UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos

Área de Bromatologia

Análise diferencial do proteoma da polpa do mamão
durante o amadurecimento utilizando eletroforese
bidimensional

Silvia Beserra Nogueira

Tese para obtenção do título de

DOUTOR

Orientador:

Prof. Dr. João Roberto Oliveira do Nascimento

**São Paulo
2010**

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos

Área de Bromatologia

Análise diferencial do proteoma da polpa do mamão
durante o amadurecimento utilizando eletroforese
bidimensional

Silvia Beserra Nogueira

Tese para obtenção do título de
DOUTOR

Orientador:

Prof. Dr. João Roberto Oliveira do Nascimento

**São Paulo
2010**

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

Nogueira, Silvia Beserra
N778a Análise diferencial do proteoma da polpa do mamão durante
o amadurecimento utilizando eletroforese bidimensional / Silvia
Beserra Nogueira. -- São Paulo, 2010.
100p.
Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da
Universidade de São Paulo. Departamento de Alimentos e Nutrição
Experimental
Orientador: Nascimento, João Roberto Oliveira do
1. Bromatologia 2. Frutas : Pós-colheita : Tecnologia de
alimentos 3. Proteína : Ciências dos alimentos I. T. II.
Nascimento, João Roberto Oliveira do, orientador.

641 CDD

Silvia Beserra Nogueira

Análise diferencial do proteoma da polpa do mamão durante
o amadurecimento utilizando eletroforese bidimensional

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Prof. Dr. João Roberto Oliveira do Nascimento
Presidente/Orientador

1º Examinador

2º Examinador

3º Examinador

4º Examinador

São Paulo, de de 2010.

AGRADECIMENTOS

À Deus por guiar meus passos em todos os momentos.

Ao meu marido, Thiago Kanyo Dutra, por acreditar em mim, me apoiar sempre e fazer minha vida mais feliz.

Aos meus queridos pais Ademiro da Silva Nogueira e Maria das Graças Beserra Nogueira pelo amor e por toda uma vida de luta para que eu chegasse até aqui.

Ao meu irmão Leandro Beserra Nogueira pelo amor e amizade.

À minha família e parentes que torcem por mim mesmo a distância.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo por possibilitar a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. João Roberto Oliveira do Nascimento pela confiança depositada, paciência e orientação durante o curso.

Ao CNPq pela concessão da bolsa e à FAPESP pelos auxílios financeiros (02/12452-9 e 2008/52447-0).

Ao Prof. Dr. Carlos Alberto Labate que prontamente permitiu a utilização de seu laboratório para a realização de algumas análises.

Ao Prof. Dr. Fábio Cesar Gozzo por possibilitar a realização de algumas análises.

Aos demais professores do Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, em especial a Prof. Dra. Beatriz Rosana Cordenunsi e ao Prof. Dr. Eduardo Purgatto pelo carinho e colaboração.

Às técnicas do laboratório de química e bioquímica de alimentos por facilitarem nosso trabalho, em especial a Tânia Misuzu Shiga pelo carinho e amizade.

À todos os amigos de laboratório Luiz Marcelo Eugênio, Renato Astorino Filho, Tatiana Torres Toledo, Roberta Ghedine der Agopian, Claudineia Aparecida Soares, Cíntia e tantos outros que passaram e deixaram saudade, pelo convívio agradável e amizade.

E a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho,
Muito Obrigada!

NOGUEIRA, S.B. **Análise diferencial do proteoma da polpa do mamão durante o amadurecimento utilizando eletroforese bidimensional.** Tese de Doutorado, 2010, 100p. [Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo].

RESUMO

O mamão papaia (*Carica papaya* L.) é uma fruta tropical de grande relevância comercial uma vez que o Brasil é o maior produtor mundial e terceiro maior exportador da fruta. Contudo, por ser uma fruta climatérica, tem uma vida pós-colheita limitada, devido ao rápido amaciamento da polpa. Neste trabalho foi realizada uma investigação proteômica comparativa de polpa do mamão verde e maduro. Várias centenas de componentes protéicos (*spots*) foram resolvidos em géis 2-DE (faixa de pH 4-7) utilizando a eletroforese diferencial em gel (DIGE) e posteriormente as imagens geradas foram analisadas pelo programa PDQuest. Os *spots* diferencialmente expressos foram retirados do gel, digeridos e sequenciados (ESI-Q-TOF-MS/MS). Em geral, as proteínas diferencialmente expressas foram associadas ao metabolismo do etileno, resposta ao estresse, metabolismo de carbono e outros importantes processos fisiológicos. Os papéis de algumas das proteínas identificadas foram discutidos em relação à qualidade dos frutos do mamão. Este estudo fornece a primeira caracterização das mudanças no proteoma da polpa do mamão durante o amadurecimento. Deste modo a identificação de proteínas envolvidas na instalação ou desenvolvimento do amadurecimento pode contribuir para o entendimento deste processo e, também, gerar subsídios para avanços tecnológicos visando à qualidade e diminuição das perdas pós-colheita.

Palavras-chave: Amadurecimento dos frutos, Proteoma diferencial, DIGE, *Carica papaya* L.

NOGUEIRA, S.B. **Differential analysis of papaya fruit proteome during ripening using two-dimensional electrophoresis**. Tese de Doutorado, 2010, 100p. [Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo].

ABSTRACT

Papaya (*Carica papaya* L.) fruit is a relevant tropical crop since Brazil is the world's largest producer and third largest exporter of fruit. However being a climacteric fruit, has a limited green life due to the rapid pulp softening. We report here a comparative proteomic investigation of fruit pulp from unripe and ripe papayas. Several hundreds of protein components were resolved on 2-DE gels (pH range 4–7) using the differential gel electrophoresis (DIGE) approach, and images were analyzed by PDQuest. The variable components were excised, in-gel digested and were analyzed by ESI-Q-TOF-MS/MS. In general, the differentially expressed proteins were associated to ethylene metabolism, stress response, carbon metabolism and other important physiological processes. The roles of some of the identified proteins were discussed in relation to papaya fruit quality. To the best of our knowledge, this investigation provides the first characterization of the changes in papaya fruit pulp proteome during ripening. Thus the identification of proteins involved in the installation or development of the ripening may contribute to the understanding of this process and also provide subsidies for technological advances aimed at quality and reduction of post harvest losses.

Keywords: Fruit ripening, Differential proteome, DIGE, *Carica papaya* L.

ABREVIATURAS

1-MCP	1-Metilciclopropeno
2DE	eletroforese bidimensional
CCD	dispositivo de carga acoplada (<i>charge-coupled device</i>)
CBB	<i>coomassie brilliant blue</i>
DIGE	eletroforese diferencial em gel (<i>difference gel electrophoresis</i>)
DPC	dias pós-colheita
DTT	ditiotreitol (tio-1,4-dimercapto-2,3-butanodiol)
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético (<i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>)
ESI	ionização por <i>electrospray</i> (<i>electrospray ionization</i>)
EST	<i>expressed sequence tags</i>
FID	detector de ionização de chama (<i>fire ionization detector</i>)
FT-MS	ressonância de <i>íon ciclotron</i> de transformada (<i>fourier transform íon cyclotron</i>)
IEF	focalização isoelétrica (<i>isoelectric focusing</i>)
IPG	gradiente imobilizado de pH (<i>immobilized pH gradient</i>)
IPP	isopentenil-difosfato
kDa	<i>quilodalton</i>
LC-MS	cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa
LED	diodo emissor de luz
MALDI	espectrometria de massa por desorção e ionização a laser assistida (<i>matrix-assisted laser desorption/ionization</i>)
MSDB	<i>mass spectrometry protein sequence data base</i>
MS	espectrometria de massas

m/z	razão massa carga
PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida (<i>polyacrylamide gel electrophoresis</i>)
pI	ponto isoelétrico
PG	<i>poligalacturonase</i>
PL	<i>pectate liase</i>
PME	<i>pectinametil esterase</i>
ppm	Partes por milhão
SDS	dodecil sulfato de sódio (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
TCA	ácido tricloroacético
TCD	detector de condutividade térmica (<i>thermal conductivity detector</i>)
TOF	Tempo de voo (<i>time-of-flight</i>)
TRIS	(hidroximetil) aminometano (<i>hydroxymethylaminomethane</i>)
V	Voltagem
Vh	volts-hora

SUMÁRIO

	Pág.
1. INTRODUÇÃO	01
1.1 Expressão gênica e amadurecimento.....	03
1.2 Proteômica.....	05
2. OBJETIVO.....	13
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	14
3.1 Amostras.....	14
3.2 Caracterização das amostras.....	14
3.3 Extração de proteínas.....	16
3.4 Eletroforese SDS-PAGE.....	17
3.5 Eletroforese bidimensional-2DE.....	17
3.6 Análise das imagens dos géis corados com <i>coomassie brilliant blue</i> ...	22
3.7 Análise das imagens dos géis de proteínas marcadas por fluorescência-DIGE.....	23
3.8 Digestão de proteínas.....	25
3.9 LC-MS/MS.....	26
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	27
4.1 Amostragem.....	27
4.2 Extração de proteínas	30
4.3 Eletroforese bidimensional: géis corados com <i>coomassie brilliant blue</i>	33
4.4 Análise DIGE.....	42
4.5 Seleção dos <i>spots</i> para digestão.....	50
4.6 Espectrometria de massas	51
4.6.1 Taxa de identificação de proteínas em <i>Carica papaya</i> L.....	51
4.7 Classificação funcional das proteínas.....	57
4.7.1 Síntese e regulação de etileno.....	57
4.7.2 Hidrolases.....	64
4.7.3 Metabolismo secundário.....	66
4.7.4 Metabolismo energético.....	68
4.7.4.1 Metabolismo de carbono.....	70

4.7.5 Síntese e armazenamento de proteínas.....	72
4.7.6 Proteínas de resposta ao estresse.....	73
4.7.7 Proteínas de estresse oxidativo.....	77
4.7.8 Múltiplos <i>spots</i> de uma mesma proteína.....	79
5. CONCLUSÃO.....	81
6. REFERÊNCIAS.....	83
7. ANEXOS	97

LISTA DE TABELAS

	Pág.
Tabela 1. Esquema de marcação com as cianidinas (Cy2, Cy3 e Cy5) dos dois pontos de maturação para cada amostragem.....	20
Tabela 2. Análise qualitativa da presença de <i>spots</i> de proteínas nos extratos dos grupos de amostras representativas do mamão papaia nos estádios de maturação verde e maduro. Os valores correspondem às médias das densidades óticas encontradas para a triplicata de géis e a razão entre esses valores.....	39
Tabela 3. Análise quantitativa da presença de <i>spots</i> de proteínas nos extratos dos grupos de amostras representativas do mamão papaia nos estádios de maturação verde e maduro. Os valores correspondem às médias das densidades óticas encontradas para a triplicata de géis e a razão entre esses valores.....	41
Tabela 4. Análise qualitativa da presença de <i>spots</i> de proteínas nos extratos dos grupos de amostras representativas do mamão papaia nos estádios de maturação verde e maduro. Os valores correspondem às médias das densidades óticas encontradas para a triplicata de géis e a razão entre esses valores.....	46
Tabela 5. Análise qualitativa da presença de <i>spots</i> de proteínas nos extratos dos grupos de amostras representativas do mamão papaia nos estádios de maturação verde e maduro. Os valores correspondem às médias das densidades óticas encontradas para a triplicata de géis e a razão entre esses valores.....	47
Tabela 6. Proteínas de <i>Carica papaya</i> L. identificadas através da análise DIGE durante o amadurecimento do fruto.....	53

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
<p>Figura 1. Caracterização fisiológica de três distintas amostragens do mamão papaia. As amostragens I (linhas pretas) e II (linhas vermelhas) e III (linhas azuis) tiveram o amadurecimento acompanhado pelos seguintes parâmetros: A) quantidade de CO₂ produzido pela respiração dos frutos, B) etileno produzido pelos frutos, C) firmeza da polpa. As barras verticais representam o erro padrão das médias n=6 amostragens I e II, n= 9 amostragem III).....</p>	28
<p>Figura 2. Caracterização fisiológica de três amostragens distintas do mamão papaia. Imagens dos frutos mostrando as mudanças típicas na cor da casca e da polpa para as amostragem I (a), II (b) e III (c) (DPC dias pós-colheita)...</p>	29
<p>Figura 3. Eletroforese sob condições desnaturantes (SDS-PAGE) de proteínas extraídas da polpa do mamão papaia. As letras A, B e C indicam os extratos de amostras pré-climatéricas obtidas das amostragens I, II e III, respectivamente, enquanto as letras D, E, e F indicam os extratos de amostras climatéricas das amostragens I, II e III, respectivamente, separadas em gel de poliacrilamida 12% (SDS-PAGE). As proteínas foram coradas utilizando-se <i>coomassie brilliant blue</i>. Os números à esquerda indicam o tamanho das bandas do padrão de peso molecular, em KDa.....</p>	32
<p>Figura 4. Eletroforese bidimensional de proteínas da polpa do mamão papaia verde (a) e maduro (b). As proteínas foram separadas em um gradiente de pH 3-10 na primeira dimensão e em SDS-PAGE 12% na segunda dimensão. As proteínas foram coradas utilizando a coloração com <i>coomassie brilliant blue</i>. Os números a esquerda indicam o tamanho da banda do padrão de peso molecular em KDa.....</p>	34
<p>Figura 5. Imagens dos géis resultantes das análises DIGE do mamão papaia verde e maduro. A coluna verde 1,2,3 representa as imagens do mamão verde foram marcados com Cy3 e 4,5,6 as que foram marcados com Cy5. A coluna <i>pool</i> todas as imagens foram marcadas com Cy2. A coluna maduro 1,2,3 representa as imagens de mamão maduro que foram marcadas com Cy5 e 4,5,6 as que foram marcadas com Cy3. As linhas representam as três imagens pertencentes ao mesmo gel.....</p>	44

Figura 6.	Imagem multicanal da análise DIGE obtida através da sobreposição de canais de fluorescência da Cy2 (<i>pool</i>), Cy3 (pré-climatérico), e Cy5 (climatérico). As setas indicam <i>spots</i> de proteínas diferencialmente expressos selecionados após análise de teste T de Student ($p \leq 0,05$), juntamente com seus respectivos números de identificação. A escala de pH de separação da IEF (pH 4-7) está localizada na parte superior, e da posição do peso molecular está à esquerda da imagem.....	49
Figura 7.	Classificação funcional das 37 proteínas da polpa do mamão papaia identificadas como diferencialmente expressas durante o amadurecimento.....	58

1. INTRODUÇÃO

O mamão papaia (*Carica papaya* L.) é um fruto de grande importância comercial para o Brasil, uma vez que o país é o maior produtor mundial da fruta, com 24% da produção total mundial e o terceiro maior exportador, sendo que a produção em 2006 representou um recorde nacional, com 1.897.639 toneladas (IBGE, 2006). Além disso, está entre as frutas mais apreciadas e consumidas no Brasil (EMBRAPA, 2009), sendo uma excelente fonte de nutrientes, vitaminas (vitamina C e pró-vitamina A) e minerais (magnésio) (WALL, 2006).

O mamão papaia é uma fruta climatérica, que apresenta comportamento típico durante o amadurecimento, com aumento da respiração e da produção de etileno (SEYMOUR, TAYLOR e TUCKER, 1993). As principais alterações físico-químicas como a mudança na coloração, na textura, acúmulo de açúcares e de compostos voláteis, ocorrem durante o amadurecimento e são finalizadas na senescência (GIOVANNONI, 2001). Estas transformações resultam em um fruto final com características atrativas para os consumidores, além de determinar características nutricionais importantes, como quantidade e composição de fibras, lipídeos, vitaminas e composição de antioxidantes (BRAMLEY, 2002).

Nos frutos climatéricos as transformações físico-químicas ocorrem rapidamente após a colheita, tornando-os muito perecíveis, o que exige medidas de controle apropriadas do amadurecimento, de forma a aumentar a vida útil do produto. No caso do mamão, as alterações que ocorrem na

coloração da casca, passando da cor verde para amarela, são resultantes, principalmente, da degradação da clorofila e do aumento da síntese de pigmentos, como os carotenóides (CHITARRA e CHITARRA, 1990). De acordo com Fabi (2007) a concentração de alguns carotenóides como: *all-trans*-licopeno, *all-trans*- β -criptoxantina e *all*- β -caroteno, aumentaram durante o amadurecimento da polpa de frutos de mamoeiro.

A diminuição da firmeza da polpa é um indicativo importante do amadurecimento do mamão e um dos principais fatores que contribuem para torná-lo extremamente perecível. Em frutos a degradação de polissacarídeos da parede celular, como celulose, hemicelulose e pectina levam as alterações na parede celular e, conseqüentemente, ao amaciamento da polpa (SEYMOUR, TAYLOR e TUCKER, 1993). As alterações na parede celular resultam, muito provavelmente, da ação de enzimas hidrolíticas como: poligalacturonase (PG), pectinametilesterase (PME) e pectate liase (PL), entre outras. A atividade de PME aumenta gradualmente ao longo do amadurecimento permitindo a atividade da PG através da demetilação das pectinas. No caso da PG o aumento é bem significativo, concomitante com o aumento da produção de etileno no mamão papaia (PAULL e CHEN, 1983). Genes que codificam para PG já foram caracterizados em muitas outras frutas, e alguns estudos têm revelado a expressão deste gene induzido pelo etileno.

De acordo com Fabi e colaboradores (2009) em mamões o gene da PG é induzido pelo etileno. Porém, a inibição do mesmo por 1-MCP não impediu o amadurecimento total do fruto. Estes resultados podem ser um indicativo de

que outras enzimas etileno independentes participam do processo do amadurecimento.

A rápida diminuição da firmeza da polpa do mamão predispõe o fruto a injúrias mecânicas e a presença de microorganismos. Foi estimada uma perda pós-colheita mundial de 40 a 100% do mamão (PAULL *et al.*, 1997). Apesar disso, as técnicas de manejo pós-colheita como o uso de embalagens especiais, o tratamento térmico e a aplicação de inseticidas ainda não provaram ser completamente eficazes para minimizar e prevenir as perdas (SAUCEDO-VELOZ, 1997). Portanto, é importante conhecer os mecanismos moleculares de controle do processo de maturação da fruta e o amaciamento da polpa e identificar eventuais pontos em seu metabolismo que possam ser trabalhados com o intuito de reduzir as perdas econômicas e nutricionais.

1.1 Expressão gênica e amadurecimento

A expressão gênica desempenha papel importante no amadurecimento de frutos uma vez que, genes específicos parecem ser necessários durante esse processo (GIOVANNONI, 2004). Porém, estes estudos estão limitados a poucos frutos como no estudo de genes envolvidos no processo de amadurecimento de tomate (GIOVANNONI, 2001; MATAS *et al.*, 2009) no estudo de genes envolvidos na sinalização de etileno durante o amadurecimento em banana (MBÉGUIÉ *et al.*, 2008) e nos estudos relacionando o ácido ascórbico com o início do amadurecimento de uvas (LUND *et al.*, 2008).

A obtenção da sequência de nucleotídeos do genoma de plantas constitui o início da realização de muitos outros estudos. Embora os dados obtidos pela genômica sejam relevantes, eles são limitados, uma vez que, o conhecimento de todo o código genético pode ter pouco valor caso não haja informações sobre a regulação espaço-tempo dos genes. Estas limitações estão associadas à dificuldade de obtenção de informações sobre o nível de expressão dos genes, ou sobre as características das proteínas expressas, tais como a sua localização subcelular, eventuais modificações pós-tradução como glicosilações e fosforilações, interações proteína-proteína e proteína-DNA, bem como a estrutura e a função biológica das proteínas (TYERS e MANN, 2003). Uma maneira de complementar a pesquisa genômica é o estudo do seu produto final (as proteínas). Assim, grande ênfase tem sido dada à genômica funcional, que visa identificar a função dos genes e das proteínas através de estudos do transcriptoma, da proteoma e da metaboloma dos organismos.

Embora a expressão do gene a nível transcripcional forneça informações importantes sobre a transcrição da fase inicial do genoma para a maquinaria celular, os níveis de mRNA não são sempre compatíveis com a abundância de proteínas. Além disso, devido ao *splicing* alternativo, processamento de mRNA, proteólise de proteínas e modificações pós-traducionais, um gene pode produzir muitas proteínas diferentes. Não sendo isso bastante, as funções da proteína são definidas pela classificação subcelular, a interação com outras moléculas e a regulação via sinalização celular e ambientais (CHEN e HARMON, 2006). A proteômica complementa outras abordagens da genômica funcional, incluindo perfis de expressão baseados em *microarray*, sistemática de perfis fenotípicos na célula e no nível de organismo. A integração desses

conjuntos de dados através da bioinformática pode criar um banco de dados global da função do gene, que servirá como referência poderosa das propriedades e das funções da proteína.

Deste modo, estudos sobre os produtos finais dos genes, as proteínas, podem complementar aqueles sobre as sequências de genes, além de fornecer informações importantes acerca da expressão gênica.

1.2 Proteômica

O termo proteoma é definido como conjunto de todas as proteínas codificadas pelo genoma em um determinado momento metabólico (WILKINS *et al.*, 1996). O proteoma é altamente dinâmico e dependente do estado atual da célula, mudando com o desenvolvimento do organismo e em resposta a qualquer alteração no seu ambiente (TYERS e MANN, 2003). Devido ao dinamismo da expressão gênica das células, a proteômica consiste numa ferramenta importante para descrever as proteínas totais de organelas, órgãos ou tecidos em diferentes condições biológicas e contribui para entender o funcionamento dos genes (CHEN e HARMON, 2006). As informações obtidas como nível de expressão e ponto isoelétrico são informações complementares ao mecanismo de regulação, quantidade, atividade, isoformas de proteínas, modificações pós-traducionais e interações de cada proteína no interior da célula. Isto faz com que essa técnica seja uma ferramenta extremamente útil para os estudos da genômica funcional (TYERS e MANN, 2003).

A obtenção do extrato protéico é a primeira fase antes da separação das proteínas, sendo uma etapa crítica na produção dos resultados finais da análise. A qualidade do extrato depende da quantidade de proteínas obtidas, ausência de contaminantes como pigmentos, carboidratos e compostos fenólicos e variedade de proteínas extraídas para uma resolução de qualidade e boa separação das mesmas no gel (NEBRICH *et al.*, 2009).

O tecido vegetal de frutos é considerado de difícil extração de proteínas devido à sua baixa concentração (SONG *et al.*, 2006) e à presença de grande quantidade de substâncias interferentes como sais, carboidratos e polifenóis (WANG *et al.*, 2006). Recentemente muitos trabalhos foram realizados com o intuito de estabelecer o melhor protocolo para extração de proteínas de tecido vegetal como nos trabalhos com morango (ZHENG *et al.*, 2007), meristema de banana (CARPENTIER *et al.*, 2005) e uva (VINCENT, WHEATLEY e CRAMER, 2006). Os protocolos para extração utilizando TCA/acetona e extração fenólica com precipitação em acetato de amônia e metanol (ISAACSON *et al.*, 2006) têm sido testados com maior frequência, sendo que, a extração fenólica parece ser o que obtêm melhor qualidade de extrato.

Após a extração de proteínas, a separação da mistura protéica é realizada tanto por 2-DE (GORG *et al.*, 1999), ou diferentes tipos de LC (DAHER *et al.*, 2010). A eletroforese bidimensional tem sido a estratégia mais utilizada para análise do proteoma em plantas (CARRETTE *et al.*, 2006).

A eletroforese bidimensional (2-DE) pode resolver em um único gel mais de 5.000 proteínas simultaneamente, e detectar 1 ng de proteína por *spot*.

Além disso, ela estabelece um mapa das proteínas intactas, o que reflete as mudanças no nível de expressão, isoformas ou modificações pós-traducionais. Outro ponto da proteômica, baseada na eletroforese bidimensional, é que esta permite o acesso a dados qualitativos que mostram apenas se uma proteína está presente ou não na amostra estudada e, dados quantitativos, que revelam as concentrações de determinada proteína nas diferentes condições analisadas (GORG, WEISS e DUNN, 2004).

A eletroforese bidimensional (2-DE) é dividida em duas etapas principais onde, na primeira dimensão, as amostras são separadas de acordo com seus pontos isoelétricos (pI) isto é, o valor do pH no qual a proteína tem carga residual nula. No pI não ocorre migração sob a ação de um campo elétrico. Após a amostra ser misturada com uma série de reagentes, denominados anfólitos carreadores, que possuem boa capacidade tamponante em seus valores individuais de pI, um gradiente de pH é obtido quando, ao se aplicar um campo elétrico. Isto faz com que ocorra a migração da amostra, de acordo com o seu valor de pH. Desta forma, em valores de pH mais baixos que o pI das amostras migram para o catodo, pois estão positivamente carregados. Em pH mais alto, elas migram para o anodo, pois estão carregados negativamente.

Já na segunda dimensão, a separação se dá de acordo com suas massas moleculares a sua mobilidade electroforética, na qual as proteínas menores irão migrar mais rápido que as proteínas maiores. Após a obtenção dos géis as proteínas podem ser visualizadas através da utilização de corantes como *coomassie brilliant blue* (CBB), prata ou fluorescência que permitem visualizar as proteínas no gel (CANDIANO *et al.*, 2004).

DIGE é um sistema de marcação de proteínas que permite a separação quantitativa proteômica de duas ou mais amostras por detecção de fluorescência óptica de proteínas diferencialmente marcadas que são separadas eletroforicamente no mesmo gel. DIGE é uma alternativa para a quantificação de metodologias baseadas em MS e pode contornar suas limitações analíticas. Por exemplo, consegue analisar as proteínas, mantendo-as intactas, além de detectar uma gama ampla de proteínas sendo interessante em aplicações onde a sensibilidade extrema é necessária (UNLU, MORGAN e MINDEN, 1997). Na eletroforese bidimensional diferencial em gel é possível analisar em um mesmo gel duas condições experimentais diferentes, eliminando as variações resultantes de diferenças de corrida dos géis independentes. As amostras de proteínas são marcadas antes da eletroforese com corantes fluorescentes, as cianidinas Cy2, Cy3, Cy5. As cianidinas têm um grupo NHS-éster reativo que forma uma ligação covalente com o grupo ϵ -amino de resíduos de lisina das proteínas (ALBAN *et al.*, 2003). Essa técnica apresenta uma sensibilidade maior quando comparada com a coloração com prata ou com *coomassie brilliant blue*, uma vez que é capaz de detectar uma quantidade muito pequena de proteínas. Além disso, diminui a variação de gel para gel (ALBAN *et al.*, 2003).

Para a análise DIGE o extrato de proteínas de cada grupo é marcado com corante fluorescente que exibe comprimento de onda específico para excitação e emissão. Assim, três amostras diferentes (amostra controle marcada com Cy3, amostra experimental marcada com Cy5 e, uma mistura de todas as amostras utilizadas na análise marcadas com Cy2) são misturadas após a marcação para a focalização isoeletrica e resolvidas no mesmo gel

bidimensional. O padrão interno é constituído a partir do *pool* (mistura) de alíquotas de quantidades iguais de todas as amostras que serão analisadas e é aplicado junto com as outras duas amostras marcadas com os outros dois fluoróforos em cada gel. Isso permite o cálculo das razões para a mesma proteína entre as amostras no mesmo gel bem como entre géis, de forma a diminuir a variação experimental e propiciar o aumento da confiança da quantificação das proteínas entre as amostras dos diferentes géis. Além disso, reduz o número de repetições de géis por experimento, uma vez que, no mesmo gel estão duas amostras mais o *pool* (UNLU, MORGAN e MINDEN, 1997).

A digitalização e a análise das imagens são as etapas seguintes, após a separação das proteínas nos géis. Primeiramente, a imagem é digitalizada e, para isso, estão disponíveis vários equipamentos para a aquisição da imagem do gel 2-DE, incluindo *scanners*, densitômetros a laser e câmeras *charge-coupled device* (CCD). Em seguida, as imagens são analisadas utilizando-se programas de análise de imagem (Delta2D, DECODON, BioRad, GE Healthcare) para obter informações sobre a variação das proteínas, de modo a poder selecionar os *spots* (proteínas) diferencialmente expressos quantitativamente e qualitativamente (NEBRICH *et al.*, 2009). A identificação dos *spots* selecionados é feita através de sua remoção do gel, seguida por digestão enzimática (como a tripsina, por exemplo) e posterior identificação dos peptídeos por espectrometria de massas.

A espectrometria de massas (MS) mede a razão massa/carga (m/z) da amostra ionizada a ser analisada e consistem em uma fonte de íons, um analisador de massas e um detector que registra o número de íons de cada

valor m/z . A ionização por *electrospray* (ESI) e a ionização/dessorção por matriz assistida a laser (MALDI) estão entre as técnicas mais utilizadas para volatilizar e ionizar as proteínas ou peptídeos. Na ionização por *electrospray* o analisador de massas gera a informação do espectro da massa do íon do fragmento do peptídeo. Os principais analisadores utilizados em proteômica são *time-of-flight* (TOF), *íon trap*, quadrupolo e *fourier transform íon cyclotron* - FT-MS (AEBERSOLD e MANN, 2003) Cada um desses analisadores possui um desempenho diferente e podem ser utilizados separadamente ou em conjunto. Com os dados obtidos pela espectrometria de massas existe a possibilidade de identificação das proteínas através da comparação com os bancos de dados de sequências de genes e proteínas já disponíveis, como Genbank e SwissProt (NEBRICH *et al.*, 2009).

Em plantas, as análises proteômicas foram iniciadas com milho (TOUZET *et al.*, 1996) e *Arabidopsis thaliana* (SAHNOUN *et al.*, 2000). De acordo com os trabalhos iniciais, existem algumas dificuldades quanto à análise proteômica vegetal como a obtenção de um extrato protéico adequado para a análise. Isto é, sem a presença de compostos interferentes como pigmentos e carboidratos que afetam a eletroforese bidimensional produzindo estrias verticais e/ou horizontais (WANG *et al.*, 2006). Além disso, a identificação de proteínas de espécies cujos genomas ainda não foram sequenciados também dificulta a análise uma vez que, a identificação e a caracterização das proteínas; é possível pela disponibilidade de sequências genômicas e de sequências expressas (*Expressed Sequence Tags* - EST) (CANOVAS *et al.*, 2004).

A compreensão de alguns processos como o amadurecimento tem sido possível devido à união de técnicas complementares a genômica, como a proteômica. O conhecimento a respeito do amadurecimento pode levar a descoberta de pontos de controle desse processo, possibilitando, assim, o aprimoramento do manejo pós-colheita através da tecnologia ou do uso do melhoramento genético, propiciando aumento da qualidade final e aumento da vida de prateleira dos frutos. Existem estudos sobre o amadurecimento de frutos utilizando a proteômica como ferramenta, como no caso de: tomate (ROCCO *et al.*, 2006), uva (DEYTIEUX *et al.*, 2007) e morango (BIANCO *et al.*, 2009). Porém, para o mamão papaia ainda não existe nenhum trabalho que aborde o amadurecimento utilizando a análise proteômica.

Apesar de ainda não existir acervo completo com sequências de genes ou proteínas do mamoeiro, é possível prosseguir a análise a partir de buscas baseadas na homologia entre proteínas de outras espécies vegetais já seqüenciadas, como *Arabidopsis thaliana*. Isso é possível, pois, as proteínas são mais conservadas nas plantas, o que facilita sua identificação em um organismo que não teve o seu genoma completamente sequenciado (como no caso da *Carica papaya* L.) pela sua comparação com proteínas bem conhecidas, como as de *Arabidopsis thaliana* (LISKA e SHEVCHENKO, 2003). As identificações e caracterizações de proteínas também são possíveis através de sequências expressas já disponíveis para o mamão papaia (DEVITT *et al.*, 2006).

A rápida mudança do estágio de maturação verde para o estágio maduro demonstra uma situação em que o estabelecimento e a comparação de mapas protéicos dos perfis de proteínas entre ambos estádios de maturação poderia resultar na identificação de proteínas associadas com essa transição.

2. OBJETIVO

Estabelecer mapas protéicos da polpa do mamão papaia (*Carica papaya* L.) nos estádios de maturação verde e maduro e, a partir das comparações entre esses mapas, identificar *spots* de proteínas diferentemente expressas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Amostras

Foram utilizadas três amostragens biológicas diferentes nos experimentos. Deste modo foram utilizados frutos de mamoeiro (*Carica papaya* L. cv. Golden) para duas amostragens caracterizadas neste trabalho (amostragens I e II) e frutos previamente caracterizados por Fabi (2007) denominada amostragem III. Os frutos das três amostragens foram cedidos pela empresa Agra Pex Comércio Exterior LTDA (www.agrapapaya.com) cuja fazenda está localizada no estado do Espírito Santo, Brasil.

3.2 Caracterização das amostras

A caracterização das amostragens I e II foi iniciada com um dia após a colheita, com frutos em boas condições fito-sanitárias, pesando entre 200 e 300 g. Essas frutas foram mantidas em incubadora com temperatura e umidade controladas e tiveram o amadurecimento monitorado através de medidas diárias de CO₂, etileno, textura e mudança na cor da casca e da polpa.

Do total de 200 frutos obtidos, 6 frutos foram diariamente selecionados ao acaso para compor as amostragens I e outros 6 frutos para compor a amostragem II. Para as medidas de CO₂ e etileno, os frutos foram acondicionados durante 1 hora em frascos individuais (1,4 L e 1,1 L, respectivamente) hermeticamente fechados. Ao término desse período

amostras de ar para medida de etileno (10 mL) e CO₂ (1 mL) foram coletadas do ambiente interno dos frascos para a análise. A composição de gases foi determinada por cromatografia gasosa (HP-6890) utilizando uma coluna HP-Plot Q (30 m, I.D. 0,53 mm), com injetor e detector a 250 °C e corrida isotérmica a 30 °C. Para a análise de etileno foi utilizado o detector de ionização de chama (FID), enquanto que para a análise do CO₂ foi utilizado o detector de condutividade térmica (TCD). As medidas foram feitas 1 hora após a chegada dos frutos ao laboratório e diariamente a intervalos de 24 horas.

Para o cálculo da medida dos gases, foram levados em consideração o volume do frasco de armazenamento, a massa dos frutos e o tempo de acúmulo dos gases (FABI, 2007).

Após as medidas de CO₂ e etileno, os frutos foram submetidos à análise da firmeza das polpas, de acordo com o método descrito por Fabi (2007). As polpas foram perfuradas com uma sonda de penetração (3 mm de diâmetro) de um texturômetro, sendo a medida expressa em N.cm². Para isso, foram retiradas da polpa de cada fruto três seções cilíndricas de 1 cm de altura e 3 cm de diâmetro distando 0,5 cm da casca. Após essa análise, as frações remanescentes dos frutos foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80 °C. Os frutos pré-climatéricos foram denominados de frutos verdes e os frutos climatéricos de frutos maduros.

3.3 Extração de proteínas

A extração de proteínas foi feita de acordo com o procedimento descrito por Carpentier e colaboradores (2005) com algumas modificações. Aproximadamente 1 g da polpa armazenada à -80 °C foi macerada e ressuspensa com 5 mL de tampão de extração (50 mM de Tris HCl pH 8,5; 5 mM de EDTA, 100 mM de KCL, 1% de DTT, 30% de sacarose e 0,01 µL coquetel inibidor de protease para tecidos vegetais (Sigma-P9599) e 0,01 µL de coquetel inibidor fosfatase I e II – Sigma-P2850 e P5726, respectivamente) e homogeneizados com agitação por 30 segundos. Igual volume de fenol com pH ajustado para 8,5 foi adicionado aos tubos contendo as amostras. Estas foram então deixadas sob agitação por 15 minutos a 4 °C.

Após centrifugação (6.000 g) a 4 °C por 10 minutos, os sobrenadantes foram transferidos para novos tubos. A fase orgânica coletada foi re-extraída com tampão de extração e mantida sob agitação novamente por 15 minutos a 4 °C. Após nova centrifugação (6.000 g) a 4 °C por 10 minutos, a fase orgânica foi coletada e adicionada de 5 volumes de acetato de amônio 100 mM. Após 12 horas a -20 °C, procedeu-se à centrifugação (16.000 g) por 30 minutos a 4 °C.

O precipitado foi submetido a uma lavagem com acetona adicionada de DTT (0,2%) durante 15 minutos a -20 °C. Após a secagem a temperatura ambiente por 30 minutos o precipitado de proteínas resultante da extração foi solubilizado em 1 mL de tampão de extração (7 M de uréia, 2 M de tiouréia, 4% de CHAPS, 1% de DTT) por agitação constante a temperatura ambiente por

1 hora. A concentração de proteínas totais foi determinada utilizando o 2-D Quant Kit (GE Healthcare), de acordo com as instruções do fabricante.

3.4 Eletroforese SDS-PAGE

Amostras contendo 15 µg do extrato de proteínas de cada ponto de cada amostragem foram desnaturadas separadamente em solução desnaturante de amostra (2% SDS, 5% β-mercaptoetanol, 10% glicerol, 0,5 M Tris pH 6,8 e 0,05% azul de bromofenol) e fervidas por 5 minutos (LAEMMLI, 1970). Posteriormente foi feito um gel desnaturante com 12% de acrilamida e a solução contendo as proteínas foi aplicada neste gel. E para a corrida foi utilizada uma voltagem de 200 V. As bandas separadas foram visualizadas por coloração com *coomassie brilliant blue* (CBB) G-250 (NEUHOFF *et al.*, 1990).

3.5 Eletroforese bidimensional-2DE

Alíquotas de solução contendo 1 mg de proteína, extraídas dos diferentes estádios de maturação da amostragem I foram solubilizadas em DeStreak Rehydration Solution (GE Healthcare) e 0,5% de IPG *buffer*. Para a eletroforese bidimensional das amostras coradas foram feitas triplicas de géis das amostras verde e madura da amostragem I.

Para a focalização isoelétrica tiras de géis com gradiente de pH imobilizado (Immobiline DryStrip gels - GE Healthcare) de 24 cm e pH 3-10 foram reidratadas nessa solução por 20 horas a temperatura ambiente. A focalização foi realizada no sistema Ettan IPGphor System (GE Healthcare) com a seguinte programação: 1 hora a 500 V, 8 horas a 1.000 V, 3 horas a 8.000 V (gradiente), 4 horas e 45 minutos a 8.000 V.

Para a separação na segunda dimensão, as tiras de géis foram incubadas por 15 minutos em solução de equilíbrio (6 M de uréia, 50 mM de Tris-HCL pH 8,8, 30% de glicerol, 2% de SDS e 0,002% de azul de bromofenol) contendo 1% de DTT e posteriormente incubadas em solução de equilíbrio contendo 2,5% de iodoacetamida por mais 15 minutos. A separação das proteínas na segunda dimensão foi realizada em gel de poliacrilamida a 12,5% com 1,5 mm de espessura utilizando-se o sistema Ettan DALT Six (GE Healthcare).

As proteínas foram visualizadas por coloração com *coomassie brilliant blue* (CBB) G-250 (NEUHOFF *et al.*, 1990). Os géis foram enxaguados com água destilada e corados por 12 horas com a solução de coloração (10% de sulfato de amônio, 25 de ácido fosfórico e 5% de CBB). Posteriormente os géis foram transferidos para uma solução neutralizadora (0,1 M de Tris-HCL pH 6,5 ajustado com ácido fosfórico) por 3 minutos e em seguida lavados com 50% de etanol por 1 minuto. Os géis foram transferidos para a solução fixadora (20% de sulfato de amônio) e posteriormente foram corados novamente com a solução de coloração por mais 12 horas e descorados como descrito anteriormente para uma melhor visualização dos *spots*. Após a descoloração, os géis foram mantidos em solução de fixação a 4 °C até a aquisição da imagem.

Para a eletroforese diferencial em gel (DIGE) foram utilizadas alíquotas das soluções de proteínas obtidas na extração dos dois pontos de maturação, verde e maduro, das três amostragens (**Tabela 1**) e foram feitas duplicatas de cada gel. Antes da marcação as amostras foram purificadas usando 2-D Clean-Up Kit, como descrito pelo fabricante para a remoção de contaminantes que pudessem comprometer a marcação. Após a purificação as amostras foram solubilizadas em tampão de reidratação para DIGE (7 M de uréia, 2 M de tiouréia, 4% de CHAPS, 10 mM de Tris pH 8,0).

Tabela 1. Esquema de marcação com as cianidinas (Cy2, Cy3 e Cy5) dos dois pontos de maturação para cada amostragem.

	Gel 1	Gel 2	Gel 3	Gel 4	Gel 5	Gel 6
Padrão interno (<i>pool</i>)	Cy2	Cy2	Cy2	Cy2	Cy2	Cy2
Verde (V)	Cy3 V1	Cy3 V2	Cy3 V3	Cy3 V1	Cy3 V2	Cy3 V3
Maduro (M)	Cy5 M1	Cy5 M2	Cy5 M3	Cy5 M1	Cy5 M2	Cy5 M3

V1,M1: amostragem I

V2,M2: amostragem II

V3,M3: amostragem III

pool: V1+M1+V2+M2+V3+M3

Géis 4, 5 e 6 são duplicatas dos géis
1, 2 e 3

Os extratos de proteínas foram marcados com o sistema de marcação fluorescente mínima (Amersham CyDye DIGE Fluors – minimal dyes – for Ettan DIGE, da GE Healthcare) de acordo com as instruções do fabricante. Os géis que continham as amostras de frutos verdes das três amostragens que foram marcadas com o corante Cy3, as maduras que foram marcadas com o corante Cy5 e o *pool* marcado com o corante Cy2. Assim, 50 µg de extrato de proteína de cada amostra foram marcadas com 400 pmol de corante fluorescente e incubadas no escuro e no gelo por 30 minutos. A reação foi interrompida pela adição de 1 µL de lisina 10 mM e incubada por 10 minutos no escuro e em gelo. As amostras de proteínas marcadas com as cianidinas foram diluídas em DeStreak Rehydration Solution (GE Healthcare) e 0,5% de IPG *buffer*.

Tiras de géis com gradiente de pH imobilizado (Immobiline DryStrip gels - GE Healthcare) de 24 cm e pH 4-7 foram reidratadas nessa solução por 20 horas a temperatura ambiente. A focalização foi realizada com o sistema Ettan IPGphor System (GE Healthcare) com programação de: 1 hora a 500 V, 7 horas a 1.000 V, 3 horas a 8.000 V (gradiente), 5 horas e 36 minutos a 8.000 V.

Para a separação na segunda dimensão, as tiras de géis foram incubadas por 15 minutos em solução de equilíbrio (6 M de uréia, 50 mM de Tris-HCl pH 8,8, 30% de glicerol, 2% de SDS e 0,002% de azul de bromofenol) adicionada de 1% de DTT e posteriormente incubadas em solução de equilíbrio adicionada de 2,5% de iodoacetamida por mais 15 minutos. A separação das proteínas na segunda dimensão foi realizada em gel de poliacrilamida a 12,5% com 1,5 mm de espessura utilizando-se o sistema Ettan DALT Six (GE Healthcare) em placas de vidro de baixa fluorescência.

3.6 Análise das imagens dos géis corados com *coomassie brilliant blue*

As imagens das triplicatas de géis corados com *coomassie brilliant blue* foram digitalizadas no *scanner* LabScan III, versão 6.0 (GE Healthcare) utilizando a resolução de 200 dpi e filtro transparente e arquivadas em formato *tagged image file format* (TIFF) para posterior análise com o programa PDQuest 8.0.1 (Bio-Rad). A triplicata de géis das amostras de frutos, verde e maduro, foi então analisada usando o programa PDQuest (Bio-Rad).

Primeiramente as imagens foram ajustadas para estarem do mesmo tamanho e formato e assim poderem ser comparadas e em seguida foram filtradas para remover qualquer tipo de ruído (sinal de fundo), porém sem afetar os *spots*. Em seguida os *spots* de proteínas de cada imagem foram detectados automaticamente usando o 'Spot Detection Parameter Wizard' após os parâmetros anteriores de formatação ter sido ajustados. Os *spots* foram editados manualmente adicionando ou excluindo aqueles *spots* que repetiam ou eram ausentes em mais de um gel. Os géis com separação de amostras obtidas de frutas de um mesmo estágio de maturação foram comparados entre si e agrupados a fim de atribuir uma identidade comum para os mesmos *spots* derivados de imagens diferentes. A normalização foi feita com o método de densidade total na imagem do gel, em que a intensidade em *pixels* de cada *spot* de um gel é dividida pelo valor de intensidade total de todos os *pixels* da imagem, e os resultados foram expressos em ppm (partes por milhão).

Os volumes dos *spots* normalizados das triplicatas de géis dos dois estágios de maturação foram comparados, e analisados de acordo com o teste-T de Student para verificar se eles foram significativamente diferentes ($p < 0,05$). Os *spots* foram analisados qualitativamente e quantitativamente. A análise qualitativa correspondeu à detecção de *spots* presentes em apenas um grupo, mas não no outro, empregando como critério definidor da presença de um *spot* no gel o valor de intensidade acima de 1,5 vezes o valor de fundo observado no gel. A análise quantitativa correspondeu aos *spots* que apresentaram aumento, ou redução, de 50% da intensidade tendo com referência o valor dado pela amostra verde.

3.7 Análise das imagens dos géis de proteínas marcadas por fluorescência-DIGE

As imagens dos seis géis DIGE foram digitalizadas utilizando-se o equipamento VersaDoc MP 4000 (Bio-Rad) que emprega uma câmara *charge coupled device* (CCD) para a captação da imagem dos géis. Primeiramente padronizou-se o ajuste do zoom, do diafragma e do foco para o tamanho e distância do gel para melhor captura da imagem e visualização dos *spots*. Posteriormente o método de captura de imagem apropriado para cada cianidina foi selecionado, de modo que para a cianidina Cy2 foi utilizado como fonte de excitação: diodo emissor de luz (LED) azul e filtro de emissão 530BP, para a cianidina Cy3 LED verde e filtro de emissão 605BP e para a cianidina Cy5 LED vermelho com filtro de emissão 695BP. Cada gel foi colocado dentro

do compartimento da câmera e exposto à luz específica por 30 segundos para a captura de cada uma das três imagens geradas a partir da fluorescência das três cianidinas.

As imagens foram ajustadas para estarem com o mesmo tamanho e formato e assim poderem ser comparadas utilizando-se o programa PDQuest, versão 8.0. Posteriormente foram filtradas para remover qualquer tipo de ruído (sinal de fundo), porém sem afetar a qualidade dos *spots*. Os *spots* foram detectados, editados manualmente, o volume do *spot* quantificado e a normalização dos volumes dos *spots* foram baseadas no padrão interno marcado com Cy2.

As proteínas diferencialmente expressas foram selecionadas pela análise com teste-T de Student ($p < 0,05$). O programa permitiu identificar proteínas que tiveram variação quantitativa, ou seja, aquelas correspondentes a *spots* que aumentaram ou diminuíram de intensidade entre os grupos (triplicatas de géis de amostras de frutos verde e maduro) baseados em limites préselecionados, ou seja, *spots* que apresentaram aumento, ou redução, de 50% da intensidade do valor de referência dado pela amostra verde. Também foi realizada a análise qualitativa que faz à detecção de *spots* presentes em apenas um grupo, mas não no outro, empregando como critério definidor da presença de um *spot* no gel, o valor de intensidade acima de 1,5 vezes o valor de fundo observado no gel.

3.8 Digestão de proteínas

Para a retirada desses *spots* do gel, foi feito um gel bidimensional preparativo contendo 750 mg de proteínas e a metodologia utilizada para o seu preparo foi de acordo com a eletroforese bidimensional descrita em métodos, conforme item 3.5.

Os *spots* foram isolados de cada uma das repetições do gel e após serem fragmentados com o auxílio do bisturi, foram imersos em solução de descoloração (50% de acetonitrila e 25 mM de bicarbonato de amônio) até total remoção do corante. Após desidratação com acetonitrila 100%, os fragmentos de gel foram reidratados e as proteínas foram reduzidas em 50 mM de bicarbonato de amônio e 20 mM de DTT a 56 °C por 40 minutos.

Posteriormente, as proteínas foram alquiladas com 55 mM de iodoacetamida em 50 mM de bicarbonato de amônio por 30 minutos ao abrigo da luz. Os fragmentos dos géis foram desidratados com acetonitrila 100% seguida de reidratação com 25 mM de bicarbonato de amônio contendo 10 µL de tripsina (Promega) por 14 horas a 37 °C. A ação da tripsina foi interrompida pela adição de solução bloqueadora (50% acetonitrila e 5% de ácido fórmico) e os peptídeos obtidos foram eluídos por duas extrações com mistura de 50% de acetonitrila, 1% de ácido fórmico, seguida de extração com mistura de 60% de metanol, 1% de ácido fórmico e finalmente acetonitrila pura.

Em todas as etapas de eluição os fragmentos de gel foram mantidos em banho de ultra-som por 20 minutos a 40 °C. Todas as frações de eluição resultantes de cada *spot* foram combinadas no mesmo tubo e submetidas à secagem em concentrador a vácuo sob temperatura ambiente (CELEDON *et al.*, 2007).

3.9 LC-MS/MS

Os peptídeos resultantes da digestão foram solubilizados em 1% de ácido fórmico e transferidos para tubos específicos para realização da espectrometria de massas. O sequenciamento das proteínas foi conduzido em plataforma cromatografia líquida associada a espectrometria de massa (LC-MS/MS) com fonte de ionização por ESI e analisador de massas Q-TOF Ultima API (Waters, Micromass), acoplado a um sistema *online* de HPLC capilar CapLC XE Pump (Waters).

Os espectros MS/MS gerados pelo sequenciamento dos peptídeos pelo programa ProteinLynx v2.1 (Waters) de cada amostra foram processados posteriormente pelo programa MASCOT MS/MS Ion Search (www.matrixscience.com) que comparou as seqüências obtidas com os dados depositados nos bancos de dados do SwissProt e NCBI. As modificações fixas e variáveis, carbamidometil (C), oxidação (M), respectivamente, foram selecionadas para a análise. A identificação dos espectros e possíveis similaridades com proteínas já seqüenciadas e depositadas em bancos de dados foi feita automaticamente.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Amostragem

As medidas de etileno, CO₂ e textura para as amostragens I e II iniciaram-se com um dia após a colheita (DPC) e encerram-se no sexto dia pós-colheita enquanto que a análise da amostragem III iniciou-se no segundo dia após a colheita e terminou no décimo dia. Os frutos das três amostragens (I, II e III) apresentaram mudanças semelhantes, na síntese de etileno, no aumento da taxa respiratória e na diminuição da firmeza da polpa (**Figura 1 a, b, c**, respectivamente). Essas modificações correspondem à mudança característica e esperada de frutos climatéricos.

Os frutos apresentaram mudanças nas cores da casca e da polpa, como pode ser observado na **Figura 2 a, b, c**, sendo que do quarto dia em diante a casca já estava totalmente amarela para as amostragens I e II. Para as amostragens I e II as análises foram encerradas no sexto dia pós-colheita, pois após esse período os frutos apresentaram sinais evidentes de senescência ou podridão. As mudanças observadas na amostragem III (FABI, 2007) foram similares às observadas nas amostragens I e II, sendo que o aumento da taxa respiratória, o pico de etileno e a diminuição da firmeza da polpa ocorreram no quarto dia após a colheita.

As três amostragens apresentam as transformações características do amadurecimento, com pico de etileno, CO₂ e diminuição da textura semelhantes, assim como as mudanças de cor da casca do fruto.

Figura 1. Caracterização fisiológica de três distintas amostragens do mamão papaia. As amostragens I (linhas pretas) e II (linhas vermelhas) e III (linhas azuis) tiveram o amadurecimento acompanhado pelos seguintes parâmetros: A) quantidade de CO_2 produzido pela respiração dos frutos, B) etileno produzido pelos frutos, C) firmeza da polpa. As barras verticais representam o erro padrão das médias $n=6$ amostragens I e II, $n=9$ amostragem III).

Figura 2. Caracterização fisiológica de três amostragens distintas do mamão papaia. Imagens dos frutos mostrando as mudanças típicas na cor da casca e da polpa para as amostragens I (a), II (b) e III (c) (DPC dias pós-colheita).

Uma das poucas diferenças notadas foi que nas amostragens I e II o período de amadurecimento foi mais breve do que na amostragem III. Esses resultados mostram que apesar de serem amostragens de colheitas diferentes as três amostragens apresentam as mesmas características durante o amadurecimento, seja pelo aumento da taxa respiratória seja pela diminuição da textura, demonstrando assim que estão adequadas para o trabalho uma vez que o objetivo de obter replicatas biológicas de frutas representativas dos estádios pré-climatéricos e climatérico para as análises posteriores foi alcançado.

Com base nas mudanças fisiológicas observadas, os frutos das amostragens I e II escolhidos para as análises dos perfis de proteínas foram aqueles com 1 dia após a colheita (DPC) e com 3 DPC, representativos de frutas pré-climatéricas e climatéricas, doravante ‘verdes’ e ‘maduras’. Já para a amostragem III foram selecionados os frutos amostrados no 2 DPC (verdes) e 4 DPC (maduras), correspondentes aos mesmos estádios de maturação das frutas verdes e maduras das amostragens I e II.

4.2 Extração de proteínas

Embora muitos protocolos tenham sido descritos para extração de proteínas em tecidos vegetais, não existe na literatura um método de extração de proteínas específico para a polpa do mamão. De acordo com Wang *et al.* (2006) a extração fenólica produz uma amostra de alta qualidade para tecidos

recalcitrantes, como o mamão papaia, uma vez que os compostos interferentes, que comumente provocam manchas e estrias na eletroforese bidimensional são removidos ao ficarem retidos na fase aquosa.

As proteínas foram extraídas das frutas das três amostragens e dos dois estádios de maturação utilizando-se a extração fenólica e a precipitação das proteínas com acetato de amônio (CARPENTIER *et al.*, 2005). Os extratos protéicos obtidos foram quantificados e apresentaram um rendimento total de proteínas de 1 mg de proteína por grama de polpa, que é semelhante aos valores encontrados no experimento utilizando meristema de banana (CARPENTIER *et al.*, 2005). Após a quantificação das proteínas, procedeu-se a SDS-PAGE dos dois pontos de maturação da amostragem I e II para verificar a qualidade do extrato.

Foram aplicados no gel 15 µg de proteínas de cada extrato com o intuito de verificar a qualidade dos mesmos (**Figura 3**). A extração mostrou-se eficiente, pois as amostras não apresentaram sinais de contaminação de impurezas como carboidratos, pigmentos, compostos fenólicos, ou degradação, pois as bandas estavam bem definidas e sem arraste. O fato de aplicar quantidades iguais e os extratos apresentarem aspecto semelhante tem importância, pois quanto mais semelhante a amostras do mesmo estágio mais fácil de encontrar diferenças entre os estádios diferentes. A análise SDS-PAGE sugere que as amostras dos diferentes estádios são semelhantes, porém, já é perceptível a diferença de expressão de algumas bandas.

Figura 3. Eletroforese sob condições desnaturantes (SDS-PAGE) de proteínas extraídas da polpa do mamão papaia. As letras A, B e C indicam os extratos de amostras pré-climatéricas obtidas das amostragens I, II e III, respectivamente, enquanto as letras D, E, e F indicam os extratos de amostras climatéricas das amostragens I, II e III, respectivamente, separadas em gel de poliacrilamida 12% (SDS-PAGE). As proteínas foram coradas utilizando-se *coomassie brilliant blue*. Os números à esquerda indicam o tamanho das bandas do padrão de peso molecular, em kDa.

4.3 Eletroforese bidimensional (géis corados com *coomassie brilliant blue*)

Após a obtenção de um extrato protéico que se mostrou adequado para a SDS-PAGE, o mesmo extrato foi utilizado para separação por eletroforese bidimensional com o objetivo de visualizar a distribuição das proteínas ao longo do gel quanto ao ponto isoelétrico e massa molecular, bem como se a resolução dos *spots* estaria adequada, isto é, sem a presença de estrias resultantes de baixa solubilidade das proteínas durante a focalização isoelétrica, o que prejudicaria a detecção e quantificação de *spots*.

Inicialmente, as proteínas dos dois estádios de maturação da amostragem I foram primeiramente separadas em tiras de géis de gradiente de pH imobilizado (tiras de géis de 7 cm de comprimento) com intervalo de pH 3-10, a fim de se testar a eletroforese bidimensional para os extratos de proteínas dos dois estádios de maturação. Na **Figura 4** as amostras dos dois estádios de maturação apresentaram-se distribuídas predominantemente na faixa de pH 4-7 com a presença de poucos *spots* nos extremos da faixa de pH utilizada.

Figura 4. Eletroforese bidimensional de proteínas da polpa do mamão papaia verde (a) e maduro (b). As proteínas foram separadas em um gradiente de pH 3-10 na primeira dimensão e em SDS-PAGE 12% na segunda dimensão. As proteínas foram coradas utilizando a coloração com *coomassie brilliant blue*. Os números a esquerda indicam o tamanho da banda do padrão de peso molecular em KDa.

Os géis não apresentaram estrias verticais mostrando que o extrato estava livre de sal e outros agregados protéicos (GORG *et al.*, 1999) apresentando algumas estrias horizontais, possivelmente devido à insuficiente solubilização de algumas proteínas mais abundantes ou com maior massa molecular, mas que não comprometeriam a qualidade geral da análise.

O método de coloração utilizando *coomassie brilliant blue* foi padronizado, uma vez que os géis apresentavam muitas diferenças de intensidade da coloração, bem como manchas e *spots* mais corados que outros na mesma triplicata de corrida o que interfere na análise das imagens. Foi observada uma certa inconsistência na coloração, o que, de fato, é uma das desvantagens da coloração como CBB. Devido a isso, foi feita uma otimização da coloração, para aumentar a sensibilidade e não ter diferenças de intensidade dos mesmos *spots* por causa da variação da coloração de um gel para o outro.

Ficou estabelecida a coloração com *coomassie brilliant blue* (WESTERMEIER, 2006) na qual os géis foram corados por 12 horas e descorados como descrito no item 3.5, sob agitação constante. Após a descoloração os géis foram submetidos a um novo ciclo de coloração por 12 horas, o qual teve por objetivo aumentar a intensidade dos *spots* visíveis em comparação com a primeira coloração, além de possibilitar a visualização de *spots* que não apareciam com apenas um ciclo de coloração. A adição desse novo ciclo aumentou a sensibilidade uma vez que há a maior deposição de *coomassie brilliant blue* e maior fixação. A agitação constante fez com que os géis não ficassem manchados devido a precipitação do CBB. Somente após o segundo ciclo de coloração os géis foram então digitalizados. Com essa

padronização os *spots* apresentaram intensidades similares entre as triplicatas, houve aumento no número de *spots* visíveis e apresentou uma melhor reprodutibilidade, pelo fato da coloração ter sido aplicada por tempo suficiente, ou repetidamente e sob agitação, especialmente para géis com tamanho maior (24 cm, por exemplo).

Após terem sido encontradas as condições que propiciavam a obtenção de géis de boa qualidade em escala de separação reduzida (tiras de separação isoeletrica com 7 cm de comprimento), foram realizadas triplicatas de eletroforese bidimensional a partir da separação em tiras de 24 cm de comprimento com pH 3-10 para cada estágio de maturação. Essa faixa de pH mais ampla foi escolhida como avaliação preliminar para poder visualizar a distribuição dos *spots* no gel. A escolha da faixa de pH é um dos fatores que afetam a visualização das mudanças de expressão de proteínas (GORG *et al.*, 1999), e apesar de uma faixa muito ampla poder dificultar uma maior resolução de *spots* muito próximos, resultando em sobreposição de proteínas (*overlapping*) o uso de um gradiente de pH mais abrangente oferece uma visão geral do estado do mapa protéico.

A triplicata de géis dos dois grupos de amostras, verde e maduro, foi então analisada usando o programa PDQuest. Primeiramente as imagens foram ajustadas para estarem do mesmo tamanho e formato e assim poderem ser comparadas e filtradas para remover qualquer tipo de ruído (sinal de fundo), porém sem afetar os *spots*. Em seguida os *spots* de proteínas de cada imagem foram detectados usando o 'Spot Detection Parameter Wizard', sendo necessário ajustar os seguintes parâmetros: tamanho do menor *spot*,

intensidade do *spot* mais fracamente corado e do maior local de maior agrupamento de proteínas com nítido *overlapping*.

Após a detecção dos *spots* a sensibilidade também foi ajustada, pois muitos *spots* menos intensos não foram detectados automaticamente, porém, isso também levou ao aumento de falsos positivos, uma vez que o parâmetro ficou mais sensível aos ruídos da imagem. Deste modo foi feita a opção de diminuir a sensibilidade e adicionar manualmente os *spots* visíveis, porém que não foram detectados automaticamente pelo programa. O critério utilizado para a edição manual foi que, caso houvesse repetição de *spot* em pelo menos dois géis da triplicata, este seria adicionado no terceiro gel caso não estivesse presente. De maneira inversa, se um *spot* estivesse presente em apenas um gel ele não seria considerado como presente na amostra.

A etapa seguinte foi a de estabelecer correspondência entre os mesmos *spots* identificados nos diferentes géis (*matching*) e para isso foi utilizada primeiramente a ferramenta automática do programa e, posteriormente, foi feita a edição manual utilizando os mesmos critérios citados acima. Todas essas edições foram feitas utilizando como referência o gel *master*, que consiste numa imagem virtual que compreende todos os *spots* presentes em todos os géis da análise. Todas as comparações entre *spots* e entre os géis, assim como a edição e o agrupamento de *spots*, foram coordenadas através do gel *master*.

De modo a eliminar as interferências das variações não-relacionadas com a expressão diferencial das proteínas as quantidades de *spots* de todos os géis foram normalizadas. A normalização foi feita com o método de 'densidade

total na imagem do gel', em que a intensidade em *pixels* de cada *spot* de um gel é dividida pelo valor de intensidade total de todos os pixels da imagem, e os resultados foram expressos em partes por milhão (ppm). O programa gera uma tabela final com densidade ótica média para dados quantitativos ou qualitativos de cada *spot* de cada grupo de amostras. A partir disso, foi possível identificar as proteínas que tiveram variação na análise qualitativa que corresponde à detecção de *spots* presentes (**Tabela 2**) em apenas um grupo, mas não no outro. Na **Tabela 2** a coluna *spot* corresponde ao número de identificação do *spot*, e as colunas denominadas verde e maduro indicam a intensidade ótica média de cada *spot* para cada grupo de amostras. A coluna 'razão' indica quantas vezes a intensidade do *spot* aumentou ou diminuiu com o amadurecimento em relação ao valor observado no grupo de amostras verde.

Tabela 2. Análise qualitativa da presença de *spots* de proteínas nos extratos dos grupos de amostras representativas do mamão papaia nos estádios de maturação verde e maduro. Os valores correspondem às médias das densidades óticas encontradas para a triplicata de géis e a razão entre esses valores.

<i>Spot</i>	Verde	Maduro	Razão	<i>Spot</i>	Verde	Maduro	Razão
13	2,5	403,7	158,7	6803	2,5	109,7	43,13
110	2,5	366,1	143,92	6808	2,5	48,5	19,08
208	2,5	1039,3	408,63	6906	2,5	229,5	90,22
2305	2,5	325,8	128,08	6907	2,5	112,2	44,12
2504	2,5	401,8	157,98	7003	2,5	470,9	185,14
2608	2,5	552,7	217,32	7402	2,5	1205,4	473,92
3206	2,5	1876,2	737,66	7405	2,5	324,9	127,73
3303	2,5	702,2	276,08	7407	2,5	3322,7	1306,37
3503	2,5	824,0	323,97	7602	2,5	527,6	207,42
3505	2,5	738,6	290,39	7612	1246,1	3,1	0,00
3511	1308,3	3,1	0,00	7709	287,0	3,1	0,01
3704	2,5	236,0	92,77	7714	2,5	45,9	18,03
3705	2,5	282,8	111,17	7903	2,5	196,2	77,15
3709	2,5	587,8	231,12	7904	2,5	116,3	45,71
4306	328,5	3,1	0,01	8206	1904,7	3,1	0,00
4502	2,5	477,9	187,88	8803	2,5	365,3	143,61
4511	155,9	3,1	0,02				
4606	1011,0	3,1	0,00				
4607	977,6	3,1	0,00				
4709	2,5	230,0	90,44				
4804	2,5	351,0	138,01				
4805	2,5	198,3	77,96				
4806	212,6	3,1	0,01				
4807	2,5	606,7	238,54				
5301	2,5	562,8	221,27				
5303	2,5	155,5	61,12				
5404	317,8	639,7	2,01				
5702	2,5	249,0	97,91				
5706	2,5	85,9	33,79				
5801	2,5	177,5	69,79				
5804	2,5	96,7	38,02				
5807	2,5	137,8	54,17				
5809	2,5	126,4	49,71				
6403	2,5	689,0	270,88				
6601	2,5	338,7	133,16				
6708	2,5	79,2	31,15				
6801	2,5	170,2	66,91				

Para as análises qualitativas o programa atribuiu um valor mínimo de intensidade para os *spots* ausentes a fim de efetuar os cálculos posteriores da análise estatística (atribuiu 2,5 para ausência de *spots* nas amostras verdes e 3,1 para ausência em amostras maduras). A análise quantitativa revelou os *spots* de proteínas presentes em ambos os estádios, mas que apresentaram aumento ou diminuição corresponde aos *spots* que aumentaram ou diminuíram de intensidade, e os resultados podem ser vistos na **Tabela 3**. Na coluna ‘razão’ está indicado quantas vezes a intensidade do *spot* aumentou ou diminuiu em relação ao valor observado no grupo verde, tomado como referência na análise quantitativa. Estas variações foram validadas através do teste T de Student, com nível de significância de 95% e somente os *spots* que passaram nesse teste foram considerados na composição da lista final de *spots* de proteínas diferencialmente expressas.

Dos 378 *spots* detectados com aparente diferença de expressão entre os estádios de amadurecimento, apenas 74 *spots* foram considerados estatisticamente significativos. Dentre esses, nove *spots* foram considerados presentes apenas nas frutas verdes e 43 *spots* foram considerados presentes apenas nas frutas maduras, mostrando que, aparentemente, existem mais proteínas associadas exclusivamente com o estágio de maturação maduro, o que reflete o aumento de síntese protéica que acompanha o amadurecimento. Para a análise quantitativa, o teste T de Student confirmou variação significativa para 22 proteínas, sendo que a maior parte das alterações correspondeu ao aumento da intensidade dos *spots* em frutas maduras em relação às verdes.

Tabela 3. Análise quantitativa da presença de *spots* de proteínas nos extratos dos grupos de amostras representativas do mamão papaia nos estádios de maturação verde e maduro. Os valores correspondem às médias das densidades óticas encontradas para a triplicata de géis e a razão entre esses valores.

<i>Spot</i>	Verde	Maduro	Razão
9	187,9	1294,2	6,89
1003	150,0	619,4	4,13
2303	1271,8	3652,0	2,87
2601	5306,7	2478,0	0,47
2602	1752,5	689,6	0,39
3501	2918,4	1219,7	0,42
3604	257,5	111,5	0,43
4504	955,8	255,1	0,27
4508	985,6	2787,1	2,83
4509	461,7	973,9	2,11
4604	2514,5	656,1	0,26
4710	583,1	233,4	0,40
5502	1042,0	2441,2	2,34
5808	329,8	161,5	0,49
5901	479,8	238,4	0,50
6406	534,3	1259,4	2,36
7408	663,6	2744,9	4,14
7609	475,5	332,2	0,38
7610	598,9	76,5	0,13
7804	6366,2	2488,3	0,39
7906	74,4	282,3	3,79
8310	200,1	614,0	3,07

Os resultados obtidos com os géis corados com *coomassie brilliant blue* foram preliminares, pois foi utilizada apenas uma amostragem biológica, a amostragem III. Isso resultou em um baixo poder de análise, uma vez que é mais fácil perceber mudanças quando existem mais modelos de comparação do que quando há apenas um (HUNT *et al.*, 2005). Por isso existe uma grande importância de usar maior número de replicatas biológicas. Por exemplo, se a análise fosse feita para as três replicatas teria de ser feito um número muito grande de géis, além disso, a coloração com *coomassie brilliant blue* e a separação são etapas que introduzem grande variabilidade na análise. Apesar disso, essa caracterização das proteínas na faixa de pH 3-10 confirma a observação inicial de que a maior parte das proteínas extraídas parecem estar concentradas na faixa de pH 4-7, para os dois estádios de maturação. Assim, para as análises seguintes decidiu-se pelo uso da faixa de pH 4-7 na separação dos extratos das três amostragens.

4.4 Análise DIGE

O sistema de análise DIGE, eletroforese diferencial em gel, foi utilizado a por possibilitar maior sensibilidade de detecção de proteínas e menor variação técnica ou experimental devido às diferenças nas condições da corrida da eletroforese. Além disso, por permitir a incorporação de um padrão interno permite a normalização individualizada de cada *spot*, diminuindo assim o número de corridas necessárias e aumentando a qualidade dos dados para a análise estatística. Valcu e Valcu (2007) descreveram que as fontes de

variabilidade que influenciam os resultados 2-DE são principalmente: variabilidade biológica (como variedade genética e fatores ambientais) e variabilidade técnicas (pode resultar de qualquer fase do experimento desde a coleta e o armazenamento da amostra, até a análise das imagens e a variação do manipulador a qualidade dos reagentes). A fim de detectar apenas as proteínas com variação de expressão durante o amadurecimento do mamão papaia e não variações técnicas e biológicas, o sistema DIGE foi utilizado para a comparação dos extratos protéicos dos dois estádios de maturação das três amostragens. As três amostragens foram utilizadas para que o experimento tivesse maior confiabilidade a fim de diminuir a variação biológica nos experimentos posteriores e aumentar a confiabilidade da análise. Também foram feitas duplicatas de géis para cada experimento, a fim de diminuir a variabilidade técnica.

Inicialmente as proteínas de todas as amostras foram marcadas com o fluoróforo Cy5 e procedeu-se a eletroforese unidimensional para verificar a qualidade da marcação que mostrou que o extrato estava adequado para a marcação DIGE. A etapa seguinte foi a preparação dos seis *strips* de 24 cm de comprimento e pH 4-7, sendo que em cada gel foram aplicadas três amostras: os géis com as amostras verdes das três amostragens que foram marcadas com o corante Cy3, as maduras que foram marcadas com o corante Cy5 e o *pool* marcado com o corante Cy2. Neste experimento três amostras biológicas diferentes (amostragem I, II e III) para os dois pontos de maturação (verde e maduro) foram comparadas e analisadas (**Figura 5**).

Figura 5. Imagens dos géis resultantes das análises DIGE do mamão papaia verde e maduro. A coluna verde 1,2,3 representa as imagens do mamão verde foram marcados com Cy3 e 4,5,6 as que foram marcados com Cy5. A coluna *pool*/ todas as imagens foram marcadas com Cy2. A coluna maduro 1,2,3 representa as imagens do mamão maduro que foram marcadas com Cy5 e 4,5,6 as que foram marcadas com Cy3. As linhas representam as três imagens pertencentes ao mesmo gel.

Após obter a média da intensidade dos *spots* foi necessária a normalização a fim de compensar as variações técnicas como quantidades diferentes de proteínas aplicadas nos géis e as possíveis diferenças entre a marcação das amostras. Dessa maneira, os volumes dos *spots* de todos os géis foram normalizados para remover as variações não-relacionadas com a expressão diferencial das proteínas. A normalização com base no padrão interno (imagem com *spots* marcados com Cy2) foi feita para cada valor de intensidade de cada *spot* marcado com as cianidinas Cy3 e Cy5 e os resultados foram expressos em ppm. As variações entre os *spots* obtidas pelas análises quantitativas e qualitativas, assim com descrito para as análises dos géis corados com *coomassie brilliant blue*, foram validadas através do teste T de Student, com nível de significância de 95% e somente os *spots* que passaram nesse teste foram considerados na composição da lista final de *spots* de proteínas diferencialmente expressas.

Dos 426 *spots* validados, apenas 37 *spots* foram considerados diferencialmente expressos com $p < 0,05$. Desses 37 *spots*, 10 foram identificados como *spots* de proteínas presentes apenas na amostra do mamão maduro (**Tabela 4**), mostrando que existem mais proteínas presentes apenas no estágio de maturação maduro que no verde, o que reflete o aumento de síntese protéica que acompanha o amadurecimento.

Os outros vinte e sete *spots* foram indicados pela análise quantitativa (**Tabela 5**) compreendendo as proteínas com aumento de expressão de pelo menos 1,5 vezes, no estágio maduro.

Tabela 4. Análise qualitativa da presença de *spots* de proteínas nos extratos dos grupos de amostras representativas do mamão papaia nos estádios de maturação verde e maduro. Os valores correspondem às médias das densidades óticas encontradas para a triplicata de géis e a razão entre esses valores.

<i>Spot</i>	Verde	Maduro	Razão
3105	2,06	696,7	337,83
3203	2,06	458	222,09
3204	2,06	1152,2	558,66
3804	2,06	409,3	198,47
3902	2,06	159,6	77,4
5803	2,06	123,1	59,7
5804	2,06	183,8	89,1
6801	2,06	216,5	104,98
6802	2,06	54,1	26,25
7408	2,06	1281,4	621,33

Tabela 5. Análise qualitativa da presença de *spots* de proteínas nos extratos dos grupos de amostras representativas do mamão papaia nos estádios de maturação verde e maduro. Os valores correspondem às médias das densidades óticas encontradas para a triplicata de géis e a razão entre esses valores.

<i>Spot</i>	Verde	Maduro	Razão
1602	1238,3	2806,4	2,77
1603	1243,9	2655,9	2,14
1605	36,5	187,4	5,13
1801	1021,6	4841,5	4,74
1805	2198,8	8996,3	4,09
2705	1981,2	3405,8	1,72
2801	2302,8	8648,4	3,76
2802	975,8	4608	4,72
2805	209,1	1531,6	7,32
3202	8233	35539,1	4,32
3506	135,4	708,9	5,77
3702	1999,2	3670,4	1,84
3803	1264,8	6916,2	5,47
4502	86,1	3209,4	37,28
4801	56,1	184,3	3,29
5202	754,1	5553	7,36
6101	9167,1	14171,8	1,55
6308	191,3	420,8	2,2
7104	2514,6	7111,7	2,83
7810	171,3	721,9	4,21
8104	224,1	2642,4	11,79
8203	3228,2	6011,5	1,86
8204	456	2424,4	5,32
8702	178,6	686,2	3,84
8704	1193,1	2384,2	2
9301	582,9	2474,1	4,24
9302	110,4	607,9	5,51

Essas observações mostram que parece ocorrer maior variação qualitativa do que variação quantitativa durante o amadurecimento, o que foi sugerido pela avaliação preliminar dos géis, pois visualmente não se notam diferenças muito evidentes, como pode ser observado na **Figura 5**. Todas as 9 imagens dos diferentes géis apresentaram um perfil de *spots* muito similar, porém as imagens do mesmo gel possuem ruídos de coloração ou sinal de fundos muito diferentes, mais escuros ou claros que outros.

Conforme os resultados obtidos nas **Tabelas 4 e 5**, a maior parte das alterações corresponde ao aumento de *spots* nos géis dos estádios de maturação maduro em relação às verdes. De qualquer modo, foi identificado um número razoável de *spots* que parecem corresponder a proteínas variações de expressão mais pronunciadas, conforme apresentado na **Figura 6**.

A **Figura 6** é uma imagem multicanal que permite a visualização combinada dos *spots* das três imagens do mesmo gel ao mesmo tempo sendo que os géis da amostragem I foram os escolhidos como representativos das demais amostragens. Na imagem multicanal as proteínas do padrão interno marcadas com Cy2 são apresentadas em cor azul, os *spots* da amostra verde, marcados com Cy3, são apresentados em cor verde e os *spots* da amostra madura, marcados com Cy5, são apresentados em cor vermelha. Deste modo, a cor mais destacada da sobreposição das cores/imagens permite visualizar as proteínas mais abundantemente expressas no determinado estágio de maturação da cor escolhida para aquela imagem.

Figura 6. Imagem multicanal da análise DIGE obtida através da sobreposição de canais de fluorescência da Cy2 (pool), Cy3 (pré-climatérico), e Cy5 (climatérico). As setas indicam spots de proteínas diferencialmente expressos selecionados após análise de teste T de Student ($p \leq 0,05$), juntamente com seus respectivos números de identificação. A escala de pH de separação da IEF (pH 4-7) está localizada na parte superior, e da posição do peso molecular está à esquerda da imagem.

Assim, o *spot* que foi identificado no *pool*, no verde e no maduro simultaneamente sem diferença de expressão estará na cor branco. Os *spots* que aparecem em rosa são devido à sobreposição das cores azul (*pool*) e vermelho (maduro). A cor azul claro que seria resultado da sobreposição da imagem do *pool* (azul) e amostras verdes não aparece confirmando os resultados vistos nas Tabelas 3 e 4 que mostram que não há aumento significativo da expressão de proteínas no estágio verde. As proteínas selecionadas após a análise do teste de Student ($p \leq 0,05$) como diferencialmente expressas estão indicadas por setas, juntamente com seus respectivos números de identificação. A faixa de pH de separação da IEF foi de 4-7.

4.5 Seleção dos *spots* para digestão

Os 37 *spots* considerados diferencialmente expressos foram selecionados para a digestão, sendo isolados de gel preparativo, para cada amostragem e cada estágio de maturação, empregando uma quantidade total de 750 µg de proteínas adicionadas de 50 µg de cianidina (Cy5). Os géis foram corados com *coomassie brilliant blue* e as proteínas marcadas com fluorescência permitiram confirmar a correspondência entre os *spots* identificados na análise DIGE e aqueles no gel preparativo, pois as imagens geradas utilizando coloração com *coomassie brilliant blue* podem diferir da coloração utilizando fluorescência principalmente devido à quantidade de proteína carregada no gel. Para digestão e posterior análise dos resíduos dos

peptídeos, todas as repetições de um mesmo *spot* retiradas das triplicatas de géis foram agrupadas, obtendo-se assim uma maior concentração de proteína de cada amostra.

4.6 Espectrometria de massas

Os espectros resultantes do seqüenciamento dos 15 *spots* por ESI-Q-TOF MS/MS foram analisados utilizando o programa MASCOT (www.matrixscience.com). A escolha dos parâmetros é de fundamental importância para uma identificação precisa das proteínas. Utilizou-se banco de dados Mass Spectrometry Protein Sequence Data Base (MSDB) que possui alta qualidade de sequências, principalmente por não conter sequências redundantes. Como as amostras foram reduzidas e alquiladas, ou seja, as ligações dissulfeto dos resíduos de cisteína foram rompidas e estabilizadas com a inserção de um grupamento alquil pela iodoacetamida, selecionou-se a carbamidometil (C) como modificação fixa.

4.6.1 Taxa de identificação de proteínas em *Carica papaya* L.

Os espectros resultantes do sequenciamento por LC-MS/MS de 37 *spots* foram analisados contra as bases de dados de proteínas Swiss-Prot e NCBI. Deste total, 30 *spots* (81%) puderam ser identificados resultando em 20 proteínas diferentes.

A **Tabela 6** apresenta as proteínas que foram identificadas a partir da análise da eletroforese bidimensional e a classificação atribuída a elas. Nela estão relacionados o número de identificação do *spot*, a espécie a qual tiveram maior similaridade e o valor desta (*score*), ponto isoeletrico e massa molecular teórico e valor de intensidade para cada *spot* no estágio verde e no maduro.

Não foi possível a identificação de 7 *spots* (19%), provavelmente pela baixa concentração de peptídeos e nem a classificação de 2 *spots*, possivelmente por falta de identidade com as seqüências depositadas nos bancos de dados utilizados, como ocorreu com dois *spots* (3202 e 8203). Uma boa parte das proteínas identificadas apresentaram similaridade com proteínas já caracterizadas para mamão (33,3%) e depositadas em bancos de dados.

As demais proteínas apresentaram similaridade com proteínas bem caracterizadas em outras espécies como *Arabidopsis thaliana*, o que pode ser explicado pelo fato de haver um grande acervo de seqüências disponíveis, em razão do genoma completamente sequenciado e, também por pertencerem à mesma ordem (Brassicales).

Tabela 6. Proteínas de *Carica papaya* L. identificadas através da análise DIGE durante o amadurecimento do fruto.

<i>Spot</i>	Proteína	Espécie	Nº de acesso	Score	M_r/pI teórico a)	Nº de peptídeos b)	Classificação	Intensidade verde c)	Intensidade maduro c)
6101	Glutathione transferase (EC 2.5.1.18)	<i>Carica papaya</i> L.	T09781	622	25529/5,78	11	Estresse oxidativo	9167,1	14171,8
2802	Invertase de parede celular (EC 3.2.1.26)	<i>Carica papaya</i> L.	Q944U7	114	65902/6,16	12	Hidrolases	975,8	4608
2805	Invertase de parede celular (EC 3.2.1.26)	<i>Carica papaya</i> L.	Q944U7	531	65895/6,16	21	Hidrolases	209,1	1531,6
2801	Invertase de parede celular (EC 3.2.1.26)	<i>Carica papaya</i> L.	Q944U7	1132	65902/6,16	19	Hidrolases	2302,8	8648,4
3803	Invertase de parede celular (EC 3.2.1.26)	<i>Carica papaya</i> L.	Q944U7	691	65902/6,16	12	Hidrolases	1264,8	6916,2
4801	Invertase de parede celular (EC 3.2.1.26)	<i>Carica papaya</i> L.	Q944U7	192	65902/6,16	5	Hidrolases	56,1	184,3
3804	Invertase de parede celular (EC 3.2.1.26)	<i>Carica papaya</i> L.	Q944U7	92	65895/6,16	15	Hidrolases	2,06	409,3
3506	Alfa-galactosidase	<i>Carica papaya</i> L.	Q84QC9	72	45838/6,02	2	Hidrolases	135,4	780,9

continua

Continuação da Tabela 6. Proteínas de *Carica papaya* L. identificadas através da análise DIGE durante o amadurecimento do fruto.

Spot	Proteína	Espécie	Nº de acesso	Score	M _r /pI teórico a)	Nº de peptídeos b)	Classificação	Intensidade verde c)	Intensidade maduro c)
3105	AY780259 NID (ATP sintase)	<i>Eucalyptus globulus subsp. globulus</i>	AAX21014	88	55535/5,15	5	Metabolismo energético	2,06	696,7
3702	Oxidoreductase málica (enzima málica)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	E84582	326	64523/6,32	7	Metabolismo energético	1999,2	3670,4
2705	Oxidoreductase málica (enzima málica)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	E84582	364	64523/6,32	9	Metabolismo energético	1981,2	3405,8
6308	Piruvato desidrogenase E1 beta subunidade isoforma 2 (EC 1.2.4.1)	<i>Zea mays</i>	Q9ZQY2	255	40231/5,56	5	Metabolismo energético	191,3	420,8
3203	Triose-fosfato isomerase (EC 5.3.1.1)	<i>Zea mays</i>	ISZMT	142	27236/5,52	17	Metabolismo energético	2,06	458
1605	Aldeído desidrogenase (NAD) (EC 1.2.1.3)	<i>Nicotiana tabacum</i>	T02301	325	54239/6,96	6	Metabolismo secundário	36,5	187,4
1602	2A precursor, mitocondrial Aldeído desidrogenase (NAD) (EC 1.2.1.3)	<i>Nicotiana tabacum</i>	T02301	395	54239/6,96	6	Metabolismo secundário	1238,3	2806,4
	2A precursor, mitocondrial								

continua

Continuação da Tabela 6. Proteínas de *Carica papaya* L. identificadas através da análise DIGE durante o amadurecimento do fruto.

<i>Spot</i>	Proteína	Espécie	Nº de acesso	Score	M _r /pI teórico a)	Nº de peptídeos b)	Classificação	Intensidade verde c)	Intensidade maduro c)
5803	GcpE	<i>Lycopersicon esculentum</i>	Q8GZR6	113	82805/5,76	3	Metabolismo secundário	2,06	123,1
7810	Proteína Heat shock hsp70.	<i>Saussurea medusa</i>	Q5MCL0	604	71220/5,11	22	Resposta ao estresse	171,3	721,9
8702	Chaperona 60 cadeia alfa	cloroplasto - <i>Brassica napus</i>	S38642	515	61682/5,14	10	Resposta ao estresse	178,6	686,2
9302	Homólogo a fibrilina CDS P34 precursor	cloroplasto - batata	T07825	151	35671/5,26	2	Resposta ao estresse	110,4	607,9
5804	Proteínas de plastídeo associadas a lipídios	Tomate (fragmento)	T07125	89	29385/4,83	1	Resposta ao estresse	2,06	183,8
8204	Proteínas de plastídeo associadas a lipídios	Tomate (fragmento)	T07125	67	29385/4,83	1	Resposta ao estresse	456	2424,4
5202	Provável endoquitinase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	H84867	75	29674/8,31	2	Resposta ao estresse	754,1	5553
3902	Fator de alongação 2 putativo	<i>Oryza sativa</i> (japônica cultivar-group)	Q6H4L2	147	94987/5,85	6	Síntese e armazenamento de proteínas	2,06	159,6

continua

Continuação da Tabela 6. Proteínas de *Carica papaya* L. identificadas através da análise DIGE durante o amadurecimento do fruto.

Spot	Proteína	Espécie	Nº de acesso	Score	M _r /pI teórico a)	Nº de peptídeos b)	Classificação	Intensidade e verde c)	Intensidade e maduro c)
7408	Oxidase do ácido 1-aminociclocarbílico -ACC oxidase (EC 1.14.17.4)	<i>Carica papaya</i> L.	Q9ZRC9	59	36357/5,15	17	Síntese e regulação de etileno	2,06	1281,4
6802	5-metiltetraidropteroil-triglutamate-homocisteína metiltransferase (EC 2.1.1.14)	<i>Mesembryanthemum crystallinum</i> L.	T12575	105	85054/5,9	8	Síntese e regulação de etileno	2,06	54,1
1805	5-metiltetraidropteroil-triglutamate-homocisteína metiltransferase (EC 2.1.1.14)	<i>Catharanthus roseus</i> (L.)	S57636	211	85089/6,10	30	Síntese e regulação de etileno	2198,8	8996,3
1801	5-metiltetraidropteroil-triglutamate-homocisteína metiltransferase, putativa	<i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)	Q2QLY5	293	84879/5,93	12	Síntese e regulação de etileno	1021,6	4841,5
4502	S-adenosilmetionina sintase (EC 2.5.1.6)	<i>Carica papaya</i> L.	Q8GTL5	455	47626/5,60	15	Síntese e regulação de etileno	86,1	3209,4
3202	Proteína QA100006	<i>Arabidopsis thaliana</i> (fragmento)	PA0027	38	1598/9,71	1	Não classificada	8233	35539,1
8203	Proteína hipotética At3g23560	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q8H0X9	88	26784/5,28	2	Não classificada	3228,2	6011,5

a) Massa molecular (Da) e ponto isoelétrico teóricos

b) Número de peptídeos correspondentes identificados por MS/MS

c) Média normalizada da intensidade dos spots de amostras verdes e maduras

4.7 Classificação funcional das proteínas

As proteínas identificadas foram classificadas de acordo com sua função biológica em categorias funcionais (RISON, HODGMAN e THORNTON, 2000). Como pode ser observado na **Figura 7**, grande parte das proteínas seqüenciadas da polpa de *Carica papaya* L. participam de processos celulares como resposta ao estresse, metabolismo de energia (como metabolismo de glicose) e proteínas relacionadas à síntese de DNA, RNA, proteínas e aminoácidos, carboidratos, nucleotídeos e lipídeos. A categoria hidrolases de parede celular está representada pelo maior número de proteínas (19%) estando presentes proteínas que participam da perda da textura do fruto.

4.7.1 Síntese e regulação de etileno

O etileno é um hormônio que está envolvido na aceleração do amadurecimento e senescência de frutos climatéricos. Durante a maturação, o etileno se liga ao seu receptor na célula e desencadeia uma série de eventos que levam ao amadurecimento e senescência do fruto. Já foi visto que a inibição da ligação do etileno ao seu receptor pode reduzir a produção e a ação do mesmo e, com isso, retardar o amadurecimento e a senescência de frutos climatéricos.

Figura 7. Classificação funcional das 37 proteínas da polpa do mamão papaia identificadas como diferencialmente expressas durante o amadurecimento.

Devitt e colaboradores (2006) relataram várias sequências de ESTs do mamão com similaridade significativa com proteínas associadas a síntese e regulação de etileno e hidrolases de membrana e parede celular que consequentemente leva ao amaciamento da polpa do fruto.

A metionina é um aminoácido essencial sintetizado apenas por plantas e microorganismos. As proteínas metionina sintase (MetE, EC 2.1.1.14), *spots* 1801, 1805 e 6802, participam da síntese de metionina (Met). Em plantas, a metionina serve como precursor de diversos processos metabólicos, incluindo a síntese de proteínas e etileno (ZEH *et al.*, 2002).

Os três *spots* identificados como MetE apresentaram aumento acentuado da expressão dessa enzima em frutos climatéricos sugerindo um aumento na demanda de precursores de etileno a partir da metionina. O gene que codifica essa enzima já foi relatado em batata (ZEH *et al.*, 2002) e os transcritos desse gene foram encontrados mais abundantemente nas flores do que em folhas e raízes e, em quantidades menores ainda, no caule e nos tubérculos. Concluiu-se que, embora em níveis diferentes, a biossíntese de metionina ocorre em todos os tecidos da planta, não só nos órgãos de origem, embora a taxa possa variar em diferentes órgãos. Dados um pouco mais antigos indicam que a cistationina- γ -sintase (enzima que catalisa a primeira etapa da via de síntese de metionina) em morango (NAM *et al.*, 1999) e MetE em frutos de tomate (ZEGZOUTI *et al.*, 1999) são altamente expressas durante a formação dos frutos. Isso pode indicar que há uma maior demanda por

metionina durante a floração e formação dos frutos o que pode explicar o aumento da expressão de metionina sintase.

Por conseguinte, é razoável especular que a biossíntese de aminoácidos, especialmente a biossíntese de metionina, ocorre em tecidos como frutas e flores, a fim de alcançar as concentrações intracelulares necessárias de aminoácidos. Sarry e colaboradores (2004) estudaram os proteomas dos mesocarpos de seis variedades de uva e identificaram níveis de metionina sintase similares entre elas. Os *spots* 1801 e 1805 apresentaram massas moleculares similares às encontradas no trabalho com uvas, porém com *pI* diferente. Três proteínas foram identificadas como metionina sintase e as variações de intensidade dos *spots* 1801 e 1805 foram semelhantes com aumento de aproximadamente 4,7 vezes e mesma massa molecular com variação pequena de *pI*. Já o *spot* 6802 não teve expressão em frutos pré-climatéricos e sua intensidade foi elevada em 27 vezes em amostras de frutos climatéricos com *pI* e massa molecular diferentes dos outros dois *spots*.

As proteínas S-adenosilmetionina sintase (SAMs, EC 2.5.1.6), *spot* 4502, catalizam a formação da S-adenosilmetionina (SAM) a partir da metionina, que é o precursor da síntese de etileno. Foram caracterizados os níveis de expressão de genes de SAM durante o desenvolvimento ou senescência dos ovários da ervilha. Durante a senescência desses órgãos, os níveis de mRNA de SAM aumentaram, provavelmente associados com a biossíntese de etileno, uma vez que o tratamento dos ovários com aminoetoxivinilglicina (que é um aminoácido que inibe a síntese autocatalítica do etileno), resultou em um atraso na senescência e na prevenção do acúmulo

mRNA de SAM (GOMEZ-GOMEZ e CARRASCO, 1996). Lindermayr e colaboradores (2006) relataram também o mecanismo molecular da S-nitrosilação em SAM de *Arabidopsis thaliana* e observaram a diminuição da concentração de etileno, sugerindo que este aminoácido atua regulação da síntese do etileno. Deste modo, a expressão dessa enzima parece estar diretamente relacionada com o controle e regulação do etileno. Esses dados sustentam os resultados obtidos nesse trabalho na qual a expressão dessa enzima (*spot* 4502) mostrou aumento de intensidade no estágio climatérico. Para o mamão ainda não havia relatos da expressão diferencial dessa enzima em diferentes estádios de maturação, tendo sido descrito, apenas, que uma enzima putativa já foi clonada de uma biblioteca de cDNA do mamão.

A enzima 1-aminociclopropano-1-carboxílico oxidase (ACC oxidase EC 1.14.17.4) também é uma enzima chave na via do etileno, uma vez que catalisa a etapa final da biossíntese; seu papel durante o amadurecimento de frutos como tomate (ANJANASREE, VERMA e BANSAL, 2005), banana (LOPEZ-GOMEZ *et al.*, 1997) e mamão (LIN, LIN e SHAW, 1997) tem sido o foco de pesquisas de diversos grupos por muitos anos. No trabalho realizado por Roeder e colaboradores (2009) foi observado que os níveis de mRNAs da ACC oxidase aumentaram durante o desenvolvimento e a senescência das flores de *Nicotiana suaveolens*, que se correlaciona com a produção de etileno.

O nível do ácido 1-aminociclocarboxílico (ACC), substrato para a ACC oxidase, foi relatado como inicialmente baixo no mesocarpo de mamão, sendo ampliado em até três vezes quando o pico da síntese de etileno ocorre. Isto

sugere que, no auge da síntese de etileno, a atividade da ACC oxidase pode ser limitante (PAULL e CHEN, 1990).

Em outro trabalho os níveis de mRNA da ACC oxidase em mamão (encontrados em frutos pré-climatérios) foram muito baixos na casca e muito altos na polpa. Por outro lado, os níveis em frutos climatéricos se tornaram bastante perceptíveis na casca e abundantes na polpa (LOPEZ-GOMEZ *et al.*, 2004). Diferentemente do que foi descrito no trabalho desses autores, foi verificado que a expressão dessa proteína (*spot* 7408) foi pouco detectável em frutos pré-climatéricos, tendo aumentado expressivamente em frutos climatéricos. Este comportamento diferente no estágio pré-climatérico pode ser explicado pelo fato de existirem dois genes que codificam para essa proteína (CHEN *et al.*, 2003). Chen e colaboradores (2003) isolaram um novo gene (*CP-ACO2*) que codifica para ACC oxidase e que tem 77% de identidade com o gene (*CP-ACO1*) reportado previamente. Ele também foi identificado como induzido pelo etileno, porém, análises de *Northern blot* revelaram que os genes *CP-ACO2* são induzidos durante amadurecimento dos frutos e senescência foliar, enquanto que os genes *CP-ACO1* foram induzidos antes do estágio da mudança de cor do fruto. Esses dados sugerem que o *spot* 7408 tenha sido codificado pelo gene (*CP-ACO2*) relacionado com o estágio posterior a mudança de cor.

Como essa enzima é bastante estudada, já foi descrita a tentativa de supressão dessa proteína em frutos transgênicos de mamoeiro (LOPEZ-GOMEZ *et al.*, 2009). Os frutos transgênicos demonstraram redução marcante nos níveis de mRNA para ACC oxidase, seguido de um atraso no

amadurecimento, porém, ocorreram alterações não desejáveis na textura e cor da casca, mostrando, assim, que a pesquisa precisa de maior aprofundamento.

Os diferentes estudos de pós-colheita para frutos climatéricos, como o mamão papaia, apontam o amaciamento da polpa como um fator fundamental para ser controlado (PAULL *et al.*, 1997). Deste modo, as enzimas envolvidas na síntese de etileno representam pontos fundamentais para a investigação, uma vez que o etileno participa do processo de amadurecimento dos frutos. O mamão é muito suscetível ao rápido amadurecimento causado pelo etileno e muitas das estratégias usadas atualmente para prolongar a vida de prateleira do mamão são baseadas no controle da ação e produção do etileno.

Fabi (2007) estudou a resposta ao etileno e ao 1-MCP durante o amadurecimento do mamão. Os resultados obtidos mostraram que o 1-MCP pode diminuir a qualidade das frutas tratadas. Mas, mesmo com o uso de etileno para provocar ou induzir a maturação homogênea, a qualidade dos frutos resultantes é menor quando comparada à dos frutos que foram deixados para amadurecer naturalmente. Talvez a disponibilidade de frutos com baixa produção de etileno endógeno possa reduzir substancialmente as perdas causadas por este hormônio. Os genes responsáveis pela síntese, ACC sintase e ACC oxidase, tem sido alvos de estudo e de estratégias de manipulação e repressão desses genes no amadurecimento do tomate ou em outras espécies (MATAS *et al.*, 2009).

4.7.2 Hidrolases

As invertases de parede celular ou β - fructofuranosidases (*spots* 2801, 2802, 2805, 3803, 3804 e 4801) estão ionicamente ligadas a parede celular devido a sua neutralidade (pI básico e baixo pH). Essas enzimas promovem a clivagem hidrolítica da sacarose em monômeros de hexose, além de regular muitos aspectos do crescimento e do desenvolvimento das plantas, quando sozinhas, ou em combinação com hormônios de plantas (ROITSCH e GONZALEZ, 2004).

As invertases ácidas de parede celular são consideradas enzimas-chave na mobilização da sacarose e no equilíbrio entre a produção e o escoamento da mesma pela planta. Estas enzimas fornecem carboidratos que serão levados para os tecidos através da via apoplástica (FOTOPOULOS, 2005). Estas proteínas tiveram aumento de expressão significativo nas frutas climatéricas (**Figura 7**). Os seis *spots* referentes às invertases apresentaram padrões de variação de Mr e pI similares (*spots* 2801, 2802, 2805, 3803 e 4801) com exceção do *spot* 3804 cuja a razão da intensidade foi bem maior que a dos demais. Essas isoformas podem ocorrer devido a modificações pós-traducionais, proteólise ou diferença de subunidades terminais. Em mamão essas enzimas provavelmente atuam disponibilizando frutose e glicose para outros processos como a respiração e a biossíntese de compostos primários e secundários que requerem maior demanda desses açúcares durante o amadurecimento.

As alfa-galactosidases (EC 3.2.1.22), similar ao *spot* 3506, são enzimas amplamente distribuídas em plantas e já foram relatadas durante o desenvolvimento de folhas e frutos, bem como sementes e tubérculos (MARRACCINI *et al.*, 2005). Dependendo do tipo da isoforma, a enzima pode ser distribuída no citosol, bem como no vacúolo e, em alguns casos, na parede celular (SOH, ALI e LAZAN, 2006). Fernandez e colaboradores (1995) correlacionaram o aumento dessa enzima com a mudança na composição de açúcares da parede celular durante o amadurecimento de azeitonas. Soh e colaboradores (2006) observaram que, durante o amadurecimento do mamão, a atividade da alfa-galactosidase aumentou concomitantemente com a perda de firmeza da polpa. Este aumento foi em grande parte atribuído a uma das três isoformas de alfa-galactosidase estudadas (α -gal 2). Essa isoforma também teve uma marcante capacidade de catalisar o aumento da solubilidade e despolimerização de pectina, enquanto os polímeros ainda se mantinham estruturalmente ligado à estrutura da parede celular, de forma similar ao que ocorre durante a maturação.

Shiga e colaboradores (2009) observaram que o amaciamento da polpa do mamão durante o amadurecimento é uma consequência da solubilização de grande parte da massa molecular de galacturonanos de frações de pectina da parede celular. Este processo parece ser dependente dos níveis de etileno e é provável que a liberação dos galacturonanos seja resultado da ação de uma endo-poligalacturonase. Esses resultados, as modificações na parede celular observadas pela análise química de Shiga e colaboradores (2009) são compatíveis com o aumento da alfa-galactosidase (*spot* 3506). Dessa maneira,

esse resultado pode dar uma nova pista de mais uma enzima envolvida no processo de amaciamento da polpa.

A estreita correlação entre as alterações da textura, atividade e níveis de proteína, bem como a capacidade para modificar a parede celular, sugerem que a enzima alfa-galactosidase contribui para o amaciamento do fruto do mamão durante o amadurecimento. O *spot* 3506 também teve aumento de intensidade da fase pré-climática para a climática e apresentou massa molecular de 45 KDa, próxima àquela descrita no trabalho de Soh e colaboradores (2006). Essas proteínas merecem maior atenção, pois podem ser de importância para o melhoramento do mamão papaia por participar da alteração na textura da polpa do fruto.

4.7.3 Metabolismo secundário

Os precursores para a produção de carotenóides são sintetizados através da via do metileritritol fosfato (MEP). As enzimas GcpE (hidroxi-metil-butenil-4-difosfato-sintase) participam dessa via catalisando a conversão de metileritritol 2,4-ciclo difosfato para hidroxi-metil-butenil 4-difosfato, que é o precursor direto para a síntese de isopentenil-difosfato (IPP) e isômero-dimetilalil-difosfato (DMAPP) que por sua vez são precursores para a síntese de carotenóides (QUEROL *et al.*, 2002). Em trabalho com tomate foi identificada uma seqüência de cDNA que codifica uma proteína bastante similar à GcpE (RODRIGUEZ-CONCEPCION *et al.*, 2003). Através de análise molecular da variação de transcritos em diferentes estádios de

amadurecimento dos frutos de tomate, não foram observadas alterações significativas na expressão gênica de GcpE.

Porém, no caso do mamão, o *spot* 5803, similar a GcpE teve um marcante aumento na intensidade (61 vezes) durante a maturação, com expressão não-detectável no estágio pré-climatérico. Este é um resultado esperado, uma vez que, a biossíntese de carotenóides e sua regulação durante o desenvolvimento e maturação dos frutos é um processo complexo, que ocorre juntamente com a diferenciação dos cloroplastos em cromoplastos e alterações nas propriedades organolépticas do fruto. Portanto, pode ser esperada uma maior atividade da via MEP para suprir um intenso acúmulo de carotenóides durante o amadurecimento. Essas enzimas são importantes uma vez que os carotenóides afetam o valor nutricional do fruto e sensorial do fruto. Desse modo, o conhecimento a respeito dessa enzima pode trazer melhorias para a qualidade do fruto, relativas à cor.

Os compostos voláteis como cetonas, aldeídos, ésteres, álcoois e ácidos voláteis, são responsáveis pelo aroma dos vegetais. Sua produção está relacionada diretamente com o processo de amadurecimento e com os fatores que o influenciam, como a temperatura, composição atmosférica, presença de etileno, entre outros fatores.

A enzima aldeído desidrogenase, (EC 1.2.1.3), *spots* 1605 e 1602, teve aumento da intensidade em frutos maduros em mamão e pode estar associada com a formação de compostos voláteis (FUGGATE *et al.*, 2010). Giribaldi e colaboradores (2007) relataram que essa enzima também está envolvida na

destoxificação de aldeídos e na resistência a patógenos em pimentão, além do papel no metabolismo energético, como na entrada do acetato no ciclo de Krebs.

Essa enzima pode ser foco de estudo no futuro, tanto pelo interesse na qualidade final do fruto durante o amadurecimento (síntese de compostos voláteis), bem como pelo possível papel na resistência a patógenos, uma vez que um dos problemas relacionados à qualidade do mamão exportado pelo Brasil é a ocorrência de doenças pós-colheita. Os dois *spots* tiveram aumento na intensidade, porém, com padrão de variação diferente, o *spot* 1602 aumentou 2,2 vezes enquanto que o *spot* 1605 aumentou 5,1 vezes. Isso sugere que essas proteínas podem ser reguladas de maneira diferente, uma vez que houve diferença nos valores de intensidade. Elas possuem a mesma massa molecular e *pI* diferentes, porém, os valores de *pI* estão próximos, sugerindo possíveis isoformas.

4.7.4 Metabolismo energético

Quando um tecido se encontra em alta atividade metabólica é também alta a necessidade de energia. As ATP sintases (ATPase) são enzimas multiméricas que contribuem para a geração do gradiente de prótons através do tonoplasto. A ATP sintase pertence à família das ATPase's e produz ATP a partir de ADP na presença do gradiente de prótons, através da membrana. Foi observado que a supressão antisense dessa enzima reduz o crescimento do fruto, mas não afeta a concentração de açúcar, como visto em frutos de tomate (FAUROBERT *et al.*, 2007). Em membrana plasmática de uva, em diferentes estádios de maturação, não foram verificadas grandes diferenças na expressão

dessa enzima (ZHANG *et al.*, 2008). Diferentemente, em mamão, o *spot* 3105 teve intensidade detectada apenas em frutos maduros, indicando uma forte indução da expressão durante o amadurecimento. Isso ocorre, provavelmente, por ser necessário nesta fase maior transporte de prótons para fornecer energia durante a maturação, devido ao aumento da respiração.

As oxidoreductases málicas (EC 1.1.1.38), *spots* 2705, 3702, são enzimas que catalisam a descarboxilação oxidativa do malato para piruvato, com a liberação simultânea de dióxido de carbono e conversão de NADP⁺ para NADPH. Um aumento acentuado na atividade da enzima málica foi observado durante o amadurecimento da maçã, frutos de cereja e pera (HIRAI, 1978).

Isso também foi observado em mamão, como pode ser notado pelo aumento nos *spots* 2705 e 3702. Ambas as enzimas (*spots* 2705 e 3702) apresentaram sequências com elevada similaridade com as da enzima já identificada em tomate. Além disso, apresentaram um padrão de variação da intensidade com maior expressão do *spot* 3702 que foi 59 vezes mais intenso nas amostras climatéricas que nas pré-climatéricas. Por outro lado, o *spot* 2705 apresentou um aumento regular de 18 vezes no estágio climatérico

O aumento da expressão dessa enzima pode ter relação com a maior demanda de energia e piruvato, o qual participa de vários outros processos metabólicos como o ciclo de Krebs, podendo ser convertido a carboidrato via gliconeogênese ou convertido a energia através da Acetil-CoA. Outra justificativa para o aumento de expressão dessa enzima durante o amadurecimento do mamão seria a maior necessidade de NADPH. O NADPH

está relacionado com as vias de defesa, como a via da glutathione, que também teve uma enzima aumentada (a glutathione transferase, *spot* 6101) e também participa da síntese de ácidos graxos.

4.7.4.1 Metabolismo de carbono

A glicólise é uma via do metabolismo primário da célula e o principal processo de uso energético da glicose. Nessa via, a glicose, um açúcar de 6 carbonos, é dividido em dois açúcares de 3 carbonos, que são oxidados e rearranjados para produzir duas moléculas de piruvato. Além de preparar um substrato para oxidação do ciclo do ácido tricarboxílico, a glicólise produz uma pequena quantidade de energia química na forma de ATP e NADH.

As triose-fosfato-isomerases (EC 5.3.1.1), que no mamão tem um provável correspondente no *spot* 3203, são enzimas da via glicolítica que estão associadas com a obtenção de energia e o metabolismo de carbono. Como visto no trabalho durante a maturação de tomate, ocorre um aumento do catabolismo, ocorrendo indução de enzimas da glicólise, como a triose fosfato isomerase, que produz substratos para a respiração e síntese de malato, a partir de açúcares liberados durante a maturação. Foi observado no trabalho de Rocco e colaboradores (2006) um aumento dos níveis dessa enzima de 0,6 vezes para o tomate no estágio *breaker* e 0,4 vezes no tomate vermelho em relação ao tomate verde. O *spot* 3203 teve um aumento de intensidade de 222 vezes sugerindo que grande quantidade de energia é necessária durante o amadurecimento do mamão papaia.

Além de moléculas de ATP a glicólise produz duas moléculas de piruvato, o qual é oxidado nas mitocôndrias pela piruvato desidrogenase (EC 1.2.4.1), uma enzima que também foi encontrada neste trabalho, como indicado pelo *spot* 6308. O piruvato pode ser canalizado para o ciclo de Krebs e é convertido em Acetil-CoA pela piruvato desidrogenase. Através do aumento no fluxo do ciclo de Krebs, observou-se que a subunidade E1 da enzima piruvato desidrogenase é mais abundantemente expressa no estágio maduro em uvas (NEGRI *et al.*, 2008), indicando uma maior produção de energia durante este estágio. Perez e colaboradores (2002) observaram que os níveis de atividade da piruvato descarboxilase e da piruvato desidrogenase poderiam estar envolvidos, também, nas diferentes distribuições de compostos voláteis entre cultivares de morango. Além disso, alterações da atividade da enzima piruvato desidrogenase, a qual converte piruvato em Acetil-CoA, que por sua vez é precursor de muitos compostos voláteis responsáveis pelo aroma produzido durante o amadurecimento, pode provocar alterações nas concentrações de compostos voláteis produzidos.

O *spot* 6308 teve aumentado de intensidade de 2,19 vezes em relação à intensidade do *spot* das amostras de frutos pré-climatérico. Este aumento pode ser justificado tanto pela necessidade de maior quantidade de energia como também pelo acúmulo de compostos que compõem o aroma durante esta fase. Essa enzima teve alta identidade com aquela identificada em brotos de milho, com pI e Mr similares aos encontrados no trabalho de Thelen, Miernyk e Randall (1998). Esse resultado tem muita importância para o amadurecimento do mamão e para a qualidade do fruto, uma vez que o aroma e as outras características organolépticas são muito importantes na sua qualidade final

4.7.5 Síntese e armazenamento de proteínas

Antes do início da perda da firmeza da polpa, o fruto aumenta quase que exclusivamente pela expansão de células, o que exige alongamento da parede celular e acúmulo de solutos dentro do vacúolo. O fator de alongação 2 (*spot* 3902) é um polipeptídeo que catalisa o último passo do ciclo de alongação (a translocação) durante a síntese de proteínas (IGLEWSKI, 1994).

Os resultados obtidos para o *spot* 3902, com aumento da expressão da proteína durante o amadurecimento, estão de acordo com os dados apresentados por Zegzouti e colaboradores (1999) que demonstrou que frutos de tomate verdes tratados com etileno apresentaram acúmulo de um transcrito (ER49) que codifica para um gene denominado *LeEF-Ts_{mt}* e que corresponde a um fator de alongação mitocondrial envolvido na síntese de proteínas. Deste modo, o etileno parece estimular a síntese e/ou armazenamento de proteínas durante o amadurecimento. No mamão, provavelmente este aumento na expressão dessa proteína se deve ao aumento da produção de etileno, pois essa enzima teve maior expressão em frutos climatéricos do que em frutos pré-climatéricos. Isto sugere que, durante essa etapa do amadurecimento, existe uma maior demanda de síntese protéica, provavelmente para suprir e executar os processos metabólicos que ocorrem na maturação.

4.7.6 Proteínas de resposta ao estresse

As proteínas de resposta ao estresse estão envolvidas na respostas ao estresse biótico e abiótico. Proteínas de resposta ao estresse são principalmente *heat shock proteins* (HSP) e chaperoninas, que são uma classe de proteínas responsáveis pelo dobramento, translocação e degradação de proteínas, mantendo a conformação funcional (WANG *et al.*, 2004).

Diferentes proteínas de choque térmico (HSP), pertencente às famílias chaperonina e HSP pequenas (sHSP), ocorrem em plantas. A família HSP, como a HSP 70 (EC 3.6.4.10), similar ao *spot* 7810, também participa da proteção da estrutura de proteínas sendo induzidas ou mais intensamente expressas em resposta a altas e baixas temperaturas. O estresse celular pode ser causado por fatores bióticos e abióticos e normalmente danificam macromoléculas como DNA, proteínas ou lipídios de membranas. Quando o sinal de estresse é iniciado o nível de proteínas envolvidas na defesa do organismo eleva-se ou elas tornam-se ativas (KULTZ, 2005). Em tomate, HSP pequenas estão envolvidas nos processos de desenvolvimento dos frutos (FAUROBERT *et al.*, 2007). Recentemente, Rocco e colaboradores (2006) demonstraram em trabalho com tomate que a isoforma citosólica da HSP 70 aumenta 2,6 vezes quando estágio maduro é comparado ao verde. No caso do *spot* 7810, este teve a intensidade aumentada em 4,2 entre os estádios verde e maduro. Além disso, a enzima apresentou Mr (71 KDa) e pI (5,1) próximo ao encontrado no trabalho Rocco e colaboradores (2006). Assim, é possível que no mamão essa proteína desempenhe um papel protetor equivalente aos

encontrados por Kultz (2005), Faurobert e colaboradores (2007) e Rocco e colaboradores (2006).

As chaperonas (*spot* 8702) compõem uma família de proteínas que estão envolvidas no dobramento e auxílio ao redobramento de proteínas sintetizadas em procariotos, mitocôndrias e plastídios. Porém, a caracterização funcional das chaperonas em plantas é limitada. Já foi reportado que essas enzimas são importantes na assistência de proteínas plastidiais como a rubisco. As chaperonas desempenham papel importante na aclimação fotossintética ao estresse térmico, possivelmente, protegendo a rubisco ativase de desnaturação térmica (WANG *et al.*, 2004). A expressão elevada dessa enzima (*spot* 8702) no estágio climatérico sugere que, durante este período, seja necessária uma maior estabilização de proteínas, uma vez que durante o amadurecimento ocorrem vários processos oxidativos. Esse aumento pode ser importante para o processo de amadurecimento normal do mamão papaia, uma vez que durante o amadurecimento ocorrem alterações bioquímicas que podem desencadear um processo de estresse, induzindo essas enzimas a atuarem em resposta ao estresse elevando assim o nível de proteínas de defesa.

As fibrilinas de plantas, também denominadas proteínas de plastídeo associadas a lipídios (PAP), similares aos *spots* 5804 e 8204, são proteínas plastídicas reguladas durante a diferenciação do cromoplasto em certas frutas. Os cromoplastos são responsáveis pelas cores laranja, amarelo, vermelho das flores, frutos, folhas e algumas raízes. As proteínas de plastídeo associadas a lipídios são proteínas envolvidas na conversão de cromoplastos em cloroplastos, a qual é caracterizada pelo acúmulo de carotenóides e pela

degradação de clorofila durante a maturação de frutos de pimenta (ROMERO *et al.*, 1997). Como no trabalho com frutos de pimenta, o *spot* 8204 também apresentou aumento durante a maturação (91 vezes), porém, o *spot* 5804 não apresentou intensidade na fase pré-climatérica, aumentando sua intensidade em 5,3 vezes em amostras de frutos climatéricos.

Esse aumento é condizente com a mudança na cor da polpa, pois, é uma das alterações que ocorrem durante o amadurecimento. Além disso, o p/e e a massa molecular também variaram muito. É importante conhecer os padrões das diferentes isoformas pois, elas podem estar sendo ativadas e reguladas de maneira diferente podendo assim exercer funções diferentes uma das outras. Desse modo, conhecer essa proteína e cada isoforma pode ser importante uma vez que, pode ser um ponto de intervenção ou manipulação no processo de desenvolvimento da cor do mamão.

Recentemente, essa proteína também foi relacionada ao estresse hídrico em folhas de pimentas (LANGENKAMPER *et al.*, 2001). Isso foi comprovado após a clonagem do cDNA que codifica para uma proteína de cloroplasto de batata, altamente homologa à fibrilina em pimenta, previamente caracterizada como uma proteína relacionada ao estresse hídrico, CDSP-34 (GILLET *et al.*, 1998). A proteína presente no *spot* 9302 foi similar à proteína homóloga à fibrilina, CDSP-34, que apresenta alta similaridade com uma proteína cromoplástica de pimenta envolvida no seqüestro de carotenóides e está relacionada ao estresse hídrico. A intensidade do *spot* aumentou significativamente do fruto verde para o fruto maduro em 5,5 vezes. Além disso,

essa informação pode ser também de interesse para o entendimento do processo de desenvolvimento da cor, cromoplasto e etc.

Foi observado que a atividade de enzimas quitinases aumentou significativamente no início do amadurecimento de uva (ROBINSON, JACOBS e DRY, 1997). Essas proteínas estão envolvidas na resposta a estresses bióticos (GUARINO *et al.*, 2007). As endoquitinases (*spot 5202*) em mamão também tiveram aumento durante a maturação e apresentaram Mr e pI diferente do teórico descrito na **Tabela 6**. A presença de todas essas enzimas que participam da resposta ao estresse, dentre as quais as quitinases, podem ser também parte de mecanismo protetor. Esse mecanismo pode ser induzido durante a maturação, para que os frutos tenham um conjunto de enzimas de defesa presentes para responder rapidamente em caso de ataque de patógeno.

O melhor entendimento sobre as proteínas de defesa em mamão durante o amadurecimento, bem como os níveis de expressão dessas proteínas, pode facilitar a pesquisa no controle de perdas pós-colheita, tanto em relação ao estresse biótico como abiótico. Isso, por exemplo, poderia levar ao entendimento de qual a melhor temperatura para acondicionar os frutos e que menos os afetem.

4.7.7 Proteínas de estresse oxidativo

Os organismos aeróbicos estão continuamente expostos ao oxigênio, que os tornam propensos a danos gerados por radicais livres. O estresse oxidativo é largamente mediado pelas espécies ativas de oxigênio, por exemplo, o ânion superóxido, o peróxido de hidrogênio e o radical hidroxila. Em plantas, espécies reativas de oxigênio são produzidas por foto-redução de O₂ durante a fotossíntese. Algumas proteínas como as peroxidases, catalases e glutathione transferase são encarregadas da remoção de radicais livres em decorrência do estresse oxidativo (REICHHELD *et al.*, 1999).

A glutathione transferase (EC 2.5.1.18) é uma enzima que participa da destoxificação de uma variedade de compostos xenobióticos da célula e por isso tem sido estudada para possibilitar a desntoxificação de herbicidas em plantas (MARRS, 1996). Além disso, o sítio de domínio da glutathione transferase (*spot* 6101) também é encontrado em fatores de alongação 1-gama e de proteínas da família HSP 26 que estão relacionadas ao estresse (LEVI *et al.*, 2006). Já foi relatado que em várias espécies de plantas há uma expressão gene-específica e variável dessa enzima durante o desenvolvimento, em resposta a fatores ambientais, químicos ou a patógenos. Também foi visto que essas enzimas podem executar uma variedade de funções relacionadas aos flavonóides e à deposição desses compostos no vacúolo (LEVI *et al.*, 2006).

Essa enzima já foi isolada de sementes do mamão e foi verificado o possível papel da glutathione no acúmulo de isotiocianatos (moléculas que conferem resistência a ataques de fungos) (NAKAMURA *et al.*, 2000). Além

disso, o isotiocianato também tem sido relatado pelo seu potencial quimioprotetor na prevenção de câncer (BRADLOW *et al.*, 1991). Rossetto e colaboradores (2008) detectaram níveis significativos de isotiocianato também na polpa do mamão. Foi verificada que a quantidade obtida consumindo 200 g de polpa do fruto é comparável aos níveis presentes em 100 g de outros vegetais (brócolis, couve-flor, repolho branco). Do mesmo modo, o consumo do fruto é mais vantajoso considerando que os vegetais necessitam de processamento antes do consumo, e as condições de processamento usualmente empregadas afetam negativamente os valores de isotiocianatos.

Frutos de *Amelanchier alnifolia* responderam ao progressivo aumento do estresse oxidativo nas fases anteriores da maturação com um aumento da regulação de glutathione transferase durante a fase final de maturação (ROGIERS, KUMAR e KNOWLES, 1998). Em mamão, o *spot* 6101 também apresentou alguma intensidade em frutos verdes e aumentou durante a maturação, comprovando que há um aumento da expressão dessa proteína. Esse aumento é esperado, uma vez que, durante o processo do amadurecimento, compostos xenobióticos podem ser gerados em maior quantidade devido às várias reações bioquímicas que ocorrem durante o processo. Essa enzima apresentou alta similaridade com a proteína já descrita para mamão com o *score* de 622, com *pI* e *Mr* similares aos *pI* e *Mr* teóricos. Pelo fato deste composto (isotiocianato) ser um agente quimioprotetor na prevenção de câncer, um melhor conhecimento sobre essa enzima seria interessante para uma possível utilização da polpa como alimento funcional. Além disso, o isotiocianato desempenha papel importante de proteção do próprio fruto

4.7.8 Múltiplos *spots* de uma mesma proteína

Quinze proteínas foram representadas por *spots* múltiplos com *pI* diferentes e/ou *Mr*. Assim, dos 37 *spots* 20 corresponderam a proteínas distintas, correspondendo a 40% dos *spots* identificados.

Isoformas de proteínas são geralmente separadas durante a eletroforese bidimensional e ocorrem por vários mecanismos: variação alélica, interações de subunidades diferentes, degradação de proteínas, ou modificações pós-tradução. Algumas linhas horizontais de *spots* podem ser observadas no gel como múltiplos *spots*. Dentro dessas linhas, a análise identificou múltiplos *spots* da mesma proteína. Esses mesmos *spots* de proteínas, que normalmente tem tamanhos moleculares semelhantes, mas pontos isoelétricos ligeiramente diferentes podem ser decorrentes de modificações pós-tradução que provocam alterações na carga de proteína ou diferença nas sequências de aminoácidos.

Os mecanismos de modificações pós-traducionais como a fosforilação, acetilação, alquilação, metilação dentre outros, adicionam grupos funcionais que alteram a atividade, a conformação e as interações de um grande número de proteínas (MANN e JENSEN, 2003).

A presença de múltiplos *spots* de uma mesma proteína é relatada em muitos trabalhos que utilizam a eletroforese bidimensional. Na análise proteômica de endosperma de milho, os autores identificaram uma mesma proteína em vários *spots* (MECHIN *et al.*, 2004) e muitas delas haviam sido glicosiladas. Na análise proteômica de meristema de banana, também foi

observada a presença de várias isoformas e, utilizando o sequenciamento *de novo*, conseguiram identificar as diferentes isoformas resultantes de variações alélicas, ou de locos gênicos diferentes (SAMYN *et al.*, 2006).

Mesmo sem poder ainda definir os motivos que explicam alguns dos múltiplos *spots* de uma mesma proteína em mamão, é primordial ressaltar a importância de obter informações sobre o padrão bioquímico e de expressão das isoformas, pois, isso pode ter reflexos também no papel funcional desta proteína e na sua contribuição para processos implicados na qualidade da fruta.

5. CONCLUSÃO

Essa é a primeira abordagem proteômica para polpa do mamão e oferece uma grande quantidade de novas informações que podem contribuir para melhorar a compreensão dos elementos envolvidos no processo de amadurecimento do tecido em questão. A análise comparativa dos mapas de proteínas em dois diferentes estádios de maturação apresentou informações sobre o padrão de expressão de algumas proteínas associadas com o processo de maturação da polpa do mamão papaia (*Carica papaya* L.).

As hidrolases de parede celular foram encontradas em maior número, estando presentes nessa categoria algumas proteínas que participam da perda da firmeza do fruto. No estágio climatérico foi maior a expressão das enzimas envolvidas na biossíntese de etileno e seu precursor em comparação ao estágio pré-climatérico. Tanto as hidrolases e as enzimas envolvidas na biossíntese de etileno e seu precursor são importantes para a compreensão de como é regulada a perda da firmeza na conversão de frutos verdes a maduros, uma vez que a textura é uma das principais características de qualidade do fruto.

Da mesma forma, desde o início da maturação até o fim da mudança de cor há um acréscimo nas proteínas envolvidas na defesa do fruto, indicando que os mecanismos de defesa são fortalecidos durante o amadurecimento, provavelmente para prevenir o ataque de patógenos. Essas informações podem ser importantes para embasar estratégias visando maior resistência ao estresse biótico e abiótico na fase pós-colheita. As proteínas envolvidas no

metabolismo energético também tiveram aumento na expressão, o que é esperado, uma vez que, maior quantidade de energia é necessária para suprir o aumento do metabolismo das proteínas das demais categorias.

A técnica 2D-DIGE-LC-MS-MS foi adequada para a identificação de um grupo de proteínas, tendo sido possível identificar proteínas diferencialmente expressas potencialmente envolvidas em processos bioquímicos que controlam importantes características da qualidade dos frutos, tais como carotenóides, biossíntese de aroma e textura.

A investigação proteômica iniciada aqui, contribui para ampliar a compreensão do metabolismo do mamão e sua regulação durante o amadurecimento, permitindo o desenvolvimento de novas práticas para a manutenção da qualidade dos frutos.

6. REFERÊNCIAS

AEBERSOLD, R.; MANN, M. Mass spectrometry-based proteomics. Nature, v.422, n.6928, p.198-207, 2003.

ALBAN, A.; DAVID, S.O.; BJORKESTEN, L.; ANDERSSON, C.; SLOGE, E.; LEWIS, S.; CURRIE, I. A novel experimental design for comparative two-dimensional gel analysis: two-dimensional difference gel electrophoresis incorporating a pooled internal standard. Proteomics, v.3, n.1, p.36-44, 2003.

AMERICA, A.H.P.; CORDEWENER, J.H.G.; GEFFEN, M.H.A.; LOMMEN, A.; VISSERS, J.P.C.; BINO, R.J.; HALL, R.D. Alignment and statistical difference analysis of complex peptide data sets generated by multidimensional LC-MS. Proteomics, v.6, p.641-653, 2006.

ANJANASREE, K.N.; VERMA, P.K.; BANSAL, K.C. Differential expression of tomato ACC oxidase gene family in relation to fruit ripening. Current Science, v.89, n.8, p.1394-1399, 2005.

BIANCO, L.; LOPEZ, L.; SCALONE, A.G.; DI CARLI, M.; DESIDERIO, A.; BENVENUTO, E.; PERROTTA, G. Strawberry proteome characterization and its regulation during fruit ripening and in different genotypes. Journal of Proteomics, v.72, n.4, p.586-607, 2009.

BRAMLEY, P.M. Regulation of carotenoid formation during tomato fruit ripening and development. Journal of Experimental Botany, v.53, p.2107-2113, 2002.

CANDIANO, G.; BRUSCHI, M.; MUSANTE, L.; SANTUCCI, L.; GHIGGERI, G.M.; CARNEMOLLA, B.; ORECCHIA, P.; ZARDI, L.; RIGHETTI, P.G. Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. Electrophoresis, v.25, n.9, p.1327-1333, 2004.

CANOVAS, F.M.; DUMAS-GAUDOT, E.; RECORBET, G.; JORRIN, J.; MOCK, H.P.; ROSSIGNOL, M. Plant proteome analysis. Proteomics, v.4, n.2, p.285-298, 2004.

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, n.10, p.2497-2507, 2005.

CELEDON, P.A.F.; ANDRADE, A.; MEIRELES, K.G.X.; CARVALHO, M.C.C.G.; CALDAS, D.G.G.; MOON, D.H.; CARNEIRO, R.T.; FRANCESCHINI, L.M.; ODA, S.; LABATE, C.A. Proteomic analysis of the cambial region in juvenile eucalyptus grandis at three age. Proteomics, v.7, p.2258-2274, 2007.

CHEN, S.; HARMON, A.C. Advances in plant proteomics. Proteomics, v.6, n.20, p.5504-5516, 2006.

CHEN, Y.T.; LEE, Y.R.; YANG, C.Y.; WANG, Y.T.; YANG, S.F.; SHAW, J.F. A novel papaya ACC oxidase gene (CP-ACO2) associated with late stage fruit ripening and leaf senescence. Plant Science, v.164, n.4, p.531-540, 2003.

CHITARRA, M.I.F.; CHITARRA, A.B. Pós-colheita de frutas e hortaliças: fisiologia e manuseio. Lavras: Escola Superior de Agricultura de Lavras, FAEPE, 1990.

DAHER, Z.; RECORBET, G.; VAOLT, B.; ROBERT, F.; BALLIAU, T.; POTIN, S.; SCHOEFS, B.; DUMAS-GUDOT, E. Proteomic analysis of *Medicago truncatula* root plastids. Proteomics, v.10, p.2123-2137, 2010.

DEVITT, L.C.; SAWBRIDGE, T.; HOLTON, T.A.; MITCHELSON, K.; DIETZGEN, R.G. Discovery of genes associated with fruit ripening in *Carica papaya* using expressed sequence tags. Plant Science, v.170, n.2, p.356-363, 2006.

DEYTIEUX, C.; GENY, L.; LAPAILLERIE, D.; CLAVEROL, S.; BONNEU, M.; DONECHE, B. Proteome analysis of grape skins during ripening. Journal of Experimental Botany, v.58, n.7, p.1851-1862, 2007.

ELLIOTT, K.J.; BUTLER, W.O.; DICKINSON, C.D.; KONNO, Y.; VEDVICK, T.S.; FITZMAURICE, L.; MIRKOV, T.E. Isolation and characterization of fruit vacuolar invertase genes from two tomato species and temporal differences in mRNA levels during fruit ripening. Plant Molecular Biology, v.21, n.3, p.515-524, 1993.

EMBRAPA. Embrapa inicia pesquisas com mamão no Amazonas. Disponível em: <http://www.embrapa.br/embrapa/imprensa/noticias/2009/julho/4a-semana/embrapa-inicia-pesquisas-com-mamao-no-amazonas>. Acesso em: 11 nov. 2009.

FABI, J.P. Análise da expressão gênica durante o amadurecimento do mamão papaia e identificação de genes relacionados com a qualidade pós-colheita do fruto. São Paulo, 2007. 211p. Tese de Doutorado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.

FABI, J. P.; CORDENUNSI, B. R.; SEYMOUR, G. B.; LAJOLO, F. M.; DO NASCIMENTO, J. R. O. Molecular cloning and characterization of a ripening-induced polygalacturonase related to papaya fruit softening. Plant Physiology and Biochemistry, v.47, n.11-12, p.1075-81, 2009.

FAUROBERT, M.; MIHR, C.; BERTIN, N.; PAWLOWSKI, T.; NEGRONI, L.; SOMMERER, N.; CAUSSE, M. Major proteome variations associated with cherry tomato pericarp development and ripening. Plant Physiology, v.143, n.3, p.1327-1346, 2007.

FERNANDEZ-BOLANOS, J.; RODRIGUEZ, R.; GUILLEN, R.; JIMENEZ, A.; HEREDIA, A. Activity of cell wall-associated enzymes in ripening olive fruit. Physiologia Plantarum, v.93, n.4, p.651-658, 1995.

FUGGATE, P.; WONGS-AREE, C.; NOICHINDA, S.; KANLAYANARAT, S. Quality and volatile attributes of attached and detached 'Pluk Mai Lie' papaya during fruit ripening. Scientia Horticulturae, v.126, n.2, p.120-129, 2010.

GILLET, B.; BEYLY, A.; PELTIER, G.; REY, P. Molecular characterization of CDSP 34, a chloroplastic protein induced by water deficit in *Solanum tuberosum* L. plants, and regulation of CDSP 34 expression by ABA and high illumination. Plant Journal, v.16, n.2, p.257-262, 1998.

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

GIOVANNONI, J.J. Genetic regulation of fruit development and ripening. Plant Cell, v.16, suppl., p.S170-S180, 2004.

GIRIBALDI, M.; PERUGINI, I.; SAUVAGE, F.X.; SCHUBERT, A. Analysis of protein changes during grape berry ripening by 2-DE and MALDI-TOF. Proteomics, v.7, n.17, p.3154-3170, 2007.

GOMEZ-GOMEZ, L.; CARRASCO, P. Hormonal regulation of S-adenosylmethionine synthase transcripts in pea ovaries. Plant Molecular Biology, v.30, n.4, p.821-832, 1996.

GORG, A.; OBERMAIER, C.; BOGUTH, G.; WEISS, W. Recent developments in two-dimensional gel electrophoresis with immobilized pH gradients: wide pH gradients up to pH 12, longer separation distances and simplified procedures. Electrophoresis, v.20, n.4/5, p.712-717, 1999.

GUARINO, C.; ARENA, S.; DE SIMONE, L.; D'AMBROSIO, C.; SANTORO, S.; ROCCO, M.; SCALONI, A.; MARRA, M. Proteomic analysis of the major soluble components in Annurca apple flesh. Molecular Nutrition & Food Research, v.51, n.2, p.255-262, 2007.

HIRAI, M. Development of citrus-fruits. 2. Nad malic enzyme from citrus-fruit. Phytochemistry, v.17, n.9, p.1507-1510, 1978.

HUNT, S.M.N.; THOMAS, M.R.; SEBASTIAN, L.T.; PEDERSEN, S.K.; HARCOURT, B.L.; SLOANE, A.J.; WILKINS, M.R. Optimal replication and the importance of experimental design for gel- based quantitative proteomics. Journal of Proteome Research, v.4, p.809-819, 2005.

IBGE. Mamão tem safra recorde em 2006. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias>. Acesso em: 30 out. 2009.

IGLEWSKI, W.J. Cellular ADP-ribosylation of elongation factor 2. Molecular and Cellular Biochemistry, v.138, p.131-133, 1994.

ISAACSON, T.; DAMASCENO, C.M.B.; SARAVANAN, R.S.; HE, Y.; CATALÀ, C.; SALADIE, M.; ROSE, J.K.C. Sample extraction techniques for enhanced proteomic analysis of plant tissues. Nature Protocols, v.1, p.769-774, 2006.

KULTZ, D. DNA damage signals facilitate osmotic stress adaptation. American Journal of Physiology: Renal Physiology, v.289, n.3, p.F504-F505, 2005.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, v.227, n.5259, p.680-685, 1970.

LANGENKAMPER, G.; MANAC'H, N.B.; BROIN, M.; CUINÉ, S.; BECUWE, N.; KUNTZ, M.; REY, P. Accumulation of plastid lipid-associated proteins (fibrillin/CDSP34) upon oxidative stress, ageing and biotic stress in Solanaceae and in response to drought in other species. Journal of Experimental Botany, v.52, n.360, p.1545-1554, 2001.

LEVI, A.; DAVIS, A.; HERNANDEZ, A.; WECHTER, P.; THIMMAPURAM, J.; TREBITSH, T.; TADMOR, Y.; KATZIR, N.; PORTNOY, V.; KING, S. Genes expressed during the development and ripening of watermelon fruit. Plant Cell Reports, v.25, n.11, p.1233-1245, 2006.

LIN, C.T.; LIN, M.T.; SHAW, J.F. Cloning and characterization of a cDNA for 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase from papaya fruit. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v.45, n.2, p.526-530, 1997.

LINDERMAYR, C.; SAALBACH, G.; BAHNWEG, G.; DURNER, J. Differential inhibition of Arabidopsis methionine adenosyltransferases by protein S-nitrosylation. Journal of Biological Chemistry, v.281, n.7, p.4285-4291, 2006.

LISKA, A.J.; SHEVCHENKO, A. Expanding the organismal scope of proteomics. Cross-species protein identification by mass spectrometry and its implications. Proteomics, v.3, p.19-28, 2003.

LOPEZ-GOMEZ, R.; CABRERA-PONCE, J.L.; SAUCEDO-ARIAS, L.J.; CARRETO-MONTOYA, L.; VILLANUEVA-ARCE, R.; DIAZ-PEREZ, J.C.; GOMEZ-LIM, M.A.; HERRERA-ESTRELLA, L. Ripening in papaya fruit is altered by ACC oxidase cosuppression. Transgenic Research, v.18, n.1, p.89-97, 2009.

LOPEZ-GOMEZ, R.; MORALES-DOMINGUEZ, F.; MENDOZA ALCAZAR, O.; GOMEZ-LIM, M.A. Identification of a genomic clone to ACC oxidase from papaya (*Carica papaya* L.) and expression studies. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v.52, n.4, p.794-800, 2004.

LOPEZ-GOMEZ, R.; CAMPBELL, A.; DONG, J.G.; YANG, S.F.; GOMEZLIM, M.A. Ethylene biosynthesis in banana fruit: Isolation of a genomic clone to ACC oxidase and expression studies. Plant Science, v.123, n.1/2, p.123-131, 1997.

LUND, S.T.; PENG, F.Y.; NAYAR, T.; REID, K.E.; SCHLOSSER, J. Gene expression analyses in individual grape (*Vitis vinifera* L.) berries during ripening initiation reveal that pigmentation intensity is a valid indicator of developmental staging within the cluster. Plant Molecular Biology, v.68, n.3, p.301-315, 2008.

MANN, M.; JENSEN, O.N. Proteomic analysis of post-translational modifications. Nature Biotechnology, v.21, n.3, p.255-261, 2003.

MARRACCINI, P.; ROGERS, W.J.; CAILLET, V.; DESHAYES, A.; GRANATO, D.; LAUSANNE, F.; LECHAT, S.; PRIDMORE, D.; PÉTIARD, V. Biochemical and molecular characterization of alpha-D-galactosidase from coffee beans. Plant Physiology and Biochemistry, v.43, p.909-920, 2005.

MARRS, K.A. The functions and regulation of glutathione s-transferases in plants. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, v.47, p.127-158, 1996.

MATAS, A.J.; GAPPER, N.E.; CHUNG, M.Y.; GIOVANNONI, J.J.; ROSE, J.K. Biology and genetic engineering of fruit maturation for enhanced quality and shelf-life. Current Opinion in Biotechnology, v.20, n.2, p.197-203, 2009.

MBÉGUIÉ, D.M.A.; HUBERT, O.; LYCAON, B.F.; CHILLET, M.; BAURENS, F.C. EIN3-like gene expression during fruit ripening of Cavendish banana (*Musa acuminata* cv. Grande naine). Physiologia Plantarum, v.133, p.435-448, 2008.

MECHIN, V.; BALLIAU, T.; CHATEAU-JOUBERT, S.; DAVANTURE, M.; LANGELLA, O.; NEGRONI, L.; PRIOUL, J.L.; THEVENOT, C.; ZIVY, M.; DAMERVAL, C. A two-dimensional proteome map of maize endosperm. Phytochemistry, v.65, n.11, p.1609-1618, 2004.

NAKAMURA, Y.; MORIMITSU, Y.; OHIGASHI, H.; MURAKAMI, A.; NAITO, Y.; NAKAGAWA, Y.; OSAWA, T.; UCHIDA, K. A glutathione S-transferase inducer from papaya: rapid screening, identification and structure activity relationship of isothiocyanates. Cancer Letters, v.157, p.193-200, 2000.

NAM, Y.W.; TICHIT, L.; LEPELIER, M.; CUERQ, B.; MARTY, I.; LELIEVRE, J.M. Isolation and characterization of mRNA differentially expressed during ripening of wild strawberry (*Fragaria vesca* L.) fruits. Plant Molecular Biology, v.39, p.629-636, 1999.

NEBRICH, G.; HERRMANN, M.; HARTL, D.; DIEDRICH, M.; KREITLER, T.; WIERLING, C.; KLOSE, J.; GIAVALISCO, P.; ZABEL, C.; MAO, L. PROTEOMER: A workflow-optimized laboratory information management system for 2-D electrophoresis-centered proteomics. Proteomics, v.9, n.7, p.1795-1808, 2009.

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

NEUHOFF, V.; STAMM, R.; PARDOWITZ, I.; AROLD, N.; EHRHARDT, W.; TAUBE, D. Essential problems in quantification of proteins following colloidal staining with coomassie brilliant blue dyes in polyacrylamide gels, and their solution. Electrophoresis, v.11, n.2, p.101-117, 1990.

ONG, S.E.; MANN, M. Mass spectrometry-based proteomics turns quantitative Nature Chemical Biology, v.1, n.5, p.252-262, 2005.

PAULL, R.E.; CHEN, N.J. Postharvest variation in cell wall-degrading enzymes of papaya (*Carica papaya* L.) during fruit repening. Plant Physiology, v.72, p.382-385, 1983.

PAULL, R.E.; CHEN, N.J. Heatshock response in field-grown ripening papaya fruit. Journal of the American Society for Horticultural Science, v.115, p.623-631, 1990.

PAULL, R.E.; NISHIJIMA, W.; REYES, M.; CAVALETTO, C. Postharvest handling and losses during marketing of papaya (*Carica papaya* L). Postharvest Biology and Technology, v.1997, p.165-79, 1997.

PEREZ, A.G.; OLIAS, R.; LUACES, P.; SANZ, C. Biosynthesis of strawberry aroma compounds through amino acid metabolism. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v.50, n.14, p.4037-4042, 2002.

QUEROL, J.; CAMPOS, N.; IMPERIAL, S.; BORONAT, A.; RODRIGUEZ-CONCEPCION, M. Functional analysis of the *Arabidopsis thaliana* GCPE protein involved in plastid isoprenoid biosynthesis. FEBS Letters, v.514, n.2/3, p.343-346, 2002.

REICHHELD, J.P.; VERNOUX, T.; LARDON, F.; MONTAGU, M.V.; INZÉ, D. Specific checkpoints regulated plant cell cycle progression in response to oxidative stress. Plant Journal, v.17, p.647-656, 1999.

RISON, S.C.; HODGMAN, T.C.; THORNTON, J.M. Comparison of functional annotation schemes for genomes. Functional & Integrative Genomics, v.1, n.1, p.56-69, 2000.

ROBINSON, S.P.; JACOBS, A.K.; DRY, I.B. A class IV chitinase is highly expressed in grape berries during ripening. Plant Physiology, v.114, n.3, p.771-778, 1997.

ROCCO, M.; D'AMBROSIO, C.; ARENA, S.; FAUROBERT, M.; SCALONI, A.; MARRA, M. Proteomic analysis of tomato fruits from two ecotypes during ripening. Proteomics, v.6, n.13, p.3781-3791, 2006.

RODRIGUEZ-CONCEPCION, M.; QUEROL, J.; LOIS, L.M.; IMPERIAL, S.; BORONAT, A. Bioinformatic and molecular analysis of hydroxymethylbutenyl diphosphate synthase (GCPE) gene expression during carotenoid accumulation in ripening tomato fruit. Planta, v.217, n.3, p.476-482, 2003.

ROEDER, S.; DRESCHLER, K.; WIRTZ, M.; CRISTESCU, S.M.; VAN HARREN, F.J.; HELL, R.; PIECHULLA, B. SAM levels, gene expression of SAM synthetase, methionine synthase and ACC oxidase, and ethylene emission from *N. suaveolens* flowers. Plant Mol Biol, v.70, n.5, p.535-46, 2009.

ROGIERS, S.Y.; KUMAR, G.N.M.; KNOWLES, N.R. Maturation and ripening of fruit of *amelanchier alnifolia* nutt. are accompanied by increasing oxidative stress. Annals of Botany, v.81, p.203-211, 1998.

ROITSCH, T.; GONZALEZ, M.C. Function and regulation of plant invertases: sweet sensations. Trends in Plant Science, v.9, n.12, p.606-613, 2004.

ROMERO, J.P.; RAFIA, F.; HOULNÉ, G.; CHENICLET, C.; CARDE, J.P.; SCHANTZ, M.L.; SCHANTZ, R. A ubiquitous plant housekeeping gene, PAP, encodes a major protein component of bell pepper chromoplasts. Plant Physiology, v.115, p.1185-1194, 1997.

SAHNOUN, I.; DÉHAIS, P.; MONTAGU, M.V.; ROSSIGNOL, M.; ROUZÉ, P. PPMdb: a plant plasma membrane database. Journal of Biotechnology, v.78, p.235-246, 2000.

SAMYN, B.; SERGEANT, K.; CARPENTIER, S.; DEBYSER, G.; PANIS, B.; SWENNEN, R.; VAN BEEUMEN, J. Functional proteome analysis of the banana plant (*Musa* spp.) using de novo sequence analysis of derivatized peptides. Journal of Proteome Research, v.6, n.1, p.70-80, 2007.

SARRY, J.E.; SOMMERER, N.; SAUVAGE, F.X.; BERGOIN, A.; ROSSIGNOL, M.; ALBAGNAC, G.; ROMIEU, C. Grape berry biochemistry revisited upon proteomic analysis of the mesocarp. Proteomics, v.4, n.1, p.201-215, 2004.

SAUCEDO-VELOZ, C. Tratamientos físicos de cuarentena en frutos tropicales e subtropicales (CYTED): La Habana, Junio. 1997.

SEYMOUR, G.B.; TAYLOR, J.E.; TUCKER, G.A. Biochemistry of fruit ripening. London: Chapman & Hall, 1993. 454p.

SOH, C.P.; ALI, Z.M.; LAZAN, H. Characterisation of an alpha-galactosidase with potential relevance to ripening related texture changes. Phytochemistry, v.67, n.3, p.242-254, 2006.

SONG, J.; BRAUN, G.; BEVIS, E.; DONCASTER, K. A simple protocol for protein extraction of recalcitrant fruit tissues suitable for 2-DE and MS analysis. Electrophoresis, v.27, n.15, p.3144-3151, 2006.

TANG, G.Q.; LUSCHER, M.; STURM, A. Antisense repression of vacuolar and cell wall invertase in transgenic carrot alters early plant development and sucrose partitioning. Plant Cell, v.11, n.2, p.177-189, 1999.

THELEN, J.J.; MIERNYK, J.A.; RANDALL, D.D. Partial purification and characterization of the maize mitochondrial pyruvate dehydrogenase complex. Plant Physiology, v.116, n.4, p.1443-1450, 1998.

TOUZET, P.; RICCARDI, F.; MORIN, C.; DAMERVAL, C.; HUET, J.C.; PERNOLLET, J.C. The maize two dimensional gel protein database: towards an integrated genome analysis program. Theoretical and Applied Genetics, v.93, p.997-1005, 1996.

TYERS, M.; MANN, M. From genomics to proteomics. Nature, v.422, n.6928, p.193-197, 2003.

UNLU, M.; MORGAN, M.E.; MINDEN, J.S. Difference gel electrophoresis: a single gel method for detecting changes in protein extracts. Electrophoresis, v.18, n.11, p.2071-2077, 1997.

VALCU, C.M.; VALCU, M. Reproducibility of two-dimensional gel electrophoresis at different replication levels. Journal of Proteome Research, v.6, p.4677-4683, 2007.

VINCENT, D.; WHEATLEY, M.D.; CRAMER, G.R. Optimization of protein extraction and solubilization for mature grape berry clusters. Electrophoresis, v.27, n.9, p.1853-1865, 2006.

WANG, W.; VIGNANI, R.; SCALI, M.; CRESTI, M. A universal and rapid protocol for protein extraction from recalcitrant plant tissues for proteomic analysis. Electrophoresis, v.27, n.13, p.2782-2786, 2006.

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, n.5, p.244-252, 2004.

WESTERMEIER, R. Sensitive, quantitative, and fast modifications for Coomassie Blue staining of polyacrylamide gels. Proteomics, v.6, suppl.2, p.61-64, 2006.

WILKINS, M.R.; SANCHEZ, J.C.; GOOLEY, A.A.; APPEL, R.D.; HUMPHERY-SMITH, I.; HOCHSTRASSER, D.F.; WILLIAMS, K.L. Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. Biotechnology & Genetic Engineering Reviews, v.13, p.19-50, 1996.

ZEGZOUTI, H.; JONES, B.; FRASSE, P.; MARTY, C.; MAITRE, B.; LATCHE, A.; PECH, J.C.; BOUZAYEN, M. Ethylene-regulated gene expression in tomato fruit: characterization of novel ethylene-responsive and ripening-related genes isolated by differential display. Plant Journal, v.18, n.6, p.589-600, 1999.

ZEH, M.; LEGGEWIE, G.; HOEFGEN, R.; HESSE, H. Cloning and characterization of a cDNA encoding a cobalamin-independent methionine synthase from potato (*Solanum tuberosum* L.). Plant Molecular Biology, v.48, n.3, p.255-265, 2002.

ZHANG, J.; MA, H.; FENG, J.; ZENG, L.; WANG, Z.; CHEN, S. Grape berry plasma membrane proteome analysis and its differential expression during ripening. Journal of Experimental Botany, v.59, n.11, p.2979-2990, 2008.

ZHENG, Q.; SONG, J.; DONCASTER, K.; ROWLAND, E.; BYERS, D.M. Qualitative and quantitative evaluation of protein extraction protocols for apple and strawberry fruit suitable for two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry analysis. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v.55, n.5, p.1663-1673, 2007.

7. ANEXOS

Anexo 01.	Ficha do Aluno	98
Anexo 02.	Informações para os Membros de Bancas Julgadoras de Mestrado/Doutorado.....	100

Ficha do Aluno	https://janus.usp.br/janus/alunoGeral/ficha/fichaDoAlunoParaImpressao.jsf
Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação
Universidade de São Paulo Faculdade de Ciências Farmacêuticas FICHA DO ALUNO
<hr/>	
9131 - 5720872/2 - Silvia Beserra Nogueira	
Email:	sbnogueira@usp.br
Data de Nascimento:	30/03/1983
Cédula de Identidade:	RG - 2067865 - DF
Local de Nascimento:	Distrito Federal
Nacionalidade:	Brasileira
Graduação:	Licenciada em Ciências Biológicas - Universidade Católica de Brasília - Distrito Federal - Brasil - 2006
<hr/>	
Curso:	Doutorado Direto
Programa:	Ciência dos Alimentos
Área:	Bromatologia
Data de Matrícula:	03/07/2006
Início da Contagem de Prazo:	03/07/2006
Data Limite:	31/10/2010
Orientador:	Prof(a). Dr(a). João Roberto Oliveira do Nascimento - 03/07/2006 até o presente. E.Mail: jronasci@usp.br
Proficiência em Línguas:	Inglês, Aprovado em 01/12/2009
Prorrogação:	120 dias Período de 03/07/2010 a 31/10/2010
Data de Aprovação no Exame de Qualificação:	Aprovado em 14/12/2009
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:	
<hr/>	
Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 19/07/2010	
Impresso em: 13/09/10 18:02:59	
1 de 2	13/09/2010 18:05

Ficha do Aluno

<https://janus.usp.br/janus/alunoGeral/ficha/fichaDoAlunoParaImpressao.js>

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

FICHA DO ALUNO

9131 - 5720872/2 - Sílvia Beserra Nogueira

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
BTC5743-1/6	Seminários Gerais (Curso Interunidades: Biotecnologia - Universidade de São Paulo)	16/08/2006	28/11/2006	30	2	100	A	N	Concluída
EDM5791-4/7	Metodologia do Ensino Superior (Faculdade de Educação - Universidade de São Paulo)	16/08/2006	01/12/2006	120	8	91.1	A	N	Concluída
FBA5886-5/2	Microorganismos Patogênicos em Alimentos I	16/04/2007	27/05/2007	90	6	90	A	N	Concluída
FBA5703-4/1	Tópicos em Tratamento de Dados para Ciência e Tecnologia de Alimentos	11/06/2007	24/06/2007	60	4	100	A	N	Concluída
HNT5733-4/1	Métodos Analíticos Aplicados à Determinação de Composição de Alimentos (Faculdade de Saúde Pública - Universidade de São Paulo)	14/08/2007	04/09/2007	30	0	0	-	N	Matrícula cancelada
QBQ5715-3/3	Planejamento de Aulas Práticas de Bioquímica e Biologia Molecular (Instituto de Química - Universidade de São Paulo)	16/08/2007	22/11/2007	120	0	0	-	N	Matrícula cancelada
QBQ5710-7/1	Biologia Molecular do Gene (Instituto de Química - Universidade de São Paulo)	28/08/2007	27/11/2007	180	0	0	-	N	Matrícula cancelada
BTC5768-1/1	Bases Experimentais no Estudo Funcional de Proteínas (Curso Interunidades: Biotecnologia - Universidade de São Paulo)	12/09/2007	20/11/2007	120	8	95	B	N	Concluída
FBA5728-2/6	Aprimoramento Didático	06/11/2007	04/12/2007	60	0	0	-	N	Pré-matrícula indeferida

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito de tese	
Disciplinas:	25	25	28
Atividades Programadas:			
Seminários:			
Estágios:			
Total:	25	25	28

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: Matrícula de Acompanhamento em 19/07/2010

Impresso em: 13/09/10 18:02:59

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Secretaria de Pós-Graduação**Informações para os Membros de Bancas Julgadoras de
Mestrado/Doutorado**

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

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

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

2.2 Tempo máximo total de arguição: 3 horas para o mestrado e 5 horas para o doutorado.

3. Não serão permitidas correções na dissertação/tese. Assim, havendo extrema necessidade, poderá ser incluída uma errata.

4. A sessão de defesa será aberta ao público.

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

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

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

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

São Paulo, 11 de dezembro de 2009.

Profa. Dra. Bernadette D. G. M. Franco
Presidente da CPG/FCF/USP