analisadas e confirmaram alguns detalhes observados por MEV. A área analisada apresentada na imagem de topografia (Figura 42B) revela uma diferença de altura em torno de 200 nm (área analisada no sentido da seta) e confirmada pelo gráfico de profundidade apresentado na Figura 42 B1. As demais imagens (Figura 42E-42G) revelam a presença de bloquetes de diferentes tamanhos e diferenças de contraste de fase observada por toda a superfície. Infelizmente, por limitações técnicas, não foi possível encontrar grânulos com exposição dos anéis de crescimento nestas amostras, como observado nas imagens obtidas por MEV.

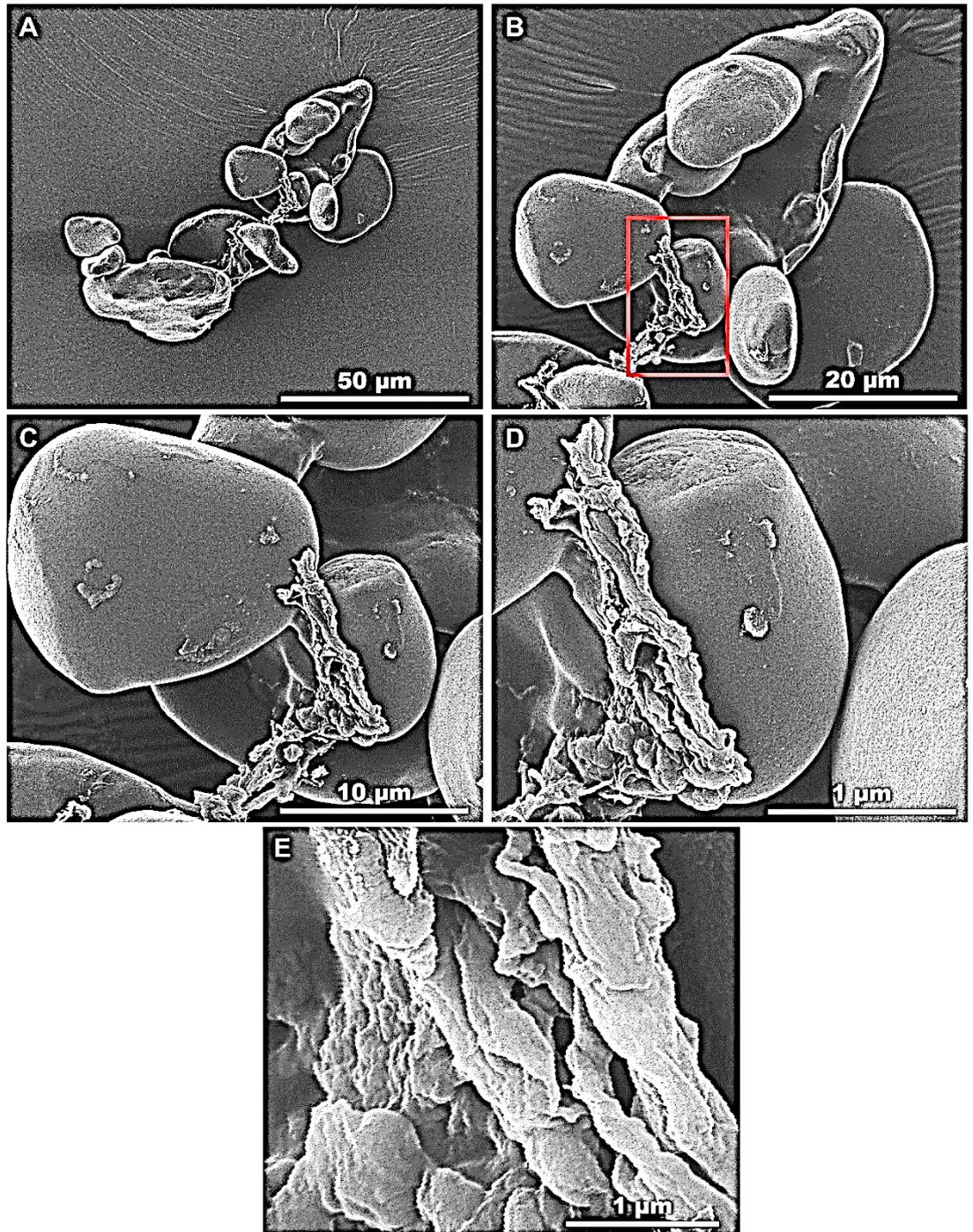
A análise do tampão de incubação por cromatografia líquida de alta resolução acoplado a detector amperométrico (CLAE-DAD), não foi conclusiva, de modo que não apresentamos aqui os resultados obtidos.



**Figura 42:** Imagens obtidas por microscopia de força atômica de amido isolado de banana Nanicão com 6 dias pós-colheita, tratados com  $\alpha$ -amilase de porcine pancreática. (A) Imagem de erro de uma área contendo 3 grânulos de amido diferentes. As imagens de topografia (B) e (E) e as respectivas imagens de erro (C) e (F), e fase (D) e (G) foram obtidas em maior resolução e revelam detalhes da estrutura do grânulo hidrolisado. O gráfico de linha apresentado em (B<sub>1</sub>) destaca a diferença de altura da área analisada em (B).

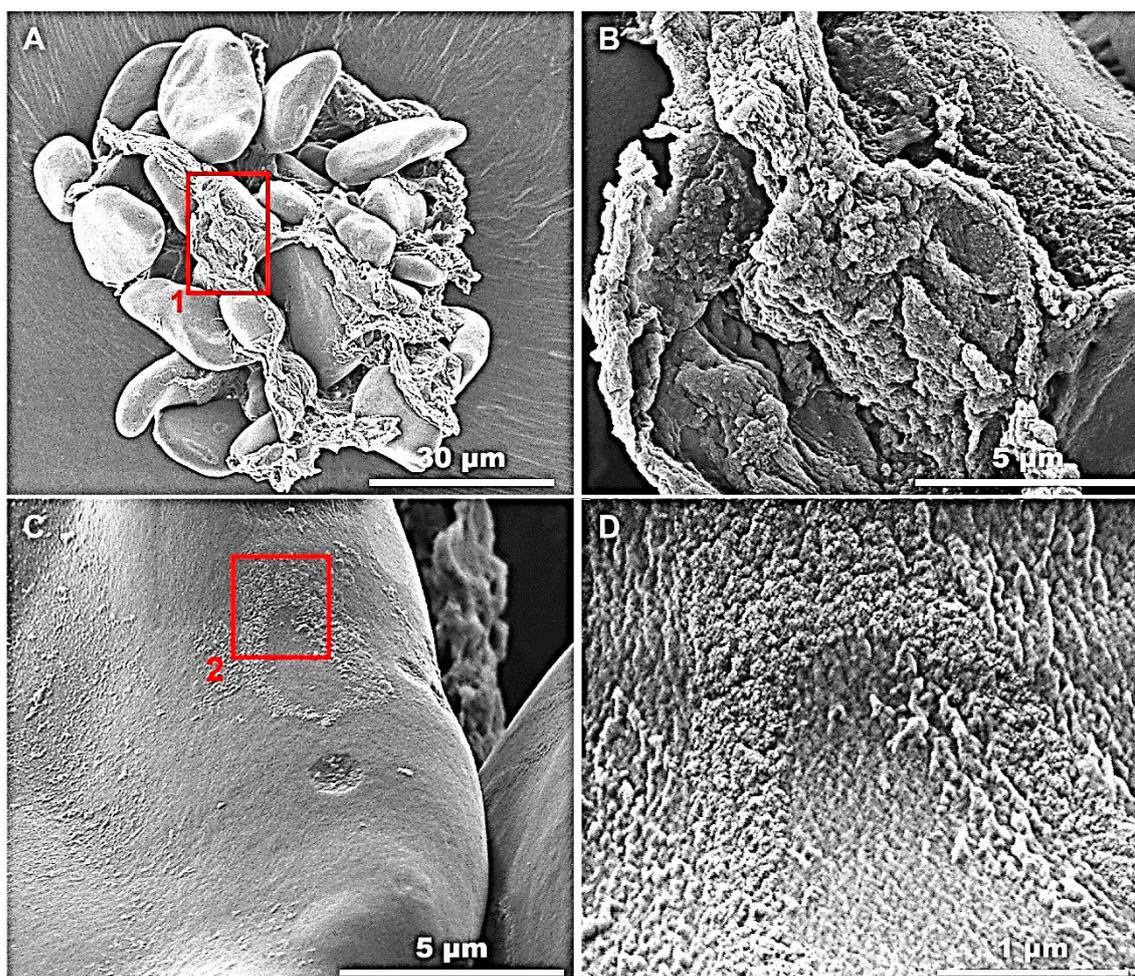
### **Amostras de amido tratadas com $\beta$ -amilase**

As Figuras 43 a 48 mostram micrografias de grânulos de amido isolados de bananas com 3 e 6 dpc, desproteinizados, tratados com  $\beta$ -amilase e incubados em tampão por 72 horas. Na amostra 3 dpc, a superfície dos grânulos parece intacta quando comparada à superfície dos grânulos tratados com  $\alpha$ -amilase (Figura 43). Em maiores aumentos, alguns detalhes apresentados nas imagens das Figuras 43C-43E puderam ser observados, revelando a presença de restos do que parecem ser cadeias amorfas, incluindo bloquetes.



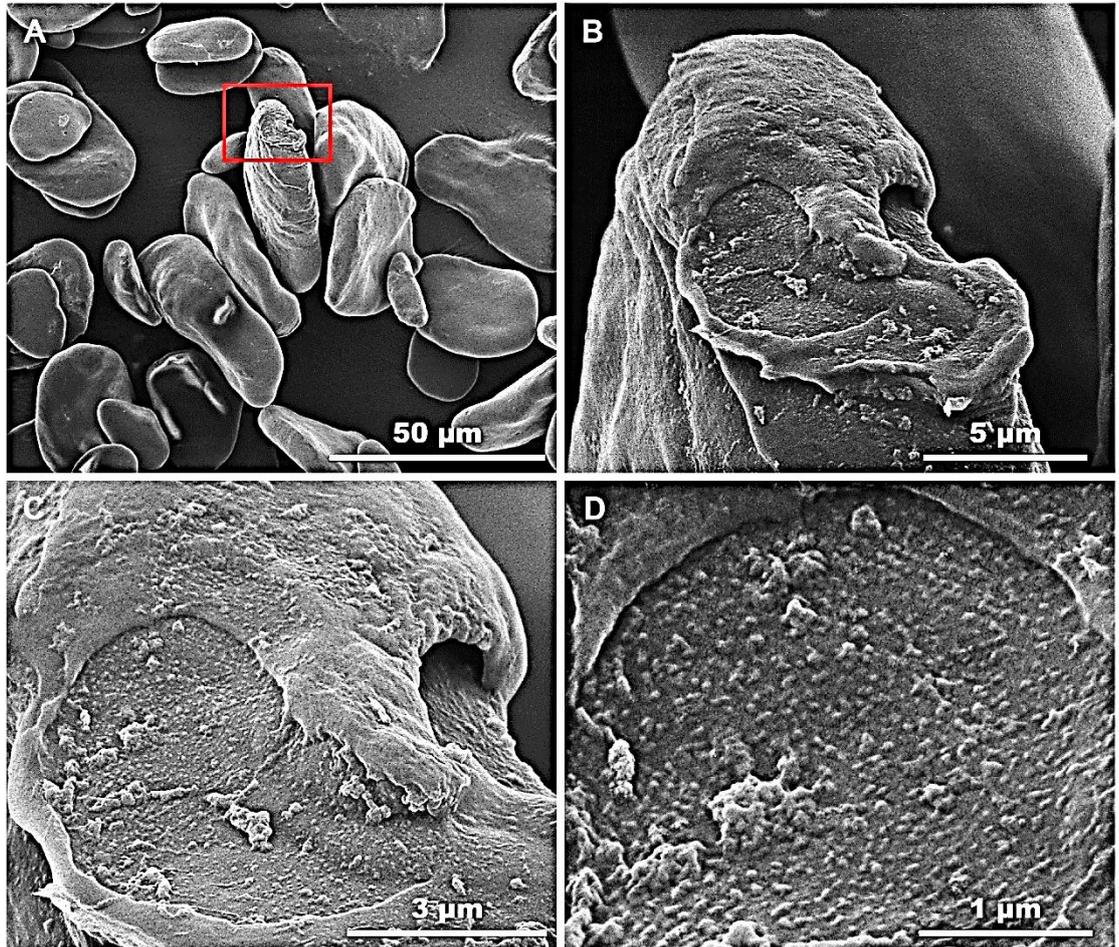
**Figura 43:** Grânulos de amido isolados de banana verde (3 dpc) desproteinizados e submetidos a tratamento com tampão e enzima  $\beta$ -amilase de batata doce (Sigma) por 72 horas e visualizados por microscopia eletrônica de varredura (MEV). B – aproximação da imagem A, quadrado vermelho indica o aumento da imagem C; D – aproximação da imagem C; E – aproximação da imagem D.

As micrografias mostradas na Figura 44A-44B (3 dpc) contém grânulos intactos que também aparentam ter resíduos de degradação de outros grânulos de amido aderidos à superfície. As imagens mostradas em C e D mostram buracos de degradação semelhantes aos do controle e, aparente degradação superficial ainda não vista nas amostras anteriores.

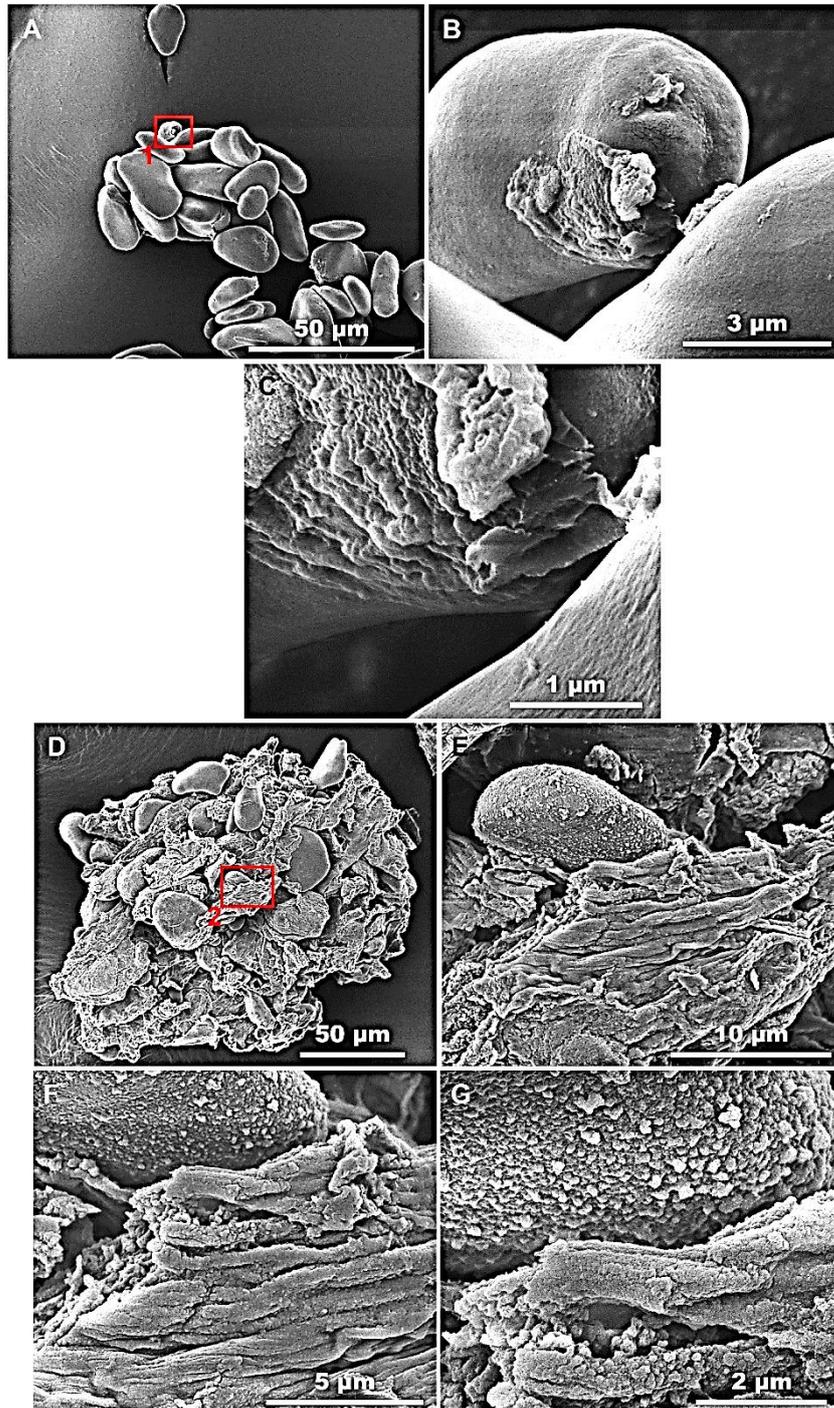


**Figura 44:** Grânulos de amido isolados de banana verde (3 dpc) desproteinizados e submetidos a tratamento com tampão e enzima  $\beta$ -amilase de batata doce (Sigma) por 72 horas e visualizados por microscopia eletrônica de varredura (MEV). A – quadrado vermelho 1 indica a região de aumento da imagem B; C – quadrado vermelho 2 indica a região de aumento da imagem D.

As imagens contidas na Figura 45 (6 dpc) mostram degradação superficial do grânulo e a Figura 46 (6 dpc) contém micrografias com grânulos com degradação superficial sem exposição dos anéis de crescimento, mas com muito resíduo do que pode ser restos de degradação de outros grânulos. Estes resíduos tem o formato de “cordas”, o que seria compatível com material amorfo e não tem sinais de bloquetes soltos. A  $\beta$ -amilase deve, preferencialmente, degradar a amilopectina, ou os bloquetes, previamente fosforilada pelas enzimas GWD e PWD, tendo como consequência a degradação de regiões mais cristalinas do grânulo, “sobrando” as regiões mais amorfas, como parece ter acontecido.



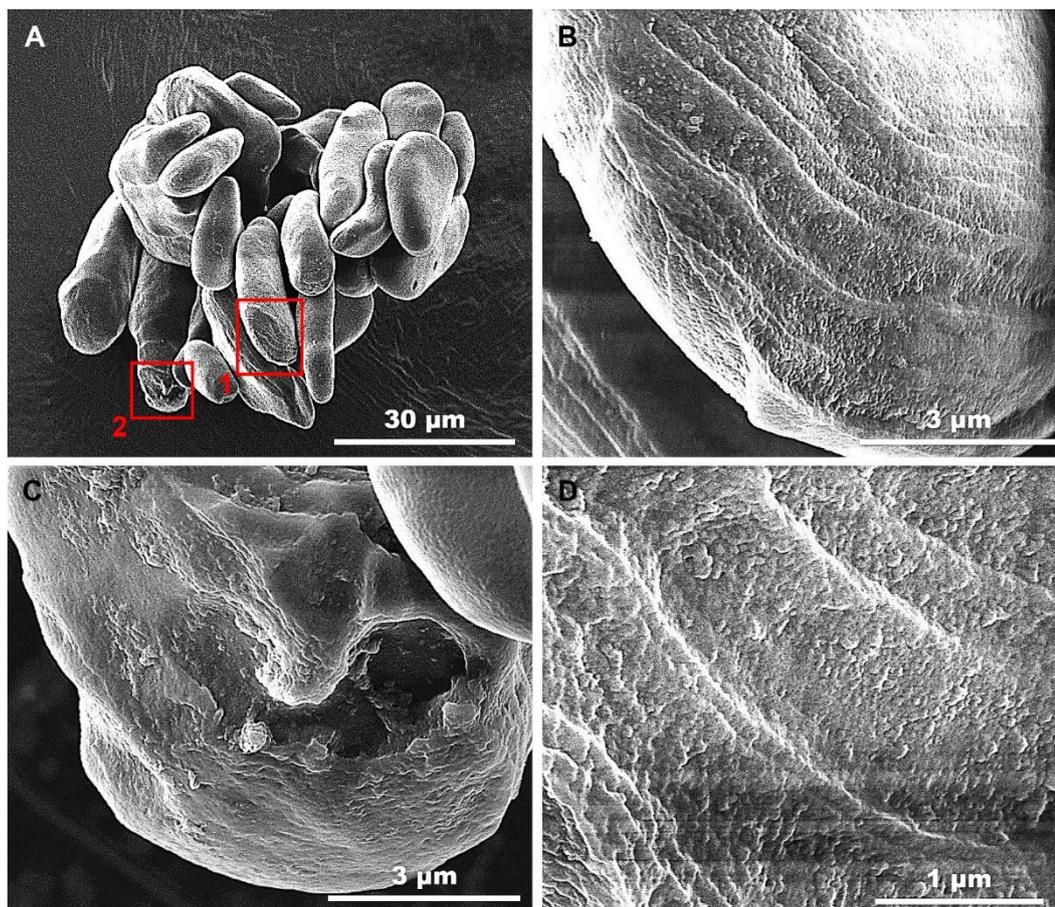
**Figura 45:** Grânulos de amido isolados de banana verde (6 dpc) desproteinizados e submetidos a tratamento com tampão e enzima  $\beta$ -amilase de batata doce (Sigma) por 72 horas e visualizados por microscopia eletrônica de varredura (MEV). A – quadrado vermelho indica a região de aumento da imagem B; C – aproximação da imagem B; D – aproximação da imagem C.



**Figura 46:** Grânulos de amido isolados de banana verde (6 dpc) desproteinizados e submetidos a tratamento com tampão e enzima  $\beta$ -amilase de batata doce (Sigma) por 72 horas e visualizados por microscopia eletrônica de varredura (MEV). A – quadrado vermelho indica a região de aumento da imagem B; C – aproximação da imagem B; D – quadrado vermelho 2 indica a região de aumento da imagem E; F – aproximação da imagem E; G – aproximação da imagem F.

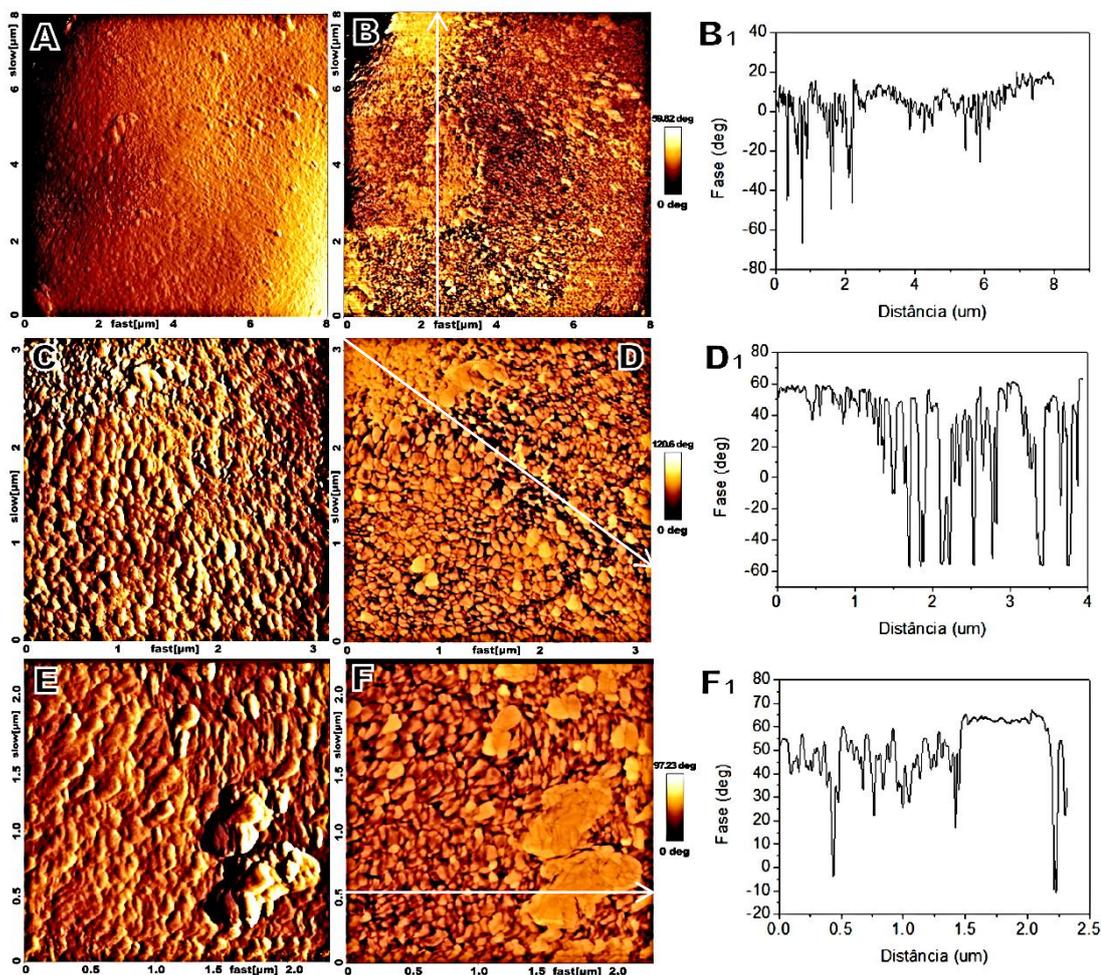
A Figura 47 mostra que a degradação parece acontecer camada por camada, não expondo os anéis de crescimento, como ocorre no caso da  $\alpha$ -amilase.

Também nestas amostras não foi possível detectar maltose como produto da hidrólise da  $\beta$ -amilase, quando o sobrenadante da reação foi analisado por CLAE-DAD.



**Figura 47:** Grânulos de amido isolados de banana verde (6 dpc) desproteinizados e submetidos a tratamento com tampão e enzima  $\beta$ -amilase de batata doce (Sigma) por 72 horas e visualizados por microscopia eletrônica de varredura (MEV). A – quadrado vermelho 1 indica a região de aumento da imagem B, quadrado vermelho 2 indica a região de aumento da imagem C; D – aproximação da imagem B.

Os mesmos grânulos isolados de bananas com 6 dias pós colheita foram analisados por MFA (Figura 48). As imagens de erro apresentadas em A, C e E mostram a superfície de um grânulo de amido aparentemente lisa e sem sinais de degradação. As respectivas imagens de contraste de fase (B, D e F) e seus respectivos gráficos de força da área demarcada (seta branca), mostram haver diferenças de fase compatíveis com os encontrados nas imagens das amostras Controle (Figura 35). Ou seja, regiões mais claras, ou mais amorfas e regiões sem contraste, ou ainda com contraste de fase compatível com a degradação de regiões muito pequenas da superfície do grânulo. A imagem apresentada de contraste de fase na Figura 48F e o respectivo gráfico de força na Figura 48 F1 revelam estruturas “alargadas” dos bloquetes ou junção de vários bloquetes com fraco contraste de fase em relação ao resto do grânulo. Essa região parece ser composta por um material mais amorfo. O tamanho médio dos bloquetes medidos na Figura 48E varia de 138 a 250 nm.



**Figura 48:** Imagens obtidas por microscopia de força atômica de amido isolado de banana Nanicão com 6 dias pós-colheita, tratados com  $\beta$ -amilase de batata doce (Sigma). Imagens de erro (A), (C) e (E) e as respectivas imagens de contraste de fase (B), (D) e (F) revelam detalhes da estrutura do grânulo hidrolisado. O gráfico de linha apresentado em (B<sub>1</sub>, D<sub>1</sub> e F<sub>1</sub>) revelam diferenças de fase das áreas analisadas em (B), (D) e (F), respectivamente.

#### 4. CONCLUSÕES

Os grânulos de amido já estão fosforilados nas posições C3 e C6 quando a banana é colhida. O grau de fosforilação do amido e a proteína relativa à GWD diminuem com o grau de degradação do amido, confirmando que esta fosforilação ocorre somente nos passos iniciais da degradação.

A  $\beta$ -amilase parece ter como substrato preferencial, regiões mais cristalinas dos grânulos de amido da banana, com a predominância da amilopectina na forma de nanocristais.

A proteína relativa à enzima ( $\beta$ -amilase) permanece associada aos grânulos até estágios finais da degradação do amido, confirmando sua importância no processo.

Grânulos de amido de banana isolados de bananas em início de amadurecimento (6 dpc) parecem ser mais susceptíveis à ação da  $\beta$ -amilase que de banana recém colhidos (3 dpc), o que seria coerente com a correlação entre a ação da enzima e etileno, já encontrada antes.

A  $\alpha$ -amilase tem como substrato preferencial regiões amorfas dos grânulos, com predominância da amilose, dos grânulos de amido, tanto de bananas recém colhidas (3dpc) quanto na fase de início de degradação (6 dpc). A proteína relativa à enzima diminui com o grau de degradação do amido, decorrente do amadurecimento da banana.

O conjunto de resultados encontrados permite concluir que ambas as vias de degradação do amido atuam na degradação da banana

## 5. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICAS

AGAMA-ACEVEDO, E., RODRIGUEZ-AMBRIZ, S.L., GARCIA-SUÁREZ, F.J., GUTIERREZ—ÉRAZ, F., PACHECO-VARGAS, G., BELLE-PÉREZ, L.A. Starch isolation and partial characterization of commercial cooking and dessert banana cultivars growing in Mexico. **Starch/Stärke**, v.65, 1-8, 2013.

ALBRECHT, T., KOCH, A., LODE, A., GREVE, B., SCHNEIDER-MERGENER, J., STEUP, M. Plastidic (Pho1-type) phosphorylase isoforms in potato (*Solanum tuberosum* L.) plants: expression analysis and immunochemical characterization. **Planta**, v. 213, 602-613, 2001.

APPENROTH, K., KERESZTES, A., KRZYSZTOFOWICZ, E., GABRYS, H. Light-Induced Degradation of Starch Granules in Turions of *Spirodela polyrhiza* Studied by Electron Microscopy. **Plant and Cell Physiology**, v.52, n.2, 348-391, 2011.

ARÉAS, J.A., LAJOLO, F.M. Starch transformation during banana ripening: I – the phosphorylase and phosphatase behavior in *Musa Acuminata*. **Journal of Food Biochemistry**, v. 5, n. 1, 19-37, 1981.

ASATSUMA, S., SAWADA, C., KITAJIMA, A., ASAKUMA, T., MITSUI, T.  $\alpha$ -amylase Affects Starch Accumulation in Rice Grains. **Journal Appl. Glycosci**, v.53, n.3, 187-192, 2006.

ASTORINO FILHO, R. **Caracterização funcional do gene maBMY que codifica para uma  $\beta$ -amilase endereçada a plastídeos e expressa durante o amadurecimento da banana.** Tese de doutorado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. São Paulo. 97 p, 2008.

BALL, G.S., MORELL, M.K. From Bacterial Glycogen to Starch: Understanding the Biogenesis of the Plant Starch Granule. **Plant Biology**, v.54, 207-233, 2003.

BASSINELLO, P.Z., CORDENUNSI, B.R., LAJOLO, F.M. Amylolytic Activity in fruits: Comparison of Different Substrates and methods using banana as Model. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, 5781-5786, 2002.

BECK, E., ZIEGLER, P. Biosynthesis and Degradation of Starch in Higher Plants. **Plant physiol. Plant Mol. Biol**, v. 40, 95-117, 1989.

New York, 2<sup>o</sup> edição, 1974.

BERTOLDO, C., ANTRANIKIAN, G. Starch-hydrolizing enzymes from thermophilic archea and bacteria. **Biocatalysis and Biotransformation**, v.6, 151-160, 2002.

BIERHALS, J.D., LAJOLO, F.M., CORDENUNSI, B.R., NASCIMENTO, J.R.O. Activity, Cloning, and Expression of an Isoamylase-Type Starch-Debranching Enzyme from Banana fruit. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.52, n.24, 7412-7418, 2004.

BORTOLOSSI, J. C. **Expressão e análise de proteínas recombinants Xanthomonas axonopodis pv. Citri em E. coli, visando análise estrutural por cristalografia.** Dissertação de mestrado. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias. Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”. Joboticabal, São Paulo. 58 p, 2007.

BRADFORD, M.M. Rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, 248-254, 1976.

BRAGA, P.C. **Como melhorar sua expressão de proteínas recombinants em E. coli.** Merck. Rio de Janeiro. 2008.

BULÉON, A., COLONNA, P., BALL, S., Mini review – Starch granules: structure and biosynthesis. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 23, 85-112, 1998.

BULÉON, A., GERARD, C., RIEKEL, C., VOUNG, R., CHANZY, H. Details of the Crystalline Ultrastructure of C-starch granules revealed by Synchrotron Microfocus Mapping. **Macromolecules**, v. 31, n. 19 6605-6610, 1998.

CANGANELLA, F., ANDRADE, C.M., ANTRANIKIN, G. Characterization of amylolytic and pullulytic activities from thermophilic Archaea and from a new Fervido bacterium species. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.42, 239-245, 1994.

CARDOSO, M.B., PUTAUX, J.L., SAMIOS, D., SILVEIRA, N.P. Influence of alkali concentration on the desproteinization and/or gelatinization of rice starch. **Carbohydrate Polymers**, v. 70, 160-165, 2007.

CARPENTER, M. JOYCE, N., BUTLER, R., GENET, R., VAUGHAN, G.T. A mass spectrometric method for quantifying C3 and C6 phosphorylation of starch. **Analytical Biochemistry**, v. 431, 115-119, 2012.

CELIŃSKA, E., BIALAS, W., BORKOWSKA, M., GRAJEK, W. Cloning, expression, and purification of insect (*Sitophilus oryzae*) alpha-amylase, able to digest granular starch, in *Yarrowia lipolytic* host. **Applied Genetics and Molecular Biotechnology**, v. 99, 2727-2739, 2015.

CHEETHAM, N.W.H., TAO, L. Variation in crystalline type with amylose content in maize starch granules: an X-ray powder diffraction study. **Carbohydrate Polymers**, v. 36, 277-284, 1998.

CORDENUNSI, B.R., LAJOLO, F.M. Starch breakdown during banana ripening: sucrose synthase and sucrose phosphate synthase. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 43 p. 347-351, 1995.

EDNER, C., LI, J., ALBRECHT, T., MAHLOW, S., HEJAZI, M., HUSSAIN, H., KAPLAN, F., GUY, C., SMITH, S.M., STEUP., RITTE, G. Glucan, Water Dikinase Activity Stimulates Breakdown of Starch Granules by Plastidial  $\beta$ -Amylases. **Plant Physiology**, v. 145, 17-28, 2007.

FERREIRA, G.S. **Expressão recombinante e caracterização funcional da  $\beta$ -amilase de banana produzida em *Pichia pastoris***. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. São Paulo. 59 p. 2013.

FRANCO, C.M.L., WONG, K.S., YOO, S., JANE, J.L. Structural and functional characteristics of selected soft wheat starches, **Cereal Chemistry**, v.79, n. 2, 243-248, 2002.

FRENCH, D. Chemical and physical properties of starch. **Journal of Animal Science**, v.37, n.4, p.1048-1061, 1973.

FULTON, D.C., STETTLER, M., METTLER, T., VAUGHAN, C.K., LI, J., FRANCISCO, P., GIL, M., REINHOLD, H., EICKE, S., MESSERLI, G., DORKEN, G., HALLIDAY, K., SMITH, A.M., SMITH, S.M., ZEEMAN, S.C.  $\beta$ -AMYLSE4, a Noncatalytic Protein Required for Starch Breakdown, Acts Upstream of Three Active  $\beta$ -amylases in Arabidopsis Chloroplasts. **The Plant Cell**, v. 20, 1040-1058, 2008.

GALLANT, D.J., BOUCHET, B., BALDWIN, P.M. Microscopy of starch: evidence of a new level of granule organization. **Carbohydrate Polymers**, v.32, 177-191, 1997.

GALLANT, D.J.; BEWA, H.; BUY, Q.H.; BOUCHET, B.; SZYLIT, O.; SEALY, L. On ultrastructural and nutritional aspects of some tropical tuber starches. **Starch/Stärke**, v.34, 255-262, 1982.

GLARING, M.A., KOCH, B.C., BLENNOW, A. An extra-plastidial  $\alpha$ -glucan, water dikinase from Arabidopsis phosphorylates amylopectin in vitro and is not necessary for transient starch degradation. **Journal of Experimental Botany**, v. 58, n.8, 3949-3960, 2007.

GLARING, M.A., KOCH, C.B., BLENNOW, A. Genotype-Specific spatial Distribution of Starch Molecules in the Starch Granule: A Combined CLSM and SEM Approach. **Biomacromolecules**, v.7, 2310-2320, 2006.

GOMEZ, L., RUBIO, E., AUGÉ, M. A new produce for extraction and measurement of soluble sugars in ligneous plants. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 82, 360-369, 2002.

HAEBEL, S., HEJAZI, M., FROHBERG, C., HEYDENREICH, M., RITTE, G. Mass spectrometric quantification of the relative amounts of C6 and C3 position phosphorylated glucosyl residues in starch. **Analytical Biochemistry**, v.379, 73-79, 2008.

HAMES, B. D.; RICKWOOD, D. **Gel Electrophoresis of Proteins – A Practical Approach**. Second Edition. p. 44-50 1990.

HEJAZI, M., FETTKE, J., HAEBEL, S., EDNER, C., PARIS, O., FROHBERG, C., STEUP, M., RITTE, G. Glucan, water dikinase phosphorylates crystalline maltodextrins and thereby initiates solubilization. **The Plant Journal**, v. 55, p. 323-334, 2008.

HENRISSAT, B., BAIROCH, A. Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases. **Biochem. J.** v.316, n.2, p.695-696, 1996.

HOOVER, R. Composition, molecular structure, and physicochemical properties of tuber and root starches: a review. **Carbohydrate Polymers**. v. 45, 253-267, 2001.

HUANG, J., HESS, W.M., WEBER, D., PURCELL, A.E., HUBER, C.S. Scanning electron microscopy: tissue characteristics and starch granule variations of potatoes after microwave and conductive heating. *Food Microstructure*, v. 9, n. 2, 113-122, 1990.

IRVING, D.E., SHINGLETON, G.J., HURST, P.L. Starch degradation in buttercup squash (*Cucurbita maxima*), **J. Amer. Soc. Hort. Sci**, v.124, n.6, 587–590, 1999.

JANECEK, S., SVENSSON, B., MACGREGOR, E.A.  $\alpha$ -amylase; an enzyme specificity found in various families of glycoside hydrolases. **Cellular and Molecular Life Science**, v. 71, 1149-1170, 2014.

JUGE, N., ANDERSEN, J.S., TULL, D., ROEPSTORFF, P., SVENSSON, B. Overexpression, purification, and characterization of recombinant barley  $\alpha$ -amylase 1 and 2 secreted by the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **Protein Expression and Purification**, v. 8, n. 0093, 204-214, 1996.

KASEMSUWAN T., JANE, J.J. Quantitative Method for the Survey of Starch Phosphate Derivatives and Starch Phospholipids by  $^{31}\text{P}$ -Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. **Cereal Chemistry**, v.73, n.6, 702-707, 1996.

KOSHIBA, T. MINAMIKAWA, T. Purification by affinity chromatography of  $\alpha$ -amylase – A main amylase in Cotyledons of germinating *Vigna mungo* seeds. *Plant Cell Physiology*, v.22, n.6, 978-987, 1981.

KOSSMANN, J., LLOYD, J. Understanding and influencing starch biochemistry. *Crit. Rev. Plant Sci.* v.19, n.3, p.171–226, 2000.

KÖTTING, O., KOSSMANN, J., ZEEMAN, S.C., LLOYD, J. Regulation of Starch metabolism: the age of enlightenment?. **Plant Biology**, v.13, 321-329, 2010.

KÖTTING, O., PUSCH, K., TIESSEN, A., GEIGENBERGER, P., STEUP, M., RITTE, G. Identification of a Novel Enzyme Required for Starch Metabolism in Arabisopsis Leaves. The Phosphoglucan, Water Dikinase. **Plant Physiology**, v. 137, 242-252, 2005.

KUMAR, V. Analysis of the key active subsites of glycoside hydrolase 13 family members. **Carbohydrate Polymers**, v. 345, 893-898, 2010.

LIM, S., SEIB, P.A. Location of phosphate esters in a wheat starch phosphate by  $^{31}\text{P}$ -Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. **Cereal Chemistry**, v.70, n.2, 145-152, 1993.

LIM, S.T., KASEMSUWAN, T. JANE, J. Characterization of phosphorus in starch by  $^{31}\text{P}$ -Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. **Cereal Chemistry**, v.71, n.5 488-493, 1994.

LIN, J.H., CHANG, Y.H., LIN, J.H., JANE, J., SHEU, M.J., LU, T.J. Heterogeneity of lotus rhizome starch granules as revealed by  $\alpha$ -amylase degradation. **Carbohydrate Polymers**, v. 66, 528-536, 2006.

LIU, Z.W., YIN, H.X., YI, X.P., ZHANG, A.L., LUO, J.X., ZHANG, T.Y., FU, C.Y., ZHANG, Z.H., SHEN, J.C., CHEN, L.P. Constitutive expression of barley  $\alpha$ -amylase in *Pichia pastoris* by high-density cell culture. **Mol. Biol. Rep.** v. 39, 5805-5810, 2012.

LU, Y., STEICHEN, J.M., YAO, J., SHARKEY, T.D. The role of cytosolic  $\alpha$ -Glucan Phosphorylase in maltose metabolism and the comparison of amylomaltase in *Arabidopsis* and *Escherichia coli*. **Plant Physiology**, v. 142, 878-889, 2006.

LU, Y., STEICHEN, J.M., YAO, J., SHARKEY, T.D. The role of Cytosolic  $\alpha$ -Glucan Phosphorylase in maltose Metabolism and the Comparison of Amylomaltase in *Arabidopsis* and *Escherichia coli*. **Plant Physiology**, v. 142, 878-889, 2006.

MACGREGOR, E.A., JANECEK, S., SVENSSON, B. Relationship of sequence and structure to specific in the alpha-amylase family of enzymes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1546, 1-20, 2001.

MAINARDI, J. A. **O efeito do 1-metilciclopropeno sobre enzimas ligadas ao metabolismo de carboidratos de bananas (*Musa acuminata* AAA cv. Nanicão)**. Tese de Doutorado (FCF/USP), 2007.

MAINARDI, J.A., PURGATTO, E., VIEIRA JUNIOR, A., BASTOS, W.A., CORDENUNSI, B.R., NASCIMENTO, J.R.O., LAJOLO, F.M. The effects of ethylene and 1-MCP on gene expression and activity profile of starch phosphorylase during

banana ripening. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n.19, 7294-7299, 2006.

MIKKELSEN, R., BAUNSGAARD, L., BLENNOW, A. Funcional characterization of alpha-glucan, water dikinase, the starch phosphorylating enzyme. **Biochem. J**, v. 377, 525-532, 2004.

MOORE, S.A., AI, Y., CHANG, F., JANE, J. Effects of alpha-amylase reaction mechanisms on analysis of resistant-starch contents. **Carbohydrate Polymers**, v. 115, 465-471, 2015.

MORALES, V., CORZO, N., SANZ, M.L. HPAEC-PAD oligosaccharide analysis to detect adulterations of honey with sugar syrups. **Food Chemistry**, v. 107, 922-928, 2008.

MOTA, R.V., CORDENUNSI, B.R., NASCIMENTO, J.R.O., PURGATTO, E., ROSSETO, M.R.M., LAJOLO, F.M. Activity and expression of banana starch phosphorylases during fruit development and ripening. **Planta**, v.216, n.2, 325-333, 2002.

MÓTYÁN, J.A., GYÉMÁNT, G., HARANGI, J., BAGOSSI, P. Computer-aided subsite mapping of alpha-amylases. **Carbohydrate Research**, v. 346, 410-415, 2011.

MUKERJEA, R., YU, L., ROBYT, J.F., Starch biosynthesis: mechanism for the elongation of starch chains. **Carbohydrate Research**, v.337, n.11, 1015-1022, 2002.

MYERS, A.M., MORELL, M.K., JAMES, M.G., BALL, S.G. Recent progress toward understanding biosynthesis of the amylopectin crystal. **Plant Physiology**, v.122, 989-997, 2000.

NASCIMENTO, J.R.O., VIEIRA JUNIOR, 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 Biology and Technology**, v.40, 41-47, 2006.

OPABODE, J.T., OYELAKIN, O.O., AKINYEMIJU, O.A., INGELBRECHT, I.L. Cloning and Sequence Analysis of the Nucleotide-Binding domain of an  $\alpha$ -Glucan, water Dikiase gene from Cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **Journal of Agricultural Science**, v.5, n.12, 56-64, 2013.

PARK, J.T., SUWANTO, A., TAN, I., NURYANTO, T., LUKMAN, R., WANG, K., JANE, J. Molecular Cloning and Characterization of a thermostable  $\alpha$ -amylase exhibiting and unusually high activity. **Food Science and Biotechnology**, v. 23, n. 1, 125-132, 2014.

PARKER, M.L., KIRBY, A.R., MORRIS, V.J. In situ imaging of Pea starch in seeds. **Food Biophysics**, v. 3, 66-76, 2008.

PAVLOV, A., XIAO, Y., GILL, R., DISHON, A., KOTLER, M., WILLNER, I. Recent developments in the optimization of thermostable DNA polymerases for efficient applications. **Trends in Biotechnology**, v. 22, n.5, p. 253-260, 2004.

PERONI, F.H.G. Estrutura do grânulo de amido de banana e sua relação com as enzimas que atuam no metabolismo amido-sacarose. Tese de Doutorado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. São Paulo. 155p. 2007.

PERONI-OKITA, F.H.G., CARDOSO, M.B., AGOPIAN, R.G.D., LOURO, R.P., NASCIMENTO, J.R.O., PURGATTO, E., TAVARES, M.I.B., LAJOLO, F.M., CORDENUNSI, B.R. The cold storage of green bananas affects the starch degradation during ripening at higher temperature. **Carbohydrate Polymers**, v. 96, 137-147, 2013.

PERONI-OKITA, F.H.G., GUNNING, A.P., KIRBY, A., SIMÃO, R.A., SOARES, C.A., CORDENUNSI, B.R. Visualization of internal structure of banana starch granule through AFM. **Carbohydrate Polymers**, v.128, 32-40, 2015.

PERONI-OKITA, F.H.G., SIMÃO, R.A., CARDOSO, M.B., SOARES, C.A., LAJOLO, F.M., CORDENUNSI, B.R. In vivo degradation of banana starches: Structural characterization of the degradation process. **Carbohydrate Polymers**, v. 81, 291-299, 2010.

PRAKASH, O., JAISWAL, N.  $\alpha$ -amylase: An Ideal representative of Thermostable Enzyme. *Appl. Biochem. Biotechnol.* v.160, p. 2401-2414, 2010.

PREISS, J., Regulation of the biosynthesis and degradation of starch, **Ann. Rev. Plant Physiol**, v.33, 431-454, 1982.

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

REIMANN, R., RITTE, G., STEUP, M., APPENROTH, K.J. Association of  $\alpha$ -amylase and the R1 protein with starch granules precedes the initiation of net starch degradation in turions of *Spirodela polyrhiza*. **Physiologia Plantarum**, v.114, 2-12, 2002.

REIMANN, R., ZIEGLER, P., APPENROTH, K.J. The binding of  $\alpha$ -amylase to starch plays a decisive role in the initiation of storage starch degradation in turions of *Spirodela polyrhiza*. **Physiologia Plantarum**, v.129, 334-341, 2007.

RIDOUT, M.J., PARKER, M.L., HEDLEY, C.L., BOGRACHEVA, T.Y., MORRIS, V.J. Atomic Force Microscopy of Pea Starch: origins of image contrast. **Biomacromolecules**, v.5, 1519-1527, 2004.

RIDOUT, M.J., PARKER, M.L., HEDLEY, C.L., BOGRACHEVA, T.Y., MORRIS, V.J. Atomic force microscopy of pea starch: granule architecture of the rug3-a, rug4-b, rug5-a and lam-c mutants. **Carbohydrate Polymers**, v. 65, 64-74, 2006.

RITTE, G., ECKERMAN, N., HAEBEL, S., LORBERTH, R., STEUP, M. Compartmentation of the Starch-Related R1 Protein in Higher Plants. **Research Papers**, v.52, 145-149, 2000.

RITTE, G., HEYDENREICH, M., MAHLOW, S., HAEBEL, S., KÖTTING, O., STEUP, M. Phosphorylation of C6 and C3 positions of glucosyl residues in starch is catalysed by distinct dikinases, **FEBS Letter**, v. 580, 4872-4876, 2006.

RITTE, G., STEUP, M., KOSSMANN, J., LLOYD, J.R. Determination of the starch-phosphorylation enzyme activity in plant extracts. **Planta**, v.216, 798-801, 2003.

SACHDEV, D., CHIRGWIN, J.M. Solubility of Proteins Isolated from Inclusion Bodies Is Enhanced by Fusion to Maltose-Binding Protein or Thioredoxin. **Protein Expression and Purification**. v.12, p. 122-132, 1998.

SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F., MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2.ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, v.3, 1989.

SARIKAYA, E., HIGASA, T., ADACHI, M., MIKAMI, B. Comparison of degradation abilities of  $\alpha$ - and  $\beta$ -amylases on raw starch granules. **Process Biochemistry**, v.35, 711-715, 2000.

SCHOCH, T.J. Fractionation of Starch by Selective precipitation with Butanol. **Contribution from the research laboratory of corn products repining company**, v.64, 2957-2961, 1942.

SCHUPP, N., ZIEGLER, P. The relation of starch phosphorylases to starch metabolism in wheat. **Plant Cell Physiology**, v. 45, n.10, 1471-1484, 2004.

SHAIK, S., CARCIOFI, M., MARTENS, H.J., HEBELSTRUP, K.H., BLENNOW, A. Starch bioengineering affects cereal grain germination and seedling establishment. **Journal of Experimental Botany**, 2014.

SHUJUN, W., JINGLIN, Y., JIUGAO, Y., JIPING, P., HONGYAN, L. Structure characterization of C-type starch granule by acid hydrolysis. **Food Hydrocolloids**, v.22, 1283-1290, 2008.

SILVER, D.M., KÖTTING, O., MOORHEAD, G.B.G. Phosphoglucan phosphate function sheds light on starch degradation. **Trends in Plant Science**, v.19, n.7, 1-8, 2014.

SIMÃO, R., SILVA, A.P.F.B., PERONI, F.H.G, NASCIMENTO, J.R.O., LOURO, R.P., LAJOLO, F.M., CORDENUNSI, B.R. Mango Starch Degradation. I. A Microscopic View of the Granule during Ripening, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.56, 7410-7415, 2008.

SINGH, K., KAYASTHA, A.M.  $\alpha$ -Amylase from wheat (*Triticum aestivum*) seeds: Its purification, biochemical attributes and active site studies. **Food Chemistry**, v.162, 1-9, 2014.

SINGH, S. M., PANDA, A. K. Review: Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. v.99, p 303-310, 2005.

SMITH, A. M.; ZEEMAN, S.; C., SMITH, S. M., Starch degradation, **Annual Review Plant Biology**, v.56, p73-98, 2005.

SMITH, A.M. Review - Starch in the Arabidopsis plant. **Starch/Stärke**, v.64, 421-434, 2012.

SMITH, R.J. CARUSO, J.L. Determination of phosphorus. **Chemical Analysis**, 42-46, 1964.

SOARES, C. A. **Avaliação comparativa de características estruturais do amido e enzimas relacionadas à sua degradação em cultivares de bananas com padrão**

**distinto do modelo representado pela cultivar Nanicão.** Tese de Doutorado. 2009. 94 p. Universidade de São Paulo. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. São Paulo. SOARES, C.A., PERONI-OKITA, F.H.G., CARDOSO, M.B., SHITAKUBO, R., LAJOLO, F.M., CORDENUNSI, B.R. Plantain and Banana Starches: Granule Structural Characteristics Explain the Differences in Their Starch Degradation Patterns. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.59, 6672-6681, 2011.

SONG, Y., JANE, J. Characterization of barley starches of waxy, normal, and high amylose varieties. **Carbohydrate Polymers**, v.41, 365-377, 2000.

STANLEY, D., FITZFERALD, A.M., FARNDEN, K.J., MACRAE, E.A., Characterization of putative  $\alpha$ -amylase from apple (*Malus domestic*) and *Arabidopsis thaliana*. **Biologia, Bratislava**, v.11, 137-148, 2002.

STREB, S., ELCKE, S., ZEEMAN, S.C. The Simultaneous Abolition of Three Starch Hydrolases Blocks Transient Starch Breakdown in *Arabidopsis*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 287, no 50, 41745-41756, 2012.

SUBBARAO, K.V., DATTA, R., SHARMA, R. Amylases Synthesis in Scutellum and Aleurone Layer of Maize Seeds. **Phytochemistry**. v.49, p. 657-666, 1998.

SUTLIFF, T.D., DAITA, R., SHARMA, R. Characterization of an  $\alpha$ -amylase multigene cluster in rice. **Plant Molecular Biology**, v.16, 579-591, 1991.

THYS, R.C.S., WESTFAHL, H., NOREÑA, C.P.Z., MARCZAK, L.D.F., SILVEIRA, N.P., CARDOSO, M.B. Effect of the Alkaline Treatment on the Ultrastructure of C-Type Starch Granules. **Biomacromolecules**, v.9, n.7, 1894-1901, 2008.

VIEIRA JUNIOR, A. **Alfa e beta-amilase no metabolismo do amido durante o amadurecimento da banana: clonagem, expressão e caracterização molecular.** Tese de doutorado. 91 p. Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. 2006.

VIEIRA JUNIOR, A., NASCIMENTO, J.R.O., LAJOLO, F.M. Molecular cloning and characterization of an alpha-amylase occurring in the pulp of ripening bananas and its expression in *Pichia pastoris*. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.54, 8222-8228, 2006.

VIEIRA-JUNIOR, A. **Seqüência e caracterização molecular do cDNA de uma  $\alpha$ -amilase expressa durante o amadurecimento da banana (*Musa spp.*)**. Dissertação de Mestrado. 87 p. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Universidade de São Paulo. 2001.

WANG, L.Z., WHITE, P.J. Structure and Properties of Amylose, Amylopectin, and Intermediate Materials of Oat Starches. **Cereal Chemistry**, v.71, n.3, 263-268, 1994.

WHISTLER, R.L.; BeMILLER, J.N. Starch. In WHISTLER, R.L.; BeMILLER, J.N. ZEEMAN, S. C., DELATTE, T., MESSERLI, G., UMHANG, M., STETTLER, M., METTLER, T., STREB, S., REINHOLD, H., KÖTTING, O. Review: Starch breakdown: recent discoveries suggest distinct pathways and novel mechanisms, **Functional Plant Biology**, v. 34, 465–473, 2007.

ZEEMAN, S.C., KOSSMANN, J., SMITH, A.M. Starch: It Metabolism, Evolution, and Biotechnological Modification in Plants. **Annu. Rev. Plant. Biol.**, v.61, 209-234, 2010.

ZHANG, D., WANG, Y.  $\beta$ -amylase in developing apple fruits: activities, amounts and subcellular localization. **Science in China**, v.45, no.4, 429-440, 2002.

ZIEGLER, P. Mini Review - Cereal beta-amylases. **Journal of Cereal Science**, v.29, 195-204, 1999.

## ANEXO 1



**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
Secretaria de Pós-Graduação

### **Informações para os Membros de Bancas Julgadoras de Mestrado/Doutorado**

1. O candidato fará uma apresentação oral do seu trabalho, com duração máxima de trinta minutos.

2. Os membros da banca farão a arguição oral. Cada examinador disporá, no máximo, de trinta minutos para arguir o candidato, exclusivamente sobre o tema do trabalho apresentado, e o candidato disporá de trinta minutos para sua resposta.

2.1 Com a devida anuência das partes (examinador e candidato), é facultada a arguição na forma de diálogo em até sessenta minutos por examinador.

3. A sessão de defesa será aberta ao público.

4. Terminada a arguição por todos os membros da banca, a mesma se reunirá reservadamente e expressará na ata (relatório de defesa) a aprovação ou reprovação do candidato, baseando-se no trabalho escrito e na arguição.

4.1 Caso algum membro da banca reprove o candidato, a Comissão Julgadora deverá emitir um parecer a ser escrito em campo exclusivamente indicado na ata.

4.2 Será considerado aprovado o aluno que obtiver aprovação por unanimidade ou pela maioria da banca.

5. Dúvidas poderão ser esclarecidas junto à Secretaria de Pós-Graduação: [pgfarma@usp.br](mailto:pgfarma@usp.br), (11) 3091 3621.

São Paulo, 23 de maio de 2014.

Prof. Dr. Adalberto Pessoa Junior  
Presidente da CPG/FCF/USP

## ANEXO 2

**Janus** - Sistema Administrativo da Pós-Graduação



**Universidade de São Paulo**  
**Faculdade de Ciências Farmacêuticas**  
**Documento sem validade oficial**  
**FICHA DO ALUNO**

---

**9131 - 7712084/1 - Renata Shitakubo**

**Email:** shitakubo@usp.br  
**Data de Nascimento:** 17/08/1986  
**Cédula de Identidade:** RG - 34.538.851-3 - SP  
**Local de Nascimento:** Estado de São Paulo  
**Nacionalidade:** Brasileira  
**Graduação:** Bacharel em Química - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras "Oswaldo Cruz" - São Paulo - Brasil - 2011

---

**Curso:** Doutorado Direto  
**Programa:** Ciência dos Alimentos  
**Área:** Bromatologia  
**Data de Matrícula:** 06/05/2011  
**Início da Contagem de Prazo:** 06/05/2011  
**Data Limite para o Depósito:** 03/09/2015  
**Orientador:** Prof(a). Dr(a). Beatriz Rosana Cordenunsi - 06/05/2011 até o presente.  
Email: hojak@usp.br  
**Co-orientador:** Prof(a). Dr(a). João Roberto Oliveira do Nascimento - 22/06/2011 até o presente.  
Email: jronasci@usp.br  
**Proficiência em Línguas:** Inglês, Aprovado em 06/05/2011  
**Prorrogação(ões):** 120 dias  
Período de 06/05/2015 até 03/09/2015  
**Data de Aprovação no Exame de Qualificação:** Aprovado em 02/07/2013  
**Data do Depósito do Trabalho:**  
**Título do Trabalho:**  
**Data Máxima para Aprovação da Banca:**  
**Data de Aprovação da Banca:**  
**Data Máxima para Defesa:**  
**Data da Defesa:**  
**Resultado da Defesa:**  
**Histórico de Ocorrências:** Primeira Matrícula em 06/05/2011  
Prorrogação em 30/03/2015

---

Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 5473 em vigor de 18/09/2008 até 19/04/2013).

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 13/07/2015

Impresso em: 31/08/2015 18:38:49



**Universidade de São Paulo**  
**Faculdade de Ciências Farmacêuticas**  
**Documento sem validade oficial**  
**FICHA DO ALUNO**

9131 - 7712084/1 - Renata Shitakubo

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
BTC5743-2/6	Seminários Gerais (Curso Interinstituições: Biotecnologia - Universidade de São Paulo)	10/08/2011	22/11/2011	30	2	100	A	N	Concluída
FBA5741-3/1	Química e Bioquímica de Alimentos I	18/08/2011	21/09/2011	60	4	100	B	N	Concluída
EDM5791-5/7	Metodologia do Ensino Superior (Faculdade de Educação - Universidade de São Paulo)	23/08/2011	14/11/2011	120	8	100	A	N	Concluída
FBA5742-2/1	Química e Bioquímica de Alimentos II	06/10/2011	09/11/2011	60	4	100	B	N	Concluída
FBA5842-3/1	Fisiologia, Bioquímica e Bioquímica Molecular Pós-Coleta I	13/09/2012	17/10/2012	45	3	100	A	N	Concluída
FBA5843-2/1	Fisiologia, Bioquímica e Bioquímica Molecular Pós-Coleta II	18/10/2012	23/11/2012	45	3	100	A	N	Concluída
FBA5895-6/2	Tópicos em Ciência dos Alimentos e Nutrição II	25/02/2013	05/05/2013	30	2	100	A	N	Concluída
Atividade do Programa	Participou da Etapa de Estágio Supervisionado em Docência do Programa de Aperfeiçoamento de Ensino junto à Disciplina FBAD405 Análise de Alimentos, ministrada aos alunos de graduação do curso de Farmácia e Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (1)	01/08/2013	10/12/2013	-	3	-	-	-	-

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito de tese	
Disciplinas:	0	25	29
Estágios:			
<b>Total:</b>	<b>0</b>	<b>25</b>	<b>29</b>

Créditos Atribuídos à Tese: 167

**Observações:**

1) Créditos atribuídos de acordo com o disposto na Portaria GR-3588 e GR-4381 - PAE, de 31.08.09 e aprovados pela Comissão Coordenadora de Programa, em Sessão de 23/01/2014.

**Conceito a partir de 02/01/1997:**

A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.

Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 13/07/2015

Impresso em: 31/08/2015 18:38:49