UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos
Área: Bromatologia

Priscila Robertina dos Santos-Donado

Estudo proteômico de variedades de milho (*Zea mays* L.) obtidas por melhoramento clássico e por recombinação genética

SÃO PAULO
2016

Priscila Robertina dos Santos-Donado

Estudo proteômico de variedades de milho (*Zea mays* L.) obtidas por melhoramento clássico e por recombinação genética

Versão corrigida da Tese conforme resolução CoPGr 6018.
O original encontra-se disponível no Serviço de Pós Graduação da FCF/USP

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor.

Orientador: Prof Dr Flavio Finardi Filho

SÃO PAULO
2016

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

Santos-Donado, Priscila Robertina dos
S237es Estudo proteômico de variedades de milho (*Zea mays* L.) obtidas por melhoramento clássico e por recombinação genética / Priscila Robertina dos Santos-Donado - São Paulo, 2016.
187p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental
Orientador : Finardi Filho, Flavio

1. Bromatologia 2. Milho : Ciência dos alimentos 3. Melhoramento genético vegetal 4. Análise de alimentos I. T. II. Finardi Filho, Flavio, orientador.

641 CDD

Priscila Robertina dos Santos Donado

Estudo proteômico de variedades de milho (*Zea mays* L.) obtidas por melhoramento clássico e por recombinação genética

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor.

Comissão Julgadora

_____

Prof. Dr. Flavio Finardi Filho
Orientador/Presidente

_____

1º Examinador

_____

2º Examinador

_____

3º Examinador

_____

4º Examinador

São Paulo,____de_____

Ao meu amado esposo, Carlos, e toda minha família

por seus incentivos e apoio incondicional

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Ao longo da minha formação acadêmica, tive a oportunidade de receber a orientação e apoio de inúmeras pessoas e instituições. Aqui, gostaria de expressar meus mais sinceros agradecimentos a todos os envolvidos.

À Universidade de São Paulo, à Faculdade de Ciências Farmacêuticas e ao Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental pela oportunidade de fazer parte deste universo acadêmico de grande reputação.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo suporte financeiro à pesquisa do laboratório.

Ao Prof. Dr. Flavio Finardi Filho pela oportunidade, orientação, ensinamentos, confiança, conversas e amizade. Se hoje sou um pouco melhor que há quatro anos, devo isso às suas contribuições e ensinamentos que levarei para sempre comigo!

À minha colega de laboratório e amiga Nicole Ramíres Rojas pela companhia, amizade e troca de conhecimento cultural. Se hoje conheço um pouquinho da Bolívia, devo isso a você!

À Dra. Maria José Vilaça de Vasconcelos, em representação à Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa Milho e Sorgo, pelo fornecimento das sementes obtidas por melhoramento genético com alta qualidade proteica.

À Thaís Rezende Morais, em representação à Syngenta Seeds Ltda., pelo fornecimento das sementes de milhos geneticamente modificados e convencionais.

À Dra. Adriana Franco Paes Leme e às pesquisadoras Bianca Alves Pauletti e Rômenia Ramos Domingues do Laboratório Nacional de Biociências (LNBio) pela oportunidade, disponibilidade e auxílio nas análises de espectrometria de massas.

À técnica Rosangela Pavan e à Dra. Fernanda Santana, por recomendação do Prof. Dr. Jorge Mancini Filho, pelo auxílio com as análises de lipídeos.

À Profa. Dra. Célia Coli e a técnica Fabiana Lima pelo auxílio nas análises de minerais

À técnica Amanda Ferreira Macedo, por recomendação da Profa. Dra. Eny Iochevet Segal Floh, pelo auxílio com as análises de aminoácidos livres.

Aos Drs. Gilberto Kaihami, Juliana Crestani e Gianlucca Nicastro do Laboratório de Genômica de Bactérias do IQ/USP pelo auxílio prestado na etapa experimental e por me apresentarem o Blast2GO.

Ao Prof. Dr. Giuseppe Palmisano e a Dra. Rebeca Kawahara pelo auxílio nas análises dos dados bioinformáticos e a interpretação dos resultados.

Aos Profs. Drs. Jorge Mancini Filho, Regina Lúcia Baldini e Gisele Monteiro de Souza pelas valiosas sugestões que enriqueceram este trabalho.

À Joana de Almeida Santos, por nos ajudar a manter o laboratório em ordem e pela agradável companhia e amizade.

Ao técnico em informática Renato Flamini por todo auxílio com o software ImageMaster 2D Platinum.

Aos técnicos do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental Tatiane Garófalo Ostronof, Luciene Lauer, Tania Shiga, Laila Abicair Sangaletti, Aline Santos, Lúcia Helena Silva e Rosa Maria Barros pelo auxílio com a utilização de equipamentos e análises.

Às Profas. Dras. Maria Inés Genovese e Ligia Bicudo de Almeida Muradian, técnicos e alunos do laboratório pelo acolhimento, amizade, ensinamentos e auxílio.

A todos os professores do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental, bem como dos Institutos de Química e de Ciências Biomédicas que participaram da minha formação ao longo deste período.

Aos secretários do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental Cleonice Estrela, Edilson Feitosa do Santos, Monica Dealis Perussi e Roberta Uehara, além dos secretários da pós-graduação Irineu Ruel de Oliveira e Sueli Duarte por todo auxílio nestes quatro anos.

Aos meus pais Aloísio Souza dos Santos e Raquel Robertina da Silva Santos, pela vida, amor, dedicação e incentivo.

Aos meus irmãos Aline Robertina dos Santos Ueda e Marcus Vinícius dos Santos, meus cunhados Felipe de Oliveira Ueda e Camila Ribeiro dos Santos e meu sobrinho Henrique dos Santos Ueda por todo amor, amizade e cumplicidade.

Ao meu esposo Carlos Mario Donado Pestana pelo imenso amor, paciência, companheirismo e apoio nos bons e maus momentos.

À minha segunda família na Colômbia, em especial à minha sogra Anneris Raquel Almario Pestana, por todo carinho, incentivo e orações.

Por fim, mas não menos importante, agradeço a DEUS por todas as bênçãos recebidas e por sempre iluminar meu caminho! Toda a Honra e toda a Glória sejam dadas a Ti, Senhor!

“In the wonderland of complete sequences, there is much that genomics cannot do, and so the future belongs to proteomics, the analysis of complete complements of proteins”

Stanley Fields, Proteomics in Genomeland
Science, 291, 1221–1224, 2001

RESUMO

SANTOS-DONADO, P. R. **Estudo proteômico de variedades de milho (*Zea mays* L.) obtidas por melhoramento clássico e por recombinação genética.** 2016. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

O melhoramento genético clássico de sementes milho (*Zea mays* L.) permitiu desenvolver inúmeras variedades, incluindo o milho com qualidade proteica melhorada (Quality Protein Maize, QPM), que visava aumentar os teores proteicos e as propriedades nutricionais. Por outro lado, novas variedades comerciais foram obtidas por vegetais geneticamente modificados (GM), com foco em parâmetros agronômicos. Em ambos os casos, a segurança dessas variedades para uso como alimento é uma das principais preocupações dos desenvolvedores e dos órgãos de regulamentação. A Equivalência Substancial é a base do sistema de avaliação da segurança de culturas geneticamente modificadas, no entanto alterações na expressão de proteínas não são devidamente analisadas e esclarecidas. As abordagens proteômicas complementam as técnicas de avaliação de biossegurança para alimentos GM, bem como permitem investigar possíveis efeitos indesejáveis derivados do melhoramento clássico. Os objetivos do presente estudo foram caracterizar e comparar os perfis proteicos de variedades de milhos convencionais melhorados (QPM) e geneticamente modificados (GMs), contra suas respectivas linhas convencionais utilizando técnicas proteômicas como eletroforese bidimensional (2-DE) e *bottom up shotgun* (*gel-free*). Num primeiro estudo, foram utilizadas três amostras de milho, sendo duas variedades convencionais com QPM (QP1 e QP2) e uma variedade convencional normal (CN). No segundo estudo, foram analisadas duas cultivares de milho GM (GM1 e GM2) e seus respectivos convencionais genitores (CG1 e CG2). As composições químicas de todas as amostras também foram avaliadas quanto a Equivalência Substancial. O extrato bruto proteico foi submetido à análise de eletroforese unidimensional (1-DE), bidimensional (2-DE) e *bottom up shotgun* (*gel-free*). As imagens dos mapas proteicos foram analisadas pelo software Image Master 2D Platinum 7.0 (GE). Os spots diferencialmente expressos e selecionados foram sequenciados por MS. Pela composição química das principais frações das amostras de milho foi possível identificar a equivalência substancial entre as amostras convencionais e GMs, bem como QPMs e sua convencional dentro das faixas de variabilidade esperadas da espécie. Nos géis 1-DE foram observadas bandas proteicas com perfis similares entre os grupos de amostras avaliadas para ambos estudos. Nas imagens dos géis 2-DE não houveram

alterações extremas entre as amostras de milhos GMs e seus respectivos convencionais genitores (CGs), mas apenas diferenças na intensidade dos spots proteicos. As variedades QPMs e CN apresentaram diferenças devido à distribuição dos spots. Os mapas proteicos das amostras CG1 x GM1 e CG2 x GM2 apresentaram maior semelhança com porcentagens de matchings superiores a 70 %, enquanto as porcentagens de matchings entre variedades diferentes (QPMs e CN) foram menores. No total foram identificadas 219 proteínas das amostras CGs x GMs e QPMs x CN, classificadas quanto aos seus processos biológicos e função molecular. Em conclusão, foram encontradas diferenças entre os cultivares GMs e CGs, indicando uma variação normal entre variedades de milho, que não comprometem a segurança alimentar das amostras estudadas. Quanto às amostras com QPM e CN as diferenças encontradas são devido à sua distância nas linhagens ou germoplasma.

Palavras chave: *Zea mays* L., milho geneticamente modificado, milho com qualidade proteica melhorada, segurança de alimentos geneticamente modificados, proteômica e espectrometria de massas.

ABSTRACT

SANTOS-DONADO, P. R. **Proteomic study of maize (*Zea mays* L.) varieties obtained by classical breeding and genetic recombination**. 2016. Thesis (Doctorate) – School of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo.

The classic genetic breeding of corn seeds (*Zea mays*) has enabled the development of many varieties, including corn with improved protein quality (Quality Protein Maize, QPM), which aimed to increase protein levels and nutritional properties. On the other hand, new commercial varieties have been obtained out of genetically modified (GM) vegetables, with a focus in agronomic parameters. In both cases, the safety of these varieties for food use is one of the main concerns for the developers and for the regulatory agencies. Substantial Equivalence is the basis of the safety evaluation system for genetically modified crops, however, alterations in the protein expressions are not been properly analyzed and clarified. The protein approaches complement the techniques of biosafety evaluation for GM foods, as well as allow for possible undesirable effects derived from classic improvement to be investigated. The goals of the current studies were to characterize and compare the protein profiles of the different varieties of conventionally improved (QPM) and genetically modified (GM) corn, against their respective conventional lines using proteomic techniques, such as, two-dimensional electrophoresis (2-DE), *bottom up shotgun* (*gel-free*) and masses spectrometry (MS). In a first instance of the study, three samples of corn were used, two of conventional varieties with QPM (QP1 and QP2) and one conventional normal variety (CN). In a second instance of the study, two cultures of GM corn (GM1 and GM2) were analyzed and their respective conventional genitors (CG1 and CG2). The chemical compositions of all the samples were also evaluated for their Substantial Equivalence. The protein raw extract was submitted to analysis of one-dimensional (1-DE), two-dimensional (2-DE) electrophoresis, and *bottom up shotgun* (*gel-free*). The protein image maps were analyzed by the Image Master 2D Platinum 7.0 (GE) software. The spots which were expressed and selected differentially were sequenced by MS. By the chemical composition of the main fractions of the samples of corn, it was possible to identify the substantial equivalence between the conventional samples and GMs, likewise with OPMs and their conventional in the ranges of variability which were expected for the species. On the 1-DE gel, it was observed protein bands with similar profiles amongst the groups of evaluated samples for both studies. In the images of the 2-DE gel, there were no alterations between the GM corn

and their respective conventional genitors (CGs), but only differences in intensity of the protein spots. The OPM and CN varieties presented differences due to the distribution of the spots. The protein maps of samples CG1 vs. GM1 and CG2 vs. GM2 presented greater similarities with the percentages of matchings superior to 70%, while the percentage of matchings among different varieties (QPMs and CN) were smaller. In total, there were 219 proteins identified in the samples CGs vs. GMs and QPMs vs. CN, classified by the biologic processes and molecular function. In conclusion, there were found differences between the cultures of GMs and CGs, indicating a normal variation among the corn varieties, which do not affect the food security of the studied samples. As per the samples with QPM and CN, the differences found were due to the line distances or germplasm.

Keywords: *Zea mays* L., genetically modified organisms, quality protein maize, safety of genetically modified foods, proteomic, mass spectrometry

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACN	Acetonitrila
AF	Ácido fórmico
Blast2GO	Blast 2 Gene Ontology
BSA	Bovine serum albumin - albumina de soro bovina
CBB	Comassie Brillante Blue
CHAPS	3-[(3-cholamidopropyl) dimethylammonio]-1-propanesulfonate
DTT	Ditiotreitol
EPSPS	5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase
ESI	Electrospray ionization - ionização por eletrospray
GM	Geneticamente modificado
HCl	Ácido clorídrico
IEF	Focalização isoelétrica
IM2DP	Software Image Master 2D Platinum (v. 7.0.6, Ge Healthcare)
IPG phor	Gradiente de pH imobilizado (*Immobilized pH gradient*) ou anfólito
LC ESI MS	Liquid Chromatography Electrospray Mass Spectrometry - Cromatografia líquida acoplada a espectrômetro de massas por eletrospray
MS/MS	Tandem Mass Spectrometry - Espectrometria de massas por Tandem
NCBI	National Center for Biotechnology Information - Centro Nacional de Informação Biotecnológica
nESI-Q-TOF MS/MS	Nano-electrospray ionization quadrupole time-of-flight mass spectrometry
OECD	Organisation for Economic Co-operation and Development - Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico
OGM	Organismo geneticamente modificado
o-2	opaco-2
PGM	Planta geneticamente modificada
pI	Ponto isoelétrico
PM	Peso molecular
PMSF	Fluoreto de fenilmetanossulfonila
QPM	Qualidade proteica melhorada
Q-TOF MS	Quadrupole Time Of Flight Mass Spectrometry - Espectrômetro de massas quadrupolo tempo de vôo
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis - Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio
TEMED	N,N,N’,N’-tetramethylethylenediamine
Tris-HCl	Hidroximetilaminometano e ácido clorídrico
2-DE	Eletroforese bidimensional

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Amostras de milho convencional normal (CN) e com qualidade proteica melhorada (QPM)	44
Figura 2	Amostras dos milhos geneticamente modificados (GMs) e convencionais genitores (CGs)	45
Figura 3	Gel de poliacrilamida 12,5% (37,5:1) das variedades de milho com qualidade proteica melhorada (QPM) e convencional normal (CN) contendo 25 e 50 µg de proteína	58
Figura 4	Spots diferencialmente expressos (ANOVA, $p < 0,05$) entre as amostras com qualidade proteica melhorada (QP1 e QP2) excisados para identificação por espectrometria de massas (MS)	60
Figura 5	Spots diferencialmente expressos (ANOVA, $p < 0,05$) entre as amostras QP1 e CN (com qualidade proteica melhorada e convencional normal) excisados para identificação por espectrometria de massas (MS)	60
Figura 6	Spots diferencialmente expressos (ANOVA, $p < 0,05$) entre as amostras QP2 e CN (com qualidade proteica melhorada e convencional normal) excisados para identificação por espectrometria de massas (MS)	61
Figura 7	Classificação funcional e distribuição das proteínas diferialmente expressas na comparação 1 (QP1 x QP2) pela abordagem proteômica 2-DE	71
Figura 8	Classificação funcional e distribuição das proteínas diferialmente expressas na comparação 2 (QP1 x CN) pela abordagem proteômica 2-DE	72
Figura 9	Classificação funcional e distribuição das proteínas diferialmente expressas na comparação 2 (QP2 x CN) pela abordagem proteômica 2-DE	73
Figura 10	Classificação funcional e distribuição das proteínas diferialmente expressas na comparação 1 (QP1 x QP2) pela abordagem *bootom up shotgun proteomics*	75
Figura 11	Classificação funcional e distribuição das proteínas diferialmente expressas na comparação 2 (QP1 x CN) pela abordagem *bootom up shotgun proteomics*	76
Figura 12	Classificação funcional e distribuição das proteínas diferialmente expressas na comparação 2 (QP2 x CN) pela abordagem *bootom up shotgun proteomics*	77

Figura 13	Gel de poliacrilamida 12,5% (37,5:1) das variedades de milho convencionais genitoras (CG) e geneticamente modificadas (GM) contendo 25 e 50 µg de proteína	97
Figura 14	Spots diferencialmente expressos (ANOVA, $p < 0,05$) entre as amostras de milho GM1 e CG1 (geneticamente modificada e convencional genitora, respectivamente) isolados para identificação por espectrometria de massas	99
Figura 15	Spots com expressão diferenciada significativa (ANOVA, $p < 0,05$) entre as amostras de milho GM2 e CG2 (geneticamente modificada e convencional genitora, respectivamente) isolados para identificação por espectrometria de massas	99
Figura 16	Classificação funcional e distribuição das proteínas diferialmente expressas na comparação 1 (GM1 x CG1) pela abordagem proteômica 2-DE	107
Figura 17	Classificação funcional e distribuição das proteínas diferialmente expressas na comparação 2 (GM2 x CG2) pela abordagem proteômica 2-DE	109
Figura 18	Classificação funcional e distribuição das proteínas diferialmente expressas na comparação 1 (GM1 x CG1) pela abordagem *bootom up shotgun proteomics*	110
Figura 19	Classificação funcional e distribuição das proteínas diferialmente expressas na comparação 2 (GM2 x CG2) pela abordagem *bootom up shotgun proteomics*	111
Anexo C	Figura 1 - Proteínas identificadas por *shotgun* em QP1 x QP2	167
Anexo C	Figura 2 - Proteínas identificadas por *shotgun* em QP1 x CN	167
Anexo C	Figura 3 - Proteínas identificadas por *shotgun* em QP2 x CN	168
Anexo C	Figura 4 - Proteínas identificadas por *shotgun* em GM1 x CG1	168
Anexo C	Figura 5 - Proteínas identificadas por *shotgun* em GM2 x CG2	169

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Características das variedades de milho convencional normal (CN) e com qualidade proteica melhorada (QPM)	43
Tabela 2	Características das amostras de milho geneticamente modificadas (GM) e convencionais genitoras (CG) utilizadas	45
Tabela 3	Análise composicional de sementes de milho convencional normal (CN) e com qualidade proteica melhorada (QPM)	55
Tabela 4	Ácidos graxos (g/100g) de sementes de milho convencional normal (CN) e com qualidade proteica melhorada (QPM)	56
Tabela 5	Análise de spots dos géis 2-DE das sementes de milho com qualidade proteica melhorada (QPM) e convencional normal (CN)	59
Tabela 6	Proteínas diferencialmente expressas identificadas pela abordagem 2-DE de sementes de milho com qualidade proteica melhorada (QP1 e QP2)	63
Tabela 7	Proteínas diferencialmente expressas identificadas pela abordagem 2-DE de sementes de milho com qualidade proteica melhorada (QP1) em comparação com uma variedade convencional normal (CN)	66
Tabela 8	Proteínas diferencialmente expressas identificadas pela abordagem 2-DE de sementes de milho com qualidade proteica melhorada (QP2) em comparação com uma variedade convencional normal (CN)	68
Tabela 9	Proteínas diferencialmente expressas identificadas pela abordagem *bootom up shotgun proteomics* de sementes de milho com qualidade proteica melhorada (QP1 e QP2)	78
Tabela 10	Proteínas diferencialmente expressas identificadas pela abordagem *bootom up shotgun proteomics* de sementes de milho com qualidade proteica melhorada (QP1) em comparação com uma variedade convencional normal (CN)	82
Tabela 11	Proteínas diferencialmente expressas identificadas pela abordagem *bootom up shotgun proteomics* de sementes de milho com qualidade proteica melhorada (QP2) em comparação com uma variedade convencional normal (CN)	87
Tabela 12	Proteínas similares entre as abordagens 2-DE e bootom up shoot gun proteomics para as comparações 1 (QP1 x QP2), 2 (QP1 x CN) e 3 (QP2 x CN)	92
Tabela 13	Análise composicional de sementes de milhos geneticamente modificados (GMs) e convencionais genitores (CGs)	94

Tabela 14	Ácidos graxos (g/100g) de sementes de milho geneticamente modificados (GM) e convencionais genitores (CG)	96
Tabela 15	Análise de spots dos géis 2-DE das amostras de sementes de milho geneticamente modificadas (GM) e convencionais genitoras (CG)	98
Tabela 16	Proteínas diferencialmente expressas identificadas pela abordagem 2-DE de sementes de milho geneticamente modificada (GM1) em comparação com uma variedade convencional genitora (CG1)	102
Tabela 17	Proteínas diferencialmente expressas identificadas pela abordagem 2-DE de sementes de milho geneticamente modificada (GM2) em comparação com uma variedade convencional genitora (CG2)	105
Tabela 18	Proteínas diferencialmente expressas identificadas pela abordagem *bootom up shotgun proteomics* de sementes de milho geneticamente modificada (GM1) em comparação com uma variedade convencional genitora (CG1)	112
Tabela 19	Proteínas diferencialmente expressas identificadas pela abordagem *bootom up shotgun proteomics* de sementes de milho geneticamente modificada (GM2) em comparação com uma variedade convencional genitora (CG2)	114
Tabela 20	Proteínas similares entre as abordagens 2-DE e *bootom up shotgun proteomics* para as comparações 1 (GM1 x CG1) e 2 (GM2 x CG2)	117
Anexo A	Tabela 1 – Valores médios de aminoácidos livres (µg/g MF) em sementes de milho com alta qualidade proteica (QPM)	150
Anexo B	Tabela 1 – Proteínas identificadas por 2-DE em QP1 e QP2	151
Anexo B	Tabela 2 – Proteínas identificadas por 2-DE em QP1 x CN	154
Anexo B	Tabela 3 – Proteínas identificadas por 2-DE em QP2 x CN	156
Anexo B	Tabela 4 – Proteínas identificadas por 2-DE em GM1 x CG1	158
Anexo B	Tabela 5 – Proteínas identificadas por 2-DE em GM2 x CG2	162

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS
RESUMO
ABSTRACT
LISTA DE ABREVIAÇÕES
LISTA DE FIGURAS
1. INTRODUÇÃO 27
1.1 A cultura do milho e sua importância 29
1.1.1 Milho obtido por melhoramento clássico 30
1.1.2 Milho obtido por recombinação genética 32
1.2 Equivalência substancial e segurança alimentar 34
1.3 Abordagem proteômica para avaliação da segurança alimentar 37
2. OBJETIVOS 41
2.1 Objetivo geral 41
2.2 Objetivos específicos 41
3. MATERIAL E MÉTODOS 43
3.1 Material 43
3.1.1 Comparação de perfil proteico entre linhagens de milhos (*Zea mays* L.) obtidas por melhoramento clássico 43
3.1.2 Avaliação da segurança alimentar de sementes de milho geneticamente modificadas em comparação com suas respectivas sementes convencionais genitoras 44
3.2 Métodos 46
3.2.1 Composição química 46
3.2.2 Extração e análise de ácidos graxos 47
3.2.3 Análise de minerais 47
3.2.4 Extração de proteínas solúveis 48
3.2.5 Eletroforese unidimensional (1-DE) 49
3.2.6 Eletroforese bidimensional (2-DE) 50
3.2.7 Detecção das proteínas no gel 2-de e análise de imagens 51
3.2.8 Digestão de proteínas separadas por gel 2-DE 51
3.2.9 Purificação, digestão e dessalinização de mistura complexa de proteínas (*gel free*) 53
3.2.10 Identificação de proteínas por espectrometria de massas ESI-QTOF e análise 53

bioinformática
3.2.11 Análise estatística 54
4 RESULTADOS 55
4.1 Comparação de perfil proteico entre linhagens de milhos (Z*ea mays* L.) obtidos por melhoramento clássico 55
4.1.1 Composição química 55
4.1.2 Extração e quantificação de proteínas 57
4.1.3 Eletroforese unidimensional (1-DE - SDS-PAGE) 57
4.1.4 Eletroforese bidimensional (2-DE) 58
4.1.4.1 Identificação de proteínas diferencialmente expressas do gel 2-DE por espectrometria de massas (MS) 61
4.1.5 Análise quantitativa e qualitativa do proteoma de milhos com qualidade proteica melhorada e convencional normal com abordagem *bottom up shotgun proteomics* 73
4.1.5.1 Identificação de proteínas diferencialmente expressas da abordagem *bottom up shotgun proteomics* por espectrometria de massas (MS) 74
4.1.6 Identificação de proteínas comuns entre a abordagem 2-DE e *bottom up shotgun proteomics* 91
4.2 Avaliação da segurança alimentar de sementes de milho geneticamente modificadas em comparação com suas respectivas sementes convencionais genitoras 94
4.2.1 Composição química 94
4.2.2 Extração e quantificação de proteínas 96
4.2.3 Eletroforese unidimensional (1-DE – SDS-PAGE) 96
4.2.4 Eletroforese bidimensional (2-DE) 97
4.2.4.1 Identificação de proteínas diferencialmente expressas do gel 2D por espectrometria de massas (MS) 100
4.2.5 Análise quantitativa do proteoma de milhos geneticamente modificados e convencionais genitores com abordagem *bottom up shotgun proteomics* 108
4.2.5.1 Identificação de proteínas diferencialmente expressas da abordagem *bottom up shotgun proteomics* por espectrometria de massas (MS) 108
4.2.6 Identificação de proteínas comuns entre a abordagem 2-DE e *bottom up shotgun proteomics* 115
5 DISCUSSÕES 117
5.1 Comparação de perfil proteico entre linhagens de milhos (*Zea mays* L.) obtidos 117

por melhoramento clássico
5.1.1 Composição química de variedades Quality Protein Maize (QPM) 117
5.1.2 Perfil proteico de variedades Quality Protein Maize (QPM) 118
5.2 Avaliação da segurança alimentar de sementes de milho geneticamente modificadas em comparação com suas respectivas sementes convencionais genitoras 124
5.2.1 A equivalência substancial entre variedades GMs e CGs 124
5.2.2 Perfil proteico de variedades GMs e CGs 125
6 CONCLUSÕES 135
7 REFERÊNCIAS 137
ANEXOS 151
ANEXO A – Aminoácidos livres 152
ANEXO B – Proteínas identificadas na eletroforese 2-DE 153
ANEXO C – Proteínas identificadas na abordagem *bottom up shotgun proteomics* 169
ANEXO D - Ficha do Aluno 172
ANEXO E - Currículo Lattes 175

1 INTRODUÇÃO

A cultura do milho (*Zea mays* L.), em função do seu alto potencial de produção, composição química e valor nutricional, constitui um dos mais importantes cereais cultivados e consumidos no mundo. Sua importância econômica é evidenciada por diversas formas de utilização, desde a alimentação animal até a indústria de alta tecnologia.

O milho é o vegetal com maior número de variedades melhoradas e, conseqüentemente, com a introdução da tecnologia de DNA recombinante e surgimento dos Organismos Geneticamente Modificados (OGMs), se tornou o principal alvo de novas variedades geneticamente modificadas (GM) lançadas no mercado mundial, com a inserção de novos genes, que conferem tolerância a herbicidas ou resistência a insetos (PECHANOVA et al., 2013). Dados de produção e produtividade do milho geneticamente modificado (GM) mostram que alcançou 81,4% de grãos no território nacional na safra 2012/2013 (CELERES, 2013), com estimativa de atingir 99 milhões de toneladas na safra 2016/2017 (CELERES, 2016).

Apesar da grande produção agrícola, a comercialização de alimentos transgênicos tem sido ainda um tema controverso. Com o avanço da produção utilizando tecnologia de DNA recombinante, diversos questionamentos quanto à inocuidade e segurança de alimentos derivados de plantas transgênicas têm sido levantados. Tais questões são relacionadas com possíveis danos ao meio ambiente onde são produzidos e potenciais perigos à saúde humana (PECHANOVA et al., 2013).

Dentre as preocupações sobre a segurança desses alimentos estão eventuais alterações causadas pela migração de genes de microrganismos usados na transformação, a pleiotropia causada pelos genes exógenos (CELLINE et al., 2004), a disseminação de genes de resistência a antibióticos, a perda do perfil nutricional de alimentos básicos da dieta, a introdução de fatores antinutricionais e a incorporação de proteínas tóxicas ou alergênicas (RUEBELT et al., 2006; FONSECA et al., 2012). Estas alterações, por sua vez, podem levar a um acúmulo dos compostos indesejados, ou modificações bioquímicas, que poderiam interagir com a regulação de outras vias bioquímicas e alterar os produtos derivados de plantas (GONG et al., 2012).

Segundo preconizam as organizações internacionais, um alimento é considerado seguro se existe certeza científica de que nenhum perigo potencial poderá resultar de seu consumo, dentro das condições aceitáveis de uso. Em função desta premissa, as avaliações de segurança dos transgênicos seguem padrões internacionais definidos pela Organização

Mundial da Saúde (OMS) e pela Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO/ONU), entidades que já manifestaram apoio aos alimentos GM.

Desde o início das modificações genéticas em organismos destinados à alimentação humana e animal, em 1996, foi introduzido o conceito de “equivalência substancial”, empregado para determinar analogias e diferenças, intencionais ou não, entre um alimento novo GM e o produto homólogo convencional, genitor, já existente e com histórico seguro de uso (COLL et al., 2011). Porém, esta é uma avaliação que permite a identificação de potenciais diferenças em relação às análises agronômicas a campo e composicional do alimento, sem discriminar eventuais alterações em cada fração nutricional analisada.

Mesmo conhecendo tais limitações, a equivalência substancial é considerada uma importante ferramenta para comprovar a inocuidade das transformações, para posterior aprovação de processos de liberação comercial. Em nosso país, avaliação de segurança de qualquer OGM é atribuição da Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio) que analisa um dossiê minuciosamente documentado apresentado pelos interessados, quanto a segurança à saúde humana e animal, e ao ambiente. Para produtos usados como alimentos, a segurança e inocuidade alimentar devem ser garantidas através de estudos comparativos entre as variedades convencionais e modificadas.

Novas metodologias de análise têm sido desenvolvidas para ampliar a detecção de diferenças na transcrição de proteínas e metabólitos secundários intracelulares. Algumas delas são úteis para investigar possíveis alterações não abrangidas pelos métodos químicos clássicos. Dentre as metodologias empregadas, as técnicas “ômicas” são ferramentas poderosas, que fornecem informações a nível molecular da variabilidade genética efetivamente expressa e presente no produto final destinado à alimentação (BÁLSAMO et al., 2011, GONG et al., 2012). Na avaliação da segurança de alimentos, a proteômica vem sendo utilizada em estudos comparativos entre alimentos convencionais e geneticamente modificados, a fim de elucidar questões sobre biossegurança, como alterações nos perfis proteicos e metabólitos secundários em diferentes tecidos ou subprodutos (ZOLLA et al., 2008; BÁLSAMO et al., 2011, ALBO et al., 2007; RICROCH; BERGE; KUNTZ, 2011).

1.1 A cultura do milho e sua importância

O milho (*Zea mays* L.) é uma espécie diploide, alógama, anual e herbácia, pertencente à família Poaceae (Gramineae) e classe das monocotidelôneas. Os grãos são a maior parte comercializada da planta, que podem ser colhidos na fase de grãos leitosos (para silagem) ou após sua maturação fisiológica (destinados à alimentação humana, animal e usos industriais) (COLL et al., 2011). Os grãos de milho podem ser caracterizados por sua qualidade, quantidade, peso, composição do endosperma, tipo (duro, dentado, doce e pipoca) e textura (semidentado e semiduro) (BROWN, DARRAH, 1985; FONSECA et al., 2014).

O milho é considerado um dos exemplos mais importantes de domesticação de plantas pelo homem. Sua origem tem sido vastamente estudada e várias hipóteses foram propostas. A mais consistente é aquela que demonstra que o milho descende do teosinte (*Zea mays subsp. parviglumis*), uma gramínea com várias espigas sem sabugo, poucas sementes, que pode cruzar naturalmente com o milho e produzir sementes férteis (GALINAT, 1995; FREITAS, 2001).

Dentre as espécies originárias das Américas, o milho é uma cultura de grande e diversificada utilização na sociedade moderna e um dos produtos agrícolas de maior distribuição mundial, tanto em produção quanto em consumo (OECD, 2003; GUIMARÃES, 2007). Esta commodity versátil possui inúmeras utilizações: como o consumo *in natura*, ou após o processamento industrial (farelos, farinhas, óleos de cozinha e adoçantes), indústrias de bebidas alcoólicas e refrigerantes (destilação e fermentação) e indústrias químicas (adesivos para têxteis) e biocombustíveis (PECHANOVA et al., 2013).

Além disso, o milho é uma das espécies cultivadas mais adaptadas a diferentes ambientes e sistemas de cultivo, sendo produzido em vários países. O Brasil ocupa o terceiro lugar na produção mundial de milho (71 milhões de toneladas de grãos), atrás apenas dos Estados Unidos e China (273 milhões de toneladas e 205 milhões de toneladas de grãos, respectivamente) (FAOSTAT, 2014).

Quanto à composição nutricional do grão de milho os valores são considerados satisfatórios, pois apresenta em média 70-75% de carboidratos, 3-5% de lipídeos, 9% de fibras e de 8-11% de proteínas (LANDRY et al., 2005). No entanto, a proteína do milho sozinha não é considerada adequada para a nutrição de animais monogástricos (incluindo o homem). Isso se deve ao endosperma, onde se encontra 70% da proteína do grão, possuir uma

baixa porcentagem de aminoácidos essenciais como a lisina e triptofano, que são necessários para a manutenção de uma dieta balanceada (VASAL, 1994; 1999; LANDRY et al., 2004).

1.1.1 Milho obtido por melhoramento clássico

O melhoramento clássico representa, desde os primórdios da agricultura, a forma mais usada e sustentável, em termos econômicos, sociais e ambientais, para o aumento da produtividade das culturas (CASTRO et al., 2006). Desde o início do século XX, o milho tem sido um organismo modelo para o estudo da biologia e genética de plantas monocotiledóneas, e, atualmente, é um dos sistemas genéticos mais estudados (STRABLE; SCANLON, 2009). Como uma espécie de polinização cruzada, o milho possui um extraordinário nível de diversidade genética, o que favorece a elucidação de fenômenos biológicos como a evolução, recombinação, transposição, heterose, e fenômenos epigenéticos como a paramutação (STRABLE; SCANLON, 2009; PECHANOVA et al., 2013).

No Brasil, até a década de 90, o Sistema Brasileiro de Pesquisas Agropecuárias, através da Embrapa, dominava a coleta e a preservação de material genético das sementes de milho, bem como seu melhoramento e lançamento de novas variedades (CASTRO, et al., 2006). Atualmente, empresas privadas produtoras de sementes, selecionam as características agronômicas necessárias para maior produtividade dos grãos através do melhoramento genético. Para tanto, parâmetros como condições ambientais de plantio, condições climáticas (chuvas, temperaturas, geadas), incidência de doenças, época de plantio e finalidade de uso da cultura são avaliados, para que novas variedades de milho sejam disponibilizadas aos agricultores. (BÁLSAMO, 2011)

No melhoramento do milho, algumas espécies selvagens têm sido consideradas para a ampliação da diversidade genética já existente. No entanto, estudos prévios têm demonstrado que a domesticação levou a perda da diversidade genética no milho, estreitamento do germoplasma e diminuição dos teores de proteína, bem como aminoácidos essenciais (FEDAK, 1984; SMITH, 1988; LU, 2000; WANG et al., 2008).

Em 1963, a obtenção do milho mutante opaco-2 (o-2), acarretou grande comoção ao se acreditar que esta variedade poderia solucionar o problema da baixa qualidade nutritiva do milho. Foi verificado que a síntese de grande parte das proteínas α-zeínas (que contém baixa concentração de lisina e triptofano) encontravam-se reduzidas no endosperma das sementes de milho o-2, devido a um decréscimo de seus mRNAs (MERTZ, BATES, NELSON, 1964;

HABBEN et al., 1993). Os pesquisadores acreditaram que o problema da baixa quantidade de aminoácidos essenciais no milho estava solucionado, contudo, à medida que o milho o-2 não conseguiu aceitação no mercado, devido sua inferioridade agronômica (baixa produtividade e alta suceptibilidade a patógenos), menor velocidade de secagem e maior ocorrência de danos mecânicos, essa euforia se esvaiu (OR, BOYER, LARKINS, 1993; VASAL, 1994; TORRENT et al., 1997).

Nas últimas décadas, embora o interesse mundial pelos milhos o-2 houvesse declinado, pesquisadores do Centro Internacional de Melhoramento de Milho e Trigo (CIMMYT), localizado no México, conseguiram superar os principais problemas agronômicos através da introdução de genes modificadores de endosperma, mantendo as características químicas e nutricionais do mutante o-2. Surgiram então as variedades de milho denominadas *Quality Protein Maize* (QPM). Estes milhos apresentam altas concentrações de lisina e triptofano e são 70% mais digeríveis que os milhos comuns (VASAL, 1999; GAZIOLA et al., 1999; AZEVEDO et al., 2003).

No Brasil, os estudos sobre melhoramento genético de milho são relativamente recentes. Em 1983, a Embrapa Milho e Sorgo, introduziu duas variedades QPM do CIMMYT, iniciando assim um programa para melhorar a qualidade proteica do milho. Oriundas deste programa surgiram as variedades BR 473 e BR 451. Estas variedades QPM apresentam altos teores de lisina e triptofano (aproximadamente 50% maior que variedades convencionais normais), são adaptadas às diversas condições edafoclimáticas do país, alta eficiência produtiva sem aumentar os custos de produção e são competitivas com algumas das variedades de endosperma normal de ciclo precoce comumente plantadas no Brasil.

Estudos prévios têm demonstrando a superioridade nutricional das variedades QPM BR 473 e BR 451 quando comparadas com variedades convencionais normais (PAES, BICUDO, 1995; PASCHOALICK, 1998; VELOSO et al., 2004). Em ensaios com ratos recém-desmamados, duas variedades QPMs (BR 451 e BR 473) e uma normal (BR 201), foram avaliadas quanto ao aproveitamento biológico da proteína. Em comparação com a caseína, o milho normal apresentou valor biológico relativo de 65%, enquanto que para as variedades QPMs, este valor biológico foi aproximadamente 85%, indicando a melhor qualidade da proteína presente na farinha dos materiais QPMs em relação ao milho comum (PAES, BICUDO, 1995).

1.1.2 Milho obtido por recombinação genética

A tecnologia de DNA recombinante é utilizada para a produção de planta GM, baseada na transformação genética através da inserção de uma ou mais sequências de DNA no genoma da planta, geralmente isoladas de espécies diferentes e não relacionadas, para garantir a expressão do(s) gene(s) de interesse (GARCÍA-CAÑAS; CIFUENTES, 2012). A obtenção de uma planta geneticamente modificada baseia-se em três etapas principais: a) a obtenção do gene a ser incorporado, normalmente encontrado na natureza e isolado dos demais genes do organismo doador; b) a técnica de introdução do gene na planta receptora, sendo os principais métodos de transformação via *Agrobacterium*, biobalística e RNA de interferência (RNAi) e c) a regeneração da célula em uma nova planta por meio de cultura de tecidos. Estes métodos são usados para criar plantas geneticamente modificadas para o cultivo de matérias-primas e alimentos, por meio da introdução de códigos genéticos resistentes a doenças causadas por insetos ou vírus, por um aumento da tolerância a herbicidas, aumento de produtividade e adaptação às diversas condições de cultivo. A introdução do transgene no genoma da planta receptora ocorre de forma controlada e independente da fecundação. Depois de incorporado torna-se parte do material genético da planta sem alterar sua constituição genética global.

As primeiras culturas GM liberadas comercialmente, foram desenvolvidas para conferir melhorias de ordem agronômica, como tolerância a herbicidas e resistência a insetos (NATURE, 2013). Na última década, duas novas linhas na engenharia genética estão sendo exploradas para o setor de alimentos: a alteração de rotas metabólicas complexas usando múltiplos genes e características que beneficiem os consumidores (melhoria nutricional e conservação pós-colheita, entre outros). Estas plantas têm sido chamadas de culturas GM de Segunda Geração, pois beneficiam tanto os países desenvolvidos quanto os países em desenvolvimento, contribuindo com o aumento na oferta de alimentos e diminuindo a prevalência de desnutrição provocada pela ausência de micronutrientes, que apresentarão níveis mais elevados (KOK; KUIPER, 2003; CHASSY et al., 2004).

Nos últimos 20 anos, desde que foram introduzidas e começaram a ser comercializadas, as plantas geneticamente modificadas (GM) têm superado suas genitoras convencionais em vários aspectos, como produtividade, aceitabilidade, custo-benefício, entre outros. Em 2015, um total de 28 países plantaram culturas GM, totalizando uma área mundial de 179,7 milhões de hectares, produzindo-se 840,3 milhões de toneladas de grãos. No entanto,

a grande maioria destas plantas GM foram plantadas em apenas 5 principais países: Estados Unidos, Brasil, Argentina, Índia e Canadá (JAMES, 2015).

Na colheita de 2008 para 2009, o Brasil teve um crescimento exponencial dos seus cultivares GM que correspondem à soja, milho e algodão, ultrapassando a Argentina e tornando-se o segundo maior produtor do mundo de plantas GM, ficando atrás apenas dos Estados Unidos. De 2009 para 2010 o Brasil aumentou mais 4 milhões de hectares de área plantada de cultura GM totalizando 25,4 milhões de hectares (JAMES, 2010). Enquanto alguns países mantiveram-se estáveis ou diminuíram a quantidade de área plantada com transgênicos, o Brasil apresentou um salto de 21% (6,3 milhões de hectares) em cultivos GM plantados de 2011 a 2012 (NATURE, 2013). Para o ano de 2015, foram cultivados 15,4 milhões de hectares e colhidos 71,2 milhões de toneladas de grãos GM no país, com uma taxa de adoção de 82,7% (CÉLERES, 2015).

Com relação ao milho, os grupos de pesquisa que produziram as primeiras plantas transgênicas dessa cultura, utilizando a técnica de biobalística, foram Gordon-Kamm et al. (1990) e Fromm et al. (1990). Estes pesquisadores obtiveram plantas de milho férteis e demonstraram a possibilidade de se transferir os genes introduzidos para a progênie com grande eficiência.

No Brasil, o primeiro evento de milho GM aprovado comercialmente pela CTNBio (Comissão Técnica Nacional de Biossegurança) e pelo Conselho Nacional de Biossegurança (CNBs) foi o evento MON810 (BRASIL, 2008). Essa cultura GM contém a inserção de DNA recombinante, que comanda a expressão da endotoxina sintética *Cry*1A(b), conferindo resistência aos insetos lepidópteros, especialmente a broca européia do milho (*Ostrinia nubialis*), principal parasita da cultura e responsável pela redução de 5-10% da produtividade das áreas cultivadas (BÁLSAMO, 2011; FONSECA et al., 2012). Depois do MON810, outros eventos de milho GM foram aprovados no Brasil nos últimos anos, totalizando 33 eventos atualmente.

A Resolução Normativa Brasileira nº 5 da CTNBio descreve as regras para liberação de Organismos Geneticamente Modificados (OGM) e seus derivados. O procedimento para aprovação de novos OGM se baseia em avaliações comparativas de segurança. Avalia-se um dossiê que inclui informações relacionadas ao OGM, como caracterização molecular, análise composicional, avaliação dos riscos para saúde humana e animal, avaliação de riscos ambientais e plano de monitoramento (BRASIL, 2008). Os OGMs aprovados são submetidos a testes toxicológicos, alergênicos, nutricionais e ambientais, que passam pela análise da

CTNBio, instância colegiada vinculada ao Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações (MCTIC).

De acordo com sua importância agroeconômica, o milho recebe grande atenção de comunidades acadêmicas e indústrias de biotecnologia e, assim, novas variedades com melhores características são desenvolvidas. No entanto, assim como em qualquer cultura GM, a inserção de DNA exógeno ao genoma do milho acarretou preocupações e desconfiança do consumidor, quanto aos potenciais riscos para o ambiente e a saúde humana e animal (PECHANOVA et al., 2013). Embora não haja evidência direta de possíveis efeitos indesejáveis e que alimentos derivados de plantas GM apresentem risco à saúde, inúmeros estudos têm focado em maneiras de avaliar a segurança alimentar de plantas GM em comparação a plantas não-GM já com um histórico de uso seguro, principalmente em se tratando da cultura do milho (ALBO et al., 2007; ZOLLA et al., 2008; COLL et al., 2011; BÁLSAMO et al., 2011;).

Diferentemente de outros vegetais, o milho é um dos cereais que apresenta menor histórico de alergenicidade, sendo recomendado como fonte alternativa para pacientes com hipersensibilidade ao trigo. A alergia ao milho, no entanto, pode ocorrer após a ingestão de grãos ou de seus derivados, bem como pela inalação de farinha de milho ou pólen. Recentemente, alguns estudos foram publicados enfocando uma provável alergia a milho (PASTORELLO et al., 2009; FASOLLI et al., 2009; FONSECA et al., 2012). Contudo, há poucos registros a cerca deste tema em milho, principalmente sobre os mecanismos envolvidos no desencadeamento das reações de hipersensibilidade no indivíduo, que até o momento são desconhecidos (FONSECA et al., 2014).

1.2 Equivalência substancial e segurança alimentar

O desenvolvimento de novas variedades de plantas GM permitiu ampliar opções de sementes para uso em diferentes técnicas agrícolas, aumentar a rotatividade de culturas, a produtividade no campo e a disponibilidade de novos alimentos e derivados para a alimentação humana e de animais. Atualmente, as pesquisas estão engajadas em elevar o teor de nutrientes em alimentos básicos e de alta demanda para populações carentes.

Mesmo com esse avanço, a recombinação genética de organismos destinados à alimentação ainda desperta suspeitas em segmentos sociais, que até admitem seu uso na produção de soros, vacinas e fármacos, mas apresentam resistência ao consumo diário em

componentes da dieta. Entre os argumentos contrários à adoção da técnica de manipulação genética estão: quebra de barreiras naturais no cruzamento entre espécies de reinos diferentes, a imprevisibilidade da introdução de genes em sítios aleatórios do genoma, mutações inesperadas, expressão de novas proteínas, alterações de perfis nutricionais e aparecimento de compostos tóxicos e/ou alergênicos. (GARCÍA-CAÑAS; CIFUENTES, 2012).

Mediante tais preocupações, foram propostos princípios norteadores e marcos regulatório em diferentes países produtores de OGM, incluindo a avaliação de riscos, comercialização, rotulagem e rastreabilidade (KÖNIG et al., 2004) de culturas GMs utilizadas para a alimentação humana e animal. Nestes regulamentos, a avaliação preliminar de inocuidade e segurança alimentar de OGMs baseia-se no conceito de Equivalência Substancial, descrito pela Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE) em 1993 e endossado pela FAO e OMS em 1996. Este conceito fundamenta-se na comparação entre a composição química de organismos convencionais genitores e os GM, bem como de seus respectivos produtos derivados, utilizados na alimentação humana e animal. O conceito da equivalência substancial é baseado na suposição de que as culturas tradicionalmente comercializadas foram consumidas durante décadas e possuem um histórico de uso seguro. Portanto, elas podem ser utilizadas como base comparativa para a avaliação de segurança de novos OGM provenientes destas variedades de plantas já estabelecidas através da transgenia (KÖNIG et al., 2004; CODEX ALIMENTARIUS, 2009; EFSA, 2008; SIMÓ et al., 2014). Este processo de avaliação aborda aspectos de segurança resultantes de efeitos pretendidos da modificação genética, bem como quaisquer efeitos não intencionais sobre a planta, que poderia ser resultado da característica introduzida ou do próprio processo de transformação. Todas as culturas GMs disponíveis comercialmente foram avaliadas quanto à inocuidade e segurança alimentar e receberam aprovações regulatórias utilizando esta abordagem de avaliação (PETRICK et al., 2013).

Para a aplicação do conceito de equivalência substancial entre a cultura GM e a cultura convencional reconhecidamente segura são comparadas características morfológicas, agronômicas e de composição química e nutricional (incluindo macro e micronutrientes, fatores antinutricionais e moléculas tóxicas). Estes parâmetros são a base principal para a avaliação de segurança alimentar entre uma planta/alimento GM e sua linha isogênica (KUIPER et al., 2002; BARTHOLOMAEUS et al., 2013).

A avaliação nutricional de arroz GM (Bar68-1) tolerante a herbicida e sua variedade convencional isogênica (D68) foi avaliada por Xin et al. (2008). Os resultados demonstraram que a qualidade nutricional de ambas cultivares foram substancialmente equivalentes e a

maioria dos resultados de composição química e nutricional se manteve dentro da faixa de valores reportados para outras linhas comerciais de arroz. Os mesmos resultados foram suportados por Wang et al. (2012) ao analisarem a composição nutricional de sementes de arroz GM com resistência a insetos (gene Cry1ab/AC) em comparação com suas linhas isogênicas não GM. Apesar de pequenas diferenças em alguns parâmetros de composição química, estas não foram consideradas biologicamente relevantes.

Por outro lado, mudanças significativas nos parâmetros de composição nutricional podem ser um indicativo de alterações mais profundas nas culturas GM e seus produtos derivados, e os mesmos deverão ser avaliados quanto às consequências adversas para a saúde humana e animal (KÖNIG et al., 2004; NICOLIA et al., 2014). Dessa forma, além dos parâmetros mencionados, alguns pesquisadores recomendavam estudos complementares com animais (KÖNIG et al., 2004; EFSA, 2011). Um estudo prévio realizado por Sanden et al. (2005) mostrou que o milho MON810, contendo a proteína Cry1Ab, resistente a algumas espécies de lepidópteros, foi tão seguro quanto sua variedade convencional genitora, quando adicionado em 12% na alimentação de peixes e codornas, não mostrando diferenças nos parâmetros do trato gastrointestinal, nem qualquer efeito adverso ou tóxico.

A fim de avaliar o impacto da inserção do transgene e os efeitos ambientais sob a segurança alimentar de plantas, Harrigan et al. (2010) analisaram os dados de composição química de diferentes cultivares de milho (*Zea mays* L.) e soja (*Glycine max*) transgênicos cultivados em nove países diferentes (França, Itália, Espanha, Alemanha, Romênia, Estados Unidos, Argentina, Brazil e Chile). Os autores concluíram que as diferenças composicionais encontradas entre as variedades GM em comparação com as suas convencionais são englobadas dentro da variabilidade natural da cultura convencional e que a composição das culturas GMs e convencionais não podem ser desagregadas.

Ainda hoje, a equivalência substancial é amplamente aceita por agências nacionais e internacionais como a melhor orientação disponível para a avaliação da segurança de novas culturas GMs (KÖNIG et al., 2004; PARROT et al., 2010), porém, há setores da sociedade, meio acadêmico e de organizações não governamentais que a classificam como tendenciosa, pois a mesma pode não discriminar efeitos indesejáveis, pequenas alterações moleculares ou de compostos resultantes das novas vias metabólicas (MILLSTONE, 1999).

Assim, juntamente com a avaliação de riscos de alimentos GM, o desenvolvimento de novos sistemas analíticos se tornaram necessários para detecção de alterações mais complexas (ZOLLA et al., 2008). Várias abordagens como a genômica, proteômica e metabolômica foram sugeridas para complementar as abordagens tradicionais, e assim, melhorar a

identificação de alterações não intencionais e que talvez sejam negligenciadas pela equivalência substancial (KUIPER et al., 2001; EFSA, 2006; ZOLLA et al., 2008; RICROCH et al., 2011; BANIASADI et al., 2014).

1.3 Abordagem proteômica para avaliação da segurança alimentar

A proteômica é uma ferramenta útil para a separação de complexo de proteínas e se torna uma parte importante da estratégia da genômica funcional (ZHEN et al., 2007). Apesar de ser uma técnica aperfeiçoada recentemente, vem influenciando vários aspectos ao longo da cadeia produtiva de alimentos, desde a agricultura, produção, inocuidade e garantia da qualidade (MAMONE et al., 2009).

O termo proteoma refere-se ao conjunto de proteínas resultantes da expressão gênica, síntese ribossomal, modificações pós-traducionais e degradação proteolítica de um organismo, num dado momento ou condição de seu desenvolvimento, idade, estado fisiológico, etc. O estudo sistemático de um proteoma permite identificar, catalogar e classificar funcionalmente possíveis efeitos involuntários derivados da manipulação genética de várias espécies de plantas (ZOLLA et al., 2008; PECHANOVA et al., 2013). Consequentemente, a identificação de proteínas expressas permite a associação destes polipeptídeos com diferentes eventos fisiológicos que ocorrem nas células, tecidos e órgãos (KORKUMAT et al., 2006; RICROCH et al., 2013).

As proteínas são especialmente interessantes para a avaliação de segurança e análise de risco, pois podem estar envolvidas em, ou serem o resultado de, síntese de toxinas, antinutrientes ou alérgenos (GONG et al., 2013; AGRAWAL, 2013). Por sua vez, contrariamente ao genoma, que é constante num organismo, o proteoma é altamente dinâmico e dependente do ciclo celular, influências ambientais e tipo de tecido ou célula (ZOLLA et al., 2008).

A análise proteômica tem representado um passo analítico complementar às técnicas de avaliação de segurança de alimentos GM e suas linhas isogênicas, por ser uma ferramenta potencialmente útil na detecção e avaliação de efeitos inesperados e imprevisíveis, (WANG et al., 2015). Ela é eficaz para análise do estado fisiológico, de processos específicos, avaliação das respostas a fatores bióticos e abióticos e alterações no genoma, devido à inserção do DNA recombinante. (KOK; KUIPER, 2003; CELLINI et al., 2004; RUEBELT et al., 2006a,b; ZOLLA et al., 2008; DAVIES, 2010; BÁLSAMO et al., 2011). Além disso, o elevado

emprego da análise proteômica nesta área é devido especialmente ao número de plantas que estão tendo seu genoma sequenciado e liberado internacionalmente (JORRÍN-NOVO et al., 2015). Apesar de todas as vantagens apresentadas, até o presente momento, as ferramentas ômicas, com destaque especial para a proteômica, não foram formalmente aplicadas à avaliação da segurança dos alimentos transgênicos (CHASSY, 2010; WANG et al, 2012).

Dentre as técnicas proteômicas disponíveis, a eletroforese bidimensional (2-DE) combinada com a espectrometria de massas (MS) ainda é muito utilizada na análise comparativa de plantas. A eletroforese 2-DE foi inicialmente desenvolvida por O'Farrel (1975) para análise de proteínas de *Escherichia coli*. Desde então a técnica evoluiu, e hoje devido a sua alta resolução e sensibilidade, tonou-se instrumento importante para a análise e detecção de proteínas em amostras biológicas complexas, com dois níveis de separação: de acordo com o seu ponto isoelétrico (pI) e seu peso molecular (PM) (RABILLOUD et al., 2011).

Por sua vez, a espectrometria de massas é uma técnica analítica revolucionária, utilizada para identificar e quantificar compostos, elucidar propriedades químicas e estruturais de moléculas. A técnica se destaca por ser de alta sensibilidade e por gerar um grande número de resultados com altíssima precisão (XU et al., 2006), que aliados às ferramentas de bioinformática avançou consideravelmente o estudo das proteínas. (GALLARDO et al., 2013).

Assim, devido ao seu fácil manuseio, sensibilidade e relação custo-eficiência satisfatório, pesquisadores de todo o mundo optaram pela utilização de eletroforese 2-DE combinada à MS para a realização de estudos comparativos e assim, iniciaram a formação de bancos de dados de proteínas de inúmeros organismos (VALLEDOR; JORRÍN, 2011).

A análise proteômica comparativa empregando a 2-DE, combinada com MS, têm sido amplamente utilizada para avaliar a segurança de diferentes culturas GMs em comparação com suas linhas isogênicas, como soja (BRANDÃO et al., 2010), arroz (WANG et al., 2012), tomate (CORPILLO et al., 2004; DICARLI et al., 2010), batata (KHALF et al. 2010; LEHESRANTA et al. 2005), trigo (SCOSSA et al., 2008), colza (LIU et al., 2015) e milho (BARROS et al., 2010; BÁLSAMO et al., 2011).

No caso específico do proteoma de milho, sementes da variedade MON810 com sua isolinha não GM foram comparadas por Zolla et al. (2008), por duas gerações consecutivas. Através das técnicas de eletroforese bidimensional e espectrometria de massas, os autores encontraram diferenças na expressão de 43 proteínas das sementes de milho MON810, e concluíram que as sementes GM responderam de forma distinta às variações ambientais,

devido aos rearranjos no genoma provocados pela inserção do gene exógeno à variedade transgênica.

Em outro estudo com duas variedades MON810 e duas linhas isogênicas, foram analisados os perfis proteômicos utilizando três extrações de proteínas de cada amostra (COLL et al., 2011). Estes autores concluíram que MON810 e grãos não GM tinham padrões proteicos praticamente idênticos, com apenas 10 proteínas diferencialmente expressas (COLL et al. 2011).

Como visto, a maioria dos estudos comparativos de plantas tem sido realizados com a eletroforese 2-DE. Entretanto, uma abordagem que também vem sendo empregada é a abordagem *bottom up shotgun proteomics*. Essa técnica consiste na análise direta de uma mistura complexa, já digerida por tripsina em peptídeos, por meio de cromatografia líquida uni ou multidimensional e seguida por espectrometria de massas em *tandem* (CARGILE et al., 2005; MOTOYAMA; YATES, 2008; ARRUDA et al., 2013). A *bottom up shotgun* é uma ferrramenta alternativa atraente, uma vez que pode ser utilizada em qualquer tipo de amostras biológicas, é razoavelmente simples de executar, reprodutível, de custo eficaz e menos propenso a erros e reações colaterais como os que podem ocorrer com a eletroforese 2-DE. Com esta abordagem, existe uma representação significativamente maior das proteínas básicas (pH 7-10), proteínas de baixo peso molecular e/ou proteínas hidrofóbicas, que costumam ser menos detectadas na abordagem 2-DE (WASHBURN et al., 2001).

A comparação entre proteínas identificadas por 2-DE e *bottom up shotgun* indica a relevância de ambas as abordagens proteômicas. A fim de elucidar os mecanismos envolvidos na resposta de sementes de soja à inundação, Yin et al. (2014) se valeram das técnicas 2-DE e *shotgun* (*gel-free*). Foram identificadas 115 proteinas, porém apenas nove proteinas foram comumente detectadas em ambos os métodos, o que os faz concluir que ambos os métodos devem ser utilizadas complementarmente.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a segurança alimentar de sementes de milho destinadas à alimentação humana e animal utilizando abordagens proteômicas

2.2 Objetivos específicos

- Analisar a equivalência substancial das diferentes variedades;
- Obter os mapas proteicos individuais de cada amostra para melhor caracterização de cada variedade ou cultivar;
- Identificar a presença de proteínas adventícias durante o processo de incorporação de novos genes ao genoma de variedades modificadas;
- Detectar possíveis casos de expressão diferenciada de proteínas ou grupos proteicos que levem ao comprometimento de propriedades funcionais ou nutricionais;
- Identificar a partir de análise por espectrometria de massa todas as proteínas que se destacarem com expressão diferenciada.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Todos os experimentos a seguir foram conduzidos no Laboratório de Biotecnologia de Alimentos – Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental (FCF/USP) e no Laboratório de Biociências (LNBio) – Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM) em Campinas – SP.

3.1 Material

Esta seção foi dividida em duas partes de acordo com os estudos realizados.

3.1.1 Comparação de perfil proteico entre linhagens de milhos (*zea mays*, l.) obtidas por melhoramento clássico

Para o primeiro estudo foram utilizadas três variedades de sementes de milho (*Zea mays* L.) convencionais obtidas por melhoramento clássico: duas variedades com qualidade proteica melhorada (QPM – QP1 e QP2) e uma variedade convencional de linhagem normal (CN). As amostras foram cultivadas em 2010/2011 e fornecidas pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa Milho e Sorgo, localizada no município de Sete Lagoas – MG, destinadas para a alimentação humana e animal.

As sementes utilizadas são certificadas para evitar eventual presença de grãos de outra procedência. As características das amostras de milho estão descritas na Tabela 1 e Figura 1.

Tabela 1 - Características das variedades de milho convencional normal (CN) e com qualidade proteica melhorada (QPM)

Nome comercial	Linhagem	Especificação	Região de adaptação	Empresa	Código empregado
BR - 473	Convencional (variedade precoce)	QPM	Brasil	Embrapa	QP1
BR - 451	Convencional (variedade precoce)	QPM	Brasil	Embrapa	QP2
BRS - 4103	Convencional (variedade precoce)	-	CO, SE, NE, N e PR	Embrapa	CN

Legenda: QPM: qualidade proteica melhorada
Fonte: http://www.cnpms.embrapa.br/

Figura 1- Amostras de milho convencional normal (CN) e com qualidade proteica melhorada (QPM)
Legenda: QP1 (BR - 473), QP2 (BR – 451), CN (BRS – 4103)

Para obtenção de amostragens representativas dos lotes de milho fornecidos, utilizou-se o método de quartejamento, conforme normas da ABNT (BRASIL, 1991). Este procedimento foi realizado três vezes por amostra, para obtenção das triplicatas. As amostras de sementes de milho foram devidamente embaladas, etiquetadas e armazenadas a -20 °C antes da utilização, para posterior extração das proteínas e demais etapas experimentais.

3.1.2 Avaliação da segurança alimentar de sementes de milho geneticamente modificadas em comparação com suas respectivas sementes convencionais genitoras

A escolha das amostras seguiu um critério específico que permitiu a comparação entre sementes de milhos (*Zea mays* L.) geneticamente modificados (GM) e suas respectivas sementes convencionais genitoras (CG), cultivadas em território, solos e condições climáticas semelhantes.

Para tanto, foram utilizadas quatro linhas de milho comercialmente disponíveis: duas geneticamente modificadas (GM1 e GM2), sendo um evento com duas modificações (Bt 11) para resistência a insetos da ordem Lepidoptera e tolerância ao herbicida glufosinato e o outro evento com quatro genes combinados por cruzamento convencional (Bt11 x MIR162 x GA21) para resistência a vários insetos Lepidopteros e tolerância aos herbicidas glifosato e glufosinato e duas cultivares convencionais genitoras (CG1 e CG2).

As amostras de milhos GM e CG foram cultivadas em 2010/2012 e fornecidas pela Syngenta Seeds Ltda, localizada no município de Uberlândia - MG, destinadas à alimentação humana e animal e liberadas para comercialização no Brasil pela CTNBio e CNBS desde 2008 e 2010. Todas as sementes utilizadas são certificadas para evitar eventual presença de grãos de outra procedência. As características das amostras de milhos GM e CG estão descritas na Tabela 2 e Figura 2.

Tabela 2 - Características das amostras de milho geneticamente modificadas (GM) e convencionais genitoras (CG) utilizadas

Nome da amostra	Evento	Nome comercial	Resistência a inseto	Tolerância à herbicida	Código
Tork TL*	Bt11	Agrisure™ CB/LL	Cry1Ab	PAT (glufosinato)	GM1
Tork	-----	Convencional	-----	-----	CG1
Maximus TL TG Viptera*	Bt11x MIR162 x GA21	Agrisure® Viptera™ 3110 ou Viptera3	Cry1Ab, Vip3Aa20	CP4 EPSPS e mEPSPS (glifosato), PAT (glufosinato)	GM2
Maximus	-----	Convencional	-----	-----	CG2

Legenda: *TL significa tolerância a lepidópteros e TG tolerância ao glifosato e glufosinato.
Fonte: http://www.ctnbio.gov.br/; http://www.cnpms.embrapa.br/

Figura 2 - Amostras das sementes de milho geneticamente modificado (GM1 e GM2) e convencionais genitores (CG1 e CG2) fornecidos pela Syngenta Seeds

Legenda: GM1 (Tork TL ou Evento Bt 11), CG1 (Tork convencional), GM2 (Maximus TLTG Viptera ou Evento Bt11 x MIR 162 x GA 21) e CG2 (Maximus convencional)
*A coloração vermelha nos milhos se deve ao corante empregado para identificação da certificação de sementes pela empresa de biotecnologia

Mesmo se tratando de experimento com eventos autorizados para comercialização no Brasil, o presente estudo foi apresentado à Comissão Interna de Biossegurança (CIBio) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP e aprovado. O Laboratório de Biotecnologia de

Alimentos recebeu extensão do CQB nº 098 da unidade para desenvolver pesquisas com OGMs de classe de risco I.

Para obtenção de amostragens representativas dos lotes de milho fornecidos, utilizou-se o método de quartejamento, conforme descrito no item 3.1.1.1. Posteriormente, de cada uma das triplicatas foi realizada a análise proteômica em triplicata, a fim de garantir a reprodutibilidade entre as amostras e entre as triplicatas. As amostras de sementes de milho foram devidamente embaladas, etiquetadas e armazenadas a -20 °C antes da utilização, para posterior extração das proteínas e demais etapas experimentais.

3.2 Métodos

As metodologias descritas abaixo foram utilizadas para ambos estudos mencionados acima, salvo se houver algum detalhe aplicável a apenas um conjunto de amostras, este será mencionado nos resultados e discussão.

3.2.1 Composição química

As amostras de milhos foram analisadas em triplicata para as determinações de umidade, proteínas, lipídios e cinzas de acordo com o método descrito pela Association of Official Analytical Chemistry - AOAC (1995). O teor de umidade foi determinado pelo método de secagem das amostras até peso constante por aproximadamente 24 h, em estufa a 105 °C. A proteína total foi determinada pelo nitrogênio segundo o método de micro-Kjeldahl, sendo multiplicado por 6,25. Os lipídios foram determinados pela quantificação de substâncias solúveis em éter etílico, pelo método de Soxhlet (AOAC, 1998). O resíduo mineral foi obtido por calcinação completa da matéria orgânica em mufla a 550 °C, até a obtenção de um resíduo isento de carvão, com coloração branca ou acinzentada, também conhecida como fração cinza. O conteúdo de fibra total foi determinando pelo método enzimático-gravimétrico (PROSKY et al., 1992). Os valores de carboidratos totais foram estimados por diferença em relação à somatória das frações de proteínas, lipídeos e resíduo mineral (FAO, 2003). Os resultados foram calculados em base seca e expressos em g/100 g

3.2.2 Extração e análise de ácidos graxos

Para a quantificação dos ácidos graxos, cada amostra foi inicialmente submetida a uma hidrolise ácida, como descrito no método 996.06 (AOAC, 2002), com algumas modificações. Em um tubo de ensaio, às amostras de milho moídas e previamente homogeneizadas, contendo 50-100 mg de gordura total, foram adicionadas de 50 mg de ácido pirogálico e 1 mL do padrão interno ácido tridecanóico (C13:0, 5 mg/mL), 2 mL de etanol e 5 mL de ácido clorídrico 8,3 M. Este tubo foi aquecido a 70-80 °C em banho com agitação horizontal por 40 min. Após atingir temperatura ambiente, 12 mL de éter etílico e de petróleo foram adicionados, e em seguida, os tubos foram centrifugados, sendo a fase superior foi transferida para um segundo tubo e evaporada em banho termostatizado (< 40 °C) sob fluxo de nitrogênio. A este resíduo, contendo fração lipídica extraída, foi adicionado 1 mL do reagente trifluoreto de boro (7%, em metanol) e 0,5 mL de tolueno e o tubo foi aquecido a 100 °C por 45 min. Após atingir a temperatura ambiente, foi adicionado 2,5 mL de água destilada, 1 mL de hexano e 0,5 g de sulfato de sódio anidro. A fase superior foi cuidadosamente coletada e transferida para o frasco do autoinjetor, acoplado ao cromatógrafo gasoso (Shimadzu Plus GC 2012, Quioto, Japão). As seguintes condições cromatográficas foram utilizadas: coluna cromatográfica de sílica fundida SP-2560 (biscianopropil polisiloxana) de 100 m e 0,25 mm de diâmetro interno; programação de temperatura da coluna: isotérmico a 140 °C por 5 min e aquecimento a 4 ºC por min até 240 ºC, permanecendo nesta temperatura por 30 min; temperatura do vaporizador a 250 ºC e do detector a 260 ºC; gás de arraste: Hélio (1 ml/min.) e razão de divisão da amostra a 1/50. A quantificação dos diferentes ácidos graxos foi realizada por comparação entre os tempos de retenção das amostras, do padrão de referência (Sigma Chemical CO, St. Louis, Missouri, USA) e do padrão interno, segundo método Ce 1h-05 (AOAC, 2005). Os resultados foram expressos em g de ácido graxo/100g de óleo.

3.2.3 Análise de minerais

As concentrações de cálcio (Ca), ferro (Fe), magnésio (Mg) e zinco (Zn) foram determinadas pela digestão das amostras de milho por via seca com adição de ácido nítrico e posteriormente analisadas em espectrofotômetro de absorção atômica (Perkin Elmer Aanalyst 100). As concentrações de cálcio (Ca), ferro (Fe), magnésio (Mg) e zinco (Zn) foram determinadas pela digestão das amostras de milho por via seca com adição de ácido nítrico

(1% HNO_3:H_2O_2) e 0,1% La_2O_3 para Ca e Mg e, posteriormente, analisadas em espectrofotômetro de absorção atômica (Perkin Elmer Aanalyst 100), segundo AOAC (2006). Soluções padrões foram preparadas com $FeCl_3$, $MgCl_2$, e HNO_3 (para Ca e Zn). A qualidade da análise foi monitorada pela leitura de padrões primários (National Institute of Standards & Technology, Gaithersburg, MD, USA). Todas as vidrarias empregadas na análise foram previamente desmineralizadas. As amostras foram analisadas em triplicata e os resultados foram expressos em µg/g.

3.2.4 Extração de proteínas

A extração de proteínas solúveis foi realizada conforme Carpentier et al. (2005) e Albo et al. (2007), com algumas modificações. Aproximadamente 10 g de sementes de milho foram trituradas em moinho analítico (marca IKA, modelo M 20) e almofariz até a obtenção de grânulos menores que 0,5 mm de diâmetro. Em 200 mg do material adicionou-se 5 mL de tampão de extração (0,5 M Tris-HCl, pH 7,5, 0,7 M sacarose, 5 mM EDTA, 0,1 M KCl, 10 mM tiouréia, 2% β-mercaptoetanol, 2% PMSF) e 5 mL de tampão fenol saturado, pH 8,0. A mistura foi homogeneizada por 30 min em banho com gelo e centrifugada (Eppendorf, modelo 5804 R) a 12.000 x g por 15 min a 4 °C, recuperando-se a fase fenólica em tubos Nalgene. Este passo foi repetido por mais duas vezes. Ao final, à fase fenólica recuperada foram adicionados 5 volumes de 0,1 M acetato de amônio diluído em metanol e manteve-se o homogenato a -20 °C por 16 h, para total precipitação das proteínas. Posteriormente, os homogenatos foram novamente centrifugados a 12.000 x g por 15 min a 4 °C. Os pellets foram lavados três vezes com 5 mL de acetona 80% e três vezes com 5 mL de etanol 75%. O resíduo obtido foi mantido à temperatura ambiente por 1 h para secagem e, posteriormente, com nitrogênio gasoso para total evaporação do etanol e secagem final dos pellets. Finalmente, as amostras proteicas foram ressuspendidas em 200 µL de solução de lise (7 M uréia, 2 M tiouréia, 4% CHAPS, 40 mM DTT e 2% IPGphor, pH 3-10), seguida por ultrasonicação em gelo por 30 seg. O material insolúvel foi removido por centrifugação a 12.000 x g por 30 min a 4 °C e o sobrenadante transferido para um novo microtubo.

A quantificação de proteínas totais foi realizada pelo método de Bradford (1976) em espectrofotômetro (marca Micronal, modelo B582) a 595 nm em microplacas. O cálculo foi realizado através da interpolação dos valores de absorbância obtidos com a curva padrão de albumina sérica bovina (BSA).

As amostras proteicas foram armazenadas a -20 °C até serem utilizadas nas análises subsequentes.

3.2.5 Eletroforese unidimensional (1-DE – SDS-PAGE)

Para avaliar a qualidade do extrato de proteínas e como forma de confirmar as concentrações obtidas pelos cálculos da quantificação de proteínas pelo método de Bradford (1976), realizou-se a eletroforese unidimensional em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). As amostras de proteína extraída de cada uma das cultivares de milho foram diluídas em tampão Laemmli (62,5 mM Tris-HCl, pH 6,8, 10% glicerol, 2% SDS, 5% 2-mercaptoetanol, 0,02% azul de bromofenol) (LAEMMLI, 1970). Posteriormente, a solução foi aquecida a 100 °C por 5 min e centrifugada a 7.000 x g por 15 min a 20 °C. Devido ao baixo peso molecular das proteínas a serem observadas, foram polimerizados géis de resolução de concentração 12,5% (1,5 M Tris-HCl, pH 8,8, 40% Acrilamida/Bisacrilamida [35,1:1], 10% SDS, 10% APS e 0,1% Temed) e géis de empacotamento (*stacking* gel) a 4,0% (0,5M Tris-HCl, pH 6,8, 40% acrilamida/bisacrilamida [35,1:1], 10% SDS, 10% APS e 0,1% TEMED). Alíquotas dos homogenatos contendo 50 μg de proteína total foram carregadas no gel. O gel foi corrido no sistema Protean II xi Cell da Bio-Rad a 120 V por aproximadamente 2 h, utilizando tampão de corrida (25 mM Tris-HCl, 192 mM glicina, 0,5% SDS, pH 8,3). O padrão de peso molecular utilizado foi Pre-stained Kaleidoscope Molecular Weight Standards (Bio-Rad, 161-0375), num volume de 4 μl/poço, permitindo a identificação de fragmentos protéicos de peso molecular de 10 a 250 kDa.

Os géis unidimensionais foram incubados em solução fixadora (40% etanol e 10% ácido acético) por 30 min, lavados duas vezes com água destilada deionizada por 10 min e corados em solução de coloração (17% sulfato de amônia, 2% ácido fosfórico, 30% metanol e 0,04% Coomassie blue G-250) por 6 h. Posteriormente, os géis foram lavados em solução descorante (5% metanol e 7,5% ácido acético) até a completa eliminação do corante excedente em aproximadamente 12 h. Os géis corados foram armazenados em recipientes plásticos contendo solução de 4% de ácido acético.

3.2.6 Eletroforese bidimensional (2-DE)

A eletroforese bidimensional foi realizada de acordo com as instruções do fabricante (2-DE Manual, GE Healthcare, 2012). As amostras foram divididas em dois grupos de análise: (i) comparação 1 (QP1 x QP2), comparação 2 (QP1 x CN) e comparação 3 (QP2 x CN) e (ii) comparação 1 (GM1 x CG1) e comparação 2 (GM2 x CG2). Para a primeira dimensão da eletroforese 2-DE as proteínas foram separadas de acordo com seu ponto isoelétrico (pI), através do processo de focalização isoelétrica (IEF). As proteínas extraídas das amostras foram diluídas em tampão de solubilização (7 M uréia, 2 M tiouréia, 4% CHAPS, 40 mM DTT e 2% IPGphor, pH 3-10) para conter 400 µg de proteína total. Posteriormente, adicionou-se tampão de reidratação (7M ureia, 2 M tiouréia, 10% CHAPS, 0,5% IPGphor, 0,002% de azul de bromofenol e 0,7 mg de DTT) até completar um volume de 250 uL. As amostras contendo o tampão de reidratação foram aplicadas em fitas (*strip*) contendo gel para faixa de pH 3-10 (Immobiline DryStrip pH 3-10, 13 cm, GE Healthcare). As fitas foram colocadas em um suporte com canaletas, cobertas com 5 mL de óleo mineral e todo o aparato foi levado ao sistema Ettan IPGphor III - GE Healthcare para a completa focalização isoelétrica após 20 h. Uma vez focalizadas, as tiras foram armazenadas a -20 °C.

Posteriormente, para a segunda dimensão, as tiras foram encubadas em solução de equilíbrio (75 mM Tris-HCl, pH 8,8, 6 M ureia, 29,3% glicerol, 2% SDS e 0,002% azul de bromofenol e 1% DTT) por 15 min. Em seguida, lavadas com água destilada, mantidas por 15 min em solução de alquilação (75 mM Tris-HCl, pH 8,8, 6 M uréia, 29,3% glicerol, 2% SDS, 0,002% azul de bromofenol e 2,5% iodoacetamida) e lavadas em tampão glicina (pH 8,3).

As fitas foram acopladas na base superior de géis de poliacrilamida verticais (150 x 150 x 1,5 mm) a 12,5% (1,5 M Tris-HCl, pH 8,8, 40% acrilamida/bisacrilamida [35,1:1], 10% SDS, 10% APS e 0,1% temed). Para fixar as tiras nos géis de poliacrilamida, ambos foram cobertos com solução de agarose (0,5% agarose, 0,002% azul de bromofenol, 25 mM Tris-HCl, 192 mM glicina e 0,1% SDS), deixando-se um pequeno orifício para pipetar os padrões de peso molecular (High Molecular Weight SDS Calibration Kit for Eletrophoresis - GE, 17061501-, permitindo a identificação de fragmentos proteicos de peso molecular de 53 a 212 kDa e Low Molecular Weight SDS Calibration Kit for Eletrophoresis -GE, 17044601-, de peso molecular de 97 a 14,4 kDa), ambos num volume de 7 µl/poço.

Os géis foram levados para a cuba eletroforética 2-DE (Excel Gel SDS Homogeneous 12,5 - Pharmacia) contendo tampão glicina (pH 8,3) e a corrida realizada a 600 V, 20 mA e 30 W, por 30 min a 12 ºC, seguida de 600 V, 50 mA e 30 W por 6 h.

3.2.7 Detecção das proteínas no gel 2-DE e análise das imagens

Para a visualização das proteínas isoladas da eletroforese 2-DE, os géis foram colocados em solução fixadora (40% etanol, 10% ácido acético) por 60 min, lavados duas vezes com água destilada por 10 min e mantidos em solução de coloração (17% sulfato de amônia, 2% ácido fosfórico, 30% metanol, 0,04% Coomassie Blue G-250) por 24 h. Posteriormente, os géis foram lavados em solução descorante (5% metanol e 7,5% ácido acético) até a completa eliminação do corante excedente em aproximadamente 12 h. Os géis corados foram armazenados em recipientes plásticos contendo solução de 4% de ácido acético.

A digitalização das imagens dos géis 2-DE foi realizada em *scanner* Image Scaner III, LabScan 6.0 (GE Healthcare) com uma resolução de 300 dpi. As imagens dos géis foram analisadas pelo software Image Master 2D Platinum (versão 7.0, GE Healthcare). As proteínas foram reconhecidas isoladamente pelo programa em forma de spots. Os mapas de spots, ou mapas proteicos, identificados pelo programa foram comparados com os mapas da mesma amostra e mapas de amostras diferentes (GM1 x CG1 e GM2 x CG2), e as variações entre eles foram avaliadas estatisticamente. Os parâmetros aplicados no programa para detecção automática dos spots foram: saliência (curvatura do spot) = 80; área mínima (delimitação física gerada pelo spot) = 5 e smooth (intensidade, gerada em pixels) = 2. Os falsos spots foram editados manualmente. Os spots foram quantificados pelo seu volume relativo (% Vol.), definido como a razão entre o volume individual de cada spot pela soma de todos os spots válidos no gel. Os spots reprodutíveis em pelo menos duas réplicas de cada variedade (GM e convencional) e apresentando diferença significativa ($p < 0,05$) foram considerados diferencialmente expressos e incluídos na análise por espectrometria de massas (MS). Os pesos moleculares (PM) e pontos isoelétricos (pI) experimentais das proteínas foram determinados automaticamente pelo programa, a partir de determinados pontos de referência anotados manualmente.

3.2.8 Digestão de proteínas separadas por gel 2-DE

Os spots de interesse ou diferencialmente expressos ($p < 0,05$) dos géis 2-DE foram extraídos e submetidos a digestão com tripsina (Promega/Sequence grade – cód. V51111), conforme Shevchenko et al. (1996), com algumas modificações. A tripsina foi preparada para

uma concentração final de 20 ng/µL (20 µg de tripsina em 1000 µL de bicarbonato de amônio).

Os spots foram descorados com 500 µL de solução descorante (metanol 50% e ácido acético 2,5%) por 2 h, à temperatura ambiente. Esta etapa foi repetida mais uma vez, porém com 1 h de incubação. Depois, os spots foram desidratados com 200 µL de acetronila 100% por 5 min. Este passo também foi repetido uma vez. Posteriormente, foram adicionados 30 µL de solução de ditiotreitol (DTT) 10 mM em bicarbonato de amônio **(**NH_4HCO_3**)** em cada um dos spots. Após 30 min de incubação, a solução foi removida e 30 µL de solução de iodoacetamida (IAA) 50 mM em NH_4HCO_3 foram adicionados. Passados 30 min de incubação, a solução foi removida e os spots foram reidratados com 100 µL de NH_4HCO_3 100 mM por 10 min. Removida esta solução, os spots foram desidratados com acetonitrila 100% por 5 min, repetindo-se os passos da reidratação e desidratação. Finalmente, o excesso de acetonitrila foi evaporado a vácuo.

Foram adicionados 30 µL de solução de tripsina em 50 mM de NH_4HCO_3 (20 ng/µL) nos spots e os mesmos foram incubados por 30 min. O excesso de solução foi removido, adicionou-se 20 µL de solução NH_4HCO_3 50 mM e os tubos com os spots permaneceram por 16 h a 37 ºC. No dia seguinte, em cada tubo foram adicionados 12 µL de ácido fórmico 5% e incubados por 10 min. O sobrenadante foi recolhido em outro tubo eppendorf, e aos spots foram adicionados mais 12 µL de solução ácido fórmico 5% em acetonitrila 50%, incubando-se por 10 min. Os sobrenadantes foram coletados e este passo repetido. Os sobrenadantes recolhidos contendo as proteínas extraídas foram evaporados e armazenados a -20 ºC.

3.2.9 Purificação, digestão e dessalinização de misturas complexas de proteínas (*bottom up shotgun proteomics ou gel-free*)

Como uma ferramenta complementar à eletroforese 2-DE, na abordagem gel free (*bottom up shotgun proteomics*), amostras proteicas foram preparadas em triplicata, de acordo com Kamal et al. (2015) com modificações. Cada amostra foi diluída em solução NH_4HCO_3 50 mM para atingir uma concentração de 50 µg de proteína total. Posteriormente, as amostras foram reduzidas com solução de DTT 5 mM por 25 min e alquiladas com IAA 14 mM, por 30 min em temperatura ambiente e protegido da luz. As amostras foram então incubadas novamente com solução DTT 5 mM à temperatura ambiente por 15 min para paralisar a reação de alquilação. Subsequentemente, as amostras foram diluídas 1:5 com NH_4HCO_3 50

mM para alcançar uma concentração de ureia final de ureia de 1,6 M e 0,1 M $CaCl_2$ foi adicionado para uma concentração final de 1 mM.

As proteínas foram digeridas com tripsina (20 ng/µL) numa concentração de 1:50 enzima/proteína por 16 h a 37 °C. A reação enzimática foi parada com a adição de solução de ácido tricloroacético (TFA) 3% para total dessalinização das amostras. Os peptídeos resultantes foram dessalinizados com seringas Sep-pack (Waters, Mildford, MA, USA). As amostras foram secas em um concentrador Speed vac e estocadas a -20 ºC até o momento da análise em espectrômetro de massas (MS).

3.2.10 Identificação de proteínas por espectrometria de massas (ESI-Q-TOF) e análise bioinformática

Para a análise de nano-ESI-QTOF MS/MS, os peptídeos obtidos por digestão enzimática com tripsina (em gel 2-DE e *gel-free*) foram ressuspensos em 12 uL de ácido fórmico a 0,1% e centrifugados a 10.000 x g por 5 min a 20 °C. Os peptídeos (num volume de 4,5 uL) foram separados em coluna C18 (100 um x 100 mm) RP-nanoUPLC (nanoAcquity, Waters, UK) acoplada a um espectrômetro de massa Q-TOF Ultima (Waters) com fonte de nanoelectrospray (nano-ESI) a uma vazão de 0,6 uL/min. O gradiente de acetonitrila para as proteínas digeridas foi de 2-90% em ácido fórmico a 0,1% por 10 min. A voltagem do nano-ESI foi ajustada a 3,5 kV, a voltagem do cone foi de 30 V e a temperatura da fonte de 100 °C. O instrumento foi operado no modo "top três", no qual o espectro de MS adquirido é seguido por MS/MS dos três principais picos detectados mais intensos. Após a fragmentação MS/MS, o íon foi colocado na lista de exclusão por 60 s.

Os espectros foram obtidos utilizando o software MassLynx v.4.1. Os arquivos de dados brutos foram convertidos em formato .mgf pelo software Mascot Distiller v.2.3.2.0, 2009 (Matrix Science, Londres, Reino Unido) e comparados com o banco de dados Viridiplantae (plantas verdes) (lançado em agosto de 2014, 19.922.528 sequências; 6.828.478.126 resíduos) usando MASCOT v.2.3.0, 2009 (Matrix Science, Londres, Reino Unido). Os dados MS/MS foram comparados com o banco de dados do NCBI.

Os parâmetros utilizados pelo programa foram: modificação fixa = carbamidometilação de cisteína; modificação variável = oxidação da metionina; número de clivagens perdidas = 2; enzima utilizada = tripsina; limiar de significância = $p < 0,05$ e tolerância iônica MS/MS = 0,1 Da, para ambos os íons precursores e de fragmentação. A

identificação dos espectros e a correlação de possíveis similaridades com proteínas presentes em bancos de dados foram realizadas automaticamente pelo programa MASCOT. Quando a proteína é identificada, ela recebe uma pontuação (score) que é obtido pelo valor negativo do logaritmo da probabilidade do valor m/z teórica coincidir com o valor m/z experimental. Portanto, quanto maior for o score, menor será a probabilidade de identificação ser um evento aleatório. Desta forma, quando os escores dos íons individuais foram maiores que o escore limiar (*Mascot íon score* > 45), as proteínas foram consideradas como confiáveis ou de extensa homologia ($p < 0,05$). O intervalo de confiança das proteínas foi acima de 95%. Os pesos moleculares e pontos isoelétricos teóricos foram sugeridos pelo banco de dados do NCBI, referentes à proteína com maior homologia com cada dado experimental. Para a análise global, foram aceitas todas as proteínas identificadas em, no mínimo, duas réplicas de cada condição, tendo sido identificadas com um mínimo de dois peptídeos e índices médios (*fold change*) de 1,5 ou 50%.

A pesquisa com BLAST contra o banco NCBI (http: //www.ncbi.nlm) foi realizada para confirmar as identificações das proteínas. Para a obtenção das categorias funcionais das proteínas, a ferramenta de busca disponível online, Blast2GO (http://www.blast2go.org), foi utilizada (CONESA et al., 2005; GOTZ et al., 2008). Essa ferramenta assinala os termos da GO baseado em definições prévias obtidas pelo BLAST (http://blast.ncbi.nim.nih.gov/blast.cgi). As sequências das proteínas identificadas foram submetidas, em formato FASTA, na plataforma Blast2GO, onde foram comparadas contra outros bancos de dados no NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/staff/tao/URLAPI/remote_blastdblist.html).

3.2.11 Análise estatística

Os resultados são uma média aritmética de três repetições e seus respectivos desvios padrão. Foi utilizada a técnica de ANOVA nas repetições dos dados experimentais para determinar diferenças significativas sobre as variáveis avaliadas nos tratamentos. Quando estas diferenças foram detectadas ($p < 0,05$) se procedeu com a análise de teste de Tukey para a comparação das médias. As técnicas de análises estatísticas foram aplicadas usando o software SAS (Version 9.0, SAS Institute Inc. Cary, NC). Quanto às proteínas diferencialmente expressas, somente aquelas com variações quantitativas *fold* 1,5 ou mais foram selecionadas para análise posterior. O programa GraphPad Prism 5.00 foi utilizado para a realização das figuras.

4 RESULTADOS

Esta seção foi dividida em duas partes, de acordo com os resultados obtidos nos estudos com linhagens de milho QPM e com milhos de eventos GM.

4.1. Comparação de perfil proteico entre linhagens de milhos (*Zea mays* L.) obtidas por melhoramento clássico

4.1.1 Composição química

A Tabela 3 apresenta os resultados das determinações de umidade, proteína total, fração lipídica, cinzas (resíduo mineral seco), fibras totais, carboidratos e minerais de cada amostra, para a comparação precisa dos parâmetros de composição nutricional, indispensáveis na avaliação da equivalência substancial entre as três amostras analisadas.

Tabela 3 – Análise composicional de sementes de milho convencional normal (CN) e com qualidade proteica melhorada (QPM)

Componentes	**CN**	**QP1**	**QP2**	**Pr > F**	***Referência**
Umidade (pf)	12,14 ± 0,28[a]	12,33 ± 0,10[a]	12,50 ± 0,68[a]	0,6177	7,0 - 23,0
Macronutrientes[f] g/100g (n = 3)					
Proteína (ps)	9,98 ± 0,19[a]	10,26 ± 0,04[a]	10,18 ± 0,16[a]	0,1290	6,0 - 12,7
Lipídios (ps)	5,24 ± 0,20[a]	5,74 ± 0,29[a]	5,44 ± 0,13[a]	0,0708	2,6 - 5,8
Cinzas (ps)	1,14 ± 0,11[b]	1,47 ± 0,01[a]	1,31 ± 0,06[ab]	0,0037	1,1 - 3,9
Fibras Totais (ps)	13,01 ± 0,12[b]	13,76 ± 0,24[a]	13,49 ± 0,18[a]	0,0072	9,2 - 13,8
Carboidratos[a] (ps)	83,64 ± 0,37[a]	82,53 ± 0,32[b]	83,07 ± 0,35[ab]	0,0381	80,1 - 85,9
Micronutrientes[f] (µg/g) (n = 3)					
Cálcio (ps)	25,00 ± 2,00[a]	34,00 ± 1,00[a]	29,00 ± 1,00[a]	0,2949	31,3 - 73,5
Ferro (ps)	14,60 ± 1,03[b]	19,00 ± 0,01[a]	19,67 ± 1,15[ab]	<0,0001	12,3 - 21,6
Magnésio (ps)	966,00 ± 2,00[b]	1067,67 ± 1,53[a]	1144,17 ± 3,04[a]	0,0721	861,0 - 1.360,0
Zinco (ps)	21,53 ± 0,57[b]	30,03 ± 2,03[a]	23,00 ± 1,00[b]	<0,0001	17,2 - 28,8

Legenda: pf: peso fresco; ps: peso seco; [a] Carboidratos do peso seco foram estimados pela fórmula: % carboidratos = 100 - (% proteína + % lipídios + % cinzas); [f] Unidades para macronutrientes: g/100; micronutrientes: µg/g; umidade: %
Valores médios ± desvio padrão. Diferentes letras na linha são estatisticamente diferentes ($p < 0,05$)
Fonte: International Life Sciences Institute (ILSI)[*] - https://www.cropcomposition.org; OECD, 2002

Não foram encontradas diferenças significativas nos níveis de umidade, proteína e lipídios entre as amostras, no entanto, os valores brutos das amostras QP1 e QP2 foram superiores à amostra convencional normal (CN). Em ambos, QP1 e QP2, os níveis de cinzas e fibras totais foram maiores que a amostra convencional (CN), no entanto, o milho QP2 não diferiu estatisticamente da amostra CN nos níveis de cinzas e carboidratos. A amostra QP1 foi

inferior no nível de carboidratos quando comparada às demais amostras, contudo, não foi estatisticamente diferente da amostra QP2.

Pela análise de minerais é possível observar que as sementes de milho QPM apresentam altos níveis de Mg, Fe e Zn ($p < 0,05$) quando comparados com o milho CN. No caso do Ca, apenas o milho QP1 situou-se dentro da faixa de variação referencial, com nível baixo na amostra CN e intermediário na QP2. O mesmo comportamento foi notado nos resultados de Zn, com valores mais baixos na amostra controle CN, mais altos para o milho QP1, inclusive superiores à faixa encontrada em tabelas internacionais, enquanto o milho QP2 foi similar à amostra CN.

Os valores médios de ácidos graxos das amostras de milho QPM e CN são apresentados na Tabela 4. A avaliação dos perfis de ácidos graxos entre as amostras QPM e CN não mostrou diferenças significativas nos níveis de ácido palmítico (C16:0), linoléico (C18:2), linolênico (C18:3) e lignocérico (C22:0). Os ácidos graxos em maior quantidade nas amostras de milho são o ácido oleico (C18:1) e linolênico (C18:2).

Tabela 4 - Ácidos graxos (g/100g) de sementes de milho convencional normal (CN) e com qualidade proteica melhorada (QPM)

Ácidos graxos (ps) (n=3)	**CN**	**QP1**	**QP2**	**Pr > F**	***Referência**
Palmítico C16:0	0,78 ± 0,02[a]	0,81 ± 0,03[a]	0,74 ± 0,02[a]	0,0602	0,259 – 0,415
Palmitoléico C16:1 (n-7)	ND	ND	0,01 ± 0,00	-	0,003 - 0,006
Esteárico C18:0	0,14 ± 0,00[a]	0,13 ± 0,00[b]	0,09 ± 0,01[c]	< 0,0001	0,032 - 0,074
Oléico C18:1 (n-9)	1,71 ± 0,05[a]	1,84 ± 0,10[a]	1,40 ± 0,06[b]	< 0,0010	0,498 - 1,087
Linoléico C18:2 (n-6)	2,43 ± 0,03[a]	2,59 ± 0,13[a]	2,64 ± 0,09[a]	0,0789	0,910 - 1,763
a-Linolênico C18:3 (n-3)	0,06 ± 0,01[a]	0,06 ± 0,00[a]	0,06 ± 0,00[a]	0,8337	0,017 – 0,042
Araquidônico C20:0	0,03 ± 0,01[a]	0,03 ± 0,00[b]	0,02 ± 0,00[b]	< 0,0030	0,008 - 0,014
Eicosanóico C20:1	0,01 ± 0,00[a]	0,01 ± 0,00[ab]	0,01 ± 0,00[b]	< 0,0260	0,005 - 0,009
Beênico C22:0	0,01 ± 0,00[a]	0,01 ± 0,00[a]	0,01 ± 0,00[b]	< 0,0173	0,003 - 0,006
Lignocérico C24:0	0,02 ± 0,01[a]	0,02 ± 0,00[a]	0,01 ± 0,00[a]	0,2851	ND
Saturados	0,98 ± 0,04[a]	0,99 ± 0,04[a]	0,88 ± 0,03[b]	< 0,0170	0,302 – 0,509
Monoinsaturados	1,73 ± 0,05[a]	1,85 ± 0,10[a]	1,42 ± 0,06[b]	< 0,0012	0,506 – 1,102
Polinsaturados	2,50 ± 0,03[a]	2,65 ± 0,13[a]	2,71 ± 0,09[a]	0,0862	0,927 – 1,805

Legenda: ps: peso seco; *Referência: em %; ND: não detectado
Valores médios ± desvio padrão. Diferentes letras na linha são estatisticamente diferentes ($p < 0,05$)
Fonte: International Life Sciences Institute – ILSI - https://www.cropcomposition.org/; OECD, 2002

Traços de ácido palmitoléico (C16:1) foram encontrados somente na amostra QP2. Os níveis dos ácidos graxos esteárico (C18:0), oléico (C18:1), araquidônico (C20:0), eicosanóico (C20:1) e beênico (C22:0) das amostras QP1 e QP2 foram ligeiramente menores que a amostra CN ($p < 0,05$). Quando o somatório dos ácidos graxos é analisado, pode-se observar

que menores níveis de ácidos graxos saturados e monoinsaturados estão presentes na amostra de milho QP2, diferindo-se estatisticamente das amostras QP1 e CN.

No entanto, se observa que as diferenças existentes entre cada amostra de milho estão pouco evidentes, pois todos se encontram dentro das faixas de variabilidade esperadas da espécie.

4.1.2 Extração e quantificação de proteínas

O método baseado em fenol (pH 8,0) para extração de proteínas totais, de acordo com Carpentier et al. (2005) e Albo et al. (2007) foi eficiente, resultando em um rendimento de proteínas em torno de 17,9 (± 1,9); 18,3 (± 1,3) e 18,6 (± 2,0) mg/g de milho (em peso fresco) para as amostras QP1, QP2 e CN, respectivamente, nas diferentes extrações realizadas (triplicata).

4.1.3 Eletroforese unidimensional (1-DE - SDS-PAGE)

A qualidade dos extratos proteicos das sementes de milho QP1, QP2 e CN foi preliminarmente avaliada por eletroforese 1-DE. Foram utilizadas duas quantidades de proteínas carregadas nos poços do gel (25 e 50 µg), para avaliar uma quantidade ideal a ser carregada com as amostras de milho, sendo ambas concentrações satisfatórias e viáveis para a observação das diferentes bandas. O gel 1-DE revelou que as proteínas dos milhos foram eficientemente extraídas pelo protocolo de extração empregado, resultando em bandas bem definidas e sem estrias verticais.

Foi possível observar uma grande concentração de bandas protéicas visíveis no intervalo de 15 a 100 kDa, com perfis similares entre as amostras com qualidade proteica melhorada (QPM) e convencional normal (CN), mas com algumas particularidades (Figura 3). Pode-se notar que em torno de 60 e 27 kDa as amostras QP1 e QP2 exibem bandas mais intensas e mais escuras quando comparadas à amostra CN. , enquanto esta mesma amostra (CN) apresenta uma banda mais escura por volta de 22 kDa. Por sua vez, a amostra CN apresenta uma banda mais escura por volta de 22 kDa, se contrastando das demais variedades, pois aparentemente, a mesma banda protéica está ausente ou menos expressa nas amostras QP1 e QP2. Bandas de 19 kDa não são visíveis na variedade QP2, pouco expressas na variedade QP1 e mais expressas na variedade CN.

Por sua vez, bandas de 16 kDa são encontradas na variedade CN, diferenciando-a das demais amostras. A partir dessas diferenças mínimas foi possível distinguir as amostras com qualidade proteica melhorada (QPM) da amostra convencional normal (CN). Estudos prévios

também realizaram géis 1-DE para avaliar a extração e perfil proteico de suas amostras quanto ao PM (ACQUADRO et al., 2009; NOGUEIRA et al., 2012; WU et al., 2011).

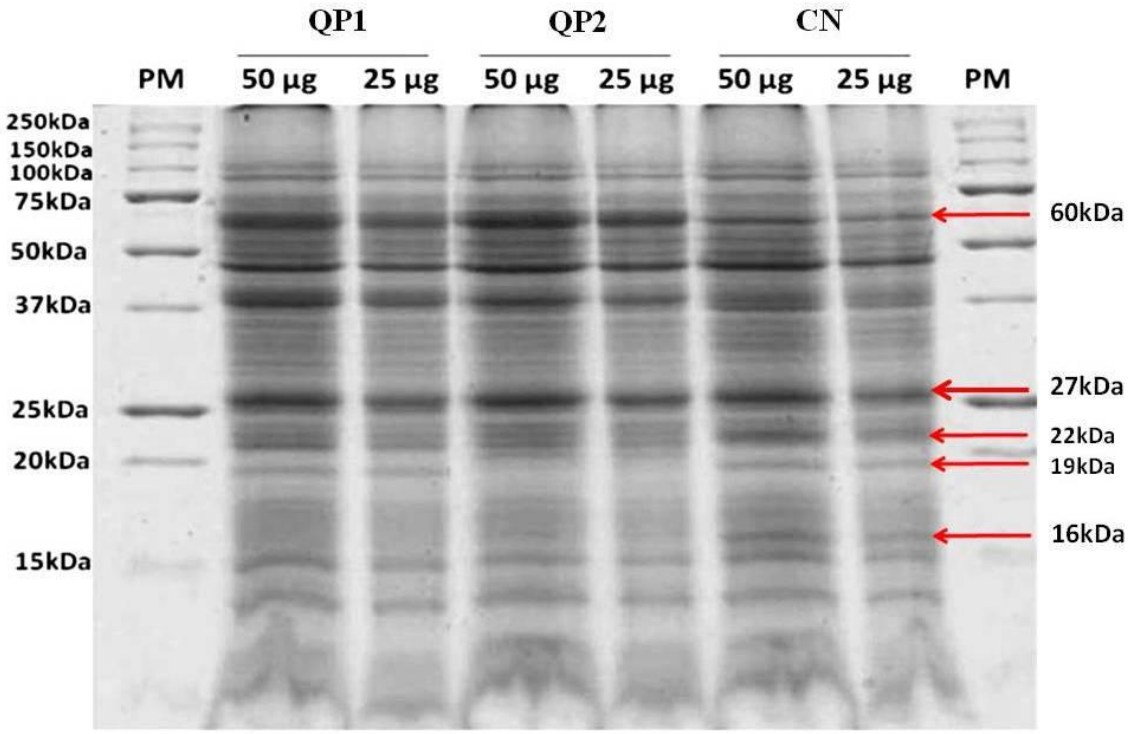

Figura 3 - Gel de poliacrilamida 12,5% (37,5:1) das variedades de milho com qualidade proteica melhorada (QPM) e convencional normal (CN) contendo 25 e 50 µg de proteína
Legenda: QP1 (BR - 473), QP2 (BR – 451), CN (BRS – 4103), PM = padrão de peso molecular (10 a 250 kDa)

4.1.4 Eletroforese bidimensional (2-DE)

As proteínas solúveis extraídas das sementes de milho com qualidade proteica melhorada (QPMs) e convencional normal (CN) foram analisadas por eletroforese bidimensional (2-DE), a fim de avaliar a variabilidade da hibridação por melhoramento clássico. Seis géis foram realizados para cada uma das amostras (três extrações distintas e dois géis por extração), para uma reprodutibilidade e homogeneidade aceitável. Após coloração dos géis 2-DE com Comassie (CBB), os spots de proteínas foram analisados utilizando o software Image Master 2D Platinum (versão 7.0.6, GE Healthcare).

Inicialmente, 650 spots foram detectados em cada gel da variedade QP1, 680 spots na variedade QP2 e 615 spots na variedade CN. Após a aplicação dos parâmetros saliência = 80, área mínima = 5 e intensidade = 2 no software mencionado, os números totais de spots foram 247, 252 e 230 para QP1, QP2 e CN, respectivamente (Tabela 5). Os mapas proteicos foram sobrepostos dois a dois e uma porcentagem de match razoável (≥ 58%) foi alcançada para cada grupo de amostras.

Tabela 5. Análise de spots dos géis 2-DE das sementes de milho com qualidade proteica melhorada (QPM) e convencional normal (CN)

Eletroforese 2D	**Comparação 1**		**Comparação 2**		**Comparação 3**	
	QP1	**QP2**	**QP1**	**CN**	**QP2**	**CN**
Total de spots [a]	247 ± 30	252 ± 26	247 ± 30	230 ± 18	252 ± 26	230 ± 18
Match spots [b]	162 (65%)		138 (58%)		144 (60%)	
Spots diferencialmente expressos [c]	14		07		08	
Spots *Up regulation* [d]	06		04		03	
Spots *Down regulation* [d]	08		03		05	

Legenda: pf: peso fresco; QP1: variedade BR - 473; QP2: variedade BR - 451; CN: variedade BRS - 4103
[a] Número de spot total após aplicação dos parâmetros: saliência = 80, área mínima = 5 e intensidade = 2
[b] Número de spots equivalentes (matched) entre os diferentes pares de géis após a sobreposição dos mapas proteicos (fold > 1,5; ANOVA, $p < 0,05$)
[c] Número de spots diferencialmente expressos considerando um fold de 1,5 (ou 50%) ($p < 0,05$)
[d] *Up* e *down regulation* (maior que 1,5, menor que 0,5, respectivamente)

Neste estudo proteômico, no que diz respeito à análise de imagens dos géis 2-DE por pares (ou seja, três diferentes comparações: QP1 x QP2, QP1 x CN e QP2 x CN), somente spots com alteração quantitativa (mudança significativa de 1,5 ou 50%, $p < 0,05$) foram selecionados para a análise por espectrometria de massas (MS) (Tabela 5).

Especificamente, para a comparação 1 (QP1 x QP2) 14 spots apresentaram expressão diferencialmente significativa (*fold* ≥ 1,5; ANOVA $p < 0,05$), sendo seis spots *up-regulation* (relação QP1/QP2 ≥ 1,5) e oito spots *down-regulation* (relação QP1/QP2 ≤ 0,67) (Figura 4). Na comparação 2 (QP1 x CN), 7 spots foram diferencialmente expressos, com quatro spots *up-regulation* (relação QP1/CN ≥ 1,5) e três spots *down-regulation* (relação QP1/CN ≤ 0,67) (Figura 5). Por fim, a comparação 3 (QP2 x CN) apresentou oito spots diferencialmente expressos, sendo três spots *up-regulation* (relação QP2/CN ≥ 1,5) e cinco spots *down-regulation* (relação QP2/CN ≤ 0,67) (Figura 6).

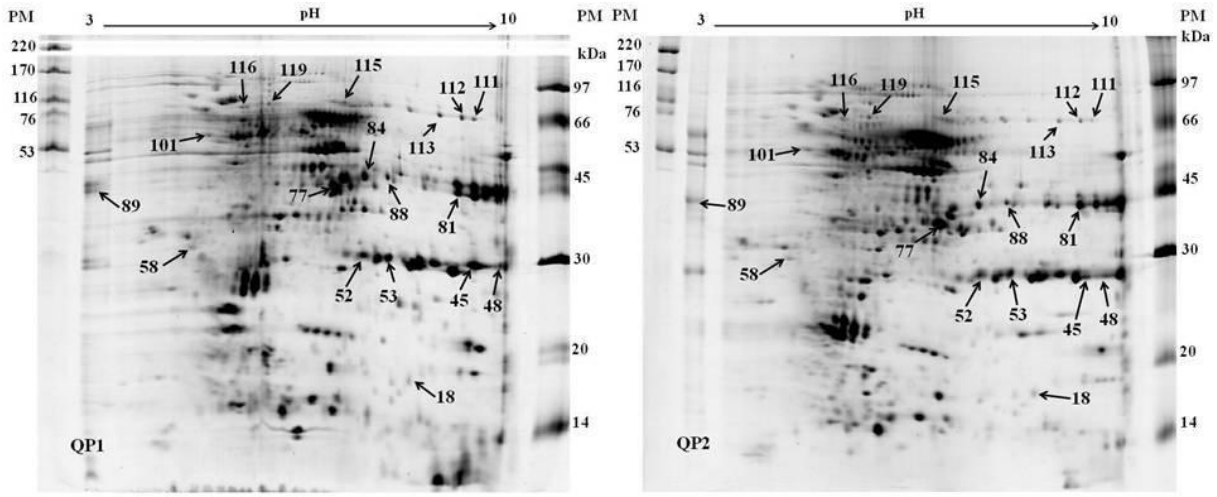

Figura 4 - Spots diferencialmente expressos (ANOVA, $p < 0,05$) entre as amostras com qualidade proteica melhorada (QP1 e QP2) excisados para identificação por espectrometria de massas (MS). Os spots foram enumerados de acordo com o *match ID* gerados pelo software de análise de géis

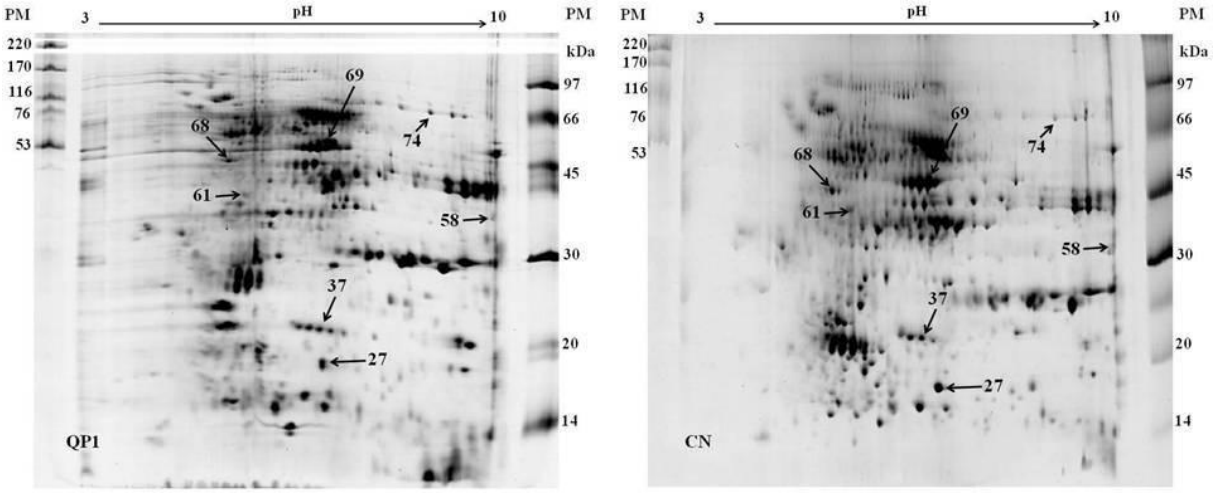

Figura 5 - Spots diferencialmente expressos (ANOVA, $p < 0,05$) entre as amostras QP1 e CN (com qualidade proteica melhorada e convencional normal) excisados para identificação por espectrometria de massas (MS). Os spots foram enumerados de acordo com o *match ID* gerados pelo software de análise de géis

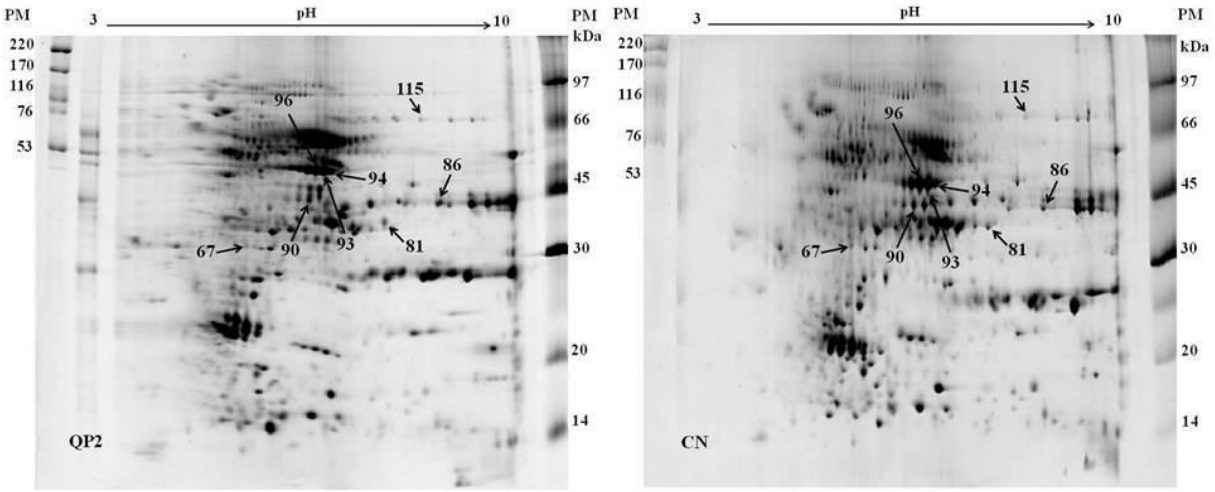

Figura 6 - Spots diferencialmente expressos (ANOVA, $p < 0,05$) entre as amostras QP2 e CN (com qualidade proteica melhorada e convencional normal) excisados para identificação por espectrometria de massas (MS). Os spots foram enumerados de acordo com o *match ID* gerados pelo software de análise de géis

De forma satisfatória, foram identificadas proteínas em todos os spots das três comparações. Somente as proteínas presentes nas duas variedades de cada comparação foram admitidas. Para a identificação das proteínas, tomou-se como critério de seleção a presença de no mínimo dois peptídeos, cujo escore de identidade estivesse acima do limiar de identificação (*Mascot íon score* > 45), a % de cobertura da sequência e o número de sequências (≥ 2). No Anexo A (Tabelas complementares 1, 2 e 3), todas as proteínas identificadas nas três comparações estão listadas, juntamente com o número de acesso, os parâmetros de identificação e sua anotação GO (processo biológico e função molecular).

Na comparação 1 (QP1 x QP2), dentre os 14 spots excisados, em um deles (spot 111) não foi identificada qualquer proteína equivalente, sendo excluído da análise. Assim, dos 13 spots analisados e mantidos no estudo, seis spots apresentaram apenas uma proteína, enquanto em oito spots foram identificadas em média duas proteínas, totalizando 27 proteínas equivalentes. Para a comparação 2 (QP1 x CN) em seis spots apenas uma proteína foi identificada e em apenas um spot foram identificadas duas proteínas, totalizando oito proteínas equivalentes. A comparação 3 (QP2 x CN) apresentou dois spots com apenas uma proteína, ao passo que seis spots apresentaram em média duas proteínas equivalentes, totalizando 15 proteínas.

4.1.4.1 Identificação de proteínas diferencialmente expressas do gel 2-DE por espectrometria de massas (MS)

De todas as proteínas identificadas, um grande número de proteínas mostraram mudanças em abundância ou de expressão. Essas mudanças foram diferentes entre as três

comparações. O número de proteínas diferentemente expressas foram 19, 8 e 11 para a comparação 1, 2 e 3, respectivamente.

Deste modo, para a comparação 1 (QP1 x QP2), dos 14 spots excisados dos géis 2-DE e analisados por MS, 13 deles apresentaram identificação de 19 proteínas diferencialmente expressas e equivalentes para ambas as variedades de milho QPM. Deste total, uma única proteína foi considerada hipotética ou não caracterizada, sendo associada a uma proteína homóloga de outra espécie de cereal, o *Sorghum bicolor* (sorgo) (Tabelas 6). Para a comparação 2 (QP1 x CN), dos sete spots analisados, foram identificadas oito proteínas diferencialmente expressas. Deste total, apenas uma proteína foi considerada hipotética ou não caracterizada, também associada a uma proteína homóloga do *Sorghum bicolor* (sorgo) (Tabela 7). Por sua vez, a comparação 3 (QP2 x CN), dos oito spots excisados e analisados, identificou-se 11 proteínas diferencialmente expressas e equivalentes em ambas variedades. Uma proteína não caracterizada entre as diferencialmente expressas foi observada, sendo a mesma associada ao próprio *Zea mays* (milho) (Tabela 8).

Algumas proteínas de estocagem de sementes, como a globulin-2 e vicilin-like embryo storage proteins, apresentaram formas truncadas nos géis 2-DE, com pesos moleculares (PM) mais baixos e pontos isoelétricos (pI) acima dos observados nas formas nativas destas proteínas (por exemplo, spot 48, 52 e 88 (Tabela 6); spot 58 (Tabela 7) e spot 68 (Tabela 8) das comparações 1, 2 e 3, respectivamente). Da mesma forma, a proteína não caracterizada (spot 115) da comparação 3 (QP2 x CN) apresentou valores experimentais de PM e pI praticamente duas vezes maior que os dados teóricos desta proteína.

Finalmente, nenhuma proteína alergênica ou tóxica foi identificada nos géis 2-DE das diferentes comparações entre as amostras QPM e CN.

Tabela 6 – Proteínas diferencialmente expressas identificadas pela abordagem 2-DE de sementes de milho com qualidade proteica melhorada (QP1 e QP2)

Spot	Nº acesso	Nome ptn	Espécie	Escore Mascot	Cobert. Seq.(%)	Pep. matched/ Nº seq.	pI/PM (kDa) teór.	pI/PM (kDa) exp.	Fold change (2-DE) QP1/QP2	Expres. spot QP1/QP2	Fold change (emPAI) QP1/QP2	Expres. proteína QP1/QP2	Processo Biológico	Função Molecular
Metabolismo														
77	gi|926657619	sorbitol dehydrogenase homolog 1 ou Uncharacterized protein	*Zea mays*	192	14	7/5	6,27/ 39,529	7,22/36	6,60	up	0,63	down	oxidation-reduction process	oxidoreductase activity/ nucleotide binding/zinc ion binding
119	gi|162463106	phosphoglucomutase, cytoplasmic 1	*Zea mays*	1395	47	46/21	5,46/ 63,286	5,92/62	1,76	up	2,38	up	response to cadmium ion/glucose metabolic process/gametophyte development	magnesium ion binding/phosphoglucomutase activity
Energia														
77	gi|293887	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, partial	*Zea mays*	250	22	8/4	8,44/ 25,044	7,22/36	6,60	up	0,67	down	seed development/ oxidation-reduction process/ response to sucrose stimulus/ response to salt stress/ defense response to bacterium/ response to heat/ glycolysis/ response to cadmium ion/ response to hydrogen peroxide	NAD binding/ copper ion binding/ zinc ion binding/ glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (NAD+) (phosphorylating) activity/ NADP binding/
Síntese de proteína														
112	gi|195620072	elongation factor 1-alpha	*Zea mays*	430	21	20/9	9,15/ 49,534	9,39/61	1,58	up	1,50	up	translational elongation/ GTP catabolic process/ response to cadmium ion	translation elongation factor activity/ GTP binding/ GTPase activity
112	gi|238014024	unkown ou elongation factor 1-alpha	*Zea mays*	431	21	20/9	9,19/ 49,593	9,39/61	1,58	up	1,57	up	translational elongation/ GTP catabolic process/ response to cadmium ion	translation elongation factor activity/ GTP binding/ GTPase activity
Armazenamento de proteína														
48	gi|228310	globulin 2 ou globulin-1 s allele-like	*Zea mays*	494	26	52/8	6,16/ 50,234	9,69/28	0,15	down	2,64	up	-	nutrient reservoir activity
52	gi|228310	globulin 2 ou globulin-1 s allele-like	*Zea mays*	448	15	34/6	6,16/ 50,234	7,73/27	0,44	down	4,64	up	-	nutrient reservoir activity
81	gi|154980334	globulin-1	*Zea mays subsp. parviglumis*	172	15	4/4	8,18/ 28,354	9,36/40	0,40	down	0,44	down	-	nutrient reservoir activity
81	gi|3414841	globulin-1	*Zea mays subsp. parviglumis*	120	10	4/4	9,03/ 27,589	9,36/40	0,40	down	0,18	down	-	nutrient reservoir activity

81	gi|3414833	globulin-1	*Zea mays subsp. parviglumis*	119	19	4/4	9,02/ 27,876	9,36/40	0,40	down	0,22	down	-	nutrient reservoir activity
88	gi|22284	vicilin-like embryo storage protein	*Zea mays*	69	3	2/2	6,23/ 62,300	8,15/42	0,40	down	0,56	down	Oxygen transport	Nutrient reservoir activity/ iron ion binding/ heme binding/ oxygen binding
115	gi|228310	globulin 2 ou globulin-1 s allele-like	*Zea mays*	399	17	10/5	6,16/ 50,234	7,24/61	5,34	up	6,14	up	-	nutrient reservoir activity
Defesa e estresse celular														
48	gi|48093332	chitinase	*Zea mays subsp. parviglumis*	238	27	9/6	8,44/ 30,146	9,69/28	0,15	down	0,62	down	chitin catabolic process/ defense response/ polysaccharide catabolic process/ cell wall macromolecule catabolic process	chitinase activity/ chitin binding
48	gi|214014500	chitinase	*Zea mays subsp. parviglumis*	96	8	5/2	8,56/ 29,973	9,69/28	0,15	down	0,50	down	carbohydrate metabolic process/ chitin catabolic process/ cell wall macromolecule catabolic process	chitinase activity/ chitin binding
48	gi|214014552	chitinase	*Zea mays subsp. parviglumis*	177	27	8/5	8,11/ 30,056	9,69/28	0,15	down	0,51	down	carbohydrate metabolic process/ chitin catabolic process/ cell wall macromolecule catabolic process	chitinase activity/ chitin binding
84	gi|1709619	protein disulfide-isomerase	*Zea mays*	464	18	15/5	5,24/ 57,289	7,70/41	0,36	down	0,67	down	cell redox homeostasis/ glycerol ether metabolic process/ protein folding in endoplasmic reticulum	electron carrier activity/ protein disulfide isomerase activity/ protein disulfide oxidoreductase activity
Crescimento e estrutura celular														
116	gi|162460038	tubulin beta-7 chain	*Zea mays*	451	34	29/12	4,72/ 50,689	5,48/62	0,32	down	0,67	down	GTP catabolic process/ protein polymerization/response to cadmium ion/ microtubule-based movement	GTP binding/ GTPase activity/ structural constituent of cytoskeleton

116	gi|162463097	tubulin beta-2 chain	*Zea mays*	265	22	21/8	4,82/ 50,535	5,48/62	0,32	down	0,62	down	response to salt stress/ GTP catabolic process/ protein polymerization/ response to cold/ microtubule-based movement	GTP binding/ GTPase activity/ structural constituent of cytoskeleton
Desconhecido														
113	gi|242064666	putative uncharacterized protein Sb04g009130	*Sorghum bicolor*	181	8	5/2	6,29/ 55,028	9,04/61	2,00	up	1,55	up	-----	-----

Legenda: QP1: variedade BR – 473 e QP2: variedade BR – 451 (Embrapa Milho e Sorgo)

[a] Número de acesso no NCBI das proteínas diferencialmente expressas considerando um *fold* de 1,5 ou 50% ($p < 0,05$)

[b] *Up* e *down regulation* (*fold change*: IM2DP - maior ou igual a 1,5; menor ou igual a 0,67)

[c] *Up* e *down regulation* (*fold change*: emPAI - maior ou igual a 1,5; menor ou igual a 0,67)

*Spot 111 não apresentou proteína equivalente nem diferencialmente expressa e foi excluído da análise

Tabela 7 – Proteínas diferencialmente expressas identificadas pela abordagem 2-DE de sementes de milho com qualidade proteica melhorada (QP1) em comparação com uma convencional normal (CN)

Spot	Nº de acesso [a]	Nome da proteína	Espécie	Escore Mascot	Cobert. Seq.(%)	Pept. Matched/ Nº seq.	pI/PM (kDa) teór.	pI/PM (kDa) exp.	Fold change (2-DE) QP1/CN	Expressão spot[b] QP1/CN	Fold change (emPAI) QP1/CN	Expressão proteína[c] QP1/CN	Processo Biológico	Função Molecular
Armazenamento de proteína														
58	gi|22284	vicilin-like embryo storage protein	*Zea mays*	195	5	4/3	6,23/ 66,635	9,96/ 37,0	8,80	up	1,80	up	oxygen transport	nutrient reservoir activity/ iron ion binding/ heme binding/ oxygen binding
61	gi|228310	globulin 2 ou globulin-1 s allele-like	*Zea mays*	130	5	6/2	6,16/ 50,234	5,72/ 42,0	0,38	down	0,67	down	-----	nutrient reservoir activity
69	gi|228310	globulin 2 ou globulin-1 s allele-like	*Zea mays*	1316	44	60/17	6,16/ 50,234	7,02/ 50,0	0,31	down	0,61	down	-----	nutrient reservoir activity
Defesa e estresse celular														
27	gi|226506758	16.9 kDa class I heat shock protein 1	*Zea mays*	449	57	8/6	6,77/ 17,220	7,06/ 17,0	0,37	down	0,61	down	stress response/ response to high light intensity/ protein oligomerization/ response to hydrogen peroxide/ heat acclimation	-----
Crescimento e estrutura celular														
37	gi|15289940	putative actin ou Os01g0964133 protein	*Oryza sativa Japonica Group*	233	28	12/5	5,23/ 41,929	7,06/ 21,0	1,54	up	4,38	up	cytoskeleton organization/ gluconeogenesis/ glucose catabolic process/ proteasomal protein catabolic process/ cell division/ root hair elongation/ regulation of protein localization/ seed germination	motor activity/ ATP binding/ structural constituent of cytoskeleton
68	gi|212274479	uncharacterized protein LOC100191561 ou Actin-97	*Zea mays*	591	38	29/12	5,24/ 41,927	5,38/ 48,0	1,86	up	1,52	up	-----	structural constituent of cytoskeleton/ ATP binding/ motor activity

68	gi|242032343	hypothetical protein SORBIDRAFT_01g002170 ou Putative uncharacterized protein Sb01g002170	*Sorghum bicolor*	567	35	25/11	5,24/ 41,962	5,38/ 48,0	1,86	up	1,60	up	cytoskeleton organization/ gluconeogenesis/ response to wounding/ glucose catabolic process/ proteasomal protein catabolic process/ cell division/ root hair elongation/ regulation of protein localization/ seed germination/ response to light stimulus/ response to auxin stimulus	protein binding/ ATP binding/ structural constituent of cytoskeleton
Desconhecido														
74	gi|242064666	hypothetical protein SORBIDRAFT_04g009130	*Sorghum bicolor*	181	8	5/5	6,29/ 55,028	8,88/ 64,0	2,64	up	2,20	up	-----	-----

Legenda: QP1: variedade BR – 473 e CN: variedade BRS - 4103 (Embrapa Milho e Sorgo)

[a] Número de acesso no NCBI das proteínas diferencialmente expressas considerando um *fold* de 1,5 ou 50% ($p < 0,05$)

[b] *Up* e *down regulation* (*fold change*: IM2DP - maior ou igual a 1,5; menor ou igual a 0,67)

[c] *Up* e *down regulation* (*fold change*: emPAI - maior ou igual a 1,5; menor ou igual a 0,67)

Tabela 8 – Proteínas diferencialmente expressas identificadas pela abordagem 2-DE de sementes de milho com qualidade proteica melhorada (QP2) em comparação com uma convencional normal (CN)

Spot	Nº de acesso [a]	Nome da proteína	Espécie	Escore Mascot	Cobert. Seq.(%)	Pept. Matched/ Nº seq.	pI/PM (kDa) teór.	pI/PM (kDa) exp.	Fold change (2-DE) QP2/CN	Expres. Spot [b] QP2/CN	Fold change (emPAI) QP2/CN	Expres. proteína [c] QP2/CN	Processo Biológico	Função Molecular
Metabolismo														
67	gi|226493908	uncharacterized protein LOC100277287 ou uncharacterized protein	*Zea mays*	75	13	5/3	5,55/ 33,588	5,63/ 31,0	0,31	down	0,54	down	metabolic process	catalytic activity
90	gi|77378040	sorbitol dehydrogenase	*Zea mays*	659	33	21/10	6,27/ 39,747	6,71/ 40,0	0,28	down	0,67	down	Oxidation-redution-process	oxidoreductase activity/ nucleotide binding/ zinc ion binding
115	gi|226493908	uncharacterized protein LOC100277287 ou uncharacterized protein	*Zea mays*	261	22	4/4	5,55/ 33,588	8,54/ 62,0	6,88	up	1,89	up	metabolic process	catalytic activity
Energia														
81	gi|162462949	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, cytosolic 3	*Zea mays*	215	21	10/6	7,01/ 36,597	7,92/ 35,0	0,15	down	0,44	down	Seed development/ oxidation-reduction process/ response to sucrose stimulus/ response to salt stress/ defense response to bacterium/ response to heat/glycolysis/ response to cadmium ion/ response to hydrogen peroxide	NAD binding/ copper ion binding/ zinc ion binding/ glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (NAD+) (phosphorylating) activity/ NADP binding
Armazenamento de proteína														
67	gi|228310	globulin 2 ou globulin-1 s allele-like	*Zea mays*	188	11	8/4	6,16/ 50,234	5,63/ 31,0	0,31	down	0,54	down	-----	nutrient reservoir activity
86	gi|22284	vicilin-like embryo storage protein	*Zea mays*	322	?	16/6	6,23/ 66,635	8,61/ 40,0	1,73	up	1,69	up	Oxygen transport	Nutrient reservoir activity/ iron ion binding/ heme binding/ oxygen binding
86	gi|154980224	globulin-1	*Zea mays subsp. parviglumis*	198	?	11/4	8,18/ 28,657	8,61/ 40,0	1,73	up	1,56	up	-----	nutrient reservoir activity
93	gi|228310	globulin 2 ou globulin-1 s allele-like	*Zea mays*	51	3	2/1	6,16/ 50,234	6,95/ 45,0	0,03	down	0,02	down	-----	nutrient reservoir activity
94	gi|821325083	uncharacterized protein LOC541920 precursor	*Zea mays*	135	16	3/3	6,83/ 35,401	7,08/ 47,0	0,28	down	1,55	up	-----	nutrient reservoir activity
96	gi|228310	globulin 2 ou globulin-1 s allele-like	*Zea mays*	1137	41	38/13	6,16/ 50,234	6,80/ 47,0	0,33	down	0,64	down	-----	nutrient reservoir activity

Defesa e estresse celular														
93	gi|22124	alcohol dehydrogenase 1	*Zea mays*	414	25	16/8	6,43/ 41,631	6,95/ 45,0	0,03	down	3,81	up	oxidation-reduction process/ response to hypoxia (baixo teor de O_2)/ response to cadmium ion/ response to salt stress	alcohol dehydrogenase (NAD) activity/ zinc ion binding/ Oxidoreductase

Legenda: QP2: variedade BR – 451e CN: variedade BRS - 4103 (Embrapa Milho e Sorgo)

[a] Número de acesso no NCBI das proteínas diferencialmente expressas considerando um *fold* de 1,5 ou 50% ($p < 0,05$)

[b] *Up* e *down regulation* (*fold change*: IM2DP - maior ou igual a 1,5; menor ou igual a 0,67)

[c] *Up* e *down regulation* (*fold change*: emPAI - maior ou igual a 1,5; menor ou igual a 0,67)

Todas as proteínas identificadas nos diferentes spots de cada comparação foram classificadas de acordo com suas principais funções biológicas e moleculares, a partir de informações disponíveis nas bases de dados do Nacional Center for Biotechnology Information (NCBI), Universal Protein Resource (Uniprot), The Arabidopsis Information Resource (TAIR), bem como pela plataforma Blast2GO (aos níveis 2 ou 3) (Tabelas 6 a 8, Anexo A, Tabelas complementares 1 a 3), com exceção de algumas proteínas identificadas como hipotéticas, desconhecidas ou não caracterizadas que não foram associadas a nenhuma outra proteína homóloga.

Observa-se na Figura 7, que as 19 proteínas diferencialmente expressas identificadas na comparação 1 (QP1 x QP2) participam dos seguintes grupos funcionais: metabolismo (11%), energia (5%), síntese de proteína (11%), armazenamento de proteína (36%), defesa e estresse celular (21%), crescimento e estrutura celular (11%) e desconhecido (5%) (Figura 7A). Um total de sete proteínas se apresentaram *up regulation* (QP1/QP2 $\geq$ 1,5) e envolvidas principalmente no armazenamento (três proteínas, 43%) e síntese de proteína (duas proteínas, 29%). Por sua vez, 12 proteínas foram *down regulation* (QP1/QP2 $\leq$ 0,67) e envolvidas principalmente no armazenamento de proteínas (quatro proteínas, 33%) e defesa e estresse celular (quatro proteínas, 33%) (Figura 7B).

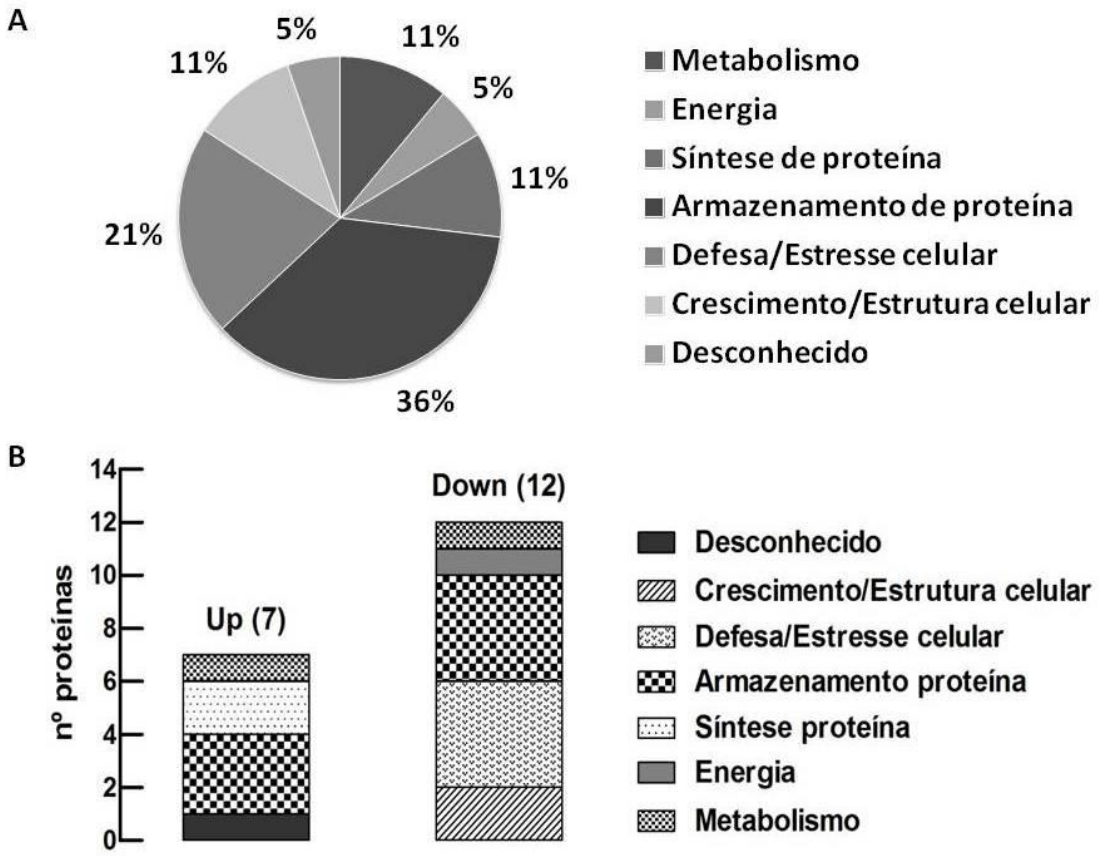

Figura 7 – Classificação funcional e distribuição das proteínas diferencialmente expressas ($p < 0,05$) na comparação 1 (QP1 x QP2) pela abordagem 2-DE

Na Figura 8, observa-se que as oito proteínas diferencialmente expressas da comparação 2 (QP1 x CN) estão em maior número envolvidas no grupo funcional armazenamento de proteína (50%), mas também classificadas em defesa e estresse celular (29%), crescimento e estrutura celular (14%) e desconhecido (7%) (Figura 8A). Deste total, cinco proteínas apresentaram expressão *up regulation* (GM2/CG2 $\geq$ 1,5) e envolvidas principalmente no crescimento e estrutura celular (três proteínas, 60%). Por outro lado, três proteínas foram *down regulation* (GM2/CG2 $\leq$ 0,67) e divididas entre o armazenamento de proteína (duas proteínas, 67%) e defesa e estresse celular (uma proteína) (Figura 8B).

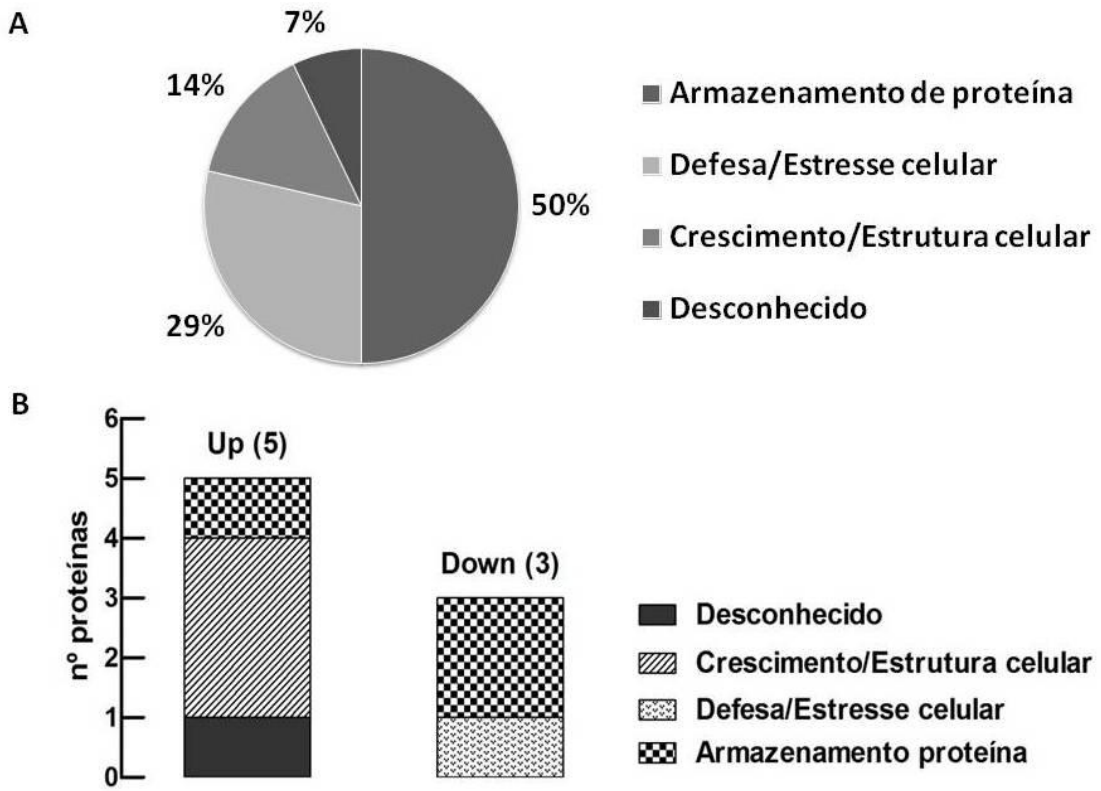

Figura 8 – Classificação funcional e distribuição das proteínas diferencialmente expressas ($p < 0,05$) na comparação 1 (QP1 x CN) pela abordagem 2-DE

Por sua vez, pode-se observar na Figura 9, que as 11 proteínas diferencialmente expressas da comparação 3 (QP2 x CN) estão envolvidas em quatro classificações biológicas metabolismo (27%), energia (9%), armazenamento de proteína (55%) e defesa e estresse celular (9%) (Figura 9A). Deste total, cinco proteínas foram *up regulation* (QP2/CN ≥ 1,5) e principalmente envolvidas no armazenamento de proteína (três proteínas, 60%). Por outro lado, seis proteínas apresentaram expressão *down regulation* (QP2/CN ≤ 0,67) e envolvidas na sua grande maioria com o metabolismo (duas proteínas, 33%) e armazenamento de proteína (três proteínas, 50%) (Figura 9B).

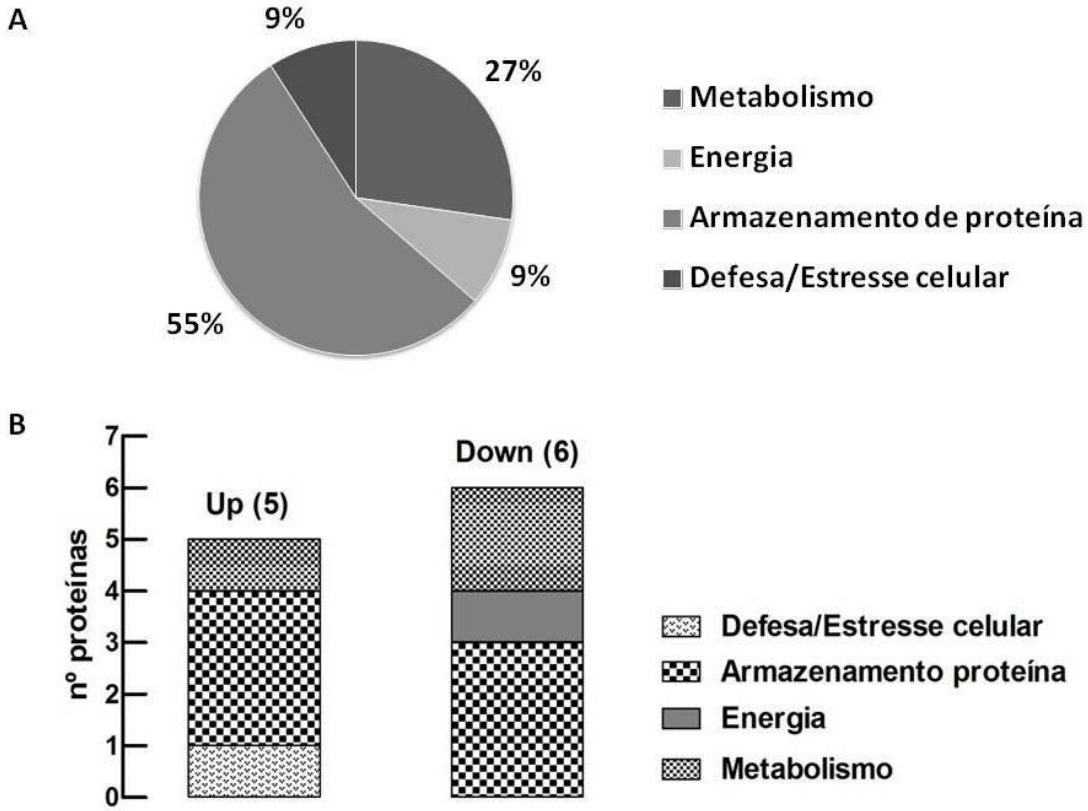

Figura 9 – Classificação funcional e distribuição das proteínas diferencialmente expressas ($p < 0,05$) na comparação 1 (QP2 x CN) pela abordagem 2-DE

Nas Figuras 7 a 9 é possível notar que as proteínas diferencialmente expressas identificadas na comparação 1 (QP1 x QP2) foram classificadas em mais níveis funcionais quando comparadas com as proteínas identificadas nas comparações 2 e 3 (QP1 x CN e QP2 x CN, respectivamente). Diferentemente da comparação 1, não foram observadas proteínas com função de metabolismo, energia e síntese de proteína na comparação 2. Por outro lado, a comparação 3 não apresentou as funções moleculares de síntese de proteína, crescimento e estrutura celular e desconhecido. Similarmente, para as três comparações, um maior número de proteínas foi observado na função molecular de armazenamento de proteínas.

4.1.5 Análise quantitativa do proteoma de milhos com qualidade proteica melhorada e convencional normal utilizando abordagem *bottom up shotgun proteomics*

Para complementar a abordagem proteômica por eletroforese bidimensional (2-DE), a abordagem *bottom up shotgun proteomics* também foi realizada.

As proteínas solúveis totais foram extraídas a partir de três réplicas biológicas idênticas e independentes para cada variedade de milho, digeridas com tripsina e os peptídeos resultantes foram analisados por nano-ESI-Q-TOF MS/MS, seguido de análise diferencial através da base de dados do NCBI.

Um total de 255 proteínas não redundantes foram identificadas nas amostras de sementes de milho com qualidade proteica melhorada da comparação 1 (QP1 x QP2). Após avaliação dos resultados e a adoção dos critérios de seleção (exclusão das proteínas sem confiança e ausentes em pelo menos duas réplicas biológicas de ao menos uma variedade de milho), 142 proteínas foram obtidas, com relação quantitativa e qualitativa, sendo 104 proteínas identificadas nas duas variedades QP1 e QP2, ao passo que 16 proteínas foram identificadas somente na variedade QP1 e 22 proteínas na variedade QP2 (Anexo C, Figura 1).

Para a comparação 2 (QP1 x CN), um total de 269 proteínas não redundantes foram obtidas após análise em MS. Baseado nos critérios de seleção mencionados acima, 148 proteínas foram identificadas, sendo 109 encontradas em ambas as variedades QP1 e CN, 19 proteínas identificadas somente na variedade QP1 e 21 proteínas identificadas unicamente na variedade CN (Anexo C, Figura 2).

Na comparação 3 (QP2 x CN), 264 proteínas não redundantes foram identificadas no total. Após utilização dos critérios de seleção, 147 proteínas foram obtidas, sendo 108 encontradas em ambas as variedades QP2 e CN, 18 proteínas identificadas somente na variedade QP2 e 21 proteínas pertencentes apenas à variedade CN (Anexo C, Figura 3).

4.1.5.1 Identificação de proteínas diferencialmente expressas da abordagem *bottom up shotgun proteomics* por espectrometria de massas (MS)

Para um melhor entendimento das funções biológicas das proteínas identificadas nas amostras de milhos QP1 e QP2 (comparação 1) pela abordagem *bottom up shotgun*, das 142 proteínas obtidas, 39 proteínas foram identificadas como diferencialmente expressas ($p < 0,05$) e funcionalmente classificadas em sete categorias com base na plataforma Blast2GO, UniProt e EMBL-EBI (The European Bioinformatics Institute), como metabolismo (18%), energia (13%), síntese de proteína (5%), armazenamento de proteína (21%), defesa e estresse celular (36%), transporte (2%), e desconhecido (5%) (Tabela 9, Figura 10A). Destas proteínas diferencialmente expressas, 17 foram *up regulation* (expressão QP1/QP2 ≥ 1,5) com um

maior número de proteínas na categoria de defesa e estresse celular (7 proteínas, 41%) e 22 proteínas foram *down regulation* (expressão QP1/QP2 ≤ 0,67) com uma maior distribuição principalmente em defesa e estresse celular (sete proteínas, 32%) e armazenamento de proteína (seis proteínas, 27%) (Figura 10B).

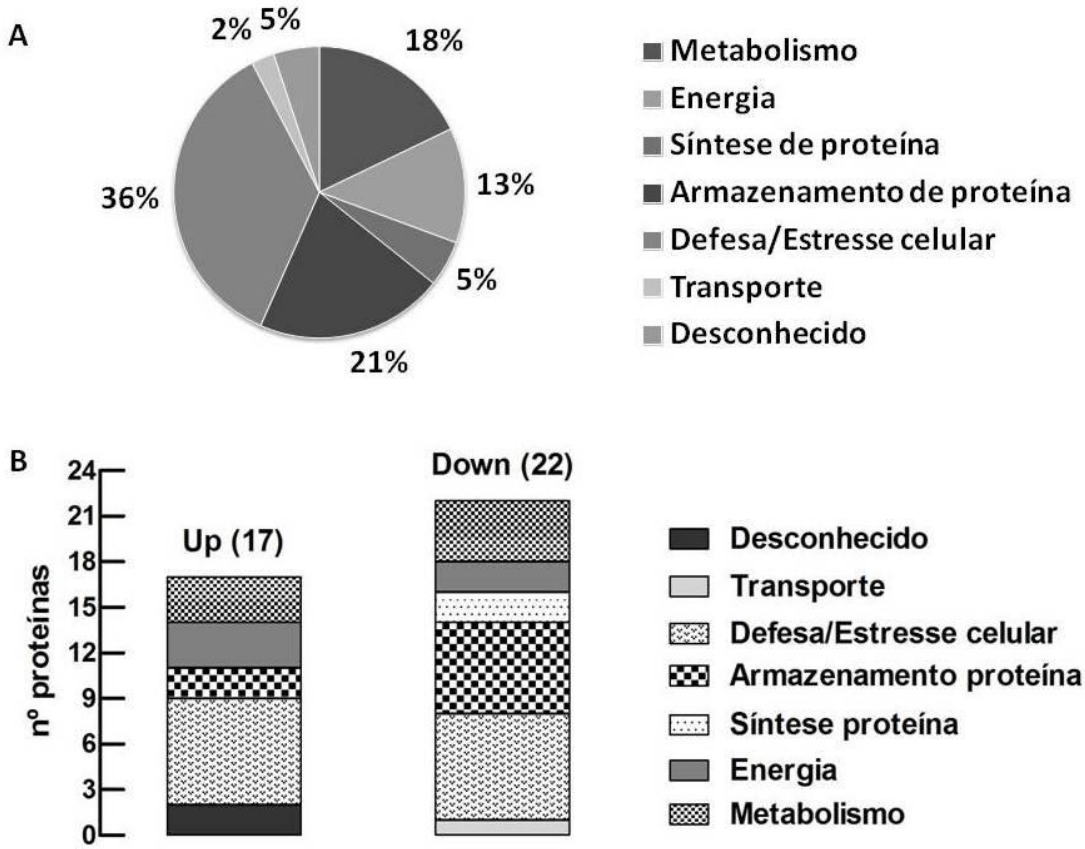

Figura 10 – Classificação funcional e distribuição das proteínas diferencialmente expressas ($p < 0,05$) na comparação 1 (QP1 x QP2) pela abordagem *bottom up shotgun proteomics*

Por sua vez, para a comparação 2 (QP1 x CN), das 148 proteínas obtidas, 52 foram identificadas como diferencialmente expressas ($p < 0,05$) e classificadas funcionalmente em sete categorias, sendo metabolismo (27%), energia (15%), síntese de proteína (8%), armazenamento de proteína (15%), defesa e estresse celular (23%), transporte (6%) e desconhecido (6%) (Tabela 10, Figura 11A). Destas proteínas diferencialmente expressas, 23 foram *up regulation* (expressão QP1/CN ≥ 1,5), envolvidas principalmente no metabolismo (sete proteínas, 30%) e defesa/estresse celular (seis proteínas, 26%) e 29 proteínas foram *down regulation* (expressão QP1/CN ≤ 0,67), principalmente classificadas em metabolismo (sete proteínas, 24%), energia (seis proteínas, 21%) e defesa/estresse celular (seis proteínas, 21%) (Figura 11B).

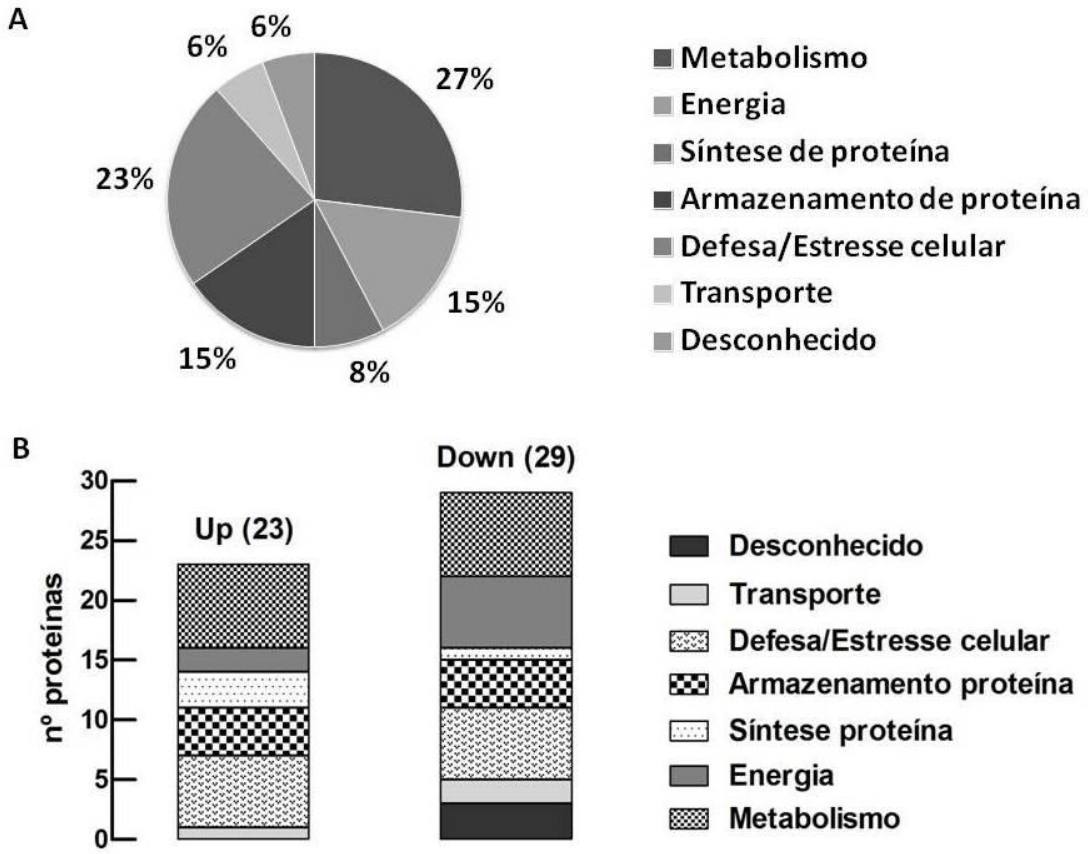

Figura 11 – Classificação funcional e distribuição das proteínas diferencialmente expressas ($p < 0,05$) na comparação 2 (QP1 x CN) pela abordagem *bottom up shotgun proteomics*

Por fim, para a comparação 3 (QP2 x CN), das 147 proteínas obtidas, 46 foram identificadas como diferencialmente expressas ($p < 0,05$) e classificadas funcionalmente em oito categorias, como metabolismo (22%), energia (22%), síntese de proteína (7%), armazenamento de proteína (17%), defesa e estresse celular (17%), transporte (7%), crescimento e estrutura celular (2%) e desconhecido (7%) (Tabela 11, Figura 12A). Destas proteínas diferencialmente expressas, 20 apresentaram expressão *up regulation* (QP2/CN ≥ 1,5), envolvidas principalmente nas categorias metabolismo (quatro proteínas, 20%), energia (quatro proteínas, 20%) e armazenamento (cinco proteínas, 25%). Por sua vez, 26 proteínas apresentaram expressão *down regulation* (QP2/CN ≤ 0,67) e foram classificadas principalmente nas funções de metabolismo (seis proteínas, 23%), energia (seis proteínas, 23%) e defesa/estresse celular (cinco proteínas, 19%) (Figura 12B).

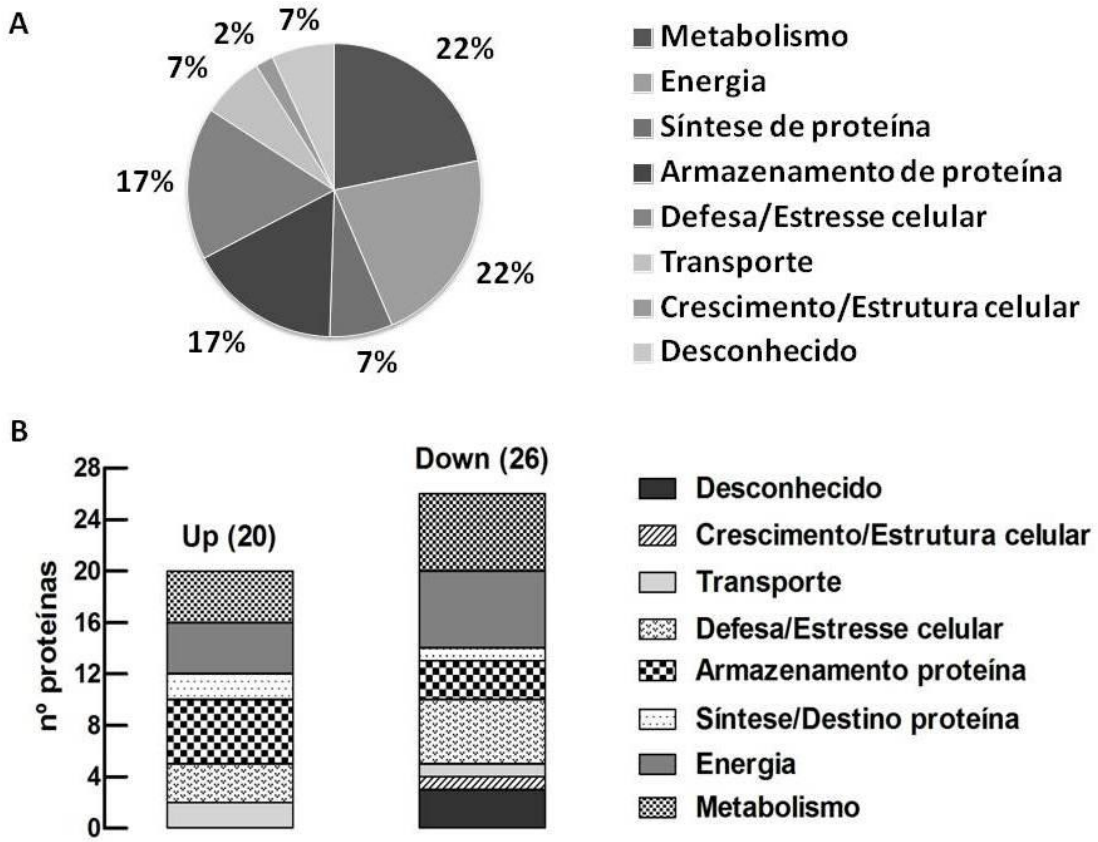

Figura 12 – Classificação funcional e distribuição das proteínas diferencialmente expressas ($p < 0,05$) na comparação 3 (QP2 x CN) pela abordagem *bottom up shotgun proteomics*

Um grande número de proteínas diferencialmente expressas pode ser observado nas diferentes comparações realizadas. Somente a comparação 3 apresentou a classificação biológica de crescimento e estrutura celular quando comparada com os demais grupos (comparação 1 (QP1 x QP2) e comparação 2 (QP1 x CN)). Na comparação 1 (QP1 x QP2), um maior número de proteínas com expressão diferenciada foi observado na função molecular de defesa/estresse celular (36%), por outro lado, a comparação 2 (QP1 x CN) e 3 (QP2 x CN) apresentaram um maior número de proteínas diferenciadas na função metabolismo (27 e 22%, respectivamente).

Tabela 9 – Proteínas diferencialmente expressas identificadas pela abordagem *bottom up shotgun proteomics* de sementes de milho com qualidade proteica melhorada (QP1 e QP2)

Número de acesso [a]	Nome da proteína	Espécie	Escore Mascot	Cobert. Seq.(%)	Pept. Matched/ Nº seq.	pI/PM (kDa) teórico	Expres. [b] QP1/QP2	Processo Biológico	Função Molecular
Metabolismo									
gi|223946537	unknown ou Uncharacterized protein	*Zea mays*	35	11	2/1	5,15/35,255	up	polyamine metabolic process	transferase activity
gi|212723032	uncharacterized protein LOC100192501 ou acetyl-CoA C-acyltransferase-like protein	*Zea mays*	136	4	2/1	8,59/48,499	down	metabolic process	transferase activity, transferring acyl groups other than amino-acyl groups/ Acyltransferase
gi|913865	branching enzyme II BEII [Zea mays, cultivar B73, endosperms, Peptide, 738 aa] ou Starch branching enzyme II	*Zea mays*	69	4	4/2	5,53/84,961	down	carbohydrate metabolic process	cation binding/ hydrolase activity, hydrolyzing O-glycosyl compounds
gi|21326129	putative UDP-glucose dehydrogenase	*Sorghum bicolor*	132	12	2/1	5,50/23,940	up	polysaccharide biosynthetic process	NAD binding/ oxidoreductase activity, acting on the CH-CH group of donors, NAD or NADP as acceptor/ oxidoreductase activity, acting on the CH-OH group of donors, NAD or NADP as acceptor
gi|226491894	uncharacterized protein LOC100274481 precursor	*Zea mays*	95	5	3/1	7,11/34,443	up	carbohydrate metabolic process	hydrolase activity, hydrolyzing O-glycosyl compounds
gi|219884551	unknown ou aspartate aminotransferase	*Zea mays*	97	2	2/1	6,92/48,111	down	biosynthetic process/ cellular amino acid metabolic process	L-aspartate:2-oxoglutarate aminotransferase activity/ L-phenylalanine:2-oxoglutarate aminotransferase activity/ pyridoxal phosphate binding
gi|212723798	uncharacterized protein LOC100194227 ou 1,4-beta-D-glucanase	*Zea mays*	99	7	2/1	5,29/25,534	down	-----	hydrolase activity
Energia									
gi|28172915	cytosolic 3-phosphoglycerate kinase	*Zea mays*	540	24	12/4	5,01/31,663	up	glycolytic process/ glycolysis/ response to endoplasmic reticulum stress/response to arsenic-containing substance/response to cadmium ion	phosphoglycerate kinase activity/ATP binding

gi|162458207	enolase 1	*Zea mays*	626	23	17/6	5,20/48,262	up	glycolytic process/ glycolysis	magnesium ion binding/ phosphopyruvate hydratase activity
gi|212275598	uncharacterized protein LOC100192501 ou pyrophosphate--fructose 6-phosphate 1-phosphotransferase subunit alpha	*Zea mays*	140	3	2/1	5,07/67,950	up	fructose 6-phosphate metabolic process/ Glycolysis	6-phosphofructokinase activity/ ATP binding/ diphosphate-fructose-6-phosphate 1-phosphotransferase activity/ metal ion binding
gi|293332239	uncharacterized protein LOC100381602 ou nucleotide diphosphate kinase	*Zea mays*	63	14	2/2	6,84/16,82	down	CTP biosynthetic process/ GTP biosynthetic process/ UTP biosynthetic process	ATP binding/ nucleoside diphosphate kinase activity
gi|226509797	uncharacterized protein LOC100274579 ou phosphoglycerate kinase	*Zea mays*	601	16	11/4	5,65/42,47	down	glycolytic process	ATP binding/ phosphoglycerate kinase activity
Síntese de proteína									
gi|32401874	small ribosomal protein 4, partial (chloroplast)	*Metasequoia glyptostroboides*	44	8	6/1	10,97/16,272	down	-----	rRNA binding/ Ribonucleoprotein/ Ribosomal protein
gi|223974245	unknown ou uncharacterized protein	*Zea mays*	94	4	3/2	5,51/65,16	down	protein folding	ATP binding
Armazenamento de proteína									
gi|154980300	globulin-1, partial	*Zea mays subsp. Parviglumis*	2568	49	68/13	9,02/28,680	down	-----	nutrient reservoir activity
gi|3414845	globulin-1, partial	*Zea mays subsp. Parviglumis*	1882	39	59/11	8,18/27,84	down	-----	nutrient reservoir activity
gi|3414817	globulin-1	*Zea mays*	629	32	17/6	8,70/27,681	down	-----	nutrient reservoir activity
gi|168695	gamma zein, partial ou glutelin-2	*Zea mays*	188	9	3/2	9,20/23,080	up	-----	nutrient reservoir activity/ Seed storage protein/ Storage protein
gi|22550	27kDa storage protein, zein	*Zea mays*	135	14	3/2	8,48/20,217	down	-----	nutrient reservoir activity
gi|141603	zein-alpha A20	*Zea mays*	143	14	2/1	8,52/26,395	down	-----	nutrient reservoir activity/ Seed storage protein/ Storage protein
gi|224030527	unknown ou Uncharacterized protein	*Zea mays*	5601	48	127/23	6,39/65,386	up	-----	nutrient reservoir activity
gi|242035831	hypothetical protein SORBIDRAFT_01g036140 ou putative uncharacterized protein Sb01g036140	*Sorghum bicolor*	412	9	8/4	5,94/58,174	down	-----	nutrient reservoir activity

Defesa e Estresse Celular

gi|113595	aldose reductase	*Hordeum vulgare*	60	3	2/1	6,51/36,069	up	stress response	oxidoreductase/ alditol:NADP+ 1-oxidoreductase activity
gi|214014704	chitinase	*Zea mays subsp. parviglumis*	990	38	16/6	8,91/29,749	up	carbohydrate metabolic process/ chitin catabolic process/ defense response/ polysaccharide catabolic process/ cell wall macromolecule catabolic process	chitinase activity/ chitin binding
gi|48093246	chitinase	*Zea mays subsp. parviglumis*	961	39	15/6	8,83/29,891	up	carbohydrate metabolic process/ chitin catabolic process/ defense response/ polysaccharide catabolic process/ cell wall macromolecule catabolic process	chitinase activity/ chitin binding
gi|214014710	chitinase	*Zea mays subsp. parviglumis*	953	33	16/7	8,91/29,972	up	carbohydrate metabolic process/ chitin catabolic process/ defense response/ polysaccharide catabolic process/ cell wall macromolecule catabolic process	chitinase activity/ chitin binding
gi|48093228	chitinase	*Zea mays subsp. parviglumis*	1188	31	21/6	8,92/29,819	down	carbohydrate metabolic process/ chitin catabolic process/ defense response/ polysaccharide catabolic process/ cell wall macromolecule catabolic process	chitinase activity/ chitin binding
gi|118484	dehydrin DHN1	*Zea mays*	280	27	5/2	9,10/17,150	up	stress response	response to stress/ response to water
gi|18964	dehydrin DHN1	*Zea mays*	163	10	4/1	8,04/16,945	down	stress response	response to stress/ response to water
gi|226499860	stromal 70 kDa heat shock-related protein	*Zea mays*	201	4	3/2	6,18/74,853	up	stress response/ protein folding	ATP binding
gi|226507890	16.9 kDa class I heat shock protein 1	*Zea mays*	211	34	8/4	6,77/17,146	down	Stress response/ response to high light intensity/ protein oligomerization/ response to hydrogen peroxide/ heat acclimation	response to stress
gi|189380223	heat shock protein 70	*Camellia sinensis*	176	9	7/5	5,54/75,582	down	stress response	ATP binding
gi|195615416	pathogenesis-related protein 1	*Zea mays*	118	8	4/1	5,39/17,074	down	plant defense	defense response/ response to biotic stimulus/ Pathogenesis-related protein

gi|226491145	late embryogenesis abundant protein Lea14-A	*Zea mays*	160	25	5/3	5,64/16,136	down	response to desiccation	response to stress
gi|226510357	antimicrobial peptide MBP-1 precursor	*Zea mays*	256	7	6/3	6,68/47,849	down	defense response to fungus	response to stress
gi|242042904	hypothetical protein SORBIDRAFT_02g002500 ou putative uncharacterized protein Sb02g002500	*Sorghum bicolor*	57	6	2/1	7,46/16,123	up	-----	serine-type endopeptidase inhibitor activity
Transporte									
gi|1703374	ADP-ribosylation factor 1	*Chlamydomonas reinhardtii*	102	11	4/1	9,65/20,747	down	protein transport/ small GTPase mediated signal transduction/ vesicle-mediated transport/ ER-Golgi transport	GTP binding
Desconhecido									
gi|242076864	hypothetical protein SORBIDRAFT_06g026030 ou putative uncharacterized protein Sb06g026030	*Sorghum bicolor*	126	10	3/2	6,45/44,014	up	-----	-----
gi|242064666	hypothetical protein SORBIDRAFT_04g009130 ou putative uncharacterized protein Sb04g009130	*Sorghum bicolor*	63	2	2/1	6,29/55,028	up	-----	-----

* As proteínas acima foram consideradas diferencialmente expressas ($p < 0,05$) se identificadas com pelo menos dois peptídeos, ao menos duas réplicas biológicas e em pelo menos uma das condições

* Escore, cobertura de sequência, peptídeos e nº de sequências são valores médios

Legenda: QP1: variedade BR – 473 e QP2: variedade BR – 451 (Embrapa Milho e Sorgo)

[a] Número de acesso no NCBI das proteínas diferencialmente expressas considerando um *fold* de 1,5 ou 50% ($p < 0,05$)

[b] *Up* e *down regulation* (*fold change*: emPAI - maior ou igual a 1,5; menor ou igual a 0,67)

Tabela 10 – Proteínas diferencialmente expressas identificadas pela abordagem *bottom up shotgun proteomics* de sementes de milho com qualidade proteica melhorada (QP1) em comparação com uma convencional normal (CN)

Número de acesso [a]	Nome da proteína	Espécie	Escore Mascot	Cobert. Seq. (%)	Peptídeos matched/ Nº Seq.	pI/PM (kDa) teórico	Expressão[b] QP1/CN	Processo Biológico	Função Molecular
Metabolismo									
gi|23664293	brittle 2	*Zea mays subsp. mays*	1157	27	20/8	5,54/52,922	up	glycogen biosynthetic process/ starch biosynthetic process/ Starch biosynthesis	ATP binding/ glucose-1-phosphate adenylyltransferase activity/ Nucleotidyltransferase
gi|23664291	brittle 2	*Zea mays subsp. mays*	933	21	16/7	5,65/52,928	down	glycogen biosynthetic process/ starch biosynthetic process/ Starch biosynthesis	ATP binding/ glucose-1-phosphate adenylyltransferase activity/ Nucleotidyltransferase
gi|189027076	glucose-1-phosphate adenylyltransferase large subunit 1, chloroplastic/amyloplastic	*Zea mays*	860	22	22/9	6,16/57,890	up	glycogen biosynthetic process/ starch biosynthetic process/ starch biosynthesis	ATP binding/ glucose-1-phosphate adenylyltransferase activity/ Nucleotidyltransferase/ Transferase
gi|22002428	granule bound starch synthase ou starch synthase, chloroplastic/amyloplastic	*Setaria italica*	319	5	7/2	8,58/66,629	down	starch biosynthetic process	Glycosyltransferase/ glycogen (starch) synthase activity
gi|6136111	UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase	*Hordeum vulgare*	115	4	3/2	5,20/51,783	down	UDP-glucose metabolic process	UTP:glucose-1-phosphate uridylyltransferase activity/ Nucleotidyltransferase/ Transferase
gi|890812290	uncharacterized protein LOC100272379 precursor ou beta-1,3-glucanase	*Zea mays*	80	8	3/2	9,31/36,100	up	carbohydrate metabolic process	Glycosidase/ glucan exo-1,3-beta-glucosidase activity
gi|288063	ketol-acid reductoisomerase, chloroplastic	*Arabidopsis thaliana*	104	4	2/1	6,55/64,285	down	Amino-acid biosynthesis/ branched-chain amino acid biosynthesis/ isoleucine biosynthetic process/ response to cadmium ion/ valine biosynthetic process	Oxidoreductase/ copper ion binding/ ketol-acid reductoisomerase activity
gi|115465569	Os05g0573700 ou ketol-acid reductoisomerase, chloroplastic	*Oryza sativa Japonica Group*	286	7	5/2	6,01/62,680	up	branched-chain amino acid biosynthetic process	ketol-acid reductoisomerase activity
gi|223946977	unknown ou uncharacterized protein	*Zea mays*	661	7	9/2	5,43/55,203	up	lipid metabolic process	Aspartyl protease/ aspartic-type endopeptidase activity
gi|224028639	unknown ou uncharacterized protein	*Zea mays*	67	7	3/2	8,56/34,682	down	------	carbohydrate binding

gi|212723798	uncharacterized protein LOC100194227 ou 1,4-beta-D-glucanase	*Zea mays*	187	6	4/1	5,29/25,534	down	-----	hydrolase activity
gi|226493908	uncharacterized protein LOC100277287 ou uncharacterized protein	*Zea mays*	186	8	4/2	5,55/33,588	down	------	catalytic activity
gi|223946537	unknown ou uncharacterized protein	*Zea mays*	35	11	2/1	5,15/35,255	up	polyamine metabolic process	transferase activity
gi|13537421	farnesyl pyrophosphate synthase	*Humulus lupulus*	106	4	2/1	5,50/39,594	up	isoprenoid biosynthetic process	transferase activity
Energia									
gi|30385668	pyruvate phosphate dikinase	*Sorghum bicolor*	802	11	18/6	5,68/103,021	down	pyruvate metabolic process	ATP binding/ kinase activity/ metal ion binding/ pyruvate, phosphate dikinase activity
gi|822885164	pyruvate, phosphate dikinase 1, chloroplastic precursor	*Zea mays*	198	4	5/3	6,07/103,919	up	pyruvate metabolic process/ photosynthesis	ATP binding/ kinase activity/ metal ion binding/ pyruvate, phosphate dikinase activity
gi|121582243	pyruvate orthophosphate dikinase	*Echinochloa frumentacea*	316	5	7/4	5,29/103,153	down	pyruvate metabolic process	ATP binding/ kinase activity/ metal ion binding/ pyruvate, phosphate dikinase activity
gi|2285877	pyruvate orthophosphate dikinase	*Eleocharis vivipara*	307	6	9/4	6,37/104,222	down	pyruvate metabolic process	ATP binding/ kinase activity/ metal ion binding/ pyruvate, phosphate dikinase activity
gi|212275598	uncharacterized protein LOC100192501 ou pyrophosphate--fructose 6-phosphate 1-phosphotransferase subunit alpha	*Zea mays*	140	3	2/1	5,07/67,950	up	fructose 6-phosphate metabolic process/ Glycolysis	6-phosphofructokinase activity/ ATP binding/ diphosphate-fructose-6-phosphate 1-phosphotransferase activity/ metal ion binding
gi|293332239	nucleotide diphosphate kinase 1	*Zea mays*	107	14	4/2	6,84/16,820	down	CTP biosynthetic process/ GTP biosynthetic process/ UTP biosynthetic process	ATP binding/ nucleoside diphosphate kinase activity
gi|168586	pyruvate,orthophosphate dikinase	*Zea mays*	795	10	19/7	5,71/103,356	down	pyruvate metabolic process/ photosynthesis	ATP binding/ kinase activity/ metal ion binding/ pyruvate, phosphate dikinase activity

gi|115463815	Os05g0405000 ou Pyruvate, phosphate dikinase 1, chloroplastic	*Oryza sativa Japonica Group*	482	5	11/4	5,98/103,578	down	photosynthesis/ pyruvate metabolic process	ATP binding/ kinase activity/ metal ion binding (Mg2+)/ pyruvate, phosphate dikinase activity/ Kinase/ Transferase
Síntese de proteína									
gi|1169476	Elongation factor 1-alpha	*Nicotiana tabacum*	342	11	13/6	8,24/49,593	up	Protein biosynthesis	GTPase activity/ GTP binding/ translation elongation factor activity
gi|242080463	hypothetical protein SORBIDRAFT_07g002560 ou 60S acidic ribosomal protein P0	*Sorghum bicolor*	184	17	5/2	5,19/34,592	up	cytoplasmic translation/ ribosome biogenesis	large ribosomal subunit rRNA binding/ structural constituent of ribosome/ Ribonucleoprotein/ Ribosomal protein
gi|162460698	60S acidic ribosomal protein P0	*Zea mays*	133	7	2/1	5,20/34,597	down	ribosome biogenesis/ response to anoxia (ausência de O2)	large ribosomal subunit rRNA binding/ structural constituent of ribosome/ Ribonucleoprotein/ Ribosomal protein
gi|556558	26S protease regulatory subunit 4 homolog	*Oryza sativa Japonica Group*	99	4	2/1	5,91/49,717	up	ER-associated ubiquitin-dependent protein catabolic process/ positive regulation of RNA polymerase II transcriptional preinitiation complex assembly	ATP binding/ proteasome-activating ATPase activity/ TBP-class protein binding
Armazenamento de proteína									
gi|22284	vicilin-like embryo storage protein	*Zea mays*	4918	43	113/22	6,23/66,635	up	Oxygen transport	Nutrient reservoir activity/ iron ion binding/ heme binding/ oxygen binding
gi|224030527	unknown ou uncharacterized protein	*Zea mays*	4494	45	107/22	6,39/65,368	up	------	nutrient reservoir activity
gi|168664	zein protein precursor ou sulfur-rich zein protein of Mr 15,000	*Zea mays*	891	10	10/1	8,05/19,961	down	------	nutrient reservoir activity/ Seed storage protein/ Storage protein
gi|162458978	LOC542653 ou legumin-like protein	*Zea mays*	257	9	5/2	6,23/38,283	up	------	nutrient reservoir activity
gi|226508602	globulin	*Zea mays*	58	11	3/2	8,76/22,225	up	------	nutrient reservoir activity
gi|3414817	globulin-1	*Zea mays*	277	21	13/5	8,70/27,681	down	------	nutrient reservoir activity
gi|141603	Zein-alpha A20	*Zea mays*	117	14	2/1	8,52/26,395	down	------	nutrient reservoir activity/ Seed storage protein/ Storage protein

gi|162459030	legumin-like protein	*Zea mays*	44	7	2/2	5,79/38,047	down	------	nutrient reservoir activity
Defesa e estresse celular									
gi|214014704	chitinase	*Zea mays subsp. parviglumis*	990	38	16/6	8,91/29,749	up	carbohydrate metabolic process/ chitin catabolic process/ defense response/ polysaccharide catabolic process/ cell wall macromolecule catabolic process	chitinase activity/ chitin binding
gi|48093246	chitinase	*Zea mays subsp. parviglumis*	961	39	15/6	8,83/29,891	up	carbohydrate metabolic process/ chitin catabolic process/ defense response/ polysaccharide catabolic process/ cell wall macromolecule catabolic process	chitinase activity/ chitin binding
gi|214014710	chitinase	*Zea mays subsp. parviglumis*	953	33	16/7	8,91/29,972	up	carbohydrate metabolic process/ chitin catabolic process/ defense response/ polysaccharide catabolic process/ cell wall macromolecule catabolic process	chitinase activity/ chitin binding
gi|48093228	chitinase	*Zea mays subsp. parviglumis*	891	27	16/5	8,92/29,819	down	carbohydrate metabolic process/ chitin catabolic process/ defense response/ polysaccharide catabolic process/ cell wall macromolecule catabolic process	chitinase activity/ chitin binding
gi|226504442	16.9 kDa class I heat shock protein 1	*Zea mays*	328	30	9/4	6,77/17,048	down	Stress response	response to stress
gi|226507146	16.9 kDa class I heat shock protein 1	*Zea mays*	424	40	11/5	6,77/16,970	down	Stress response	response to stress
gi|118484	dehydrin DHN1	*Zea mays*	280	27	5/2	9,10/17,150	up	Stress response	response to stress/ response to water
gi|226491145	late embryogenesis abundant protein Lea14-A	*Zea mays*	73	8	2/1	5,64/16,136	down	response to desiccation	response to stress
gi|6980846	zeamatin	*Zea mays*	693	24	11/3	8,16/22,956	up	Plant defense/ defense response to fungus/ killing of cells of other organism/ negative regulation of growth of symbiont in host/ positive regulation by host of cytolysis of symbiont cells	Antimicrobial/ Fungicide

gi|242042904	hypothetical protein SORBIDRAFT_02g002500 ou putative uncharacterized protein Sb02g002500	*Sorghum bicolor*	57	6	2/1	7,46/16,123	up	------	serine-type endopeptidase inhibitor activity
gi|75993931	ribosome inactivating protein 1	*Zea diploperennis*	381	15	7/7	6,25/33,508	down	defense response/ negative regulation of translation/ Plant defense	rRNA N-glycosylase activity/ Hydrolase
gi|132584	ribosome-inactivating protein 3	*Zea mays*	350	14	7/3	5,83/33,407	down	defense response/ negative regulation of translation/ Plant defense	rRNA N-glycosylase activity/ Hydrolase/ Protein synthesis inhibitor/ Toxin
Transporte									
gi|1703374	ADP-ribosylation factor 1	*Chlamydomonas reinhardtii*	90	9	4/1	9,65/20,747	down	protein transport/ small GTPase mediated signal transduction/ vesicle-mediated transport/ ER-Golgi transport	GTP binding
gi|162464433	phospholipid transfer protein precursor ou Non-specific lipid-transfer protein	*Zea mays*	370	39	7/3	9,27/12,175	up	lipid transport/ Transport	lipid binding
gi|226533385	LOC100280539 ou Aquaporin TIP3.1	*Zea mays*	125	10	2/2	9,79/27,494	down	transport	transporter activity
Desconhecido									
gi|194695920	unknown ou uncharacterized protein	*Zea mays*	143	6	2/1	7,08/37,867	down	------	------
gi|217072720	unknown	*Medicago truncatula*	119	21	4/2	5,61/22,689	down	------	------
gi|226530955	uncharacterized protein LOC100279055	*Zea mays*	112	17	2/1	5,42/18,806	down	------	------

* As proteínas acima foram consideradas diferencialmente expressas ($p < 0,05$) se identificadas com pelo menos dois peptídeos, ao menos duas réplicas biológicas e em pelo menos uma das condições

* Escore, cobertura de sequência, peptídeos e nº de sequências são valores médios

Legenda: QP1: variedade BR – 473 e CN: variedade BRS - 4103 (Embrapa Milho e Sorgo)

[a] Número de acesso no NCBI das proteínas diferencialmente expressas considerando um *fold* de 1,5 ou 50% ($p < 0,05$)

[b] *Up* e *down regulation* (*fold change*: emPAI - maior ou igual a 1,5; menor ou igual a 0,67)

Tabela 11 – Proteínas diferencialmente expressas identificadas pela abordagem *bottom up shotgun proteomics* de sementes de milho com qualidade proteica melhorada (QP2) em comparação com uma convencional normal (CN)

Número de acesso [a]	**Nome da proteína**	**Espécie**	**Escore Mascot**	**Cobert. Seq. (%)**	**Peptídeos matched/ Nº Seq.**	**pI/PM (kDa) teórico**	**Expressão [b] QP2/CN**	**Processo Biológico**	**Função Molecular**
Metabolismo									
gi|890812290	uncharacterized protein LOC100272379 precursor ou Beta-1,3-glucanase	*Zea mays*	327	8	5/2	9,31/36,100	up	carbohydrate metabolic process	Glycosidase/ glucan exo-1,3-beta-glucosidase activity
gi|226491894	uncharacterized protein LOC100274481 precursor	*Zea mays*	103	5	2/1	7,11/34,443	down	carbohydrate metabolic process	hydrolase activity, hydrolyzing O-glycosyl compounds
gi|188485727	alpha-1,4-glucan phosphorylase L isozyme	*Zea mays*	168	3	3/1	5,1678,129	down	carbohydrate metabolic process	glycogen phosphorylase activity/ pyridoxal phosphate binding/ Glycosyltransferase
gi|913865	branching enzyme II BEII [Zea mays, cultivar B73, endosperms, Peptide, 738 aa] ou Starch branching enzyme II	*Zea mays*	69	4	4/2	5,53/84,961	up	carbohydrate metabolic process	cation binding/ hydrolase activity, hydrolyzing O-glycosyl compounds
gi|22002428	granule bound starch synthase	*Setaria italica*	319	5	7/2	8,58/66,629	down	starch biosynthetic process	Glycosyltransferase/ glycogen (starch) synthase activity
gi|115465569	Os05g0573700 ou Ketol-acid reductoisomerase	*Oryza sativa Japonica Group*	233	7	4/2	6,01/62,680	up	branched-chain amino acid biosynthetic process	ketol-acid reductoisomerase activity
gi|288063	ketol-acid reductoisomerase	*Arabidopsis thaliana*	104	4	2/1	6,55/64,285	down	Amino-acid biosynthesis/ Branched-chain amino acid biosynthesis/ isoleucine biosynthetic process/ response to cadmium ion/ valine biosynthetic process	Oxidoreductase/ copper ion binding/ ketol-acid reductoisomerase activity
gi|223946977	unknown ou Uncharacterized protein	*Zea mays*	724	8	10/2	5,43/55,203	up	lipid metabolic process	aspartic-type endopeptidase activity/ Aspartyl protease
gi|224028639	unknown ou lectin	*Zea mays*	67	7	3/2	8,56/34,682	down	-----	carbohydrate binding
gi|226493908	uncharacterized protein LOC100277287	*Zea mays*	181	8	4/2	5,55/33,588	down	-----	catalytic activity
Energia									

gi|118498764	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	*Urochloa decumbens*	807	29	20/6	5,73/30,091	down	glucose metabolic process	NAD binding/ NADP binding/ oxidoreductase activity, acting on the aldehyde or oxo group of donors, NAD or NADP as acceptor
gi|212723032	uncharacterized protein LOC100192501 ou acetyl-CoA C-acyltransferase-like protein	*Zea mays*	136	4	2/1	8,59/48,499	up	metabolic process	Acyltransferase/ transferase activity, transferring acyl groups other than amino-acyl groups
gi|28172915	cytosolic 3-phosphoglycerate kinase	*Zea mays*	714	30	19/6	5,01/31,663	down	glycolytic process/ glycolysis/ response to endoplasmic reticulum stress/response to arsenic-containing substance/response to cadmium ion	phosphoglycerate kinase activity/ATP binding
gi|195605636	triosephosphate isomerase, cytosolic	*Zea mays*	670	33	15/4	5,53/27,278	up	glycolytic process	triose-phosphate isomerase activity
gi|226509797	uncharacterized protein LOC100274579 ou phosphoglycerate kinase	*Zea mays*	601	16	11/4	5,65/42,470	up	glycolytic process	ATP binding/ phosphoglycerate kinase activity
gi|30385668	pyruvate phosphate dikinase	*Sorghum bicolor*	822	10	18/6	5,68/103,021	down	pyruvate metabolic process	ATP binding/ kinase activity/ metal ion binding/ pyruvate, phosphate dikinase activity
gi|822885164	pyruvate, phosphate dikinase 1, chloroplastic precursor	*Zea mays*	237	4	8/3	6,07/103,919	up	pyruvate metabolic process/ photosynthesis	ATP binding/ kinase activity/ metal ion binding/ pyruvate, phosphate dikinase activity
gi|115463815	Os05g0405000 ou pyruvate, phosphate dikinase 1, chloroplastic	*Oryza sativa Japonica Group*	562	6	13/4	5,98/103,578	down	pyruvate metabolic process/ photosynthesis	ATP binding/ kinase activity/ metal ion binding (Mg2+)/ pyruvate, phosphate dikinase activity/ Kinase/ Transferase
gi|168586	pyruvate,orthophosphate dikinase	*Zea mays*	795	10	19/7	5,71/103,356	down	pyruvate metabolic process/ photosynthesis	ATP binding/ kinase activity/ metal ion binding/ pyruvate, phosphate dikinase activity
gi|121582243	pyruvate orthophosphate dikinase	*Echinochloa frumentacea*	317	5	8/4	5,29/103,153	down	pyruvate metabolic process	ATP binding/ kinase activity/ metal ion binding/ pyruvate, phosphate dikinase activity
Síntese de proteína									
gi|399414	elongation factor 1-alpha	*Triticum aestivum*	281	14	14/5	9,20/49,480	down	Protein biosynthesis	GTPase activity/ GTP binding/ translation elongation factor activity
gi|1169476	elongation factor 1-alpha	*Nicotiana tabacum*	244	13	13/5	8,24/49,593	up	Protein biosynthesis	GTPase activity/ GTP binding/ translation elongation factor activity

gi|32401874	small ribosomal protein 4	*Metasequoia glyptostroboides*	44	8	6/1	10,97/16,272	up	------	rRNA binding/ Ribonucleoprotein/ Ribosomal protein
Armazenamento de proteína									
gi|168664	zein protein precursor	*Zea mays*	1061	10	13/1	8,05/19,961	down	------	nutrient reservoir activity/ Seed storage protein/ Storage protein
gi|22550	27kDa storage protein, zein	*Zea mays*	135	14	3/2	8,48/20,217	up	------	nutrient reservoir activity
gi|226508602	globulin	*Zea mays*	103	13	4/3	8,76/22,225	up	------	nutrient reservoir activity
gi|154980300	globulin-1	*Zea mays subsp. parviglumis*	2568	49	68/13	9,02/28,680	up	------	nutrient reservoir activity
gi|3414845	globulin-1	*Zea mays subsp. parviglumis*	1882	39	59/11	8,18/27,840	up	------	nutrient reservoir activity
gi|162459030	legumin-like protein	*Zea mays*	44	7	2/2	5,79/38,047	down	------	nutrient reservoir activity
gi|224030527	unknown ou uncharacterized protein	*Zea mays*	3756	43	93/21	6,39/65,368	down	------	nutrient reservoir activity
gi|242035831	hypothetical protein SORBIDRAFT_01g036140 ou putative uncharacterized protein Sb01g036140	*Sorghum bicolor*	412	9	8/4	5,94/58,174	up	------	nutrient reservoir activity
Defesa e estresse celular									
gi|537446	chaperone protein ClpB1	*Arabidopsis thaliana*	173	6	2/1	5,81/101,434	down	stress response/ positive regulation of translation/ protein metabolic process/ protein unfolding/ response to heat/ response to high light intensity/ response to hydrogen peroxide	ATP binding/ Chaperone
gi|1122317	heat shock protein 17.9	*Cenchrus americanus*	133	19	7/4	5,82/17,935	down	Stress response	response to stress
gi|226507890	16.9 kDa class I heat shock protein 1	*Zea mays*	211	34	8/4	6,77/17,146	up	Stress response/ response to high light intensity/ protein oligomerization/ response to hydrogen peroxide/ heat acclimation	response to stress
gi|226507146	16.9 kDa class I heat shock protein 1	*Zea mays*	424	40	11/5	6,77/16,970	down	Stress response	response to stress

gi|226491145	late embryogenesis abundant protein Lea14-A	*Zea mays*	116	16	3/2	5,64/16,136	up	response to desiccation	response to stress
gi|75993931	ribosome inactivating protein 1	*Zea diploperennis*	381	15	7/3	6,25/33,508	down	defense response/ negative regulation of translation/ Plant defense	rRNA N-glycosylase activity/ Hydrolase
gi|132584	ribosome-inactivating protein 3	*Zea mays*	350	14	7/3	5,83/33,407	down	defense response/ negative regulation of translation/ Plant defense	rRNA N-glycosylase activity/ Hydrolase/ Protein synthesis inhibitor/ Toxin
gi|195615416	pathogenesis-related protein 1	*Zea mays*	118	8	4/1	5,39/17,074	up	Plant defense	defense response/ response to biotic stimulus/ pathogenesis-related protein
Transporte									
gi|162464433	phospholipid transfer protein precursor	*Zea mays*	284	39	5/3	9,27/12,175	up	lipid transport/ Transport	lipid binding
gi|226533385	LOC100280539 ou Aquaporin TIP3.1	*Zea mays*	125	10	2/2	9,79/27,494	down	Transport	transporter activity
gi|11263	ATP synthase subunit alpha	*Beta vulgaris subsp. vulgaris*	764	4	6/1	5,69/55,306	up	ATP hydrolysis coupled proton transport/ ATP synthesis coupled proton transport/ ATP synthesis/ Hydrogen ion transport	ATP binding/ proton-transporting ATPase activity, rotational mechanism/ proton-transporting ATP synthase activity, rotational mechanism
Crescimento e Estrutura celular									
gi|586830485	profilin-1	*Triticum aestivum*	65	9	3/1	4,91/15,144	down	------	Actin-binding
Desconhecido									
gi|223950453	unknown	*Zea mays*	960	23	12/3	6,01/22,875	down	------	------
gi|217072720	unknown	*Medicago truncatula*	119	21	4/2	5,61/22,689	down	------	------
gi|226530955	uncharacterized protein LOC100279055 ou putative uncharacterized protein	*Zea mays*	112	17	2/1	5,42/18,806	down	-----	------

* As proteínas acima foram consideradas diferencialmente expressas ($p < 0,05$) se identificadas com pelo menos dois peptídeos, ao menos duas réplicas biológicas e em pelo menos uma das condições

* Escore, cobertura de sequência, peptídeos e nº de sequências são valores médios

Legenda: QP2: variedade BR – 451e CN: variedade BRS - 4103 (Embrapa Milho e Sorgo)

[a] Número de acesso no NCBI das proteínas diferencialmente expressas considerando um *fold* de 1,5 ou 50% ($p < 0,05$)

[b] *Up* e *down regulation* (*fold change*: emPAI - maior ou igual a 1,5; menor ou igual a 0,67)

4.1.6 Identificação de proteínas comuns entre as abordagens 2-DE e *bottom up shotgun proteomics*

Pela abordagem *bottom up shotgun*, um maior número de proteínas diferencialmente expressas foi observado nas diferentes comparações estudadas, quando comparado com a abordagem eletroforética 2-DE.

Na comparação 1, a abordagem 2-DE identificou significativamente 14 spots, nos quais foram identificadas 19 proteínas diferencialmente expressas por nano-ESI-Q-TOF MS/MS com sucesso. Em comparação com estes resultados, a abordagem *shotgun* foi capaz de detectar duas vezes mais proteínas (39 proteínas). Para a comparação 2, dos sete spots diferenciais obtidos dos géis 2-DE, oito proteínas diferencialmente expressas foram identificadas, no entanto, a abordagem *shotgun* detectou seis vezes mais proteínas (52 proteínas). Ao final, na comparação 3, das 11 proteínas diferencialmente expressas identificadas em oito spots na abordagem 2-DE, um número quatro vezes maior foi obtido pela abordagem *shotgun* (46 proteínas).

Com relação às proteínas diferencialmente expressas da comparação 1 (QP1 x QP2) identificadas por 2-DE, três enzimas chitinase (todas no spot 48), três proteínas globulin-1 (todas no spot 81) e uma putative uncharacterized protein Sb04g009130 (spot 113) foram similarmente identificadas pela abordagem *bottom up shotgun proteomic*, corroborando os resultados encontrados e demonstrando a complementaridade de ambas as técnicas (Tabela 12). Em relação à sua expressão, as três proteínas de armazenamento globulin-1 e as três proteínas de defesa/estresse chitinase apresentaram expressão *down regulation* para a variedade QP1 (QP1/QP2 $\leq$ 0,67) e a proteína desconhecida putative uncharacterized protein Sb04g009130 apresentou expressão *up regulation* (QP1/QP2 $\geq$ 1,5) nas duas abordagens proteômicas utilizadas.

Na comparação 2 (QP1 x CN), entre as proteínas diferencialmente expressas por 2-DE, a vicilin-like embryo storage protein (spot 58) e 16.9 kDa class I heat shock protein 1 (spot 27) foram similares às proteínas identificadas pela abordagem *bottom up shotgun*. Estas proteínas apresentaram expressão *up* e (QP1/CN $\geq$ 1,5) e *down regulation* (QP1/CN $\leq$ 0,67), respectivamente, sendo classificadas nos grupos funcionais de armazenamento de proteína e defesa e estresse celular, respectivamente.

Finalmente, na comparação 3 (QP2 x CN), as proteínas uncharacterized protein LOC100277287 (spot 67), globulin-1 (spot 86) e a enzima glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, cytosolic 3 (spot 81) foram similares entre as duas abordagens proteômicas

utilizadas. A proteína LOC100277287 e a enzima glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase expressaram-se de forma *down regulation*, por outro lado, a proteína globulin-1 apresentou expressão *up regulation*.

Tabela 12. Proteínas similares entre as abordagens 2-DE e *bottom up shotgun proteomics* para a comparação 1 (QP1 x QP2), comparação 2 (QP1 x CN) e comparação 3 (QP2 x CN)

			Expressão QP1/QP2[b]			
Nº de acesso[a]	**Nome proteína**	**Espécie**	**2-DE**	***Shoot gun***	**Processo Biológico**	**Função Molecular**
Armazenamento de proteína						
gi|154980334	globulin-1	*Zea mays*	down	down	-----	nutrient reservoir activity
gi|3414817	globulin-1	*Zea mays*	down	down	-----	nutrient reservoir activity
gi|3414845	globulin-1	*Zea mays*	down	down	-----	nutrient reservoir activity
Defesa e estresse celular						
gi|48093332	chitinase	*Zea mays*	down	up	chitin catabolic process/ defense response/ polysaccharide catabolic process/ cell wall macromolecule catabolic process	chitinase activity/ chitin binding
gi|214014500	chitinase	*Zea mays*	down	up	carbohydrate metabolic process/ chitin catabolic process/ cell wall macromolecule catabolic process	chitinase activity/ chitin binding
gi|214014552	chitinase	*Zea mays*	down	up	carbohydrate metabolic process/ chitin catabolic process/ cell wall macromolecule catabolic process	chitinase activity/ chitin binding
Desconhecido						
gi|242064666	putative uncharacterized protein Sb04g009130	*Sorghum bicolor*	up	up	-----	-----
			Expressão QP1/CN[b]			
Nº de acesso[a]	**Nome proteína**	**Espécie**	**2-DE**	***Shoot gun***	**Processo Biológico**	**Função Molecular**
Energia						
gi|22284	vicilin-like embryo storage protein	*Zea mays*	up	up	oxygen transport	Nutrient reservoir activity/ iron ion binding/ heme binding/ oxygen binding

gi|226506758	16.9 kDa class I heat shock protein 1	*Zea mays*	down	down	Stress response/ response to high light intensity/ protein oligomerization/ response to hydrogen peroxide/ heat acclimation	-----
			Expressão QP2/CN[b]			
Nº de acesso[a]	**Nome proteína**	**Espécie**	**2-DE**	***Shoot gun***	**Processo Biológico**	**Função Molecular**
Metabolismo						
gi|226493908	uncharacterized protein LOC100277287	*Zea mays*	down	down	metabolic process	catalytic activity
Energia						
gi|162462949	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, cytosolic 3	*Zea mays*	down	down	glycolytic process/ glycolysis/ response to endoplasmic reticulum stress/ response to arsenic-containing substance/ response to cadmium ion	phosphoglycerate kinase activity/ATP binding
Armazenamento de proteína						
gi|154980224	globulin-1	*Zea mays*	up	up	-----	nutrient reservoir activity

Legenda: QP1: variedade BR - 473; QP2: variedade BR - 451; CN: variedade BRS - 4103

[a] Número de acesso da proteína de acordo com o banco de dados do NCBI

[b] *Up* e *down regulation* (emPAI *fold change* de 1,5 ou 50% ($p < 0,05$): maior ou igual a 1,5; menor ou igual a 0,67)

4.2 Avaliação da segurança alimentar de sementes de milho geneticamente modificadas em comparação com suas respectivas sementes convencionais genitoras

4.2.1 Composição química

Devido à variação natural existente entre diferentes linhas de sementes de milho, os resultados das sementes geneticamente modificadas (GM1 e GM2) foram comparados com seus respectivos convencionais genitores (CG1 e CG2). A análise estatística utilizada nesta análise foi o teste t. A abordagem de segurança foi utilizada para testar se as diferenças de sementes GM excederiam o intervalo de variação normal de suas convencionais genitoras não GM.

As Tabelas 13 e 14 apresentam os resultados das determinações de umidade, proteína total, fração lipídica, resíduo mineral seco (cinzas), fibras totais, carboidratos, minerais e ácidos graxos de cada amostra, para uma comparação mais precisa dos parâmetros nutricionais, indispensáveis para a avaliação correta da equivalência substancial.

Tabela 13 – Análise composicional de sementes de milhos geneticamente modificados (GMs) e convencionais genitores (CGs)

Componentes	**Comparação 1**		**Comparação 2**		***Referência**
	CG1	**GM1**	**CG2**	**GM2**	
Umidade (pf)	11,64 ± 0,14[a]	11,59 ± 0,21[a]	11,58 ± 0,34[a]	11,44 ± 0,32[a]	7,0 - 23,0
Macronutrientes[f] g/100g (n = 3)					
Proteina (ps)	8,94 ± 0,32[a]	9,25 ± 0,36[a]	9,39 ± 0,18[a]	9,66 ± 0,33[a]	6,0 - 12,7
Lipídios (ps)	5,55 ± 0,51[a]	5,37 ± 0,24[a]	4,93 ± 0,33[b]	6,19 ± 0,18[a]	2,6 - 5,8
Cinzas (ps)	1,53 ± 0,05[a]	1,29 ± 0,02[b]	1,16 ± 0,11[a]	1,10 ± 0,04[a]	1,1 - 3,9
Fibras Totais (ps)	12,01 ± 0,28[b]	13,83 ± 0,27[a]	12,60 ± 0,15[b]	13,48 ± 0,29[a]	9,21- 13,8
Carboidratos[a] (ps)	83,98 ± 0,68[a]	83,96 ± 0,39[a]	84,67 ± 0,46[a]	83,04 ± 0,48[b]	80,1 - 85,9
Micronutrientes[f] µg/g (n = 3)					
Cálcio (ps)	24,33 ± 1,53[b]	31,33 ± 1,53[a]	25,67 ± 0,58[b]	33,00 ± 2,00[a]	31,3 - 73,5
Ferro (ps)	18,67 ± 1,53[a]	19,33 ± 0,58[a]	19,17 ± 1,04[a]	20,33 ± 1,15[a]	12,3 - 21,6
Magnésio (ps)	1006,67 ± 2,89[b]	1018,00 ± 2,00[a]	996,67 ± 2,89[b]	1092,50 ± 2,50[a]	861,0 - 1.360,0
Zinco (ps)	25,00 ± 1,00[a]	22,00 ± 2,00[a]	24,33 ± 1,53[a]	22,33 ± 3,06[a]	17,2 - 28,8

Legenda: pf: peso fresco; ps: peso seco; [a] Carboidratos do peso seco foram estimados pela fórmula: % carboidratos = 100 - (% proteína + % lipídios + % cinzas); [f] Unidades para macronutrientes: g/100; micronutrientes: µg/g; umidade: %
Valores médios ± desvio padrão. Diferentes letras na linha são estatisticamente diferentes ($p < 0,05$)
Fonte: International Life Sciences Institute (ILSI) - https://www.cropcomposition.org/; OECD, 2002

Embora a fração de carboidratos não tenha sido analisada, os valores foram obtidos através da fórmula: % carboidratos = 100 - (% de proteína + % de cinzas + % de gordura). Os teores de umidade, proteína, lipídios e carboidratos foram semelhantes entre as amostras CG1 e GM1 (comparação 1). Por sua vez, os teores de cinzas foram maiores para a amostra convencional genitora CG1 quando comparada com a GM1 e o inverso foi observado no teor de fibras totais, no qual a amostra GM1 foi maior e estatisticamente diferente de sua amostra convencional genitora CG1. Quanto às amostras CG2 e GM2, os teores de umidade, proteína e cinzas não apresentaram diferença estatística. Por outro lado, teores de lipídios e fibras totais mostraram-se superiores na amostra GM2 quando comparados com CG2. O teor de carboidrato da variedade CG2 foi significativamente maior que a cultivar transgênica GM2. Embora o teor de lipídeos da amostra GM2 tenha sido superior às demais amostras e até mesmo os valores de referência, não houve diferenças significativas entre as amostras GMs e CGs.

Em relação aos micronutrientes, não foram identificadas diferenças significativas nos teores de Fe e Zn entre as duas comparações (CG1 x GM1 e CG2 x GM2). Os teores de Ca e Mg se apresentaram superiores nas amostras GMs quando comparados às CGs.

Dentre os os ácidos graxos identificados nas sementes de milho avaliadas, os principais são o ácido graxo oléico (C18:1) e o linoléico (C18:2) (Tabela 14). Embora os perfis de ácidos graxos das amostras CG1 e GM1 não tenham apresentado diferenças significativas, os teores da amostra geneticamente modificada GM1 foram ligeiramente inferiores.

Por outro lado, a diferença no perfil dos ácidos graxos entre as amostras GM2 e CG2 foi estatisticamente significativa ($p < 0,05$) e os tores de ácidos graxos da variedade GM2 foram maiores que os observados na variedade convencional genitora CG2, no entanto, essas diferenças não foram consideradas biologicamente relevantes.

Tabela 14 - Ácidos graxos (g/100g) de sementes de milho geneticamente modificados (GM) e convencionais genitores (CG)

Ácidos graxos (ps) (n=3)	**Comparação 1**		**Comparação 2**		***Referência**
	CG1	GM1	CG2	GM2	
Palmítico C16:0	0,84 ± 0,06[a]	0,79 ± 0,04[a]	0,66 ± 0,04[b]	0,81 ± 0,04[a]	0,259 - 0,790
Palmitoléico C16:1 (n-7)	ND	ND	ND	ND	0,003 - 0,006
Esteárico C18:0	0,19 ± 0,01[a]	0,18 ± 001[a]	0,08 ± 0,01[b]	0,12 ± 0,02[a]	0,032 - 0,170
Oléico C18:1 (n-9)	1,67 ± 0,18[a]	1,65 ± 0,07[a]	1,50 ± 0,15[b]	2,09 ± 0,05[a]	0,498 - 1,390
Linoléico C18:2 (n-6)	2,42 ± 0,28[a]	2,34 ± 0,10[a]	2,35 ± 0,11[b]	2,75 ± 0,08[a]	0,910 - 2,810
α-Linolênico C18:3 (n-3)	0,088 ± 0,021[a]	0,081 ± 0,010[a]	0,052 ± 0,003[b]	0,066 ± 0,002[a]	0,017 - 0,100
Araquidônico C20:0	0,049 ± 0,004[a]	0,044 ± 0,002[a]	0,027 ± 0,001[b]	0,032 ± 0,002[a]	0,008 - 0,014
Eicosanóico C20:1	0,015 ± 0,001[a]	0,015 ± 0,000[a]	0,017 ± 0,001[a]	0,019 ± 0,001[a]	0,005 - 0,009
Beênico C22:0	0,016 ± 0,002[a]	0,017 ± 0,001[a]	0,014 ± 0,001[a]	0,016 ± 0,001[a]	0,003 - 0,006
Lignocérico C24:0	0,022 ± 0,003[a]	0,021 ± 0,005[a]	0,016 ± 0,001[b]	0,020 ± 0,001[a]	ND
Saturados	1,11 ± 0,06[a]	1,05 ± 0,05[a]	0,80 ± 0,05[b]	1,00 ± 0,05[a]	0,302 - 0,509
Monoinsaturados	1,69 ± 0,18[a]	1,66 ± 0,07[a]	1,51 ± 0,16[b]	2,11 ± 0,05[a]	0,506 - 1,102
Polinsaturados	2,51 ± 0,26[a]	2,42 ± 0,11[a]	2,40 ± 0,11[b]	2,81 ± 0,08[a]	0,927 - 1,805

Legenda: ps: peso seco; *Referência: em %; ND = não detectado
Valores médios ± desvio padrão. Diferentes letras na linha são estatisticamente diferentes ($p < 0,05$)
Fonte: International Life Sciences Institute – ILSI - https://www.cropcomposition.org/; OECD, 2002

Por fim, pode-se observar que estão pouco evidentes as diferenças na composição centesimal existente entre as duas comparações estudadas, pois todos se encontram dentro das faixas de variabilidade esperadas da espécie.

4.2.2 Extração e quantificação de proteínas

O protocolo de extração de proteínas baseado em fenol (pH 8,0), de acordo com Carpentier et al. (2005) e Albo et al. (2007), mostrou-se eficiente para a extração de tecidos recalcitrantes, como o milho. O resultado de rendimento de proteínas (em peso fresco) para cada uma das amostras nas diferentes extrações realizadas (triplicata) foram 16 mg/g para GM1, 15 mg/g para CG1, 18 mg/g para GM2 e 17 mg/g para CG2.

4.2.3 Eletroforese unidimensional (1-DE – SDS-PAGE)

Foram utilizadas duas quantidades de proteínas nos géis (25 e 50 µg), para melhor avaliar as diferenças no perfil proteico das amostras de milho avaliadas. Ambas concentrações mostraram-se satisfatórias, podendo-se distinguir de forma satisfatória as mudanças eletroforéticas. O gel 1-DE revelou que as proteínas dos milhos foram eficientemente extraídas pelo protocolo de fenol (pH 8,0) empregado neste estudo, resultando em bandas bem acentuadas, definidas e sem estrias verticais.

A maioria das bandas protéicas foram visíveis no intervalo de 15 a 100 kDa (Figura 13), expressando perfis particulares, mas também similares, entre as variedades de milho avaliadas (CG1 x GM1 e CG2 x GM2). Em algumas bandas observa-se que as variedades geneticamente modificadas (GMs) apresentaram uma maior quantidade proteica, devido sua coloração mais escura (entre as bandas com 47 e 27 kDa). Em aproximadamente 33 kDa (ou melhor, de 35 a 30 kDa), as variedades CG1 e GM1 expressaram maior intensidade de bandas, quando comparadas com as variedades CG2 e GM2, indicando que, provavelmente, estas variedades possuam também maior quantidade de proteína ou proteínas mais expressas neste intervalo de peso molecular (PM). Por sua vez, bandas de 18 kDa foram visíveis exclusivamente em amostras geneticamente modificadas (GM1 e GM2) quando comparadas com suas variedades convencionais genitoras (CG1 e CG2).

Essas diferenças mínimas observadas nos perfis proteicos no gel 1-DE, torna possível distinguir as amostras de milho da comparação 1 (CG1 x GM1) das amostras de milho da comparação 2 (CG2 x GM2). Estudos prévios também se valeram de géis unidimensionais para avaliar a extração e perfil proteico quanto ao PM (WU et al., 2011; HASSAN et al., 2014; MORO et al., 2015).

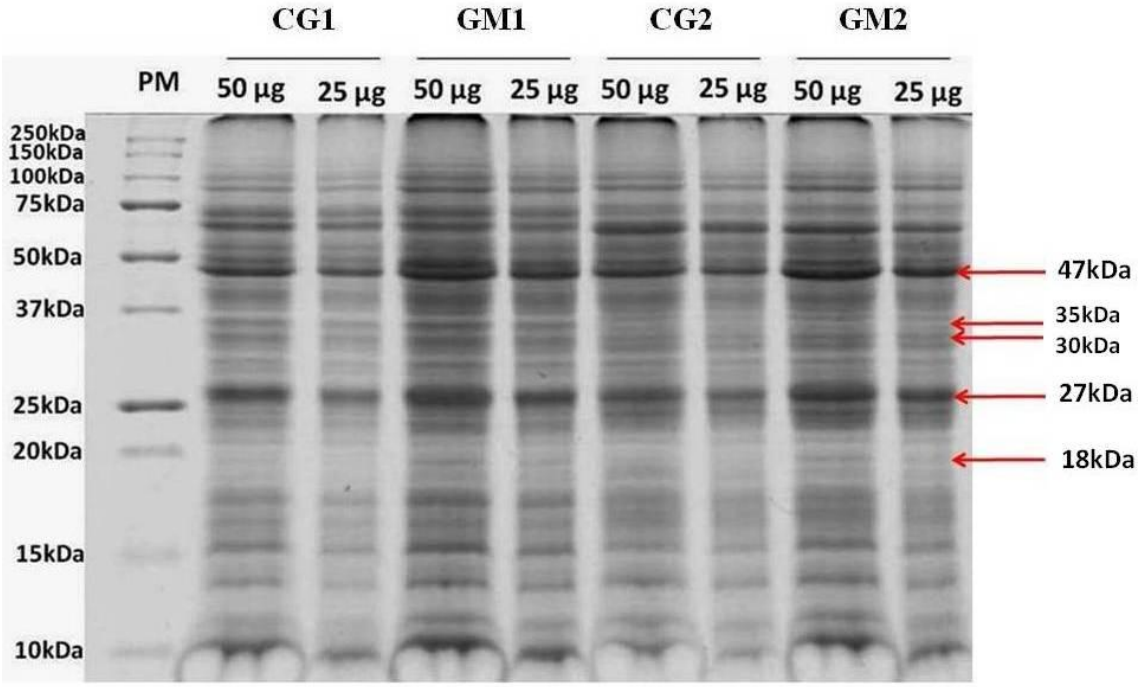

Figura 13 - Gel de poliacrilamida 12,5% (37,5:1) das variedades de milho convencionais genitoras (CG) e geneticamente modificadas (GM) contendo 25 e 50 µg de proteína

Legenda: CG1 (Tork convencional) e CG2 (Maximus convencional) GM1 (Tork TL ou Evento Bt 11) e GM2 (Maximus TLTG Viptera ou Evento Bt11 x MIR 162 x GA 21), PM = padrão de peso molecular (10 a 250 kDa)

4.2.4 Eletroforese bidimensional (2-DE)

As proteínas solúveis extraídas das sementes de milho GMs e CGs foram analisadas por eletroforese bidimensional (2-DE). Seis géis foram realizados para cada uma das amostras (três extrações distintas e dois géis por extração), a fim de assegurar reprodutibilidade e homogeneidade. Após coloração com Comassie (CBB), os spots de proteínas foram detectados e quantificados utilizando o software Image Master 2D Platinum (versão 7.0.6, GE Healthcare).

Inicialmente, 600 spots foram detectados em cada gel da comparação 1 (GM1 x CG1) e 650 spots na comparação 2 (GM2 x CG2). Após a aplicação dos parâmetros saliência = 80, área mínima = 5 e intensidade = 2 no software mencionado, o número total de spots para cada amostra foi 231, 223, 237 e 229 para GM1, CG1, GM2 e CG2, respectivamente (Tabela 15). Com a sobreposição dos mapas proteicos e identificação dos spots equivalentes, uma alta porcentagem de match (> 71%) foi alcançada para cada grupo de amostras, indicando a obtenção de géis alinhados e sem grandes distorções.

Tabela 15 - Análise de spots dos géis 2-DE das amostras de sementes de milho geneticamente modificadas (GM) e convencionais genitoras (CG)

Eletroforese 2-DE	**Comparação 1**		**Comparação 2**	
	GM1	**CG1**	**GM2**	**CG2**
Proteína Total ($mg.g^{-1}$, pf) [a]	16 ± 02	15 ± 01	18 ± 01	17 ± 02
Total de spots [b]	231 ± 22	223 ± 23	237 ± 30	229 ± 25
Match spots [c]	170 (75%)		165 (71%)	
Spots diferencialmente expressos [d]	18		15	
Spots *up regulation* [e]	05		09	
Spots *down regulation* [e]	13		06	

Legenda: pf: peso fresco; GM1: Tork TL, evento Bt 11; CG1: Tork convencional; GM2: Maximus TLTG Viptera, evento Bt11 x MIR 162 x GA 21; CG2: Maximus convencional

[a] Valores médios ± desvio padrão de três extrações distintas

[b] Número de spots total após aplicação dos parâmetros: saliência = 80, área mínima = 5 e intensidade = 2

[c] Número de spots equivalentes (*matched*) entre os diferentes pares de géis após a sobreposição dos mapas proteicos (*fold* > 1,5; ANOVA, $p < 0,05$)

[d] Número de spots diferencialmente expressos considerando um *fold* de 1,5 ou 50% ($p < 0,05$)

[e] *Up* e *down regulation* (*fold change*: maior ou igual a 1,5; menor ou igual a 0,67)

Somente spots com alteração quantitativa (mudança significativa de 1,5 fold, $p < 0,05$) foram selecionados para análise por MS. Um total de 18 spots para a comparação 1 (GM1 x CG1) apresentaram expressão diferencialmente significativa, sendo cinco spots *up-regulation* (relação GM1/CG1 ≥ 1,5) e 13 spots *down-regulation* (relação GM1/CG1 ≤ 0,67) (Tabela 8, Figura 14). Por sua vez, a comparação 2 (GM2 x CG2) apresentou 15 spots diferencialmente

expressos, no qual 11 spots foram *up-regulation* (relação GM2/CG2 ≥ 1,5) e quatro spots foram *down-regulation* (relação GM2/CG2 ≤ 0,67) (Tabela 15, Figura 15).

Nas Figuras 8 e 9 pode-se observar que os spots de interesse estão espalhados por todo o mapa proteico das amostras, sem restrição de peso molecular (PM) e ponto isoelétrico (pI). Estes spots foram excisados dos géis, digeridos e analisados por ESI-Q-TOF MS/MS contra a base de dados para proteínas do NCBI pelo programa MASCOT.

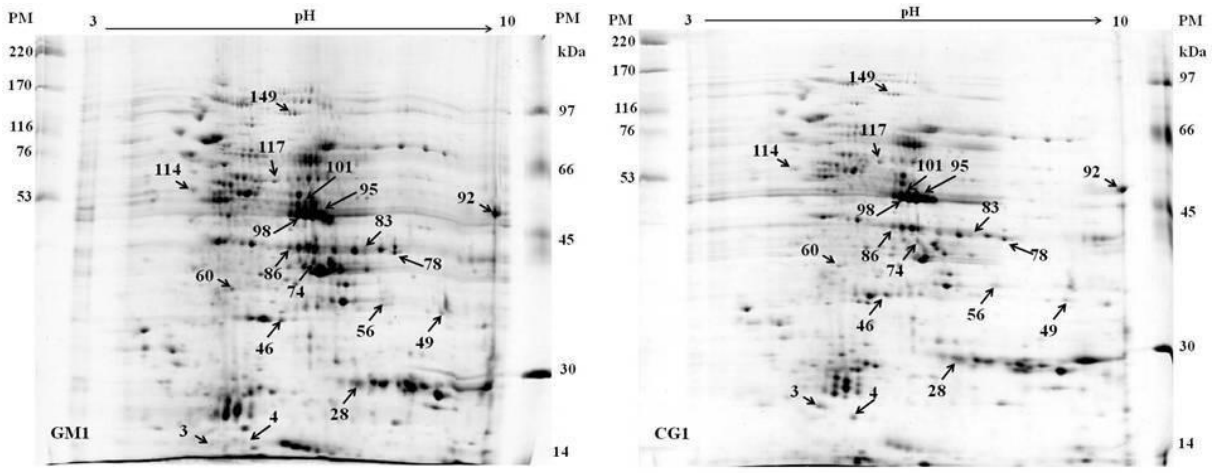

Figura 14 - Spots diferencialmente expressos (ANOVA, $p < 0,05$) entre as amostras de milho GM1 e CG1 (geneticamente modificada e convencional genitora, respectivamente) excisados para identificação por espectrometria de massas. Essas imagens foram selecionadas do gel referência e os spots foram enumerados de acordo com o *match ID* gerados pelo software de análise de géis Image Master 2D Platinum (v. 7.0.6, GE)

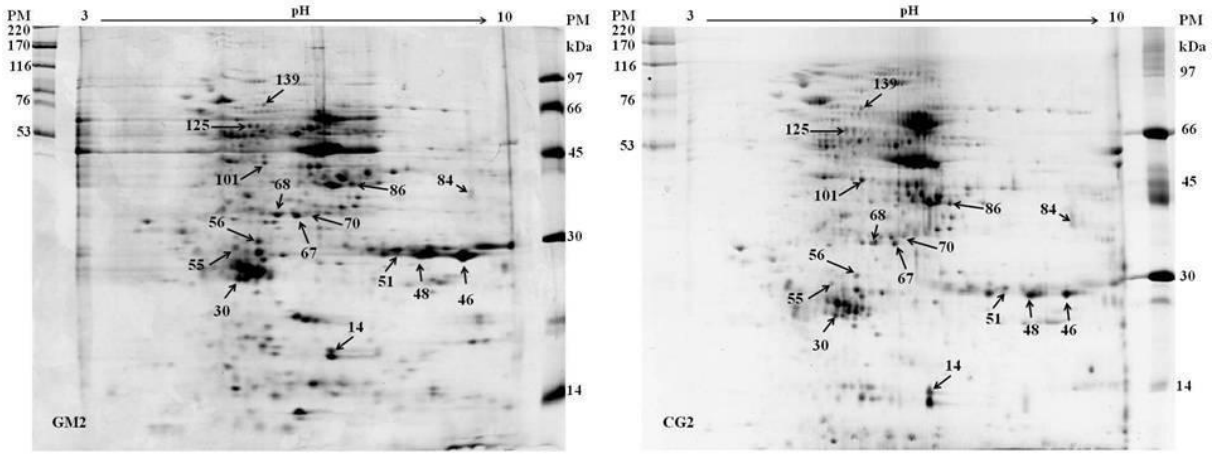

Figura 15 - Spots diferencialmente expressos (ANOVA, $p < 0,05$) entre as amostras de milho GM2 e CG2 (geneticamente modificada e convencional genitora, respectivamente) excisados para identificação por espectrometria de massas. Essas imagens foram selecionadas do gel referência e os spots foram enumerados de acordo com o *match ID* gerado pelo software de análise de géis Image Master 2D Platinum (v. 7.0.6, GE)

Foram identificadas proteínas em todos os spots das duas comparações de forma satisfatória (Anexo A, Tabelas complementares 4 e 5). Somente proteínas presentes em ambas as variedades de cada comparação foram admitidas. Para a identificação das proteínas, tomou-se como critério de seleção a presença de no mínimo dois peptídeos, cujo escore de identidade estivesse acima do limiar de identificação (*Mascot íon score* > 45), a % de cobertura da sequência e o número de sequências (≥ 2). Oito spots pertencentes à comparação 1 (GM1 x CG1) apresentaram apenas uma proteína, enquanto em 10 spots foram identificadas duas ou mais proteínas, totalizando 39 proteínas equivalentes para os 18 spots. Por outro lado, na comparação 2 (CM2 x CG2) em três spots apenas uma proteína foi identificada e em 11 spots foram identificadas duas ou mais proteínas, totalizando 36 proteínas equivalentes para os 14 spots. Um único spot da comparação 2 (spot 84) não apresentou proteína equivalente e foi excluído da análise.

4.2.4.1 Identificação de proteínas diferencialmente expressas do gel 2-DE por espectrometria de massas (MS)

Um grande número das proteínas identificadas mostraram mudanças de expressão ou abundância. Essas mudanças foram distintas entre as duas comparações. Assim, para a comparação 1, dos 18 spots analisados, foram identificadas 23 proteínas diferencialmente expressas, onde 13 proteínas foram definidas como *up regulation* (expressão GM1/CG1 ≥ 1,5) e 10 proteínas como *down regulation* (expressão GM1/CG1 ≤ 0,67) (Tabela 16). Para a comparação 2, dos 14 spots analisados, foram identificadas 21 proteínas diferencialmente expressas, sendo 12 proteínas com expressão *up regulation* (GM2/CG2 ≥ 1,5) e 9 proteínas como *down regulation* (GM2/CG2 ≤ 0,67). Deste total, apenas uma proteína foi considerada desconhecida ou não caracterizada na comparação GM2 x CG2 (Tabela 17).

Praticamente todas as proteínas diferencialmente expressas de ambas as comparações foram identificadas para a espécie *Zea mays* (milho), com exceção de duas proteínas: glucose and ribitol dehydrogenase identificada em *Oryza sativa Japonica Group* (arroz) (spot 46 e 67, comparação 1 e 2, respectivamente) e 60S acidic ribosomal protein P0 identificada em *Sorghum bicolor* (sorgo) (spot 60, comparação 1).

As proteínas elongation factor 2 (spot 46), vicilin-like embryo storage protein (spot 3) e globulin 2 (spot 4) da comparação 1 (GM1 x CG1) apresentaram PM experimental inferiores ao seu PM teórico (Tabela 16). Por sua vez, as proteínas globulina 1 e 2 apresentaram formas truncadas nos géis 2-DE da comparação 2 (GM2 x CG2), com pesos

moleculares mais baixos do que as formas nativas destas proteínas (por exemplo, spots 30, 46 e 48, Tabela 17).

Finalmente, através dos spots excisados não foi possível detectar produtos de proteínas provenientes dos genes marcadores (Cry1Ab, Vip3Aa20, PAT e mEPSPS) inseridos na recombinação genética das cultivares de milho GMs analisadas.

Tabela 16 – Proteínas diferencialmente expressas identificadas pela abordagem 2-DE de sementes de milho geneticamente modificada (GM1) em comparação com sua convencional genitora (CG1)

Spot	Nº de acesso [a]	Nome da proteína	Espécie	Escore Mascot	Cobert. Seq. (%)	Pept. matched/ Nº Seq.	pI/PM (kDa) teór.	pI/PM (kDa) exp.	Fold change (2-DE) GM1/CG1	Expres. Spot [b] GM1/CG1	Fold change (emPAI) GM1/CG1	Expres. Protein [c] GM1/CG1	Processo Biológico	Função Molecular
Metabolismo														
46	gi|108885236	glucose and ribitol dehydrogenase	*Oryza sativa Japonica Group*	47	8	3/2	5,76/ 32,475	6,40/ 35,0	0,2	down	0,24	down	oxidation-reduction process	oxidoreductase activity
74	gi|926657619	sorbitol dehydrogenase homolog 1	*Zea mays*	273	24	9/7	6,27/ 39,528	6,93/ 42,0	1,9	up	1,63	up	oxidation-reduction process	oxidoreductase activity/ zinc ion binding/ Metal-binding
83	gi|226496407	uncharacterized protein LOC100273311 ou Aspartate aminotransferase	*Zea mays*	673	29	18/11	8,54/ 50,379	7,78/ 43,0	0,5	down	0,66	down	biosynthetic process/ cellular amino acid metabolic process	L-aspartate:2-oxoglutarate aminotransferase activity/ L-phenylalanine:2-oxoglutarate aminotransferase activity/ pyridoxal phosphate binding/ Aminotransferase
117	gi|65331800	ADP-glucose pyrophosphorylase endosperm large subunit	*Zea mays*	220	21	9/6	6,32/ 46,226	6,24/ 63,0	0,7	down	0,35	down	glycogen biosynthetic process/ starch biosynthetic process	glucose-1-phosphate adenylyltransferase activity/ ATP binding
149	gi|162460741	sucrose synthase 1	*Zea mays*	552	19	28/16	5,93/ 92,073	6,44/ 128,0	5,3	up	0,21	up	response to anoxia/ sucrose metabolic process	sucrose synthase activity/ Glycosyltransferase/ Transferase
Energia														
74	gi|162461501	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, cytosolic 2	*Zea mays*	254	25	15/7	6,41/ 36,633	6,93/ 42,0	1,9	up	2,41	up	glucose metabolic process/ glycolytic process/ Glycolysis	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (NAD+) (phosphorylating) activity/ NAD+ binding/ NADP binding/ phosphate ion binding/ Oxidoreductase
95	gi|194690156	unknown ou Fructose-bisphosphate aldolase	*Zea mays*	220	14	4/2	7,52/ 39,022	6,98/ 50,0	0,3	down	2,25	up	glycolytic process/ Glycolysis	fructose-bisphosphate aldolase activity/ Lyase
Síntese de proteína														
46	gi|226503399	LOC100285098 ou Elongation factor 2	*Zea mays*	552	16	15/8	6,26/ 94,888	6,40/ 35,0	4,5	up	10,33	up	Protein biosynthesis/ translational elongation/ GTP catabolic process/ response to cold	GTPase activity/ GTP binding/ translation elongation factor activity

60	gi|194699266	unknown ou 60S acidic ribosomal protein P0	*Zea mays*	623	26	21/8	5,20/ 34,581	5,52/ 38,0	4,2	up	1,66	up	ribosome biogenesis/ translation elongation/ response to salt stress/response to cold/response to ion zinc	Ribonucleoprotein/ Ribosomal protein/ structural constituent of ribosome/ copper ion binding
60	gi|242080463	hypothetical protein SORBIDRAFT_ 07g002560 ou 60S acidic ribosomal protein P0	*Sorghum bicolor*	592	26	21/8	5,19/ 34,592	5,52/ 38,0	4,2	up	1,66	up	cytoplasmic translation/ ribosome biogenesis	large ribosomal subunit rRNA binding/ structural constituent of ribosome/ Ribonucleoprotein/ Ribosomal protein
98	gi|226505800	elongation factor 1-gamma 3	*Zea mays*	246	15	6/5	6,08/ 47,465	6,54/ 50,0	0,3	down	0,64	down	Protein biosynthesis/ translational elongation	translation elongation factor activity/ copper ion binding/ protein binding
Armazenamento de proteína														
3	gi|22284	vicilin-like embryo storage protein	*Zea mays*	67	3	2/2	6,23/ 66,635	5,09/ 24,0	0,1	down	0,13	down	Oxygen transport	Nutrient reservoir activity/ iron ion binding/ heme binding/ oxygen binding
4	gi|228310	globulin 2 ou globulin-1 s allele-like	*Zea mays*	101	3	2/2	6,16/ 50,234	5,64/ 24,0	0,1	down	0,28	down	-----	nutrient reservoir activity
78	gi|228310	globulin 2 ou globulin-1 s allele-like	*Zea mays*	455	20	98/6	6,16/ 50,234	8,25/ 44,0	0,3	down	2,28	up	-----	nutrient reservoir activity
92	gi|3414845	globulin-1	*Zea mays subsp. parviglumis*	123	19	5/4	8,18/ 27,840	9,96/ 48,0	0,2	down	3,33	up	-----	nutrient reservoir activity
98	gi|228310	globulin 2 ou globulin-1 s allele-like	*Zea mays*	1442	51	61/18	6,16/ 50,234	6,54/ 50,0	0,3	down	0,51	down	-----	nutrient reservoir activity
101	gi|228310	globulin 2 ou globulin-1 s allele-like	*Zea mays*	1275	45	55/15	6,16/ 50,234	6,76/ 49,0	0,5	down	0,67	down	-----	nutrient reservoir activity
Defesa e estresse celular														
46	gi|226500748	uncharacterized protein LOC100272498 ou general stress protein 39	*Zea mays*	249	22	10/5	5,78/ 33,152	6,40/ 35,0	0,2	down	0,34	down	oxidation-reduction process	oxidoreductase activity
49	gi|194698864	unknown ou Uncharacterized protein	*Zea mays*	330	19	18/5	7,74/ 34,621	9,26/ 36,0	2,9	up	2,20	up	regulation of catalytic activity/phenylpropanoid biosynthetic process	carbohydrate binding

56	gi|212275039	jasmonate-induced protein	*Zea mays*	132	14	7/4	7,79/ 34,581	8,12/ 37,0	0,3	down	0,45	down	regulation of catalytic activity/phenylpropanoid biosynthetic process	carbohydrate binding
86	gi|22124	alcohol dehydrogenase 1	*Zea mays*	191	25	9/6	6,43/ 41,631	6,47/ 44,0	0,4	down	2,89	up	oxidation-reduction process/ response to hypoxia (baixo teor de O_2)/ response to cadmium ion/ response to salt stress	alcohol dehydrogenase (NAD) activity/ zinc ion binding/ oxidoreductase
Crescimento e estrutura celular														
114	gi|162460038	tubulin beta-7 chain	*Zea mays*	608	42	34/14	4,72/ 50,689	4,82/ 57,0	9,3	up	1,63	up	microtubule-based process/ GTP catabolic process/ protein polymerization/response to cadmium ion	GTPase activity/ GTP binding/ structural constituent of cytoskeleton
114	gi|162463097	tubulin beta-2 chain	*Zea mays*	314	27	23/9	4,82/ 50,535	4,82/ 57,0	9,3	up	2,46	up	microtubule-based process/ GTP catabolic process/ protein polymerization/response to cadmium ion	GTPase activity/ GTP binding/ structural constituent of cytoskeleton

Legenda: GM1: Tork TL, evento Bt 11 e CG1: Tork convencional

[a] Número de acesso no NCBI das proteínas diferencialmente expressas considerando um *fold* de 1,5 ou 50% ($p < 0,05$)

[b] *Up* e *down regulation* (*fold change*: IM2DP - maior ou igual a 1,5; menor ou igual a 0,67)

[c] *Up* e *down regulation* (*fold change*: emPAI - maior ou igual a 1,5; menor ou igual a 0,67)

*Presença do spot 28 com proteína equivalente, mas não diferencialmente expressa ($1,5 < x > 0,67$)

Tabela 17 – Proteínas diferencialmente expressas identificadas pela abordagem 2-DE de sementes de milho geneticamente modificada (GM2) em comparação com sua convencional genitora (CG2)

Spot	Nº de acesso[a]	Nome da proteína	Espécie	Escore Mascot	Cobert. Seq. (%)	Pept. Matched/ Nº Seq.	pI/PM (kDa) teór.	pI/PM (kDa) exp.	Fold change (2-DE) GM2/CG2	Expres. Spot [b] GM2/CG2	Fold change (emPAI) GM2/CG2	Expres. proteína [c] GM2/CG2	Processo Biológico	Função Molecular
Metabolismo														
67	gi|108885236	glucose and ribitol dehydrogenase homolog	*Oryza sativa Japonica Group*	183	11	6/4	5,76/ 32,475	6,37/ 34,0	3,02	up	1,62	up	oxidation-reduction process	oxidoreductase activity
101	gi|33321047	granule-bound starch synthase precursor	*Zea mays*	265	8	6/3	6,59/ 67,251	5,87/ 47,0	0,37	down	0,37	down	starch biosynthetic process	glycogen (starch) synthase activity
125	gi|293331027	uncharacterized protein LOC100382989 ou Uncharacterized protein	*Zea mays*	504	19	12/7	5,46/ 57,479	5,60/ 60,0	0,79	down	0,62	down	branched-chain amino acid biosynthetic process	ketol-acid reductoisomerase activity
125	gi|821161537	granule-bound starch synthase 1, chloroplastic/ amyloplastic precursor ou starch synthase, chloroplastic/amyloplastic	*Zea mays*	446	21	15/10	6,59/ 66,609	5,60/ 60,0	0,79	down	0,62	down	starch biosynthetic process	glycogen (starch) synthase activity
125	gi|15054940	granule-bound starch synthase	*Zea luxurians*	278	22	9/4	5,39/ 29,448	5,60/ 60,0	0,79	down	0,48	down	starch biosynthetic process	Glycosyltransferase/ glycogen (starch) synthase activity
Energia														
14	gi|226509797	uncharacterized protein LOC100274579 ou phosphoglycerate kinase	*Zea mays*	100	14	7/3	5,65/ 42,470	7,01/ 17,0	0,42	down	0,64	down	glycolytic process	ATP binding/ phosphoglycerate kinase activity
30	gi|162462949	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, cytosolic 3	*Zea mays*	717	46	22/8	7,01/ 36,597	5,38/ 25,0	3,07	up	1,70	up	glucose metabolic process/ glycolytic process/ response to anoxia/ response to heat/ Glycolysis	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (NAD+) (phosphorylating) activity/ NAD+ binding/ NADP binding/ phosphate ion binding/ Oxidoreductase
55	gi|195608720	triosephosphate isomerase, cytosolic	*Zea mays*	178	21	8/4	7,72/ 25,217	5,34/ 30,0	5,32	up	1,61	up	glycolytic process	triose-phosphate isomerase activity
56	gi|28172915	cytosolic 3-phosphoglycerate kinase	*Zea mays*	440	28	16/5	5,01/ 31,663	5,73/ 30,0	2,94	up	0,56	down	glycolytic process	phosphoglycerate kinase activity/ ATP binding
101	gi|28172915	cytosolic 3-phosphoglycerate kinase	*Zea mays*	464	40	22/11	5,01/ 31,663	5,87/ 47,0	0,37	down	0,59	down	glycolytic process	phosphoglycerate kinase activity/ ATP binding/

Armazenamento de proteína														
30	gi|195658011	globulin-1 S allele precursor	*Zea mays*	335	12	20/4	6,16/ 50,275	5,38/ 25,0	3,07	up	3,83	up	-----	nutrient reservoir activity
46	gi|228310	globulin 2 ou globulin-1 s allele-like	*Zea mays*	719	28	71/11	6,16/ 50,234	9,20/ 27,0	4,87	up	1,52	up	-----	nutrient reservoir activity
48	gi|228310	globulin 2 ou globulin-1 s allele-like	*Zea mays*	784	28	50/10	6,16/ 50,234	8,58/ 28,0	3,28	up	1,85	up	-----	nutrient reservoir activity
55	gi|228310	globulin 2 ou globulin-1 s allele-like	*Zea mays*	220	11	6/4	6,16/ 50,234	5,34/ 30,0	5,32	up	1,71	up	-----	nutrient reservoir activity
67	gi|228310	globulin 2 ou globulin-1 s allele-like	*Zea mays*	234	19	7/6	6,16/ 50,234	6,37/ 34,0	3,02	up	0,52	down	-----	nutrient reservoir activity
68	gi|228310	globulin 2 ou globulin-1 s allele-like	*Zea mays*	256	19	14/6	6,16/ 50,234	6,03/ 34,0	3,31	up	3,29	up	-----	nutrient reservoir activity
70	gi|195658011	globulin-1 S allele precursor	*Zea mays*	240	17	8/6	6,16/ 50,275	6,71/ 34,0	0,11	down	0,27	down	-----	nutrient reservoir activity
Defesa e estresse celular														
14	gi|226507146	16.9 kDa class I heat shock protein 1	*Zea mays*	303	37	14/4	6,77/ 16,970	7,01/ 17,0	0,42	down	1,64	up	-----	Stress response
51	gi|226500748	uncharacterized protein LOC100272498 ou General stress protein 39	*Zea mays*	307	25	18/6	5,78/ 33,152	8,13/ 28,0	1,87	up	1,56	up	oxidation-reduction process	oxidoreductase activity
67	gi|226500748	uncharacterized protein LOC100272498 ou General stress protein 39	*Zea mays*	1053	63	49/18	5,78/ 33,152	6,37/ 34,0	3,02	up	1,87	up	oxidation-reduction process	oxidoreductase activity
Desconhecido														
86	gi|226507242	uncharacterized protein LOC100274379 ou Uncharacterized protein	*Zea mays*	274	30	13/9	6,30/ 38,770	7,34/ 40,0	7,65	up	2,17	up	-----	-----

Legenda: GM2: Maximus TLTG Viptera, evento Bt11 x MIR 162 x GA 21 e CG2: Maximus convencional (Syngenta Seeds)

[a] Número de acesso no NCBI das proteínas diferencialmente expressas considerando um *fold* de 1,5 ou 50% ($p < 0,05$)

[b] *Up* e *down regulation* (*fold change*: IM2DP - maior ou igual a 1,5; menor ou igual a 0,67)

[c] *Up* e *down regulation* (*fold change*: emPAI - maior ou igual a 1,5; menor ou igual a 0,67)

*Presença do spot 139 com proteína equivalente, mas não diferencialmente expressa ($1,5 < x > 0,67$)

**Spot 84 não apresentou proteína equivalente e foi excluído da análise

Todas as proteínas identificadas nos spots de cada comparação foram classificadas de acordo com suas principais funções biológicas, a partir das informações disponíveis nas bases de dados do Nacional Center for Biotechnology Information (NCBI), Universal Protein Resource (Uniprot), The Arabidopsis Information Resource (TAIR), bem como pela plataforma Blast2GO (aos níveis 2 ou 3) (Tabelas 16 e 17, Anexo A, Tabelas complementares 4 e 5), com exceção de algumas proteínas identificadas como hipotéticas, desconhecidas ou não caracterizadas que ainda não foram associadas a nenhuma outra proteína homóloga.

Na comparação 1 (GM1 x CG1), as proteínas diferencialmente expressas foram classificadas nos seguintes grupos funcionais: metabolismo (22%), energia (9%), síntese de proteína (17%), armazenamento de proteína (26%), defesa e estresse celular (17%) e crescimento e estrutura celular (9%) (Figura 16A). Um total de 13 proteínas se apresentaram *up regulation* e envolvidas principlamente na síntese de proteína (3 proteínas). Por sua vez, 10 proteínas foram *down regulation* e envolvidas principalmente no metabolismo (três proteínas) e armazenamento (quatro proteínas) (Figura 16B).

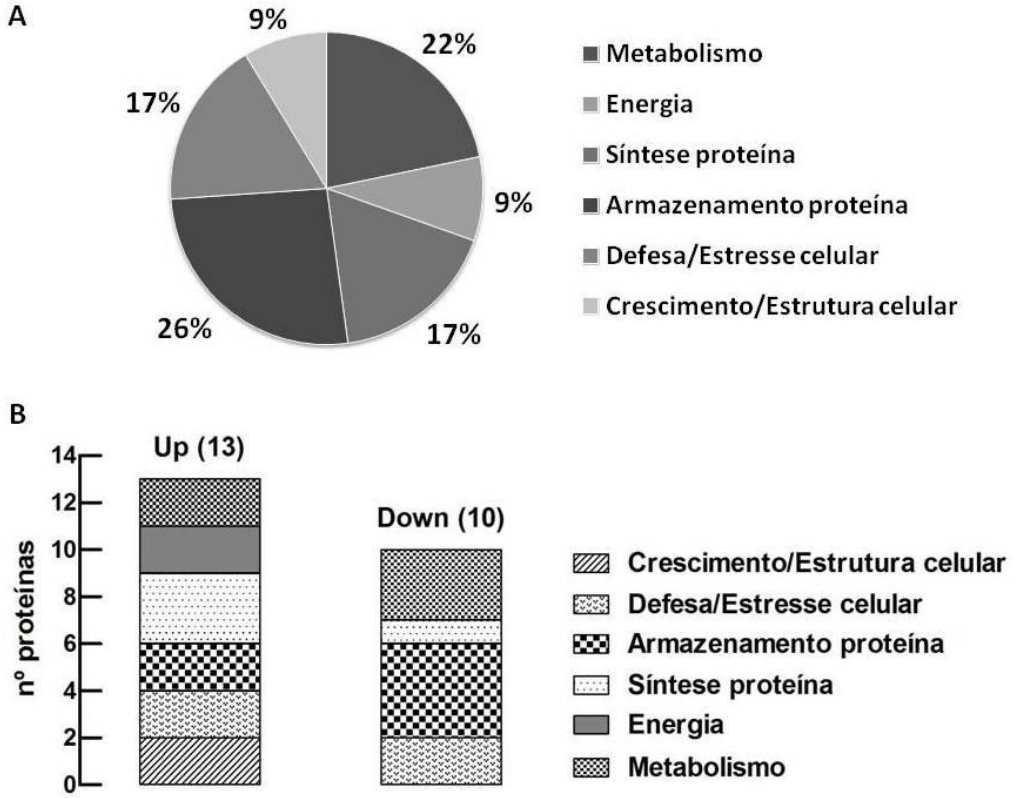

Figura 16 – Classificação funcional e distribuição das proteínas diferencialmente expressas da comparação 1 (GM1 x CG1) pela abordagem 2-DE

Na Figura 17, observa-se que as proteínas diferencialmente expressas da comparação 2 (GM2 x CG2) estão envolvidas nos grupos funcionais: metabolismo (24%), energia (24%), armazenamento de proteína (33%), defesa e estresse celular (14%) e desconhecido (5%) (Figura 17A). Deste total, 12 proteínas se apresentaram como *up regulation* e envolvidas principalmente no armazenamento de proteína (cinco proteínas) e defesa/estresse celular (três proteínas). Por outro lado, oito proteínas foram *down regulation* e classificadas funcionalmente como metabolismo (quatro proteínas), energia (três proteínas) e armazenamento (duas proteínas) (Figura 17B).

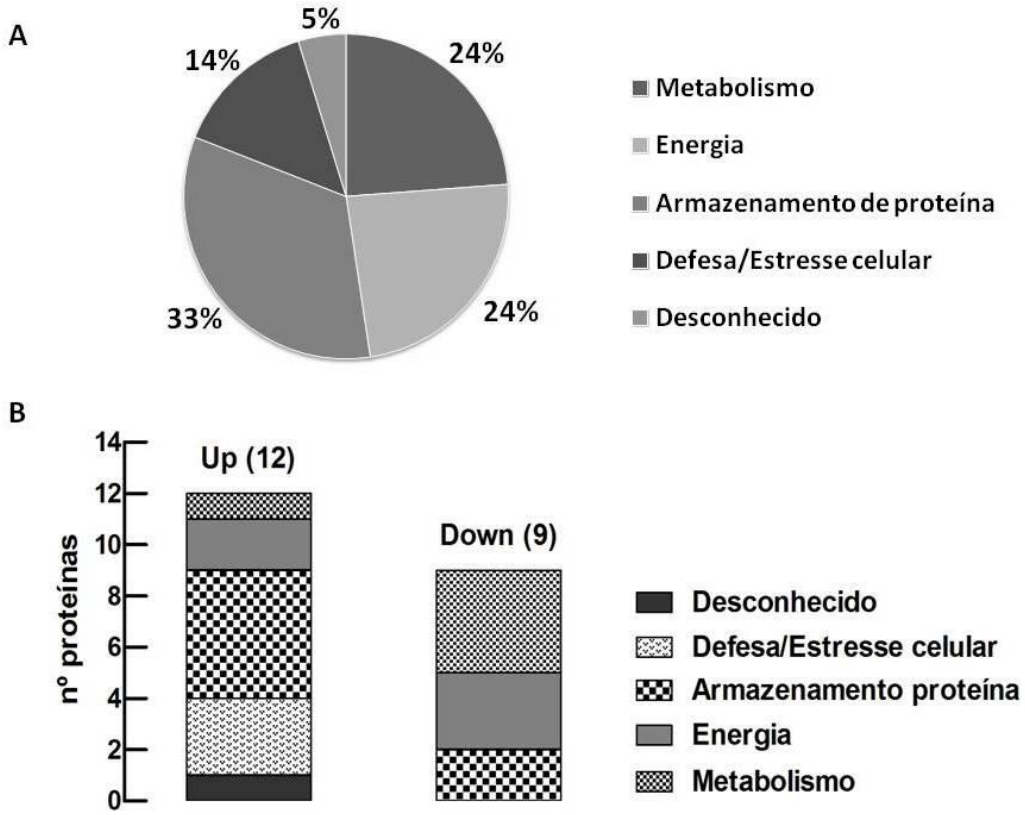

Figura 17 – Classificação funcional e distribuição das proteínas diferencialmente expressas da comparação 2 (GM2 x CG2) pela abordagem 2-DE

Pelas Figuras 16 e 17 é possível notar que as proteínas diferencialmente expressas identificadas na comparação 1 (GM1 x CG1) foram classificadas em mais níveis funcionais quando comparadas com as proteínas identificadas na comparação 2 (GM2 x CG2). Diferentemente da comparação 1, não foram observadas proteínas com função de crescimento e estrutura celular na comparação 2, no entanto, foi observada uma proteína ainda sem classificação nos principais bancos de dados internacionais. Similarmente para ambas as

comparações, um maior número de proteínas foi observado nas funções de metabolismo e armazenamento de proteínas.

4.2.5 Análise quantitativa do proteoma de milhos geneticamente modificados e convencionais genitores com abordagem *bottom up shotgun proteomics*

Como uma ferramenta complementar à análise 2-DE para detectar os possíveis casos de expressão diferenciada de proteínas ou grupos proteicos durante o processo de incorporação de novos genes, os extratos proteicos de sementes de milho GMs e suas CGs foram analisados utilizando uma abordagem *bottom up shotgun proteomics.*

As proteínas solúveis totais foram extraídas a partir de três réplicas biológicas idênticas e independentes para cada variedade de milho, digeridas com tripsina e os peptídeos resultantes foram analisados por nano-ESI-Q-TOF MS/MS, seguido de análise diferencial através da base de dados do NCBI.

Um total de 274 proteínas não redundantes foram identificadas nas amostras de sementes de milho da comparação 1 (GM1 x CG1). Após avaliação dos resultados e a adoção dos critérios de seleção (exclusão das proteínas sem confiança e ausentes em pelo menos duas réplicas biológicas de ao menos uma variedade de milho), 129 proteínas foram obtidas. Destas proteínas, 118 foram identificadas em ambas as amostras GM1 e CG1, ao passo que cinco proteínas foram identificadas somente na variedade GM1 e seis proteínas na variedade CG1 (Anexo C, Figura 4).

Para a comparação 2 (GM2 x CG2), um total de 250 proteínas não redundantes foram obtidas após análise em MS. Baseado nos critérios de seleção mencionados anteriormente, 138 proteínas foram identificadas e aceitas, sendo 127 proteínas encontradas em ambas as variedades GM2 e CG2, cinco proteínas identificadas somente na variedade GM2 e seis proteínas identificadas unicamente na variedade GC2 (Anexo C, Figura 5).

4.2.5.1 Identificação de proteínas diferencialmente expressas da abordagem *bottom up shotgun proteomics*

Para um melhor entendimento das funções biológicas das proteínas identificadas nas amostras de milhos GM1 e CG1 pela abordagem *bottom up shotgun*, das 129 proteínas obtidas, 13 proteínas foram identificadas como diferencialmente expressas ($p < 0,05$) e funcionalmente classificadas com base na plataforma Blast2GO, UniProt e EMBL-EBI (The European Bioinformatics Institute) em oito categorias, como metabolismo (8%), energia

(8%), síntese de proteína (8%), armazenamento de proteína (15%), defesa e estresse celular (23%), transporte (15%), crescimento e estrutura celular (8%) e desconhecido (15%) (Tabela 18, Figura 18A). Destas proteínas, seis foram *up regulation* (expressão GM1/CG1 ≥ 1,5) e sete proteínas foram *down regulation* (expressão GM1/CG1 ≤ 0,67) (Figura 18B).

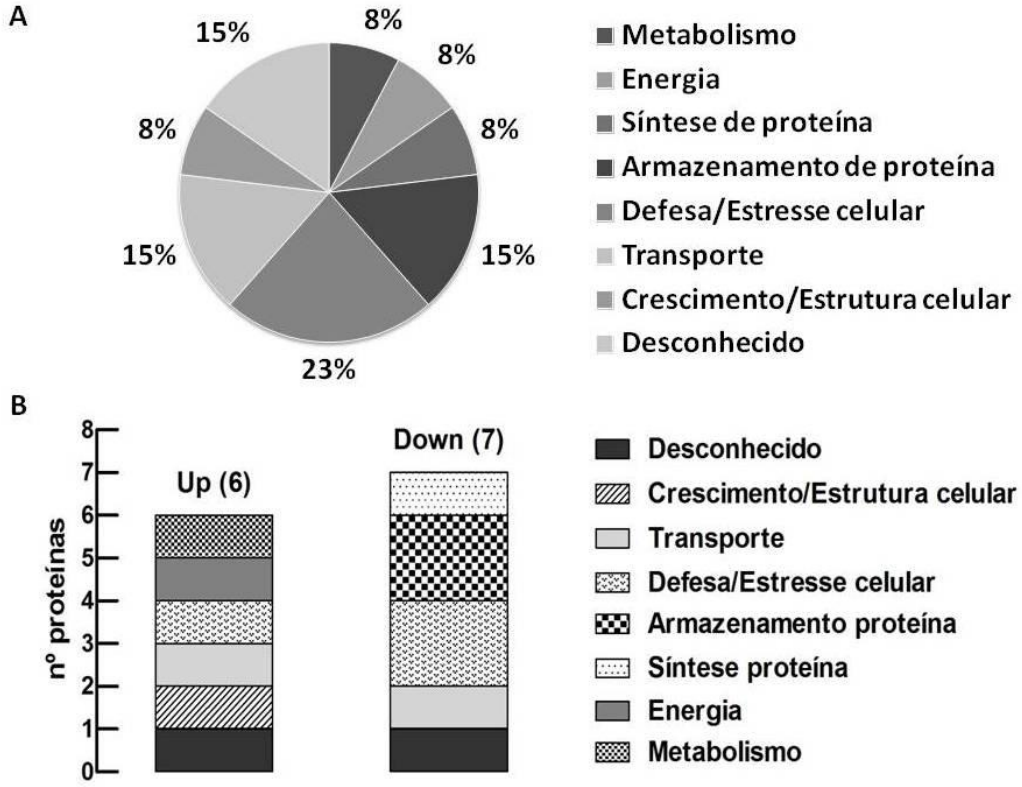

Figura 18 – Classificação funcional e distribuição das proteínas diferencialmente expressas da comparação 1 (GM1 x CG1) pela abordagem *bottom up shotgun proteomics*

Por sua vez, na comparação 2 (GM2 x CG2), das 138 proteínas obtidas, 16 proteínas foram identificadas como diferencialmente expressas ($p < 0,05$) e funcionalmente classificadas em seis categorias, sendo metabolismo (30%), energia (13%), armazenamento de proteína (13%), defesa e estresse celular (13%), crescimento e estrutura celular (25%) e desconhecido (6%) (Tabela 19, Figura 19A). Deste total, sete proteínas foram *up regulation* (expressão GM2/CG2 ≥ 1,5) e nove proteínas *down regulation* (expressão GM2/CG2 ≤ 0,67) (Figura 19B). Em contraste, quatro proteínas foram *up regulation* na categoria de defesa/estresse celular e quatro proteínas *down regulation* foram mais expressas na categoria metabolismo.

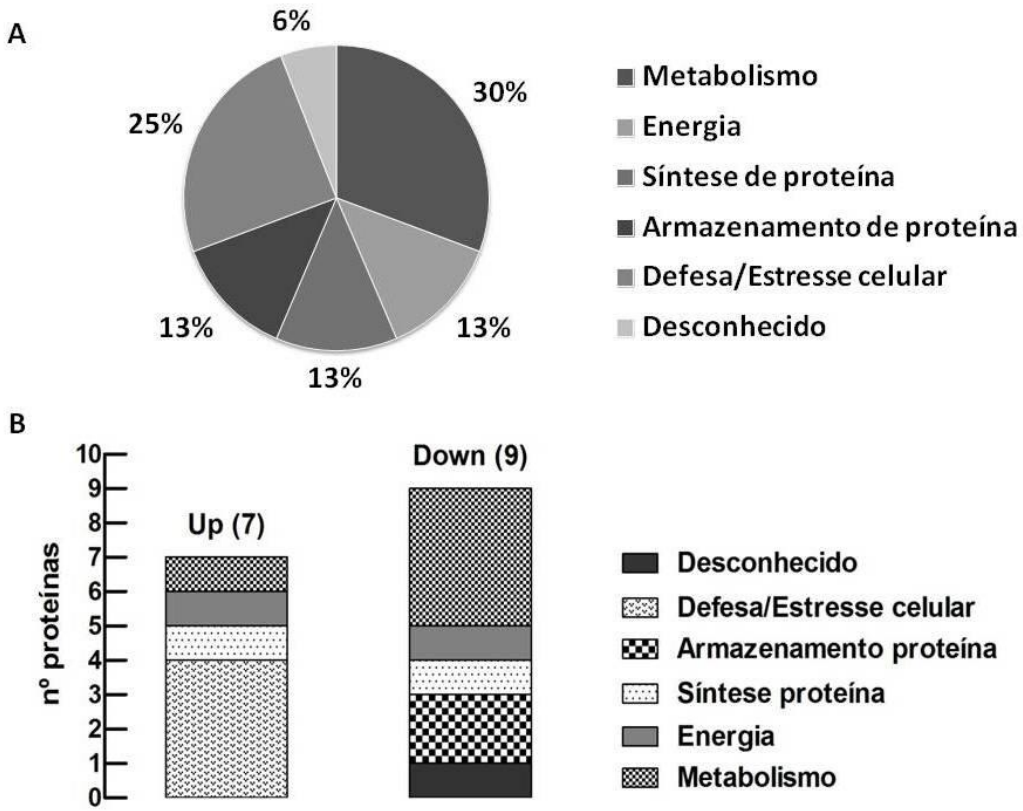

Figura 19 – Classificação funcional e distribuição das proteínas diferencialmente expressas da comparação 2 (GM2 x CG2) pela abordagem *bottom up shotgun proteomics*

As proteínas diferencialmente expressas identificadas na comparação 1 (GM1 x CG1) foram distribuídas em um maior número de níveis funcionais quando comparadas com as proteínas identificadas na comparação 2 (GM2 x CG2) (Figuras 18 e 19). Proteínas com função de crescimento/estrutura celular ou transporte não foram observadas na comparação 2 (GM2 x CG2). Em ambas as comparações, um grande número de proteínas foi observado na função de defesa e estresse celular.

Por fim, pelos critérios adotados na abordagem bottom up shotgun, não foi possível detectar nenhum produto de proteína derivado dos transgenes Cry1Ab, Vip3Aa20, PAT e mEPSPS nas cultivares de milho GM1 e GM2.

Tabela 18 – Proteínas diferencialmente expressas identificadas pela abordagem *bottom up shotgun proteomics* de sementes de milho geneticamente modificada (GM1) em comparação com sua convencional genitora (CG1)

Nº de acesso[a]	Nome da proteína	Espécie	Escore Mascot	Cobert. Seq.(%)	Peptídeos matched/ Nº Seq.	pI/PM (kDa) teórico	Expressão[b] GM1/CG1	Processo Biológico	Função Molecular
Metabolismo									
gi|5705939	endosperm ADP-glucose pyrophosphorylase subunit homolog ou glucose-1-phosphate adenylyltransferase large subunit 1, chloroplastic/amyloplastic	*Zea mays*	768	20	18/7	5,83/58,518	up	glycogen biosynthetic process/ starch biosynthetic process/ Starch biosynthesis	ATP binding/ glucose-1-phosphate adenylyltransferase activity/ Nucleotidyltransferase/ Transferase
Energia									
gi|162458207	enolase 1	*Zea mays*	1031	39	30/10	5,20/48,262	up	glycolytic process/ Glycolysis	magnesium ion binding/ phosphopyruvate hydratase activity
Síntese de proteína									
gi|1169476	elongation factor 1-alpha	*Nicotiana tabacum*	272	14	13/5	9,20/49,593	down	Protein biosynthesis	GTPase activity/ GTP binding/ translation elongation factor activity
Armazenamento de proteína									
gi|22284	vicilin-like embryo storage protein	*Zea mays*	2959	38	70/18	6,23/66,635	down	Oxygen transport	Nutrient reservoir activity/ iron ion binding/ heme binding/ oxygen binding
gi|3414855	globulin-1	*Zea luxurians*	875	22	22/5	8,87/27,638	down	-----	nutrient reservoir activity
Defesa e estresse celular									
gi|48093242	chitinase	*Zea mays subsp. mays*	981	40	17/7	8,92/30,040	down	carbohydrate metabolic process/ cell wall macromolecule catabolic process/ chitin catabolic process	chitinase activity/ chitin binding
gi|48093244	chitinase	*Zea mays subsp. mays*	1680	47	29/9	8,92/29,857	up	carbohydrate metabolic process/ cell wall macromolecule catabolic process/ chitin catabolic process	chitinase activity/ chitin binding
gi|5123910	HSP80-2	*Triticum aestivum*	171	3	4/2	4,92/80,533	down	protein folding/ response to stress	ATP binding

Transporte									
gi|1703374	ADP-ribosylation factor 1	*Chlamydomonas reinhardtii*	115	9	3/1	6,92/20,747	up	protein transport/ small GTPase mediated signal transduction/ vesicle-mediated transport/ ER-Golgi transport	GTP binding
gi|27461579	ATPase F1 alpha subunit, partial ou ATP synthase subunit alpha	*Ecdeiocolea monostachya*	460	9	6/3	5,74/44,698	down	ATP hydrolysis coupled proton transport/ ATP synthesis coupled proton transport	ATP binding/ proton-transporting ATPase activity, rotational mechanism/ proton-transporting ATP synthase activity, rotational mechanism
Crescimento e estrutura celular									
gi|135444	Tubulin beta-1 chain	*Avena sativa*	191	7	3/2	4,60/43,839	up	microtubule-based process/ GTP catabolic process/ protein polymerization/response to cadmium ion	GTPase activity/ GTP binding/ structural constituent of cytoskeleton
Desconhecido									
gi|194699098	unknown ou Uncharacterized protein	*Zea mays*	173	5	3/1	8,84/32,665	up	-----	ATP binding
gi|32488447	OSJNBa0004N05.4 protein	*Oryza sativa Japonica Group*	49	4	2/1	5,53/28,074	down	-----	-----

* As proteínas acima foram consideradas diferencialmente expressas ($p < 0,05$) se identificadas com pelo menos dois peptídeos, ao menos duas réplicas biológicas e em pelo menos uma das condições

* Escore, cobertura de sequência, peptídeos e nº de sequências são valores médios

Legenda: GM1: Tork TL, evento Bt 11 e CG1: Tork convencional (Syngenta Seeds)

[a] Número de acesso no NCBI das proteínas diferencialmente expressas considerando um *fold* de 1,5 ou 50% ($p < 0,05$)

[b] *Up* e *down regulation* (*fold change*: emPAI maior ou igual a 1,5; menor ou igual a 0,67)

Tabela 19 – Proteínas diferencialmente expressas identificadas pela abordagem *bottom up shotgun proteomics* de sementes de milho geneticamente modificada (GM2) em comparação com sua convencional genitora (CG2)

Número de acesso[a]	Nome da proteína	Espécie	Escore Mascot	Cobert. Seq.(%)	Peptídeos matched/ Nº seq.	pI/PM (kDa) teórico	Expressão[b] GM2/CG2	Processo Biológico	Função Molecular
Metabolismo									
gi|23664293	Brittle 2	*Zea mays subsp. mays*	475	15	10/5	5,54/52,922	down	glycogen biosynthetic process/ starch biosynthetic process/ starch biosynthesis	ATP binding/ glucose-1-phosphate adenylyltransferase activity/ nucleotidyltransferase
gi|242076294	hypothetical protein SORBIDRAFT_06g020720 ou malate synthase	*Sorghum bicolor*	145	4	2/1	6,40/63,270	down	glyoxylate cycle/ tricarboxylic acid cycle/ glyoxylate bypass	malate synthase activity/ transferase
gi|115465569	Os05g0573700 protein ou Ketol-acid reductoisomerase, chloroplastic	*Oryza sativa Japonica Group*	193	7	3/2	6,01/62,680	up	branched-chain amino acid biosynthetic process	ketol-acid reductoisomerase activity
gi|6136111	UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase	*Hordeum vulgare*	136	4	3/2	5,20/51,783	down	UDP-glucose metabolic process	UTP:glucose-1-phosphate uridylyltransferase activity/ nucleotidyltransferase/ transferase
gi|195605686	corticosteroid 11-beta-dehydrogenase isozyme 1	*Zea mays*	86	5	2/1	6,02/38,812	down	-----	oxidizes the glucocorticoid cortisol to the inactive metabolite cortisone
Energia									
gi|28172915	cytosolic 3-phosphoglycerate kinase	*Zea mays*	1091	44	31/10	5,01/31,663	down	glycolytic process/ glycolysis/ response to endoplasmic reticulum stress/response to arsenic-containing substance/response to cadmium ion	phosphoglycerate kinase activity/ATP binding
gi|2285877	pyruvate orthophosphate dikinase	*Eleocharis vivipara*	471	8	12/5	6,37/104,222	up	pyruvate metabolic process	ATP binding/ kinase activity/ metal ion binding/ pyruvate, phosphate dikinase activity
Síntese de proteína									
gi|162464000	60S acidic ribosomal protein P2B	*Zea mays*	47	20	2/1	4,22/11,693	up	translational elongation	protein complex binding/ structural constituent of ribosome/ ribonucleoprotein/ Ribosomal protein
gi|242080463	hypothetical protein SORBIDRAFT_07g002560 ou 60S acidic ribosomal protein P0	*Sorghum bicolor*	219	17	5/2	5,19/34,592	down	cytoplasmic translation/ ribosome biogenesis	large ribosomal subunit rRNA binding/ structural constituent of ribosome/ Ribonucleoprotein/ Ribosomal protein

Armazenamento de proteína									
gi|141603	Zein-alpha A20	*Zea mays*	96	14	3/1	8,52/26,395	down	-----	nutrient reservoir activity/ Seed storage protein/ Storage protein
gi|162458978	LOC542653 ou Legumin-like protein	*Zea mays*	160	16	3/2	6,23/38,283	down	-----	nutrient reservoir activity
Defesa e Estresse celular									
gi|22124	alcohol dehydrogenase 1	*Zea mays*	467	29	17/8	6,43/41,631	up	oxidation-reduction process/ response to hypoxia (baixo teor de O_2)/ response to cadmium ion/ response to salt stress	alcohol dehydrogenase (NAD) activity/ zinc ion binding/ oxidoreductase
gi|46200527	putative aldose reductase-related protein	*Zea mays*	49	1	2/1	6,35/65,612	up	-----	oxidoreductase activity
gi|223945515	unknown ou uncharacterized protein	*Zea mays*	52	5	2/1	5,73/22,859	up	-----	serine-type endopeptidase inhibitor activity
gi|226510357	antimicrobial peptide MBP-1 precursor	*Zea mays*	344	8	5/10	6,68/47,849	up	defense response to fungus	response to stress
Desconhecido									
gi|194703432	unknown ou uncharacterized protein	*Zea mays*	363	19	8/4	6,70/38,314	down	-----	-----

* As proteínas acima foram consideradas diferencialmente expressas ($p < 0,05$) se identificadas com pelo menos dois peptídeos, ao menos duas réplicas biológicas e em pelo menos uma das condições

* Escore, cobertura de sequência, peptídeos e nº de sequências são valores médios

Legenda: GM1: Tork TL, evento Bt 11 e CG1: Tork convencional (Syngenta Seeds)

[a] Número de acesso no NCBI das proteínas diferencialmente expressas considerando um *fold* de 1,5 ou 50% ($p < 0,05$)

[b] *Up* e *down regulation* (*fold change*: emPAI maior ou igual a 1,5; menor ou igual a 0,67)

4.2.6 Identificação de proteínas comuns entre as abordagens 2-DE e *bottom up shotgun proteomics*

Pela abordagem 2-DE, um maior número de proteínas diferencialmente expressas ($p < 0,05$) foi observado nas comparações 1 (GM1 x CG1) e 2 (GM2 x CG2) em relação à abordagem *bottom up shotgun proteomics*.

Na comparação 1 (GM1 x CG1), a abordagem 2-DE identificou significativamente 18 spots, nos quais foram identificadas 23 proteínas diferencialmente expressas por nano-ESI-Q-TOF MS/MS com sucesso. Em comparação com estes resultados, a abordagem *shotgun* foi capaz de detectar 13 proteínas diferencialmente expressas. Deste total, 32 proteínas diferencialmente expressas foram identificadas entre as duas abordagens, sendo que quatro proteínas foram comumente identificadas pelas duas técnicas proteômicas, corroborando os resultados encontrados e demonstrando a complementaridade de ambas as análises (Tabela 20).

Entre as proteínas comumente identificadas em ambas as abordagens, a proteína de armazenamento vicilin-like embryo storage protein apresentou expressão *down regulation* (*ratio* GM1/CG1 $\leq$ 0,67) e a proteína de crescimento e estrutura celular tubulin como *up regulation* (GM1/CG1 $\geq$ 1,5) nas duas abordagens proteômicas utilizadas. No entanto, na abordagem 2-DE, a proteína globulin-1 e a enzima ADP-glucose pyrophosphorylase se mostraram com expressão *up* e *down regulation*, respectivamente, o que contrasta com a expressão obtida pela abordagem *bottom up shotgun proteomics*.

Na comparação 2 (GM2 x CG2), 14 spots foram significativamente identificados pela abordagem 2-DE, nos quais foram identificadas 21 proteínas diferencialmente expressas por nano-ESI-Q-TOF MS/MS. Em comparação, a abordagem *shotgun* foi capaz de detectar 16 proteínas diferencialmente expressas. Deste total, 36 proteínas diferencialmente expressas foram identificadas entre as duas abordagens, sendo que apenas uma delas foi similarmente identificada pelas duas técnicas proteômicas (Tabela 20).

Dentre as 36 proteínas identificadas na comparação 2 (GM2 x CG2), a enzima cytosolic 3-phosphoglycerate kinase observada na eletroforese 2-DE (spots 14, 56 e 101) foi encontrada similarmente pela abordagem *shotgun* Esta enzima apresentou expressão *down regulation* (GM2/CG2 $\leq$ 0,67) e foi classificada no grupo funcional de energia (glicólise).

Tabela 20 - Proteínas similares entre as abordagens 2-DE e *bottom up shotgun proteomics* para a comparação 1 (GM1 x CG1) e comparação 2 (GM2 x CG2)

			Expressão GM1/CG1[b]			
Nº de acesso[a]	**Nome proteína**	**Espécie**	**2-DE**	***Shoot gun***	**Processo biológico**	**Função molecular**
Metabolismo						
gi|65331800	ADP-glucose pyrophosphorylase endosperm large subunit	*Zea mays*	down	up	glycogen biosynthetic process/ starch biosynthetic process	glucose-1-phosphate adenylyltransferase activity/ ATP binding
Armazenamento de proteína						
gi|22284	vicilin-like embryo storage protein	*Zea mays*	down	down	oxygen transport	nutrient reservoir activity/ iron ion binding/ heme binding/ oxygen binding
gi|3414845	globulin-1	*Zea mays*	up	down	-----	nutrient reservoir activity
Crescimento e estrutura celular						
gi|162460038	tubulin beta chain	*Zea mays*	up	up	microtubule-based process/GTP catabolic process/protein polymerization/ response to cadmium ion	GTPase activity/ GTP binding/ structural constituent of cytoskeleton
			Expressão GM2/CG2[b]			
Nº de acesso[a]	**Nome proteína**	**Espécie**	**2-DE**	***Shoot gun***	**Processo biológico**	**Função molecular**
Energia						
gi|28172915	cytosolic 3-phosphoglycerate kinase	*Zea mays*	down	down	glycolytic process/ glycolysis/ response to endoplasmic reticulum stress/ response to arsenic-containing substance/ response to cadmium ion	phosphoglycerate kinase activity/ATP binding

Legenda: GM1: Tork TL, evento Bt 11; CG1: Tork convencional; GM2: Maximus TLTG Viptera, evento Bt11 x MIR162 x GA21; CG2: Maximus convencional

[a] Número de acesso da proteína de acordo com o banco de dados do NCBI

[b] *Up* e *down regulation* (emPAI *fold change* de 1,5 ou 50% ($p < 0,05$): maior ou igual a 1,5; menor ou igual a 0,67)

5 DISCUSSÃO

5.1 Comparação de perfil proteico entre linhagens de milhos (*Zea mays* L.) obtidas por melhoramento clássico

5.1.1 Composição química de variedades Quality Protein Maize (QPM)

A composição química das variedades de milho com alta qualidade proteica (QPM) e a variedade convencional normal (CN) não apresentaram diferenças em relação aos teores de umidade, proteínas e lipídios. Em contraste com os resultados de Vasal (2005), os valores médios destes parâmetros não diferiram entre as variedades QPM e CN. Porém, diferenças significativas foram observadas para cinzas, fibras totais e carboidratos, no qual os valores médios destes parâmetros foram maiores para as variedades QPM em relação ao controle CN. Maiores teores de fibra total para variedade QPM em comparação com uma variedade normal também foram relatados por outros autores (PAES, BICUDO, 1995; OMAGE et al., 2009). Quanto aos micronutrientes, apenas o teor de cálcio não foi significativamente diferente entre as variedades estudas. Por sua vez, os valores médios de ferro, magnésio e zinco apresentaram diferença entre as variedades QPMs e CN, indicando a presença de diferenças genéticas inerentes entre as variedades para esses parâmetros (Tabela 3). Similarmente aos demais cereais, o milho possui baixos teores de minerais (PAES; BICUDO, 1995).

Por outro lado, como todos os parâmetros significativamente distintos se encontram dentro das faixas de variabilidade esperadas para a espécie (OECD, 2002), essas diferenças não são consideradas relevantes. As variações observadas podem ser atribuídas a fatores genéticos, fatores ambientais e/ou práticas agronômicas. Estudos prévios também se valeram da análise de composição nutricional para avaliar variedades de milho QPM em relação às variedades convencionais normais (VELOSO, 2004; GUIMARÃES et al., 2004; 2007).

A alta qualidade proteica das variedades QPM, relacionada com os altos teores de lisina e triptofano, foi evidenciada com a determinação dos teores de aminoácidos livres nestas amostras em comparação ao CN. Os resultados (em µg/g) mostraram um maior acúmulo ou aumento nos teores de lisina e triptofano nas variedades QPM em relação à variedade CN (Anexo A). Para o aminoácido livre lisina (LIS) houve um incremento de 51% (120,82 ± 1,07) na variedade QP1 em relação à variedade CN e um incremento de 100% (159,76 ± 4,38) para a variedade QP2 em relação à variedade CN (79,94 ± 7,77). Por sua vez, para o aminoácido livre triptofano (TRP) foi observado um incremento de 59% (53,34 ± 5,15) na variedade QP1 em relação à variedade CN e um aumento de 74% (58,21 ± 1,40) para as

variedade QP2 em relação à variedade CN (33,45 ± 1,12) (ANEXO A). Embora não realizada nesta pesquisa, através da análise de aminoácidos totais, estudos prévios têm observado esta característica comum nas variedades de milhos QPM, com incrementos nos teores de lisina e triptofano de 50 a 100% quando comparadas com variedades convencionais normais (PAES; BICUDO, 1995; GUIMARÃES et al., 1997; PACHECO et al., 1999; GAZIOLA et al., 1999; VELOSO et al., 2004; GUIMARÃES et al., 2004; 2007).

5.1.2 Perfil proteico de variedades *Quality Protein Maize* (QPM)

Os milhos QPMs são conhecidos há muitas décadas, por sua alta qualidade proteica em relação aos milhos convencionais normais (GUIMARÃES et al., 1997; PACHECO et al., 1999; VELOSO et al., 2004). A fim de detectar diferenças na expressão de proteínas totais de variedades de milho com alta qualidade proteica (*Quality Protein Maize* - QPM) e uma variedade convencional normal (CN) como controle, as abordagens 2-DE e *bottom up shotgun proteomics* foram utilizadas. Duas variedades QPMs (QP1 e QP2) foram comparadas entre si, bem como com um controle convencional normal (CN), totalizando três comparações distintas: (comparação 1) QP1 x QP2; (comparação 2) QP1 x CN e (comparação 3) QP2 x CN.

As proteínas identificadas como diferencialmente expressas ($p < 0,05$) foram classificadas em aproximadamente oito categorias biológicas, descritas como metabolismo, energia, síntese de proteína, armazenamento de proteína, defesa e estresse celular, transporte, crescimento e estrutura celular e desconhecido (Tabelas 6-11, Figuras 7-12). Destas oito categorias principais, as mais evidentes nas três comparações realizadas foram armazenamento, defesa/estresse celular, metabolismo e energia. Em concordância com estudos prévios, observou-se uma maior predominância de proteínas significativamente expressas nestas funções biológicas quando analisadas sementes de milho (KOMATSU et al., 2012; WANG et al., 2014; KIM et al., 2015).

Para o grupo funcional armazenamento, as proteínas globulin-1 e vicilin-like embryo storage foram identificadas em ambas as técnicas proteômicas empregadas neste estudo (2-DE e *bottom up shotgun*) nas diferentes comparações. A proteína globulin-1 apresentou expressão *up regulation* para a variedade QP2 nas comparações 1 (QP1 x QP2) e 3 (QP2 x CN). Por outro lado, a expressão *up regulation* foi observada na proteína vicilin-like embryo storage para a variedade QP1 na comparação 2 (QP1 x CN) (Tabela 12).

As proteínas globulin-1 e vicilin, pertencentes às globulinas da família 7S, são conhecidas por sua grande abundância e atividade no embrião de sementes de plantas

(NOURI, KOMATSU, 2010). Ricas em arginina e aminoácidos sulfurados (metionina e cisteína), estas proteínas são codificadas por um único gene polimórfico (Glb1), cuja expressão é específica do embrião e regulada pelo ácido abscísico (ABA) (BELANGER; KRIZ, 1989; 1991; KRIZ et al., 1990). São formadas durante a maturação das sementes, mas degradadas ao longo da germinação, proporcionando fontes de carbono e nitrogênio para o crescimento da planta (BELANGER; KRIZ, 1991).

Somente observada na técnica de eletroforese 2-DE, destaca-se a globulin-2, também pertencente a família das proteínas de reserva globulinas. Com a mesma função das proteínas acima, a globulin-2 se faz importante por ter sido identificada em inúmeros spots, bem como por haver apresentado valores de PM e/ou pI diferentes dos valores teóricos observados em bancos internacionais (comparação 1 - spots 48, 52 e 115; comparação 2 – spots 61 e 69 e comparação 3 – spots 67, 93 e 96). Sabe-se que algumas proteínas podem expressar diferentes isoformas para diversificar sua função (WANG et al., 2004), no entanto, ainda é desconhecido se todas possuem uma atividade definida na célula. Previamente, Koziol et al. (2012) avaliando sementes de trigo, relataram que proteínas pertencentes à família das globulinas podem sofrer processos pós-traducionais, como glicosilação, antes de serem armazenadas no embrião.

Outras proteínas de armazenamento de grande relevância para o milho são as proteínas pertencentes à família das zeinas (também conhecidas como prolaminas). As zeinas não foram identificadas na eletroforese 2-DE. Entretanto, a técnica *bottom up shotgun proteomics* identificou algumas delas nas três comparações diferentes (Tabelas 9-11). Somente na comparação 1 (QP1 x QP2) foi identificada como diferencialmente expressa a proteína gamma zein (γ-zein ou glutelin-2) como *up regulation*. Nas comparações 1 (QP1 x QP2) e 3 (QP2 x CN) foi identificada a proteína 27kDa storage protein, zein (conhecida como 27 kDa γ-zein), com expressão *up regulation* para a variedade QP2 em ambas as comparações. Por sua vez, nas comparações 1 (QP1 x QP2) e 2 (QP1 x CN) foi identificada a proteína zein-alpha A20 (α-zein A20) com expressão *down regulation* para a variedade QP1. Por fim, nas comparações 2 (QP1 x CN) e 3 (QP2 x CN) foi identificada a zein protein precursor (ou sulfur-rich zein) com expressão *down regulation* para as variedades QP1 e QP2, respectivamente. As proteínas zeínas, amplamente compostas de prolina e glutamina, são as principais proteínas de armazenamento do milho (SHEWRY et al., 1999), correspondendo a 70% das proteínas do endosperma (SCRAMIN et al, 2007). São proteínas heterogêneas solúveis em álcool e classificadas conforme sua estrutura em α, β, γ e δ-zeins (COLEMAN, LARKINS, 1999). Por serem essencialmente deficientes em lisina e triptofano, o acúmulo

destas proteínas nas sementes pode favorecer o armazenamento de proteínas de baixa qualidade em aminoácidos essenciais. No entanto, nem todas as formas de zeina são desfavoráveis. Sabe-se que no cromossomo 7S de variedades mutante opaco-2 e QPM, encontram-se genes altamente conservados para 16 e 27-kDa γ-zeins, em detrimento aos genes responsáveis pela síntese de α, β e δ-zeins. Um estudo prévio realizado por Wu et al. (2010) analisaram milhos opaco, QPM e convencional normal para elucidar esta afirmação. Os pesquisadores introduziram um transgene RNAi dominante na linhagem QPM (CM105Mo2) para eliminar a expressão de ambas as proteínas γ-zeins. Os resultados demonstraram que as γ-zeins são essenciais para restaurar a densidade dos corpos proteicos e interação de grânulos de amido em QPMs. O acúmulo destas proteínas pode favorecer a formação de uma estrutura vítrea e auxiliar na melhoria do endosperma da semente com um maior teor de lisina e triptofano (WU et al., 2010). Como esperado, proteínas da família α-zeins foram significativamente *down regulation* em milhos QPMs (19 kDa e 22 kDa α-zeins), mas as proteínas da família γ-zein (27 kDa) foram *up regulation*. Assim, como evidenciado pelo gel 1-DE (Figura 3), diferenças no padrão de bandas obtidas nas cultivares QP1, QP2 e CN, pode-se inferir que a alta qualidade proteica das cultivares QPM está relacionada com uma menor expressão nas bandas de 22 kDa (α-zeins) ou mesmo ausência de bandas entre 19 kDa (α-zeins) e maior expressão de γ-zeins (16 e 27 kDa).

Algumas proteínas relacionadas à defesa e estresse celular, e que podem contribuir para proteger as sementes de efeitos deletérios, foram identificadas por eletroforese 2-DE e/ou *bottom up shotgun*, de forma individual ou similarmente.

Na comparação 1 (QP1 x QP2) foram identificadas três proteínas chitinase com diferentes número de acesso no NCBI, mas todas com expressão down regulation nas duas técnicas proteômicas utilizadas (2-DE e *shotgun*). No ambiente, as plantas estão expostas a vários estresses bióticos e abióticos, que podem representar uma ameaça para sua sobrevivência e produtividade. No entanto, as plantas evoluíram uma sofisticada maquinaria molecular para detectar e contornar possíveis estresses (SINGH et al., 2016). Em resposta ao estresse biótico, a chitinase é uma enzima antifúngica, comumente presentes em tecidos vegetais, mesmo em plantas não produtora de quitina (PANDIT et al., 2010; WANG et al., 2014). Localizada no endosperma de sementes de milho, essa enzima inibe o crescimento fúngico, através da hidrólise da chitina, que é o maior componente da parede celular dos fungos. A hidrólise resulta no comprometimento da estrutura e lise celular, auxiliando na defesa da planta contra a infestação fúngica (CHANG et al., 1995; FERREIRA et al., 2007; WONG et al., 2010). Por sua vez, duas proteínas com atuação similar à chitinase foram

identificadas na abordagem *bottom up shotgun* das comparações 2 (QP1 x CN) e 3 (QP2 x CN) com expressaão down regulation. As proteínas ribossome-inativating protein 1 e 3 (RIP) são conhecidas por também desempenharem um papel protetor contra infestação fúngica em sementes de milho (FERREIRA et al., 2007; JIA et al., 2013). A presença de várias RIPs no endosperma é um indicador de resistência aos agentes patogênicos em sementes de milho (BASS et al., 1992; HEY et al., 1995). Estudo anterior tem demonstrado um efeito sinérgico entre as proteínas chitinase e RIP. A chitinase hidrolisaria a parede celular do fungo, permitindo a entradas das RIPs. Estas, por sua vez, atuariam na inativação dos ribossomos fúngicos (LEAH et al., 1991). No entanto, estas duas proteínas apresentaram expressão *down regulation* nas comparações onde foram identificadas, o que sugere que as variedades QPMs podem ser mais susceptíveis ao ataque fúngico quando comparadas à variedade convencional normal. Uma vez que poderiam atuar na resposta à presença de fungos ou de seus esporos latentes, a presença destas proteínas poderia ser considerada nas estratégias voltadas para fortalecer as defesas de sementes QPMs na prevenção contra ataque de patógenos durante a estocagem e germinação (JIA et al., 2013; WANG et al., 2014).

Outra proteína de defesa de grande evidência neste estudo é 16.9 kDa class I heat shock protein 1, identificada na comparação 2 (QP1 x CN) em ambas as técnicas proteômicas realizadas (2-DE e *shotgun*) com expressão *down regulation.* Em resposta a estresses abióticos, as plantas produzem várias biomoléculas chamadas chaperonas, que protegem as células contra efeitos adversos (SINGH et al., 2016). Uma classe das chaperonas são as heat shock proteins (HSP), proteínas que respondem a vários tipos de estresse, como oxidativo, baixas e altas temperaturas, salinidade, dessecação, irradiações, ferimento e metais pesados (SWINDELL et al., 2007; XU et al., 2011). Existem HSP de alto e baixo peso molecular (PM). A família das HSP de baixo PM (*small* HSP) está entre as mais encontradas nos vegetais e podem ser expressas em sementes ou em determinados estádios do desenvolvimento da planta (WANG et al., 2004). A ação das HSPs durante o estresse se baseia na regulação do enovelamento da proteína, translocação através da membrana e degradação de proteínas.

Por sua vez, na abordagem *shotgun*, uma outra proteína de resposta aos estresses abióticos de grande relevância é a late embryogenesis abundant (LEA), que apresentou expressão *down regulation* para as comparações 1 (QP1 x QP2) e 2 (QP1 x CN) e *up regulation* para a comparação 3 (QP2 x CN). A LEA é encontrada em diferentes organelas da célula das plantas (citoplasma, retículo endoplasmático, mitocôndria e núcleo), que protege outras proteínas de agregação, devido a estresse osmótico ou à dessecação associada à baixa

temperatura (GOYAL et al., 2005). São particularmente responsáveis pela proteção das membranas mitocondriais aos efeitos da desidratação (TOLLETER et al., 2010), mas também podem auxiliar na estabilidade de proteínas, proteção de atividade enzimática, ligação de íons metais, proteção do DNA ou função antioxidante. Embora a proteína LEA possa atuar por mecanismos distintos dos observados na HSP, estudo recente tem associado estas duas proteínas não exclusivamente à resposta à dessecação, mas também com uma provável influência na germinação de sementes de milho (WANG et al., 2014). Com os resultados obtidos, é possível inferir que a variedade QP1 é mais susceptível a estresses abióticos em comparação com a variedade QP2.

Com relação aos processos metabólicos primários da sementes, uma grande proporção de proteínas e/ou enzimas identificadas como diferencialmente expressas nos milhos QP1, QP2 e CN foram associadas ao metabolismo de aminoácidos, síntese de carboidratos/polissacarídeos, metabolismo de amido, metabolismo de lipídeos, ciclo do ácido cítrico, processo metabólico do piruvato e glicólise (Tabelas 9-11). A predominância dos grupos funcionais metabolismo e energia, com inúmeras vias representadas, também foi relatada em estudos anteriores com variedades QPMs (KOZIOL et al., 2012; GUO et al., 2012; JIA et al., 2013; KIM et al., 2015; LI et al., 2016).

Uma importante enzima envolvida na via glicolítica (EC 1.2.1.12) é a glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH). Esta enzima foi identificada com expressão *down regulation* em ambas as abordagens proteômicas (2-DE e *bottom up shotgun*) na comparação 3 (QP2 x CN). A GAPDH é uma enzima chave, que catalisa o primeiro passo da via da glicólise, através da conversão reversível de glyceraldehyde-3-phosphate em 1,3-bisphosphoglycerate pela redução de NAD+ para NADH. É essencial para a manutenção dos níveis de ATP celular e metabolismo de carboidratos nas células. Previamente, a GAPDH foi relacionada com a remoção de espécies reativas ao oxigênio (ROS) e tolerância ao estresse (HANCOCK et al. 2005; KIM et al., 2015). Provavelmente, o baixo acúmulo desta enzima na variedade QP2, possa estar relacionado a sua atuação no metabolismo de carboidrato e síntese de amido.

A proteina putative uncharacterized Sb04g009130 de sorgo (*Sorghum bicolor*) foi similarmente identificada na comparação 1 (QP1 x QP2) com expressão *up regulation* em ambas as técnicas proteômicas. No entanto, esta proteína ainda não foi caracterizada e suas informações como processo biológico e função molecular são desconhecidas.

A última proteína diferencialmente expressa e identificada pelas duas abordagens proteômicas realizadas foi a uncharacterized protein LOC100277287. Esta proteína foi

observada na comparação 3 (QP2 x CN) com expressão down regulation para a variedade QP2. Relacionada ao grupo funcional de metabolismo, possui as características de atuar nos processos metabólicos em atividade catalítica. No entanto, informações mais atualizadas sobre esta proteína ou sua função é desconhecido. Por outro lado, a uncharacterized protein LOC100277287 foi identificada em dois spots diferentes (spots 67 e 115) na 2-DE, como também observado na proteína de armazenamento globulin-2. Provavelmente estas proteínas com diferentes isoformas são originárias de genes da mesma família e/ou de uma duplicação do gene (OSTERGAARD et al., 2002). Algumas das proteínas que se encontram em múltiplos spots apresentaram características diferentes umas das outras, seja em seu PM, pI ou em ambos. Contudo, discrepâncias no pI e PM podem ser devido à modificação pós-traducional, síntese de proteínas, ou degradação (KIM et al., 2015)

Por fim, neste estudo, o maior número de proteínas diferencialmente expressas detectadas pela abordagem *bottom up shotgun* demonstra a maior eficiência da técnica quando comparada com eletroforese 2-DE, para detectar possíveis alterações no proteoma de variedades com linhagens diferentes. No entanto, como a maioria das proteínas identificadas nas variedades de milho estudadas foram somente detectadas por uma das técnicas, os resultados desta pesquisa indicam que ambas as abordagens proteômicas podem ser utilizadas complementarmente (YIN et al., 2014).

5.2 Avaliação da segurança alimentar de sementes de milho geneticamente modificadas (GM) e suas convencionais genitoras (CG)

5.2.1 A equivalência substancial entre variedades GM e CG

Nos processos de avaliação de inocuidade das transformações genéticas de plantas, sobretudo aquelas empregadas na alimentação humana e animal, é imprescindível a análise da composição química de grãos/sementes (por exemplo, milho) ou da planta íntegra (por exemplo, plantas forrageiras). Uma vez realizada a composição química das principais frações das amostras é possível identificar a equivalência substancial, como o primeiro indicador de similaridade entre o vegetal convencional e o geneticamente modificado. Essa comparação, no entanto, deve ser realizada preferencialmente entre a planta genitora e seu correspondente GM (OECD, 2002; HARRIGAN et al., 2010; HERMAN, PRICE, 2013).

Algumas diferenças foram observadas nos componentes nutricionais entre os grupos de milho estudados GM1 x CG1 (comparação 1) e GM2 x CG2 (comparação 2). Os teores de umidade, proteínas, ferro e zinco não apresentaram diferença significativa entre as variedades pertencentes às duas comparações realizadas. Por sua vez, os valores médios de lipídeos, cinzas, fibras totais, carboidratos, cálcio, magnésio e ácidos graxos significativamente diferiram. Resultados semelhantes e que corroboram com esta pesquisa também foram relatados em estudos prévios para variedades de milho geneticamente modificados (GM) em comparação com suas convencionais genitoras (CG) (HARRIGAN et al., 2010; VENKATESH et al., 2015; RAYAN, ABBOTT, 2015).

Uma vez que todos os valores médios se encontram dentro dos limites de referência (OECD, 2002) e variabilidade esperadas da espécie, essas diferenças não foram consideradas biologicamente relevantes (HARRIGAN et al., 2010). Desta forma, os macros e micronutrientes analisados demonstraram que a qualidade nutricional dos milhos geneticamente modificados (GM1 e GM2) foi substancialmente equivalente às suas variedades convencionais genitoras (CG1 e CG2).

As diferenças entre as variedades analisadas existem, porém não podem ser atribuídas somente à introdução do gene exógeno na modificação genética. Diferenças na composição nutricional de milhos são mais provavelmente relacionados com práticas de retrocruzamento ou variabilidade ambiental (geografia, clima e práticas agronômicas) do que a característica GM, cujo impacto se mostrou insignificante (HARRIGAN et al., 2010; BERMAN et al., 2011; ZHOU et al., 2011a,b; HARRIGAN, HARRISON, 2012; HARRISON et al., 2013a,b).

5.2.2 Perfil proteico de variedades GM e CG

A análise quantitativa do proteoma de milhos geneticamente modificados (GM1 e GM2) em comparação com suas linhas convencionais genitoras (CG1 e CG2), através das abordagens 2-DE e *bottom up shotgun proteomics* foi realizada para detectar a existência de possíveis efeitos indesejáveis, gerados durante a inserção de genes por recombinação genética. Estas abordagens têm sido utilizadas isolada ou complementarmente na análise comparativa do proteoma de culturas GM e não GM, bem como respostas fisiológicas de plantas a fatores de estresse biótico e abiótico (ZOLLA et al., 2008; COLL et al., 2011; KOMATSU et al., 2012; WANG et al., 2014; YIN et al., 2014).

Uma notável diferença no perfil de proteínas diferencialmente expressas identificadas nas variedades GM e CG é a ocorrência de proteínas relacionadas com os processo biológicos de metabolismo, energia, armazenamento e defesa/estresse celular (Tabelas 16-19, Figuras 16-19).

A predominância das categorias funcionais metabolismo e energia, com numerosas vias representadas, também foi relatado em estudos anteriores (MÉCHIN et al., 2004, 2007; MACIEL et al., 2014; YIN et al., 2014; MORO et al., 2015). A análise de anotações GO e a classificação funcional para os conjuntos de proteínas diferencialmente expressas a partir das análises de espectrometria de massa 2-DE e *shotgun* confirmam uma grande prevalência de proteínas e/ou enzimas relacionadas ao metabolismo de aminoácidos (aspartate aminotransferase em GM1 x CG1 e uncharacterized protein LOC100382989 e ketol-acid reductoisomerase em GM2 x CG2) síntese de polissacarídeos (sorbitol dehydrogenase homolog 1 em GM1 x CG1 e glucose and ribitol dehydrogenase em ambas as comparações 1 e 2), síntese de amido (sucrose synthase 1 e ADP-glucose pyrophosphorylase em GM1 x CG1 e granule-bound starch synthase precursor, starch synthase, granule-bound starch synthase, brittle 2 e UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase em GM2/CG2); metabolismo de hormônio (corticosteroid 11-beta-dehydrogenase em GM2 x CG2); ciclo do ácido cítrico (malate synthase em GM2 x CG2) e glicólise (fructose-bisphosphate aldolase e enolase 1 em GM1 x CG1; 3-phosphoglycerate kinase, triosephosphate isomerase e pyruvate orthophosphate dikinase em GM2/CG2 e glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase em ambas as comparações)

O milho é um organismo autotrófico que necessita de água, luz, minerais e ar para sintetizar compostos orgânicos e crescer. No entanto, o endosperma é um órgão heterotróficos, com grande parte de suas proteínas suportando processos metabólicos

primários e a síntese de moléculas complexas, tais como nucleotídeos, aminoácidos, carboidratos, lipídeos e metabólitos secundários (MÉCHIN et al., 2004). Devido a esses fatores, muitas enzimas envolvidas nestes processos foram identificadas neste estudo. A síntese de aminoácidos é fundamental para a sobrevivência da célula. Eles são necessários à síntese de proteínas, bem como vitaminas, nucleotídeos e fitormônios. As vias de síntese de aminoácidos podem ser agrupadas em várias categorias: reações simples, aminoácidos de cadeia ramificada, aminoácidos aromáticos, treonina/lisina e serina/glicina (MÉCHIN et al., 2004). Três proteínas diferencialmente expressas que participam do metabolismo de aminoácidos foram descritas a seguir devido a sua relevância no metabolismo.

No metabolismo de amido, devido a sua importância em sementes de milho, duas enzimas devem ser destacadas, a sucrose synthase 1 (SUS 1) e ADP-glucose pyrophosphorylase. O desenvolvimento de sementes requer um grande afluxo de carbono e energia sob a forma de sacarose, o principal tipo de carbono assimilado fotossinteticamente e translocado da folha via floema. A SUS deve ser enzimaticamente clivada em hexoses como um passo inicial na biossíntese de produtos finais de armazenamento de sementes, como amido, proteínas, e triacilglicerídeos. A SUS e suas isoformas são componentes-chave neste processo, catalisando a clivagem da sacarose translocada e produzindo UDP-glicose e frutose (WINTER; HUBER, 2000). Os produtos clivados pela SUS são convertidos em glicose-1-fosfato pela ação da hexoquinase, fosfoglucomutase, fosfoglucoisomerase e UDP-glicose pirofosforilase (UGPase). Do ponto de vista fisiológico, a maior produtividade de grãos parece estar associada à síntese e acúmulo de amido e a atividade da SUS (LI et al., 2013). Esta enzima está envolvida na via do metabolismo do amido e sacarose (E.C. 2.4.1.13).

Por sua vez, a enzima ADP-glucose pyrophosphorylase (AGPase) foi similarmente encontrada nas abordagens 2-DE e *bottom up shotgun proteomics* nas amostras das sementes de milho da comparação 1 (GM1 e CG1) como uma proteína chave na síntese de amido (Tabela 20). No endosperma da semente, o polissacarídeo de armazenamento mais comum é o amido. Encontrado tanto na forma de amilose quanto amilopectina, é sintetizado a partir de ADP-glicose, que por sua vez, é sintetizada a partir de glicose-1-fosfato e ATP em reação catalisada pela enzima AGPase (SPIELBAUER et al., 2006; FEDOSEJEVS et al., 2014). Em plantas, esta enzima é heterotetrâmera, conformada por duas subunidades grandes e duas pequenas, que são codificadas pelos genes shrunken-2 (Sh2) e brittle-2 (Bt2), respectivamente (SIVAK, PREISS, 1994; MÉCHIN et al., 2004). Encontra-se no embrião e endosperma de sementes (amiloplasto) e/ou em folhas (cloroplasto). Desempenha um papel importante na síntese de amido (E.C. 2.7.7.27). As evidências da importante ação da AGPase na síntese de

amido foi primeiramente descrito em milho mutante shrunken-2, que possui baixo conteúdo de amido no grão maduro e baixa concentração dessa enzima em comparação ao milho normal (TSAI; NELSON, 1966). Em contraste, esta enzima apresentou-se *down regulation* na técnica em 2-DE e *up regulation* na técnica *shotgun* para a variedade GM1 em comparação com sua linha isogênica CG1.

A enzima cytosolic 3-phosphoglycerate kinase, identificada similarmente nas abordagens 2-DE e *shotgun proteomics* da comparação 2 (GM2 x CG2), está relacionada com a via metabólica da glicólise e fixação de carbono de organismos fotosintéticos (E.C. 2.7.2.3). Esta enzima catalisa a transferência do grupo fosfato do ATP para a formação do composto 1,3-bisfosfoglicerato e ADP. A fosfoglicerato quinase também atua na segunda fase da glicólise, liberando um ATP durante a formação do piruvato (MÉCHIN et al., 2004; MORO et al., 2015). Quanto a sua expressão, esta enzima foi *down regulation* em amostras GM2 quando comparadas com amostras CG2.

O armazenamento de proteínas também foi uma classificação funcional com um grande número de proteínas identificadas nas abordagens proteômicas utilizadas neste estudo. Na comparação 1 (GM1 x CG1) as proteínas identificadas nesta categoria foram vicilin-like embryo storage protein, globulin-1 e 2. Por outro lado, na comparação 2 (GM2 x CG2) as proteínas globulin-1S allele precursor; globulin-2, zein-alpha A20 e legumin-like protein foram identificadas. As proteínas de armazenamento são as proteínas mais comumente identificadas em sementes de plantas. Elas fornecem uma parte importante da nutrição necessária para a germinação de sementes e crescimento de plântulas (TAN-WILSON; WILSON, 2012; WANG et al., 2014). Estudos prévios têm observado o acúmulo e utilização destas proteínas ao longo do desenvolvimento de sementes através da análise proteômica (GALLARDO et al., 2007; HUANG et al., 2012; WANG et al., 2014).

Dentre todas as proteínas encontradas na função biológica de armazenamento, as proteínas globulin-1 e vicilin-like embryo storage protein foram similares na comparação 1 (GM1 x CG1) entre as duas técnicas proteômicas utilizadas nesta pesquisa (eletroforese 2-DE e *bottom up shotgun proteomics*). Elas apresentaram expressão *up* e/ou *down regulation* (Tabela 20). Estas proteínas são conhecidas proteínas de grande abundância e atividade no embrião de sementes de plantas. Ricas em arginina, estas proteínas são codificadas por um único gene polimórfico (Glb1), cuja expressão é específica do embrião e regulada por ABA (BELANGER; KRIZ, 1989; 1991; KRIZ et al., 1990). São formadas durante a maturação das sementes, mas degradadas ao longo da germinação, proporcionando fontes de carbono e nitrogênio para o crescimento da planta (BELANGER; KRIZ, 1991). Em relação à

abordagem proteômica 2-DE, Xiong et al. (2014) demonstraram que a proteína vicilina e/ou globulin-1 pode interferir negativamente na análise de mapas proteicos de mono (milho) e dicotiledôneas (soja e ervilha), devido à sua grande abundância e composição complexa, o que reduziria consideravelmente a resolução dos spots de interesse. Em outro estudo prévio com farinha de milho, a vicilina foi observada em seis isoformas diferentes, com massa molecular semelhante e distintos pIs (6,1 - 6,7) (FASOLI et al., 2009). Segundo os autores, esta pode ser uma possível proteína alergênica de milho. Contudo, o número de indivíduos utilizados no estudo foi muito pequeno e esta mesma constatação de alergenicidade em milhos não tem sido observada em estudos atuais. Por outro lado, Satoh et al. (2011) analisaram possíveis proteínas alergênicas (RAG2, glioxalase 1, globulin-like 19, 52 e 63 kDa) encontradas em arroz GM e não GM através de técnicas proteômicas e Western blotting (*immunoblotting*). Os autores não encontraram diferenças significativas na expressão destas proteínas entre as duas variedades, indicando que não ocorreram alterações oriundas da modificação genética.

Algumas proteínas de armazenamento identificadas nas comparações 1 (GM1 e CG1) exibiram PM e/ou pI experimental diferente dos valores teóricos na abordagem 2-DE (Tabela 16). Resultados semelhantes também foram encontrados na comparação 2 (GM2 x CG2) (Tabela 17) e em estudos proteômicos anteriores com plantas geneticamente modificadas de milho, arroz e colza (ZOLLA et al., 2008; COLL et al., 2011; GONG et al., 2012; WANG et al., 2012; LIU et al., 2015). Em sementes, parece que as proteínas de armazenamento são as mais susceptíveis a sofrerem alteração pela inserção do transgene. Possivelmente isso ocorre devido à inserção aleatória no genoma da planta, que poderia então inibir a expressão do gene e, consequentemente, da proteína a ser sintetizada (LIU et al., 2015). Estes resultados contrastantes sugerem que um evento GM pode afetar a síntese de proteínas e a modificação pós-traducional (LIU et al., 2015).

As proteínas de defesa ou reposta ao estresse também representaram uma grande parte das proteínas diferencialmente expressas identificadas pelas técnicas 2-DE e *bottom up shotgun proteomics*, porém não de forma combinada ou similar. As proteínas jasmonate-induced protein (em 2-DE), chitinase e HSP80-21 (em *shotgun*) foram observadas na comparação 1 (GM1 x CG1). Por sua vez, na comparação 2 (GM2 x CG2), foram identificadas as proteínas 16.9 kDa class I heat shock protein 1 (em 2-DE), putative aldose reductase-related protein e antimicrobial peptide MBP-1 precursor (*shotgun*). Em ambas as comparações (GM1 x CG1 e GM2 x CG2), a proteína general stress protein 39 e a enzima alcohol dehydrogenase foram identificadas pela eletroforese 2-DE.

As plantas estão expostas às constantes mudanças e estresses e, por sua vez, devem interpretar e responder a cada um deles. Os estresses à seca, inundação, altas e baixas temperaturas, agentes químicos e patógenos interconectam diversos efeitos nas plantas, resultando na perturbação de sua homeostase proteica (PARK; SEO, 2015). As heat shock protein (HSPs) são proteínas envolvida em muitos processos celulares, incluindo o dobramento, translocação através da membrana e degradação de proteínas (WANG et al., 2004). Uma HSP de alto peso molecular (80 kDa) e outra de baixo peso molecular (16,9 kDa) foram observadas nas amostras da comparação 1 (GM1 x CG1) e comparação 2 (GM2 x CG2), respectivamente. As HSPs (de baixo ou alto PM) atuam como chaperonas e são conhecidas por reparar e auxiliar na renaturação de proteínas danificadas pelo estresse, bem como proteger a célula contra os efeitos do estresse (WEHMEYER et al., 1996; SUN et al., 2002; HUANG et al., 2012).

A enzima alcohol dehydrogenase, integrante das enzimas glicolíticas e codificada pelo gene Adh, é caracterizada em várias famílias de plantas. Localizada no citoplasma, esta enzima está ligada a processos metabólicos e apresenta função oxidoredutase, seja pela atividade da enzima álcool desidrogenase (NAD) e/ou ligação com íon zinco. Esta enzima catalisa a transferência de um H+ da coenzima NADH, a uma grande variedade de aldeídos alifáticos e cetonas (MURAKAMI et al., 1981). As mudanças metabólicas decorrentes de mecanismos de defesa das plantas a estresse biótico e abiótico podem ser verificadas por meio da atividade desta enzima, já que os polimorfismos estão mais perto da expressão fenotípica final do que os polimorfismos de DNA (TORGGLER et al., 1995). Esta enzima está relacionada à inúmeras vias metabólicas, como glicólise e gliconeogênese, metabolismo de drogas – citocromo P450, metabolismo de xenobióticos pelo citocromo P450, degradação de naftaleno, cloroalcanos, cloroalquenos e de ácidos graxos, metabolismo da glicina, serina, treonina, tirosina e retinol (E.C. 1.1.1.1). Neste estudo, a expressão diferenciada da enzima álcool desidrogenase foi identificada em ambas as comparações (GM1 x CG1 e GM2 x CG2) de forma *up regulation*.

Por fim, a última proteína comumente identificada na comparação 1 (GM1 x CG1) em ambas as técnicas proteômicas (2-DE e *shotgun*) foi a tubulin β chain, classificada funcionalmente como crescimento e estrutura celular. A tubulina é uma proteína composta por dois polipeptídeos, α- e β-tubulina, com PM de aproximadamente 50 kDa e uma sequência altamente conservada. A tubulina é a principal proteína constituinte dos microtúbulos, os quais participam ativamente da orientação e movimentação dos cromossomos durante a divisão celular (anáfase), composição do citoesqueleto, transporte intracelular e segregação do

DNA (MAYER; JÜRGENS, 2002). Estudos prévios tem demonstrado a ação de herbicidas sobre a polimerização da tubulina em plantas não resistentes. O complexo herbicida-tubulina inibe a polimerização dos microtúbulos, levando à desconfiguração física e perda de função. Em consequência, o fuso mitótico não ocorre, acarretando a falta de alinhamento e separação dos cromossomos durante a mitose. A perda de microtúbulos induzida pela presença de herbicida pode causar entumescimento na extremidade de raízes, impedindo que os tecidos meristemáticos se dividam e a planta cresça (APPLEBY; VALVERDE; 1989; ANTHONY et al., 1998; SENSEMAN, 2007). Assim, neste estudo, a tubulin beta chain mostrou-se mais expressa (*up regulation*) em plantas GM que convencionais genitoras (CG1).

Até o momento, nenhum estudo utilizando abordagens proteômicas em plantas transgênicas têm levantado qualquer novo problema de segurança e esta pesquisa não muda este paradigma. Nas sementes de milho geneticamente modificadas (GM1 e GM2), nenhuma proteína nova foi detectada, tais como alergênicas ou tôxicas, quando comparadas às sua linhas convencionais genitoras (CG1 e CG2).

Interessantemente, nenhum produto das proteínas Cry1Ab/AC, Vip3Aa20, mEPSPs e PAT foram identificados pela abordagem eletroforética 2-DE ou *bottom up shotgun proteomics*. O intento de encontrar as proteínas exógenas utilizadas na recombinação genética através da eletroforese 2-DE foi almejado por Ruebelt et al. (2006a) e Albo et al. (2007) para a proteína Bt em milho transgênico e Corpillo et al. (2004) em tomate GM (nptII), porém ambos sem sucesso. Provavelmente isto esteja relacionado ao próprio procedimento de extração de proteína total utilizado na análise proteômica e o conteúdo de proteína Bt presente no milho GM estar abaixo do limite de detecção (LOD) (ALBO et al., 2007; ZOLLA et al., 2008; WANG et al., 2012).

O fato de que pequenas diferenças tenham ocorrido entre as duas comparações (CG1 x GM1 e CG2 x GM2), ou seja, poucos spots diferencialmente expressos selecionados na eletroforese 2-DE, podem ser explicados pela hipótese de que o processo de inserção de genes tenha causado efeitos moderados no perfil proteico das sementes de milho avaliadas. O que também pode ser constatado pela composição química das amostras, bem como pela abordagem *bottom up shotgun proteomics*, onde as proteínas diferencialmente expressas foram identificadas em um menor número, comprovando a similaridade entre as amostras GMs e CGs.

A comparação de perfis proteicos de sementes de milho GM e não GM por Zolla et al. (2008) também mostrou pequenas alterações devido a introdução de genes exógenos. No entanto, comparações feitas para analisar o efeito do ambiente no mapa proteico das amostras,

apresentou um maior números de spots diferencialmente expressos (100 e 78 em WT06 x WT05 e T06 x T05, respectivamente), concluindo que o ambiente de crescimento teve um efeito maior sobre o proteoma da semente do que a inserção de um único gene por bombardeamento de partículas (comparação T06 x WT06).

6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos entre os dois grupos de amostras de milho permitem concluir que:

1. Não foram observadas alterações significativas nas composições químicas entre as amostras QPM e CN, o mesmo ocorrendo entre as amostras GM e CG, evidenciando nestas últimas a equivalência substancial.
2. As principais diferenças encontradas entre as proteínas das variedades de milho demonstram a identidade de cada grupo de amostras e sua linhagem genética, de um lado QPMxCN e de outro GMxCG.

7 REFERÊNCIAS

ACQUADRO, A.; FALVO, S.; MILA, S.; ALBO, A.G.; COMINO, C.; MOGLIA, A.; LANTERI, S. Proteomics in globe artichoke: Protein extraction and sample complexity reduction by PEG fractionation. **Electrophoresis**, v. 30, p. 1594-1602, 2009.

AGRAWAL, G. K.; SARKAR, A.; RIGHETTI, P. G.; PEDRESCHI, R.; CARPENTIER, S.; WANG, T.; BARKLA, B. J.; KOHLI, A.; NDIMBA, B. K.; BYKOVA, N. V.; RAMPITSCH, C.; ZOLLA, L.; RAFUDEEN, M. S.; CRAMER, R.; BINDSCHEDLER, L. V.; TSAKIRPALOGLOU, N.; NDIMBA, R. J.; FARRANT, J. M.; RENAUT, J.; JOB, D.; KIKUCHI, S.; RAKWAL, R. A decade of plant proteomics and mass spectrometry: translation of technical advancements to food security and safety issues. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 32, p. 335-65, 2013.

ALBO, A. G.; MILA, M.; DIGILIO, G.; MOTTO, M.; AIME, S.; CORPILLO, D. Proteomic analysis of a genetically modified maize flour carrying Cry1Ab gene and comparison to the corresponding wild-type. **Maydica**, v. 52, p. 443-455, 2007.

ANTHONY, R. G.; WALDIN, T. R.; RAY, J. A.; BRIGHT, S. W. J.; HUSSEY, P. J. Herbicide resistance caused by spontaneous mutation of the cytoskeletal protein tubulin. **Nature**, v. 393, p. 260-263, 1998.

APPLEBY, A. P.; VALVERDE, B. E. Behaviour of dinitroaniline herbicides in plants. **Weed Technology,** v. 3, p. 198-206, 1989.

ARRUDA, M. A. Z.; AZEVEDO, R. A.; BARBOSA, H. S.; MATAVELI, L. R. V.; OLIVEIRA, S. R.; ARRUDA, S. C. C.; GRATÃO, P. L. Soybean as a food source: compartive studies focusing on transgenic and nontransgenic soybean. **In: Comparative Studies Involving Transgenic and Non-Transgenic Soybean: What is Going On?,** 2013.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of AOAC International**, 16th ed. Arlington, VA, USA, Association of Analytical Communities.v. 2, 1995.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of AOAC International**., 16th ed. Gaithersburg, MD, USA, Association of Analytical Communities, v. 1, 1998.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of AOAC International**, 17th ed. Gaithersburg, MD, USA, Association of Analytical Communities, v. 1, 2002.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of AOAC International**, 18th ed. Gathersburg, MD, USA, Association of Analytical Communities, v. 8, 2005.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of AOAC International**., 18th ed. Washington, DC, USA, Association of Analytical Communities, v. 1, 2006.

AZEVEDO, R. A.; DAMERVAL, C.; LANDRY, J.; LEA, P. J.; BELLATO, C. M.; MEINHARDT, L. W.; GUILLOUX, M. L.; DELHAYE, S.; TORO, A. A.; GAZIOLA, S. A.; BERDEJO, B. D. A. Regulation of maize lysine metabolism and endosperm protein synthesis by opaque and floury mutations. **European Journal of Biochemistry**, v. 270, p. 4898-4908, 2003.

BÁLSAMO, G.M.; CANGAHUALA-INOCENTE, G.C.; BERTOLDO, J.B.; TERENZI, H.; ARISI, A.C.M. Proteomic analysis of four Brazilian MON810 maize varieties and their four non-genetically-modified isogenic varieties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.59, p.11553-11559, 2011.

BANIASADI, H.; VLAHAKIS, C.; HAZEBROEK, J.; ZHONG, C.; ASIAGO, V. Effect of Environment and Genotype on Commercial Maize Hybrids Using LC/MS-Based Metabolomics. **Journal of Agricultural and Food Chemistry,** v. 62, p. 1412-1422, 2014.

BARROS, E.; LEZAR, S.; ANTTONEN, M. J.; VAN DIJK, J. P.; RÖHLIG, R. M.; KOK, E. J.; ENGEL, K. H. Comparison of two GM maize varieties with a nearisogenic non-GM variety using transcriptomics, proteomics and metabolomics. **Plant Biotechnology Journal**, v. 8, p. 436-451, 2010.

BARTHOLOMAEUS, A.; PARROTT, W.; BONDY, G.; WALKER, K. The use of whole animal studies in the safety assessment of genetically modified crops: limitations and recommendations. **Critical Reviews in Toxicology,** v. 43, p. 1-24, 2013.

BELANGER, F. C., KRIZ, A. L. Molecular characterization of the major maize embryo globulin encoded by the Glbl gene. **Plant Physiology,** v. 91, p. 636-643, 1989.

BELANGER, F. C., KRIZ, A. L. Molecular basis for allelic polymorphism of the maize Globulin-1 gene. **Genetics,** v. 129, p. 863-872, 1991.

BERMAN, K.H.; HARRIGAN, G.G.; NEMETH, M.A.; OLIVEIRA, W.S.; BERGER, G.U.; TAGLIAFERRO, F.S. Compositional equivalence of insect-protected glyphosate-tolerant soybean MON 87701 9 MON 89788 to conventional soybean extends across different world regions and multiple growing seasons. **Journal of Agricultural and Food Chemistry,** v. 59, p. 11643-11651, 2011.

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

BRANDÃO, A. R.; BARBOSA, H. S.; ARRUDA, M. A. Z. Image analysis of two-dimensional gel electrophoresis for comparative proteomics of transgenic and non-transgenic soybean seeds. **Journal of Proteomics**, v. 73, n. 8, p. 1433-1440, 2010.

BRASIL, 1991. Leis etc. Portaria nº 108 de 04 de setembro de 1991, Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. Dispõe sobre a aprovação de métodos analíticos para controle de alimentos para uso animal e normas gerais de amostragem para análise de rotina. **Diário Oficial da União**, Brasília (DF), 17 de setembro de 1991. Seção I, p. 19.813, 1991.

BRASIL, Resolução CNBS Nº 3, de 5 de março de 2008. Ratifica o Parecer Técnico nº 1.100/2007 da Comissão Técnica Nacional de Biossegurança - CTNBio, publicado no Diário Oficial da União de 4 de setembro de 2007, favorável à liberação comercial de milho geneticamente modificado, evento MON810 ou Milho Guardian. 2008. Disponível em: <http://ctnbio.mcti.gov.br/resolucoes-normativas/>. Acesso em: 22 jun. 2016.

CARGILE, B. J.; SEVINSKY, J. R.; ESSADER, A. S.; STEPHENSON JR., J. L.; BUNDY, J. L. Immobilized pH Gradient Isoelectric Focusing as a First-Dimension Separation in Shotgun Proteomics. **Journal of Biomolecular Techniques,** v. 16, p. 181-189, 2005.

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.; 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.

CELERES, 2013. Disponível em: <http://celeres.com.br/wordpress/wp-content/uploads/2013/08/IB13011.pdf>. Acesso em: 15 ago. 2016.

CELERES, 2016. Disponível em: < http://www.celeres.com.br/ic16-08-projecao-de-safra-milho-agosto-2016>. Acesso em: 19 ago. 2016.

CELLINI, F.; CHESSON, A.; COLQUHOUN, I.; CONSTABLE, A.; DAVIES, H. V.; ENGEL, K. H.; GATEHOUSE, A. M. R.; KÄRENLAMPI, S.; KOK, E. J.; LEGUAY, J. J.; LEHESRANTA, S.; NOTEBORN, H. P. J. M.; PEDERSEN, J.; SMITH, M. Unintended effects and their detection in genetically modified crops. **Food Chemistry Toxicology**, v. 42, p. 1089-1123, 2004.

CHANG, M. M.; HOROVITZ, D.; CULLEY, D.; HADWIGER, L. A. Molecular cloning and characterization of a pea Chitinase gene expressed in response to wounding, fungal infection and the elicitor chitosan. **Plant Molecular Biology,** v. 28, p. 105-111, 1995.

CHASSY, B.; HLYWKA, J. J.; KLETER, G. A.; KOK, E. J.; KUIPER, H. A.; MCGLOUGHLIN, M.; MUNRO, I. C.; PHIPPS, R. H.; REID, J. E. Nutritional and safety assessments of foods and feeds nutritionally improved through biotechnology: an executive summary. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 3, p. 38-104, 2004.

CHASSY, B. M. Can –omics inform a food safety assessment? **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 58, S62-S70, 2010.

CODEX ALIMENTARIUS. Foods derived from modern biotechnology. 2nd ed. Rome, Italy, World health organization food and Agriculture organization of the United Nations, 2009. Disponível em: http://www.fao.org/3/a-a1554e.pdf. Acesso em: 21 jul. 2016.

COLL, A.; NADAL, A.; ROSSIGNOL, M.; PUIGDOMÈNECH, P.; PLA, M. Proteomic analysis of MON810 and comparable non-GM maize varieties grown in agricultural fields. **Transgenic Research**, v. 20, p. 939-949, 2011.

CORPILLO, D.; GARDINI, G.; VAIRA, A. M.; BASSO, M.; AIME, S.; ACCOTTO, G. P.; FASANO, M. Proteomics as a tool to improve investigation of substantial equivalence in genetically modified organisms: the case of a virus-resistant tomato. **Proteomics**, v. 4, p. 193-200, 2004.

CONESA, A.; GOTZ, S.; GARCIA-GOMEZ, J. M.; TEROL, J.; TALON, M.; ROBLES, M. Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. **In: Bioinformatics England**, p. 3674-3676, 2005.

DAVIES, H. A role for “omics” technologies in food safety assessment. **Food Control**, v. 21, p. 1601-1610, 2010.

DICARLI, M.; VILLANI, M. E.; BIANCO, L.; LOMBARDI, R.; PERROTTA, G.; BENVENUTO, E.; DONINI, M. Proteomic analysis of the plant-virus interaction in cucumber mosaic virus (CMV) resistant transgenic tomato. **Journal of Proteome Research**, v. 5, p. 5684-5697, 2010.

EFSA Scientific Committee; 2006. Guidance document of the Scientific Panel on Genetically Modified Organisms for the risk assessment of genetically modified plants and derived food and feed. **EFSA Journal**, v. 99, p. 1-100, 2006.

EFSA GMO Panel Working Group on Animal Feeding Trials, 2008. Safety and nutritional assessment of GM plants and derived food and feed: The role of animal feeding trials. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. S2-S70, 2008.

EFSA Scientific Committee. EFSA guidance on conducting repeated-dose 90-day oral toxicity study in rodents on whole food/feed. **EFSA Journal**, v. 9, 2438-2459, 2011.

FAOSTAT, FOOD AND AGRICULTURAL ORGANIZATION (FAO). **Food and Agriculture Organization of the United Nations**, 2014. Statistical Databases – FAOSTAT. Disponível em:<http://apps.fao.org/>. Acesso em: 1 jul. 2016.

FASOLI, E.; PASTORELLO, E. A.; FARIOLI, L.; SCIBILIA, J.; ALDINI, G.; CARINI, M.; MAROCCO, A.; BOSCHETTI, E.; RIGHETTI, P. G. Searching for allergens in maize kernels via proteomic tools. **Journal of Proteomics**, v. 72, p. 501-510, 2009.

FEDOSEJEVS, E. T.; YING, S.; PARK, J.; ANDERSON, E.M.; MULLEN, R. T.; SHE, Y. M.; PLAXTON, W. C. Biochemical and Molecular Characterization of RcSUS1, a Cytosolic Sucrose Synthase Isozyme Phosphorylated In Vivo at Serine-11 in Developing Castor Oilseeds. **Journal of Biological Chemistry,** v. 13, 2014.

FERREIRA, R. B.; MONTEIRO, S.; FREITAS, R.; SANTOS, C. N.; CHEN, Z.; BATISTA, L. M.; DUARTE, J.; BORGES, A.; TEIXEIRA, A. R. The role of plant defence proteins in fungal pathogenesis. **Molecular Plant Pathology,** v. 8, p. 677-700, 2007.

FONSECA, C.; PLANCHON, S.; RENAUT, J.; OLIVEIRA, M. M.; BATISTA, R. Characterization of maize allergens - MON810 vs. its non-transgenic counterpart. **Journal of Proteomics**, v. 75, p. 2027-2037, 2012.

FONSECA, C.; PLANCHON, S.; PINHEIRO, C.; RENAULT, J.; RICARDO, C. P.; OLIVEIRA, M. M.; BATISTA, R. Maize IgE binding proteins: each plant a different profile? **Proteome Science**, v. 12, p. 17, 2014.

FREITAS, F. O. Estudo genético-evolutivo de amostras modernas e arqueológicas de milho (Zea mays mays L.) e feijão (Phaseolus vulgaris, L.) 2001. 125 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2001.

FROMM, M. E.; MORRISH, F.; ARMSTRONG, C.; WILLIAMS, R.; THOMAS, J.; KLEIN, T. M. Inheritance and expression of chimeric genes in the progeny of transgenic maize plants. **Bio/Technology (Nature Publishing Company)** , v. 8, p. 833-839, 1990.

GALINAT, W. C. The origin of maize: grain of humanity. **Journal of the New York Botanical Garden**, v. 44, p. 3-12, 1995.

GALLARDO, K.; FIRNHABER, C.; ZUBER, H.; HERICHER, D.; BELGHAZI, M.; HENRY, C.; KUSTER, H.; THOMPSON, R. A combined proteome and transcriptome analysis of developing Medicago truncatula seeds. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 6, p. 2165-2179, 2007.

GALLARDO, J. M.; ORTEA, I.; CARRERA, M. Proteomics and its applications for food authentication and food-technology research. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 52, P. 135-141, 2013.

GARCÍA-CAÑAS, V.; CIFUENTES, A. A particular case of novel food: genetically modified organisms. **In: Chemical Analysis of Food: Techniques and Applications**, p. 575-597, 2012.

GAZIOLA, S. A.; ALESSI, E. S.; GUIMARAES, P. E. O.; DAMERVAL, C.; AZEVEDO, R. A. Quality Protein Maize: A Biochemical Study of Enzymes Involved in Lysine Metabolism. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 47, p. 1268-1275, 1999.

GE HEALTHCARE. Manual do usuário, 29-0187-55, Image Master 2D Platinum 7.0, **Edition AA**, 2012.

GONG, C. Y.; LI, Q.; YU, H. T.; WANG, Z.; WANG, T. Proteomics Insight into the Biological Safety of Transgenic Modification of Rice As Compared with Conventional Genetic Breeding and Spontaneous Genotypic Variation. **Journal of Proteome Research**. v. 11, p. 3019-3029, 2012.

GONG, C. Y.; WANG, T. Proteomice valuation of genetically modified crops: current status and challenges. **Frontiers in Plant Science**, v. 4, p. 41, 2013.

GORDON-KAMM, W. J.; SPENCER, T. M.; MANGANO, M. L.; ADAMS, T. R.; DAINES, R. J.; START, W. G.; OBRIEN, J. V.; CHAMBERS, S. A.; ADAMS, W. R.; WILLETTS, N. G.; RICE, T. B.; MACKEY, C. J.; KRUEGER, R. W.; KAUSCH, A. P.; LEMAUX, P. G. Transformation of maize cells and regeneration of fertile transgenic plants. **Plant Cell**, v. 2, p. 603-618, 1990.

GOTZ, S.; GARCIA-GOMEZ, J. M.; TEROL, J.; WILLIAMS, T. D.; NAGARAJ, S.H.; NUEDA, M. J.; ROBLES, M.; TALON, M.; DOPAZO, J.; CONESA, A. High-throughput functional annotation and data mining with the Blast2GO suite. **In: Nucleic Acids Res England**, p. 3420-3435, 2008.

GOYAL, K.; WALTON, L. J.; TUNNACLIFFE, A. LEA proteins prevent protein aggregation due to water stress. **Biochemical Journal**, v. 388, p. 151-157, 2005.

GUIMARÃES, P. E. O.; PACHECO, C. A. P.; PAES, M. C. D.; SANTOS, M. X.; PARENTONI, S. N.; GAMA, E. E G.; MEIRELLES, W. F.; RIBEIRO, P. H. E.; MONTEIRO, M. A. R. BR 473: variedade de milho amarelo com qualidade protéica melhorada (QPM). Sete Lagoas: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - **EMBRAPA Milho e Sorgo**, 2004.

GUIMARÃES, P. E. O.; MEIRELLES, W. F.; PACHECO, C. A. P.; PARENTONI, S. N.; GAMA, E. E. G.; CASELA, C. R.; FERREIRA, A. S.; ROCHA, L. M. P.; CARVALHO, H. W. L.; CARDOSO, M. J. Variedade de milho BRS 4103. Sete Lagoas: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - **Embrapa Milho e Sorgo**, 2007.

GUO, X.; RONHOVDE, K.; YUAN, L.; YAO, B.; SOUNDARARAJAN, M. P.; ELTHON, T.; ZHANG, C.; HOLDING, D. R. Pyrophosphate-Dependent Fructose-6-Phosphate 1-Phosphotransferase Induction and Attenuation of Hsp Gene Expression during Endosperm Modification in Quality Protein Maize. **Plant Physiology**, v. 158, p. 917-929, 2012.

HABBEN, J. E.; KIRLEIS, A. W.; LARKINS, B. A. The origin of lysine containing proteins, in opaque-2 maize endosperm. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 23, p. 825-828, 1993.

HANCOCK, J. T.; HENSON, D.; NYIRENDA, M.; DESIKAN, R.; HARRISON, J.; LEWIS, M.; HUGHES, J.; NEILL, S. J. Proteomic identification of glyceraldehydes 3-phosphate dehydrogenase as an inhibitory target of hydrogen peroxide in Arabidopsis. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 43, p. 828-835, 2005.

HARRIGAN, G. G.; HARRISON, J. M. Assessing compositional variability through graphical analysis and Bayesian statistical approaches: case studies on transgenic crops. **Biotechnology & Genetic Engineering Reviews**, v. 28, p. 15-32, 2012.

HARRIGAN, G.G.; LUNDRY, D.; DRURY, S.; RIDLEY, W.P.; RIORDAN, S.G.; NEMETH, M.A. Natural variation in crop composition and the impact of transgenesis. **Nature Biotechnology,** v. 28, p. 402-404, 2010.

HARRISON, J. M.; HOWARD, D.; MALVEN, M.; HALLS, S. C.; CULLER, A.H.; HARRIGAN, G. G.; WOLFINGER, R. D. Principal variance component analysis of crop composition data: a case study on herbicide-tolerant cotton. **Journal of Agricultural and Food Chemistry,** v. 61, p. 6412-6422, 2013a.

HARRISON, J.M.; BREEZE, M.L.; BERMAN, K.H.; HARRIGAN, G.G. Bayesian statistical approaches to compositional analyses of transgenic crops 2. Application and validation of informative prior distributions. **Regulatory Toxicology and Pharmacology,** v. 65, p. 251-258, 2013b.

HERMAN, R. A.; PRICE, W. D. Unintended compositional changes in genetically modified (GM) crops: 20 years of research. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, p. 11695-11701, 2013.

HUANG, H.; MØLLER, I. M.; SONG, S. Q. Proteomics of desiccation tolerance during development and germination of maize embryos. **Journal of Proteomics**, v. 75, p. 1247-1262, 2012.

JAMES, C. 2015. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2015. ISAAA Brief nº 51. **ISAAA**: Ithaca, NY, 2015.

JIA, M.; WU, H.; CLAY, K. L.; JUNG, R.; LARKINS, B. A.; GIBBON, B. C. Identification and characterization of lysine-rich proteins and starch biosynthesis genes in the opaque2 mutant by transcriptional and proteomic analysis. **BMC Plant Biology**, v. 13, p. 60, 2013.

JORRÍN-NOVO, J. V. Scientific Standards and MIAPEs in plant proteomics research and publications. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, p. 473, 2015.

KAMAL, A. H. M.; RASHID, H.; SAKATA, K.; KOMATSU, S. Gel-free quantitative proteomic approach to identify cotyledon proteins in soybean under flooding stress. **Journal of Proteomics**, v. 112, p. 1-13, 2015.

KHALF, M.; GOULET, C.; VORSTER, J.; BRUNELLE, F.; ANGUENOT, R.; FLISS, I.; Michaud, D. Tubers from potato lines expressing a tomato Kunitz protease inhibitor are substantially equivalent to parental and transgenic controls. **Plant Biotechnology Journal,** v. 8, p. 155-169, 2010.

KIM, S. G.; LEE, J. S.; SHIN, S. H.; KOO, S. C.; KIM, J. T.; BAE, H. H.; SON, B. H.; KIM, Y. H.; KIM, S. L.; BAEK, S. B.; KWON, Y. U. Profiling of differentially expressed proteins in mature kernels of Korean waxy corn cultivars using proteomic analysis. **Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry**, v. 58, p. 293-303, 2015.

KOK, E. J.; KUIPER, H. A. Comparative safety assement for biotech crops. **Trends in Biotechnology**, v. 21, n. 10, p. 439-444, 2003.

KOMATSU, S.; HIRAGA, S.; YANAGAWA, Y. Proteomics techniques for the development of flood tolerant crops. **Journal of Proteome Research**, v. 11, p. 68-78, 2012.

KÖNIG, A.; COCKBURN, A.; CREVEL, R. W.; DEBRUYNE, E.; GRAFSTROEM, R.; HAMMERLING, U.; KIMBER, I.; KNUDSEN, I.; KUIPER, H. A.; PEIJNENBURG, A. A.; PENNINKS, A. H.; POULSEN, M.; SCHAUZU, M.; WAL, J. M. Assessment of the safety of foods derived from genetically modified (GM) crops. **Food and Chemical Toxicology**, v. 42, p. 1047-1088, 2004.

KOZIOL, A. G.; MARQUEZ, B. K.; HUEBSCH, M. P.; SMITH, J. C.; ALTOSAAR, I. The starch granule associated proteomes of commercially purified starch reference materials from rice and maize. **Journal of Proteomics**, v. 75, p. 993-1003, 2012.

KUIPER, H. A.; KLETER, G. A.; NOTEBORN, H. P. J. M.; KOK, E. J. Assessment of the food safety issues related to genetically modified foods. **The Plant Journal**, v. 27, p. 503-528, 2001.

KUIPER, H. A.; KLETER, G. A.; NOTEBORN, H. P. J. M.; KOK, E. J. Substantial equivalence - an appropriate paradigm for the safety assessment of genetically modified foods? **Toxicology**, v. 181-182, p. 427-431, 2002.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v.227, n.259, p.680-685, 1970.

LEAH, R.; TOMMERUP, H.; SVENDSEN, I.; MUNDY, J. Biochemical and molecular characterization of three barley seed proteins with antifungal properties. **Journal of Biological Chemistry,** v. 266, p. 1564-1573, 1991.

LEHESRANTA, S. J.; DAVIES, H. V.; SHEPHERD, L. V.; NUNAN, N.; MCNICOL, J. W.; AURIOLA, S., KOISTINEN, K. M.; SUOMALAINEN, S.; KOKKO, H. I.; KÄRENLAMPI, S. O. Comparison of tuber proteomes of potato varieties, landraces, and genetically modified lines. **Plant Physiology**, v. 138, p. 1690-1699, 2005.

LI, J.; BAROJA-FERNÁNDEZ, E.; BAHAJI, A.; MUÑOZ, F. J.; OVECKA, M.; MONTERO, M.; SESMA, M. T.; ALONSO-CASAJÚS, N.; ALMAGRO, G.; SÁNCHEZ-LÓPEZ, A. M.; HIDALGO, M.; ZAMARBIDE, M.; POZUETA-ROMERO, J. Enhancing sucrose synthase activity results in increased levels of starch and ADP-glucose in maize (*Zea mays* L.) seed endosperms. **Plant Cell Physiology**, v. 54, p. 282-294, 2013.

LI, J.; DING, X.; HAN, S.; HE, T.; ZHANG, H.; YANG, L.; YANG, S.; GAI, J. Differential proteomics analysis to identify proteins and pathways associated with male sterility of soybean using iTRAQ-based strategy. **Journal of Proteomics**, v. 138, p. 72-82, 2016.

LIU,Y.; ZHANG, Y-X.; SONG, S-Q.; LI, J.; STEWART JR., C. N.; WEI, W.; ZHAO, Y.; WANG, W-Q. A proteomic analysis of seeds from *Bt*-transgenic *Brassica napus* and hybrids with wild *B. juncea*. **Scientific Reports**, **Nature**, v. 5, p. 15480, 2015.

MACIEL, B. C. M.; BARBOSA, H. S.; PESSO, G. S.; SALAZAR, M. M.; PEREIRA, G. A. G.; GONÇALVES, D. C.; RAMOS, C. H. I.; ARRUDA, M. A. Z. Comparative proteomics and metallomics studies in Arabidopsis thaliana leaf tissues: Evaluation of the selenium addition in transgenic and nontransgenic plants using two-dimensional difference gel electrophoresis and laser ablation imaging. **Proteomics**, v. 14, p. 904-912, 2014.

MAMONE, G. PICARIELLO, G.; CAIRA, S.; ADDEO, F.; FERRANTI, P. Analysis of food proteins and peptides by mass spectrometry-based techniques. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, p. 7130-7130, 2009.

MAYER, U.; JÜRGENS, G. Microtubule skeleton: a track record. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 5, p. 494–501, 2002.

MÉCHIN, V.; BALLIAU, T.; CHÂTEAU-JOUBERT, S.; DAVANTURE, D.; LANGELLA, O.; NÉGRONI, L.; PRIOUL, J.L.; THÉVENOT, C.; ZIVY, M.; DAMERVAL, C. A two-dimensional proteome map of maize endosperm. **Phytochemistry**, v. 65, p. 1609-1618, 2004.

MÉCHIN, V.; THÉVENOT, C.; LE GUILLOUX, M.; PRIOUL, J. L.; DAMERVAL, C. Developmental analysis of maize endosperm proteome suggests a pivotal role for pyruvate orthophosphate dikinase. **Plant Physiology**, v. 143, p. 1203-1219, 2007.

MERTZ, E. T.; BATES, L. S.; NELSON, O. E. Mutant gene that changes protein composition and increases lysine content of maize endosperm. **Science**, v. 145, p. 279-280, 1964.

MILLSTONE, E.; BRUNNER, E.; MAYER, S. Beyond substantial equivalence. **Nature**, v. 401, p. 525-526, 1999.

MORO, C. F.; FUKAO, Y.; SHIBATO, J.; RAKWAL, R.; TIMPERIO, A. M.; ZOLLA, L.; AGRAWAL, G. K.; SHIODA, S.; KOUZUMA, Y.; YONEKURA, M. Unraveling the seed endosperm proteome of the lótus (*Nelumbo nucifera* Gaertn.) utilizing 1DE and 2DE separation in conjunction with tandem mass spectrometry. **Proteomics**, v. 15, p. 1717-1735, 2015.

MOTOYAMA, A.; YATES III, J.R. Multidimensional LC Separations in Shotgun Proteomics: Two modes of separation coupled with MS enable researchers to study complicated biological structures. **Analytical Chemistry**, v. 80, p. 7187-7193, 2008.

MURAKAMI, Y.; AOYAMA, Y.; KIKUSHI, J. Syntheses of macrocyclic enzyme models. Part 5. Preparation and metal-co-ordination behavior of [20]paracyclophane bearing 1,4-dihydronicotinamide and pyridine-2-carboxylic acid moieties as an alcohol dehydrogenase model. **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1**, v. 11, p. 2809-2815, 1981.

NATURE, 2013. GM CROPS A story in numbers. **Nature**, v. 497, p. 22-23, 2013.

NICOLIA, A.; MANZO, A.; VERONESI, F.; ROSELLINI, D. An overview of the last 10 years of genetically engineered crop safety research. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 34, p. 77-88, 2014.

NOGUEIRA, S. B.; LABATE, C. A.; GOZZO, F. C.; PILAU, E. J.; LAJOLO, F. M.; NASCIMENTO, J. R. O. Proteomic analysis of papaya fruit ripening using 2DE-DIGE. **Journal of Proteomics**, v.75, p. 1428-1439, 2012.

NOURI, M. Z.; KOMATSU, S. Comparative analysis of soybean plasma membrane proteins under osmotic stress using gel-based and LC MS/MS-based proteomics approaches. **Proteomics**, v. 10, p.1930-1945, 2010.

OECD, 2002. Series on the Safety of Novel Food and feed No. 6. Consensus document on compositional considerations for new varieties of maize (Zea mays): key food and feed nutrients and antinutrients and secondary metabolities. **Organization for Economic Cooperation and Development (OECD)**, Paris, 2002.

OECD, 2003. Series on the Safety of Novel Food and Feed No. 7. Consensus Document on Compositional Considerations for New Varieties of Bread Wheat (Triticum aestivum): Key Food and Feed Nutrients, Anti-Nutrients and Toxicants. **Organization for Economic Co-operation and Development (OECD)**, Paris, 2003.

O'FARELL, P. H. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 250, p. 470-4021, 1975.

OMAGE, J.; AGUBOSI, O. C. P.; BAWA, G. S.; ONIMISI, P. A. Evaluation of the nutritive value of quality protein maize on the growth performance and carcass characteristics of weaner rabbits. **Pakistan Journal of Nutrition**, v. 8, p. 106-111, 2009.

OR, E.; BOYER, S. K.; LARKINS, B. A. Opaque2 modifiers act post-transcriptionally and in a polar manner on gamma-zein gene expression in maize endosperm. **The Plant Cell**, v. 5, p. 1599-1609, 1993.

OSTERGAARD, O.; MELCHIOR, S.; ROEPSTORFF, P.; SVENSSON, B. Initial proteome analysis of mature barley seeds and malt. **Proteomics**, v. 2, p. 733-739, 2002.

PAES, M. C. D.; BICUDO, M. H. Nutritional Perspectives of Quality Protein Maize. In: Larkins, B. A.; Mertz, E. T. (eds.). Quality Protein Maize: 1964-1994. **Proceedings of the International Symposium on Quality Protein Maize**. Sete Lagoas. p. 65-78, 1995.

PANDIT, S. S.; KULKARNI, R. S.; GIRI, A. P.; KÖLLNER, T. G.; DEGENHARDT, J.; GERSHENZON, J.; GUPTA, V. S. Expression profiling of various genes during the fruit development and ripening of mango. **Plant Physiology and Biochemistry,** v. 48, p. 426-33, 2010.

PARK, C. J.; SEO, Y. S. Heat Shock Proteins: A Review of the Molecular Chaperones for Plant Immunity. **The Plant Pathology Journal,** v. 31, p. 323-333, 2015.

PARROTT, W.; CHASSY, B.; LIGON, J.; LIGON, J.; MEYER, L.; PETRICK, J.; ZHOU, J.; HERMAN, R.; DELANEY, B.; LEVINE, M. Application of food and feed safety assessment principles to evaluate transgenic approaches to gene modulation in crops. **Food and Chemistry Toxicology**, v. 48, p. 1773-90, 2010.

PASCHOALICK, H. N. S. **Efeito da época deaplicaçãodo nitrogênio na produção, teor de óleo e na qualidade protéica de cultivares de milho (Zea mays L.) normal e QPM**. 1998. 107 f. Tese (Mestado) Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias. Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 1998.

PASTORELLO, E. A.; FARIOLI, L.; PRAVETTONI, V.; SCIBILIA, J.; CONTI, A.; FORTUNATO, D.; BORGONOVO, L.; BONOMI, S.; PRIMAVESI, L.; BALLMER-WEBER, B. Maize food allergy: lipid-transfer proteins, endochitinases, and alpha-zein precursor are relevant maize allergens in double-blind placebo-controlled maizechallenge-positive patients. **Analytical Bioanalytical Chemistry**, v. 395, p. 93-102, 2009.

PECHANOVA, O.; TAKÁC; T.; SAMAJ, J.; PECHAN, T. Maize proteomics: An insight into the biology of an important cereal crop. **Proteomics**, v. 13, p. 637-662, 2013.

PETRICK, J. S.; BROWER-TOLAND, B.; JACKSON, A. L.; KIER, L. D. Safety assessment of food and feed from biotechnology-derived crops employing RNA-mediated gene regulation to achieve traits: a scientific review. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 66, p. 167-176, 2013.

PROSKY, P.; ASP, N. G.; SCHWEIZER, T. F.; DE VRIES, J. W.; FURDA, I. Determination of insoluble and soluble dietary fiber in foods and food products: Collaborative study. **Journal of Association of Official Analytical Chemists**, v. 75, p. 360-367, 1992.

RABILLOUD, T.; CHEVALLET, M.; LUCHE, S.; LELONG, C. Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: Past, present and future. **Journal of Proteomics**, v. 7 3, p. 2064–2077, 2010.

RAYAN, A. M.; ABBOTT, L. C. Compositional analysis of genetically modified corn events (NK603, MON88017 x MON810 and MON89034 x MON88017) compared to conventional corn. **Food Chemistry**, v. 176, p. 99-105, 2015.

RICROCH, A. E.; BERGÉ, J. B.; KUNTZ, M. Evaluation of Genetically Engineered Crops Using Transcriptomic, Proteomic, and Metabolomic Profiling Techniques. **Plant Physiology**, v. 155, p. 1752-1761, 2011.

RICROCH, A. E. Assessment of GE food safety using "-omics" techniques and long-term animal feeding studies. **New Biotechnology**, v. 30, p. 349-354, 2013.

RUEBELT, M. C.; LIPP, M.; REYNOLDS, T. L.; ASTWOOD, J. D.; ENGEL, K. H.; JANY, K. D. Application of two-dimensional gel electrophoresis to interrogate alterations in the proteome of genetically modified crops. 1. Assessing analytical validation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 6, p. 2154-2161, 2006a.

RUEBELT, M. C.; LIPP, M.; REYNOLDS, T. L.; ASTWOOD, J. D.; ENGEL, K. H.; JANY, K. D. Application of Two-Dimensional Gel Electrophoresis To Interrogate Alterations in the Proteome of Genetically Modified Crops. 2. Assessing Natural Variability. **Journal of Agricultural and Food Chemistry,** v. 54, p. 2162-2168, 2006b.

SANDEN, M.; BERNTSSEN, M. H. G.; KROGDAHL, A.; HEMRE, G. I.; BAKKE-MCKELLEP, A. M. An examination of the intestinal tract of Atlantic salmon, Salmon salar L., parr fed different varieties of soy and maize. **Journal of Fish Diseases**, v. 28, p. 317-330, 2005.

SATOH, R.; NAKAMURA, R.; KOMATSU, A.; OSHIMA, M.; TESHIMA, R. Proteomic analysis of known and candidate rice allergens between 3 non-transgenic and transgenic plants. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 59, p. 437-444, 2011.

SCOSSA, F.; LAUDENCIA-CHINGCUANCO, D.; ANDERSON, O. D.; VENSEL, W. H.; LAFIANDRA, D.; D'OVIDIO, R.; MASCI, S. Comparative proteomic and transcriptional profiling of a bread wheat cultivar and its derived transgenic line overexpressing a low molecular weight glutenin subunit gene in the endosperm. **Proteomics**, v. 8, p. 2948-2966, 2008.

SENSEMAN, S.A. (Ed.). Herbicide Handbook. 9ª edição. Lawrence, EUA: **Weed Science Society of America**, 458 p., 2007.

SHEVCHENKO, A.; WILM, M.; VORM, O.; MANN, M. Mass spectrometric sequencing of proteins from silver stained polyacrylamide gels. **Analytical Chemistry**, v. 68, n.5, p. 850-858, 1996.

SHEWRY, P. R.; CASEY, R. Seed proteins. Dordrecht: **Kluwer Academic Publishers**. 1999.

SINGH, R. K.; JAISHANKAR, J.; MUTHAMILARASAN, M.; SHWETA, S.; DANGI, A.; PRASAD, M. Genome-wide analysis of heat shock proteins in C_4 model, foxtail millet identifies potential candidates for crop improvement under abiotic stress. **Nature**, **Scientific Reports, v.** 6, n. 32641, 2016.

SIMÓ, C.; IBÁÑEZ, C.; VALDÉS, A.; CIFUENTES, A; GARCÍA-CAÑAS, V. **Metabolomics of Genetically Modified Crops. International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, p. 18941-18966, 2014.

SIVAK, M. N.; PREISS, J. Synthesis of starch in seeds. In: Negbi, M., KIGEL, J., GALILI, G. (Eds.), **Seed Development and Germination**. Marcel Dekker, New York, p. 139-168, 1994.

STRABLE, J.; SCANLON, M. J. Maize (*Zea mays*): a model organism for basic and applied research in plant biology. **Cold Spring Harbor Protocols**, v. 10, pdb.emo132, 2009.

SUN, W.; MOTANGU, M. V.; VERBRUGGEN, N. Small heat shock proteins and stress tolerance in plants. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1577, p. 1-9, 2002.

SWINDELL, W. R.; HUEBNER, M.; WEBER, A. P. Transcriptional profiling of *Arabidopsis* heat shock proteins and transcription factors reveals extensive overlap between heat and nonheat stress response pathways. **BMC Genomics**, v. 8, p. 125, 2007.

TAN-WILSON, A. L.; WILSON, K. A. Mobilization of seed protein reserves. **Physiologia Plantarum**, v. 145, p. 140-153, 2012.

TOLLETER, D.; HINCHA, D. K.; MACHEREL, D. A mitochondrial late embryogenesis abundant protein stabilizes model membranes in the dry state. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1798, p. 1926-1933, 2010.

TORGGLER, M. G. F.; CONTEL, E. P. B.; TORGGLER, S. P. Isoenzimas - variabilidade genética em plantas. Ribeirão Preto: **Sociedade Brasileira de Genética**. 87 p., 1995.

TORRENT, M.; ALVAREZ, I.; GELI, M. I.; DALCOL, I.; LUDEVID, D. Lysine-rich modified gamma-zein accumulate in protein bodies in transiently transformed maize endosperm. **Plant Molecular Biology**, v. 34, p. 139-149, 1997.

TSAI, C. Y.; NELSON, O. E. Starch-deficient maize mutant lacking adenosine diphosphate glucose pyrophosphorylase activity. **Science**, v. 151, p. 341-343, 1966.

VALLEDOR, L.; JORRÍN, J. Back to the basics: Maximizing the information obtained by quantitative two dimensional gel electrophoresis analyses by an appropriate experimental desing and statistical analyses. **Jornal of Proteomics**, v. 74, p. 1-18, 2011.

VASAL, S. K. Hihg quality protein corn. In: HALLAUER, A. R. (ed), Speciality Corns. **CRC Press**. Boca Raton, Florida, USA. p 80-121, 1994.

VASAL, S. K. Quality protein maize. Improving human nutrition through agriculture: The role of International agricultural Research, **The International Maize and Wheat Improvement Center (CIMMYT)**, Ciudad de México, México, 1999.

VASAL, S. K. The role of high lysine cereals in animal and human nutrition in Asia. **The International Maize and Wheat Improvement Center (CIMMYT)**, Ciudad de México, México, 2005. Disponível em: <http://www.fao.org/docrep/007/y5019e/y5019e0b.htm>. Acesso em: 13 jul. 2016.

VELOSO, M. M. N.; SILVA, M. S.; CERQUEIRA, F. M.; PAES, M. C. D. Avaliação química e biológica da proteína do grão em cultivares de milho normal e de alta qualidade protéica (QPM). **Pesquisa Agropecuária Tropical,** v. 34, p. 1-8, 2004.

VENKATESH, T. V.; COOK, K.; LIU, B.; PEREZ, T.; WILLSE, A.; TICHICH, R.; FENG, P.; HARRIGAN, G. G. Compositional differences between near-isogenic GM and conventional maize hybrids are associated with backcrossing practices in conventional breeding. **Plant Biotechnology Journal**, v. 13, p. 200-210, 2015.

WANG, W.; VINOCUR, B.; SHOSEYOV, O.; ALTMAN, A. Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. **Trends in Plant Science**, v. 9, p. 244-52, 2004.

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

WANG, L; XU, C.; QU, M.; ZHANG, J. Kernel amino acid composition and protein content of introgression lines from Zea mays ssp. mexicana into cultivated maize. **Journal of Cereal Science**, v. 48, p. 387-393, 2008.

WANG, W.; WU, X.; XIONG, X.; TAI, F. Improving gel-based proteome analysis of soluble protein extracts by heat prefractionation. **Proteomics**, v. 12, p. 938–943, 2012.

WANG, W.; YE, J.; ROGOWSKA-WRZESINSKA, A.; WOJDYLA, K. I.; JENSEN, O. N.; MOLLER, I. M.; SONG, S. Proteomic comparison between maturation drying and prematurely imposed drying of zea mays seeds reveals a potential role of maturation drying in preparing proteins for seed germination, seedling vigor, and pathogen resistance. **Journal of Proteome Research,** v. 13, p. 606−626, 2014.

WANG, L.; WANG, X.; JIN, X.; JIA, R.; HUANG, Q.; TAN, Y.; GUO, A. Comparative proteomics of Bt-transgenic and non-transgenic cotton leaves. **Proteome Science**, v. 13, p. 1-15, 2015.

WASHBURN, M. P.; WOLTERS, D.; YATES, J. R. Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology. **Nature Biotechnology**, v. 19, p. 242-247, 2001.

WEHMEYER, N; HERNANDEZ, L.; FINKELSTEIN, R.; VIERLING, E. Synthesis of small heat-shock proteins is part of the developmental program of late seed maturation. **Plant Physiology**, v. 112, p. 747-57, 1996.

WINTER, H.; HUBER, S. C. Regulation of sucrose metabolism in higher plants: localization and regulation of activity of key enzymes. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, v. 19, p. 31-67, 2000.

WONG, J. H.; NG, T. B.; CHEUNG, R. C. F.; YE, X. J.; et al. Proteins with antifungal properties and other medicinal applications from plants and mushrooms. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 87, p. 1221-1235, 2010.

WU, X.; LIU, H.; WANG, W.; CHEN, S.; HU, X.; LI, C. Proteomic analysis of seed viability in maize. **Acta Physiologiae Plantarum,** v. 33, p. 181–191, 2011.

WU, Y.; HOLDING, D. R.; MESSING, J. γ-Zeins are essential for endosperm modification in quality protein maize. **Proceedings of the National Academy of Sciences - PNAS**, v. 107, p. 12810–12815, 2010.

XIN, L.; XIAOYUN, H.; YUNBO, L.; GUOYING, X.; XIANBIN, J.; KUNLUN, H. Comparative analysis of nutritional composition between herbicide-tolerant rice with bar gene and its non-transgenic counterpart. Journal of **Food Composition and Analysis**, v. 21, p. 535-539, 2008.

XIONG, E. WU, X.; YANG, L.; GONG, F.; TAI, F.; WANG, W. Chloroform-Assisted Phenol Extraction Improving Proteome Profiling of Maize Embryos through Selective Depletion of High-Abundance Storage Proteins. **Plos One**, v. 9, e112724, 2014.

XU, C. P. XU, C.; GARRETT, W. M.; SULLIVAN, J.; CAPERNA, T. J.; NATARAJAN, S. Separation and identification of soybean leaf proteins by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. **Phytochemistry**, v. 67, p. 2431-2440, 2006.

XU, Y.; ZHAN, C.; HUANG, B. Heat Shock Proteins in Association with Heat Tolerance in Grasses. **International Journal of Proteomics**, v. 2011, p. 1-11, 2011.

YIN, X.; SAKATA, K.; NANJO, Y.; KOMATSU, S. Analysis of initial changes in the proteins of soybean root tip under flooding stress using gel-free and gel-based proteomic techniques. **Journal of Proteomic**, v. 106, p. 1-16, 2014.

ZHEN, Y.; QI, J. L.; WANG, S. S.; XU, G. H.; ZHANG, M. S.; MIAO, L.; PENG, X. X.; YANG, Y. H. Comparative proteome analysis of differentially expressed proteins induced by Al toxicity in soybean. **Physiologia Plantarum**, v. 131, p. 542-554, 2007.

ZHOU, J.; BERMAN, K. H.; BREEZE, M. L.; NEMETH, M. A.; OLIVEIRA, W. S.; BRAGA, D. P. V.; BERGER, G. U.; HARRIGAN, G. G. Compositional variability in conventional and glyphosate-tolerant soybean (*Glycine max L.*) varieties grown in different regions in Brazil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry,** v. 59, p. 11652-11656, 2011a.

ZHOU, J.; HARRIGAN, G. G.; BERMAN, K. H.; WEBB, E. G.; KLUSMEYER, T. H.; NEMETH, M. A. Stability in the composition equivalence of grain from insect-protected maize and seed from glyphosate-tolerant soybean to conventional counterparts over multiple seasons, locations, and breeding germplasms. **Journal of Agricultural and Food Chemistry,** v. 59, 8822-8828, 2011b.

ZOLLA, L.; RINALDUCCI, S.; ANTONIOLI, P.; RIGHETTI, P.G. Proteomics as a Complementary Tool for Identifying Unintended Side Effects Occurring in Transgenic Maize Seeds As a Result of Genetic Modifications. **Journal of Proteome Research**, v. 2008, p. 1850-1861, 2008.

ANEXOS

ANEXO A – Aminoácidos livres

Tabela 1 – Valores médios de aminoácidos livres (µg/g MF) em sementes de milho com alta qualidade proteica (QPM)

Aminoácidos (pf) [§]	**QP1**	**QP2**	**CN**	**Pr > F**
Aspartato (ASP)	248,06 ± 1,84[b]	470,44 ± 7,56[a]	146,69 ± 4,06[c]	< 0,0001
Glutamato (GLU)	177,41 ± 24,81[b]	223,98 ± 0,39[a]	137,60 ± 5,74[c]	0,0011
Asparagina (ASN)	529,43 ± 48,27[b]	608,05 ± 1,09[a]	93,87 ± 0,44[c]	< 0,0001
Serina (SER)	26,98 ± 3,27[a]	28,94 ± 1,79[a]	15,38 ± 0,48[b]	0,0005
Glutamina (GLN)	8,37 ± 1,11[b]	10,80 ± 0,94[a]	5,16 ± 0,35[c]	0,0006
Histidina (HIS)	21,29 ± 2,18[a]	21,98 ± 1,59[a]	15,60 ± 2,56[b]	0,0203
Glicina (GLY)	34,84 ± 3,96[b]	53,45 ± 4,94[a]	28,44 ± 0,89[b]	0,0004
Treonina (TRE)	13,42 ± 3,42[ab]	18,53 ± 0,85[a]	10,13 ± 0,41[b]	0,0069
Alanina (ALA)	194,26 ± 19,48[b]	231,55 ± 0,09[a]	145,91 ± 6,56[c]	0,0004
Ácido gama-aminobutírico (GABA)	26,54 ± 2,79[b]	36,28 ± 0,81[a]	14,72 ± 0,57[c]	< 0,0001
Tirosina (TIR)	52,43 ± 4,91[a]	73,55 ± 1,25[a]	27,83 ± 1,15[a]	< 0,0001
Triptofano (TRP)	53,34 ± 5,15[a]	58,21 ± 1,40[a]	33,45 ± 1,12[b]	0,0002
Metionina (MET)	3,87 ± 1,05[a]	4,57 ± 0,43[a]	3,50 ± 0,28[a]	0,2267
Valina (VAL)	2,47 ± 0,47[ab]	2,75 ± 0,04[a]	1,84 ± 0,13[b]	0,0194
Fenilalanina (PHE)	16,21 ± 6,69[a]	19,57 ± 2,33[a]	11,81 ± 0,86[a]	0,1479
Isoleucina (ILE)	12,57 ± 2,77[ab]	16,05 ± 0,33[a]	10,30 ± 0,29[b]	0,0137
Leucina (LEU)	19,59 ± 5,37[a]	16,48 ± 2,17[a]	11,87 ± 0,69[a]	0,0786
Ornitina (ORN)	29,40 ± 2,86[a]	27,04 ± 1,04[a]	21,12 ± 0,73[b]	0,0035
Lisina (LIS)	120,82 ± 1,07[b]	159,76 ± 4,38[a]	79,94 ± 7,77[c]	< 0,0001

Legenda: pf: peso fresco;

[§] Unidades para aminoácidos livres: µg/g

Valores médios ± desvio padrão. Diferentes letras na linha são estatisticamente diferentes ($p < 0,05$)

ANEXO B – Proteínas identificadas na eletroforese 2-DE

Tabela 1 – Proteínas identificadas pela abordagem 2-DE de sementes de milho com qualidade proteica melhorada (QP1 e QP2)

Spot	Nº de acesso[a]	Nome da proteína	Espécie	Escore Mascot	Cobert. Seq.(%)	Pept. Matched/ Nº Seq.	pI/PM (kDa) teór.	pI/PM (kDa) exp.	Fold change (2-DE) QP1/QP2	Expres. spot[b] QP1/QP2	Fold change (emPAI) QP1/QP2	Expres. ptn[c] QP1/QP2	Processo Biológico	Função Molecular
Metabolismo														
77	gi|926657619	sorbitol dehydrogenase homolog 1 ou Uncharacterized protein	*Zea mays*	192	14	7/5	6,27/ 39,529	7,22/ 36,0	6,60	up	0,63	down	oxidation-reduction process	oxidoreductase activity/ nucleotide binding/ zinc ion binding
119	gi|162463106	phosphoglucomutase, cytoplasmic 1	*Zea mays*	1395	47	46/21	5,46/ 63,286	5,92/ 62,0	1,76	up	2,38	up	response to cadmium ion/ glucose metabolic process/ gametophyte development	magnesium ion binding/ phosphoglucomutase activity
119	gi|162459678	phosphoglucomutase, cytoplasmic 2	*Zea mays*	1382	44	42/19	5,47/ 63,230	5,92/ 62,0	1,76	up	1,00	---	response to cadmium ion/ glucose metabolic process/ gametophyte development	magnesium ion binding/ phosphoglucomutase activity
Energia														
77	gi|293887	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, partial	*Zea mays*	250	22	8/4	8,44/ 25,044	7,22/ 36,0	6,60	up	0,67	down	seed development/ oxidation-reduction process/ response to sucrose stimulus/ response to salt stress/ defense response to bacterium/ response to heat/ glycolysis/ response to cadmium ion/ response to hydrogen peroxide	NAD binding/ copper ion binding/ zinc ion binding/ glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (NAD+) (phosphorylating) activity/ NADP binding/
Síntese de proteína														
112	gi|162460570	elongation factor alpha3	*Zea mays*	380	19	12/7	9,20/ 49,452	9,39/ 61,0	1,58	up	1,00	---	translational elongation/ GTP catabolic process/ response to cadmium ion	translation elongation factor activity/ GTP binding/ GTPase activity
112	gi|195606920	elongation factor 1-alpha	*Zea mays*	378	19	12/7	9,20/ 49,492	9,39/ 61,0	1,58	up	0,80	---	translational elongation/ GTP catabolic process/ response to cadmium ion	translation elongation factor activity/ GTP binding/ GTPase activity
112	gi|195620072	elongation factor 1-alpha	*Zea mays*	430	21	20/9	9,15/ 49,534	9,39/ 61,0	1,58	up	1,50	up	translational elongation/ GTP catabolic process/ response to cadmium ion	translation elongation factor activity/ GTP binding/ GTPase activity
112	gi|238014024	unknown ou Elongation factor 1-alpha	*Zea mays*	431	21	20/9	9,19/ 49,593	9,39/ 61,0	1,58	up	1,57	up	translational elongation/ GTP catabolic process/ response to cadmium ion	translation elongation factor activity/ GTP binding/ GTPase activity

Armazenamento de proteína														
48	gi|228310	globulin 2 ou globulin-1 s allele-like	*Zea mays*	494	26	52/8	6,16/ 50,234	9,69/ 28,0	0,15	down	2,64	up	-----	nutrient reservoir activity
52	gi|228310	globulin 2 ou globulin-1 s allele-like	*Zea mays*	448	15	34/6	6,16/ 50,234	7,73/ 27,0	0,44	down	4,64	up	-----	nutrient reservoir activity
53	gi|228310	globulin 2 ou globulin-1 s allele-like	*Zea mays*	553	27	14/9	6,16/ 50,234	8,22/ 27,0	0,52	down	1,33	---	-----	nutrient reservoir activity
81	gi|22284	vicilin-like embryo storage protein	*Zea mays*	269	10	5/5	6,23/ 66,635	9,36/ 40,0	0,40	down	1,27	---	oxygen transport	Nutrient reservoir activity/ iron ion binding/ heme binding/ oxygen binding
81	gi|154980334	globulin-1	*Zea mays subsp. parviglumis*	172	15	4/4	8,18/ 28,354	9,36/ 40,0	0,40	down	0,44	down	-----	nutrient reservoir activity
81	gi|3414841	globulin-1	*Zea mays subsp. parviglumis*	120	10	4/4	9,03/ 27,589	9,36/ 40,0	0,40	down	0,18	down	-----	nutrient reservoir activity
84	gi|228310	globulin 2 ou globulin-1 s allele-like	*Zea mays*	565	26	23/9	6,16/ 50,234	7,70/ 41,0	0,36	down	1,40	---	-----	nutrient reservoir activity
88	gi|22284	vicilin-like embryo storage protein	*Zea mays*	69	3	2/2	6,23/ 62,300	8,15/ 42,0	0,40	down	0,56	down	oxygen transport	Nutrient reservoir activity/ iron ion binding/ heme binding/ oxygen binding
115	gi|228310	globulin 2 ou globulin-1 s allele-like	*Zea mays*	399	17	10/5	6,16/ 50,234	7,24/ 61,0	5,34	up	6,14	up	-----	nutrient reservoir activity
Defesa e Estresse celular														
18	gi|226507890	16.9 kDa class I heat shock protein 1	*Zea mays*	302	38	8/4	6,77/ 17,146	8,64/ 15,0	0,09	down	0,85	---	stress response/ response to high light intensity/ protein oligomerization/ response to hydrogen peroxide/ heat acclimation	-----
48	gi|48093332	chitinase	*Zea mays subsp. parviglumis*	238	27	9/6	8,44/ 30,146	9,69/ 28,0	0,15	down	0,62	down	chitin catabolic process/ defense response/ polysaccharide catabolic process/ cell wall macromolecule catabolic process	chitinase activity/ chitin binding

48	gi|214014500	chitinase	*Zea mays subsp. parviglumis*	96	8	5/2	8,56/ 29,973	9,69/ 28,0	0,15	down	0,50	down	carbohydrate metabolic process/ chitin catabolic process/ cell wall macromolecule catabolic process	chitinase activity/ chitin binding
48	gi|214014552	chitinase	*Zea mays subsp. parviglumis*	177	27	8/5	8,11/ 30,056	9,69/ 28,0	0,15	down	0,51	down	carbohydrate metabolic process/ chitin catabolic process/ cell wall macromolecule catabolic process	chitinase activity/ chitin binding
84	gi|1709619	protein disulfide-isomerase	*Zea mays*	464	18	15/5	5,24/ 57,289	7,70/ 41,0	0,36	down	0,67	down	cell redox homeostasis/ glycerol ether metabolic process/ protein folding in endoplasmic reticulum	electron carrier activity/ protein disulfide isomerase activity/ protein disulfide oxidoreductase activity
115	gi|162464260	mitochondrial aldehyde dehydrogenase 2	*Zea mays*	222	11	5/4	6,69/ 59,751	7,24/ 61,0	5,34	up	1,00	---	-----	aldehyde dehydrogenase (NAD) activity/ Oxidoreductase
Crescimento e Estrutura celular														
84	gi|226497424	embryonic protein DC-8 precursor	*Zea mays*	318	24	12/7	6,16/ 33,552	7,70/ 41,0	0,36	down	1,32	---	fatty acid catabolic process/ embryo development ending in seed dormancy	-----
116	gi|162460038	tubulin beta-7 chain	*Zea mays*	451	34	29/12	4,72/ 50,689	5,48/ 62,0	0,32	down	0,67	down	GTP catabolic process/ protein polymerization/response to cadmium ion/ microtubule-based movement	GTP binding/ GTPase activity/ structural constituent of cytoskeleton
116	gi|162463097	tubulin beta-2 chain	*Zea mays*	265	22	21/8	4,82/ 50,535	5,48/ 62,0	0,32	down	0,62	down	response to salt stress/ GTP catabolic process/ protein polymerization/ response to cold/ microtubule-based movement	GTP binding/ GTPase activity/ structural constituent of cytoskeleton
Desconhecido														
113	gi|242064666	hypothetical protein SORBIDRAFT_04g009130 ou putative uncharacterized protein Sb04g009130	*Sorghum bicolor*	181	8	5/2	6,29/ 55,028	9,04/ 61,0	2,00	up	1,55	up	-----	-----

Legenda: QP1: variedade BR – 473 e QP2: variedade BR – 451 (Embrapa Milho e Sorgo)

[a] Número de acesso no NCBI das proteínas diferencialmente expressas considerando um *fold* de 1,5 ou 50% ($p < 0,05$)

[b] *Up* e *down regulation* (*fold change*: IM2DP - maior ou igual a 1,5; menor ou igual a 0,67)

[c] *Up* e *down regulation* (*fold change*: emPAI - maior ou igual a 1,5; menor ou igual a 0,67)

*Spot 111 não apresentou proteína equivalente e foi excluído da análise

Tabela 2 – Proteínas identificadas pela abordagem 2-DE de sementes de milho com qualidade proteica melhorada (QP1) em comparação com uma convencional normal (CN)

Spot	Nº de acesso[a]	Nome da proteína	Espécie	Escore Mascot	Cobert. Seq.(%)	Pept. Matched/ Nº Seq.	pI/PM (kDa) teór.	pI/PM (kDa) exp.	Fold change (2-DE) QP1/CN	Expres. spot[b] QP1/CN	Fold change (emPAI) QP1/CN	Expressão ptn[c] QP1/CN	Processo Biológico	Função Molecular
Armazenamento de proteína														
58	gi|22284	vicilin-like embryo storage protein	*Zea mays*	195	5	4/3	6,23/ 66,635	9,96/ 37,0	8,80	up	1,80	up	oxygen transport	Nutrient reservoir activity/ iron ion binding/ heme binding/ oxygen binding
61	gi|228310	globulin 2 ou globulin-1 s allele-like	*Zea mays*	130	5	6/2	6,16/ 50,234	5,72/ 42,0	0,38	down	0,67	down	-----	nutrient reservoir activity
69	gi|228310	globulin 2 ou globulin-1 s allele-like	*Zea mays*	1316	44	60/17	6,16/ 50,234	7,02/ 50,0	0,31	down	0,61	down	-----	nutrient reservoir activity
Defesa e Estresse celular														
27	gi|226506758	16.9 kDa class I heat shock protein 1	*Zea mays*	449	57	8/6	6,77/ 17,220	7,06/ 17,0	0,37	down	0,61	down	Stress response/ response to high light intensity/ protein oligomerization/ response to hydrogen peroxide/ heat acclimation	-----
Crescimento e Estrutura celular														
37	gi|15289940	putative actin ou Os01g0964133 protein	*Oryza sativa Japonica Group*	233	28	12/5	5,23/ 41,929	7,06/ 21,0	1,54	up	4,38	up	cytoskeleton organization/ gluconeogenesis/ glucose catabolic process/ proteasomal protein catabolic process/ cell division/ root hair elongation/ regulation of protein localization/ seed germination	motor activity/ ATP binding/ structural constituent of cytoskeleton
68	gi|212274479	uncharacterized protein LOC100191561 ou Actin-97	*Zea mays*	591	38	29/12	5,24/ 41,927	5,38/ 48,0	1,86	up	1,52	up	-----	structural constituent of cytoskeleton/ ATP binding/ motor activity

68	gi|242032343	hypothetical protein SORBIDRAFT_01g002170 ou Putative uncharacterized protein Sb01g002170	*Sorghum bicolor*	567	35	25/11	5,24/ 41,962	5,38/ 48,0	1,86	up	1,60	up	cytoskeleton organization/ gluconeogenesis/ response to wounding/ glucose catabolic process/ proteasomal protein catabolic process/ cell division/ root hair elongation/ regulation of protein localization/ seed germination/ response to light stimulus/ response to auxin stimulus	protein binding/ ATP binding/ structural constituent of cytoskeleton
Desconhecido														
74	gi|242064666	hypothetical protein SORBIDRAFT_04g009130 ou Uncharacterized protein	*Sorghum bicolor*	181	8	5/5	6,29/ 55,028	8,88/ 64,0	2,64	up	2,20	up	-----	-----

Legenda: QP1: variedade BR – 473 e CN: variedade BRS - 4103 (Embrapa Milho e Sorgo)

[a] Número de acesso no NCBI das proteínas diferencialmente expressas considerando um *fold* de 1,5 ou 50% ($p < 0,05$)

[b] *Up* e *down regulation* (*fold change*: IM2DP - maior ou igual a 1,5; menor ou igual a 0,67)

[c] *Up* e *down regulation* (*fold change*: emPAI - maior ou igual a 1,5; menor ou igual a 0,67)

Tabela 3 – Proteínas identificadas pela abordagem 2-DE de sementes de milho com qualidade proteica melhorada (QP2) em comparação com uma convencional normal (CN)

Spot	Nº de acesso[a]	Nome da proteína	Espécie	Escore Mascot	Cobert. Seq.(%)	Pept. Matched/ Nº Seq.	pI/PM (kDa) teór.	pI/PM (kDa) exp.	Fold change (2-DE) QP2/CN	Expres. spot[b] QP2/CN	Fold change (emPAI) QP2/CN	Expressão ptn[c] QP2/CN	Processo Biológico	Função Molecular
Metabolismo														
67	gi|226493908	uncharacterized protein LOC100277287 ou Uncharacterized protein	*Zea mays*	75	13	5/3	5,55/ 33,588	5,63/ 31,0	0,31	down	0,54	down	metabolic process	catalytic activity
90	gi|926657619	sorbitol dehydrogenase homolog 1	*Zea mays*	912	47	26/13	6,27/ 39,528	6,71/ 40,0	0,28	down	0,88	---	oxidation-reduction process	oxidoreductase activity/ nucleotide binding/ zinc ion binding
90	gi|77378040	sorbitol dehydrogenase	*Zea mays*	659	33	21/10	6,27/ 39,747	6,71/ 40,0	0,28	down	0,67	down	oxidation-redution-process	oxidoreductase activity/ nucleotide binding/zinc ion binding/
90	gi|242081977	hypothetical protein SORBIDRAFT_07g025 220 ou Putative uncharacterized protein Sb07g025220	*Sorghum bicolor*	435	20	14/7	6,07/ 40,130	6,71/ 40,0	0,28	down	1,00	---	oxidation-reduction process	oxidoreductase activity/ nucleotide binding/ zinc ion binding
115	gi|226493908	uncharacterized protein LOC100277287 ou Uncharacterized protein	*Zea mays*	261	22	4/4	5,55/ 33,588	8,54/ 62,0	6,88	up	1,89	up	metabolic process	catalytic activity
Energia														
81	gi|162462949	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, cytosolic 3	*Zea mays*	215	21	10/6	7,01/ 36,597	7,92/ 35,0	0,15	down	0,44	down	seed development/ oxidation-reduction process/ response to sucrose stimulus/ response to salt stress/ defense response to bacterium/ response to heat/ glycolysis/ response to cadmium ion/response to hydrogen peroxide	NAD binding/ copper ion binding/ zinc ion binding/ glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (NAD+) (phosphorylating) activity/ NADP binding
Armazenamento de proteína														
67	gi|228310	globulin 2 ou globulin-1 s allele-like	*Zea mays*	188	11	8/4	6,16/ 50,234	5,63/ 31,0	0,31	down	0,54	down	-----	nutrient reservoir activity
86	gi|22284	vicilin-like embryo storage protein	*Zea mays*	322	?	16/6	6,23/ 66,635	8,61/ 40,0	1,73	up	1,69	up	oxygen transport	nutrient reservoir activity/ iron ion binding/ heme binding/ oxygen binding
86	gi|154980224	globulin-1	*Zea mays subsp. parviglumis*	198	?	11/4	8,18/ 28,657	8,61/ 40,0	1,73	up	1,56	up	-----	nutrient reservoir activity
93	gi|228310	globulin 2 ou globulin-1 s allele-like	*Zea mays*	51	3	2/1	6,16/ 50,234	6,95/ 45,0	0,03	down	0,02	down	-----	nutrient reservoir activity

94	gi|228310	globulin 2 ou globulin-1 s allele-like	*Zea mays*	1183	48	41/19	6,16/ 50,234	7,08/ 47,0	0,28	down	1,00	---	-----	nutrient reservoir activity
94	gi|821325083	uncharacterized protein LOC541920 precursor ou uncharacterized protein	*Zea mays*	135	16	3/3	6,83/ 35,401	7,08/ 47,0	0,28	down	1,55	up	-----	nutrient reservoir activity
96	gi|228310	globulin 2 ou globulin-1 s allele-like	*Zea mays*	1137	41	38/13	6,16/ 50,234	6,80/ 47,0	0,33	down	0,64	down	-----	nutrient reservoir activity
Defesa e Estresse celular														
93	gi|22124	alcohol dehydrogenase 1	*Zea mays*	414	25	16/8	6,43/ 41,631	6,95/ 45,0	0,03	down	3,81	up	oxidation-reduction process/ response to hypoxia (baixo teor de O_2)/ response to cadmium ion/ response to salt stress	alcohol dehydrogenase (NAD) activity/ zinc ion binding/ Oxidoreductase
96	gi|22124	alcohol dehydrogenase 1	*Zea mays*	216	8	2/2	6,43/ 41,631	6,80/ 47,0	0,33	down	1,00	---	response to cadmium ion/ response to hypoxia/ response to salt stress/ oxidation-reduction process	alcohol dehydrogenase (NAD) activity/ zinc ion binding

Legenda: QP2: variedade BR – 451e CN: variedade BRS - 4103 (Embrapa Milho e Sorgo)

[a] Número de acesso no NCBI das proteínas diferencialmente expressas considerando um *fold* de 1,5 ou 50% ($p < 0,05$)

[b] *Up* e *down regulation* (*fold change*: IM2DP - maior ou igual a 1,5; menor ou igual a 0,67)

[c] *Up* e *down regulation* (*fold change*: emPAI - maior ou igual a 1,5; menor ou igual a 0,67)

Tabela 4 – Proteínas identificadas pela abordagem 2-DE de sementes de milho geneticamente modificada (GM1) em comparação com sua convencional genitora (CG1)

Spot	Nº de acesso[a]	Nome da proteína	Espécie	Escore Mascot	Cobert. Seq.(%)	Pept. Matched/ Nº Seq.	pI/PM (kDa) teór.	pI/PM (kDa) exp.	Fold change (2-DE) GM1/CG1	Expres. spot[b] GM1/CG1	Fold change (emPAI) GM1/CG1	Expressão ptn[c] GM1/CG1	Processo Biológico	Função Molecular
Metabolismo														
46	gi|226500748	uncharacterized protein LOC100272498 ou General stress protein 39	*Zea mays*	249	22	10/5	5,78/ 33,152	6,40/ 35,0	4,5	up	0,34	down	oxidation-reduction process	oxidoreductase activity
46	gi|108885236	glucose and ribitol dehydrogenase	*Oryza sativa Japonica Group*	47	8	3/2	5,76/ 32,475	6,40/ 35,0	4,5	up	0,24	down	oxidation-reduction process	oxidoreductase activity
74	gi|926657619	sorbitol dehydrogenase homolog 1	*Zea mays*	273	24	9/7	6,27/ 39,528	6,93/ 42,0	1,9	up	1,63	up	oxidation-reduction process	oxidoreductase activity/ zinc ion binding/ Metal-binding
78	gi|226496407	uncharacterized protein LOC100273311 ou aspartate cytoplasmic	*Zea mays*	931	30	42/13	8,54/ 50,379	8,25/ 44,0	0,3	down	1,25	---	response to misfolded protein/ fatty acid beta-oxidation/ proteasomal ubiquitin-dependent protein catabolic process/ ethylene biosynthetic process/toxin catabolic process/ proteasome core complex/ assembly/ root hair elongation/ tricarboxylic acid cycle/ aspartate metabolic process/ glutamate metabolic process/ 2-oxoglutarate metabolic process/ response to cytokinin stimulus/ alanine metabolic process	L-aspartate:2-oxoglutarate aminotransferase activity/ L-phenylalanine:2-oxoglutarate aminotransferase activity/ pyridoxal phosphate binding
83	gi|226496407	uncharacterized protein LOC100273311 ou Aspartate aminotransferase	*Zea mays*	673	29	18/11	8,54/ 50,379	7,78/ 43,0	0,5	down	0,66	down	biosynthetic process/ cellular amino acid metabolic process	L-aspartate:2-oxoglutarate aminotransferase activity/ L-phenylalanine:2-oxoglutarate aminotransferase activity/ pyridoxal phosphate binding/ Aminotransferase
86	gi|926657619	sorbitol dehydrogenase homolog 1 ou Uncharacterized protein	*Zea mays*	1057	55	38/13	6,27/ 39,528	6,47/ 44,0	0,4	down	1,3	---	oxidation-reduction process	oxidoreductase activity/ nucleotide binding/ zinc ion binding/ zinc ion binding

86	gi|77378040	sorbitol dehydrogenase	*Zea mays*	645	37	24/9	6,27/ 39,747	6,47/ 44,0	0,4	down	1,33	---	oxidation-redution-process	oxidoreductase activity/ nucleotide binding/ zinc ion binding/
117	gi|65331800	ADP-glucose pyrophosphorylase endosperm large subunit	*Zea mays*	220	21	9/6	6,32/ 46,226	6,24/ 63,0	0,7	down	0,35	down	glycogen biosynthetic process/ starch biosynthetic process	glucose-1-phosphate adenylyltransferase activity/ ATP binding
149	gi|162460741	sucrose synthase 1	*Zea mays*	552	19	28/16	5,93/ 92,073	6,44/ 128,0	5,3	up	0,21	up	response to anoxia/ sucrose metabolic process	sucrose synthase activity/ glycosyltransferase/ transferase
Energia														
74	gi|162461501	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, cytosolic 2	*Zea mays*	254	25	15/7	6,41/ 36,633	6,93/ 42,0	1,9	up	2,41	up	glucose metabolic process/ glycolytic process/ glycolysis	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (NAD+) (phosphorylating) activity/ NAD+ binding/ NADP binding/ phosphate ion binding/ Oxidoreductase
86	gi|162461501	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, cytosolic 2	*Zea mays*	609	41	11/7	6,41/ 36,633	6,47/ 44,0	0,4	down	0,85	---	glycolysis/ oxidation-reduction process	NAD and NADP binding/ glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (NAD+) (phosphorylating) activity
86	gi|162458671	LOC100037774 ou glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	*Zea mays*	160	17	5/3	6,61/ 36,656	6,47/ 44,0	0,4	down	0,9	---	seed development/ oxidation-reduction process/ response to sucrose stimulus/ response to salt stress/ defense response to bacterium/ response to heat/ glycolysis/ response to cadmium ion/ response to hydrogen peroxide	NAD binding/ copper ion binding/ zinc ion binding/ glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (NAD+) (phosphorylating) activity/ NADP binding
95	gi|194690156	unknown ou Fructose-bisphosphate aldolase	*Zea mays*	220	14	4/2	7,52/ 39,022	6,98/ 50,0	0,3	down	2,25	up	glycolytic process/ glycolysis	fructose-bisphosphate aldolase activity/ Lyase
Síntese de proteína														
46	gi|226503399	LOC100285098 ou Elongation factor 2	*Zea mays*	552	16	15/8	6,26/ 94,888	6,40/ 35,0	4,5	up	10,33	up	protein biosynthesis/ translational elongation/ GTP catabolic process/ response to cold	GTPase activity/ GTP binding/ translation elongation factor activity/ Elongation factor
98	gi|226505800	elongation factor 1-gamma 3	*Zea mays*	246	15	6/5	6,08/ 47,465	6,54/ 50,0	0,3	down	0,64	down	protein biosynthesis/ translational elongation	translation elongation factor activity/ copper ion binding/ protein binding

Armazenamento de proteína														
3	gi|22284	vicilin-like embryo storage protein	*Zea mays*	67	3	2/2	6,23/ 66,635	5,09/ 24,0	0,1	down	0,13	down	oxygen transport	Nutrient reservoir activity/ iron ion binding/ heme binding/ oxygen binding
4	gi|228310	globulin 2 ou globulin-1 s allele-like	*Zea mays*	101	3	2/2	6,16/ 50,234	5,64/ 24,0	0,1	down	0,28	down	------	nutrient reservoir activity
28	gi|228310	globulin 2 ou globulin-1 s allele-like	*Zea mays*	890	30	48/12	6,16/ 50,234	7,68/ 28,0	0,4	down	1,1	---	------	Nutrient reservoir activity
74	gi|228310	globulin 2 ou globulin-1 s allele-like	*Zea mays*	326	22	24/7	6,16/ 50,234	6,93/ 42,0	1,9	up	1,24	---	------	Nutrient reservoir activity
78	gi|228310	globulin 2 ou globulin-1 s allele-like	*Zea mays*	455	20	98/6	6,16/ 50,234	8,25/ 44,0	0,3	down	2,28	up	------	nutrient reservoir activity
92	gi|22284	vicilin-like embryo storage protein	*Zea mays*	377	19	14/8	6,23/ 66,635	9,96/ 48,0	0,23	down	1,22	---	oxygen transport	Nutrient reservoir activity/ iron ion binding/ heme binding/ oxygen binding
92	gi|3414845	globulin-1	*Zea mays subsp. parviglumis*	123	19	5/4	8,18/ 27,840	9,96/ 48,0	0,2	down	3,33	up	------	nutrient reservoir activity
95	gi|228310	globulin 2 ou globulin-1 s allele-like	*Zea mays*	1252	46	51/18	6,16/ 50,234	6,98/ 50,0	0,3	down	1,32	---	------	Nutrient reservoir activity
95	gi|821325083	uncharacterized protein LOC541920 precursor ou Uncharacterized protein	*Zea mays*	298	28	7/6	6,83/ 35,401	6,98/ 50,0	0,3	down	0,77	---	------	nutrient reservoir activity
98	gi|228310	globulin 2 ou globulin-1 s allele-like	*Zea mays*	1442	51	61/18	6,16/ 50,234	6,54/ 50,0	0,3	down	0,51	down	------	nutrient reservoir activity
101	gi|228310	globulin 2 ou globulin-1 s allele-like	*Zea mays*	1275	45	55/15	6,16/ 50,234	6,76/ 49,0	0,5	down	0,67	down	------	nutrient reservoir activity
Defesa e Estresse celular														
49	gi|194698864	unknown ou Uncharacterized protein	*Zea mays*	330	19	18/5	7,74/ 34,621	9,26/ 36,0	2,9	up	2,20	up	regulation of catalytic activity/ phenylpropanoid biosynthetic process	carbohydrate binding

56	gi|212275039	jasmonate-induced protein	*Zea mays*	132	14	7/4	7,79/ 34,581	8,12/ 37,0	0,3	down	0,45	down	regulation of catalytic activity/ phenylpropanoid biosynthetic process	carbohydrate binding
60	gi|194699266	unknown ou 60S acidic ribosomal protein P0	*Zea mays*	623	26	21/8	5,20/ 34,581	5,52/ 38,0	4,2	up	1,66	up	ribosome biogenesis/ translation elongation/ response to salt stress/ response to cold/ response to ion zinc	Ribonucleoprotein/ Ribosomal protein/ structural constituent of ribosome/ copper ion binding
86	gi|22124	alcohol dehydrogenase 1	*Zea mays*	191	25	9/6	6,43/ 41,631	6,47/ 44,0	0,4	down	2,89	up	oxidation-reduction process/ response to hypoxia (baixo teor de O_2)/ response to cadmium ion/ response to salt stress	alcohol dehydrogenase (NAD) activity/ zinc ion binding/ Oxidoreductase
Crescimento e Estrutura celular														
46	gi|226497424	embryonic protein DC-8 precursor	*Zea mays*	336	28	15/9	6,16/ 33,552	6,40/ 35,0	0,22	down	1,24	---	fatty acid catabolic process/ embryo development ending in seed dormancy	-
60	gi|242080463	hypothetical protein SORBIDRAFT_07 g002560 ou 60S acidic ribosomal protein P0	*Sorghum bicolor*	592	26	21/8	5,19/ 34,592	5,52/ 38,0	4,2	up	1,66	up	cytoplasmic translation/ ribosome biogenesis	large ribosomal subunit rRNA binding/ structural constituent of ribosome/ Ribonucleoprotein/ Ribosomal protein
114	gi|162460038	tubulin beta-7 chain	*Zea mays*	608	42	34/14	4,72/ 50,689	4,82/ 57,0	9,3	up	1,63	up	microtubule-based process/ GTP catabolic process/ protein polymerization/ response to cadmium ion	GTPase activity/ GTP binding/ structural constituent of cytoskeleton
114	gi|162463097	tubulin beta-2 chain	*Zea mays*	314	27	23/9	4,82/ 50,535	4,82/ 57,0	9,3	up	2,46	up	microtubule-based process/ GTP catabolic process/ protein polymerization/ response to cadmium ion	GTPase activity/ GTP binding/ structural constituent of cytoskeleton

Legenda: GM1: Tork TL, evento Bt 11 e CG1: Tork convencional

[a] Número de acesso no NCBI das proteínas diferencialmente expressas considerando um *fold* de 1,5 ou 50% ($p < 0,05$)

[b] *Up* e *down regulation* (*fold change*: IM2DP - maior ou igual a 1,5; menor ou igual a 0,67)

[c] *Up* e *down regulation* (*fold change*: emPAI - maior ou igual a 1,5; menor ou igual a 0,67)

*Presença do spot 28 com proteína equivalente, mas não diferencialmente expressa ($1,5 < x > 0,67$)

Tabela 5 – Proteínas identificadas pela abordagem 2-DE de sementes de milho geneticamente modificada (GM2) em comparação com sua convencional genitora (CG2)

Spot	Número de acesso[a]	Nome da proteína	Espécie	Escore Mascot	Cobert. Seq.(%)	Pept. matched/ Nº Seq.	pI/PM (kDa) teór.	pI/PM (kDa) exp.	Fold change (2-DE) GM2/CG2	Expres. spot [b] GM2/CG2	Fold change (emPAI) GM2/CG2	Expressão ptn[c] GM2/CG2	Processo Biológico	Função Molecular
Metabolismo														
14	gi|226509797	uncharacterized protein LOC100274579 ou phosphoglycerate cytosolic	*Zea mays*	100	14	7/3	5,65/ 42,470	7,01/ 17,0	0,42	down	0,64	down	response to endoplasmic reticulum stress/ glycolysis/ phosphorylation/ response to arsenic-containing substance/ response to cadmium ion	phosphoglycerate kinase activity/ ATP binding
51	gi|226500748	uncharacterized protein LOC100272498 ou glucose and ribitol dehydrogenase homolog 1	*Zea mays*	307	25	18/6	5,78/ 33,152	8,13/ 28,0	1,87	up	1,56	up	oxidation-reduction process	oxidoreductase activity
55	gi|162463106	phosphoglucomutase, cytoplasmic 1	*Zea mays*	123	7	2/2	5,46/ 63,286	5,34/ 30,0	5,32	up	1,27	---	response to cadmium ion/ glucose metabolic process/ gametophyte development	magnesium ion binding/ phosphoglucomutase activity
56	gi|226509797	uncharacterized protein LOC100274579 ou phosphoglycerate cytosolic	*Zea mays*	429	22	18/5	5,65/ 42,470	5,73/ 30,0	2,94	up	0,70	---	response to endoplasmic reticulum stress/ glycolysis/ phosphorylation/response to arsenic-containing substance/ response to cadmium ion	phosphoglycerate kinase activity/ ATP binding
67	gi|226500748	uncharacterized protein LOC100272498 ou glucose and ribitol dehydrogenase homolog 1	*Zea mays*	1053	63	49/18	5,78/ 33,152	6,37/ 34,0	3,02	up	1,87	up	oxidation-reduction process	oxidoreductase activity
67	gi|108885236	Glucose and ribitol dehydrogenase homolog	*Oryza sativa Japonica Group*	183	11	6/4	5,76/ 32,475	6,37/ 34,0	3,02	up	1,62	up	oxidation-reduction process	oxidoreductase activity
68	gi|226500748	uncharacterized protein LOC100272498 ou glucose and ribitol dehydrogenase homolog 1	*Zea mays*	1199	60	46/19	5,78/ 33,152	6,03/ 34,0	3,31	up	1,43	---	oxidation-reduction process	oxidoreductase activity

68	gi|108885236	Glucose and ribitol dehydrogenase homolog	*Oryza sativa Japonica Group*	262	12	8/5	5,76/ 32,475	6,03/ 34,0	3,31	up	1,00	---	oxidation-reduction process	oxidoreductase activity
70	gi|226500748	uncharacterized protein LOC100272498	*Zea mays*	134	13	3/3	5,78/ 33,152	6,71/ 34,0	0,11	down	1,00	---	oxidation-reduction process	oxidoreductase activity
86	gi|926657619	sorbitol dehydrogenase homolog 1 ou Uncharacterized protein	*Zea mays*	177	12	6/4	6,27/ 39,528	7,34/ 40,0	7,65	up	1,00	---	oxidation-reduction process	oxidoreductase activity/ nucleotide binding/ zinc ion binding
101	gi|226509797	uncharacterized protein LOC100274579 ou phosphoglycerate cytosolic	*Zea mays*	642	38	32/13	5,65/ 42,470	5,87/ 47,0	0,37	down	0,76	---	response to endoplasmic reticulum stress/ glycolysis/ phosphorylation/response to arsenic-containing substance/ response to cadmium ion	phosphoglycerate kinase activity/ ATP binding
101	gi|33321047	granule-bound starch synthase precursor	*Zea mays*	265	8	6/3	6,59/ 67,251	5,87/ 47,0	0,37	down	0,37	down	starch biosynthetic process	NDP-glucose-starch glucosyltransferase activity/ starch synthase activity
101	gi|226506370	acetyl-CoA acetyltransferase, cytosolic 1	*Zea mays*	45	7	2/2	6,15/ 41,618	5,87/ 47,0	0,37	down	1,00	---	metabolic process	transferase activity, transferring acyl groups other than amino-acyl groups
125	gi|293331027	uncharacterized protein LOC100382989 ou granule bound starch synthase	*Zea mays*	504	19	12/7	5,46/ 57,479	5,60/ 60,0	0,79	down	0,62	down	starch biosynthetic process	NDP-glucose-starch glucosyltransferase activity/ starch synthase activity
125	gi|821161537	granule-bound starch synthase 1, chloroplastic/amylo plastic precursor	*Zea mays*	446	21	15/10	6,59/ 66,609	5,60/ 60,0	0,79	down	0,62	down	starch biosynthetic process	NDP-glucose-starch glucosyltransferase activity/ starch synthase activity
125	gi|15054940	granule-bound starch synthase	*Zea luxurians*	278	22	9/4	5,39/ 29,448	5,60/ 60,0	0,79	down	0,48	down	starch biosynthetic process	NDP-glucose-starch glucosyltransferase activity/ starch synthase activity
139	gi|162463106	phosphoglucomuta se, cytoplasmic 1	*Zea mays*	724	36	26/15	5,46/ 63,286	5,86/ 79,0	0,26	down	1,11	---	response to cadmium ion/ glucose metabolic process/ gametophyte development	magnesium ion binding/ phosphoglucomutase activity

Energia														
30	gi|162462949	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, cytosolic 3	*Zea mays*	717	46	22/8	7,01/ 36,597	5,38/ 25,0	3,07	up	1,70	up	seed development/ oxidation-reduction process/ response to sucrose stimulus/response to salt stress/ defense response to bacterium/ response to heat/ glycolysis/ response to cadmium ion/ response to hydrogen peroxide	NAD binding/ copper ion binding/ zinc ion binding/ glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (NAD+) (phosphorylating) activity/NADP binding
55	gi|195608720	triosephosphate isomerase, cytosolic	*Zea mays*	178	21	8/4	7,72/ 25,217	5,34/ 30,0	5,32	up	1,61	up	response to misfolded protein/ pentose-phosphate shunt/ photorespiration/ gluconeogenesis/proteasoma l ubiquitin-dependent protein catabolic process/ water transport/ response to salt stress/ proteasome core complex assembly/ cellular carbohydrate metabolic process/ hyperosmotic response/ golgi organization/ response to zinc ion/ glycolysis/ response to cadmium ion/ aerobic respiration/ cysteine biosynthetic process/ response to temperature stimulus	triose-phosphate isomerase activity/ copper ion binding
56	gi|28172915	cytosolic 3-phosphoglycerate kinase	*Zea mays*	440	28	16/5	5,01/ 31,663	5,73/ 30,0	2,94	up	0,56	down	response to endoplasmic reticulum stress/ glycolysis/ phosphorylation/ response to arsenic-containing substance/ response to cadmium ion	phosphoglycerate kinase activity/ ATP binding
86	gi|162462949	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, cytosolic 3	*Zea mays*	422	27	14/8	7,01/ 36,597	7,34/ 40,0	7,65	up	0,79	---	seed development/ oxidation-reduction process/ response to sucrose stimulus/response to salt stress/ defense response to bacterium/ response to heat/ glycolysis/ response to cadmium ion/ response to hydrogen peroxide	NAD binding/ copper ion binding/ zinc ion binding/ glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (NAD+) (phosphorylating) activity/NADP binding

86	gi|120670	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 1, cytosolic	*Zea mays*	127	12	7/4	6,46/ 36,614	7,34/ 40,0	7,65	up	1,00	---	glucose metabolic process/ glycolytic process/ response to light stimulus/ glycolysis	oxidoreductase/ glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (NAD+) (phosphorylating) activity/ NAD+ binding/ NADP binding/ phosphate ion binding
101	gi|28172915	cytosolic 3-phosphoglycerate kinase	*Zea mays*	464	40	22/11	5,01/ 31,663	5,87/ 47,0	0,37	down	0,59	down	response to endoplasmic reticulum stress/ glycolysis/ phosphorylation/ response to arsenic-containing substance/ response to cadmium ion	phosphoglycerate kinase activity/ ATP binding
Armazenamento de proteína														
30	gi|195658011	globulin-1 S allele precursor	*Zea mays*	335	12	20/4	6,16/ 50,275	5,38/ 25,0	3,07	up	3,83	up	-----	nutrient reservoir activity
46	gi|228310	globulin 2 ou globulin-1 s allele-like	*Zea mays*	719	28	71/11	6,16/ 50,234	9,20/ 27,0	4,87	up	1,52	up	-----	nutrient reservoir activity
48	gi|228310	globulin 2 ou globulin-1 s allele-like	*Zea mays*	784	28	50/10	6,16/ 50,234	8,58/ 28,0	3,28	up	1,85	up	-----	nutrient reservoir activity
51	gi|228310_1802402A	globulin 2 ou globulin-1 s allele-like	*Zea mays*	780	28	39/10	6,16/ 50,234	8,208/ 28,0	1,87	up	1,00	---	-----	nutrient reservoir activity
55	gi|228310	globulin 2 ou globulin-1 s allele-like	*Zea mays*	220	11	6/4	6,16/ 50,234	5,34/ 30,0	5,32	up	1,71	up	-----	nutrient reservoir activity
55	gi|242041881	hypothetical protein SORBIDRAFT_01g043980 ou Putative uncharacterized protein Sb01g043980	*Sorghum bicolor*	98	4	4/2	6,24/ 75,423	5,34/ 30,0	5,32	up	1,00	---	-----	nutrient reservoir activity
56	gi|228310	globulin 2 ou globulin-1 s allele-like	*Zea mays*	110	5	2/2	6,16/ 50,234	5,73/ 30,0	2,94	up	1,00	---	-----	nutrient reservoir activity
67	gi|228310	globulin 2 ou globulin-1 s allele-like	*Zea mays*	234	19	7/6	6,16/ 50,234	6,37/ 34,0	3,02	up	0,52	down	-----	nutrient reservoir activity

68	gi|228310	globulin 2 ou globulin-1 s allele-like	*Zea mays*	256	19	14/6	6,16/ 50,234	6,03/ 34,0	3,31	up	3,29	up	-----	nutrient reservoir activity
70	gi|195658011	globulin-1 S allele precursor	*Zea mays*	240	17	8/6	6,16/ 50,275	6,71/ 34,0	0,11	down	0,27	down	-----	nutrient reservoir activity
Defesa e estresse celular														
14	gi|226507146	16.9 kDa class I heat shock protein 1	*Zea mays*	303	37	14/4	6,77/ 16,970	7,01/ 17,0	0,42	down	1,64	up	response to high light intensity/ protein oligomerization/ response to hydrogen peroxide/ heat acclimation	-----
14	gi|226504442	16.9 kDa class I heat shock protein 1	*Zea mays*	389	38	21/4	6,77/ 17,048	7,01/ 17,0	0,42	down	1,00	---	stress response	
Desconhecido														
86	gi|226507242	uncharacterized protein LOC100274379	*Zea mays*	274	30	13/9	6,30/ 38,770	7,34/ 40,0	7,65	up	2,17	up	-----	-----

Legenda: GM2: Maximus TLTG Viptera, evento Bt11 x MIR 162 x GA 21 e CG2: Maximus convencional (Syngenta Seeds)

[a] Número de acesso no NCBI das proteínas diferencialmente expressas considerando um *fold* de 1,5 ou 50% ($p < 0,05$)

[b] *Up* e *down regulation* (*fold change*: IM2DP - maior ou igual a 1,5; menor ou igual a 0,67)

[c] *Up* e *down regulation* (*fold change*: emPAI - maior ou igual a 1,5; menor ou igual a 0,67)

*Presença do spot 139 com proteína equivalente, mas não diferencialmente expressa (1,5 < x > 0,67)

**Spot 84 não apresentou proteína equivalente e foi excluído da análise

ANEXO C – Proteínas identificadas na abordagem *bottom up shotgun proteomics*

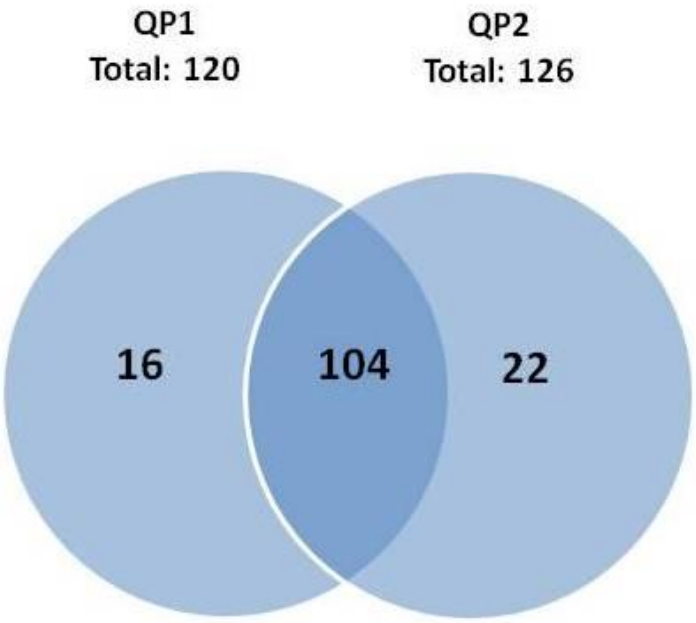

Figura 1 – Proteínas identificadas pela abordagem *bottom up shotgun proteomic* de sementes de milho com qualidade proteica melhorada (QP1 e QP2)

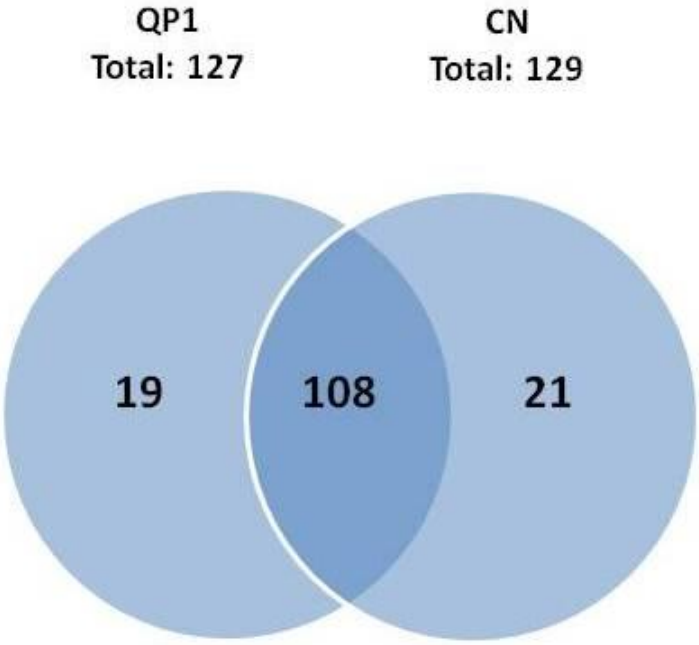

Figura 2 – Proteínas identificadas pela abordagem *bottom up shotgun proteomic* de sementes de milho com qualidade proteica melhorada (QP1) em comparação com uma convencional normal (CN)

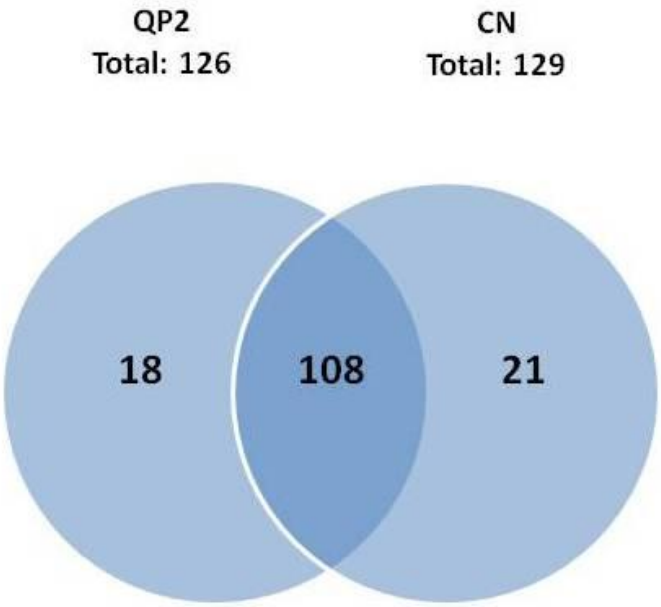

Figura 3 – Proteínas identificadas pela abordagem *bottom up shotgun proteomic* de sementes de milho com qualidade proteica melhorada (QP2) em comparação com uma convencional normal (CN)

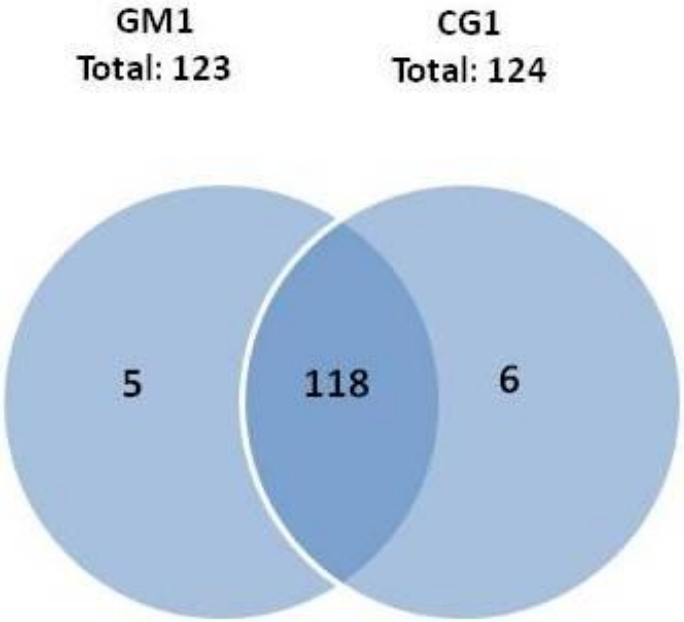

Figura 4 – Proteínas identificadas pela abordagem *bottom up shotgun proteomic* de sementes de milho geneticamente modificada (GM1) em comparação com sua convencional genitora (CG1)

Figura 5 – Proteínas identificadas pela abordagem *bottom up shotgun proteomic* de sementes de milho geneticamente modificada (GM2) em comparação com sua convencional genitora (CG2)

ANEXO D - Ficha do Aluno

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial

FICHA DO ALUNO

9131 - 4955211/1 - Priscila Robertina dos Santos Donado

Email:	priscila.robertina.santos@usp.br
Data de Nascimento:	29/06/1982
Cédula de Identidade:	RG - 34.869.044-7 - SP
Local de Nascimento:	Estado de São Paulo
Nacionalidade:	Brasileira
Graduação:	Engenheiro Agrônomo - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" - Universidade de São Paulo - São Paulo - Brasil - 2007
Mestrado:	Mestra em Ciências - Área: Ciência e Tecnologia de Alimentos - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" - Universidade de São Paulo - São Paulo - Brasil - 2011

Curso:	Doutorado
Programa:	Ciência dos Alimentos
Área:	Bromatologia
Data de Matrícula:	26/09/2012
Início da Contagem de Prazo:	26/09/2012
Data Limite para o Depósito:	26/10/2016
Orientador:	Prof(a). Dr(a). Flavio Finardi Filho - 26/09/2012 até o presente. Email: ffinardi@usp.br
Proficiência em Línguas:	Inglês, Aprovado em 26/09/2012
Prorrogação(ões):	30 dias Período de 26/09/2016 até 26/10/2016
Data de Aprovação no Exame de Qualificação:	Aprovado em 17/12/2014
Data do Depósito do Trabalho:	
Título do Trabalho:	
Data Máxima para Aprovação da Banca:	
Data de Aprovação da Banca:	
Data Máxima para Defesa:	
Data da Defesa:	

Resultado da Defesa:

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

Última ocorrência: Prorrogação em 23/09/2016

Impresso em: 22/10/2016 21:36:07

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Documento sem validade oficial

FICHA DO ALUNO

9131 - 4955211/1 - Priscila Robertina dos Santos Donado

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
EDM5102-3/3	Preparação Pedagógica PAE (Faculdade de Educação - Universidade de São Paulo)	13/03/2013	23/04/2013	60	0	-	-	N	Pré-matrícula indeferida
QBQ5802-4/1	Metodologias em Bioquímica e Biologia Molecular: Conceitos e Aplicações (Instituto de Química - Universidade de São Paulo)	19/03/2013	29/04/2013	60	4	100	A	N	Concluída
FBA5870-7/1	Tópicos em Ciência dos Alimentos e Nutrição I	02/04/2013	10/06/2013	30	2	100	A	N	Concluída
QBQ5778-4/1	Proteômica: Bases e Aplicações (Instituto de Química - Universidade de São Paulo)	04/10/2013	07/11/2013	30	0	-	-	N	Pré-matrícula indeferida
QBQ5722-5/2	Bioinformática (Instituto de Química - Universidade de São Paulo)	07/10/2013	20/10/2013	60	4	100	A	N	Concluída
FBA5903-1/1	Segurança dos Alimentos Geneticamente Modificados	10/03/2014	18/05/2014	60	4	100	A	N	Concluída
BTC5721-4/4	Tópicos Avançados em Química de Proteínas e Peptídeos para Aplicação Biotecnológica (Curso Interunidades: Biotecnologia - Universidade de São Paulo)	11/03/2014	14/04/2014	75	0	-	-	N	Pré-matrícula indeferida
ICB5731-1/1	Ferramentas de Bioinformática para Análise de Estruturas de	05/05/2014	15/06/2014	60	4	89	B	N	Concluída

	Proteínas (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)								
BTC5743-3/2	Seminários Gerais (Curso Interunidades: Biotecnologia - Universidade de São Paulo)	06/08/2014	18/11/2014	30	2	100	A	N	Concluída

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito de tese	
Disciplinas:	0	20	20
Estágios:			
Total:	0	20	20

Créditos Atribuídos à Tese: 167

Conceito a partir de 02/01/1997:

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

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

Última ocorrência: Prorrogação em 23/09/2016

Impresso em: 22/10/2016 21:36:07

ANEXO E - Currículo Lattes

Priscila Robertina dos Santos-Donado

Endereço para acessar este CV: http://lattes.cnpq.br/7753829692463788
Última atualização do currículo em 11/10/2016

Possui graduação em Engenharia Agronômica pela Universidade de São Paulo (2007). Desenvolveu estudos de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos na Universidade de São Paulo, em nivel de Mestrado, no campus da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz". Tem experiência em Produção Animal e Tecnologia de Alimentos, com ênfase em Qualidade e Processamento de Carnes e Produtos Cárneos. Atua principalmente nos seguintes temas: produção animal, proteínas miofibrilares, proteólise muscular, sistemas de embalagem (atmosfera modificada e vácuo) e atributos organolépticos de carne (cor, sabor, odor, suculência e maciez). Capacitada na realização de análises de qualidade de carne que incluem oxidação protéica (free thiols e carbonyls), oxidação lipídica, colágeno, índice de fragmentação miofibrilar (MFI), eletroforese (SDS-PAGE), imunodetecção (western blotting), microscopia eletrônica de transmissão (MET) e varredura (MEV), força de cisalhamento, drip loss, acidez e colesterol. Atualmente realiza estudos de doutorado em Ciência dos Alimentos pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, com ênfase em caracterização bioquímica e molecular de proteínas vegetais e seguranca e inocuidade de alimentos geneticamente modificados **(Texto informado pelo autor)**

Identificação

Nome
Priscila Robertina dos Santos-Donado

Nome em citações bibliográficas
SANTOS, Priscila Robertina dos;SANTOS, P.R.;dos SANTOS, P.R.;SANTOS, PRISCILA ROBERTINA; Santos-Donado, P.R.; DOS SANTOS, PRISCILA ROBERTINA

Endereço

Endereço Profissional

Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas.
Avenida Professor Lineu Prestes
Butantã
05508000 - São Paulo, SP - Brasil
Telefone: (11) 30913646
URL da Homepage: http://www.fcf.usp.br/

Formação acadêmica/titulação

2012

Doutorado em andamento em Ciências dos Alimentos (Conceito CAPES 7).
Universidade de São Paulo, USP, Brasil.
Título: Estudo proteômico de variedades de milho (Zea mays) obtidas por melhoramento clássico e

por recombinação genética, Ano de obtenção: 2016.
Orientador: Flávio Finardi Filho.
Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, Brasil.
Palavras-chave: caracterização bioquímica; caracterização molecular; proteínas vegetais; organismos geneticamente modificados.
Grande área: Ciências da Saúde
Grande Área: Ciências Agrárias / Área: Ciência e Tecnologia de Alimentos / Subárea: Ciência de Alimentos / Especialidade: Química, Física, Fisico-Química e Bioquímica dos Alim. e das Mat-Primas Alimentares.

2009 - 2011
Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos.
Universidade de São Paulo, USP, Brasil.
Título: Qualidade dos músculos Longissimus thoracis e lumborum de bovinos machos inteiros e fêmeas de descarte: influência da estocagem em atmosfera modificada e vácuo,Ano de Obtenção: 2011.
Orientador: Carmen Josefina Contreras Castillo.
Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, Brasil.
Palavras-chave: carne bovina; oxidação lipídica; oxidação protéica; atmosfera modificada; vácuo; cor.
Grande área: Ciências Agrárias
Grande Área: Ciências Agrárias / Área: Ciência e Tecnologia de Alimentos / Subárea: Ciência de Alimentos.

2003 - 2007
Graduação em Engenharia Agronômica.
Universidade de São Paulo, USP, Brasil.
Orientador: Eduardo Francisquine Delgado.
Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, Brasil.

Formação Complementar

2016 - 2016
Oficina de Aromas, Sistemas Sensoriais e Análise Sensorial à Alimentos. (Carga horária: 3h).
Faculdade de Ciências Farmacêuticas, FCF/USP, Brasil.

2015 - 2015
Curso Teórico "Imunoistoquímica - Uma Valiosa Ferramenta de Pesquisa". (Carga horária: 8h).
Instituto de Ciências Biomédicas, ICB/USP, Brasil.

2015 - 2015
Minicurso de Citometria de Fluxo. (Carga horária: 4h).
Instituto de Ciências Biomédicas, ICB/USP, Brasil.

2013 - 2013
Curso de Posgrado "Análisis regulatorio para la comercialización de OGMs. (Carga horária: 35h).
Universidad Nacional de Quilmes, UVQ, Argentina.

2010 - 2010
Técnicas de Microscopia Eletrônica de Transmissão. (Carga horária: 16h).
Universidade de São Paulo, USP, Brasil.

2008 - 2008
Mini Curso 2: Análise Sensorial de Alimentos. (Carga horária: 8h).
Universidade de São Paulo, USP, Brasil.

Atuação Profissional

Universidade de São Paulo, USP, Brasil.

Vínculo institucional

2012 - Atual
Vínculo: Colaborador, Enquadramento Funcional: Estudante de Doutorado, Carga horária: 40, Regime: Dedicação exclusiva.

Outras informações
Biotecnologia de Alimentos

Vínculo institucional

2016 - 2016
Vínculo: Bolsista, Enquadramento Funcional: Estágio Supervisionado, Carga horária: 6

Outras informações
Estágio Supervisionado em Docência do Programa de Aperfeiçoamento de Ensino, junto à disciplina FBA 0406 Fiscalização de Alimentos, ministrada aos alunos de graduação do curso de Farmácia e Bioquímica (turma diurno e noturno), no Departamento de Alimentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, com carga horária semanal de 6 horas, durante o 1º semestre de 2016, com desenvolvimento de atividades didáticas, sob supervisão da Profa. Dra. Ligia Bicudo de almeida Muradian.

Vínculo institucional
2014 - 2014
Vínculo: Bolsista, Enquadramento Funcional: Estágio Supervisionado, Carga horária: 6

Outras informações
Estágio Supervisionado em Docência do Programa de Aperfeiçoamento de Ensino, junto à disciplina FBA 0408 Gestão da Qualidade de Alimentos, ministrada aos alunos de graduação do curso de Farmácia e Bioquímica (turma diurno e noturno), no Departamento de Alimentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, com carga horária semanal de 6 horas, durante o 1º semestre de 2014, com desenvolvimento de atividades didáticas, sob supervisão do Prof. Dr. Flavio Finardi Filho

Vínculo institucional

2009 - 2011
Vínculo: Estudante de Pós-Graduação, Enquadramento Funcional: Estudante de Mestrado, Regime: Dedicação exclusiva.

Vínculo institucional

2010 - 2010
Vínculo: Bolsista, Enquadramento Funcional: Estágio Supervisionado, Carga horária: 6

Outras informações
Estágio Supervisionado em Docência do Programa de Aperfeiçoamento de ensino, junto à disciplina LAN 1444 Qualidade e Processamento de Alimentos de Origem Animal, ministrada aos alunos de graduação do curso de Engenharia Agronômica da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"

da Universidade de São Paulo, com carga horária semanal de 6 horas, durante o 1º semestre de 2010, com desenvolvimento de atividades didáticas, sob supervisão do Prof. Dr. Severino Matias de Alencar.

Vínculo institucional

2007 - 2009
Vínculo: Colaborador, Enquadramento Funcional: Pesquisador colaborador, Regime: Dedicação exclusiva.

Empresa Agropecuária Ponderosa LTDA, PONDEROSA, Brasil.
Vínculo institucional

2007 - 2007
Vínculo: Estagiário Profissionalizante, Enquadramento Funcional: Assistente Setor Administrativo e Operacional, Regime: Dedicação exclusiva.

Clínica Veterinária Dra. Luciana Machado, LUCIANAMACHADO, Brasil.
Vínculo institucional

2000 - 2003
Vínculo: Auxiliar, Enquadramento Funcional: Auxiliar Veterinário, Carga horária: 20

Projetos de pesquisa

2012 - Atual
Estudo proteômico de variedades de milho (Zea mays) obtidas por melhoramento clássico e por recombinação genética
Situação: Em andamento; Natureza: Pesquisa.
Alunos envolvidos: Doutorado: (1)
Integrantes: Priscila Robertina dos Santos Donado - Integrante / Flávio Finardi Filho - Coordenador / Gerby Giovanna Rondán Sanabria - Integrante.
Financiador(es): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - Auxílio financeiro.

2010 - 2012
Qualidade de carne bovina in natura embalada sob atmosfera modificada e vácuo
Descrição: Várias tecnologias são utilizadas pelas indústrias de carnes para prolongar a vida útil, evitar crescimento microbiano, manter a cor e qualidade cada vez mais exigida pelos consumidores. No entanto, ainda são desconhecidas quais as mudanças bioquímicas ocorrem na carne após o seu porcionamento, embalagem e estocagem, até chegar à mesa do consumidor. Com isso, o objetivo deste trabalho é averiguar o efeito de diferentes sistemas de embalagens, como a atmosfera modificada e o vácuo, sobre a estrutura muscular e estabilidade oxidativa (lipídica e protéica) de bifes de Longissimus dorsi (contra-filé) bovino de macho inteiro e fêmeas de descarte, por um período de armazenamento de 28 dias em refrigeração. Será verificado o efeito da oxidação protéica na textura da carne (maciez) e algumas características de qualidade. Para tanto, serão utilizadas diferentes composições gasosas, para avaliar qual a melhor metodologia a ser empregada pelas indústrias, a fim de agregar valor a carnes que são mantidas somente para a comercialização no mercado interno, sem diferenciação ou processadas e industrializadas, devido à baixa maciez, cor escura e sabor estranho. Análises de cor objetiva, pH, índice de fragmentação miofibrilar (MFI), força de cisalhamento (FC), oxidação lipídica (valor de TBARS), oxidação protéica, composição gasosa, colágeno total, eletroforese e microscopia de transmissão serão realizadas..
Situação: Em andamento; Natureza: Pesquisa.
Alunos envolvidos: Graduação: (2) / Mestrado acadêmico: (1)
Integrantes: Priscila Robertina dos Santos Donado - Integrante / Eduardo Francisquine Delgado -

Integrante / Carmen J. Contreras-Castillo - Coordenador / Anna Cecília Venturini - Integrante.
Financiador(es): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - Auxílio financeiro.

2009 - 2011
Estrutura Muscular e Estabilidade Oxidativa de Músculos Longissimus dorsi de Bovinos Frescos embalados sob atmosfera modificada e vácuo
Descrição: A indústria de carnes passa por um momento de reestruturação, visando atender não só o crescimento da demanda, mas também aspectos de qualidade cada vez mais exigidos pelo mercado consumidor, com alimentos, de preferência frescos, naturais e práticos para seu preparo. A vida útil da carne bovina in natura está diretamente relacionada com a qualidade inicial da carne, com a eficiência do sistema de embalagem, com as condições do ambiente em que são armazenadas e com a adequação da cadeia frigorífica às etapas de comercialização. O objetivo deste projeto é avaliar o efeito da embalagem de bifes de Longissimus dorsi (contra-filé) bovino sob atmosfera modificada e vácuo na estrutura muscular e estabilidade oxidativa (lipídica e protéica), por um período de armazenamento prolongado..
Situação: Concluído; Natureza: Pesquisa.
Alunos envolvidos: Graduação: (1) / Mestrado acadêmico: (1) .
Integrantes: Priscila Robertina dos Santos Donado - Integrante / Eduardo Francisquine Delgado - Integrante / Carmen J. Contreras-Castillo - Coordenador / Francisco Tanaka - Integrante.
Financiador(es): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - Auxílio financeiro.

2009 - 2011
Estrutura muscular e estabilidade oxidativa de músculos bovinos embalados a vácuo e sob atmosfera modificada
Descrição: Para a elaboração deste projeto serão utilizadas diferentes composições gasosas para as embalagens de atmosfera modificada, além do vácuo, para avaliar qual a melhor metodologia a ser empregada pelas indústrias, a fim de agregar valor a carnes que são comercializadas somente no mercado interno, sem diferenciação ou processadas e industrializadas, devido à baixa maciez, cor escura e sabor estranho.
Situação: Concluído; Natureza: Pesquisa.
Alunos envolvidos: Mestrado acadêmico: (1)
Integrantes: Priscila Robertina dos Santos Donado - Integrante/ Carmen J. Contreras-Castillo - Coordenador.
Financiador(es): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - Bolsa.

2008 - 2010
Marinação do Biceps femoris com proteina hridrolisada de soja e seu efeito sobre a estrutura muscular
Situação: Concluído; Natureza: Pesquisa.
Alunos envolvidos: Graduação: (1) / Mestrado acadêmico: (1)
Integrantes: Priscila Robertina dos Santos Donado - Integrante / Eduardo Francisquine Delgado – Integrante/Alessandra Aparecida da Silva - Integrante/ Carmen J. Contreras-Castillo - Coordenador/Elliot Kitajima - Integrante.
Financiador(es): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - Auxílio financeiro.

Áreas de atuação

---

1. Grande área: Ciências Agrárias / Área: Ciência e Tecnologia de Alimentos.
2. Grande área: Ciências Agrárias / Área: Ciência e Tecnologia de Alimentos / Subárea: Ciência de Alimentos/Especialidade: Avaliação e Controle de Qualidade de Alimentos.
3. Grande área: Ciências Agrárias / Área: Ciência e Tecnologia de Alimentos / Subárea: Tecnologia de Alimentos/Especialidade: Embalagens de Produtos Alimentares.

4. Grande área: Ciências Agrárias / Área: Ciência e Tecnologia de Alimentos / Subárea: Tecnologia de Alimentos/Especialidade: Tecnologia de Produtos de Origem Animal.

Idiomas

Espanhol
Compreende Bem, Fala Razoavelmente, Lê Bem, Escreve Bem.
Inglês
Compreende Pouco, Fala Pouco, Lê Bem, Escreve Razoavelmente.
Português
Compreende Bem, Fala Bem, Lê Bem, Escreve Bem.

Prêmios e títulos

2009
Primeiro lugar no processo seletivo do Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos ESALQ-USP 2009, ESALQ-USP.

Produções
Produção bibliográfica
Artigos completos publicados em periódicos

1. **SANTOS, PRISCILA ROBERTINA**; CONTRERAS-CASTILLO, CARMEN J. VENTURINI, A. Scientia Agropecuaria, v. 7, p. 401-408, 2016.

2. **DOS SANTOS, PRISCILA ROBERTINA**; DONADO-PESTANA, CARLOS M. ; FRANCISQUINE DELGADO, EDUARDO ; OSSAMU TANAKA, FRANCISCO ; CONTRERAS-CASTILLO, CARMEN J. . Tenderness and oxidative stability of Nellore bulls steaks packaged under vacuum or modified atmosphere during storage at 2°C. Food Packaging and Shelf Life, v. 4, p. 10-18, 2015.

3. DONADO-PESTANA, C. M. ; Salgado, J. M. ; Rios, A. O. ; **SANTOS, P.R.** ; Jablonski, A. . Stability of Carotenoids, Total Phenolics and In Vitro Antioxidant Capacity in the Thermal Processing of Orange-Fleshed Sweet Potato (Ipomoea batatas Lam.) Cultivars Grown in Brazil. Plant Foods for Human Nutrition (Dordrecht) JCR, p. 262-270, 2012.
Citações: WEB OF SCIENCE 8|SCOPUS 11

4. SILVA, A. A. ; CONTRERAS-CASTILLO, C. J. ; DELGADO, E. F. ; **SANTOS, Priscila Robertina dos** ; MOURAO, G. B. . Penetration of hydrolysed soy protein-added brine and its effect on yield and pH of beef steaks from the biceps femoris muscles.. Lebensmittel-Wissenschaft + Technologie / Food Science + Technology JCR, v. 44, p. 109/-114, 2011.
Citações: WEB OF SCIENCE 1|SCOPUS 2

Textos em jornais de notícias/revistas

1. SANTOS, P.R.. Estudo busca melhorar a qualidade da carne bovina. Jornal A Tribuna Piracicabana, Piracicaba, p. 10 - 10, 23 mar. 2012.

2. SANTOS, P.R.. Estudo da ESALQ monitora qualidade da carne bovina. Agrosoft Brasil, 20 mar. 2012.

3. SANTOS, P.R.. Qualidade de Carne. A Gazeta de Piracicaba, 18 mar. 2012.

Resumos expandidos publicados em anais de congressos

1. SANTOS, P.R.; CONTRERAS-CASTILLO, C. J. ; DONADO-PESTANA, C. M. ; ALMEIDA, M. A. ; DELGADO, E. F. . Tenderness and oxidative stability of beef in vacuum and modified atmosphere packaging. In: 58th International Congress of Meat Science and Technology, 2012, Montreal. The Healthy World of Meat, 2012.

2. SANTOS, P.R.; MARTIN, A.D. ; CONTRERAS-CASTILLO, C. J. ; MONTES-VILLANUEVA, N.D. ; DELGADO, E. F. . Avaliação do pHfinal no amaciamento natural de músculos Longissimus lumborum bovino sob diferentes sistemas de embalagens. In: VI Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Carnes, 2011, Campinas. Anais do VI Congresso Brasileiro, 2011.

3. SANTOS, P.R.; CONTRERAS-CASTILLO, C. J. ; DONADO-PESTANA, C.M. ; FELDMANN, V. . Estabilidade oxidativa e índice de maciez de bifes de bovinos machos inteiros embalados em atmosferas modificadas ou vácuo durante estocagem refrigerada. In: VI Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Carnes, 2011, Campinas. Anais do VI Congresso Brasileiro, 2011.

4. FELDMANN, V. ; **SANTOS, P.R.** ; CONTRERAS-CASTILLO, C. J. ; DELGADO, E. F. ; MONTES-VILLANUEVA, N.D. . Maciez de carne de bovinos machos inteiros embalados em atmosfera modificada. In: VI Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Carnes, 2011, Campinas. Anais do VI Congresso Brasileiro, 2011.

5. SANTOS, P.R.; CONTRERAS-CASTILLO, C. J. ; VENTURINI, A. C. . Estabilidade da cor da carne de bovinos machos inteiros embalados em atmosfera modificada. In: VI Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Carnes, 2011, Campinas. Anais do VI Congresso Brasileiro, 2011.

6. SANTOS, P.R.; CONTRERAS-CASTILLO, C. J. ; PINO, A.P.M. ; FELDMANN, V. ; DELGADO, E. F. . Amaciamento de carne bovina de fêmeas de descarte sob atmosfera modificada e vácuo. In: VIII Congreso Iberoamericano de Ingenieria de Alimentos, 2011, Lima. Anais do VIII Congreso Iberoamericano de Ingenieria de Alimentos, 2011.

7. SANTOS, P.R.; CONTRERAS-CASTILLO, C. J. ; DONADO-PESTANA, C.M. ; DELGADO, E. F. . Influencia de diferentes sistemas de embalagem na maciez e oxidação protéica de músculo Longissimus lumborum. In: VIII Congreso Iberoamericano de Ingenieria de Alimentos, 2011, Lima. Anais do VIII Congreso Iberoamericano de Ingenieria de Alimentos, 2011.

8. SANTOS, Priscila Robertina dos; SILVA, A. A. ; CASTILLO, C. J. C. ; LOBO JUNIOR, A. R. . Aceitação de diferentes formulações de lingüiça ovina por dois grupos de provadores. In: V Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Carnes, 2009, São Paulo. V Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Carnes, 2009.

9. BERNARDI, S. ; GOLINELI, B.B ; **SANTOS, P.R.** ; RUIZ, J.N. ; CONTRERAS-CASTILLO, C. J. . Própolis Livre e Microencapsulada: Efeito Antioxidante em Salame Tipo Italiano. In: V Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Carnes, 2009, Campinas. Anais do V Congresso Brasileiro, 2009.

10. SILVA, A. A. ; CONTRERAS-CASTILLO, C. J. ; DELGADO, E. F. ; HAGUIWARA, M.M.H ; MOURAO, G. B. ; ROSENFELD, N.C. ; **SANTOS, P.R.** . Marinação com proteína hidrolisada de soja e seu efeito no rendimento e pH de bifes do músculo Biceps femoris. In: V Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Carnes, 2009, Campinas. Anais do V Congresso Brasileiro, 2009.

11. SILVA, A. A. ; CONTRERAS-CASTILLO, C. J. ; DELGADO, E. F. ; MIYAGUSKU, L. ; **SANTOS, P.R.** ; MOURAO, G. B. ; ROSENFELD, N.C. . Massageamento de diferentes porções do músculo bovino Biceps femoris com diferentes tipos de salmouras sobre teor de colágeno total. In: V

Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Carnes, 2009, Campinas. Anais do V Congresso Brasileiro, 2009.

12. SILVA, A. A. ; CASTILLO, C. J. C. ; **SANTOS, Priscila Robertina dos** ; BERNARDI, S.; DELGADO, E. F. . Measuring brine penetration in beef tumbled with hydrolysed soybean protein. In: INTERNATIONAL CONFERENCE OF AGRICULTURAL ENGINEERING/ XXXVII CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA AGRICOLA/ ASABE S ILES VIII, 2008, 2008, Foz do Iguaçu - PR. INTERNATIONAL CONFERENCE OF AGRICULTURAL ENGINEERING, 2008.

Resumos publicados em anais de congressos

1. MARTIN, A.D. ; **SANTOS, P.R.** ; CONTRERAS-CASTILLO, C. J. . Qualidade de Carne Bovina: Avaliação dos bifes de Longissimus dorsi sob Diferentes Sistemas de Embalagem. In: 19º Simpósio Internacional de Iniciação Científica da USP, 2011, Piracicaba. Anais do 19º Simpósio Internacional de Iniciação Científica da USP, 2011.

2. FELDMANN, V. ; **SANTOS, P.R.** ; CONTRERAS-CASTILLO, C. J. . Qualidade de Carne Bovina: Avaliação dos bifes de Longissimus dorsi sob Diferentes Sistemas de Embalagem. In: 19º Simpósio Internacional de Iniciação Científica da USP, 2011, Piracicaba. Anais do 19º Simpósio Internacional de Iniciação Científica da USP, 2011.

3. **SANTOS, Priscila Robertina dos**; DELGADO, E. F. ; STELLA, I. L. ; SORIA, R. F. ; LEONARDO, E. F. Estabelecimento do Método de Fragmento Miofibrilar Retido por Filtragem e sua Correlação com o Índice de Fragmentação Miofibrilar e com Força de Cisalhamento em Carne Suína. In: 15 Simpósio Internacional de Iniciação Científica da USP, 2007, Pirassununga. Anais do 15 Simpósio Internacional de Iniciação Científica da USP. São Paulo: Universidade de São Paulo, 2007.

4. **SANTOS, Priscila Robertina dos**; STELLA, I. L. ; SANTOS, C. C. ; LEONARDO, E. F. ; DELGADO, E. F. . Correlação entre Maciez Instrumental e o Índice de Fragmentação Miofibrilar (MFI) em Carne Bovina Cozida e Crua. In: 14 Simpósio Internacional de Iniciação Científica da USP, 2006, Piracicaba. Anais do 14 Simpósio Internacional de Iniciação Científica da USP. São Paulo: Universidade de São Paulo, 2006.

5. **SANTOS, Priscila Robertina dos**; SANTOS, C. C. ; STELLA, I. L. ; LEONARDO, E. F. ; DELGADO, E. F. . Diferenças na relação Índice de Fragmentação Miofibrilar e Força de Cisalhamento em Três Porções do músculo L. dorsi bovino.. In: 14 Simpósio Internacional de Iniciação Científica da USP, 2006, Piracicaba. Anais do 14 Simpósio Internacional de Iniciação Científica da USP. São Paulo: Universidade de São Paulo, 2006.

6. MARCHIORI, P. E. R. ; **SANTOS, Priscila Robertina dos** ; LEONARDO, E. F. ; SORIA, R. F. ; SANTOS, C. C. ; SUSIN, I. ; DELGADO, E. F. . Estudo inicial do índice de fragmentação miofibrilar (MFI) em escala diminuta para o processo de classificação de animais por mérito de maciez através de biopsia. In: 13 Simpósio Internacional de Iniciação Científica da USP, 2005, Piracicaba. Anais do 12 Simpósio Internacional de Iniciação Científica da USP. São Paulo: Universidade de São Paulo, 2005.

7. **SANTOS, Priscila Robertina dos**; RIBEIRO, M. F. ; MENDES, C. Q. ; PIRES, A. V. ; RODRIGUES, G. H. ; ARAUJO, R. C. ; SUSIN, I. . Substituição do milho pela polp cítrica no concentrado inicial de cabritos em aleitamento.. In: 13º Simpósio Internacional de Iniciação Científica da USP, 2005, Piracicaba. Anais do 13º Simpósio Internacional de Iniciação Científica da USP, 2005.. São Paulo: Universidade de São Paulo, 2005.

Apresentações de Trabalho

1. DOS SANTOS-DONADO, PRISCILA ROBERTINA; FINARDI FILHO, F. Comparative Proteomic Analysis of Conventional and Transgenic Maize Seeds (Zea Mays) Commercialized in Brazil?. 2016. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

2. SANTOS, P.R.. Desvendando os transgênicos. 2014. (Apresentação de Trabalho/Conferência ou palestra).

3. SANTOS, P.R.. Estudio proteómico de variedades de maíz (Zea mays) obtidas por mejoramiento clásico y por recombinación genética: Análisis de imágenes de SDS-PAGE e 2D-SDS-PAGE. 2013. (Apresentação de Trabalho/Conferência ou palestra).

4. SANTOS, P.R.; CONTRERAS-CASTILLO, C. J. ; DONADO-PESTANA, C.M. ; DELGADO, E. F. . Influencia de Diferentes Sistemas de Embalagem na Maciez e Oxidação Protéica de Músculo Longissimus lumborum. 2011. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

5. SANTOS, P.R.; CONTRERAS-CASTILLO, C. J. ; DELGADO, E. F. ; PINO, A.P.M. ; FELDMANN, V. ; MONTES-VILLANUEVA, N.D. . Amaciamento de Carne Bovina de Fêmeas de Descarte sob Atmosfera Modificada e Vácuo. 2011. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

6. SANTOS, P.R.; CONTRERAS-CASTILLO, C. J. ; VENTURINI, A. C. . Estabilidade da Cor da Carne de Bovinos Machos Inteiros Embalados em Atmosfera Modificada. 2011. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

7. FELDMANN, V. ; **SANTOS, Priscila Robertina dos** ; CONTRERAS-CASTILLO, C. J. ; DELGADO, E. F. ; MONTES-VILLANUEVA, N.D. . Maciez de carne de bovinos machos inteiros embalados em atmosfera modificada. 2011. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

8. dos SANTOS, P.R.; CASTILLO, C. J. C. ; DONADO-PESTANA, C.M. ; FELDMANN, V. . Estabilidade oxidativa e índice de maciez de bifes de bovinos machos inteiros embalados em atmosferas modificadas ou vácuo durante estocagem refrigerada. 2011. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

9. SANTOS, Priscila Robertina dos; MARTIN, A.D. ; CASTILLO, C. J. C. ; MONTES-VILLANUEVA, N.D. ; DELGADO, E. F. . Avaliação do pHfinal no amaciamento natural de músculos Longissimus lumborum bovino sob diferentes sistemas de embalagens. 2011. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

10. FELDMANN, V. ; **SANTOS, P.R.** ; CASTILLO, C. J. C. . Qualidade de Carne Bovina: Avaliação dos bifes de Longissimus dorsi sob Diferentes Sistemas de Embalagem. 2011. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).

11. MARTIN, A.D. ; **SANTOS, P.R.** ; CONTRERAS-CASTILLO, C. J. . Avaliação do amaciamento natural de músculos Longissimus lumborum bovino sob diferentes sistemas de embalagens. 2011. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).

12. SANTOS, P.R.; SILVA, A. A. ; CASTILLO, C. J. C. ; LOBO JUNIOR, A. R. . Aceitação de diferentes formulações de lingüiça ovina por dois grupos de provadores. 2009. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

13. SILVA, A. A. ; CASTILLO, C. J. C. ; DELGADO, E. F. ; HAGUIWARA, M.M.H ; MOURAO, G. B. ; ROSENFELD, N.C. ; **SANTOS, P.R.** . Marinação com proteína hidrolisada de soja e seu efeito no rendimento e pH de bifes do músculo Biceps femoris. 2009. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

14. BERNARDI, S. ; GOLINELI, B.B ; **SANTOS, P.R.** ; RUIZ, J.N. ; CONTRERAS-CASTILLO, C. J. . Própolis Livre e Microencapsulada: Efeito Antioxidante em Salame Tipo Italiano. 2009. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

15. SILVA, A. A. ; CASTILLO, C. J. C. ; **SANTOS, P.R.** ; BERNARDI, S. ; DELGADO, E. F. . Measuring brine penetration in beef tumbled with hydrolyzed soybean protein. 2008. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

16. SANTOS, Priscila Robertina dos; STELLA, I. L. ; SORIA, R. F. ; LEONARDO, E. F. ; DELGADO, E. F. . Estabelecimento do Método de Fragmento Miofibrilar Retido por Filtragem e sua Correlação com o Índice de Fragmentação Miofibrilar e com Força de Cisalhamento em Carne Suína.. 2007. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).

17. SANTOS, P.R.; STELLA, I. L. ; SANTOS, C. C. ; LEONARDO, E. F. ; DELGADO, E. F. . Correlação entre Maciez Instrumental e o Índice de Fragmentação Miofibrilar em Carne Bovina Cozida e Crua. 2006. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).

18. SANTOS, P.R.; SANTOS, C. C. ; STELLA, I. L. ; LEONARDO, E. F. ; DELGADO, E. F. . Índice de Fragmentação Miofibrilar e Força de Cisalhamento em Três Porções do músculo Longissimus dorsi bovino. 2006. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).

19. MARCHIORI, P. E. R. ; **SANTOS, P.R.** ; LEONARDO, E. F. ; SORIA, R. F. ; SANTOS, C. C. ; SUSIN, I. ; DELGADO, E. F. . Estudo inicial do índice de fragmentação miofibrilar (MFI) em escala diminuta para o processo de classificação de animais por mérito de maciez através de biopsia. 2005. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).

20. SANTOS, P.R.; RIBEIRO, M. F. ; MENDES, C. Q. ; PIRES, A. V. ; RODRIGUES, G. H. ; ARAUJO, R. C. ; SUSIN, I. . Substituição do milho pela polpa cítrica no concentrado inicial de cabritos em aleitamento. 2005. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).

Produção técnica

Entrevistas, mesas redondas, programas e comentários na mídia

1. SANTOS, Priscila Robertina dos. Embalagem de cArne sem oxigênio deixa a carne mais macia. 2012. (Programa de rádio ou TV/Entrevista).

2. SANTOS, Priscila Robertina dos. Programa Nossa Gente: Qualidade de Carne Bovina embalada em atmosfera modificada e vácuo. 2012. (Programa de rádio ou TV/Entrevista).

Demais tipos de produção técnica

Bancas

Participação em bancas de trabalhos de conclusão

Trabalhos de conclusão de curso de graduação

1. dos SANTOS, P.R.; VENTURINI, A. C.; BRAZACA, S. G.. Participação em banca de Vanessa Feldmann.Qualidade de carne bovina: Avaliação dos bifes de Longissimus dorsi sob diferentes sistemas de embalagem. 2011. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências dos Alimentos) - Universidade de São Paulo.

Eventos

Participação em eventos, congressos, exposições e feiras

1. 51ª Semana Universitária Paulista de Farmácia e Bioquímica. 2016. (Simpósio).

2. XXI SEMANA FARMACÊUTICA DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA. ?Comparative Proteomic Analysis of Conventional and Transgenic Maize Seeds (Zea Mays) Commercialized in Brazil?. 2016. (Congresso).

3. I Workshop em Análise Bioinformática de dados de microbioma. 2015. (Outra).

4. Seminário Agroecológico da Cultura do Cambuci. 2015. (Seminário).

5. Grupo de Estudos de Nutrição em Cardiologia: Desvendando os Transgênicos.Desvendando os Transgênicos. 2014. (Outra).

6. Análisis Regulatorio para la Comercialización de Cultivos Genéticamente Modificados.Estudio proteómico de variedades de maíz (Zea mays) obtidas por mejoramiento clásico y por recombinación genética: Análisis de imágenes de SDS-PAGE e 2D-SDS-PAGE. 2013. (Outra).

7. Encontro de Regulamentação de OGMs. 2013. (Encontro).

8. Simpósio ?Aplicações da Metabolômica na Pesquisa em Alimentos, Nutrição e Agricultura?. 2013. (Simpósio).

9. 29° Semana da Química do IQ/USP. "Química em 2012": Desmistificando o fim do mundo. Palestra: Transgenia - Prof. Walter Colli.. 2012. (Outra).

10. 3° Workshop de Capacitação para Pesquisadores da USP em Publicação Científica. 2012. (Outra).

11. XI Simpósio de Biossegurança e Descartes de Produtos Químicos PeriPerigosos em Instituições de Ensino e Pesquisa. 2012. (Simpósio).

12. 1° Simpósio Internacional de Avaliação Animal e Qualidade da Carne.. 2011. (Simpósio).

13. 19º Simpósio Internacional de Iniciação Científica da USP.Qualidade de Carne Bovina: Avaliação dos bifes de Longissimus dorsi sob Diferentes Sistemas de Embalagem. 2011. (Simpósio).

14. VI Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Carnes. Estabilidade da Cor da Carne de Bovinos Machos Inteiros Embalados em Atmosfera Modificada. 2011. (Congresso).

15. VIII Congreso Iberoamericano de Ingenieria de Alimentos. Influencia de Diferentes Sistemas de Embalagem na Maciez e Oxidação Protéica de Músculo Longissimus lumborum. 2011. (Congresso).

16. I Workshop Internacional de Eletroforese Capilar e Tecnologia de Microchip. 2010. (Outra).

17. Palestras de Atualização em Biotecnologia: Fronteiras da Biotecnologia Animal, Vegetal e Bioética. 2010. (Outra).

18. Treinamento em Técnicas de Microscopia Eletrônica de Transmissão 2010/1.Técnicas em Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET). 2010. (Outra).

19. V Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Carnes. Aceitação de diferentes formulações de lingüiça ovina por dois grupos de provadores. 2009. (Congresso).

20. III Simpósio Brasileiro de Carne Bovina: Redução de Riscos e Aumento de Rentabilidade com Sustentabilidade. 2008. (Simpósio).

21. International Conference of Agricultural Engineering/XXXVII Congresso Brasileiro de Engenharia Agrícola. Measuring brine penetration in beef tumbled with hydrolyzed soybean protein. 2008. (Congresso).

22. Marketing em Alimentos e Agronegócios. 2008. (Outra).

23. TREINAMENTO DO PROGRAMA 5S.Programa 5S. 2008. (Outra).

24. VII Simpósio Saiba Mais Sobre Alimentos. 2008. (Simpósio).

25. WORKSHOP SOBRE PROCESSAMENTO DE PRODUTOS CÁRNEOS.WORKSHOP SOBRE PROCESSAMENTO DE PRODUTOS CÁRNEOS. 2008. (Outra).

26. 15º Simpósio Internacional de Iniciação Científica da USP.Estabelecimento do Método de Fragmento Miofibrilar Retido por Filtragem e sua Correlação com o índice de Fragmentação Miofibrilar e com Força de Cisalhamento em Carne Suína. 2007. (Simpósio).

27. 6° Simpósio de Bovinocultura de Corte ? Requisitos de Qualidade na Bovinocultura de Corte. 2007. (Simpósio).

28. Encontro de Produtores, Noções Básicas de Pós-Colheita ? Hortaliças Minimamente Processadas. 2007. (Encontro).

29. II Curso de Gestão Agroeconômica da Pecuária de Corte. 2007. (Outra).

30. GIC - 2º PIBIC na ESALQ. Programa PIBIC - CNPq / ESALQ / USP 2005-2006.Correlações entre maciez instrumental e o índice de fragmentação miofibrilar (MFI) em carne bovina cozida e crua. 2006. (Outra).

31. 14º Simpósio Internacional de Iniciação Científica da USP.Diferenças na relação Índice de Fragmentação Miofibrilar e Força de Cisalhamento em Três Porções do músculo L. dorsi bovino. 2006. (Simpósio).

32. Programa Portas Abertas - Bellman Nutrição Animal. 2006. (Outra).

33. Simpósio Brasileiro de Carne Bovina ? Perspectivas da Bovinocultura de Corte: Investir na Crise ou na Recuperação da Atividade. 2006. (Simpósio).

34. 13º Simpósio Internacional de Iniciação Científica da USP.Substituição do milho pela polpa cítrica no concentrado inicial de cabritos em aleitamento. 2005. (Simpósio).

35. Feira Internacional de Tecnologia Agrícola em Ação (AGRISHOW/2005).Colaboração nas atividades do estande da Escola Superior de Agricultura ?Luiz de Queiroz? (ESALQ) da Universidade de São Paulo (USP). 2005. (Outra).

36. I Simpósio de Microbiologia e Biotecnologia.. 2005. (Simpósio).

37. Seminário Agroenergia ? Novo Paradigma para Agricultura Moderna. 2005. (Seminário).

38. Exposição Agrícola e Tecnológica. Encontro Regional de Ovinocultores ? EATEC. 2004. (Encontro).

39. Feira Internacional de Soluções e Tecnologia para a Indústria Alimentícia. Food Ingredients South América (FI). 2004. (Outra).

40. Palestra de Ovinocultura. 2004. (Outra).

41. Compostagem e suas Aplicações. Um enfoque teórico-prático da reutilização de resíduos orgânicos na agropecuária. CEPARA - Centro de Pesquisa para o Aproveitamento de Resíduos Agroindustriais. Universidade de São Paulo (USP). 2003. (Outra).

Organização de eventos, congressos, exposições e feiras

1. SANTOS, Priscila Robertina dos; CASTILLO, C. J. C. . WORKSHOP SOBRE PROCESSAMENTO DE PRODUTOS CÁRNEOS. 2008. (Outro).

Outras informações relevantes

Bolsista CAPES (Doutorado) 2012 a 2016.

Bolsista FAPESP (Mestrado) 2009 a 2011 Processo No. 2009/13559-0.

Bolsista PIBIq (Iniciação científica) 2005 a 2007.