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

Análise proteômica do amadurecimento da banana
empregando eletroforese bidimensional acoplada à
espectrometria de massas

Tatiana Torres Toledo

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Prof. Dr. João Roberto Oliveira do
Nascimento

São Paulo
2010

TATIANA TORRES TOLEDO

Análise proteômica do amadurecimento da banana
empregando eletroforese bidimensional acoplada à
espectrometria de massas

Dissertação apresentada ao
Departamento de Alimentos da
Faculdade de Ciências
Farmacêuticas da Universidade
de São Paulo para obtenção do
título de Mestre em Ciências
dos Alimentos

Área de concentração:
Bromatologia

Orientador: Prof. Dr.
João Roberto Oliveira do
Nascimento

São Paulo
2010

Tatiana Torres Toledo

Análise proteômica do amadurecimento da banana empregando
eletroforese bidimensional acoplada à espectrometria de massas

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Prof. Dr. João Roberto Oliveira do Nascimento
orientador/presidente

1º. examinador

2º. examinador

São Paulo, _____ de _____.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, ao professor João pela confiança, oportunidade, orientação, incentivo, conselhos, compreensão e paciência.

Ao professor Eduardo pela atenção, apoio, prestatibilidade, incentivo, conselhos e boas e longas conversas.

À professora Beatriz pelo apoio, prestatibilidade, atenção, incentivo e conselhos.

Aos colegas de trabalho Talita, Fernanda, Tânia, Claudinéia, João Paulo, Florence, Lorenzo, Helena, Jonathan, Mariana, Sabrina, Roberta, Renato e Marcelo, pela companhia, boas conversas e apoio. Agradecimento especial à Claudinéia pelo suporte na determinação do teor de amido, e ao Marcelo pela paciência na minha iniciação na proteômica.

À Silvia pela companhia durante todo o mestrado, amizade, paciência, apoio e suporte.

Ao CNPq pela bolsa concedida, e à FAPESP pelo suporte financeiro no projeto (2008/52447-0).

DEDICATÓRIA

Aos meus pais pela incansável dedicação, amor, paciência e apoio.

À minha família, em especial à vó Maria pela dedicação, zelo e amor, e ao vô Pedro (*in memoriam*), por ter feito meus dias mais felizes, pacíficos e tranquilos.

Ao meu namorado Denis pelo incentivo e apoio.

“A mente que se abre a uma nova idéia
jamais voltará ao seu tamanho original.”

Albert Einstein

RESUMO

TOLEDO, T.T. **Análise proteômica do amadurecimento da banana empregando eletroforese bidimensional acoplada à espectrometria de massas.** 2010. 108 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

A banana tem grande importância econômica, é a fruta mais produzida no mundo, e o Brasil é o segundo maior produtor. É uma fruta altamente perecível, de rápida maturação, sensível a choques mecânicos, suscetível a descoloração, ao amolecimento excessivo e a patógenos na fase pós-colheita. As mudanças ocorridas durante o amadurecimento levam a uma vida de prateleira muito reduzida e são dependentes da expressão de diversas proteínas. Portanto, a identificação de proteínas associadas com essas modificações pode contribuir para a melhor compreensão da regulação do amadurecimento e auxiliar no aprimoramento das estratégias de conservação pós-colheita e melhoria da qualidade dessa fruta. Através da análise proteômica diferencial podem ser identificadas proteínas com variação de abundância durante o amadurecimento e que estejam envolvidas nesse processo. O presente trabalho teve por objetivo comparar os mapas protéicos de polpa de banana (*Musa acuminata* cv. nanicão) nas fases pré-climatérica e climatérica, e a identificar spots de proteínas que diferem em abundância nesses dois estádios, através da eletroforese bidimensional acoplada à espectrometria de massas. Neste trabalho foram utilizadas três amostragens distintas de frutas, de modo a minimizar o efeito da variabilidade biológica, não relacionada com o amadurecimento. Para a obtenção dos perfis protéicos foi utilizada a metodologia 2D-DIGE. Os géis obtidos foram analisados com o software PDQuest e para a análise estatística foi utilizado o teste T. Chegou-se a uma lista de 50 spots que foram recortados dos géis, sendo as proteínas digeridas e seqüenciadas por espectrometria de massas. Destas proteínas, 26 tiveram a provável identidade apontada pela comparação com o banco de dados MSDB, empregando o software Mascot. A maioria das proteínas identificadas apresenta provável função durante o amadurecimento da banana e podem estar relacionadas com processos bioquímicos relacionados com a qualidade da fruta.

Palavras-chave: Banana. Amadurecimento. Proteômica.

ABSTRACT

TOLEDO, T.T. **Proteomic analysis of banana ripening using two-dimensional electrophoresis coupled to mass spectrometry.** 2010. 108 f. M.Sc. Dissertation – Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

Banana has great economic importance, is the most widely produced fruit in the world, and Brazil is the second largest producer. It is a highly perishable fruit, ripening fast, sensitive to mechanical shock, susceptible to discoloration, excessive softening and pathogens in the post-harvest. The changes during ripening leads to a very limited shelf life and are dependent on the expression of several proteins. Therefore, the identification of proteins associated with these modifications may contribute to better understanding the regulation of maturation and help to improve strategies for post-harvest preservation and improvement of this fruit. Through differential proteomics analysis could be identified proteins with a range of abundance during ripening and that could be involved in this process. This study aimed to compare the protein maps of banana pulp (*Musa acuminata* cv. nanicão) in pre-climacteric and climacteric phases, and identify protein spots that differ in abundance in these two stages by two-dimensional electrophoresis coupled to mass spectrometry. In this study we used three different fruits samples, to minimize the effect of biological variability, non-ripening related. To obtain the protein profiles was used 2D-DIGE methodology. The gels were analyzed with the PDQuest software and Student's t-Test was used to statistical analysis. A list of 50 spots differential accumulated were detected and then were extracted of gels, protein digested and sequenced by mass spectrometry. Of these proteins, 26 had the probable identity indicated by comparison with the MSDB database, using Mascot software. Most of the identified proteins has probable function during banana ripening and may be related to biochemical processes related to fruit quality.

Keywords: Banana. Ripening. Proteomics.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	11
1.1.	A banana.....	11
1.2.	Amadurecimento dos frutos	11
1.3.	Características do amadurecimento da banana.....	13
1.4.	Controle genético do amadurecimento.....	14
1.5.	Genômica funcional.....	15
1.6.	Proteômica	16
2.	OBJETIVO.....	19
3.	MATERIAL E MÉTODOS	20
3.1.	Frutas	20
3.2.	Extração de proteínas	21
3.3.	Determinação da concentração protéica.....	21
3.4.	Eletroforese bidimensional	22
3.4.1.	<i>Focalização isoeletrica (primeira dimensão)</i>	22
3.4.2.	<i>SDS-PAGE (segunda dimensão)</i>	22
3.5.	Coloração dos géis para proteínas.....	23
3.6.	Marcação das proteínas por fluorescência diferencial (fluors CyDye DIGE)	24
3.6.1.	<i>Retirada dos interferentes das amostras protéicas</i>	24
3.6.2.	<i>Marcação protéica</i>	24
3.7.	Análise das imagens dos géis	25
3.8.	Digestão das proteínas	26
3.9.	Identificação das proteínas	27
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
4.1.	Amostragens	29
4.1.1.	<i>Amostras escolhidas para a realização das análises preliminares</i>	31
4.1.2.	<i>Amostras escolhidas para a realização das análises</i>	32
4.2.	Otimização e padronização das condições para obtenção dos extratos protéicos.....	33
4.3.	Obtenção dos perfis de proteínas de bananas em 2D-PAGE	38
4.4.	Análise preliminar da expressão de proteínas	48

4.4.1. Edição das imagens	51
4.4.2. Detecção e edição dos spots	51
4.4.3. Análise diferencial dos spots	53
4.5. Análise da expressão de proteínas por DIGE	60
4.5.1. Edição das imagens	61
4.5.2. Detecção e edição dos spots	61
4.5.3. Perfil protéico obtido com a tecnologia DIGE	62
4.5.4. Análise diferencial dos spots	66
4.6. Proteínas identificadas	75
4.6.1. Quitinases	77
4.6.2. Pectato liase	80
4.6.3. Amido fosforilase	82
4.6.4. ADP-glicose pirofosforilase (subunidade pequena)	84
4.6.5. ACC oxidase	86
4.6.6. Proteína de choque térmico	87
4.6.7. Malato desidrogenase	88
4.6.8. Isoflavona redutase	89
4.6.9. S-adenosil-L-homocisteína hidrolase (adenosilhomocisteinase)	91
5. CONCLUSÃO	93
REFERÊNCIAS	94

1. INTRODUÇÃO

1.1. A banana

A banana tem grande importância econômica, é a fruta mais produzida no mundo, e o Brasil é o segundo maior produtor, perdendo apenas para a Índia, que apresenta produção 2,5 vezes maior (MENDES; BIERHALS, 2008). A comercialização brasileira é basicamente local, pois a banana é uma fruta altamente perecível, de rápida maturação, sensível a choques mecânicos, suscetível a descoloração, ao amolecimento excessivo e a patógenos pós-colheita (CHAUHAN et al. 2006; MENDES; BIERHALS, 2008). Devido a essas características da fruta, a sua exportação é feita para países vizinhos. No Brasil, a banana é a segunda fruta mais produzida, sendo a média de consumo brasileiro de 25 kg por habitantes por ano. No Centro de Entrepósitos e Armazéns Gerais de São Paulo (Ceagesp), são vendidas 85 mil toneladas de banana por ano, sendo 75% desse valor correspondente a venda de banana Nanica (MENDES; BIERHALS, 2008). Nos países em desenvolvimento o consumo de bananas é de 21 kg por pessoa por ano, sendo a maior fonte a produção doméstica ou de mercados locais (ARIAS et al. 2003).

As bananas são componentes importantes para a nutrição humana, já que são boas fontes de fibras, vitaminas, carboidratos e minerais (DER AGOPIAN et al. 2009), e, sendo frutas, possuem ácidos orgânicos, lipídios, antioxidantes e fatores de crescimento essenciais para a manutenção de uma vida saudável (WHITE 2002; PRASANNA; PRABHA; THARANATHAN, 2007; MARTÍNÉS-ROMERO et al. 2007). Além disso, as bananas são fonte de frutooligosacarídeos, prebióticos importantes para a saúde intestinal (DER AGOPIAN et al. 2008).

1.2. Amadurecimento dos frutos

De acordo com as características do processo do amadurecimento, em relação à respiração e biossíntese de etileno, as frutas são classificadas em dois grupos, climatéricas e não-climatéricas. As frutas climatéricas apresentam respiração e biossíntese de etileno elevados durante o amadurecimento,

apresentando um pico respiratório característico. Esse pico é denominado climatério respiratório, e dependendo da fruta corresponde ao seu ponto ótimo para consumo, como já foi observado para a manga, banana e abacate. Segundo Tucker (1993), o pico climatérico respiratório varia bastante entre as diferentes frutas climatéricas, e é interessante notar que quanto maior o pico respiratório, menor o tempo de prateleira da fruta, como é o caso da banana. Também são exemplos desse grupo o tomate e a maçã. Já as frutas não-climatéricas, apresentam declínio da respiração e produção de etileno durante o amadurecimento, não apresentando síntese auto-catalítica de etileno durante o amadurecimento. São exemplos desse grupo o morango, a uva, a cereja, o limão e a laranja (TUCKER 1993; PAYASI; SANWAL, 2005).

O amadurecimento dos frutos é um processo geneticamente programado, coordenado e irreversível (PRASANNA; PRABHA; THARANATHAN, 2007). Todo o processo leva a um fruto com características atrativas para os animais frutívoros, já que a função do amadurecimento é dispersar as sementes do fruto. Durante esse processo, ocorrem mudanças no sabor, textura, aroma e cor (WHITE 2002), que são responsáveis pela qualidade final do fruto, e são originadas por fenômenos bioquímicos e fisiológicos (PRASANNA; PRABHA; THARANATHAN, 2007). Esses fenômenos são a conversão de amido em açúcares, as modificações na parede celular, as alterações na biossíntese de pigmentos e o acúmulo de voláteis de sabor e aroma (GIOVANNONI, 2001). Ocorre também aumento da susceptibilidade a patógenos pós-colheita (GIOVANNONI, 2001), o que contribui para facilitar a dispersão das sementes.

As mudanças ocorridas durante o amadurecimento levam a uma vida de prateleira reduzida pelo resultado de queda na firmeza do fruto e queda na resistência às infecções microbianas do fruto maduro (GIOVANNONI, 2001), e nos frutos climatéricos essas mudanças ocorrem com muita rapidez (TUCKER, 1993). Para que os desperdícios sejam evitados, é necessário evitar a perda de frutos no período entre a colheita e o momento do consumo (PRASANNA; PRABHA; THARANATHAN, 2007), sendo necessária a utilização de técnicas de manejo pós-colheita, nas etapas de colheita, transporte e armazenagem. A diminuição do desperdício das frutas pode contribuir para diminuir o seu preço no mercado, além de ser mais econômico do que o plantio de mais bananeiras (AWAD, 1993).

Como exemplo das tecnologias pós-colheita pode ser citado a utilização de atmosferas controladas para maçãs e as embalagens para melões com divisórias de

papel ondulado (CHITARRA, 2008). As bananas são colhidas verdes e expostas ao etileno para a indução do amadurecimento (climatização), e para a exportação são transportadas em navios sob temperatura controlada (12-14°C) (SEYMOUR, 1993). Também tem sido utilizada a tecnologia de embalagens com atmosferas modificadas, como por exemplo, as embalagens a vácuo (CHAUHAN et al., 2006). Também são utilizadas sprays químicos, irradiação gama e estocagem a baixas temperaturas (BAPAT et al., 2010). Mesmo com o uso da tecnologia pós-colheita, o desperdício da banana gira em torno de 50-60% (SANCHES et al., 2004).

Para o desenvolvimento da tecnologia pós-colheita, foram necessários estudos para o entendimento do processo do amadurecimento, e ainda é necessário muito estudo para responder as muitas questões em aberto, objetivando um produto final de melhor qualidade. Segundo Giovannoni 2001, a principal questão é: “Como vias independentes são coordenadas para agir eficientemente e em sincronia durante o amadurecimento?”.

1.3. Características do amadurecimento da banana

Durante o amadurecimento da banana ocorrem mudanças bioquímicas que vão resultar em uma fruta com cor, aroma, textura e sabor característicos (PAYASI; SANWAL, 2005). O etileno apresenta uma participação principal durante o amadurecimento da banana, e o pico na sua produção sinaliza o início do climatério (CLENDENNEN; MAY, 1997).

A banana é um fruto climatérico e, portanto, apresenta um nível baixo e constante de produção de etileno no período pré-climatérico (em torno de $0,05 \mu\text{L.kg}^{-1}.\text{h}^{-1}$), até o início do amadurecimento, quando a produção de etileno aumenta e atinge um “pico”, declinando depois. Normalmente enquanto o pico da produção de etileno é atingido, a taxa de respiração também aumenta, atingindo também um pico (SEYMOUR 1993; PRASANNA et al. 2007).

Durante o climatério respiratório ocorre uma intensa conversão de amido em açúcares solúveis. No estágio pré-climatérico o amido corresponde a aproximadamente $200\text{-}250 \text{ mg.g}^{-1}$ do peso da polpa da banana, sendo rapidamente degradado e utilizado para a síntese dos açúcares solúveis, chegando a menos de 10 mg.g^{-1} durante o climatério (ÁREAS; LAJOLO, 1981 *apud* CORDENUNSI et al., 1995). Durante esse processo ocorre diminuição na atividade de enzimas que

participam da síntese do amido, aumento na atividade das enzimas envolvidas na sua degradação, e aumento na atividade das enzimas envolvidas na síntese de açúcares solúveis. Na degradação do amido ocorre a participação das enzimas amilases (α - e β -amilases), fosforilases e isoamilases (PERONI-OKITA et al., 2010). A enzima sacarose sintase (SS) está envolvida na síntese de amido, e sua atividade diminui durante o amadurecimento. A enzima sacarose fosfato sintase (SPS) está envolvida na síntese de sacarose e sua atividade aumenta durante o amadurecimento (CORDENUNSI; LAJOLO, 1995).

Durante o amadurecimento da banana ocorre deslocamento de água da casca para a polpa da fruta (PAYASI; SANWAL, 2005), e a casca passa da cor verde para a cor amarela, em consequência da degradação da clorofila pela clorofilase (CLENDENNEN; MAY, 1997). O amolecimento da fruta está relacionado à solubilização da parede celular, tendo a participação das enzimas poligalacturonase, pectato liase e pectina metilesterase (PAYASI; SANWAL, 2005). Ocorre a síntese do principal aroma característico da fruta, o acetato de isoamila, catalisada pela enzima álcool acetiltransferase, e também ocorre a síntese de muitos outros compostos voláteis. As enzimas polifenol oxidase e peroxidases catalisam o declínio dos polifenóis, que são os responsáveis pela adstringência do fruto pré-climatérico (CLENDENNEN; MAY, 1997; PAYASI; SANWAL, 2005). O ácido málico é o principal ácido orgânico da banana, e aumenta durante o amadurecimento (PAYASI; SANWAL, 2005).

1.4. Controle genético do amadurecimento

Como já dito anteriormente, o amadurecimento dos frutos é o processo que leva a um fruto comestível, com características atrativas para o consumo, e é resultado de mudanças bioquímicas e fisiológicas, controladas geneticamente. As bases moleculares que controlam o amadurecimento permanecem pouco conhecidas (GIOVANNONI, 2001). Através de análises do amadurecimento de frutas mutantes e expressão de genes relacionados ao amadurecimento, chegou-se ao conhecimento de uma cascata regulatória, porém ainda necessita ser desvendada (GIOVANNONI, 2004). O tomate tem sido utilizado como modelo para estudos sobre o controle genético do amadurecimento.

O etileno é o responsável pela indução do início do amadurecimento, e tem sido conhecido como o hormônio do amadurecimento (TUCKER, 1993; PRASANNA; PRABHA; THARANATHAN, 2007). Após o início do amadurecimento, começam uma série de mudanças na fruta que a levarão a ter características atrativas para o consumo pelos animais, como sabor adocicado, textura adequada, aroma e cores chamativas. Essas transformações, comandadas por um controle genético-enzimático, são resultantes de uma série de reações bioquímicas de síntese e degradação, que necessitam de energia química fornecida pela respiração (AWAD 1993).

Nas frutas climatéricas, o etileno é produzido de forma auto-catalítica. A biossíntese do etileno se dá através de uma via bioquímica, que tem a participação de duas enzimas chaves do processo, a ACC sintase e a ACC oxidase. A ACC sintase faz a conversão da S-adenosilmetionina (SAM) em ácido carboxílico 1-aminociclopropano (ACC), que então é oxidada a etileno pela ACC oxidase (TUCKER, 1993; PRASANNA; PRABHA; THARANATHAN, 2007). A biossíntese do etileno pode ser induzida por etileno exógeno (TUCKER, 1993).

1.5. Genômica funcional

O primeiro passo da era genômica foi dado há duas décadas com o início do sequenciamento do genoma humano, que foi completado em 2001. Posteriormente, o objetivo foi deslocado para o conhecimento da função dos genes que essas seqüências representariam, através da transcriptômica, e então no produto desses genes através da proteômica (KANDPAL; SAVIOLA; FELTON, 2009). Enfim, vêm sido estudados os metabólitos, produtos das vias bioquímicas do metabolismo, através da metabolômica (FUKUSHIMA et al. 2009). Dessa maneira se dá a genômica funcional, conhecida também como a era das “ômicas”.

A primeira planta a ter o genoma completo seqüenciado foi a *Arabidopsis thaliana* em 2000 (*The Arabidopsis Initiative 2000*), e então o objetivo passou a ser a determinação da função de cada gene, que ao todo são 25.000. Em 2005 foi completado o sequenciamento do arroz japonesa (*International Rice Genome Sequencing Project*). Atualmente foram seqüenciados os genomas completos de várias outras espécies de plantas. A *Arabidopsis thaliana* vêm sendo utilizada como planta-modelo para estudos de diversos aspectos, incluindo o desenvolvimento do

fruto. Com a união dos dados obtidos da genômica funcional das várias espécies de plantas já estudadas, podem ser comparados, chegando às suas semelhanças e diferenças fisiológicas, levando a um entendimento complexo dos sistemas biológicos (LONG; BRADY; BENFEY, 2008).

Através da integração dos dados gerados pelos estudos das “ômicas”, pode-se chegar ao entendimento da regulação da rede genética dos sistemas biológicos, e como o sistema genético responde a alterações e estímulos ambientais (LONG; BRADY; BENFEY, 2008). Na área da agricultura, esses conhecimentos podem ser usados, por exemplo, para a produção de plantas resistentes a doenças ou características ambientais, com maior valor nutricional ou com características mais atrativas para o consumo humano.

No campo do amadurecimento dos frutos frescos, as bases moleculares têm sido bastante estudadas nos últimos anos e isso têm propiciado um melhor entendimento da bioquímica do processo. Atualmente, muitos grupos estão desenvolvendo pesquisas com as técnicas genômica, transcriptômica, proteômica e metabolômica, chegando a uma visão geral sobre as vias metabólicas, pois os resultados se complementam. Esses estudos podem levar a elucidação de pontos-chaves do processo do amadurecimento, levando ao aprimoramento do manejo pós-colheita, através da tecnologia ou do uso do melhoramento genético e da biotecnologia, trazendo melhoria da qualidade final dos frutos e aumento da vida de prateleira.

Um exemplo de pesquisa realizada através da união dessas técnicas moleculares é o estudo de Alós e colaboradores (2008), onde foram utilizadas a transcriptômica, proteômica e metabolômica, para a investigação de citros mutantes *nan* (*navel negra*), que apresentam flavedo com coloração marrom anormal durante o amadurecimento, e chegou-se à conclusão que esses mutantes são classificados como mutantes tipo C “stay-green”, e que a causa para essa característica é que apresentam lesão em uma via regulatória, levando ao stress oxidativo antecipado ao processo normal de degradação da clorofila.

1.6. Proteômica

De acordo com Wilkins et al. 1995, proteoma é o complemento expresso de um genoma, ou seja, são todas as proteínas codificadas por um genoma. As funções

celulares são controladas diretamente pelas proteínas (ARTHUR, 2003). A expressão gênica em nível transcricional traz informações importantes, porém a abundância de mRNA nem sempre é correlacionada com a abundância das proteínas expressas, isso porque a quantidade de proteínas expressas depende de vários fatores como transcrição, tradução e modificações pós-tradução (CHEN; HARMON, 2006).

A separação das proteínas por eletroforese bidimensional (2D-PAGE) em conjunto com o sequenciamento dos peptídeos através da espectrometria de massas é o método proteômico mais utilizado atualmente (CARPENTIER et al., 2005). Na eletroforese bidimensional as proteínas são separadas em duas dimensões, na primeira, são separadas pelo ponto isoelétrico (pI), e na segunda, por peso molecular. A técnica permite a quantificação das proteínas, e com a introdução dos ingredientes imobilizados de pH, a técnica ganhou maior resolução e reprodutividade (CHEN; HARMON, 2006).

São muitas as aplicações dos estudos proteômicos em todas as áreas das ciências da vida. Na biomedicina pode ser utilizada, por exemplo, para a identificação de proteínas que possam ser alvos de drogas para tratamento de doenças ou marcadores de determinada doença (JACOBS; HEIJDEN; VERPOORTE, 2000). Na área dos alimentos a proteômica pode ser aplicada para estudos de rastreabilidade, controle de qualidade, estudos de equivalência de alimentos transgênicos, e identificação e caracterização de alérgenos (JORRÍN-NOVO et al., 2007).

Ultimamente, têm sido publicados alguns estudos sobre aspectos da proteômica diferencial durante o amadurecimento. Entre esses trabalhos podem ser citados os estudos dos frutos: tomate (FAUROBERT et al., 2007; ROCCO et al., 2006), morango (BIANCO et al., 2009), uva (LÜCKER et al., 2009; NEGRI et al., 2008; ZHANG et al., 2008; GIRIBALDI et al., 2007) e pêssego (BORSANI et al., 2009).

Para a banana foram publicados alguns estudos com o uso da proteômica. Saravan e Rose (2004) avaliaram três diferentes métodos de extração de proteínas aplicadas a tecidos de tomate, banana, laranja, e abacate, que são considerados recalcitrantes, tendo muitos interferentes para a realização da eletroforese bidimensional. Também Carpentier et al. (2005) avaliou diferentes métodos de extração de proteínas para tecidos das espécies recalcitrantes banana, maçã e

batata. Samyn et al. (2006) realizou o estudo de proteoma funcional de meristema de duas variedades de bananeira, e em 2007, Carpentier e colaboradores utilizaram o proteoma de meristema de bananeira para o estudo da aclimação ao stress osmótico.

Na área do amadurecimento, Dominguez-Puigjaner, Vendrell e Ludevid (1992), analisaram as polpas de banana em quatro fases diferentes do amadurecimento com a utilização da eletroforese bidimensional, no entanto, foram resolvidas poucas proteínas nos géis, e destas puderam ser identificadas apenas cinco proteínas de mesmo peso molecular, identificadas por imunnoblotting como poligalacturonases. Hoje, com o avanço na tecnologia da eletroforese bidimensional e com o uso do sequenciamento das proteínas por espectrometria de massas, será possível a resolução e identificação de um número maior de proteínas.

O conhecimento do processo do amadurecimento leva ao desenvolvimento de novas tecnologias para controle do amadurecimento, tanto para aumento da vida de prateleira, quanto para melhor qualidade do fruto, como por exemplo, valor nutricional, adoçamento e aromas. Através da proteômica será possível a identificação de proteínas envolvidas no processo do amadurecimento, podendo ser futuros alvos de manipulação.

2. OBJETIVO

O presente trabalho tem como objetivo a comparação de mapas protéicos de polpa de banana nanica (*Musa acuminata* cv. nanicão) nas fases pré-climatérica e climatérica, e a identificação de proteínas diferentemente expressas, através da eletroforese bidimensional acoplada à espectrometria de massas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Frutas

Foram utilizadas duas amostragens de frutos de bananeira (*Musa acuminata* cv. Nanicão) previamente caracterizadas em nosso laboratório, além de uma terceira amostragem caracterizada neste trabalho:

Amostragem 1: realizada em abril de 2005.

Amostragem 2: realizada em dezembro de 2005.

Amostragem 3: realizada em junho de 2009.

Para as três amostragens, as frutas foram obtidas na CEAGESP/São Paulo, no dia da colheita, e não receberam tratamento para indução do amadurecimento. Ao chegar ao laboratório as bananas foram acondicionadas em câmaras com temperatura entre 18 e 20°C, onde foram mantidas durante todo o amadurecimento. Essas frutas tiveram o amadurecimento monitorado através de medidas diárias do CO₂ produzido pela respiração e da produção de etileno, com intervalo de 24 horas, através da cromatografia gasosa, de acordo com Nascimento et al. (2006). Diariamente, 5 frutas foram coletadas, sendo descascadas, picadas, congeladas em N₂ líquido e armazenadas a -80°C.

A determinação do teor de amido foi feita enzimaticamente de acordo com Bergmeyer (1974), como descrito por Arêas e Lajolo (1981). Os açúcares solúveis totais foram determinados por cromatografia líquida (HPLC), como descrito em Fabi et al. 2007.

Com base nos resultados obtidos nas medidas de respiração e etileno, e na determinação de amido e açúcares solúveis, foram definidos os dois grupos de frutas a serem utilizados nas análises dos perfis de proteínas:

- Pré-climatéricas, doravante denominadas 'verdes', apresentando baixa produção de etileno e respiração, alto teor de amido e baixo teor de açúcares solúveis.
- Climatéricas, doravante denominadas maduras, apresentando alta produção de etileno e respiração, baixo teor de amido e alto teor de açúcares solúveis.

3.2. Extração de proteínas

Para a extração de proteínas totais da polpa das frutas foi empregada a metodologia de extração com fenol e precipitação com acetato de amônio em metanol, baseada no protocolo de Carpentier et al, 2005. As amostras foram trituradas na presença de nitrogênio líquido, e 1,0 g do tecido pulverizado foram ressuspensos em 5 mL de tampão de extração gelado (Tris-HCl 50 mM pH 8.5, EDTA 5 mM, KCl 100 mM, DTT 1%, sacarose 30%, coquetel inibidor de protease para células vegetais e extratos de tecido da SIGMA-ALDRICH – 1 ml para cada 30g de tecido), e agitados por 30 s. Aos extratos foram adicionados 5 mL de fenol tamponado com Tris-HCl (pH 8.0) gelado e as amostras foram agitadas por 15 minutos a 4°C. Após centrifugação a 6.000 g por 10 min a 4°C, as fases fenólicas foram coletadas, re-extraídas com 5 mL de tampão de extração gelado e agitadas por 15 minutos a 4°C. Após nova centrifugação, as fases fenólicas foram coletadas e então as proteínas foram precipitadas por adição de 5 volumes de metanol contendo acetato de amônio 100 mM e incubação a -20°C por 16 horas. Após centrifugação a 16.000 g por 30 min a 4°C, os sobrenadantes foram removidos e os precipitados foram lavados com acetona gelada adicionada de DTT 0,2%. Deixou-se secar os precipitados ao ar, que então foram ressuspensos por 1 h a temperatura ambiente em 1 mL de tampão de lise (uréia 7 M, tiouréia 2 M, CHAPS 4% e DTT 1%).

3.3 Determinação da concentração protéica

A concentração das proteínas foi determinada com o uso do 2-D Quant kit da GE Healthcare. O princípio do kit é a ligação específica de íons cobre às proteínas, e o cobre não ligado às proteínas é medido com um agente colorimétrico. A intensidade da cor é inversamente proporcional à concentração das proteínas.

As leituras da absorbância foram obtidas por leitura em espectrofotômetro a 480 nm. As leituras foram feitas em duplicatas, e a estimativa da concentração das proteínas foi feita por comparação com curva padrão de albumina de soro bovino (BSA), proteína padrão do kit.

3.4. Eletroforese bidimensional

Os extratos protéicos foram submetidos à eletroforese bidimensional (2D-PAGE), combinando a separação baseada no ponto isoelétrico (pI) por focalização isoelétrica (IEF) na primeira dimensão, com a separação por peso molecular em SDS-PAGE na segunda dimensão.

3.4.1. *Focalização isoelétrica (primeira dimensão)*

As fitas de gradiente de pH imobilizado de 7 cm foram rehidratadas com um máximo de 124 µl de extrato contendo 100 µg de proteínas, e para as fitas de 24 cm, e um máximo de 450 µl de extrato contendo 500 µg de proteínas. As proteínas foram solubilizadas em solução de rehidratação (uréia 7M, toureia 2M, DTT 1%, CHAPS 4 %, contendo 0,5% de mistura de carregadores anfóliticos (do intervalo de pH a ser utilizado e traços de azul de bromofenol). O volume total de solução aplicada para as fitas de 7 cm foi de 125 µl, e para as de 24 cm, 450 µl. A rehidratação foi feita passivamente, por no mínimo 10 horas e no máximo 20 horas, com o uso de óleo mineral para cobertura das tiras, de modo a evitar a evaporação da solução e formação de cristais de uréia.

A focalização das amostras foi realizada em sistema Ettan IPGphor II (GE Healthcare), a temperatura de 20°C e corrente total de 50 µA por fita de gradiente de pH imobilizado de 7 cm, ou de 2 mA para as fitas de 24 cm. Para as fitas de 7 cm, foi utilizada a seguinte programação: 300 V por 4:00 h , 1000 V por 0:30 h , 5000 V por 1:30 h e 5000 V por 0:36 h a. Para as fitas de 24 cm, a programação utilizada foi: 500 V por 0:01 h a, 3500 V por 1:30 h a e 3500 V por 16:20 a.

Após a focalização isoelétrica as fitas foram estocadas a -80°C, até o momento da separação na segunda dimensão.

3.4.2. *SDS-PAGE (segunda dimensão)*

As fitas contendo as proteínas separadas por pI passaram por duas etapas de acondicionamento em solução de equilíbrio (Tris-HCl 75 mM pH 8.8, uréia 6M, glicerol 29,3%, SDS 2% e traços de azul de bromofenol). Na primeira etapa, as fitas

foram mantidas na solução de equilíbrio adicionada de 1% de DTT por 15 minutos para a redução dos grupamentos tiólicos das proteínas. Em seguida, as fitas foram mantidas na solução de equilíbrio adicionada de 2,5% de iodoacetamida (IAA) por 15 minutos para a alquilação, e estabilização, dos grupos tiol das proteínas e destruição de DTT residual. Essas incubações foram realizadas a temperatura ambiente.

As SDS-PAGE foram realizadas em géis de poliacrilamida a 12,5%, com dimensões de 6,5 cm (Altura), 8,5cm (Largura), 1,5 mm (Espessura), para as fitas de 7 cm, e 19,5 cm (Altura), 25,5 cm (Largura) e 1,5 mm (Espessura), para as fitas de 24 cm, em tampão de corrida Tris-glicina 25 mM, pH 8,3 contendo SDS 0,1%. Para as eletroforeses as fitas foram posicionadas na parte superior dos géis e imobilizadas por adição de solução de agarose 0,5% no tampão de corrida, adicionada de traços de azul de bromofenol, previamente aquecida a 100°C. As corridas eletroforéticas foram realizadas empregando 150V e 12 mA por gel, até que a linha de azul de bromofenol chegasse à parte inferior dos géis.

3.5. Coloração dos géis para proteínas

As proteínas separadas nos géis foram visualizadas por coloração com Comassie Brilliant Blue G coloidal, de acordo com Neuhoﬀ et al. 1985, com pequenas modiﬁcações.

Os géis foram lavados brevemente com água Milli-Q para a retirada de resíduos do tampão de eletroforese, e incubados em solução corante (sulfato de amônio 10%, ácido fosfórico 2%, Comassie Brilliant Blue G coloidal 5% e etanol 19,6%) por dois dias. Após esse período, os géis foram transferidos para o tampão de neutralização (Tris-base 0,1M, pH 6,5 ajustado com ácido fosfórico) por três minutos, sendo lavados com etanol 50% por menos de um minuto. Todo o processo de coloração/descoloração foi feito mais uma vez, e então os géis foram transferidos para solução de fixação das proteínas (sulfato de amônio 20%), por no mínimo um dia.

3.6. Marcação das proteínas por fluorescência diferencial (CyDye DIGE)

3.6.1. Retirada dos interferentes da amostra protéica

Para a marcação das proteínas com as cianidinas (CyDye) visando a detecção de fluorescência é importante a remoção de contaminantes, como pequenas moléculas endógenas, que podem comprometer a eficiência da marcação. Além disso, com a purificação da amostra há melhora na resolução e aumento do número de *spots* detectados (Ettan DIGE System – User Manual – GE Healthcare).

Para purificação das amostras foi utilizado o kit Ettan 2D Clean-Up, da GE Healthcare. O princípio do kit é a combinação de precipitação e co-precipitação, para a precipitação quantitativa das proteínas. É obtido um precipitado das proteínas através de centrifugação, que então é lavado para a remoção dos contaminantes. Após uma segunda centrifugação, o precipitado é ressuspendido em tampão de amostra de desnaturação.

Após a retirada dos contaminantes, as amostras foram ressuspendidas em tampão de lise (Tris 30 mM pH 8.5, ureia 7 M, tiourea 2 M, CHAPS 4%), sendo verificado o pH da amostra protéica, pois o pH ótimo para a ocorrência da marcação é 8.5. Um pH abaixo de 8.5 levará a uma marcação ineficiente, e acima desse pH ocorrerão marcações inespecíficas. Após averificação do pH foi determinada a concentração das amostras protéicas como descrito no item 2.3. (Material e Métodos).

3.6.2. Marcação protéica

Para a marcação das proteínas foi utilizado o sistema de marcação fluorescente de marcação mínima (Amersham CyDye DIGE Fluors – minimal dyes – for Ettan DIGE, da GE Healthcare), cujo princípio é a ligação covalente entre o grupo amino epsilon de uma lisina de uma molécula protéica, e um grupo éster NHS reativo da cianidina, via ligação amida.

A marcação das proteínas foi realizada de acordo com as instruções do fabricante. Os marcadores CyDye foram reconstituídos em DMF (dimetilformamida). Foi utilizado o sistema de marcação com dois marcadores fluorescentes (Cy3 e Cy5), pois essa combinação foi demonstrada ser mais reprodutiva do que o sistema

de combinação com três marcadores (KARP; LILLEY, 05). O padrão interno foi marcado com Cy5, e cada amostra foi marcada separadamente com Cy3, sendo utilizados 400 μmol de cada marcador para 50 μg de amostra protéica. Para a composição e marcação do padrão interno (*pool*) foram misturados 50 μg de cada amostra adicionado de quantidade proporcional de Cy5. Em cada gel foi aplicado o correspondente a 50 μg do padrão interno e 50 μg de amostra. No quadro abaixo está apresentado o esquema de composição das misturas de proteínas separadas em cada um dos géis.

Gel	Cy3	Cy5
1	Extrato de proteínas de frutas pré-climatéricas da amostragem 1,	Pool
2	Extrato de proteínas de frutas pré-climatéricas da amostragem 2,	Pool
3	Extrato de proteínas de frutas pré-climatéricas da amostragem 3,	Pool
4	Extrato de proteínas de frutas climatéricas da amostragem 1,	Pool
5	Extrato de proteínas de frutas climatéricas da amostragem 2,	Pool
6	Extrato de proteínas de frutas climatéricas da amostragem 3,	Pool

Após a marcação das proteínas foi realizada a rehidratação das fitas de pH imobilizado de 24 cm e as eletroforeses bidimensionais foram realizadas conforme descrito no item 3.4 (Material e Métodos).

3.7. Análise das imagens dos géis

Os géis para proteínas quando coradas com Coomassie Brilliant Blue foram digitalizados com o uso do scanner LabScan III versão 6.0, em modo de transparência, com resolução de 300 dpi e filtro de coloração verde. As melhores imagens dos géis foram selecionadas de modo a resultarem triplicatas para cada um dos dois grupos de frutas, que então foram analisadas com o uso do software PDQuest Advanced, versão 8.0.1.

Para os géis visualizados por marcação fluorescente diferencial foi utilizado o sistema de fotodocumentação por câmera CCD Versa Doc 4000 MP (Bio-Rad). As

imagens foram adquiridas por excitação com LED verde (553 ± 3 nm) e filtro de emissão de 605 ± 50 nm BP (Band Pass), para as amostras marcadas com Cy3, e excitação com LED (648 ± 3 nm) vermelho e filtro de emissão 695 ± 55 nm BP, para as amostras marcadas com Cy5, sendo esses parâmetros definidos pelo próprio software. O tempo de exposição utilizado foi de 30 segundos, com imagens captadas de 10 em 10 segundos, tendo sido obtidas 3 imagens de cada gel. As imagens que se mostraram com melhor qualidade foram aquelas obtidas nos primeiros 10 segundos de exposição. As imagens foram analisadas com o uso do software PDQuest Advanced, versão 8.0.1.

Para as análises com o software (PDQuest Advanced, versão 8.0.1.), primeiramente as imagens foram editadas. Foram feitos ajustes no tamanho das imagens de maneira que ficassem semelhantes. Para os géis coloridos com Coomassie Brilliant Blue foram feitos ajustes no brilho e contraste, para que a coloração do fundo do gel não interferisse nas análises.

Para a detecção dos *spots*, primeiramente foi feito o *matching* automático pelo software, e então a verificação manual dos *spots* em todos os géis do experimento, para a correção de possíveis detecções incorretas. Para a verificação manual, foram considerados válidos os *spots* presentes em dois dos três géis de cada grupo de frutas, e, quando utilizada a tecnologia DIGE, também deveria estar presente no padrão interno.

Na análise quantitativa dos *spots*, foram detectados aqueles que variaram em abundância por um fator 2 em relação à intensidade inicial do *spot* para os géis coloridos com Coomassie Brilliant Blue, ou seja 2 vezes de aumento e diminuição de $\frac{1}{2}$ vezes. Para os géis visualizados com a tecnologia DIGE foram detectados os *spots* com variação por um fator de aumento de abundância 1,5 e diminuição por um fator 2, ou seja, redução ou aumento de metade do valor da intensidade inicial.

Na análise qualitativa, foram estimados os *missing spots* e os *spots* saturados. Para a análise estatística foi utilizado o teste-T, com nível de significância de 95%, sendo 5% a probabilidade de ocorrência de erro.

3.8. Digestão das proteínas

Para a retirada dos *spots* de proteínas selecionadas pelas análises, foram feitos três géis bidimensionais preparativos de amostras do grupo de frutas pré-

climatéricas, e três géis de amostras do grupo de frutas climatéricas. Em cada gel foram submetidos 700 µg de extrato protéico. Os géis foram preparados de acordo com o descrito nos itens 3.4. e 3.5.

A digestão das proteínas foi feita de acordo com Celedon et al. (2007). Os *spots* foram retirados dos géis com o uso de um bisturi, reduzidos a fragmentos menores (em torno de 1mm³) e transferidos para tubos *ependorf*. Para a remoção do corante os segmentos dos géis foram submersos em solução de descoloração (50% de acetonitrila e 25 mM de bicarbonato de amônio), em repetições de lavagens de 30 minutos até a completa remoção do corante. Em seguida, os segmentos de géis foram desidratados em solução contendo 100% de acetonitrila e reidratados em solução de redução contendo 20 mM de DTT e 50 mM de bicarbonato de amônio, a 56°C por 40 minutos. Após a redução, as proteínas foram alquiladas em 55 mM de iodoacetamida em 50 mM de bicarbonato de amônio ao abrigo da luz, durante 30 minutos. Os fragmentos de géis foram novamente desidratados em 100% de acetronitrila.

Para a digestão das proteínas, os géis foram reidratados em 25 mM de bicarbonato de amônio contendo 100 ng de tripsina (Promega) a 37 °C por 14 horas. Foi adicionada solução bloqueadora (50% acetonitrila e 5% de ácido fórmico) para a interrupção da ação da tripsina.

Os peptídeos obtidos foram eluídos dos fragmentos de géis com duas lavagens de 20 minutos em 60% de metanol e 1% de ácido fórmico, e depois duas lavagens em 100% de acetonitrila. Ambas as etapas foram feitas em banho de ultra-som por 20 minutos a 40 °C. Os sobrenadantes contendo os peptídeos foram submetidos à secagem em concentrador a vácuo sob temperatura ambiente.

3.9. Identificação das proteínas

Para a realização da espectrometria de massas os peptídeos foram eluídos em 0,1% de ácido fórmico. As análises de sequenciamento das proteínas foram realizadas em plataforma LC-MS/MS, em um nanoAcquity Waters UPLC acoplado a um espectrômetro de massa Waters SYNAPT HDMS (geometria Q-TOF), com fonte de ionização por ESI e analisador de massas Q-TOF.

Os arquivos RAW gerados pelo LC-MS/MS foram processados utilizando o programa ProteinLynx Global Server versão 2.2 (Waters) e analisados utilizando o

programa MASCOT versão 2.2 (Matrix Science Ltd., www.matrixscience.com). Para a obtenção da possível identidade das proteínas, o programa Mascot comparou as seqüências obtidas com as seqüências depositadas no banco de dados MSDB. O MSDB é um banco de dados de seqüências de proteínas não-redundantes, compilado pelo grupo de proteômica do *Imperial College London*, composto de seqüências depositadas em bancos de dados primários, retidos preferencialmente em ordem de prioridade: PIR, Trembl, GenBank, Swiss-Prot e NRL3D (www.matrixscience.com).

A busca no banco de dados foi realizada com os seguintes parâmetros: digestão por tripsina, até uma clivagem perdida permitida, taxonomia *Viridiplantae*, carbamidometil (C) como modificação fixa, oxidação (M) como modificação variável, carga do íon 2+, valores das massas monoisotópicas, tolerância de peptídeos 0.1 Da, tolerância do fragmento 0.1 Da, instrumento ESI-QUAD-TOF, formato dos dados micromass (.pkl).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Amostragens

Os resultados obtidos nas análises físico-químicas das três amostragens estão de acordo com o padrão típico de amadurecimento da banana, e podem ser vistos na figura 1.

Figura 1. Caracterização físico-química das três amostragens de banana utilizadas: A) Amostragem 1, B) Amostragem 2, C) Amostragem 3. Os pontos escolhidos para as análises realizadas com a metodologia DIGE estão destacados pelas linhas pontilhadas verticais. As barras de erro indicam o desvio padrão, significância (n=3).

As amostragens 1 e 2 já haviam sido caracterizadas em nosso laboratório. A amostragem 3 foi feita durante a realização desse trabalho. Apesar de ser observado que o pico atingido de produção de etileno na amostragem 3 foi menor ($0,8 \mu\text{L.kg}^{-1}.\text{h}^{-1}$), em relação às outras duas amostragens (aproximadamente $5,0 \mu\text{L.kg}^{-1}.\text{h}^{-1}$), o processo do amadurecimento ocorreu normalmente. O pico de produção de etileno costuma variar entre diferentes amostragens, como pode ser observado ao serem comparados os picos obtidos nos trabalhos de Mainardi et al. (2006) e de Godoy et al. (2010). No trabalho de Mainardi et al. (2006), o pico atingido foi de aproximadamente $5,0 \mu\text{L.kg}^{-1}.\text{h}^{-1}$, e no de Godoy et al. (2010), $2,5 \mu\text{L.kg}^{-1}.\text{h}^{-1}$. Nos dois trabalhos esses valores de produção de etileno foram obtidos de bananas Nanicao não tratadas.

Seguindo o comportamento climatérico característico do amadurecimento da banana, na amostragem 3, o pico respiratório atingiu aproximadamente $100 \text{mg.kg}^{-1}.\text{h}^{-1}$, valor próximo ao obtido nas outras duas amostragens e ao obtido por Godoy et al. (2010). O amido foi degradado em açúcares solúveis, partindo de um teor de aproximadamente 200mg.g^{-1} e chegando a um teor inferior a 10mg.g^{-1} .

Na análise preliminar em que os géis bidimensionais foram visualizados por coloração com Coomassie Brilliant Blue, foi utilizada a segunda amostragem de frutas, pois naquela ocasião ainda não havia sido obtida uma terceira amostragem, necessária para a análise DIGE. Por isso, a análise preliminar foi realizada com o objetivo de otimizações experimentais e treinamento do método de análise da expressão protéica diferencial. Replicatas biológicas são essenciais para a confiabilidade das análises estatísticas, em especial as análises univariadas como o teste-T (KARP; LILLEY, 2007), o qual foi utilizado no presente trabalho. Como discutido por Karp e Lilley (2007), quanto maior o número de replicatas biológicas, maior o poder experimental. Para as análises definitivas, em que os géis foram visualizados por marcação fluorescente, foram utilizadas três amostragens.

4.1.1. Amostras escolhidas para a realização das análises preliminares

Para as análises preliminares, em que os géis foram coloridos com Coomassie Brilliant Blue, foi utilizada a amostragem 2. Para o grupo de amostras de bananas pré-climatéricas foi definido o ponto de colheita 1 dia pós-colheita (dpc). Evitou-se a escolha do ponto 0 dpc, para que proteínas não envolvidas ao processo

do amadurecimento não fossem detectadas nas análises, devido ao *stress* da colheita e transporte das frutas. As células das frutas produzem diferentes respostas ao *stress* mecânico que sofrem durante sua colheita e manipulação, como produção de etileno e aumento na taxa de respiração (PEDRESCHI et al., 2009).

Para o grupo de amostras de bananas climatéricas foram selecionados os pontos de colheita 18 dpc, 19 dpc e 20 dpc. Esse pontos de colheita foram escolhidos para compor uma mistura representativa de frutas climatéricas porque no ponto 18 dpc foi atingido o pico de etileno e a respiração continuou subindo, mas menos da metade do amido havia sido degradado em açúcares solúveis, sendo que somente após o ponto 20 dpc o teor do amido sofreu uma queda abrupta. Durante o amadurecimento da banana, o rápido aumento da respiração e da conversão do amido em açúcares solúveis são resultados do aumento dos fluxos de carbono das vias glicolítica e gliconeogênica (HUBBARD et al., 1990), assim esses três pontos de colheita representam a fase crítica do climatério, onde provavelmente há a participação de proteínas chave do processo, estando altamente expressas.

4.1.2. Amostras escolhidas para a realização das análises

A escolha dos pontos do amadurecimento utilizados nas análises, realizadas com DIGE, foi feita de forma que as três amostragens pudessem ser comparáveis. Para as amostras pré-climatéricas foram escolhidos o primeiro dia após a colheita, com o objetivo de evitar a interferência de proteínas expressas em resposta ao *stress* da colheita e transporte das frutas. Para as amostras definidas como climatéricas foram escolhidos os pontos onde a taxa respiratória atingiu seu pico, momento definido como climatério. Assim, para a amostragem 1 foram escolhidos os pontos 1 dpc como pré-climatérico e 17 dpc como climatérico, para a amostragem 2 os pontos 1 dpc e 21 dpc e para a amostragem 3 os pontos 1 dpc e 15 dpc. A figura 1, apresentada anteriormente, mostra destacados os pontos pós-colheita escolhidos em cada amostragem.

Os resultados das análises físico-químicas permitiram a escolha de dois grupos bem caracterizados como pré-climatéricos e climatéricos, permitindo a análise da expressão diferencial de proteínas envolvidas no processo do amadurecimento.

4.2. Otimização e padronização das condições para obtenção dos extratos protéicos

As amostras de cinco bananas de cada dia de coleta foram armazenadas em fatias finas, que foram homogeneizadas, para que se tivesse maior representatividade do respectivo ponto de colheita. Foi feita uma mistura de várias fatias das amostras de cada um dos pontos de colheita definidos como pré-climatéricos e climatéricos, trituradas em N₂ líquido e armazenadas a -80°C, para quando fossem realizadas as extrações de proteínas. No caso das bananas definidas como climatéricas utilizadas nas análises preliminares, o pulverizado foi um “pool” de várias fatias de cada ponto de colheita definido como representativo desse estágio fisiológico.

As paredes celulares das plantas são difíceis de romper por serem compostas por polissacarídeos e outros elementos, sendo a pulverização em nitrogênio líquido a forma mais comum de romper as células vegetais, o que minimiza a ocorrência de proteólise e outras formas de degradação protéica. O rendimento da extração de proteínas está relacionado ao tamanho do pulverizado, geralmente quanto mais fino, maior será a concentração de proteínas obtidas (WANG et al., 2008). O armazenamento das amostras em fatias finas facilita a pulverização do material, aumentando o rendimento nas extrações protéicas.

A obtenção de extratos protéicos para estudos proteômicos é uma etapa crítica, em especial para tecidos de plantas, que precisam de precauções especiais por normalmente não serem fontes abundantes de proteínas. As paredes celulares e os vacúolos são a maioria da massa celular, resultando em uma relação proteína/volume relativamente baixa, e são associados a substâncias interferentes para os géis bidimensionais (CARPENTIER et al., 2005). Além disso, os tecidos de plantas também são ricos em proteases (WANG et al., 2008).

As frutas são consideradas tecidos recalcitrantes para as análises proteômicas e contém quantidades significativas de proteases, compostos fenólicos, lipídeos, pigmentos, carboidratos (polissacarídeos e amido), e muitos outros metabólicos secundários (SONG et al., 2006; SARAVANAN; ROSE, 2004). A banana contém muitos interferentes e é um bom exemplo de tecido recalcitrante (CARPENTIER et al., 2005), pois contém níveis extremamente altos de enzimas

oxidativas, compostos fenólicos (lignina, taninos condensados, flavonóides, fenóis simples) e altos níveis de carboidratos e látex (CARPENTIER et al., 2008). Essas substâncias interferentes causam muitos problemas nos géis bidimensionais, resultando em diminuição do número de *spots* bem resolvidos, manchas e estrias verticais e horizontais (SARAVANAN; ROSE, 2004). Os carboidratos e o látex causam estrias e perdas de proteínas, porque bloqueiam os poros dos géis causando precipitação e aumento no tempo de focalização, resultando em estrias horizontais, e alguns polissacarídeos possuem cargas negativas, complexando-se com as proteínas através de interação eletrostática (CARPENTIER et al., 2008). Os compostos fenólicos levam à heterogeneidade de carga das proteínas e estrias nos géis, porque se combinam irreversivelmente com as proteínas por oxidação seguida por condensações covalentes, e reversivelmente através de ligações de pontes de hidrogênio. Os pigmentos e lipídeos causam estrias e heterogeneidade das cargas das proteínas (CARPENTIER et al., 2005). As proteases são liberadas quando as células ou tecido são rompidos, podendo ocorrer proteólise em larga escala, o que leva a erros na identificação das proteínas por exemplo, quando é feita a análise por espectrometria de massas, ou diminuição do rendimento da proteína desejada (RABILLOUB, 1996). Imagens de géis bidimensionais mais limpos, sem estrias e manchas, são importantes para a análise pois diminuem as interferências na detecção e identificação dos *spots*.

Para as análises proteômicas a extração de proteínas é a etapa crucial, pois para que as proteínas possam ser detectadas e identificadas, precisam ser extraídas e solubilizadas. Dessa forma, o protocolo de extração deve ser otimizado para cada tecido, principalmente se for de origem vegetal. O método ideal de extração deve ser capaz de extrair o máximo possível de espécies protéicas, reduzir o nível de contaminantes, minimizar a degradação e modificações protéicas, e ser altamente reprodutível (JORRÍN-NOVO et al., 2009).

No estudo de Carpentier et al. (2005), em que foram comparados quatro métodos de extração protéica para tecidos recalcitrantes, tendo como exemplo amostras de meristema de banana, verificou-se que somente os métodos de extração com TCA e precipitação com acetona (TCA/acetona), e a extração com fenol e precipitação com acetato de amônio em metanol (fenol/acetato de amônio em metanol), podem ser usados com sucesso para esse tipo de tecido. No entanto, o método de extração com fenol e precipitação com acetato de amônio em metanol

foi a mais eficiente na remoção de substâncias interferentes e resultou em géis de melhor qualidade. De fato, quando não se atinge a qualidade final pretendida com uso do método com TCA/acetona, que é mais simples, o método de extração com fenol/acetato de amônio em metanol vem a ser o método de escolha (WANG et al., 2008).

No presente estudo o protocolo de extração que se mostrou eficiente, e que é utilizado para a extração de proteínas totais de polpa da fruta da banana, foi o método do fenol/acetato de amônio em metanol, de acordo com Carpentier et al. (2005). O método de TCA/acetona havia sido testado anteriormente no laboratório para amostras de polpa de banana, porém, não se mostrou eficiente e foi descartado para uso com esse material vegetal.

Para avaliar a efetividade de um protocolo de extração protéica, é necessária a quantificação das proteínas no extrato protéico (JORRÍN-NOVO et al., 2009). As extrações das proteínas totais de polpa da fruta da banana se mostraram eficientes, resultando em um rendimento de proteínas em torno de 2000 $\mu\text{g/g}$ de polpa da fruta. Esse rendimento foi obtido após otimização do método de extração, no qual verificou-se que com o aumento no tempo das centrifugações de cinco minutos para dez minutos, houve o aumento da concentração das proteínas extraídas. Antes da otimização o rendimento obtido era em média de 1000 $\mu\text{g/g}$ de polpa de banana. Em comparação com outras frutas também estudadas em nosso laboratório, o rendimento atingido para a banana é alto, já que o rendimento obtido nas extrações de mamão com o uso do mesmo método, após a otimização, costumam dar em média 1000 $\mu\text{g/g}$, e para as extrações de manga em torno de 800 $\mu\text{g/g}$.

Para verificar a qualidade da extração os extratos protéicos foram submetidos a eletroforese em gel de poliacrilamida apenas em uma dimensão (1-D). Como pode ser observado na figura 2, não há degradação do material ou sinais de contaminação com substâncias interferentes, pois são visíveis bandas protéicas de vários tamanhos, inclusive de alto peso molecular e grandes, e elas se apresentam bem definidas e sem estrias verticais. Quando esses extratos foram utilizados para a composição de um gel bidimensional, resultados similares foram encontrados. A figura 3 mostra um dos géis bidimensionais, onde pode-se observar a boa qualidade do extrato protéico obtido, pois não há grande quantidade de manchas ou estrias verticais e horizontais, e os *spots* se apresentam com boa resolução.

Figura 2. Eletroforese SDS-PAGE de proteínas de amostras de bananas pré-climatéricas: amostragem 1 (1) e amostragem 2 (3); e climatéricas: amostragem 1 (2) e amostragem 2 (4). As proteínas foram separadas em gel de poliacrilamida a 12%. Em cada trilha do gel foram aplicados 10 μ l de cada amostra, contendo aproximadamente 20 μ g de proteínas. M: Marcador de peso molecular, com bandas protéicas de 97 kDa a 14,4 kDa, cujas posições estão indicadas a esquerda dos géis. A coloração foi feita com Comassie Brilliant Blue G-250.

Figura 3. Eletroforese bidimensional de amostra de extrato de proteínas de bananas climatéricas da amostragem 2, a partir da combinação de focalização isoelétrica em *strips* de 7 cm com gradiente linear de pH 4 a 7, na primeira dimensão, e separação por SDS-PAGE 12% na segunda dimensão. Os géis foram corados com Comassie Brilliant Blue G-250. A direção do pI das proteínas está indicada na parte superior dos géis. Foi usado marcador de peso molecular com bandas protéicas de 97 kDa a 14,4 kDa, cujas posições estão indicadas a esquerda dos géis.

4.3. Obtenção dos perfis de proteínas de bananas em 2D-PAGE

Tendo em vista que o objetivo do projeto é analisar diferenças de expressão protéica, a escolha do método de coloração dos géis é de extrema importância (WESTERMEIER; MAROUGA, 2005). Inicialmente, os géis foram corados com Coomassie Brilliant Blue G-250 coloidal, que tem como vantagens o baixo custo, a boa reprodutibilidade, a ligação quantitativa do corante às proteínas (WESTERMEIER; MAROUGA, 2005), e a compatibilidade com a espectrometria de massas somado ao fato de que cada *spot* corado possui a quantidade ideal de proteína necessária para a identificação das proteínas por essa metodologia (MILLER; CRAWFORD; GIANAZZA, 2006). O Coomassie Brilliant Blue possui dois tipos de modificações, o CBB R-250 (tom avermelhado) e o CBB G-250 (tom esverdeado, forma dimetilada). O CBB R foi o primeiro a ser usado na proteômica, mas a coloração feita com CBB G apresenta maior sensibilidade em soluções solventes (MILLER; CRAWFORD; GIANAZZA, 2006). O CBB tem alta sensibilidade, de 50 a 100 ng de proteína por banda (WILLIAMS, 2001), e a coloração com CBB coloidal quando feito por tempo suficiente ou repetidamente, apresenta maior sensibilidade e melhor reprodutibilidade do que a coloração não coloidal (WESTERMEIER; MAROUGA, 2005), além de apresentar menor coloração do segundo plano do gel (MILLER; CRAWFORD; GIANAZZA, 2006).

Para que se obtivesse reprodutibilidade na coloração dos géis, os géis foram mantidos em solução coradora sempre por 48 horas e sob agitação suave, para evitar a formação de manchas por depósito do corante. Para os géis de 24 cm, devido à dificuldade de manipulação foram tomados alguns cuidados nas etapas de neutralização, lavagem do gel e fixação. Cada etapa foi feita em recipientes separados com as devidas soluções, observando-se atentamente o tempo em cada etapa. Os géis foram transferidos de um recipiente para o outro, cuidadosamente, apoiados em um suporte de plástico. Para os géis de 7 cm, os géis foram mantidos nos recipientes e foi feita a troca das devidas soluções, sempre cuidadosamente evitando a quebra do gel. Na etapa de fixação, ambos os géis foram mantidos em recipientes individuais contendo solução de fixação. Todo o procedimento de coloração foi refeito, para maior sensibilidade e melhor contraste dos *spots* de proteínas. Após as duas rodadas de coloração, os géis foram mantidos por, no

mínimo, 48 horas em solução de fixação antes de serem escaneados, pois verificou-se que o segundo plano do gel ficava mais claro.

O intervalo de pH da focalização isoeletrica que mostrou o melhor perfil de separação de proteínas foi o de pH 4 a 7. A quantidade de extrato protéico aplicado na reidratação das fitas de 7 cm que resultou em melhor qualidade e intensidade dos *spots* foi 100 µg.

Foi notado que alguns géis bidimensionais apresentaram estrias verticais ligadas a determinados *spots* protéicos, na região mais ácida da fita de pH 4-7. As estrias verticais estão relacionadas à segunda dimensão da eletroforese bidimensional, e podem estar associadas a vários fatores que diminuem a solubilidade das proteínas. Esses fatores são: a) alta concentração de proteína aplicada na fita de gradiente de pH imobilizado (fita IPG); b) tempo excessivo no tempo de focalização na primeira dimensão que gera precipitação isoeletrica das proteínas; c) equilíbrio ineficaz da fita IPG; d) reoxidação protéica, retornando à sua conformação; e) soluções preparadas inadequadamente ou reagentes de baixa qualidade; f) espaço entre a fita IPG e o gel de poliacrilamida; g) dano na fita IPG durante o seu posicionamento na parte superior do gel de poliacrilamida; h) redução do tamanho dos poros em algumas partes da fita IPG, causadas pelo movimento da água no gel durante a focalização (BERKELMAN; BRUBACHER; CHANG, 2000). Uma vez que isso tem efeito direto na qualidade das separações e pode prejudicar a análise dos *spots*, foram feitos alguns testes na tentativa de diminuir ou eliminar essas estrias.

Primeiramente, foram comparados os perfis obtidos dos extratos protéicos tratados com o kit 2D-Clean Up (GE Healthcare) com os não tratados, dos dois grupos de frutas. O kit 2D-Clean Up trata o extrato protéico de modo que elimina os interferentes como lipídios, sais, ácidos nucleicos e detergentes, que podem produzir, entre outros problemas no mapa protéico, estrias e coloração do segundo plano do gel. Nas figuras 4 e 5, observa-se que nos géis em que o extrato protéico foi tratado com o kit, houve discreta redução das estrias, principalmente de proteínas mais abundantes sendo que, em ambos os casos, houve uma pequena diminuição na intensidade dos *spots*, provavelmente devido à diminuição da concentração protéica do extrato durante o procedimento. As estrias verticais presentes nas figuras são resultantes do vazamento do marcador de peso molecular. Esses resultados demonstram que apesar da extração protéica utilizada

ter sido eficiente na remoção dos principais interferentes da amostra, uma melhora adicional pode ser conseguida com o uso desse kit, apesar de haver uma pequena perda de material.

Figura 4. Eletroforeses bidimensionais de extrato protéico de bananas pré-climatéricas da amostragem 2, não tratado com o kit Clean Up (A) e tratado (B). As eletroforeses bidimensionais foram feitas a partir da combinação de focalização isoeletrica em fitas de 7 cm com gradiente linear de pH 4 a 7, na primeira dimensão, e separação por SDS-PAGE 12,5% na segunda dimensão. Os géis foram corados com Comassie Blue G-250. A direção do gradiente de pH está indicada na parte superior dos géis. Foi usado marcador de peso molecular com bandas protéicas de 97 kDa a 14,4 kDa, cujas posições estão indicadas a esquerda dos géis.

Figura 5. Eletroforeses bidimensionais de extrato protéico de bananas climatéricas da amostragem 2, não tratado com o kit Clean Up (A) e tratado (B). As eletroforeses bidimensionais foram feitas a partir da combinação de focalização isoelétrica em fitas de 7 cm com gradiente linear de pH 4 a 7, na primeira dimensão, e separação por SDS-PAGE 12,5% na segunda dimensão. Os géis foram corados com Comassie Blue G-250. A direção do gradiente de pH está indicada na parte superior dos géis. Foi usado marcador de peso molecular com bandas protéicas de 97 kDa a 14,4 kDa, cujas posições estão indicadas a esquerda dos géis.

Outra possível causa de estrias verticais é o equilíbrio ineficaz. O equilíbrio deve garantir boa penetração de SDS para a solubilização da proteína, e deve ser feito sob agitação para o contínuo movimento da solução. O tempo pode ser prolongado por até 45 minutos, porém podem ocorrer perdas de alguns polipeptídeos pequenos (BERKELMAN; BRUBACHER; CHANG, 2000). Inicialmente o equilíbrio estava sendo feito por 15 minutos em cada etapa (redução e alquilação) e sem agitação, e foram feitos alguns testes na tentativa de diminuição das estrias verticais: 1) 15 minutos em cada etapa sem agitação dos tubos (controle), 2) 15 minutos em cada etapa sob agitação dos tubos, 3) 25 minutos em cada etapa sem agitação dos tubos, e 4) 15 minutos em cada etapa sem agitação dos tubos, com a adição de uma etapa a mais de incubação em solução de equilíbrio sem adição de DTT e IAA, para a retirada de possíveis resíduos remanescentes. Os géis resultantes destes testes (figura 6) não apresentaram diferenças significativas entre si na redução de estrias verticais, e apresentaram padrões semelhantes, não parecendo haver um efeito das condições de equilíbrio no aparecimento das estrias.

Figura 6. Eletroforeses bidimensionais de extrato protéico de frutas pré-climatéricas da amostragem 2, após diferentes formas da etapa de equilíbrio das fitas: A) 15 minutos em cada etapa sem agitação dos tubos (controle), B) 15 minutos em cada etapa sob agitação dos tubos, C) 25 minutos em cada etapa sem agitação dos tubos, e D) 15 minutos em cada etapa sem agitação dos tubos, com a adição de uma etapa a mais em solução de equilíbrio sem adição de DTT e IAA. As eletroforeses bidimensionais foram feitas a partir da combinação de focalização isoeletrica em fitas de 7 cm com gradiente linear de pH 4 a 7, na primeira dimensão, e separação por SDS-PAGE 12,5% na segunda dimensão. Os géis foram corados com Comassie Blue G-250. A direção do gradiente de pH está indicada na parte superior dos géis. Foi usado marcador de peso molecular com bandas protéicas de 97 kDa a 14,4 kDa, cujas posições estão indicadas a esquerda dos géis.

A alta concentração de proteínas aplicadas no gel, ou a presença de determinadas proteínas com alta abundância podem ser causas que explicam a formação de estrias verticais. Nesses casos, a ressolubilização das proteínas durante o equilíbrio pode ser incompleta, resultando nas estrias verticais e “caudas” nos *spots* das proteínas mais intensas (BERKELMAN; BRUBACHER; CHANG, 2000). Esse motivo parece ser a causa das estrias verticais, já que essas estrias estão ligadas aos *spots* mais intensos dos géis, formando a “cauda” dos *spots*. Maneiras de prevenir a formação dessas estrias são o prolongamento do tempo de equilíbrio, a aplicação de menor concentração de proteínas nas fitas, ou o uso de uma técnica de coloração mais sensível que o Comassie Brilliant Blue (BERKELMAN; BRUBACHER; CHANG, 2000), permitindo o uso de menores quantidades de proteínas nos géis. Como citado anteriormente, foi feita a tentativa no prolongamento do tempo de equilíbrio, porém houve um aumento na formação das estrias formadas (figura 6). A aplicação de menor concentração de proteínas no gel acarretaria na diminuição da intensidade dos outros *spots*, devido à alta intensidade dos *spots* mais abundantes, prejudicando a análise diferencial dos géis. Na etapa seguinte do presente trabalho, a análise definitiva, foi utilizado o sistema de coloração fluorescente diferencial CyDye DIGE, que é bem mais sensível do que a coloração por Comassie Brilliant Blue. Como já dito anteriormente, a coloração com Coomassie Brilliant Blue G-250 coloidal tem alta sensibilidade de detecção de proteínas, porém a coloração fluorescente é mais sensível, sendo a detecção mínima do CyDye DIGE de 0,025 ng de proteínas para o corante fluorescente Cy3, e 0,075 ng para os corantes fluorescentes Cy2 e Cy5 (MAROUGA et al., 2005).

Após a otimização das condições de extração e separação, foram feitos os géis analíticos, com eletroforese bidimensionais empregando fitas de 24 cm com intervalo de pH de 4 a 7. Para a reidratação das fitas foram aplicados 500 µg do extrato protéico. Foram realizadas sextuplicatas de géis para cada grupo de frutas. A análise de triplicatas de géis se torna necessária para que se tenha reprodutibilidade dos *spots* e que os resultados das análises diferenciais sejam realmente devido a diferenças nas expressões protéicas, e não de artefatos técnicos de um gel para o outro (KARP; LILLEY, 2007).

O perfil dos *spots* obtidos nas eletroforeses bidimensionais (figura 7) foram bastante semelhantes entre os dois grupos de frutas, porém observa-se *spots* de proteínas muito mais abundantes no grupo de frutas pré-climatéricas, que

apresentam o peso molecular em torno de 30 kDa. Os *spots* de proteínas estão bem distribuídos ao longo da faixa de pH de 4 a 7, e se concentram na faixa de peso molecular de 97 kDa a 30 kDa. Nota-se, em ambos os grupos de frutas, uma maior quantidade de *spots* agrupados e bem definidos e intensos com peso molecular em torno de 60 kDa, e nas regiões de peso molecular 20.1 kDa e 30 kDa. A figura 7 mostra o perfil protéico dos dois grupos de frutas e a boa qualidade obtida dos géis.

Figura 7. Eletroforeses bidimensionais de amostras de bananas pré-climatéricas (A) e climatéricas (B) da amostragem 2, a partir da combinação de focalização isoeletrica em fitas de 24 cm com gradiente linear de pH 4 a 7, na primeira dimensão, e separação por SDS-PAGE 12,5% na segunda dimensão. Os géis foram corados com Comassie Blue G-250, A direção do gradiente de pH está indicada na parte superior dos géis. Foi usado marcador de peso molecular com bandas protéicas de 97 kDa a 14,4 kDa, cujas posições estão indicadas a esquerda dos géis.

Em 1992, Dominguez-Puigjaner, Vendrell e Ludevid, encontraram perfis protéicos semelhantes durante o amadurecimento na faixa de pH de 5 a 7. Também foram encontradas proteínas muito abundantes na faixa de peso molecular de 30 kDa, e que quase desapareceram na fase climatérica, durante o pico da taxa respiratória. Por limitações das técnicas na época, foram visualizadas poucas espécies protéicas nas eletroforeses bidimensionais, e destas apenas cinco proteínas puderam ser identificadas. Essas proteínas apresentaram reação contra o anticorpo de poligalacturonase de tomate através de imunoblot, e apresentavam a mesma massa molecular (42 kDa), e três dessas proteínas foram caracterizadas como glicoproteínas, indicando que essas proteínas sofreram glicosilação. Os resultados sugerem que estas podem ser proteínas imunorrelacionadas, ou por possuírem a mesma massa molecular, sejam os mesmos peptídeos com diferentes níveis de glicosilação, alterando seu ponto isoelétrico. As modificações pós-traducionais alteram as cargas das proteínas, e na eletroforese bidimensional, aparecem como *spots* distintos nos eixos verticais ou horizontais (GÖRG et al. 2004). As poligalacturonases são sintetizadas após a produção de etileno, e são enzimas endolíticas de parede celular (DOMINGUEZ-PUIGJANER; VENDRELL; LUDEVID, 1992).

4.4. Análise preliminar da expressão de proteínas

Após a otimização e melhores condições de extração e separação das proteínas, passou-se para os géis analíticos, como já mencionado anteriormente. O objetivo dos géis analíticos é a comparação entre os dois perfis protéicos obtidos dos dois grupos de frutas, através da utilização do software específico. O uso de géis maiores, no caso, fitas de 24 cm, permite uma melhor resolução e separação das proteínas, facilitando e resultando em análises diferenciais de melhor qualidade.

Para a preparação dos géis analíticos, foram feitas cinco extrações para cada grupo de frutas, com o objetivo de aumentar a representatividade dos extratos protéicos. Foi feito um *pool* dos extratos de cada grupo de frutas, e então foi determinada a concentração protéica, como já detalhado em Materiais e Métodos. Para cada gel de cada grupo de frutas foram aplicados 500 µg do *pool* dos extratos protéicos.

Foram feitas sextuplicatas de géis para cada grupo de frutas. A cuba de eletroforese (Ettan Dalt Six Electrophoresis System – GE Healthcare) utilizada para a corrida dos géis analíticos possui capacidade de corrida para seis géis simultaneamente, assim, a eletroforese de uma triplicata de géis de cada grupo de frutas foi realizada no mesmo dia. Foram feitas duas eletroforeses em dias diferentes, totalizando as duas triplicatas de cada grupo de frutas. Todos os géis foram preparados e corados com as mesmas preparações de soluções, e para cada eletroforese foi utilizado tampão SDS novo, dessa maneira minimizou-se as diferenças experimentais, garantindo maior confiabilidade na análise das diferenças entre os dois grupos de frutas. Os géis foram escaneados, e as imagens obtidas foram comparadas e selecionadas as melhores triplicatas para cada um dos dois grupos de frutas. A escolha das melhores imagens dos géis foi baseada, por ordem de importância, na maior semelhança entre as triplicatas de cada grupo de frutas, melhor resolução dos *spots*, e menor quantidade de estrias e manchas. Após a escolha dos melhores géis, as imagens foram analisadas com o uso do software PDQuest Advanced, versão 8.0.1. As figuras 8 e 9 mostram as triplicatas de géis de cada grupo de frutas, escolhidas para a realização das análises diferenciais.

Figura 8. Triplicatas de eletroforeses bidimensionais de amostras de bananas pré-climatéricas da amostragem 2, a partir da combinação de focalização isoelétrica em fitas de 24 cm com gradiente linear de pH 4 a 7, na primeira dimensão, e separação por SDS-PAGE 12,5% na segunda dimensão. Os géis foram corados com Comassie Blue G-250. A direção do gradiente de pH está indicada na parte superior dos géis. Foi usado marcador de peso molecular com bandas protéicas de 97 kDa a 14,4 kDa, cujas posições estão indicadas a esquerda dos géis.

Figura 9. Triplicatas de eletroforeses bidimensionais de amostras de bananas climatéricas da amostragem 2, a partir da combinação de focalização isoeletrica em fitas de 24 cm com gradiente linear de pH 4 a 7, na primeira dimensão, e separação por SDS-PAGE 12,5% na segunda dimensão. Os géis foram corados com Comassie Blue G-250. A direção do gradiente de pH está indicada na parte superior dos géis. Foi usado marcador de peso molecular com bandas protéicas de 97 kDa a 14,4 kDa, cujas posições estão indicadas a esquerda dos géis.

A análise das imagens dos géis foi estruturada da seguinte forma:

- 1) Edição das imagens
- 2) Detecção e edição dos *spots*
- 3) Análise diferencial dos *spots*

4.4.1. Edição das imagens

O tamanho das imagens seleccionadas foi ajustado com o uso de ferramentas de imagem do software, assim como o brilho e o contraste, de maneira que todas as imagens apresentassem a maior semelhança possível, para que pudessem ser comparáveis e as diferenças de intensidade entre os *spots* fossem detectadas. Esses ajustes na qualidade da imagem dos géis, como brilho e contraste, devem ser feitos para que as diferenças de abundância dos *spots* detectadas pelas análises sejam realmente biológicas, e não características das imagens ou devido à coloração do plano de fundo do gel pelo Coomassie Brilliant Blue. Os ajustes no tamanho e posição das imagens com maior semelhança é importante para o *matching* (combinação entre os *spots* dos diferentes grupos), porque este é dependente da similaridade entre a distribuição espacial dos *spots* nos géis (PALAGI; HERNANDEZ; WALTHER, 2006).

4.4.2. Detecção e edição dos *spots*

Para a análise dos géis, primeiramente foi feita a detecção e o *matching* automáticos dos *spots*. Para a detecção dos *spots* foram escolhidos os parâmetros para serem utilizados automaticamente em todas as imagens, com o uso de uma das imagens do experimento escolhida como representativa. Dessa maneira, o software teve padrões para a definição de *spots*, distinguindo-os de manchas inespecíficas presentes nas imagens. Os parâmetros foram determinados através da escolha de um *spot* de tamanho pequeno, para determinar o menor tamanho detectável, um de intensidade fraca, para determinar a sensibilidade de detecção e o valor mínimo de pico detectável, e o *spot* mais largo da imagem do gel, o que

ajusta o raio de subtração do segundo plano do gel (background) e a remoção de estrias.

No *matching* automático o software identificou os *spots* presentes em todos os géis (ou na maioria dos géis) de um grupo e dos demais grupos utilizados na análise, ou seja, os *spots* presentes em todos os membros da análise.

Durante o *matching* automático foi criado um *MatchSet*, que é composto por diferentes tipos de imagens geradas pelo software (2-D, filtrada e gaussiana). A imagem 2-D original digitalizada foi então filtrada e atenuada, com o objetivo de destacar os *spots*, resultando na imagem filtrada. A partir da imagem filtrada foi formada uma imagem 3-D dos *spots*, denominada imagem Gaussiana, a qual foi utilizada para a realização de todas as quantificações e identificação dos *spots*, pois em uma imagem de gel 2-D pode ser difícil quantificar precisamente *spots* sobrepostos, com estrias ou desfocados. A imagem gaussiana é uma representação tridimensional precisa da imagem original dos *spots*, que é gerada através de uma curva gaussiana através das dimensões X e Y do *spot* original.

Ainda no *MatchSet*, os *spots* presentes em todos os géis do experimento foram combinados em apenas uma imagem sintética, gaussiana, chamada gel máster. Para a criação do gel máster, foi escolhido como gel padrão o de melhor qualidade entre os seis géis disponíveis, independente de ser proveniente de amostras de frutas verdes ou maduras. Esse gel de melhor qualidade foi escolhido automaticamente pelo software PDQuest, baseado na imagem com os *spots* de melhor qualidade. O restante dos *spots* presentes nos outros géis de ambos os grupos de amostras, e os *spots* únicos, foram adicionados manualmente à imagem. Assim, foi obtido um gel artificial contendo todos os *spots* válidos presentes nos dois grupos de amostras, chamado gel máster, sendo utilizado como referência para a combinação (ou *matching*) entre os *spots* dos dois grupos de géis.

Posteriormente, foi feita a normalização dos *spots*. Em um set de análise, ocorrem variações de intensidade e tamanho dos *spots* entre os géis, que não são correspondentes a diferenças de expressão protéica, que podem ser causadas por vários fatores, como por exemplo, diminuição da eficiência da preparação da amostra causada por variação nos reagentes. A normalização é feita para compensar essas variações entre os *spots*, para que então a análise diferencial de expressão entre os diferentes grupos possa ser feita com precisão. A normalização foi feita com o método de densidade total na imagem do gel, em que a densidade de

cada *spot* de um gel é dividida pelo valor de intensidade total de todos os *pixels* da imagem, e os resultados foram expressos em PPM. Esse método foi escolhido por ser o mais adequado, dentre os outros métodos, às características dos géis e do experimento.

Após a detecção e o *matching* automáticos, os *spots* foram editados manualmente para eliminar qualquer erro cometido pelo software. Nessa edição foram considerados válidos os *spots* que estavam presentes em, no mínimo, dois géis da triplicata de cada grupo de frutas.

4.4.3. Análise diferencial dos spots

A intensidade de cada *spot* é dada pela sua densidade ótica (OD) obtida pela coloração utilizada, no caso com Coomassie Brilliant Blue G-250 coloidal. Como foram analisadas triplicatas de géis, foram obtidos três valores de OD para cada *spot* de um grupo de frutas. Baseado nos valores obtidos de intensidade dos *spots*, o software aplica o teste T para a análise de diferenças significativas desses valores entre os dois grupos de frutas. O teste T compara dois valores (no caso a média da OD normalizada obtida do respectivo *spot* em um grupo de frutas, e a média do mesmo *spot* no outro grupo de frutas) para determinar se há diferença significativa entre eles. O nível de significância escolhido foi 95%, sendo assim, 5% a probabilidade de aceitação de um falso-positivo para a diferença de intensidade entre os *spots*. As análises qualitativas e quantitativas são independentes do teste T. Na análise quantitativa, são detectados os *spots* em que a intensidade aumentou ou diminuiu entre os grupos, e na análise qualitativa são detectados os *spots* presentes em apenas um dos grupos. Os resultados dessas análises precisam ser intersectados com o teste T, para a obtenção dos *spots* que apresentam diferenças significativas de intensidade.

Na análise quantitativa foi utilizado o método de detecção fora dos limites acima de duas vezes, representando 100% de aumento da intensidade dos *spots*, e abaixo de duas vezes, representando 50% de diminuição. Nas análises qualitativas foram estimados os *missing spots* e os *spots* saturados. Na estimativa dos *missing spots*, um determinado *spot* deve ser detectado em mais de 50% dos géis de um grupo para ser considerado na análise qualitativa, sendo assim, estimados os *spots* que não estão presentes em 100% dos géis do grupo em questão, mas na maioria

destes. A estimativa dos *missing spots* é importante para a análise qualitativa, já que o objetivo é detectar os *spots* presentes em um grupo e ausente no outro. Os *spots* saturados aparecem na imagem gaussiana, porém não é possível sua quantificação através do modelo gaussiano, pois sua quantidade é reportada como zero. Na análise qualitativa há a opção de estimativa dos *spots* saturados, que é feita através da estimativa do valor total do pico do *spot*.

No *matching* foram detectados 151 *spots* entre os grupos de géis da análise. Nas análises diferenciais de expressão protéica (quantitativa e qualitativa) são selecionados os *spots* que apresentam variação de intensidade entre os dois grupos, mas para serem selecionados os *spots* que apresentam variação significativa é necessária a aplicação de análise estatística nesses resultados, no caso foi utilizado o teste T mencionado anteriormente. Na análise quantitativa foram selecionados 94 *spots* com variação de intensidade, mas ao ser intersectada com o teste T foram selecionados 79 *spots* de proteínas com diferenças significativas de expressão. Na análise qualitativa do grupo verde (pré-climatéricas) *versus* maduro (climatéricas), que detecta os *spots* presentes apenas no grupo de frutas verdes, foram detectados 15 *spots*, e quando intersectada com o teste T esses 15 *spots* foram selecionados. Na análise qualitativa do grupo de frutas maduras *versus* verdes, que detectou os *spots* presentes apenas no grupo de frutas maduras, foram detectados 40 *spots*, mas quando intersectada com o teste T foram selecionados 36 *spots* com variação significativa. Os *spots* selecionados nas análises qualitativas são selecionados também na análise quantitativa, dessa forma, são 79 *spots* de proteínas diferencialmente expressas selecionadas pelo teste T (figura 10). A tabela 1 apresenta os *spots* selecionados na análise quantitativa e pelo teste T, separadamente dos *spots* selecionados nas análises qualitativas e pelo teste T, que são apresentados na tabela 2, e figuras 11 e 12. Na figura 10 é possível observar a semelhança entre o gel máster e os géis dos dois grupos de frutas.

O número de *spots* diferentemente expressos encontrados nessa análise é consistente com outro trabalho de análise proteômica durante o amadurecimento. Rocco e colaboradores (2006) analisaram o proteoma de duas variedades de tomate, um fruto também climatérico, durante o amadurecimento. Nesse estudo foram utilizadas fitas de intervalo de pH 4-7 e coloração com Comassie Brilliant Blue G-250 coloidal, mesmas condições utilizadas no presente trabalho. Os resultados do teste T revelaram para a variedade de tomate SM 74 *spots* diferencialmente

expressos entre os três estágios do amadurecimento analisados, e para a variedade AC, 55 *spots* diferencialmente expressos.

Tabela 1 - Lista de *spots* de proteínas selecionados pelas análises quantitativa e pelo teste T, .

SSP	Amostras pré-climatéricas	Amostras climatéricas	Razão C/PC
1	4379,7	9592,3	2,19
102	28407,8	821,8	0,29
203	2889,5	832,3	2,88
402	2251,9	447,9	0,2
1101	22297,4	5101,1	0,23
1701	1157,6	528,7	0,46
1903	1349,2	541,5	0,4
2101	15884,8	2731,9	0,17
2102	1868	7694,6	4,12
2103	7742,9	1358,2	0,18
2201	1441,8	9639,2	6,69
2203	2262,1	6697,9	2,96
3101	24687,2	6648,4	0,27
3404	572,9	1568,7	2,74
3902	516,1	1538,2	2,98
3903	1259,8	2666,8	2,12
4103	12165,9	4199,5	0,35
5103	10019,7	947	0,09
5107	5507,2	1122,5	0,2
5601	3774,1	453,7	0,12
7001	11093	27764,2	2,5
7405	3504,5	1452,2	0,41
7704	430,7	1364,1	3,17
8401	1727	733,7	0,42
8501	2127,6	571,3	0,27
8502	2044,9	680,2	0,33
8701	663,5	1687	2,54
8703	205,1	1081,6	5,27

- Na coluna SSP são apresentados os números de identificação dos *spots* atribuídos pelo programa.
- Nas colunas "amostras climatéricas" e "amostras pré-climatéricas" são apresentados os valores das médias de intensidade dos *spots* nos respectivos grupos de frutas.
- Nas colunas "Razão C/PC (C: amostras climatéricas, P: amostras pré-climatéricas)" são apresentados os valores das razões que indicam quantas vezes a intensidade dos *spots* no grupo de frutas climatéricas variou em relação à intensidade no grupo das pré-climatéricas.

Tabela 2 - Lista de *spots* de proteínas presentes apenas um dos estádios de maturação selecionados pelas análises qualitativa e pelo teste T.

SSP	Amostras pré-climatéricas	Amostras climatéricas	SSP	Amostras pré-climatéricas	Amostras climatéricas
2	-----	2882,3	5903	-----	768,6
101	-----	1749,9	6101	-----	1208,7
103	87,6	-----	6104	2117,7	7,2
702	1498,1	-----	6203	-----	2205,8
704	1201,4	-----	6503	-----	2712,2
705	1105,2	-----	6505	-----	835
706	738,2	-----	6902	-----	222,8
802	1416,8	-----	6903	-----	343,3
901	-----	400,2	6904	-----	317,2
1401	-----	649,2	7002	-----	5253,7
1402	-----	659,2	7104	3613,7	-----
1505	422,3	-----	7105	1029,6	-----
1703	1200,4	-----	7201	-----	1489,2
1901	-----	426,6	7202	-----	593,2
3201	-----	1411,6	7302	-----	1581,7
3301	-----	654,2	7607	1202,8	-----
3401	-----	745,7	7703	-----	1583,9
3901	-----	859,4	7902	-----	371,6
3904	-----	667,8	7903	-----	379,1
4203	-----	6447,4	8001	-----	5710,3
5101	-----	2862,2	8101	-----	4708,1
5106	7708,8	-----	8301	-----	791,4
5504	-----	5932,6	8304	-----	507
5506	-----	4133,1	9102	-----	564,4
5507	585,8	-----	9301	-----	1184,1
5701	1865,9	-----			

- Na coluna SSP são apresentados os números de identificação dos *spots* atribuídos pelo programa.
- Nas colunas "amostras climatéricas" e "amostras pré-climatéricas" são apresentados os valores das médias de intensidade dos *spots* nos respectivos grupos de frutas.

Figura 10. Imagem do gel máster (A) e eletroforeses bidimensionais de extratos protéicos de bananas pré-climatéricas (B) e climatéricas (C) da amostragem 2, com *spots* selecionados pela análise quantitativa intersectada com o teste T, destacados em vermelho nas figuras. A eletroforese bidimensional foi feita a partir da combinação de focalização isoeletrica em fitas de 24 cm com gradiente linear de pH 4 a 7, na primeira dimensão, e separação por SDS-PAGE 12,5% na segunda dimensão. Os géis foram corados com Comassie Blue G-250, A direção do gradiente de pH está indicada na parte superior dos géis. Foi usado marcador de peso molecular com bandas protéicas de 97 kDa a 14,4 kDa, cujas posições estão indicadas a esquerda dos géis.

Figura 11. Imagem do gel máster (A) e eletroforeses bidimensionais de extratos protéicos de bananas pré-climatéricas (B), da amostragem 2, com *spots* selecionados pela análise qualitativa intersectada com o teste T, destacados em vermelho nas figuras. A eletroforese bidimensional foi feita a partir da combinação de focalização isoelétrica em fitas de 24 cm com gradiente linear de pH 4 a 7, na primeira dimensão, e separação por SDS-PAGE 12,5% na segunda dimensão. Os géis foram corados com Comassie Blue G-250, A direção do gradiente de pH está indicada na parte superior dos géis. Foi usado marcador de peso molecular com bandas protéicas de 97 kDa a 14,4 kDa, cujas posições estão indicadas a esquerda dos géis.

Figura 12. Imagem do gel máster (A) e eletroforeses bidimensionais de extratos protéicos de bananas climatéricas (B) da amostragem 2, com spots selecionados pela análise qualitativa intersectada com o teste T, destacados nas figuras. A eletroforese bidimensional foi feita a partir da combinação de focalização isoeétrica em fitas de 24 cm com gradiente linear de pH 4 a 7, na primeira dimensão, e separação por SDS-PAGE 12,5% na segunda dimensão. Os géis foram corados com Comassie Blue G-250. A direção do gradiente de pH está indicada na parte superior dos géis. Foi usado marcador de peso molecular com bandas protéicas de 97 kDa a 14,4 kDa, cujas posições estão indicadas a esquerda dos géis.

A presente análise correspondeu a um estudo preliminar, com o objetivo de desenvolvimento e otimização das técnicas utilizando uma amostragem de bananas, pois ainda não estavam disponíveis as três replicatas biológicas necessárias para garantir confiabilidade estatística dos resultados. A utilização de apenas uma amostra biológica pode levar a resultados de expressão diferencial protéica relativas a variações técnicas, ou exclusivas da amostragem devido a variações biológicas, genéticas ou ambientais (KARP; LILLEY, 2007).

Outro ponto dessa análise preliminar é que foi utilizado o método de coloração com Coomassie Brilliant Blue, que permite a visualização de apenas um extrato protéico em um gel, assim é necessária a análise de diferentes géis, o que leva a variações de expressão dos *spots* não relacionadas às proteínas, e sim de gel para gel (KARP; LILLEY, 2007). Além disso, esse método de coloração é relativamente demorado, levando em torno de uma semana para a obtenção da coloração protéica de qualidade. Posteriormente, foi utilizada a metodologia 2D-DIGE, onde os géis são marcados antes da eletroforese com sistema de marcação fluorescente CyDye, que permite que até três extratos protéicos sejam separados em apenas um gel, dessa maneira podem ser comparadas duas amostras distintas a uma amostra interna padrão usada como referência, que é um *pool* de todas as diferentes amostras do experimento (MAROUGA, et al., 2005). Dessa forma, as análises diferenciais são feitas em um mesmo gel, apresentando as mesmas condições da corrida da eletroforese, permitindo uma comparação mais exata dos volumes dos *spots* (KARP; LILLEY, 2005).

4.5. Análise da expressão de proteínas por DIGE

No presente trabalho, optou-se pela utilização do sistema de marcação com dois marcadores fluorescentes, com a combinação de Cy3 e Cy5. Karp e Lilley (2005) demonstraram que essa combinação é mais reprodutiva comparada ao sistema de marcação fluorescente com três marcadores fluorescentes, ocorrendo menos variações de um gel para o outro. No entanto, as variações são esperadas e inevitáveis. Quanto maior a reprodutibilidade do experimento, maior será a capacidade de detecção da variação de abundância protéica. Esse sistema de marcação implicou em redução do número de replicatas necessárias. Ultimamente têm sido feitos estudos proteômicos com a metodologia 2D-DIGE em plantas,

podendo ser citados como exemplo o estudo sobre alérgenos de variantes de amendoim (SCHIMDT et al., 2009) e morango (ALM et al., 2007), e o estudo proteômico sobre resposta ao stress por frio em *Arabidopsis thaliana* (AMME et al., 2006). Contudo, até o momento só foram publicados dois estudos sobre análise proteômica do amadurecimento, sobre o morango (BIANCO et al., 2009) e pêra (NILO et al. 2010).

Apesar de estarem sendo feitos muitos estudos com o uso de técnicas biotecnológicas com o objetivo de melhorar a qualidade da banana em vários aspectos (ARVANITOYANNIS et al., 2008), ainda há poucos estudos proteômicos com a bananeira, comentados anteriormente na introdução deste trabalho (CARPENTIER et al., 2007; SAMYN et al., 2006; CARPENTIER et al., 2005; SARAVAN; ROSE, 2004; DOMINGUEZ-PUIGJANER; VENDRELL; LUDEVID, 1992), e ainda não foi aplicada a metodologia 2D-DIGE para a banana.

4.5.1. Edição das imagens

Para que todas as imagens ficassem do mesmo tamanho e posicionamento dos *spots*, foi utilizado o recurso de recorte das imagens do software PDQuest. Foram selecionados o tamanho e posição da área a ser recortada e um *spot* foi selecionado como ponto de referência da imagem, sendo os parâmetros salvos e aplicados em todas as imagens.

4.5.2. Detecção e edição dos spots

Para a detecção e edição dos *spots* foram utilizados os mesmos parâmetros da análise preliminar, com a diferença de que durante a criação do *MatchSet*, cada imagem de gel foi agrupada com sua respectiva imagem de gel de padrão interno, para que pudesse ser feita a normalização. Outra diferença foi que na edição manual dos *spots*, além de eles deverem estar presentes em no mínimo dois géis das triplicatas de cada grupos de frutas, também deveriam estar presentes nas imagens dos padrões internos dos géis.

4.5.3. Perfil protéico obtido com a tecnologia DIGE

O perfil protéico obtido com a tecnologia DIGE foi semelhante ao obtido com coloração por Coomassie Brilliant Blue, porém ocorreu uma discreta diminuição na intensidade de algumas espécies de *spots*, como pode-se observar na figura 13. A tecnologia DIGE é 4 vezes mais sensível comparada à coloração com CBB G-250 coloidal, quando aplicada a mesma concentração de proteínas (TONGE et al., 2001). No entanto, na marcação das proteínas com marcação fluorescente foram utilizados 50 µg, já para os géis corados com CBB foram utilizados 500 µg de proteínas, ou seja, uma quantidade 10 vezes maior de proteínas. Dessa forma, a coloração com CBB permitiu maior visualização de *spots* a olho nu.

Figura 13. Imagens de géis bidimensionais. Amostras pré-climatéricas (A e B) e climatéricas (C e D). Proteínas marcadas com Cy3 (A e C) e coradas com Coomassie Brilliant Blue G-250 (B e D). A eletroforese bidimensional foi feita a partir da combinação de focalização isoeletrica em fitas de 24 cm com gradiente linear de pH 4 a 7, na primeira dimensão, e separação por SDS-PAGE 12,5% na segunda dimensão. A direção do gradiente de pH está indicada na parte superior dos géis. Foi usado marcador de peso molecular com bandas protéicas de 97 kDa a 14,4 kDa, cujas posições estão indicadas a esquerda dos géis.

Tonge et al., (2001), comparou os sistemas de detecção de proteínas através da coloração com prata e Coomassie coloidal (CBB-G250), com o sistema de marcação fluorescente 2D-DIGE, e observou que o sistema DIGE fornece mais confiabilidade na detecção da expressão diferencial de proteínas entre as amostras, devido ao fato de ser incluído o padrão interno no mesmo gel. Também observou que o sistema de marcação fluorescente com a combinação Cy3 e Cy5, apresentou menor variação entre os géis, ou seja, maior reprodutibilidade, mesmo quando os géis eram feitos por diferentes operadores ou em diferentes dias. Karp e Lilley (2005) também observaram que essa combinação de marcação fluorescente apresenta maior reprodutibilidade comparada às outras combinações, confirmando as observações de Tonge et al., em 2001.

A figura 14 mostra os géis obtidos e utilizados nas análises. Observa-se que os perfis obtidos entre os dois grupos de frutas são semelhantes, e é marcante a presença de proteínas muito abundantes com peso molecular de aproximadamente 30 kDa no grupo de frutas pré-climáticas, e também presentes no grupo de frutas climáticas, porém com intensidade bem menor, como já havia sido observado nos géis coloridos com Coomassie Brilliant Blue. É interessante notar que nos géis de padrão interno ocorre uma mistura dos perfis protéicos dos dois grupos de frutas. Os géis apresentaram reprodutibilidade entre os grupos de frutas e entre cada gel e seu respectivo padrão interno, com pequenas variações entre alguns géis, que como dito anteriormente, são inevitáveis. Essas variações são corrigidas pela normalização dos *spots*. Os géis obtidos apresentaram boa qualidade e puderam ser analisados pelo software.

Figura 14. Eletroforeses bidimensionais visualizadas por marcação fluorescente Cy3 e Cy5. Cada amostra foi marcada individualmente com Cy3, e os padrões internos foram marcados com Cy5. A figura está com a coloração invertida. Amostras pré-climáticas: amostragem 1 (A) e seu padrão interno (D); amostragem 2 (B) e seu padrão interno (E); amostragem 3 (C) e seu padrão interno (F). Amostras climáticas: amostragem 1 (G) e seu padrão interno (J); amostragem 2 (H) e seu padrão interno (K); amostragem 3 (I) e seu padrão interno (L). As eletroforeses bidimensionais foram obtidas a partir da combinação de focalização isoeétrica em fitas de 24 cm com gradiente linear de pH 4 a 7, na primeira dimensão, e separação por SDS-PAGE 12,5% na segunda dimensão.

4.5.4. Análise diferencial dos spots

Para a análise diferencial dos *spots* também foram utilizados os mesmos parâmetros da análise preliminar, porém, nas análises quantitativas optou-se pela detecção de *spots* com aumento a partir de 1,5 vezes, correspondente a um aumento de 50%.

No *match* foram detectados 168 *spots* comuns entre os grupos de géis da análise, esse número foi maior ao encontrado na análise preliminar, em que foram detectados 151 *spots*, o que comprova que o perfil obtido com a metodologia DIGE apresentou menos *spots* comparado ao obtido por coloração com Coomassie Brilliant Blue apenas quando visualizados a olho nu. Na análise quantitativa foram detectados 109 *spots*, e na análise do teste T foram selecionados 50 *spots*. Ao serem intersectadas as duas análises, quantitativa e teste T, foram selecionados os mesmos 50 *spots*. Foram selecionados pela análise qualitativa do grupo de frutas climatéricas 28 *spots*, mas ao ser intersectada com o teste T foram selecionados apenas 9 *spots*. Na análise qualitativa do grupo de frutas pré-climatéricas foram selecionados 5 *spots*, sendo estes 5 *spots* selecionados também pelo teste T. A figura 15 é uma imagem sobreposta (multicanal) de um dos géis de amostras pré-climatéricas e um dos géis de amostras climatéricas, destacando os 50 *spots* selecionados como diferencialmente expressos. Para a confecção da figura multicanal, optou-se pela coloração verde para os *spots* do gel de amostras pré-climatéricas, e coloração vermelha para os *spots* do gel de amostras climatéricas. Dessa maneira, os *spots* que apresentam coloração verde na figura estão mais expressos nas frutas pré-climatéricas, e os que apresentam coloração vermelha estão mais expressos nas frutas climatéricas. A tabela 3 apresenta os *spots* selecionados pela análise quantitativa e pelo teste T, separados dos *spots* selecionados na análise qualitativa e pelo teste T, que são apresentados na tabela 4.

Figura 15. Imagem bidimensional de um gel de amostras pré-climáticas e um gel de amostras climáticas sobrepostos (imagem multicanal). Em ambos os géis as amostras foram marcadas com o marcador fluorescente Cy3. Os *spots* com coloração verde estão mais abundantes nas amostras pré-climáticas, e os com coloração vermelha estão mais abundantes nas amostras climáticas. As setas destacam os *spots* selecionados pela análise do teste-T como diferencialmente expressos estatisticamente, os números são os números de identificação do *spot* gerados pelo software (SSP). As eletroforeses bidimensionais foram feitas a partir da combinação de focalização isoeétrica em fitas de 24 cm com gradiente linear de pH 4 a 7, na primeira dimensão, e separação por SDS-PAGE 12,5% na segunda dimensão.

Tabela 3 - Lista de *spots* de proteínas selecionados pelas análises quantitativa e pelo teste T.

SSP	Amostras pré-climatéricas	Amostras climatéricas	Razão C/PC	SSP	Amostras pré-climatéricas	Amostras climatéricas	Razão C/PC
1	8042.4	20429.9	2.54	4201	166.4	3280.1	19.72
204	4179.2	12691.1	3.04	4505	712,1	1327.2	1.86
1101	57755.7	4466.2	0.08	5101	11133.6	590.9	0.05
1803	29.3	215.7	7.37	5701	567.7	1202.9	2.12
1806	47.6	422.1	8.87	5916	16.5	35.9	2.18
2004	19879.8	59537.7	2.99	6103	6126.4	313.6	0.05
2103	24437.4	1619.1	0.07	6606	284.8	1649.5	5.79
2202	2000.7	10165.9	5.08	7002	498.9	3532.7	7.08
2203	1462.4	5937.4	4.06	7003	3339.6	7183.7	2.15
2502	770.1	3323.0	4.32	7408	191.9	717.3	3.74
2504	7190.5	16803.7	2.34	7703	543.7	201.7	0.37
2804	142.5	325.9	2.29	8301	201.1	788.8	3.92
3101	14494.2	768.5	0.05	8303	280.5	2556.5	9.11
3206	145.2	1150.9	7.93	8307	200.8	1621.7	8.08
3301	695,1	1054.3	1,52	8601	522.9	915.8	1.75
4101	29483.1	3332.6	0.11	8602	733.4	1116.4	1.52
4102	7746.4	378.6	0.05	8801	56.2	701.9	12.49
4104	22354.1	969.8	0.04	8827	62.5	750.1	12.00

- Na coluna SSP são apresentados os números de identificação dos *spots* atribuídos pelo programa.
- Nas colunas "amostras climatéricas" e "amostras pré-climatéricas" são apresentados os valores das médias de intensidade dos *spots* nos respectivos grupos de frutas.
- Nas colunas "Razão C/PC (C: amostras climatéricas, P: amostras pré-climatéricas)" são apresentados os valores das razões que indicam quantas vezes a intensidade dos *spots* no grupo de frutas climatéricas variou em relação à intensidade no grupo das pré-climatéricas.

Tabela 4 - Lista de *spots* de proteínas presentes apenas um dos estádios de maturação selecionados pelas análises qualitativa e pelo teste T.

SSP	Amostras pré-climatéricas	Amostras climatéricas
101	5265.2	-----
1304	-----	1567.4
2102	1880.1	-----
3102	9106.0	-----
3207	-----	1054.2
5911	-----	1355.7
6101	4830.2	-----
6802	-----	505.7
7202	710.8	-----
7301	-----	1698.8
7302	-----	1140.2
7806	-----	419.1
8104	-----	692.4
8802	-----	1141.1

- Na coluna SSP são apresentados os números de identificação dos *spots* atribuídos pelo programa.
- Nas colunas "amostras climatéricas" e "amostras pré-climatéricas" são apresentados os valores das médias de intensidade dos spots nos respectivos grupos de frutas.

Na figura 15, mencionada anteriormente, observa-se claramente a presença de proteínas muito abundantes na fase pré-climatérica, que foram selecionadas como diferencialmente expressas pelas análises, que são as mesmas proteínas já observadas nos géis corados com CBB, todas na faixa de peso molecular de 30kDa. Nota-se também que algumas proteínas apresentam coloração intensa na figura, o que indica que são mais abundantes em um determinado grupo de frutas, porém não foram selecionadas como diferencialmente expressas pelo teste-T. Esse fato ocorre porque para as análises foi feita uma média dos três valores do *spot* em questão entre as triplicatas do mesmo grupo, e depois então foi comparado esse valor e o seu desvio padrão, à média e o desvio padrão obtida do mesmo *spot* no outro grupo de frutas. Na imagem multicanal vemos sobrepostas apenas a imagem de um dos géis do grupo de frutas pré-climatéricas com a imagem de um dos géis do grupo de frutas climatéricas, que são representativos do experimento como um todo. Nesse caso, não está apresentada a imagem dos respectivos pools de cada gel. Contudo, os valores dos padrões internos foram utilizados para o *match* dos *spots* presentes nos géis do experimento, e foi calculada uma abundância padrão do volume de cada *spot*, que foi comparada entre os géis (KARP; LILLEY, 2005).

O número de proteínas identificadas pela análise é consistente quando comparado a um trabalho feito com pêra (PEDRESCHI et al., 2009), no qual foi utilizada a mesma combinação de marcadores fluorescentes, sendo selecionados 43 *spots* diferencialmente expressos. Porém, cada estudo proteômico é único, sendo a quantidade de proteínas selecionadas dependente dos parâmetros utilizados em cada análise, e do sistema biológico em questão. Também ocorrem variações de laboratório para laboratório, por variações técnicas, equipamentos e protocolos, além disso, a detecção da expressão diferencial de proteínas é dependente do software utilizado para as análises (KARP; LILLEY, 2005).

O número de *spots* selecionados como diferencialmente expressos na análise definitiva (50) é menor do que o número obtido na análise preliminar (79), porém os resultados obtidos na análise preliminar são menos confiáveis, pois foram realizados com apenas uma amostra biológica. Além disso, estão mais sujeitos a erros experimentais, pois não existe o padrão interno de cada gel para alinhamento e validação dos *spots*, e também para normalização dos valores das intensidades dos *spots*. Apesar disso, ao serem comparadas as duas análises, observam-se

vários *spots* indicados pelas duas, como mostram as figuras 16 e 17, reforçando os resultados obtidos pela análise DIGE.

Figura 16. Imagem comparativa entre a imagem multicanal (B), e a imagem de um gel bidimensional de uma amostra pré-climatérica com coloração por Coomassie Brilliant Blue G-250 (A). Na imagem A, os *spots* selecionados como diferencialmente expressos na análise preliminar, estão destacados por círculos, as setas destacam os *spots* também selecionados na análise definitiva realizada com a tecnologia 2D-DIGE. Na figura B estão destacados por setas os *spots* selecionados como diferencialmente expressos na análise definitiva. As eletroforeses bidimensionais foram feitas a partir da combinação de focalização isoelétrica em fitas de 24 cm com gradiente linear de pH 4 a 7, na primeira dimensão, e separação por SDS-PAGE 12,5% na segunda dimensão. A direção do gradiente de pH está indicada na parte superior dos géis. Foi usado marcador de peso molecular com bandas protéicas de 97 kDa a 14,4 kDa, cujas posições estão indicadas a esquerda dos géis.

Figura 17. Imagem comparativa entre a imagem multicanal (B), e a imagem de um gel bidimensional de uma amostra climatérica com coloração por Coomassie Brilliant Blue G-250 (A). Na imagem A, os *spots* selecionados como diferencialmente expressos na análise preliminar, estão destacados por círculos, as setas destacam os *spots* também selecionados na análise definitiva realizada com a tecnologia 2D-DIGE. Na figura B estão destacados por setas os *spots* selecionados como diferencialmente expressos na análise definitiva. As eletroforeses bidimensionais foram feitas a partir da combinação de focalização isoeletrica em fitas de 24 cm com gradiente linear de pH 4 a 7, na primeira dimensão, e separação por SDS-PAGE 12,5% na segunda dimensão. A direção do gradiente de pH está indicada na parte superior dos géis. Foi usado marcador de peso molecular com bandas protéicas de 97 kDa a 14,4 kDa, cujas posições estão indicadas a esquerda dos géis.

Para que as análises tivessem sido feitas com o método de coloração com CBB, além de serem necessárias replicatas biológicas, seriam necessárias replicatas de géis de cada replicata biológica, para garantir que a variação de abundância ou presença de *spots* não estivessem relacionadas às variações técnicas de um único gel. No entanto, quanto maior o número de replicatas de géis em um experimento, mais variações serão encontradas de gel para gel. As variações de gel para gel ocorrem devido a muitos fatores, como por exemplo, flutuações elétricas e de temperatura durante a corrida da eletroforese. Além disso, os métodos de coloração de proteínas resultam em variações na coloração de gel para gel (TIMMS; CRAMMER, 2008). O uso da tecnologia 2D-DIGE minimiza essas variações, aumentando a precisão e confiabilidade das análises.

A análise realizada com a tecnologia DIGE permitiu a seleção de *spots* de proteínas com variação de abundância que provavelmente desempenham função no processo de amadurecimento.

4.6. Proteínas identificadas

Das 50 proteínas selecionadas como diferencialmente expressas durante o amadurecimento da banana, 45 puderam ser extraídas dos géis de poliacrilamida para posterior sequenciamento por espectrometria de massas, e destas, 26 tiveram a provável identidade apontada pela comparação com o banco de dados MSDB empregando o software Mascot. Na tabela 5 são apresentados os resultados encontrados na busca no banco de dados.

Tabela 5 - Lista de proteínas identificadas.

Nº do spot	Identidade provável da proteína	Organismo	Código de acesso	Score	Nº de peptídeos combinados no MS/MS	pI teórico	Massa molecular teórica (Da)	Estádio do amadurecimento com maior abundância	Presença exclusiva no estágio
1	Proteína associada ao amadurecimento (fragmento)	<i>Musa acum inata</i> (banana)	O22322_MUSAC	194	7	6,7	21155	climatérico	
204	Suposta quitinase	<i>Musa acum inata</i> (banana)	Q8VXF0_MUSAC	163	5	6,84	34301	climatérico	
1101	Quitinase ácida da classe III	<i>Musa acum inata</i> (banana)	Q8QUK8_MUSAC	522	18	7,59	35275	pré-climatérico	
1304	Pectato liase (fragmento)	<i>Musa acum inata</i> (banana)	Q43783_MUSAC	94	2	6,51	44312		climatérico
2004	Proteína associada ao amadurecimento (fragmento)	<i>Musa acum inata</i> (banana)	O22322_MUSAC	255	5	6,67	21155	climatérico	
2103	Quitinase ácida da classe III	<i>Musa acum inata</i> (banana)	Q8QUK8_MUSAC	508	14	7,59	35732	pré-climatérico	
2202	Isoflavona redutase (fragmento)	<i>Musa acum inata</i> (banana)	Q8DQ90_MUSAC	133	2	5,38	20165	climatérico	
2203	Suposta quitinase	<i>Musa acum inata</i> (banana)	Q8VXF0_MUSAC	121	4	6,84	34301	climatérico	
2504	S-adenosil-L-homocisteína hidrolase	<i>Hordeum vulgare</i> (cevada)	Q4LB20_HORVU	496	11	5,81	49960	climatérico	
3101	Quitinase ácida da classe III	<i>Musa acum inata</i> (banana)	Q8QUK8_MUSAC	416	9	7,59	35732	pré-climatérico	
3102	Quitinase ácida da classe III	<i>Musa acum inata</i> (banana)	Q8QUK8_MUSAC	256	5	7,59	35732		pré-climatérico
3301	Malato desidrogenase	<i>Nicotiana tabacum</i> (tabaco)	Q9FSF0_TOBAC	153	3	5,91	35727	climatérico	
4101	Quitinase ácida da classe III	<i>Musa acum inata</i> (banana)	Q8QUK8_MUSAC	546	11	7,59	35732	pré-climatérico	
4102	Quitinase ácida da classe III	<i>Musa acum inata</i> (banana)	Q8QUK8_MUSAC	238	9	7,59	35732	pré-climatérico	
4104	Quitinase ácida da classe III	<i>Musa acum inata</i> (banana)	Q8QUK8_MUSAC	562	16	7,59	35732	pré-climatérico	
4505	ADP-glicosilase e pirofosforilase (subunidade pequena)	<i>Solanum tuberosum</i> (batata)	Q2PXI9_SOLTU	71	2	6,73	57545	climatérico	
5101	Quitinase ácida da classe III	<i>Musa acum inata</i> (banana)	Q8QUK8_MUSAC	103	3	7,59	35732	pré-climatérico	
5911	Amido fosforilase	<i>Ipomoea batatas</i> (batata doce)	T10947	90	2	5,26	109079		climatérico
6101	Quitinase ácida da classe III	<i>Musa acum inata</i> (banana)	Q8QUK8_MUSAC	158	5	7,59	35732		pré-climatérico
6103	Quitinase ácida da classe III	<i>Musa acum inata</i> (banana)	Q8QUK8_MUSAC	93	3	7,59	35732	pré-climatérico	
7003	Proteína associada ao amadurecimento (fragmento)	<i>Musa acum inata</i> (banana)	O22322_MUSAC	199	3	6,67	21155	climatérico	
7202	Quitinase ácida da classe III	<i>Musa acum inata</i> (banana)	Q8QUK8_MUSAC	61	3	7,59	35732		pré-climatérico
7302	1-aminociclopropano-1-carboxilato oxidase	<i>Musa acum inata</i> (banana)	Q8LC46_MUSAC	63	3	5,33	36256		climatérico
8801	Proteína de choque térmico de alto peso molecular	<i>Malus domestica</i> (maçã)	Q9M6R1_MALDO	147	5	5,17	71570	climatérico	
8802	Proteína de choque térmico 70	<i>Cucumis sativus</i> (pepino)	Q9M4E6_CUCSA	201	6	5,29	71183		climatérico
8827	Proteína de choque térmico 90	<i>Nicotiana tabacum</i> (tabaco)	Q8R0J1_TOBAC	171	3	4,95	80358	climatérico	

Como se pode observar na tabela 5 e figura 15, apresentada anteriormente, muitas proteínas foram identificadas em mais de um *spot*, apresentando diferenças de pI ou Mr. A presença de múltiplos *spots* pode ser causada por fatores como modificações pós-traducionais, isoformas de proteínas e degradação proteolítica (JORGE et al., 2005).

As modificações pós-traducionais são formadas por quebras proteolíticas ou adição de um grupo funcional a um ou mais aminoácidos, alterando suas propriedades. Exemplos dessas modificações são a fosforilação, metilação e glicosilação (MANN; JENSEN, 2003).

Em eucariotos superiores um só gene pode produzir diferentes isoformas de proteínas através de mecanismos de modificações durante a tradução do DNA, transcrição, ou pós-traducionais. As diferentes isoformas de proteínas podem desempenhar diferentes funções celulares (GODOVAC-ZIMMERMANN et al., 2005). As modificações pós-traducionais, por exemplo, determinam características como a compartimentação da proteína na célula, interações com outras proteínas, atividade e *turnover* (MANN; JENSEN, 2003).

A seguir serão discutidas as proteínas identificadas e suas prováveis implicações durante o amadurecimento da banana.

4.6.1. Quitinases

Dentre as proteínas identificadas, as proteínas mais abundantes foram as quitinases, tendo sido encontradas várias isoformas de quitinase ácida da classe III (*spots* 1101, 2103, 3101, 3102, 4101, 4102, 4104, 5101, 6101, 6103, 7202) na fase pré-climatérica, todas com peso molecular de aproximadamente 30 kDa. Também foram encontradas duas isoformas de uma suposta quitinase (*spots* 204 e 2203) que apresentaram aumento de abundância na fase climatérica. As proteínas quitinase ácida da classe III foram as únicas que apresentaram diminuição de abundância durante a fase climatérica, sendo visivelmente as proteínas mais abundantes na fase pré-climatérica.

As quitinases estão presentes em diversos organismos, como bactérias, vírus, fungos, animais e plantas, apresentando funções variadas de organismo para organismo. Nos animais e plantas, são proteínas que apresentam como função

principal a defesa contra patógenos, mas também tem sido demonstrado que podem estar envolvidas em processos de crescimento e desenvolvimento (KASPRZEWSKA 2003).

A função das quitinases durante o crescimento e o desenvolvimento de plantas ainda não está bem definida e pensava-se que estariam envolvidas com o mecanismo de defesa a possíveis ataques de patógenos (KASPRZEWSKA 2003). Atualmente, outras funções vêm sendo propostas, como, por exemplo, a atuação na regulação dos processos de crescimento e desenvolvimento através da geração ou degradação de moléculas sinalizadoras (GOORMACHTIG et al. 1998; VAN DER HOLST; SCHLAMMAN; SPAINK, 2001; CULLIMORE; RANJEVA; BONO, 2001), e como proteína de reserva (CLENDENNEN et al. 1997; PEUMANS et al. 2002; RAO; GOWDA, 2008).

As quitinases são classificadas como proteínas relacionadas à patogênese, ou proteínas PR. A expressão de genes codificadores de proteínas PR em plantas é induzida por ataques de patógenos, diversos fatores de *stress*, e reguladores de crescimento (KASPRZEWSKA 2003). No caso das quitinases existe ação antifúngica devido à ação de hidrólise da quitina, que é o principal componente da parede celular dos fungos, levando à lise celular (WONG et al. 2010).

A expressão das quitinases, é específica de órgãos e tecidos, ocorre em alguns estágios do desenvolvimento da planta, e dependendo do tipo de quitinase é constante, mesmo que em níveis baixos (CLENDENNEN et al. 1997, KASPRZEWSKA 2003). As quitinases da classe III são expressas em resposta a vários fatores de estresse, como ferimentos e patógenos, mas as proteínas PR também têm sido associadas com o amadurecimento de frutos (CLENDENNEN et al. 1997).

Semelhante ao que foi encontrado na presente análise proteômica, Clendennen e May (1997), encontraram em polpa de banana transcritos de quitinases apresentando diminuição na abundância durante o amadurecimento. Eles realizaram SDS-PAGE e western blot de proteínas totais extraídas da polpa da banana durante sete estágios do amadurecimento. Foi observada uma proteína muito abundante de 31 kDa na fase pré-climatérica, que apresentou diminuição da expressão no decorrer do amadurecimento. Foi realizado western blot para essa proteína na polpa da banana e em outros tecidos da bananeira (meristema, folha, casca, raiz e rizoma), porém a proteína se mostrou específica da polpa da banana.

O sequenciamento da proteína mostrou similaridade com quitinases da classe III de outras plantas. Segundo as características de proteínas de reserva, como as de serem muito abundantes e degradadas durante um estágio de desenvolvimento seguinte, os autores concluíram que além de servir como possível proteína de proteção durante o amadurecimento, a proteína poderia ter função de reserva durante o processo.

Peumans et al. (2002), confirmaram a possível função de proteína de reserva da quitinase da classe III sugerida por Clendennen e May (1997), e também demonstraram que a proteína não apresenta ação catalítica, o que indica que a proteína não apresenta função antifúngica e reforça a convicção de que a sua função é de atuar como proteína de reserva. Em abacaxi, a quitinase da classe III também não apresentou ação antifúngica (TAIRA et al., 2005).

As características de proteínas de reserva descritas por Clendennen e May (1997) e Peumans et al. (2002) também foram observadas no presente estudo proteômico. As isoformas de quitinase da classe III são muito abundantes na fase pré-climatérica da banana, ocorrendo uma diminuição de abundância, o que pode significar que tenham sido degradadas durante o processo, pois alguns desses *spots* da proteína quitinase da classe III desapareceram completamente na fase climatérica. Uma vez que na fase climatérica surgiram *spots* únicos e muitos outros apresentaram aumento de abundância, como detectado na análise com o uso do software PDQuest e teste-T, isso pode indicar que as quitinases da classe III foram degradadas e utilizadas como fonte de aminoácidos para a síntese *de novo* de proteínas necessárias para o amadurecimento (PEUMANS et al., 2002).

Também foram encontradas isoformas de uma possível quitinase (*spots* 204 e 2203) apresentando aumento na abundância durante a fase climatérica do amadurecimento da banana. Sabe-se que algumas quitinases são induzidas por etileno e que essa indução é independente da sua classificação (TAIRA et al., 2005), portanto, o aumento encontrado dessas isoformas pode estar relacionado ao aumento na concentração de etileno produzido durante o pico auto-catalítico no climatério. Como para essas possíveis quitinases não foi observado o desaparecimento característico de proteínas de reserva, pode-se supor que elas possam ter função de proteção contra patógenos durante o amadurecimento, ou tenham participação na resposta genérica ao *stress* desencadeada pelo etileno .

Apesar das evidências apontadas por outros autores já citados, a função de proteção de quitinases contra patógenos durante o amadurecimento da banana não pode ser totalmente descartada, ao menos para algumas formas dessa proteína. Foram isoladas de banana-ouro duas proteínas com seqüências homólogas a quitinases, que inibiram o crescimento do fungo *Fusarium oxysporum* (HO; NG, 2007). Quitinases com ação anti-fúngica também foram encontradas em frutas como o figo (LI et al., 2005), uva (FERNANDEZ-CABALLERO et al., 2009) e mamão papaia (CHEN et al., 2007).

Durante o amadurecimento de uvas, frutas não-climatéricas, foi detectada atividade de quitinases similares às quitinases da classe IV após o início do amadurecimento (*veráison*), continuando o aumento da atividade durante o amadurecimento (ROBINSON et al., 1997). O autor concluiu que as quitinases podem estar envolvidas no processo de crescimento ou desenvolvimento da uva, ou podem estar envolvidas na defesa contra patógenos após o *veráison*, momento em que ocorre aumento da suscetibilidade à infestação fúngica. Em outros estudos em uvas também foram detectadas quitinases em frutas maduras (POCOCK et al., 2000; SARRY et al., 2004; NEGRI et al., 2008).

Apesar do fato do acúmulo de quitinases após o início do amadurecimento em uvas sugerir que possam ter importância durante o processo, é difícil correlacionar seu papel com o amadurecimento da banana, que é uma fruta climatérica, pois não se pode descartar que não sejam apenas resposta genérica ao *stress* induzida pelo aumento de etileno durante o climatério.

4.6.2. Pectato liase

As pectato liases (PL, EC 4.2.2.2) catalisam a desesterificação da pectina (figura 18) (YADAV et al., 2009). A pectina é o componente principal da parede celular (CARPITA; GIBEAUT, 1993) e a lamela média é rica em pectina (TUCKER, 1993), e a sua degradação leva ao consequente amolecimento da fruta. Essa proteína também é produzida por patógenos de plantas e antigamente acreditava-se que não era produzida pelas plantas, mas a grande quantidade de seqüências de genes codificadores da pectato liase demonstram o contrário (MARÍN-RODRIGUEZ; ORCHARD; SEYMOUR, 2002).

Fig 18. Desesterificação da pectina pela pectato liase (Fonte: SOLBAK et al.,2005).

A proteína pectato liase (*spot 1304*) está presente apenas nas bananas climatéricas, o que confirma os resultados obtidos por Dominguez-Puigjaner et al. (1997), Payasi e Sanwall (2003) e Marín-Rodríguez et al. (2003). Dominguez-Puigjaner et al. (1997) isolaram um clone de cDNA que codifica uma proteína homóloga à pectato liase e através de análises com Northern, observaram que o mRNA correspondente à proteína começa a ser expresso no início do climatério e atinge sua expressão máxima no pico climatérico, declinando depois. Em 2003, Payasi e Sanwall observaram que não foi encontrada atividade da enzima em polpa de bananas pré-climatéricas, e que esta começou a apresentar atividade no início do climatério atingindo atividade máxima no pico respiratório. Marín-Rodríguez et al. (2003) encontraram dois transcritos diferentes correspondentes à pectato liase, presentes apenas na polpa e casca de bananas maduras. A atividade da enzima foi detectada apenas na polpa da fruta e se mostrou relacionada ao amadurecimento, apresentando aumento durante o processo. Concomitantemente, o nível de pectinas solúveis aumentou durante o amadurecimento, estando em maiores níveis na casca do que na polpa da banana, o que pode indicar correlação entre a atividade da enzima e a modificação da parede celular e lamela média.

Os resultados citados acima são sugestivos de que a síntese da pectato liase seja induzida pelo aumento na concentração de etileno, desempenhando um papel relevante no metabolismo da parede celular e lamela média da banana.

O tomate tem sido o fruto modelo para o estudo de modificação da parede celular durante o amadurecimento. Acreditava-se que a enzima poligalacturonase fosse a principal enzima responsável pelo amolecimento dos frutos, uma vez que é encontrada em grande quantidade no pericarpo de tomate maduro (MARÍN-RODRIGUEZ; ORCHARD; SEYMOUR, 2002). Porém, em estudos com tomates transgênicos em que foi suprimida a enzima, o amolecimento do fruto ocorreu normalmente (SMITH et al., 1990; SCHUCH et al., 1991). Em bananas, com semelhança ao que foi sugerido para o tomate, é possível que a enzima pectato liase tenha mais participação no amolecimento da fruta do que a poligalacturonase. Payasi e Sanwall (2003) mediram a atividade das duas enzimas na polpa da fruta durante o amadurecimento. A atividade da poligalacturonase aumentou gradativamente durante o amadurecimento, e continuou aumentando após o climatério. Em contrapartida, a atividade da pectato liase começou no início do climatério atingindo atividade máxima no pico respiratório climatérico, momento que corresponde ao ponto ótimo de consumo da fruta. Esses fatos mostram a importante função da enzima pectato liase no amolecimento da polpa da banana durante o amadurecimento.

4.6.3. Amido fosforilase

A proteína amido fosforilase ou α -1,4-glucano-fosforilase (EC 2.4.1.1) atua tanto na síntese quanto na degradação fosforolítica do amido. Na degradação do amido, catalisa a transferência reversível de α -1,4-glucano e fosfato inorgânico em glicose-1-fosfato (Glc-1-P) (figura 19), e na síntese do amido ocorre a reação inversa. A enzima existe em duas isoformas, a plastidial (fosforilase 1 – Pho1) e a citosólica (fosforilase 2 – Pho 2) (DA MOTA et al., 2002; MAINARDI et al., 2006; RATHORE et al., 2009).

Fig 19. Síntese e degradação do amido. Abreviações: Pho1, amido fosforilase plastidial; ADGP, ADP-glicose pirofosforilase; SS, amido sintases; SBE, enzimas ramificadoras do amido; DBE, enzimas desramificadoras do amido, isoamilase, dextrinase limitadora (fonte: RATHORE et al., 2009).

Como dito anteriormente, durante o amadurecimento da banana ocorre uma intensa conversão do amido em açúcares solúveis (CORDENUNSI; LAJOLO, 1995), que parece contar com a participação das fosforilases bem como das enzimas α e β -amilases (CORDENUNSI; LAJOLO, 1995; PURGATTO et al., 2001; NASCIMENTO et al., 2006; VIEIRA-JÚNIOR; NASCIMENTO; LAJOLO, 2006), e isoamilases (BIERHALS et al., 2004).

Da Mota et al. 2002 caracterizaram a atividade e a expressão de amido fosforilases durante o desenvolvimento e amadurecimento da banana, e foi

observado que no início da degradação do amido houve aumento concomitante da atividade da enzima. Mainardi et al. (2006) analisaram o efeito do etileno e do 1-MCP na expressão gênica, na atividade da enzima e na degradação do amido. A amido fosforilase apresentou sua atividade máxima no início da degradação do amido, e conforme o amido foi degradado houve diminuição na sua atividade, o que mostra que está relacionada ao processo. Os resultados mostraram que sua atividade é induzida durante o amadurecimento como consequência do aumento da expressão genética, que é responsiva ao etileno.

Na presente análise proteômica a proteína amido fosforilase (*spot 5911*) está presente apenas nas amostras climatéricas, reforçando o que foi proposto pelos outros autores com base nos resultados obtidos nos estudos citados acima.

A amido fosforilase encontrada no presente trabalho apresentou homologia com amido fosforilase de batata doce. Esse fato pode significar que tenha sido encontrada uma nova isoforma da enzima, ou que os peptídeos seqüenciados não estejam no trecho das seqüências de amido fosforilases de banana já depositadas no banco de dados. Por curiosidade, foi feita uma busca no blast p (ncbi) com os peptídeos identificados, mas também não houve identidade com as amido fosforilases de banana já descritas, mas com outras espécies de plantas. Citando alguns dos resultados na busca do blast p (ncbi) apresentando maior taxa de score, ocorreu identidade de amido fosforilase de algodão (código de acesso ACJ11757.1, dados não publicados) e amido fosforilase plastidial de cevada (código de acesso CAX51383.1, RADCHUCK et al., 2009).

4.6.4. ADP-glicose pirofosforilase (subunidade pequena)

A proteína ADP-glicose pirofosforilase (AGPase; EC 2.7.7.27) catalisa a formação de ADP-glicose de glicose-1-fosfato e ATP. Dessa forma a enzima participa da síntese do amido (figura 19 apresentada anteriormente), porque a amilose e a amilopectina são sintetizadas a partir da ADP-glicose (MARTIN; SMITH, 1995). A enzima possui duas subunidades grandes e duas pequenas, e em plantas são codificadas por diferentes genes, cada um responsável por uma subunidade da enzima (KIM; KAHNG; CHUNG, 1998). Na presente análise proteômica foi identificada uma subunidade pequena da enzima.

A proteína ADP-glicose pirofosforilase (*spot* 4505) foi detectada nas fases pré-climatérica e climatérica, porém apresentou um pequeno aumento na fase climatérica. O padrão de expressão encontrado não condiz com o que se sabe sobre o amadurecimento da banana, pois como dito anteriormente, o amido é degradado rapidamente durante o amadurecimento da banana, sendo utilizado na síntese de açúcares solúveis. Portanto, não seria de se esperar um aumento dessa proteína no climatério, mas sim na fase de desenvolvimento do fruto, quando ocorre a síntese de amido. No entanto, têm sido descritas a ocorrência de degradação e síntese de amido concomitantemente no amiloplasto em tomate, pêra, banana e batata (NGUYEN-QUOC; FOYER, 2001).

O comportamento de expressão da AGPase parece variar de acordo com o organismo, tecido e estágio de desenvolvimento. Kim, Kahng e Chung (1998), isolaram clones de cDNA de genes codificadores de três subunidades da AGPase de melancia durante o amadurecimento. O nível de expressão dos genes correspondentes às respectivas subunidades da proteína foi verificado através de análises de northern blot, e apresentaram diminuição do estágio verde (small green) para verde mediano (medium green), e aumento durante o amadurecimento da fruta. Segundo os autores, em um estudo em melão oriental, com dados não publicados, foi observada diminuição na expressão de genes codificadores de duas subunidades da enzima durante o amadurecimento, comportamento diferente do observado em melancia. Em tomates a expressão de três genes codificadores de três isoformas de subunidade grande da AGPase apresentaram diferenças de acordo com o tecido (fruta, folhas, caule e raiz) e estágio de desenvolvimento. Um dos genes não apresentou expressão no fruto (*AgpL3*). O gene *AgpL1* foi expresso durante o amadurecimento, diminuindo seu nível de expressão durante o processo, e o gene *AgpL2* foi expresso a níveis baixos em todas as fases do amadurecimento (PARK; CHUNG, 1997).

Até o momento, o presente trabalho é o único estudo que mostra a presença de uma subunidade da enzima durante o amadurecimento da banana, sendo necessárias mais pesquisas para o entendimento de sua participação durante o amadurecimento da fruta, uma vez que os teores de amido são reduzidos significativamente.

O *spot* identificado apresenta o tamanho da subunidade identificada tanto na fase pré-climatérica quanto na fase climatérica, o que mostra que o aumento da sua

abundância na fase climatérica não foi causado por degradação proteolítica da proteína.

4.6.5. ACC oxidase

A proteína ACC oxidase participa da via de biossíntese de etileno, hormônio cujo “pico” na concentração é necessário para o amadurecimento normal em frutos climatéricos (ALEXANDER; GRIERSON, 2002). Para a biossíntese do etileno, a proteína ACC sintase faz a conversão da S-adenosilmetionina (SAM) em ácido carboxílico 1-aminociclopropano (ACC), que então é oxidado a etileno pela ACC oxidase (figura 20) (TUCKER 1993; PRASANNA; PRABHA; THARANATHAN, 2007).

Fig. 20. Ciclo de biossíntese do etileno (Fonte: PRASANNA; PRABHA; THARANATHAN, 2007).

Há dois sistemas de biossíntese de etileno descritos na literatura. O sistema 1 está relacionado à produção basal de etileno que ocorre durante o amadurecimento de frutos não-climatéricos e durante a fase pré-climatérica do amadurecimento de frutos climatéricos. O sistema 2 está relacionado à síntese auto-catalítica de etileno, que ocorre nos frutos climatéricos (BAPAT et al., 2010). O pico de síntese auto-catalítica de etileno acelera e coordena o amadurecimento dos frutos climatéricos (ALEXANDER; GRIERSON 2002).

Em 1997, Huang e colaboradores caracterizaram e isolaram o gene *MAO2* de casca de banana, responsável pela codificação da *ACC oxidase*. Análises de expressão por Northern blot demonstraram que a maior parte do mRNA do gene foi acumulada após o início do amadurecimento, e sua expressão foi induzida por 1 µL/L de etileno exógeno e saturou quando o etileno estava na concentração de 100 µL/L, o que estava de acordo com o fato reportado de que baixas concentrações

de etileno são necessárias para o início da síntese auto-catalítica de etileno e início do amadurecimento da banana.

Em 2005, Do e colaboradores caracterizaram dois genes responsáveis pela codificação de ACC oxidases, os genes *Mh-ACO1* e *Mh-ACO2*. Foram realizadas análises de Northern blot a partir de mRNA extraídos de casca e polpa da banana em diferentes estágios do amadurecimento. Não foi encontrado mRNA do gene *Mh-ACO1* na fase pré-climatérica, e durante o amadurecimento os transcritos de ambos os genes foram aumentando sua expressão, porém os codificados pelo gene *Mh-ACO2* apresentaram maior nível de expressão durante o progresso do amadurecimento. A aplicação de 1 µL/L de etileno exógeno foi suficiente para a expressão do gene *Mh-ACO2*, mas não do gene *Mh-ACO1*. Os resultados indicam que cada gene codifica diferentes isoformas com diferentes participações nos sistemas 1 e 2 da biossíntese de etileno.

Os resultados dos estudos citados acima ilustram a presença das diferentes isoformas da proteína ACC oxidase nos diferentes estágios do amadurecimento da banana. Na presente análise proteômica, a proteína ACC oxidase (*spot 7302*) está presente apenas nas amostras de bananas climatéricas, o que nos leva a supor que esta seja uma isoforma envolvida na biossíntese auto-catalítica do etileno.

Foi realizada uma busca no blast p (ncbi) com os peptídeos identificados, e houve identidade com a proteína codificada pelo gene *MAO2* de banana (*Musa acuminata*, código de acesso AAR00930.1, dados não publicados), apresentando o maior valor de score entre os resultados obtidos, confirmando a suposição de que se trata de uma isoforma envolvida na biossíntese auto-catalítica do etileno.

4.6.6. Proteína de choque térmico

Nesse trabalho foram encontradas três proteínas de choque térmico (HSP, do inglês *heat shock protein*), cujas denominações são feitas de acordo com seus pesos moleculares: *HSP de alto peso molecular* (*spot 8801*, nível de expressão aumentada na fase climatérica), *HSP 70* (*spot 8802*, expressão presente apenas na fase climatérica), *HSP 90* (*spot 8827*, nível de expressão aumentada na fase climatérica).

As diversas classes de HSPs estão relacionadas a respostas a diversos tipos de stress em plantas (GUARINO et al., 2007), e parecem ser sintetizadas em

resposta a mudanças de temperatura, tanto para o frio quanto para o calor (MUCCILLI et al., 2009). Contudo, as HSPs também têm sido associadas e encontradas em frutos durante o amadurecimento (FAUROBERT et al., 2007; Bianco et al., 2009; MUCCILLI et al., 2009; DEYTIEUX et al., 2007; NEGRI et al., 2008; GIRIBALDI et al., 2007; GUARINO et al., 2007).

As HSPs normalmente estão envolvidas na estabilização da estrutura protéica durante o desenvolvimento das plantas, e em diferentes formas de estímulos em condições não estressantes (MUCCILLI et al., 2009). Em 2005, da Silva e colaboradores propuseram que o aumento de várias HSPs durante o *véraison* em uvas poderia estar relacionado à necessidade de estabilização de proteínas antigas e recém-sintetizadas. Essa parece ser uma boa explicação para a função dessas proteínas durante o amadurecimento, e está de acordo com o aumento na abundância dessas proteínas que vem sendo encontrado durante o amadurecimento das uvas e outras frutas, e no presente estudo proteômico, e provavelmente esta possa ser a função das HSPs identificadas na banana.

4.6.7. Malato desidrogenase

A enzima malato desidrogenase (MDH, E.C. 1.1.1.37) catalisa a conversão reversiva de oxaloacetato em malato, podendo atuar na síntese (figura 21) ou na degradação do malato. A enzima utiliza o sistema NAD/NADH, necessitando do NAD ou NADP como cofator (MINÁRIK et al., 2002; SWEETMAN et al., 2009). Em plantas existem várias isoformas da enzima, existindo em quase todos os compartimentos celulares (SWEETMAN et al., 2009).

Fig 21. Síntese do malato catalisada pela malato desidrogenase.

A quantidade de ácidos orgânicos na polpa da fruta influencia seu sabor, e durante o amadurecimento da banana ocorre aumento da acidez (SEYMOUR, 1993). Na polpa da banana, o ácido málico (malato na forma ionizada no pH celular) é o principal ácido orgânico e aumenta durante o amadurecimento, mesmo na fase climatérica (PAYASI; SANWAL, 2005; SWEETMAN et al., 2009).

O ácido málico parece ser o principal ácido orgânico utilizado como substrato respiratório (TUCKER, 1993), porém o seu acúmulo ou degradação não está relacionado ao comportamento climatérico ou não-climatérico dos frutos. Alguns frutos climatéricos parecem utilizar o ácido málico durante o pico respiratório, como por exemplo, o tomate, enquanto outros não, como a banana e a manga (SWEETMAN et al., 2009).

Na presente análise proteômica, a enzima malato desidrogenase apresentou abundância aumentada durante a fase climatérica (*spot 3301*). Ainda não há estudos descritos sobre essa enzima durante o amadurecimento da banana, mas o aumento de sua abundância na fase climatérica sugere que esteja sendo diferencialmente expressa na polpa da fruta, o que é uma informação inédita e importante. Levando em consideração que o ácido málico aumenta durante o amadurecimento da banana e que parece não ser utilizado como substrato respiratório, a enzima parece ter a função de síntese do ácido, que dará importante contribuição a composição do sabor da fruta madura.

O sabor da banana é composto por um equilíbrio entre a adstringência atribuída pelos taninos, acidez atribuída pelos ácidos orgânicos, e sabor doce atribuído pelos açúcares solúveis (AWAD, 1993). A enzima malato desidrogenase pode ser um futuro alvo de manipulação para melhora da qualidade da fruta, com o objetivo de atribuir maior ou menor teor de acidez na composição do sabor da banana.

4.6.8. Isoflavona redutase

A enzima isoflavona redutase (IFR) é uma enzima chave na biossíntese de fitoalexinas isoflavonóides (figura 22), que são compostos anti-microbianos de baixo peso molecular, produzidos pelas plantas em resposta a estresses bióticos e abióticos, ataque de patógenos e moléculas elicitoras. As moléculas elicitoras são produzidas por patógenos e plantas hospedeiras e levam à ocorrência de uma

resposta de defesa na planta. Como exemplos desse tipo de moléculas podem ser citados alguns peptídeos, lipídeos, oligossacarídeos e glicoproteínas (KIM et al., 2003).

Fig. 22. Biossíntese de isoflavonóides, no exemplo o isoflavonóide medicarpina. Abreviações: PAL, L-fenilalanina amônia-liase; C4H, cinamato 4-hidroxilase; 4CL, 4-cumarato CoA-ligase; CHS, chalcona sintase; CHR, chalcona redutase; CHI, chalcona isomerase; 2-HIS, isoflavona sintase ou 2-hidroxiisoflavanona sintase; 2-HID, 2-hidroxiisoflavanona desidratase; IOMT, isoflavona-O-metiltransferase; 12'H, isoflavona 2'-hidroxilase; IFR, isoflavona redutase; VR, vestitone redutase; DMID, 7,2'-dihidroxi-4'-metoxiisoflavanol desidratase (Fonte: WANG 2010).

Além do papel na defesa vegetal, os isoflavonóides são importantes na nutrição humana e animal, e trazem benefícios importantes como atividade antioxidante, anti-câncer, estrogênica e antiangiogênica (DIXON; STEELE, 1999; WANG, 2010).

Em uva, fruta não-climatérica, a enzima foi encontrada em frutos maduros (SARRY et al., 2004) a partir de estudos proteômicos e durante o amadurecimento em frutos (GIRIBALDI et al., 2007) e pericarpo (NEGRI et al., 2008). Também em morango, outra fruta não-climatérica, foi notado aumento na abundância durante o amadurecimento (BIANCO et al., 2009).

No presente estudo, a enzima IFR apresentou aumento na abundância durante a fase climatérica (*spot* 2202). Em 2006, Gupta e colaboradores encontraram transcritos na polpa da banana de um gene *isoflavone reductase like* com expressão aumentada durante o amadurecimento, altamente responsivo à exposição ao etileno, tendo sido ativado após dez minutos de exposição, e permaneceu com o nível alto de expressão após o pico de síntese auto-catalítica de etileno. Este trabalho foi o primeiro a reportar a presença desse gene durante o amadurecimento da banana, e agora, a presente análise proteômica veio confirmar a presença dessa proteína durante o amadurecimento da fruta.

Levando em consideração que durante o amadurecimento ocorre aumento da susceptibilidade a patógenos (GIOVANNONI, 2001), o aumento da abundância da enzima durante o amadurecimento de frutas pode ter função de proteção contra possíveis ataques durante essa fase suscetível do fruto. Na banana, uma outra hipótese seria a indução do aumento da expressão da enzima em resposta ao aumento na concentração do etileno durante o climatério da banana, pois o etileno também é regulado em situações de *stress* bióticos e abióticos (LIN; ZHONG; GRIERSON, 2009).

Devido aos benefícios que os isoflavonóides proporcionam para a saúde humana, a detecção da enzima participante da via de biossíntese desses compostos na banana é importante, e pode vir a ter aplicações biotecnológicas futuras, como por exemplo, o melhoramento genético de frutas com maior teor de isoflavonóides. Nesse sentido, a identificação da IFR como uma das enzimas moduladas durante o processo de amadurecimento da banana pode ser uma informação importante.

4.6.9. S-adenosil-L-homocisteína hidrolase (adenosilhomocisteinase)

A enzima S-adenosil-L-homocisteína hidrolase (SAHH, EC 3.3.1.1) catalisa a hidrólise reversível de S-adenosil-L-homocisteína em adenosina e L-homocisteína (DE LA HABA; CANTONI, 1959). Dessa forma, a enzima regula os processos de metilação nas células, já que a S-adenosil-L-homocisteína é subproduto das reações de metilação dependentes da S-adenosil-L-metionina (SAM), que é um dos principais doadores de grupos metil. A S-adenosil-L-homocisteína é formada durante a transferência de grupo metil, agindo como inibidora competitiva de

metiltransferases SAM-dependentes (TANAKA et al., 1997; BRZEZINSKI, BUJACZ, JASKOLSKI, 2008).

A atenuação da enzima SAHH pode afetar a metilação de proteínas, DNA, RNA, fosfolipídeos e pequenas moléculas. No entanto a SAM tem como uma das principais funções a metilação de ácidos nucleicos (CHIANG, 1998). O composto SAM também está relacionado com a biossíntese de etileno sendo utilizada como molécula precursora, e na metilação do DNA como doadora do radical metil (HADFIELD, DANDEKAR, ROMANI, 1992).

Para a investigação do envolvimento da enzima SAHH na metilação do DNA, Tanaka e colaboradores (1997), utilizaram tabaco transgênico expressando RNA antisenso da SAHH, diminuindo os transcritos da enzima. A diminuição nos mRNA da SAHH foi confirmada por análises Northern blot. A consequência da diminuição dos transcritos da enzima foram diversas alterações morfológicas, como por exemplo, diminuição no tamanho das plantas, mudança de cor nas folhas, atraso na senescência, anormalidade nas flores e produção de pólen infértil. Nos tabacos transgênicos foi observada diminuição na metilação do DNA. Os resultados do estudo demonstram a importância da enzima na regulação da expressão genética.

Durante o amadurecimento ocorre aumento na expressão de determinados genes e supressão de outros (GIOVANNONI, 2004), e a metilação do DNA é um mecanismo associado à repressão de genes (GIBNEY; LONAN, 2010). Em tomates foi investigada a metilação dos genes codificadores da poligalacturonase e da celulase em estádios progressivos do amadurecimento, e foi observada diminuição da metilação desses genes no início do amadurecimento (HADFIELD, DANDEKAR, ROMANI, 1992). Ainda em tomates foi observado que a metilação do DNA é específica do tecido, ocorrendo uma grande redução no nível de metilação do DNA no pericarpo, já no tecido locular não foi observada alteração (TEYSSIER et al. 2008). No presente estudo proteômico, a enzima apresentou abundância aumentada na fase climatérica (spot 2504), podendo estar envolvida na regulação genética durante o climatério inibindo a metilação de determinados genes.

5. CONCLUSÃO

O presente estudo proteômico possibilitou a identificação de proteínas que apresentam provável função durante o amadurecimento da banana e podem estar relacionadas com processos bioquímicos relacionados com a qualidade da fruta. A malato desidrogenase e a pectato liase estão envolvidas diretamente na qualidade da fruta, afetando o sabor e a textura, respectivamente. A identificação da amido fosforilase na fase climatérica veio confirmar resultados de estudos anteriores que sugerem que essa enzima contribua para a mobilização do amido e síntese de açúcares solúveis.

Foi possível a identificação de várias isoformas de quitinases ácidas da classe III, proteínas que apresentaram características de proteínas de reserva, estando muito abundantes na fase pré-climatérica, e diminuindo ou sumindo completamente na fase climatérica, dependendo do spot. Também foi encontrada uma possível quitinase que apresentou aumento na abundância durante a fase climatérica, podendo ter ação antifúngica. Ainda com relação à resposta ao stress, foi identificada pela primeira vez uma proteína isoflavona redutase de banana, o que pode futuramente ter aplicações biotecnológicas não apenas para a resistência do fruto, mas também para o desenvolvimento de uma fruta com alto teor de isoflavonóides, importantes para a saúde humana. Foram identificadas também proteínas que podem ter participação importante e ampla nas mudanças de expressão genética durante o amadurecimento. As proteínas de choque térmico que apresentaram maior abundância na fase climatérica com possível função de estabilização proteica de proteínas antigas e recém-sintetizadas, e a enzima S-adenosil-L-homocisteína hidrolase que provavelmente age na regulação genética por meio da inibição da metilação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEXANDER, L.; GRIERSON, D. Ethylene biosynthesis and action in tomato: a model for climacteric fruit ripening. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, p. 2039-2055, 2002.

ALM, R.; EKEFJÄRD, A.; KROG, M.; HÄKKINEN, J.; EMANUELSSON, C. Proteomic variation is as large within as between strawberry varieties. **Journal of Proteome Research**, v. 6, p. 3011-3020, 2007.

ALÓS, E.; ROCA, M.; IGLESIAS, D.J.; MÍNGUEZ-MOSQUERA, M. I.; DAMASCENO, C.M.B.; THANNHAUSER, T.W.; ROSE, J.K.C.; TALÓN, M.; CERCOS, M. An Evaluation of the Basis and Consequences of a Stay-Green Mutation in the navel negra Citrus Mutant Using Transcriptomic and Proteomic Profiling and Metabolite Analysis. **Plant Physiology**, v. 147, p. 1300-1315, 2008.

AMME, S.; MATROS, A.; SCHLESIER, B.; MOCK, H. Proteome analysis of cold stress response in *Arabidopsis thaliana* using DIGE-technology. **Journal of Experimental Botany**, vol. 57, p. 1537–1546, 2006.

ARIAS, P.; DANKERS, C.; LIU, P.; PILKAUSKAS, P. The World Banana Economy, 1985-2002. **Food and Agriculture Organization of the United Nations**. Rome, 2003, cap 1. Disponível em: <<http://www.fao.org/kids/en/index.html>>. Acesso em: 6 julho 2010.

ARÊAS, J. A. G.; LAJOLO, F. M. Starch transformation during banana ripening: I. the phosphorylase and phosphatase behavior in *Musa acuminata*. **Journal of Food Biochemistry**, vol. 5, p. 19-37, 1981.

ARTHUR, J.M. Proteomics. **Current Opinion in Nephrology and Hypertension**, v. 12, p. 423-430, 2003.

ARVANITOYANNIS, I.S.; MAVROMATIS, A.G.; GRAMMATIKAKI-AVGELI, G.; SAKELLARIOU, M. Banana: cultivars, biotechnological approaches and genetic Transformation. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 43, p. 1871–1879, 2008.

AWAD, M. **Fisiologia pós-colheita de frutos**. São Paulo, Ed. Nobel, 1993.

¹ As referências bibliográficas estão de acordo com a norma NBR6023/2002 preconizada pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT)

BAPAT, V.A.; TRIVEDI, P.K.; GHOSH, A.; SANE, V.A.; GANAPATHI, T.R.; NATH, P. Ripening of fleshy fruit: Molecular insight and the role of ethylene. *Biotechnology Advances*, v. 28, p. 94–107, 2010.

BEAUDRY, R.M.; PAZ, R.M.; BLACK, C.C.; KAYS, S.J. Banana Ripening: Implications of Changes in Internal Ethylene and CO₂ Concentrations, Pulp Fructose 2,6-Bisphosphate Concentration, and Activity of Some Glycolytic Enzymes. **Plant Physiology**, v. 85, p. 277-282, 1987.

BERKELMAN, T.; BRUBACHER, M.G.; CHANG, H. Prevention of Vertical Streaking. **Bio-rad laboratories – Tips and Techniques**, Alfred Nobel Drive, Hercules, EUA, 2000.

BIANCO, L.; LOPEZ, L.; SCALONE, A.G.; DI CARLI, M.; DESIDERIO, A.; BENVENUTO, E.; PERROTTA, G. Strawberry proteome characterization and its regulation during fruit ripening and in different genotypes. **Journal of Proteomics**, v. 72, p. 586-607, 2009.

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**, 52, 7412–7418, 2004.

BORSANI, J.; BUDDE, C.O.; PORRINI, L.; LAUXMANN, M.A.; LOMBARDO, V.A.; MURRAY, R.; ANDREO, C.S.; DRINCOVICH, M.F.; LARA, M.V. Carbon metabolism of peach fruit after harvest: changes in enzymes involved in organic acid and sugar level modifications. **Journal of Experimental Botany**, v. 60, p. 1823-1837, 2009.

BRZEZINSKI, K.; BUJACZ, G.; JASKOLSKI, M. Purification, crystallization and preliminary crystallographic studies of plant S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase (*Lupinus luteus*). **Acta Crystallographica**, v. 64, p. 671–673, 2008.

CAPE, J. N. Effects of airborne volatile organic compounds on plants. **Environmental Pollution**, v. 122, p. 145–157, 2003.

CAPRIOLI, I.; LAFUENTE, M.T.; RODRIGO, M.J.; MENCARELLI, F. Influence of Postharvest Treatments on Quality, Carotenoids, and Abscissic Acid Content of tored “Spring Belle” Peach (*Prunus persica*) Fruit. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 57, p. 7056–7063, 2009.

CARPITA, N.C.; GIBEAUT, D.M. Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. **The Plant Journal**, v. 3, p. 1-30, 1993.

CARPENTIER, S.C.; WITTERS, E.; LAUKENS, K.; DECKERS, P.; SWENNEN, R.; PANIS, B. Preparation of protein extracts from recalcitrant plant tissues: An evaluation of different methods for two-dimensional gel electrophoresis analysis. **Proteomics**, v. 5, p. 2497-2507, 2005.

CARPENTIER, S.C.; WITTERS, E.; LAUKENS, K.; ONCKELEN, H.V.; SWENNEN, R.; PANIS, B. Banana (*Musa* spp.) as a model to study the meristem proteome: Acclimation to osmotic stress. **Proteomics**, v. 7, p. 92-105, 2007.

CARPENTIER, S.C.; PANIS, B.; VERTOMMEN, A.; SWENNEN, R.; SERGEANT, K.; RENAUT, J.; LAUKENS, K.; WITTERS, E.; SAMYN, B.; DEVREESE, B. Proteome analysis of non-model plants: a challenging but powerful approach. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 27, p. 354– 377, 2008.

CERCO'S, M.; SOLER, G.; IGLESIAS, D.J.; GADEA, J.; FORMENT, J.; TALO, M. Global analysis of gene expression during development and ripening of citrus fruit flesh. A proposed mechanism for citric acid utilization **Plant Molecular Biology**, v. 62, p. 513–527, 2006.

CHAUHAN, O.P.; RAJU, P.S.; DASGUPTA, D.K.; BAWA, A.S. Instrumental textural changes in banana (var. pachbale) during ripening under active and passive modified atmosphere. **International Journal of Food Properties**, v. 9, p. 237–253, 2006.

CHEN, S.; HARMON, A.C. Advances in plant proteomics. **Proteomics**, v. 6, p. 5504-5516, 2006.

CHEN, Y.; HSU, L.; HUANG, I.; TSAI, T.; LEE, G.; SHAW, J. Gene cloning and characterization of a novel recombinant antifungal chitinase from papaya (*carica papaya*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 714, 722, 2007.

CHIANG, P. K. Biological Effects of Inhibitors of S-Adenosylhomocysteine Hydrolase. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 77, p. 115–134, 1998.

CHITARRA, A.B. Histórico da pós-colheita no Brasil. **Tópicos em qualidade e pós-colheita de frutas (Temas e calidad y postcosecha de frutos)**, Centro APTA Citros Sylvio Moreira, p. 3-8, 2008.

CHOUDHURY, S.R.; ROY, S.; SAHA, P.P.; SINGH, S.K.; SENGUPTA, D.N. Characterization of differential ripening pattern in association with ethylene biosynthesis in the fruits of five naturally occurring banana cultivars and detection of a GCC-box-specific DNA-binding protein. **Plant Cell Reports**, v. 27, p. 1235–1249, 2008.

CLENDENNEN, S.K.; MAY, C.D. Differential gene expression in ripening banana fruit. **Plant Physiol.**, v. 115, p. 463-469, 1997.

CLENDENNEN, S.K.; LOPEZ-GOMEZ, R.; GOMEZ-LIM, M.; ARNTZEN, C.J.; MAY, G.D. The abundant 31-kilodalton banana pulp protein is homologous to class-III acidic chitinases. **Phytochemistry**, v. 47, p. 613-619, 1997.

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.

CULLIMORE, J.V.; RANJEVA, R.; BONO, J.-J. Perception of lipochitooligosaccharidic Nod factors in legumes. **Trends Plant Sci.**, v. 6, p. 24-30, 2001.

CUSHMAN, J.C.; COOK, D.R. Characterizing the grape transcriptome. Analysis of expressed sequence tags from multiple *Vitis* species and development of a compendium of gene expression during berry development. **Plant Physiology**, v. 139, p. 574-597, 2005.

DA SILVA, F.G.; LANDOLINO, A.; AL-KAYAL, F.; BOHLMANN, M.C.; CUSHMAN, M.A.; LIM, H.; ERGUL, A.; FIGUEROA, R.; KABULOGLU, E.K.; OSBORNE, C.; ROWE, J.; TATTERSALL, E.; LESILE, A.; XU, J.; BEAK, J.M.; CRAMER, G.R.; DER AGOPIAN, R.G.; SOARES, C.A.; PURGATTO, E.; CORDENUNSI, B.R.; LAJOLO, F.M. Identification of fructooligosaccharides in different banana cultivars. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 3305-3310, 2008.

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

DER AGOPIAN, R.G.; PURGATTO, E.; CORDENUNSI, B.R.; LAJOLO, F.M. Synthesis of fructooligosaccharides in Banana 'Prata' and Its Relation to Invertase Activity and Sucrose Accumulation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 10765–10771, 2009.

DEYTIEUX, C.; GENY, L.; LAPAILLERIE, D.; CLAVEROL, S.; BONNEU, M.; DONÈCHE, B. Proteome analysis of grape skins during ripening. **Journal of Experimental Botany**, v. 58, p. 1851–1862, 2007.

DIXON, R.A.; STEELE, C.L. Flavonoids and isoflavonoids - a gold mine for metabolic engineering. **Trends in plant science**, v. 4, p. 394-400, 1999.

DO, Y.; THAY, T.; CHANG, T.; HUANG, P. Molecular Cloning and Characterization of A Novel 1-Aminocyclopropane-1-carboxylate Oxidase Gene Involved in Ripening of Banana Fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 8239-8247, 2005.

DOMINGUEZ-PUIGJANER, E.; VENDRELL, M.; LUDEVID, M.D. Differential Protein Accumulation in Banana Fruit during Ripening. **Plant Physiology**, v. 98, p. 157-162, 1992.

DOMINGUEZ-PUIGJANER, E.; LLOP, L.; VENDRELL, M.; PRAT, S. A cDNA Clone Highly Expressed in Ripe Banana Fruit Shows Homology to Pectate Lyase. **Plant Physiology**, v. 114, p. 1071-1076, 1997.

FABI, J.P.; CORDENUNSI, B.R.; BARRETO, G.P.M.; MERCADANTE, A.Z.; LAJOLO, F.M.; NASCIMENTO, J.R.O. Papaya Fruit Ripening: Response to Ethylene and 1-Methylcyclopropene (1-MCP). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 6118-6123, 2007.

FAUROBERT, M.; MIHR, C.; BERTIN, N.; PAWLOWSKI, T.; NEGRONI, L.; SOMMERER, N.; CAUSSE, M. Major Proteome Variations Associated with Cherry Tomato Pericarp Development and Ripening. **Plant Physiology**, vol. 143, p. 1327-1346, 2007.

FERNANDEZ-CABALLERO, C.; ROMERO, I.; GON, O.; ESCRIBANO, M.I.; MERODIO, C.; SANCHEZ-BALLESTA, M.T. Characterization of an Antifungal and Cryoprotective Class I Chitinase from Table Grape Berries (*Vitis vinifera* Cv. Cardinal). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 8893–8900, 2009.

FUKUSHIMA, A.; KUSANO, M.; REDESTIG, H.; ARITA, M.; SAITO, K. Integrated omics approaches in plant systems biology. **Current Opinion in Chemical Biology**, vol. 13, p. 532–538, 2009.

GIBNEY, E.R.; NOLAN, C.M. Epigenetics and gene expression. *Heredity*, v. 105, p. 4–13, 2010.

GIOVANNONI J. Molecular biology of fruit maturation and ripening. **Annual Review Plant Physiology Plant Molecular Biology**, vol. 52, p. 725-749, 2001.

GIOVANNONI, J. Genetic Regulation of Fruit Development and Ripening. **The Plant Cell**, vol. 16, p. 170–S180, 2004.

GIRIBALDI, M.; PERUGINI, I.; SAUVAGE, F.; SCHUBERT, A. Analysis of protein changes during grape berry ripening by 2-DE and MALDI-TOF. **Proteomics**, vol. 7, p. 3154-3170, 2007.

GODOVAC-ZIMMERMANN, J.; KLEINER, O.; BROWN, L.R.; DRUKIER, A.K. Perspectives in spicing up proteomics with splicing. **Proteomics**, vol. 5, p. 699–709, 2005.

GODOY, A.; CORDENUNSI, B.R.; LAJOLO, F.M.; NASCIMENTO, J.R.O. Differential display and suppression subtractive hybridization analysis of the pulp of ripening banana. **Scientia Horticulturae**, vol. 124, p. 51–56, 2010.

GÖRG, A.; WEISS, W.; DUNN, M.J. Current 2-DE technology for proteomics. **Proteomics**, vol. 4, p. 3665–3685, 2004.

GOORMACHTIG, S.; LIEVENS, S.; VAN DE VELDE, W.; VAN MONTAGU, M.; HOLSTERS, M. Srchi13, a novel early nodulin from *Sesbania rostrata*, is related to acidic class III chitinases. **The Plant Cell**, v. 10, p. 905-915, 1998.

GUARINO, C.; ARENA, S.; DE SIMONE, L.; D'AMBROSIO, C.; SANTORO, S.; ROCCO, M.; SCALONI, A.; MARRA, M. Proteomic analysis of the major soluble components in Annurca apple flesh. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 51, p. 255 – 262, 2007.

GUPTA, S.M.; SRIVASTAVA, S.; SANE, A.P.; NATH, P. Differential expression of genes during banana fruit development, ripening and 1-MCP treatment: Presence of distinct fruit specific, ethylene induced and ethylene repressed expression. **Postharvest Biology and Technology**, v. 42, p. 16–22, 2006.

HADFIELD, K.A.; DANDEKAR, A.M.; ROMANI, R.J. Demethylation of ripening specific genes in tomato fruit. **Plant Science**, v. 92, p. 13-18, 1993.

HO, V.S.M.; NG, T.B. Chitinase-Like Proteins with Antifungal Activity from Emperor Banana Fruits. **Protein and Peptide Letters**, v. 14, p. 828-831, 2007.

HUANG, P.; DO, Y.; HUANG, F.; THAY, T.; CHANG, T. Characterization and expression analysis of a banana gene encoding 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase. **Biochemistry and Molecular Biology International**, v. 41, p. 941-950, 1997.

HUBBARD, N.L.; PHARR, D.M.; HUBER, S.C. Role of Sucrose Phosphate Synthase in Sucrose Biosynthesis in Ripening Bananas and Its Relationship to the Respiratory Climacteric. **Plant Physiology**, vol. 94, p. 201-208, 1990.

JACOBS, D.I.; HEIJDEN, R.V.D.; VERPOORTE, R. Proteomics in Plant Biotechnology and Secondary Metabolism Research. **Phytochemical analysis**, vol. 11, p. 277–287, 2000.

JORGE, I.; NAVARRO, R.M.; LENZ, C.; ARIZA, D.; PORRAS, C.; JORRÍN, J. The holm oak leaf proteome: analytical and biological variability in the protein expression level assessed by 2-DE and protein identification tandem mass spectrometry de novo sequencing and sequence similarity searching. **Proteomics**, vol. 5, p. 222-234, 2005.

JORRÍN-NOVO, J.V.; MALDONADO, A.M.; ECHEVARRÍA-ZOMEÑO, S.; VALLEDOR, L.; CASTILLEJO, M.A.; CURTO, M.; VALERO, J.; SGHAIER, B.; DONOSO, G.; REDONDO, I. Plant proteomics update (2007–2008): Second-generation proteomic techniques, an appropriate experimental design, and data analysis to fulfill MIAPE standards, increase plant proteome coverage and expand biological knowledge. **Journal of proteomics**, vol. 72, p. 285-314, 2009.

KANDPAL, R.P.; SAVIOLA, B.; FELTON, J. The era of 'omics unlimited. **BioTechniques**, vol. 46, p. 351-355, 2009.

KARP, N.A.; LILLEY, K.S. Maximising sensitivity for detecting changes in protein expression: Experimental design using minimal CyDyes. **Proteomics**, vol. 5, p. 3105–3115, 2005

KARP, N.A.; LILLEY, K.S. Design and Analysis Issues in Quantitative Proteomics Studies. **Proteomics**, vol. 7, p. 42-50, 2007.

KASPRZEWSKA, A. Plant chitinases – regulation and function. **Cellular and Molecular Biology Letters**, v. 8, p. 809-824, 2003.

KIM, I.J.; KAHNG, H.Y.; CHUNG, W.I. Characterization of cDNAs encoding small and large subunits of ADP-glucose pyrophosphorylases from watermelon (*Citrullus vulgaris* S.). **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 62, p. 550-555, 1998.

KIM, S.T.; CHO, K.S.; KIM, S.G.; KANG, S.Y.; KANG, K.Y. A Rice Isoflavone Reductase-like Gene, OslRL, Is Induced by Rice Blast Fungal Elicitor. **Molecules and Cells**, v. 16, p. 224-231, 2003.

LARA, M.V.; BORSANI, J.; BUDDE, C.O.; LAUXMANN, M.A.; LOMBARDO, V.A.; MURRAY, R.; ANDREO, C.S.; DRINCOVICH, M.F. Biochemical and proteomic analysis of 'Dixiland' peach fruit (*Prunus persica*) upon heat treatment. **Journal of Experimental Botany**, vol. 4, p. 1-19, 2009.

LI, Y.; YANG, Y.; HSU, J.S.F.; WU, D.; WU, H.; TZEN, J.T.C. Cloning and immunolocalization of an antifungal chitinase in jelly fig (*Ficus awkeotsang*) achenes. **Phytochemistry**, v. 66, p. 879–886, 2005.

LIN, Z.; ZHONG, S.; GRIERSON, D. Recent advances in ethylene research. **Journal of Experimental Botany**, p. 1-26, 2009.

LONG, T.A.; BRADY, S.M.; BENFEY, P.N. Systems Approaches to Identifying Gene Regulatory Networks in Plants. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, vol. 24, p. 81–103, 2008.

LÜCKER, J.; LASZCZAK, M.; SMITH, D.; LUND, S.T. Generation of a predicted protein database from EST data and application to iTRAQ analyses in grape (*Vitis Vinifera* cv. Cabernet Sauvignon) berries at ripening initiation. **BMC Genomics**, vol. 10, p. 50-67, 2009.

MAINARDI, J.A.; PURGATTO, E.; VIEIRA JR., A.; BASTOS, W.A.; CORDENUNSI, B.R.; NASCIMENTO, J.R.O; LAJOLO, F.M. Effects of Ethylene and 1-Methylcyclopropene (1-MCP) on Gene Expression and Activity Profile of r-1,4-Glucan-phosphorylase during Banana Ripening. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, vol. 54, p. 7294-7299, 2006.

MANN, M.; JENSEN, O.N. Proteomic analysis of post-translational modifications. **Nature Biotechnology**, London, v. 21, p. 255-261, 2003.

MAROUGA, R.; DAVID, S.; HAWKINS, E. The development of the DIGE system: 2D fluorescence difference gel analysis technology. **Anal Bioanal Chem**, vol. 382, p. 669–678, 2005.

MARÍN-RODRÍGUEZ, M.C.; SMITH, D.L.; MANNING, K.; ORCHARD, J.; SEYMOUR, G.B. Pectate lyase gene expression and enzyme activity in ripening banana fruit. **Plant Molecular Biology**, v. 51, p. 851–857, 2003.

MARÍN-RODRÍGUEZ, M.C.; ORCHARD, J.; SEYMOUR, G.B. Pectate lyases, cell wall degradation and fruit softening. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, p. 2115-2119, 2002.

MARTIN, C.; SMITH, A.M. Starch Biosynthesis. **The Plant Cell**, v. 7, p. 971-985, 1995.

MARTÍNEZ-ROMERO, D.; BÁILEN, G.; SERRANO, M.; GUILLÉN, F.; VALVERDE, J.M.; ZAPATA, P.; CASTILLO, S.; VALERO, D. Tools to maintain postharvest fruit and vegetable quality through the inhibition of ethylene action: a review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, vol. 47, p. 543-560, 2007.

MILLER, I.; CRAWFORD, J.; GIANAZZA, E. Protein stains for proteomic applications: Which, when, why? **Proteomics**, vol. 6, p. 5385–5408, 2006.

MOCHIDA, K.; SHINOZAKI, K. Omics resources for crop improvement **Plant and Cell Physiology Advance Access**, março, 2010.

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

MENDES, M.; BIERHALS, J. Mercado nacional e internacional de frutas. **Tópicos em qualidade e pós-colheita de frutas (Temas e calidad y postcosecha de frutos)**, Centro APTA Citros Sylvio Moreira, p. 265-268, 2008.

MINÁRIK, P.; TOMÁKOVÁ, N.; KOLLÁROVÁ, M.; ANTALÍK, M. Malate Dehydrogenases - Structure and Function. **General Physiology and Biophysics**, v. 21, p. 257-265, 2002.

MUCCILLI, V.; LICCIARDELLO, C.; FONTANINI, D.; RUSSO, M.P.; CUNSOLO, V.; SALETTI, R.; RECUPERO, G.R.; FOTI, S. Proteome analysis of Citrus sinensis L. (Osbeck) flesh at ripening time. **Journal of proteomics**, v. 73, p. 134-152, 2009.

NASCIMENTO, J.R.O.; VIEIRA-JÚNIOR, 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, p. 41-47, 2006.

NEGRI, A.S.; PRINSI, B.; ROSSONI, M.; FAILLA, O.; SCIENZA, A.; COCUCCI, M.; ESPEN, L. Proteome changes in the skin of the grape cultivar Barbera among different stages of ripening. **BMC Genomics**, vol. 9, p. 378, 2008.

NEUHOFF, V.; STAMM, R.; EIBL, H. Clear background and highly sensitive protein staining with Coomassie Blue dyes in polyacrilamide gels: A sistematic analysis. **Electrophoresis**, v.6, p. 427-448, 1985.

NGUYEN-QUOC, B.; FOYER, C.H. A role for futile 'futile cycles' involving invertase and sucrose synthase in sucrose metabolism of tomato fruit. **Journal of Experimental Botany**, v. 52, p. 881-889, 2001.

NILO, R.; SAFFIE, C.; LILLEY, K.; BAEZA-YATES, R.; CAMBIAZO, V.; CAMPOS-VARGAS, R.; GONZÁLEZ, M.; MEISEL, L.A.; RETAMALES, J.; SILVA, H.; ORELLANA, A. Proteomic analysis of peach fruit mesocarp softening and chilling injury using difference gel electrophoresis (DIGE). **BMC Genomics**, vol. 11, p. 43, 2010.

PALAGI, P.M.; HERNANDEZ, P.; WALTHER, D.R. Proteome informatics I: Bioinformatics tools for processing experimental data. **Proteomics**, vol. 6, p. 5435–5444, 2006.

PARK, S.W.; CHUNG, W. Molecular cloning and organ-specific expression of three isoforms of tomato ADP-glucose pyrophosphorylase gene. **Gene**, v. 206, p. 215-221, 1998.

PAYASI, A.; SANWAL, G.G. Biochemistry of Fruit Ripening. **Indian Journal of Agriculture Biochemistry**, vol. 18, p. 51-60, 2005.

PEDRESCHI, R.; HERTOOG, M.; ROBBEN, J.; LILLEY, K.S.; KARP, N.A.; BAGGERMAN, G.; VANDERLEYDEN, J.; NICOLAI, B. Gel-Based Proteomics Approach to the Study of Metabolic Changes in Pear Tissue during Storage. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Article, 2009.

PEUMANS, W.J.; PROOST, P. ; SWENNEN, R.L.; VAN DAMME, E.J.M. The abundant class III chitinase homolog in young developing banana fruits behaves as a transient vegetative storage protein and most probably serves as an important supply of amino acids for the synthesis of ripening-associated proteins. **Plant Physiology**, v. 130, p. 1063–1072, 2002.

POCOCK, K. F.; HAYASAKA, Y.; MCCARTHY, M.G.; WATERS, E.J. Thaumatin-like proteins and chitinases, the haze-forming proteins of wine, accumulate during ripening of grape (*Vitis vinifera*) berries and drought stress does not affect the final levels per berry at maturity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, vol. 48, p. 1637-1643, 2000.

PRASANNA, V.; PRABHA, T.N.; THARANATHAN, R.N. Fruit ripening phenomena – an overview. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, vol. 47, p. 1-19, 2007.

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

RABILLOUD, T. Solubilization of proteins for electrophoretic analyses. **Electrophoresis**, vol. 17, p. 813-829, 1996.

RAO, D.H.; GOWDA, L.R. Abundant Class III Acidic Chitinase Homologue in Tamarind (*Tamarindus indica*) Seed Serves as the Major Storage Protein. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 2175–2182, 2008.

ROBINSON, S. P.; JACOBS, A.K.; DRY, L.B. A Class IV chitinase is highly expressed in grape berries during ripening. **Plant Physiology**, vol.114, p. 771-778, 1997.

RADCHUK, V.V.; BORISJUK, L.; SREENIVASULU, N.; MERX, K.; MOCK, H.P.; ROLLETSCHEK, H.; WOBUS, U.; WESCHKE, W. Spatiotemporal profiling of starch biosynthesis and degradation in the developing barley grain. **Plant Physiology**, v. 150, p. 190-204, 2009.

RATHORE, R.S.; GARG, N.; GARG, S.; KUMAR, A. Starch phosphorylase: Role in starch metabolism and biotechnological applications. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 29, p. 214–224, 2009.

ROCCO, M.; D'AMBROSIO, C.; ARENA, S.; FAUROBERT, M.; SCALONI, A.; MARRA, M. Proteomic analysis of tomato fruits from two ecotypes during ripening. **Proteomics**, vol.6, p. 3781-3791, 2006.

ROLIN, D.; BALDET, P.; JUST, D.; CHEVALIER, C.; BRIAN, M.; RAYMOND, P. NMR study of low subcellular pH during the development of cherry tomato fruit . **Australian Journal of Plant Physiology**, v. 27, p. 61 – 69, 2000.

SAMYN, B.; SERGEANT, K.; CARPENTIER, S.; DEBYSER, G.; PANIS, B.; SWENNEN, R.; BEEUMEN, J.V. Functional Proteome Analysis of the Banana Plant (Musa spp.) Using de Novo Sequence Analysis of Derivatized Peptides. **Journal of Proteome Research**, vol. 6, p. 70-80, 2006.

SANCHES, J.; LEAL, P.A.M.; SARAVALI, J.H.; ANTONIALI, S. Principal components analysis for quality evaluation of cooled banana 'nanicão' in different packing. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 25, p. 220-223, 2003.

SANCHES, J.; LEAL, P.A.M.; SARAVALI, J.H.; SILVIA, A. Avaliação de danos mecânicos causados em banana "Nanicão" durante as etapas de beneficiamento, transporte e embalagem. **Engenharia Agrícola**, v. 24, n.1, p.195-201, 2004.

SARAVANAN, R.S.; ROSE, J.K.C. A critical evaluation of sample extraction techniques for enhanced proteomic analysis of recalcitrant plant tissues. **Proteomics**, vol. 4, p. 2522-2532, 2004.

SARRY, J-E.; SOMMERER, N.; SAUVAGE, F-X.; BERGOIN, A.; ROSSIGNOL, M.; ALBAGNAC, G.; ROMIEU, C.; Grape berry biochemistry revisited upon proteomic analysis of the mesocarp. **Proteomics**, v. 4, p. 201–215, 2004.

SCHMIDT, H.; GELHAUS, C.; LATENDORF, T.; NEBENDAHL, M.; PETERSEN, A.; KRAUSE, S.; LEIPPE, M.; BECKER, W.; JANSSEN, O. 2-D DIGE analysis of the proteome of extracts from peanut variants reveals striking differences in major allergen contents. **Proteomics**, vol. 9, p. 3507–3521, 2009.

SCHUCH, W.; KANCZLER, J.; HOBSON, G.; TUCKER, G.; GRIERSOSN, D.; BRIGHT, S.; BIRD, C. Fruit quality characteristics of transgenic tomato fruit with altered polygalacturonase activity. **Hort. Sci.**, vol. 26, p. 1517–1520, 1991.

SEYMOUR, G.B. Banana. In: **Biochemistry of Fruit Ripening**. SEYMOUR, G.B.; TAYLOR, J.E.; TUCKER G.A. London. Ed. Chapman & Hall., 1993, p. 83-102.

SMITH, C.J.S.; WATSON, C.F.; MORRIS, P.C.; BIRD, C.R.; SEYMOUR, G.B.; GRAY, J.E.; ARNOLD, C.; TUCKER, G.A.; SCHUCH, W.; HARDING, S.; GRIERSON, D. Inheritance and effect on ripening of antisense polygalacturonase genes in transgenic tomatoes. **Plant Mol. Biol.**, v. 14, p. 369–379, 1990.

SOLBAK, A.I.; RICHARDSON, T.H.; MCCANN, R.T.; KLINE, K.A.; BARTNEK, F.; TOMLINSON, G.; TAN, X.; PARRA-GESSERT, L.; FREY, G.J.; PODAR, M.; LUGINBUHL, P.; GRAY, K.A.; MATHUR, E.J.; ROBERTSON, D.E.; BURK, M.J.; HAZLEWOOD, G.P.; SHORT, J.M.; KEROVUO, J. Discovery of pectin-degrading enzymes and directed evolution of a novel pectate lyase for processing cotton fabric. **The journal of biological chemistry**, v. 280, p. 9431–9438, 2005.

SONG, J.; BRAUN, G.; BEVIS, E.; DONCASTER, K. A simple protocol for protein extraction of recalcitrant fruit tissues suitable for 2-DE and MS analysis. **Electrophoresis**, vol. 27, p. 3144–3151, 2006.

SWEETMAN, C.; DELUC, L.G.; CRAMER, G.R.; FORD, C.M.; Soole, K.L. Regulation of malate metabolism in grape berry and other developing fruits. **Phytochemistry**, v. 70, p. 1329–1344, 2009.

TAIRA, T.; TOMA, N.; ICHI, M.; TAKEUCHI, M.; ISHIHARA, M. Tissue distribution, synthesis stage, and ethylene induction of pineapple (*Ananas comosus*) chitinases. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, vol. 69, p. 852–854, 2005.

TANAKA, H.; MASUTA, C.; UEHARA, K.; KATAOKA, J.; KOIWAI, A.; NOMA, M. Morphological changes and hypomethylation of DNA in transgenic tobacco expressing antisense RNA of the S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase gene. **Plant Molecular Biology**, v. 35, p. 981–986, 1997.

TEYSSIER, E.; BERNACCHIA, G.; MAURY, S.; KIT, A.H.; STAMMITTI-BERT, L.; ROLIN, D.; GALLUSCI, P. Tissue dependent variations of DNA methylation and endoreduplication levels during tomato fruit development and ripening. **Planta**, v. 228, p. 391–399, 2008.

TIMMS, J.F.; CRAMER, R. Difference gel electrophoresis **Proteomics**, vol. 8, p. 4886–4897, 2008.

TONGE, R.; SHAW, J.; MIDDLETON, B.; ROWLINSON, R.; RAYNER, S.; YOUNG, J.; POGNAN, F.; HAWKINS, E.; CURRIE, I.; DAVISON, M. Validation and development of fluorescence two-dimensional differential gel electrophoresis proteomics technology. **Proteomics**, vol. 1, p. 377–396, 2001.

TUCKER, G.A. Introduction. In: Biochemistry of Fruit Ripening. SEYMOUR, G.B., TAYLOR, J.E., TUCKER G.A. London. Ed. Chapman & Hall., 1993, p. 1-43.

VAN DER HOLST, P.P.G.; SCHLAMMAN, H.R.M.; SPAINK, H.P. Proteins involved in the production and perception of oligosaccharides in relation to plant and animal development. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 11, p. 608-616, 2001.

VIEIRA-JÚNIOR, 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 Agricultural and Food Chemistry*, v. 54, p. 8222–8228, 2006.

WANG, X. Structure, function, and engineering of enzymes in isoflavonoid biosynthesis. **Functional and Integrative Genomics**, n.p., 2010.

WANG, W.; TAI, F.; CHEN, S. Optimizing protein extraction from plant tissues for enhanced proteomics analysis. **Journal of Separation Science**, vol. 31, p. 2032 – 2039, 2008.

WESTERMEIER, R.; MAROUGA, R. Protein Detection Methods in Proteomics Research. **Bioscience Reports**, Vol. 25, 2005.

WHITE, P.J. Recent advances in fruit development and ripening: an overview. **Journal of Experimental Botany**, vol. 53, p. 1995-2000, 2002.

WILLIAMS, L.R. Staining nucleic acids and proteins in electrophoresis gels. **Biotechnic & Histochemistry**, vol. 76, p. 127-132, 2001

WILKINS, M.R.; SANCHEZ, J.C.; GOOLEY, A.A.; APPEL, R.D.; HUMPHERY-SMITH, I.; HOCHSTRASSER, D.F.; WILLIAMS, K.L. Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, vol. 13, p. 19-50, 1995.

WONG, J.H.; NG, T. B.; CHEUNG, R.C.F.; YE, X.J.; WANG, H.X.; LAM, S.K.; LIN, P.; CHAN, Y.S.; FANG, E.F.; NGAI, P.H.K.; XIA, L.X.; YE, X.Y.; JIANG, Y.; LIU, F. Proteins with antifungal properties and other medicinal applications from plants and mushrooms. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 87, p. 1221–1235, 2010.

YADAV, S.; YADAV, P. K.; YADAV, D.; YADAV, K.D. S. Pectin lyase: a review. **Process Biochemistry**, v. 44, p. 1–10, 2009.

ZHANG, J.; MA, H.; FENG, J.; ZENG, L.; WANG, Z.; CHEN, S. Grape berry plasma membrane proteome analysis and its differential expression during ripening. **Journal of Experimental Botany**, vol. 59, p. 2979-2990, 2008.