

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 de manga (*Mangifera indica* L.)
e identificação de proteínas com variação de abundância durante o
amadurecimento pós-colheita

Jonathan de Magalhães Andrade

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Prof. Dr. João Roberto Oliveira do
Nascimento

São Paulo
2011

JONATHAN DE MAGALHÃES ANDRADE

Análise diferencial do proteoma da polpa de manga (*Mangifera indica* L.)
e identificação de proteínas com variação de abundância durante o
amadurecimento pós-colheita

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

Área de Concentração: Bromatologia

Orientador: Prof. Dr. João Roberto Oliveira do Nascimento

São Paulo

2011

JONATHAN DE MAGALHÃES ANDRADE

Análise diferencial do proteoma da polpa de manga (*Mangifera indica* L.)
e identificação de proteínas com variação de abundância durante o
amadurecimento pós-colheita

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

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

1º. Examinador

2º. Examinador

São Paulo, ____ de _____ de 2011.

DEDICATÓRIA

Antes de tudo, agradeço a Deus pela Vida.

Dedico esse trabalho aos meus pais, Dilza e João, ao meu irmão, Jean Patrick, e à minha esposa, Janaína, que sempre me incentivaram e apoiaram em todas as decisões que tomei em minha vida. Amo vocês!

A todos meus familiares.

Aos meus maiores amigos, sempre presentes.

Aos meus amigos músicos, que fizeram meus momentos de estresse desaparecerem no primeiro acorde e meus fins de semana mais barulhentos, com nossos encontros regados ao bom e velho rock´n roll.

Aos novos e grandes amigos que fiz no laboratório durante os últimos dois anos, que foram imprescindíveis para tornar os dias mais alegres e o trabalho menos árduo e mais divertido.

Ao prof. Dr. Marco Antônio Moreira Furtado, do departamento de Alimentos e Toxicologia da Faculdade de Farmácia e Bioquímica da Universidade Federal de Juiz de Fora, que me abriu os olhos e as portas para o mundo da ciência.

AGRADECIMENTOS

Sinceros agradecimentos ao Prof. Dr. João Roberto, meu orientador, que confiou em minha capacidade, me incentivou a obter o melhor de meu trabalho e por ter se tornado um grande amigo, ao longo desses anos. Obrigado pelo apoio, dedicação e paciência.

À Profa. Beatriz, pelos conselhos, conversas, apoio e, sobretudo, atenção aos alunos do laboratório.

À Sra. Elizabeth Rezende, por gentilmente ceder parte de sua produção de mangas para a realização desse trabalho.

À Dra. Ana Paula Fioravante Bernardes Silva, pelos trabalhos realizados no laboratório e pela concessão dos dados relativos a primeira amostragem de mangas utilizadas neste trabalho.

À Dra. Adriana Franco Paes Leme e colaboradores, pelo auxílio na realização e interpretação das análises de espectrometria de massas.

Às técnicas do laboratório de Química, Bioquímica e Biologia Molecular de Alimentos, pelos ensinamentos e amizade.

Por fim, a todos que de alguma forma contribuíram para este trabalho.

Muito obrigado!

APOIO

Apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) (Edital Universal - Processo: 471396/2008-7).

Bolsas de estudos concedidas pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) durante o período de 01/04/2009 a 31/08/2009 e pela Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (Processo: 2009/02658-8 – 01/09/2009 a 31/03/2011).

Pesquisa realizada com apoio do Laboratório Nacional de Biociências (LnBIO), CNPEM/MCT – ABTLuS, em Campinas-SP, onde foi realizado o sequenciamento dos peptídeos utilizando as instalações do Laboratório de Espectrometria de Massas (MAS) de acordo com a proposta MAS-10567.

ANDRADE, J. M. **Análise diferencial do proteoma da polpa de manga (*Mangifera indica* L.) e identificação de proteínas com variação de abundância durante o amadurecimento pós-colheita.** 2011, 106 f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Universidade de São Paulo, São Paulo.

RESUMO

A manga (*Mangifera indica* L.) é cultivada em áreas tropicais e subtropicais, principalmente em países em desenvolvimento. Os maiores produtores são a Índia, China, México, Indonésia, Tailândia, Paquistão e Brasil, mas, por ser uma fruta altamente perecível, suas exportações têm sido limitadas. Durante o amadurecimento, as frutas adquirem características que as tornam adequadas para o consumo como consequência de alterações metabólicas dependentes, em larga medida, da expressão de genes específicos. Uma vez que as proteínas são os elementos efetores da expressão gênica, a análise de proteomas pode auxiliar na identificação de pontos de controle do metabolismo determinantes para a qualidade desses alimentos. Assim, o objetivo do trabalho é identificar *spots* de proteínas diferentemente abundantes durante o amadurecimento a partir dos mapas 2D-DIGE das polpas de mangas (*Mangifera indica* L.) da cultivar Keitt nos estádios pré-climatérico e climatérico. Após extração das proteínas e separação por 2D-DIGE, as imagens dos géis obtidas foram analisadas com o *software* PDQuest, utilizando o teste T de Student para a análise estatística. Dentre os *spots* protéicos bem resolvidos e considerados na análise, os 47 que apresentaram-se diferentemente abundantes entre os estádios estudados foram removidos dos géis, suas proteínas digeridas e, enfim, sequenciadas por espectrometria de massas. Foram obtidas as identidades prováveis de 58 proteínas diferentes a partir da comparação das sequências obtidas com banco de dados NCBI2010, utilizando o *software* Mascot.

Palavras-chave: Manga. Amadurecimento. Pós-colheita. Proteômica. 2D-DIGE.

ANDRADE, J. M. **Differential proteomic analysis of mango fruit pulp (*Mangifera indica* L.) during postharvest ripening.** 2011, 106 p. MSc thesis (Master Degree in Food Science) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Universidade de São Paulo, São Paulo.

ABSTRACT

Mango fruit (*Mangifera indica* L.) is cultivated in tropical and subtropical areas, mainly in developing countries. India, China, Mexico, Indonesia, Thailand, Pakistan and Brazil are the major producers, but its trade has been limited due the highly perishable nature of the fruit. During ripening, the fruits acquire characteristics that make them appropriate for consumption as a consequence of metabolic changes dependent on the expression of specific genes. As proteins are the effector elements of gene expression, proteome analysis can help the identification of metabolism keypoints that could influence the fruit quality. Thus, the aim of this study was to compare the protein maps of mango pulp (*Mangifera indica* L. cv. Keitt) in pre-climacteric and climacteric stages, in order to identify protein spots that differ in abundance in these two stages. After protein extraction and separation by 2D-DIGE technique, the gel images obtained were analyzed with PDQuest software, using the Student's T-test for statistical analysis. We obtained 47 spots differently abundant between the stages studied, that were excised from the gels and its proteins digested with trypsin and sequenced by mass spectrometry. We obtained the identities of 58 distinct proteins from the search of the peptide sequences against NCBI2010 database using the software Mascot.

Keywords: Mango. Ripening. Postharvest. Proteomics. 2D-DIGE.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
1.1 A manga	13
1.2 A importância do etileno no amadurecimento.....	17
1.3 Genômica funcional e o amadurecimento.....	20
1.3.1 <i>Proteômica</i>	22
2. OBJETIVO.....	25
3. Material e Métodos.....	26
3.1 Amostragem de material.....	26
3.2 Caracterização do amadurecimento	26
3.2.1 <i>Medidas de respiração (CO₂) e etileno</i>	26
3.2.2 <i>Amido e açúcares solúveis</i>	28
3.3 Distinção dos estágios fisiológicos para a análise proteômica	28
3.4 Extração e quantificação de proteínas.....	29
3.5 Eletroforese em condições desnaturantes (SDS-PAGE).....	30
3.6 Coloração dos géis	30
3.7 Eletroforese bidimensional.....	31
3.7.1 <i>Focalização isoeletrica (primeira dimensão)</i>	31
3.7.2 <i>SDS-PAGE (segunda dimensão)</i>	32
3.8 Marcação das proteínas com fluoróforos (CyDye).....	33
3.8.1 <i>Purificação dos extratos protéicos</i>	33
3.8.2 <i>Padrão interno e amostras para análise 2D-DIGE</i>	33
3.8.3 <i>Reação de marcação protéica</i>	35
3.9 Aquisição e análise das imagens dos géis	35
3.9.1 <i>Edição das imagens</i>	36
3.9.2 <i>Detecção e validação dos spots</i>	36
3.10 Excisão dos <i>spots</i> de interesse	38
3.11 Digestão com tripsina	38
3.12 LC-MS/MS	39
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	41
4.1 Caracterização do amadurecimento pós-colheita dos frutos	41
4.2 Extratos de proteínas.....	45
4.3 Obtenção dos mapas protéicos bidimensionais.....	46

4.4 Análise diferencial dos <i>spots</i>	50
4.5 Sequenciamento das proteínas por espectrometria de massas	55
4.6 Classificação funcional das proteínas.....	67
4.6.1 <i>Fixação de carbono</i>	68
4.6.2 <i>Catabolismo energético</i>	72
4.6.3 <i>Fitormônios</i>	75
4.6.4 <i>Biossíntese de metabólitos secundários</i>	78
4.6.5 <i>Proteínas de defesa</i>	78
4.6.6 <i>Resposta a estresse</i>	81
4.6.7 <i>Resposta a estresse oxidativo</i>	84
4.6.8 <i>Demais proteínas</i>	86
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	90
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	92

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** O Ciclo de Yang e a biossíntese de etileno (Modificado de YANG, 1984).....18
- Figura 2.** Interações entre os elementos básicos de um sistema biológico. As setas grossas ilustram a transcrição (de DNA para RNA), a tradução (de RNA para Proteínas), e atividade enzimática (proteínas para metabólitos). As setas mais finas indicam interações adicionais. (Modificado de BAGINSKY, 2009).....23
- Figura 3.** Esquema da Mistura dos extratos protéicos das polpas de manga para utilização como padrão interno.34
- Figura 4.** Perfis de respiração, produção de etileno e teores de amido e açúcares solúveis totais em mangas da cultivar “Keitt” durante o amadurecimento pós-colheita de três diferentes amostragens. (A, B e C). Valores expressos pela <média> ± erro padrão, n = 4.....42
- Figura 5.** Perfis de açúcares solúveis durante o amadurecimento da manga Keitt de três diferentes amostras (A, B e C). Valores expressos pela <média> ± erro padrão, n = 4.43
- Figura 6.** Eletroforese SDS-PAGE (10% poliacrilamida) dos extratos protéicos das amostras de mangas da cultivar Keitt. Amostras dos grupos pré-climatérico e climatérico respectivos às amostragens: “A”: poços 1 e 2, “B”: poços 3 e 4, “C”: poços 5 e 6. Os marcadores de massa molecular são representados por MM, expressos em kDa.46
- Figura 7.** Perfis dos extratos protéicos das amostras de mangas da cultivar Keitt em 2D-PAGE (12,5% acrilamida). Imagens representativas dos grupos pré-climatérico (A) e climatérico (B). Marcadores de massa molecular estão representados por MM.....47
- Figura 8.** Imagens representativas de separações por 2D-DIGE dos extratos protéicos das amostras de mangas da cultivar Keitt. (A) Amostra pré-climatérica marcada com Cy5. (B) Amostra climatérica marcada com Cy5. (C) Padrão interno marcado com Cy3, relativo ao gel da imagem (A). (D) Padrão interno marcado com Cy3, relativo ao gel da imagem (B).....49
- Figura 9.** Gel 2D-DIGE com indicação dos spots de proteínas com variação de abundância durante o amadurecimento da manga. A imagem representativa do gel 2D-DIGE foi gerada pela combinação das imagens individuais de fluorescência de dois géis. Em cada gel foi aplicado o pool das amostras (marcado com Cy3) e o extrato de proteínas de mangas pré-climatéricas ou o de mangas climatéricas (marcado com Cy5). As imagens de fluorescência Cy5 dos dois géis foram combinadas, sendo arbitrariamente atribuída cor azul para representar a fluorescência derivada das proteínas da amostra de mangas pré-climatéricas e cor vermelha para a fluorescência das proteínas de mangas climatéricas. Os números no alto indicam a faixa de separação da focalização isoeletrica (pH 4-7) e à esquerda está indicada a posição dos marcadores de peso molecular (97 kDa a 14,4 kDa). As setas destacam os spots estatisticamente diferentes, selecionados pelo teste T de Student ($p < 0,05$), e identificados pelos respectivos números de identificação (SSP) gerados pelo software PDQuest (Bio-Rad). Intensidades médias descritas conforme tabela 2.54
- Figura 10.** Classificação funcional das proteínas inferidas a partir da identificação dos peptídeos sequenciados dos spots com variação de abundância durante o amadurecimento.67
- Figura 11:** Fixação de Carbono em organismos fotossintéticos (Adaptado de Kegg Pathway ko00710). As enzimas catalizadoras de cada etapa do processo estão identificadas por seus números EC dentro dos retângulos. Os retângulos sem preenchimento não foram identificados e apenas ilustram e completam as outras etapas. Os retângulos destacados em verde indicam as enzimas identificadas em maior abundância no estágio pré-climatérico nas amostras de mangas da cultivar Keitt: EC 1.1.1.82; 1.1.1.37; 1.1.1.39; 1.1.1.40 – enzimas málicas/malato desidrogenase; EC 2.6.1.1 – aspartato aminotransferase; EC: 2.2.1.1 - trancetolase; EC: 2.7.2.3 – fosfoglicerato quinase; EC 4.1.1.39 – subunidade grande da Rubisco; EC: 5.3.1.1 – triosefosfato isomerase.....69

Figura 12: Glicólise e gliconeogênese (Adaptado de Kegg Pathway 00010). As enzimas catalizadoras de cada etapa do processo estão identificadas por seus números EC dentro dos retângulos. Os retângulos sem preenchimento não foram identificados e apenas ilustram e completam as outras etapas. Os retângulos destacados em verde indicam as enzimas identificadas em maior abundância no estágio pré-climatérico nas amostras de mangas da cultivar Keitt: EC 2.7.2.3 – fosfoglicerato quinase; EC 5.3.1.1 – triosefosfato isomerase; EC 5.4.2.2 – fosfoglicomutase; EC 4.2.1.11 – enolase; EC 1.2.1.3 – aldeído desidrogenase. O retângulo destacado em vermelho indica a enzima identificada em maior abundância no estágio climatérico: EC 1.1.1.1 – álcool desidrogenase.71

Figura 13. Síntese de etileno a partir do metabolismo dos aminoácidos cisteína e metionina. (Adaptado de KEGG Pathway ko00270, 2010). As enzimas catalizadoras de cada etapa do processo estão identificadas por seus números EC dentro dos retângulos. Os retângulos sem preenchimento não foram identificados e apenas ilustram e completam as outras etapas. Os retângulos destacados em verde indicam as enzimas identificadas em maior abundância no estágio pré-climatérico nas amostras de mangas da cultivar Keitt: EC 2.5.1.6 – AdoMet sintase; EC 3.3.1.1 – S-adenosil-L-homocisteína hidrolase; EC 2.5.1.47 – cisteína sintase.77

Figura 14. Ciclo glutatona-ascorbato. (Adaptado de JIANG e FELDMAN, 2005 e KEGG Pathway 00053). As enzimas catalizadoras de cada etapa do processo estão identificadas por seus nomes dentro dos retângulos. As enzimas ascorbato peroxidase (EC1.11.1.11) e dehidroascorbato redutase (EC 1.8.5.1) foram encontradas em maior abundância no climatérico. As outras enzimas apenas ilustram as outras etapas do ciclo.85

Figura 15. Metabolismo de metilglioxal (Adaptado de KEGG Pathway 00620). As enzimas catalizadoras de cada etapa do processo estão identificadas por seus números EC dentro dos retângulos. Os retângulos em azul não foram identificados e apenas ilustram e completam as outras etapas. O retângulo destacado em vermelho e branco indica que a enzima foi identificada em maior abundância no estágio climatérico nas amostras de mangas da cultivar Keitt: EC 4.4.1.5 – lactoilglutaciona liase (glioxalase 1).87

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição das misturas de extratos protéicos marcados com fluoróforos utilizados na análise proteômica.	34
Tabela 2. Intensidade média dos <i>spots</i> selecionados pelo teste T ($p < 0,05$).	51
Tabela 3. Proteínas de <i>Mangifera indica</i> L. identificadas através da análise DIGE durante o amadurecimento do fruto.	57

1. INTRODUÇÃO

1.1 A manga

A manga (*Mangifera indica* L.) é uma dicotiledônea da família *Anacardiaceae*, cultivada nos trópicos, bem como nas áreas subtropicais, principalmente em países em desenvolvimento. Existem mais de 150 cultivares de manga produzidas no mundo, sendo o gênero alimentício mais importante para os habitantes dos trópicos, depois da banana (LIZADA, 1993; MOLINA *et al.*, 2004).

Rica em água, carboidratos, ácidos orgânicos, pigmentos, vitaminas e minerais, sua qualidade e valor nutricional é influenciado pelas diferentes cultivares, pelas suas características metabólicas e condições ambientais de desenvolvimento e pelo estágio de maturidade (MANICA *et al.*, 2001).

Diversos frutos carnosos, durante sua maturação, mostram um aumento rápido e significativo em sua taxa respiratória que pode coincidir com mudanças esperadas em sua cor, sabor e textura. Frutos que exibem este padrão respiratório são classificados como climatéricos. Este pico respiratório marca o ponto máximo do amadurecimento do fruto e o início de sua senescência. Além disso, concomitantemente, há um aumento dramático na biossíntese do hormônio gasoso etileno, que gradualmente declina (TAIZ, 2002; THARANATHAN, 2006; FENNEMA, 2007).

A manga é considerada climatérica, apesar de muitas divergências existirem sobre o momento exato quando o climatério ocorre, variando entre as diversas cultivares (LIZADA, 1993; BERNARDES SILVA, 2000). Seu amadurecimento é um processo complexo e geneticamente programado, que promove uma infinidade de transformações bioquímicas, deixando os frutos com características adequadas para o consumo, fornecendo importantes nutrientes e compostos com atividade biológica, como as fibras alimentares e anti-oxidantes (GIOVANNONI, 2001).

Em média, a maturação pós-colheita da manga pode levar de 2 a 9 dias, dependendo do cultivar e do grau de maturidade no momento da colheita (MANICA *et al.*, 2001).

Seu amadurecimento não é prolongado o suficiente para permitir o transporte de longas distâncias e, por este motivo, apesar do grande volume comercializado, as exportações de manga têm sido limitadas. (LIZADA, 1993; BERNARDES SILVA,

2004). Ainda assim, o Brasil, a Índia e o México, dominam o mercado de exportações de manga, e, além destes, outros países asiáticos também estão presentes na lista dos maiores produtores mundiais, como China, Indonésia, Tailândia e Paquistão (FAO, 2007).

O Brasil oferece excelentes condições para desenvolvimento e produção da manga. Contudo, a produção está concentrada em poucas cultivares, sendo que a cultivar Tommy Atkins domina cerca de 80% da área plantada (PINTO *et al.*, 2002). Dentre outras cultivares de importância comercial no Brasil, pode-se citar: Bourbon, Extrema, Irwin, Espada, Rosa, Ubá, Kent, Haden, Palmer, Van Dyke e Keitt.

Segundo Bernardes Silva (2000), as cultivares Van Dyke e Haden apresentam pico respiratório no quarto dia pós-colheita, enquanto Tommy Atkins não apresentou pico respiratório significativo no mesmo período, sugerindo a possibilidade de tê-lo ocorrido anteriormente à colheita, entretanto, houve um leve aumento na taxa respiratória ao fim do amadurecimento. Foi sugerido que nessas três cultivares, a produção de etileno estaria relacionada com a senescência e não com o pico respiratório, sendo difícil precisar a ocorrência das principais mudanças físico-químicas do amadurecimento, o que dificulta estudos mais detalhados sobre algumas alterações metabólicas importantes para a qualidade.

Em contraste a diversas cultivares, o amadurecimento dos frutos da cultivar Keitt está diretamente ligado a sua colheita. Durante seu desenvolvimento, apresenta baixos níveis de açúcares e cerca de 8% em massa de amido acumulado em sua polpa, que, em poucos dias após sua colheita, é degradado, contribuindo para a síntese e o acúmulo dos açúcares solúveis. Além disso, apresenta comportamento típico de um fruto climatérico, com picos de etileno endógeno e respiração claramente definidos (BERNARDES SILVA *et al.*, 2003; PERONI *et al.*, 2008; BERNARDES SILVA *et al.*, 2008).

As mudanças físicas e químicas que ocorrem nos frutos durante o amadurecimento são irreversíveis e muitas estão relacionadas com a degradação de organelas e constituintes químicos, bem como a ação de enzimas, que afetam sua qualidade e conservação após a colheita. Durante o amadurecimento da manga, ocorrem várias alterações na firmeza da polpa, na composição e teor dos ácidos orgânicos, nos teores de amido, açúcares totais, compostos fenólicos e carotenóides, na pigmentação da casca e da polpa, na diminuição de acidez, entre outros, correspondendo às mudanças dos fatores sensoriais: cor, textura, sabor e

aromas. Estes fatores, além de deixarem o fruto mais atrativo para o consumo, deixam-no mais sensíveis a infecções por patógenos, a injúrias mecânicas e a variações de temperatura durante seu armazenamento e transporte (LIZADA, 1993; BERNARDES SILVA, 2004; THARANATHAN, YASHODA e PRABHA, 2006; CHITARRA e CHITARRA, 2005; BRECHT e YAHIA, 2009).

A coloração da casca de mangas é a principal característica utilizada pelo consumidor para julgar a qualidade do fruto maduro e sua alteração ocorre através da degradação da clorofila presente nos cloroplastos, durante sua transformação em cromoplastos e conseqüente síntese de outros pigmentos amarelados e avermelhados (AWAD, 1993; LIZADA, 1993).

A perda da coloração verde da casca indica o amadurecimento do fruto e é evidente em diversas cultivares, porém, algumas cultivares como a Keitt, ainda retém tons esverdeados, mesmo quando madura, apresentando tons mais avermelhados quando já em estado de senescência (BRECHT e YAHIA, 2009).

A polpa contém altas concentrações de carotenóides, que aumentam com o amadurecimento, desenvolvendo colorações que variam de creme a amarelo-alaranjado intenso, dependendo da cultivar (EMBRAPA, 2004; BRECHT e YAHIA, 2009).

Na cultivar Keitt, o teor total de carotenóides aumenta de 12,3 para 38,0 $\mu\text{g/g}$ do estágio “de vez” para o maduro, já na Tommy Atkins, o aumento é de 17,0 para 51,2 $\mu\text{g/g}$, sendo os carotenóides β -caroteno e violaxantina os principais responsáveis por este aumento em ambos casos. Além destes carotenóides, são encontrados outros como a β -criptoxantina, zeaxantina, luteoxantina e neoxantina, que, assim como o β -caroteno e violaxantina também atuam como pró-vitamina A, contribuindo com a melhoria do valor nutricional do fruto (MERCADANTE, RODRIGUEZ-AMAYA e BRITTON, 1997; MERCADANTE e RODRIGUEZ-AMAYA, 1998).

Seguida da mudança de cor, a diminuição da firmeza da polpa é a transformação mais característica durante o amadurecimento, pois afeta diretamente sua qualidade, vida de prateleira e a resistência ao transporte e ao ataque de microorganismos (AWAD, 1993; LIZADA, 1993).

A alteração da textura ocorre principalmente devido aos fatores: perda de água, podendo reduzir de 5 a 10% da massa fresca do fruto diminuindo sua turgidez; degradação do amido em frutos onde seu teor é muito alto; e devido à hidrólise

enzimática de pectinas, celulose e hemicelulose provocando alterações nas estruturas da parede celular e da lamela média (AWAD, 1993; TUCKER, 1993).

O amaciamento de mangas é iniciado na parte interna da polpa, próximo à semente, progredindo para camadas mais externas do fruto. Em mangas das cultivares Tommy Atkins e Keitt, foi verificado que as partes mais internas das polpas, próximo à semente, possuem menor textura que as partes externas, abaixo da casca, mas em mangas Keitt, a parte exterior se mantém firme por mais tempo do que na cultivar Tommy Atkins (LAZAN *et al.*, 1993; MITCHAM e McDONNALD, 1992).

Os valores médios avaliados na firmeza das mangas são decrescentes com o avanço da maturação e variam entre as cultivares. No Brasil, há uma indicação de valores antiga, utilizada como norma, em que os frutos que com valores entre 8,5 a 11,4 kgf, medidos com um penetrômetro, estariam aptos para serem exportados (MANICA *et al.*, 2001).

O sabor e o aroma são critérios importantes no valor de mercado de toda fruta e são resultados de uma complexa interação entre diversas substâncias, principalmente entre os açúcares, ácidos orgânicos e compostos voláteis (AWAD, 1993).

No desenvolvimento de mangas, há o acúmulo de amido, que é hidrolisado rapidamente durante a maturação após a colheita, contribuindo com o aumento no conteúdo de sólidos solúveis totais (SST – medidos em °Brix) e com o sabor doce da fruta, elevando o conteúdo dos açúcares glicose, frutose e sacarose, sendo este o mais predominante no fruto maduro (AWAD, 1993; LIZADA, 1993; BERNARDES-SILVA, 2000; MANICA *et al.*, 2001).

Em mangas pré-climatéricas fisiologicamente desenvolvidas há predomínio dos ácidos málico e cítrico e, em menores quantidades, oxálico, succínico, oxalacético, alfa-oxiglutarico e pirúvico (MANICA *et al.*, 2001). Com o amadurecimento, há um decréscimo no conteúdo destes ácidos e conseqüente aumento no pH, devido sua utilização como fonte de energia no processo respiratório celular e, também, como fonte de carbono na síntese de açúcares (CHITARRA e CHITARRA, 2005; BERNARDES-SILVA, 2000). A manga Keitt é considerada um fruto ácido, apresentando valores de pH entre 3,69 a 5,4 (MANICA *et al.*, 2001).

O aroma característico da fruta contribui significativamente para o seu sabor e se deve à presença de compostos voláteis sintetizados principalmente durante os estádios finais da maturação. A manga representa um exemplo único, em que cada cultivar apresenta alta diversidade de odores (PANDIT *et al.*, 2010). Já foram identificados mais de 300 compostos voláteis em 20 cultivares diferentes de mangas (PINO *et al.*, 2005), porém, muitos não contribuem diretamente com o aroma do fruto. Os voláteis ativos mais predominantes em alguns cultivares são terpenos, lactonas, aldeídos, ésteres e alguns ácidos graxos (AWAD, 1993; BRECHT e YAHIA, 2009).

Os frutos da cultivar Keitt são muito grandes, de forma ovalada, alongada, oblonga, chegando a pesar mais de 1 kg, com cor amarelo-esverdeada e sinais fracos de vermelho. Sua polpa é sulcosa e firme, com maior número de fibras nas proximidades da base ou perto da semente. Essa cultivar é considerada irmã da Tommy Atkins, tendo sido introduzida no Brasil na década de 60, junto com as cultivares Palmer, Van Dyke, Irwin, Rubi e outras (MANICA *et al.*, 2001; EMBRAPA, 2004).

As características do amadurecimento de mangas da cultivar Keitt, com pico respiratório e de produção de etileno claramente definidos, associados com a degradação do amido e a síntese de açúcares solúveis no período de alguns dias após a colheita, fazem dessa variedade um interessante modelo para estudos sobre o amadurecimento da manga.

1.2 A importância do etileno no amadurecimento

Durante a maturação, as diversas mudanças bioquímicas e estruturais que ocorrem nos frutos são resultados da ação de diversas enzimas, coordenadas a partir de genes e de hormônios vegetais, como o etileno, considerado o gatilho do amadurecimento (CHAVES, 2006).

O etileno, que se apresenta na forma gasosa, atua como hormônio vegetal afetando muitos processos do desenvolvimento da planta como o metabolismo celular, a germinação de sementes, senescência de flores e folhas, crescimento e diferenciação de raízes, abscisão de folhas e o amadurecimento de frutos. Esse hormônio é biologicamente ativo em quantidades mínimas e seus efeitos fisiológicos são extremamente importantes. Tanto os frutos climatéricos como os não-

climáticos são capazes de produzi-lo, mas apenas nos primeiros esta síntese ocorre de maneira autocatalítica, ou seja, o próprio hormônio induz a expressão das enzimas responsáveis por sua produção (TAIZ, 2002; THARANATHAN, 2006).

Esse hormônio vegetal é sintetizado a partir de intermediários do ciclo da metionina ou Ciclo de Yang, apresentado na figura 1 (YANG, 1984). A etapa limitante do processo é a conversão da S-adenosil-metionina (AdoMet) em ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC), catalisada pela S-adenosil-L-metionina metil-tio-adenosina-liase (ACC sintase). A última etapa do ciclo, a conversão do ACC em etileno, requer oxigênio e é catalisada pela enzima ACC oxidase (1-aminociclopropano carboxilato oxidase). O grupo $\text{H}_3\text{C-S}$ da metionina é “reciclado” pelo Ciclo de Yang e então conservado para a síntese contínua.

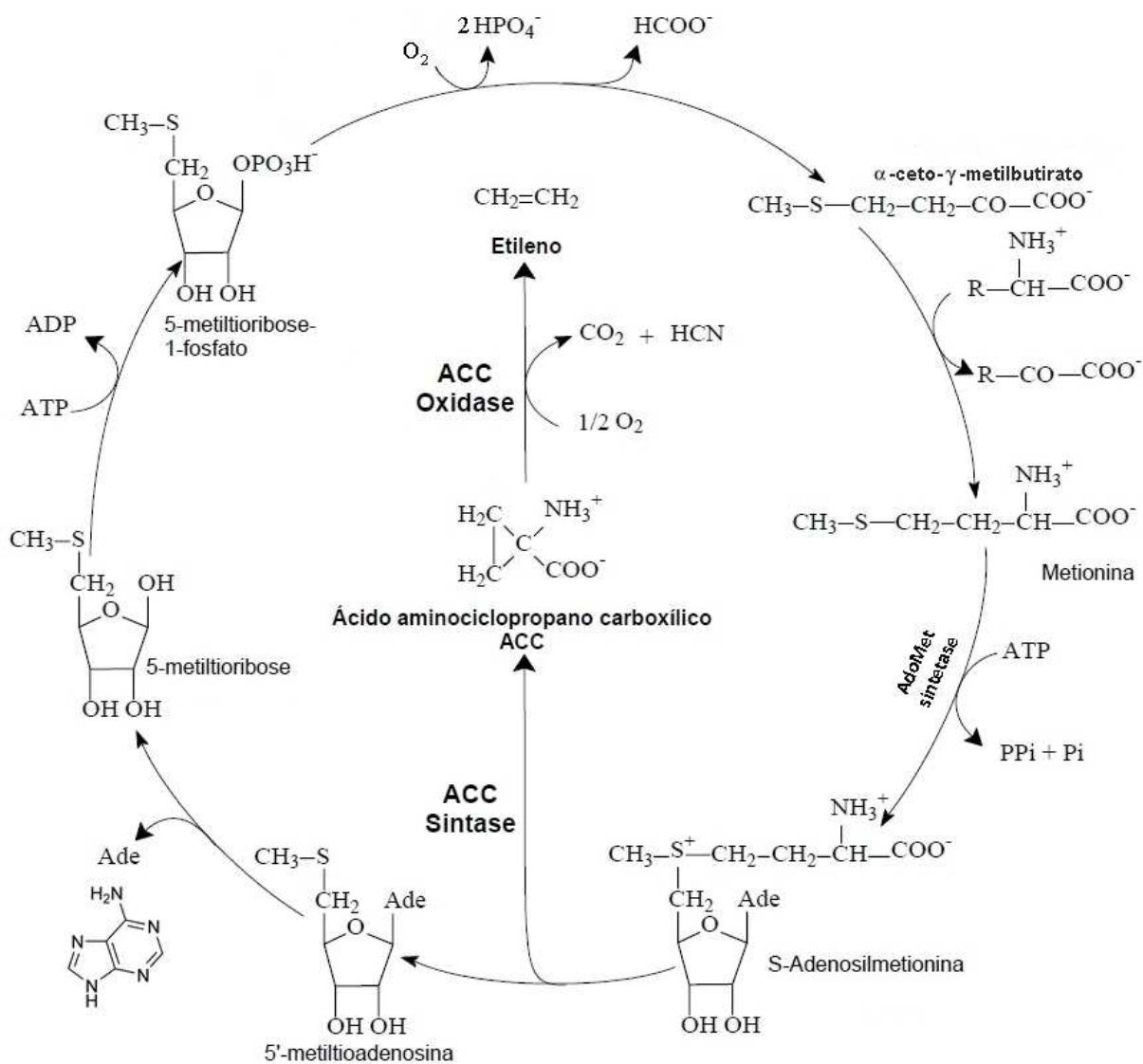


Figura 1. O Ciclo de Yang e a biossíntese de etileno (Modificado de YANG, 1984).

A liberação endógena do etileno após a colheita dos frutos desencadeia alterações quase que imediatas em alguns frutos, tornando-os propícios à infestação por patógenos e a perda pós-colheita, diminuindo assim a vida de prateleira dos mesmos e alterando seu valor comercial (GIOVANNONI, 2001). De forma similar, reações controladas pelo etileno durante o amadurecimento podem ser induzidas pela exposição da fruta à atmosfera contendo etileno exógeno, de modo a produzir coloração externa homogênea, por exemplo (SALVEIT, 1999).

Dentre as técnicas aplicadas na pós-colheita de frutos, a aplicação de inibidores de etileno promove o retardo no amadurecimento, permitindo estender a vida útil de prateleira e, assim, o prazo de comercialização.

Este controle do amadurecimento por parte do etileno ocorre devido à modulação de um grande número de genes, envolvidos em uma série de reações metabólicas, gerando respostas distintas e de intensidade variável em diferentes tecidos vegetais (CHAVES, 2006).

Análises moleculares da ação do etileno geram informações que, juntamente com análises da utilização de seus inibidores, facilitam a descoberta de genes etileno-dependentes cujas expressões possam estar relacionadas à regulação do amadurecimento de frutos e seus atributos de qualidade.

Em estudo com tomates mutantes caracterizados pelo amadurecimento inibido, Lincoln e Fisher (1985) observaram que níveis baixos de produção de etileno reduziram e até inibiram transcrição de alguns genes. Nos últimos anos, vêm-se identificando famílias de genes, genes específicos e fatores de transcrição (CHEN *et al.*, 2005), que regulam a sensibilidade de diferentes vegetais ao etileno, podendo induzir ou até inibir o amadurecimento em tomate (ALBA, *et al.*, 2005) e em kiwi (YIN *et al.*, 2008).

Hadfield *et al.* (2000) isolaram 16 cDNAs de expressão regulada durante o amadurecimento de melões cv. Charentais. Ao utilizar a fruta mutante, com inibição do gene que codifica a enzima ACC oxidase, observou a existência de três grupos de genes com expressão reduzida: dois deles influenciados pela exposição da fruta ao etileno, sendo um grupo sem alterações significativas e um grupo regulado por vias independentes do etileno; e o um terceiro grupo maior, aparentemente independente do etileno, porém, regulado por outros fatores dependentes do etileno.

Todos estes estudos mostram que a expressão gênica é determinante para a ocorrência dos eventos característicos do amadurecimento de frutos climatéricos,

exemplificado pela maneira como o etileno desencadeia seus efeitos. A compreensão da regulação do amadurecimento, de como e quais genes são ativados e/ou desativados, pode ser a chave do entendimento do processo.

Uma vez que um conjunto de genes é afetado e existe relação entre eles, é necessária a utilização de metodologias abrangentes como as ferramentas da genômica funcional. Assim, é possível o esclarecimento de questões do metabolismo que possam contribuir para a resolução de questões práticas que dizem respeito a um produto de grande importância comercial como a manga.

1.3 Genômica funcional e o amadurecimento

A determinação da seqüência completa do genoma humano foi um importante passo no campo da genética (KANDPAL *et al.*, 2009) e o mapeamento de genes em plantas também acompanhou este avanço. Hoje em dia, diversas plantas superiores como a *Arabidopsis thaliana*, o arroz (*Oryza sativa*), o álamo (*Populus sp.*) (LONG *et al.*, 2008), o milho (*Zea mays*) (SCHNABLE *et al.*, 2009), o cacau (*Theobroma cacao*) (ARGOUT *et al.*, 2011), dentre outras, têm seus genomas completamente seqüenciados.

Porém, apenas com seqüências completas de nucleotídeos no DNA não é possível elucidar muitos dos processos biológicos. As células de um organismo, apesar de possuírem o mesmo genoma, apresentam diferentes funções, morfologias, composição de proteínas expressas e metabólitos, o que tornou importantíssimo o estudo da expressão dos genes, a quantidade expressa e o funcionamento dos seus produtos.

Um amplo estudo do genoma, com o objetivo entender como os genes e a informação genética estão organizados no DNA presente nos núcleos das células, e como essa organização determina a sua função é o que caracteriza os estudos sobre genômica funcional (HATZIMANIKATIS, 2000). Na caracterização funcional de um genoma, ao contrário dos métodos tradicionais, são necessários estudos abrangentes, de alta resolução e de quantificação rigorosa dos produtos do genoma, levando a novos campos de pesquisa: a transcriptômica (estudos com mRNA), a proteômica (proteínas) e a metabolômica (metabólitos). As abordagens “ômicas” visam o entendimento do metabolismo celular como um todo, integrado, e não em partes diferentes e independentes (ZHANG *et al.*, 2010). A modulação da expressão

gênica pode ser efetuada na transcrição, nas taxas de degradação de mRNAs e proteínas, nos níveis de eficiência da tradução e distribuição das proteínas entre compartimentos subcelulares. Além disso, a regulação da transcrição e da atividade enzimática pode ocorrer por acúmulo de metabólitos e interações regulatórias dos ácidos nucleicos entre si e com as proteínas, evidenciando a complexidade do controle genético do amadurecimento (SMITH *et al.*, 1977; GIOVANNONI, 2001; BAGINSKY, 2009).

A transcriptômica se baseia no estudo da expressão dos genes, na qual moléculas de mRNA produzidas na célula a partir de seu genoma são estudadas, possibilitando a obtenção de dados mais precisos sobre a regulação da transcrição. Entretanto, devido a mecanismos de regulação pós-tradução, a quantidade de proteínas expressas pode não ser proporcional à quantidade de mRNA produzido. Assim, visando uma caracterização em larga escala, tem-se a proteômica, definida como a análise sistemática de “todas” as proteínas de uma célula ou tecido em um determinado momento, sob uma dada condição, refletindo a expressão das moléculas que mais influenciam a bioquímica e o funcionamento celular. Já a metabolômica é o estudo dos metabólitos em função de condições genéticas ou ambientais e permite o estudo de mecanismos de regulação do metabolismo celular (CULLIS, 2004; SILVA e SILVA *et al.*, 2007; BAGINSKY, 2009).

A integração dos dados produzidos pelas diferentes “ômicas” contribuem enormemente para a identificação de pontos chave no entendimento de processos de interação, regulação e caracterização de sistemas biológicos (FUKUSHIMA *et al.*, 2009). Na área agrícola, com o genoma sequenciado, os genes previstos e suas funções definidas, a transferência e a expressão de genes exógenos em células vegetais tornam-se poderosas ferramentas para pesquisa e geração de plantas transformadas, com fenótipos úteis e perceptíveis, inatingíveis por melhoramento genético convencional como, por exemplo, a produção de proteínas com capacidade de promover resistência a insetos, vírus, herbicidas (POZUETA-ROMERO, 2002; LONG *et al.*, 2008), enriquecimento do valor nutricional (PAINE *et al.*, 2005; BUTELLI *et al.*, 2008) e produção de vacinas (SANDHU *et al.*, 2000).

Como apresentado no item anterior, a expressão da informação genética é um evento de fundamental importância na pós-colheita, pois coordena as alterações no aroma, sabor, cor e textura durante o amadurecimento dos frutos. Com base em estudos sobre o tomate, genes envolvidos em alterações como o acúmulo de

açúcares solúveis, degradação da parede celular e síntese de pigmentos durante a maturação já são conhecidos (GIOVANNONI, 2004; ALBA *et al.*, 2005; THARANATHAN, 2006; FENNEMA, 2007; GODOY *et al.*, 2009). A análise de frutas transformadas geneticamente e estudos da expressão de diversos genes relacionados ao amadurecimento sugerem a existência de uma cascata regulatória do amadurecimento, ainda a ser definida (GIOVANNONI, 2004).

Diversas vias metabólicas são dependentes da expressão de alguns genes de enzimas relacionadas ao amadurecimento. Níveis aumentados de enzimas específicas podem ser observados em numerosos vegetais após a colheita, durante a maturação de frutos, como aldolase, carboxilase, clorofilase, fosforilase, peroxidase, fenolase, transaminase, invertase, fosfatase, o-metiltransferase, catalase e oxidase de ácido indolacético. Muitas dessas enzimas surgem como resultado da síntese *de novo* e têm uma meia vida *in situ* relativamente curta (GIOVANNONI, 2004; THARANATHAN, 2006; FENNEMA, 2007).

A composição protéica celular é dinâmica, varia em resposta as condições externas impostas à planta ou com seu próprio estágio de desenvolvimento. Desse modo, a análise em escala genômica da expressão protéica é relevante, uma vez que aprofunda o conhecimento dos principais agentes do metabolismo celular, complementa os estudos das outras abordagens e pode revelar informações importantes sobre o amadurecimento.

1.3.1 Proteômica

A análise proteômica tem um papel central na biologia, pois complementa a análise do genoma, do transcriptoma e do metaboloma (figura 2). O proteoma é o resultado da expressão gênica, síntese ribossomal e degradação proteolítica. Representa uma importante fonte de informação, sendo um dos campos que mais se desenvolve na pesquisa biológica em grande escala, pela caracterização quantitativa e qualitativa da expressão protéica global, incluindo a síntese de polipeptídeos, degradação, modificações pós-tradução, sinalização e interação das proteínas com outros componentes celulares. O proteoma é o produto direto do genoma transcrito e traduzido gerando informações cruciais para a compreensão global do funcionamento celular (BAGINSKY, 2009; ROSE e SALADIÉ, 2005; WILKINS *et al.*, 1997; ZOLLA *et al.*, 2008).

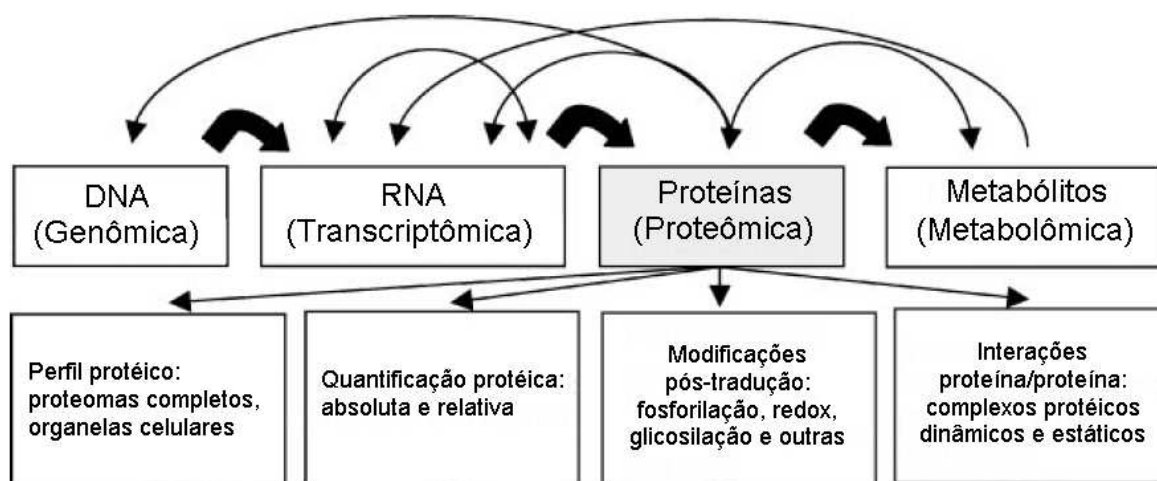


Figura 2. Interações entre os elementos básicos de um sistema biológico. As setas grossas ilustram a transcrição (de DNA para RNA), a tradução (de RNA para Proteínas), e atividade enzimática (proteínas para metabólitos). As setas mais finas indicam interações adicionais. (Modificado de BAGINSKY, 2009).

Dentre as inúmeras aplicações da proteômica, pode-se citar na medicina a identificação e desenvolvimento de biomarcadores, alvos de drogas, diagnóstico e prognóstico de doenças (AHMED, 2010). Em ciência dos alimentos, a proteômica já foi aplicada no estudo de equivalência de culturas transgênicas, controle de qualidade, rastreabilidade (JORRÍN-NOVO *et al.*, 2007), verificação de efeitos adversos da transgenia e avaliação da variabilidade natural de culturas, dentre outros (RUEBELT *et al.*, 2006).

Atualmente, a eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida (2D-PAGE), combinada com a espectrometria de massas (MS) ainda é o método mais amplamente utilizado para comparar proteomas de plantas na tentativa de identificar proteínas diferencialmente expressas (ZOLLA *et al.*, 2008).

A eletroforese bidimensional separa as proteínas de acordo com seu ponto isoelétrico e massa molecular. Tradicionalmente, a identificação de diferenças estatisticamente significativas entre dois ou mais mapas protéicos por géis 2-D exige a corrida e análise de um grande número de géis. No entanto, a reprodutibilidade na comparação de proteomas por este método é diminuída devido às variações técnicas na preparação de amostras e nos parâmetros de corrida dos géis. A análise das imagens e validação dos *spots* em diferentes géis pode ser uma tarefa complicada quando os padrões diferem ou quando apenas mudanças sutis nas

proteínas de menor importância estão presentes (WANG *et al.*, 1997; CARPENTIER *et al.*, 2005; KNOWLES *et al.*, 2003).

Uma forma eficaz na tentativa de eliminar a variação de gel para gel é a utilização da técnica de eletroforese em gel diferencial (DIGE) que permite a análise de até três proteomas em um único gel, sendo um padrão interno comum a todos os géis, e duas amostras diferentes marcadas com fluoróforos distintos (CyDye) (ÜNLU *et al.*, 1997). Assim, apenas as proteínas marcadas com seu próprio fluoróforo são visualizadas. Além disso, a DIGE emprega marcação de proteínas com uma ampla faixa dinâmica de detecção e apresenta sensibilidade superior à coloração de géis por métodos com prata, possibilitando a realização de estudos proteômicos de natureza quantitativa com maior precisão, exatidão e sensibilidade (TONGE *et al.*, 2001; KNOWLES *et al.*, 2003).

Informações sobre as maiores variações protéicas durante o desenvolvimento, amadurecimento e resposta a diferentes tipos estresses de algumas frutas de importância comercial ainda são escassas e limitadas a alguns frutos como tomate (ALBA *et al.*, 2005; ROCCO *et al.*, 2006; FAUROBERT *et al.*, 2007; PAGE *et al.*, 2010), morango (BIANCO *et al.*, 2009), pêra (PEDRESCHI *et al.*, 2009), pêssigo (RENAULT *et al.*, 2008; LARA *et al.*, 2009; BORSANI *et al.*, 2009; NILO *et al.*, 2010; ZHANG *et al.*, 2010), laranja (KATZ *et al.*, 2007; MUCCILLI *et al.*, 2009) e limão (PIGNATARO *et al.*, 2010). Até o presente momento não se tem conhecimento sobre publicações deste gênero relacionadas à manga.

Como dito anteriormente, mangas da cultivar Keitt apresentam comportamento típico de frutos climatéricos, o que as tornam modelo para estudos relacionados ao amadurecimento da fruta. Suas etapas durante o amadurecimento pós-colheita são distintas e bem definidas facilitando a identificação de proteínas diferencialmente expressas ao comparar dois estádios deste período.

Uma melhor compreensão molecular do amadurecimento pós-colheita de mangas Keitt pode contribuir para o desenvolvimento de novas variedades, para melhorar o entendimento sobre processos fundamentais na melhoria da qualidade e também para desenvolvimento de tecnologias para o controle do amadurecimento.

Assim, o desenvolvimento dos mapas protéicos de mangas Keitt utilizando a tecnologia DIGE pode trazer informações sobre as alterações moleculares sofridas pela manga, em se tratando de proteínas, durante o amadurecimento e também revelar proteínas que possam atuar no controle de pontos específicos do processo.

2. OBJETIVO

Identificar proteínas com significativa variação de abundância durante o amadurecimento da manga (*Mangifera indica* cv. Keitt), a partir da comparação dos mapas protéicos das polpas de mangas nos estádios pré-climatérico e climatérico.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Amostragem de material

Frutos de manga (*Mangifera indica* L.) da cultivar Keitt foram obtidos de uma produção comercial localizada no município de Joanópolis, Estado de São Paulo. Os frutos, que estavam no ponto de colheita comercial, ainda pré-climatéricos, foram colhidos de maneira aleatória pelo produtor e trazidos para o laboratório no mesmo dia.

Para as análises de acompanhamento do amadurecimento, os frutos foram lavados com água corrente, divididos aleatoriamente em dois grupos e armazenados em duas câmaras com temperatura (25°C) e umidade (90%) controladas e amostrados durante seu período de amadurecimento pós-colheita. Desse modo, foram realizados dois experimentos distintos de caracterização do amadurecimento, de maneira simultânea, intitulados “A” e “B”. Uma terceira amostragem, “C”, caracterizada anteriormente a este trabalho em nosso laboratório por Bernardes Silva (2004), também foi utilizada para a análise proteômica.

3.2 Caracterização do amadurecimento

3.2.1 Medidas de respiração (CO₂) e etileno

Para os ensaios de medidas de respiração (CO₂) e etileno de cada uma das amostragens “A” e “B”, quatro frutos foram amostrados de cada uma das câmaras durante todos os dias até a senescência.

Seringas plásticas, sem êmbolo, de volume conhecido (74 mL), e com os bicos conectados a tubos plásticos vedados, foram anexadas pela base à casca dos frutos íntegros com auxílio de fita adesiva, de forma a constituir uma câmara capaz de concentrar os gases produzidos por uma área de 5,31 cm² da superfície dos frutos, por no mínimo 1 hora. As análises de CO₂ e etileno foram realizadas coletando pelo bico da seringa anexada ao fruto, uma amostra do gás nela encerrado. Para as análises de CO₂ foram tomadas alíquotas de 1 mL e de 10 mL para etileno.

O CO₂ e o etileno foram medidos através de cromatografia gasosa (Cromatógrafo modelo *HP 6890*), sendo o etileno detectado por ionização de chama (FID) e o CO₂ por detector de condutividade térmica (TCD), utilizando-se uma coluna HP-PLOT Q com 30 m de comprimento e 530 µm de diâmetro interno, com injetor e detector a 250°C e corrida isotérmica a 30°C. A injeção dos gases foi realizada manualmente com seringa *GAS Tigth*, própria para este fim. Foi utilizado o hélio como o gás de arraste, no volume de 0,8 mL/min para etileno e 4 mL/min para CO₂ (PURGATTO, 2002).

Após as análises dos gases, os frutos foram então pesados, os perímetros maiores e menores de cada um dos quatro frutos amostrados foram medidos com auxílio de fita métrica e os respectivos raios calculados, considerando perímetros circulares. Sendo a manga uma fruta de forma esferóide e oblonga, sua área de superfície foi calculada a partir da utilização da fórmula da área total da superfície de um esferóide oblongo:

$$Área = 2\pi \cdot \left[a^2 + \frac{b^2}{\text{sen}(E)} \cdot \ln\left(\frac{1 + \text{sen}(E)}{\text{cos}(E)}\right) \right]$$

$$E = \arccos\left(\frac{b}{a}\right)$$

onde, “a” é o raio maior, “b” o raio menor e “E” a excentricidade angular (BEYER, 1987).

Em seguida os frutos foram descascados, as polpas picadas, congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C, para sua posterior utilização como amostra nas análises subsequentes.

Para estimativa das taxas respiratórias e de produção de etileno, foram realizados cálculos levando em consideração a massa, a área da superfície da fruta, as análises dos gases padrões, o tempo decorrido entre a vedação das seringas e a tomada das amostras dos gases produzidos pelas frutas. Os resultados obtidos foram expressos pelos valores médios da produção de gás durante cada dia após a colheita, junto com o respectivo erro padrão.

3.2.2 Amido e açúcares solúveis

O conteúdo de amido foi determinado enzimaticamente como descrito por Cordenunsi e Lajolo (1995). A extração procedeu-se da seguinte maneira: homogeneizou-se 0,5 g de amostra da polpa dos frutos de manga (triturada em nitrogênio líquido) em 5 mL de hidróxido de sódio 0,5 N, sendo neutralizado em seguida com 5,0 mL ácido acético 0,5 N e completando o volume para 25 mL em balão volumétrico com água deionizada. Uma alíquota de 1 mL foi utilizada para precipitação do amido com etanol, de modo que a concentração final deste fosse de 80%, seguido de duas centrifugações a 9000g por 15 minutos, descartando o sobrenadante. Após a secagem do precipitado ao ar, foi adicionado 1 mL de solução de amiloglicosidase (14 U/mL) e a glicose liberada determinada pelo sistema glicose oxidase/peroxidase/ABTS, segundo método de Bergmeyer (1974), utilizando como padrão a glicose.

Os açúcares solúveis foram extraídos homogeneizando-se cerca de 1,0 g da amostra da polpa dos frutos (triturada em nitrogênio líquido) em 5,0 mL de etanol 80% a 80°C. O homogenato foi mantido sob agitação mecânica a 80°C por 20 minutos e centrifugado a 9000g por 15 minutos. A extração foi repetida três vezes, os sobrenadantes combinados e o volume final corrigido com etanol 80% para 25 mL. A partir de uma alíquota de 1 mL, o etanol foi evaporado a vácuo a 43°C (em sistema *speed vac*) e o resíduo retomado em água. Os açúcares solúveis foram identificados e quantificados, através de HPLC (Cromatógrafo *Dionex DX 500*) acoplado a detector de pulso amperométrico, utilizando coluna CarboPac PA1 (*Dionex*), em corrida isocrática com fluxo de 1 mL/min de NaOH (18 mM).

3.3 Distinção dos estágios fisiológicos para a análise proteômica

Os pontos do período pós-colheita utilizados nas análises proteômicas foram escolhidos de modo que as três amostragens pudessem ser comparáveis e ter características distintas e representativas de dois estádios distintos, permitindo, então, a análise das proteínas envolvidas. Os dois grupos de frutos comparados apresentaram as seguintes características:

- Verdes – Recém-colhidas, pré-climatéricas, com baixas taxas de respiração e produção de etileno, polpa com alto teor de amido e baixo teor de açúcares solúveis;
- Maduras – Climatéricas, com alto teor de açúcares solúveis e demais características de maturação plenamente desenvolvidas.

3.4 Extração e quantificação de proteínas

O método empregado na extração de proteínas totais da polpa das frutas dos três experimentos foi baseado no protocolo descrito por Carpentier *et al.* (2005), utilizando fenol tamponado com Tris para extração das proteínas seguido da precipitação com acetato de amônio em metanol.

As amostras da polpa da manga foram trituradas em nitrogênio líquido e, em seguida, 1,0 g do pulverizado foi ressuspenso em 5 mL de tampão de extração gelado (Tris-HCl 50 mM pH 8,5, EDTA 5 mM, KCl 100 mM, DTT 1%, sacarose 30%, coquetel inibidor de protease SIGMA-ALDRICH (P9599) 10 µL), e agitados por 30 segundos. Aos extratos foram adicionados 5 mL de fenol tamponado com Tris-HCl (pH 8,0) gelado e as amostras foram agitadas por 15 minutos a 4°C. Em seguida, foram centrifugadas a 6000g por 30 minutos a 4°C e as fases orgânicas coletadas e re-extraídas com 5 mL de tampão de extração, repetindo o processo. Após a segunda centrifugação, as fases orgânicas foram coletadas e as proteínas precipitadas a partir da adição de 25 mL de solução de acetato de amônio 100 mM em metanol e incubação a -20°C por no mínimo 16 horas. Seguiu-se por centrifugação a 16000g por 45 minutos a 4°C, descartando os sobrenadantes. Os precipitados foram lavados com acetona gelada adicionada de ditioneína (DTT) a 0,2%, deixados secar por 30 minutos na capela e ressuspendidos em 1 mL de tampão de lise (uréia 7M, tiouréia 2M, CHAPS 4% e DTT 1%, 0,5% anfólitos de pH a ser utilizado) ou em 1 mL de tampão de lise para análise DIGE (uréia 7M, tiouréia 2M, CHAPS 4%, Tris 10 mM pH 8,5).

As proteínas foram quantificadas usando o *2-D Quant Kit* da *GE Healthcare*, seguindo as instruções do fabricante. Neste processo ocorreu ligação específica de íons cobre às proteínas do extrato e o cobre não ligado foi medido através de um agente colorimétrico por leitura em espectrofotômetro a 480nm. A concentração foi estimada ao comparar os valores lidos com a curva padrão de albumina de soro

bovino (BSA). A absorbância lida no espectrofotômetro foi, portanto, inversamente proporcional à concentração da amostra.

3.5 Eletroforese em condições desnaturantes (SDS-PAGE)

Para realização de eletroforese em condições desnaturantes, foram confeccionados mini-géis de poliacrilamida em presença de detergente aniônico e agente desnaturante dodecil-sulfato de sódio (SDS), de 0,75 mm de espessura, 7 cm de altura e 9 de largura. O gel de separação, com 10% de poliacrilamida, tinha 6 cm de altura, enquanto o gel de concentração, com 3,75% de poliacrilamida, tinha 1 cm de altura, segundo metodologia clássica (LAEMMLI, 1970).

Os volumes dos extratos protéicos de cada amostra equivalentes a 30 µg de proteínas foram adicionados à solução tampão de amostra três vezes concentrado, de modo a atingir sua a concentração de uso (0,0625 M Tris-HCl pH 6,8, 10% Glicerol, 2% SDS, 0,05% Azul de Bromofenol e 5% β-mercaptoetanol). Em seguida, foram aplicados em cada poço do gel e também aplicou-se o marcador de massa molecular *LMW calibration kit for SDS eletrophoresis (GE Healthcare)* composto de fosforilase b (músculo de coelho), massa molecular 97 kDa, albumina (soro bovino), massa molecular 66 kDa, ovoalbumina (ovo branco de galinha) 45 kDa, anidrase carbônica (eritrócito bovino) 30 kDa, inibidor de tripsina (soja) 20,1 kDa e α-lactoalbumina (leite bovino) 14,4 kDa.

Os mini-géis foram então submetidos à tensão fixa de 200V por 45 minutos.

3.6 Coloração dos géis

Os géis unidimensionais, bidimensionais preliminares e os preparativos, foram submetidos a processo de coloração das proteínas totais utilizando o reagente azul de coomassie (*Coomassie Brilliant Blue G250*) coloidal, de acordo com Westermeier (2006), com pequenas modificações.

Os géis foram lavados com água mili-Q e incubados em solução corante (sulfato de amônio 10%, ácido fosfórico 2%, azul de coomassie G250 5% e etanol 19,6%) por no mínimo 2 dias. Após este período, os géis foram lavados novamente com água mili-Q e transferidos para solução tampão de neutralização (Tris 0,1M, pH 6,5 ajustado com ácido fosfórico) por 3 minutos, descorados com etanol 50% até a

coloração desejada e, em seguida, os géis foram transferidos para a solução fixadora (sulfato de amônio 20%) por no mínimo 12 horas a 4°C, repetindo o processo caso fosse necessário.

3.7 Eletroforese bidimensional

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

Durante os géis preliminares e no preparo dos géis analíticos com extratos protéicos marcados com fluoróforos, os géis de poliacrilamida foram confeccionados em escala reduzida, já os géis preparativos, utilizados para excisão dos spots, em escala maior.

3.7.1 Focalização isoelétrica (primeira dimensão)

Utilizou-se tiras de gradiente de pH imobilizado de 7 cm para os testes e para as análises das amostras marcadas com fluoróforos e de 24 cm para os géis preparativos (*Immobiline DryStrip pH 4-7, GE Healthcare*). As tiras de 7 cm foram reidratadas com 125 µL de extrato contendo 100 µg de proteínas, enquanto nas de 24 cm com 450 µL de extrato contendo 750 µg de proteínas. Em ambos os casos a reidratação foi feita de modo passivo, com o extrato deixado em contato com a tira por um período entre 10 a 20 horas, com utilização de óleo mineral para cobri-las, evitando evaporação e formação de cristais de uréia.

A aparelhagem *Ettan IPGphor II (GE Amersham Biosciences)* foi utilizada na focalização das amostras utilizando 50 µA por tira de gradiente de pH imobilizado e 20°C de temperatura. Para as tiras de 7 cm, a programação utilizada foi 300 V por 4 horas, aumento gradativo até 1000 V por 30 minutos, aumento gradativo até 5000 V por 1 hora e 30 minutos, por fim, mantendo a 5000 V por 36 minutos, totalizando 6 horas e 36 minutos para completar a separação das proteínas por seu ponto isoelétrico. Quando dos géis preparativos, tiras de 24 cm, a programação foi: 500 V por 1 hora, aumento gradativo até 1000 V por 7 horas, aumento gradativo até 8000

V por 3 horas, por fim, mantendo a 8000 V por 5 horas e 36 minutos, totalizando 16 horas e 36 minutos.

Após este processo, as tiras utilizadas foram armazenadas a -80°C até o momento da separação por massa molecular, no entanto, as tiras que continham proteínas marcadas com fluoróforos, foram cobertas com papel laminado de modo a estarem protegidas da exposição da luz.

3.7.2 SDS-PAGE (segunda dimensão)

Na preparação para a separação por massa molecular, as tiras foram incubadas sob temperatura ambiente em solução tampão de equilíbrio (Uréia 6 M, Tris-HCl 75 mM pH 8,8, glicerol 29,3%, SDS 2% e traços de azul de bromofenol) em duas fases: primeiramente adicionou-se 1% de DTT em quantidade suficiente da solução tampão de equilíbrio para incubar as tiras por 15 minutos, descartando a solução no final; em seguida, da mesma maneira, foi realizada a incubação na solução adicionada de 2,5% de iodoacetamida.

Sendo o DTT um forte agente redutor em pH alcalino, colocaram-se as tiras em contato com a solução de equilíbrio, para que ocorresse a redução dos grupamentos sulfidríla e pontes dissulfeto das proteínas, prevenindo a formação de interligações de resíduos de cisteína das proteínas. Já a iodoacetamida tem o papel de alquilar e estabilizar os grupos sulfidríla das proteínas protegendo-as da reação de formação de pontes dissulfeto, além de reagir com o DTT residual, inibindo sua ação.

Durante os testes, confeccionaram-se mini-géis de poliacrilamida de 12,5% de concentração em presença de SDS, de dimensões 7 cm de altura, 9 de largura e 1 mm de espessura para as tiras de 7 cm. Para as análises propriamente ditas, utilizaram-se géis de 20 cm de altura, 26 de largura e 1 mm de espessura, em que 2 tiras foram posicionadas na parte superior de cada gel (minimizando variações relativas à técnica). Os géis preparativos foram confeccionados com as mesmas dimensões, entretanto, utilizando-se tiras de 24 cm. As tiras foram fixadas nos géis utilizando gel de agarose a 0,5% em tampão de corrida Tris 25mM, glicina 0,192 M, pH 8,3 contendo 0,1% de SDS e traços de azul de bromofenol. As eletroforeses foram realizadas fixando tensão máxima de 200 V para cada par de mini-géis e no

caso dos géis maiores, fixou-se potência máxima de 17 W por gel e temperatura de 25°C.

3.8 Marcação das proteínas com fluoróforos (CyDye)

3.8.1 Purificação dos extratos protéicos

Na purificação dos extratos protéicos destinados à análise DIGE, foi utilizado o kit *Ettan 2D Clean-up Kit (Ge Healthcare)* que precipita as proteínas do extrato quantitativamente através da adição de agentes precipitantes e centrifugação, seguido da lavagem do precipitado com solução específica para remoção dos interferentes e, após nova centrifugação, solubilização do precipitado no tampão de lise para análise DIGE. Após a verificação e ajuste do pH do extrato, sua concentração foi novamente determinada como descrito no item 3.3.

3.8.2 Padrão interno e amostras para análise 2D-DIGE

A tecnologia DIGE permite a corrida de até três amostras diferentes em um mesmo gel, sendo uma delas correspondente a padrão interno comum a todos os géis SDS-PAGE bidimensionais. O padrão interno é um *pool* de todas as amostras do experimento e, portanto, contém todas as proteínas de cada amostra. Ele é usado para combinar e normalizar os perfis protéicos das amostras de géis diferentes, minimizando a variação entre os géis, facilitando as análises e permitindo a quantificação das diferenças entre as amostras com precisão estatística.

Uma mistura de 50 µg de extrato protéico de cada amostra foi promovida para ser utilizada como padrão interno, como mostrado a figura 3.

Neste trabalho, utilizou-se o esquema de marcação com dois marcadores fluorescentes: Cy3 e Cy5, para marcação do padrão interno e das amostras, respectivamente. Para a realização da focalização isoeétrica das amostras, após a reação de marcação, 50µg de cada amostra e 50µg do padrão interno, foram aplicados em cada tira de pH imobilizado. A tabela 01 apresenta a composição das misturas dos extratos protéicos aplicados.

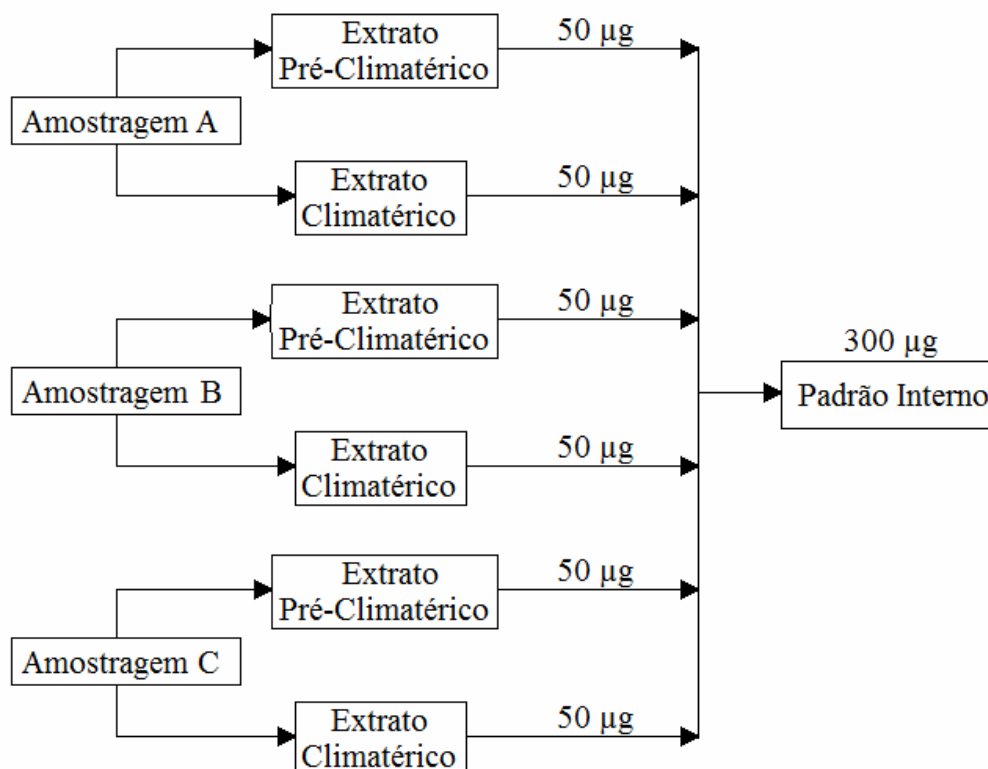


Figura 3. Esquema da Mistura dos extratos protéicos das polpas de manga para utilização como padrão interno.

Tabela 1. Composição das misturas de extratos protéicos marcados com fluoróforos utilizados na análise proteômica.

Mistura	Cy5	Cy3
1	50 µg Extrato protéico pré-climatérico da amostragem A	50 µg Padrão Interno
2	50 µg Extrato protéico pré-climatérico da amostragem B	50 µg Padrão Interno
3	50 µg Extrato protéico pré-climatérico da amostragem C	50 µg Padrão Interno
4	50 µg Extrato protéico climatérico da amostragem A	50 µg Padrão Interno
5	50 µg Extrato protéico climatérico da amostragem B	50 µg Padrão Interno
6	50 µg Extrato protéico climatérico da amostragem C	50 µg Padrão Interno

3.8.3 Reação de marcação protéica

A reação de marcação das proteínas foi realizada com o uso do sistema fluorescente de marcação mínima (*Amersham CyDye DIGE Fluors – minimal dyes – for Ettan DIGE, GE Healthcare*), que promove ligação covalente entre o grupamento amino ligado ao carbono épsilon de uma lisina da molécula protéica e um grupo éster NHS reativo da cianidina, via ligação amida.

Seguindo instruções do fabricante, os fluoróforos foram então reconstituídos em dimetilformamida (DMF) e diluídos à concentração de uso: 400 pmol de cada marcador para 50 µg de proteínas presentes na amostra. A reação ocorre por 30 minutos e foi interrompida pela adição de 1 µL de solução 10 mM de lisina para cada 50 µg de proteínas. A amostra protéica relativa ao padrão interno foi constituída da mistura de 50 µg de proteínas de cada amostra, sendo marcadas com a quantidade proporcional de Cy3. Dessa forma, como dito anteriormente, após a marcação, em cada tira de pH imobilizado aplicou-se 50 µg de amostra marcada com Cy5 e 50 µg de padrão interno marcado com Cy3, prosseguindo com as eletroforeses bidimensionais.

3.9 Aquisição e análise das imagens dos géis

A aquisição das imagens dos géis foi feita com o uso do sistema *VersaDoc 4000MP (Bio-Rad)* que capta imagens digitais de alta resolução por câmara com sistema *cooled CCD*, juntamente com a utilização do software *Quantity One (Bio-Rad)*.

As imagens dos géis corados com azul de coomassie foram adquiridas utilizando fonte de luz branca, sem filtros. Para as amostras marcadas com fluoróforos, utilizou-se o LED verde (553 ± 3 nm) e filtro de emissão 605 ± 50 nm BP (*Band Pass*) para as amostras marcadas com Cy3, e LED vermelho (648 ± 3 nm) com filtro de emissão 695 ± 55 nm para as marcadas com Cy5, sendo esses parâmetros definidos pelo fabricante.

O tempo de exposição foi de 5 minutos com imagens sendo obtidas a cada 30 segundos (dez imagens), dentre as quais, a melhor imagem de cada amostra foi selecionada para as análises.

Para todas as análises computacionais das imagens DIGE, utilizou-se do *software PDQuest Advanced*, versão 8.0.1 (*Bio-Rad*).

3.9.1 Edição das imagens

A fim de manter as mesmas dimensões das imagens, minimizar distorções e facilitar o processo de análise, a função de recorte do *software PDQuest* foi utilizada. Os parâmetros de tamanho e posições a serem recortadas foram salvos e aplicados em todas as imagens.

Nenhuma edição relativa a brilho e contraste foi realizada para que não influenciasse nos resultados, já que poderia alterar a intensidade dos *spots* detectados.

3.9.2 Detecção e validação dos spots

Quando um aparelho óptico é utilizado para transformar um sinal biológico em sinal digital computadorizado, forma-se uma imagem composta de minúsculos e individuais *pixels*. Cada *pixel* tem uma coordenada X e Y (horizontal e vertical) de posicionamento na imagem, e um valor Z que é a intensidade de seu sinal. Para um dado *spot* de determinada área ser visível e quantificável, a intensidade de seus *pixels* deve ser maior que a intensidade dos *pixels* que formam o plano de fundo da imagem. Sua intensidade total é a soma das intensidades de todos seus *pixels*. A intensidade média é a intensidade total dividida pelo número de *pixels* do *spot*. A unidade do sinal produzido pela intensidade de cada *spot* é a densidade óptica.

Com os valores obtidos das intensidades de cada *spot*, o *software PDQuest* aplica análises quantitativas, qualitativas, estatísticas e booleanas, a fim de comparar os grupos. Para isso, utilizou-se o assistente de experimentos do *software PDQuest*, que mostra passo a passo como realizar as detecções e análises multicanal das imagens.

Primeiramente foram selecionadas as imagens pertencentes aos grupos a serem comparados, aos respectivos canais de leitura do fluoróforo e aos padrões internos. Em seguida, determinaram-se os parâmetros de detecção dos *spots* através da escolha de: um *spot* de intensidade fraca, para indicação da sensibilidade de detecção e o menor nível a ser detectado; um *spot* de tamanho pequeno (menor

que o *spot* fraco), para os parâmetros de escala de tamanho; e também o maior e mais largo *spot* da imagem, que ajusta os parâmetros do raio de subtração do plano de fundo da imagem, bem como a remoção de estrias e não detecção de falsos *spots*.

Selecionou-se a opção de ajuste das imagens para reduzir os efeitos de alterações no posicionamento geral, provocados tanto por seu processo de aquisição quanto por defeitos nos géis. Deste modo, os *spots* detectados são facilmente correlacionados entre as imagens.

Durante a detecção automática dos *spots*, foi selecionada a opção para que o software escolhesse automaticamente a imagem a ser tratada para se tornar o “gel mestre”, baseando-se na melhor qualidade dos *spots* detectados. Em seguida, a imagem digital original foi filtrada e suavizada de modo a destacar os *spots*. A partir destes destaques, foi criada uma imagem sintética em três dimensões denominada imagem Gaussiana, removendo toda espécie de estria, reflexos, artefatos que possam interferir nos *spots* presentes na imagem digital original, facilitando o processo de quantificação. O *software* utiliza este modelo Gaussiano a fim de criar uma imagem ideal, com separações bem definidas entre os *spots*, para que possam ser devidamente identificados e quantificados. Todas as análises realizadas pelo software são processadas na imagem Gaussiana (“gel mestre”), preservando a imagem original e a filtrada, para que, a qualquer momento, haja a possibilidade de visualizá-las e fazer correções necessárias em determinações de falsos *spots*.

As imagens das amostras marcadas com Cy5 foram comparadas umas as outras por meio de normalização com o padrão interno marcado com Cy3. O algoritmo selecionado para a normalização foi o *Local Regression Method*, sugerido pelo fabricante. Este algoritmo é menos susceptível a *outliers* do que uma simples regressão linear e também corrige diferenças na eficiência da reação de marcação das proteínas nos géis.

Após a detecção e validação automática, todos os *spots* foram revistos manualmente para que se eliminasse qualquer detecção errônea pelo software. Neste caso, consideraram-se válidos os *spots* presentes em, no mínimo, 3 géis de cada grupo de frutas e também presentes em todas imagens dos padrões internos.

O grupo climatérico foi comparado com o grupo controle pré-climatérico e, para análise quantitativa, foram selecionados *spots* com aumento ou diminuição de expressão de 1,5 vezes, ou seja, aumento da expressão maior que 50% e

diminuição da expressão maior que 33%, em relação ao grupo controle pré-climatérico. Na análise qualitativa, foram selecionados os *spots* presentes em apenas um dos grupos. Para análise estatística, utilizou-se o teste T de Student ($p < 0,05$), para comparar os valores médios das intensidades de um *spot* de um grupo de frutas com o outro. A partir destes resultados foi possível a aplicação de análises booleanas de união e intersecção.

3.10 Excisão dos *spots* de interesse

Após a identificação dos *spots* com significativa variação de abundância, foram confeccionados géis preparativos utilizados para a coleta dos *spots* de interesse. Utilizando a metodologia já descrita, posicionou-se o gel sobre um transiluminador e os *spots* foram removidos com o auxílio de um bisturi e armazenados em solução de ácido acético 10% a -80°C para, posteriormente, proceder à digestão e identificação dessas proteínas por espectrometria de massas.

3.11 Digestão com tripsina

Os *spots* isolados foram descongelados e fragmentados com auxílio de bisturi, de modo a obter partes de aproximadamente 1 mm^3 em microtubos de 1,5 mL. Em seguida, foram imersos em solução contendo metanol 50% e ácido acético 2,5 % em água purificada, por 2 horas, substituindo a solução por mais 1 hora em temperatura ambiente, para promover a descoloração e remoção do SDS do gel.

Com os géis descoloridos, proseguiu-se com a desidratação, adicionando acetonitrila (100%) por 5 minutos, repetindo o processo e, ao final, descartar a acetonitrila e levar os microtubos para evaporar o excesso com auxílio de aparelho evaporador.

As proteínas nos géis foram submetidas à redução com solução de DTT 10 mM por 30 minutos, e alquilação com solução de IAA 50 mM por outros 30 minutos.

Posteriormente, os géis foram lavados com solução de 100 mM de bicarbonato de amônio por 10 minutos e submetidos aos processos de desidratação com acetonitrila (100%), por 5 minutos a temperatura ambiente, reidratatação com bicarbonato de amônio 100 mM e, por fim, novamente desidratação com acetonitrila, evaporando o excesso.

Em seguida, adicionou-se solução de tripsina a 20 ng/ μ L em bicarbonato de amônio 50mM por 30 minutos em banho de gelo para reidratar os fragmentos dos géis, prosseguindo com a adição de bicarbonato de amônio 50 mM em quantidade suficiente para cobrir os géis e incubação durante 16 horas a 37°C. A extração dos peptídeos foi promovida através da adição de solução contendo 5% de ácido fórmico por 10 minutos a temperatura ambiente, removendo o sobrenadante para outro microtubo. Logo após, adicionou-se solução ácido fórmico 5% e acetonitrila 50% por mais 10 minutos no tubo contendo os fragmentos de géis, coletando o sobrenadante para o novo tubo contendo a solução anterior. Por fim, evaporou-se o extrato no evaporador por aproximadamente 40 minutos de modo que restasse aproximadamente 1 μ l de solução e armazenou-se a -20°C até a realização da análise.

3.12 LC-MS/MS

Os microtubos contendo peptídeos foram levados até o Laboratório de Espectrometria de Massas, do Laboratório Nacional de Biociências, Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM) – Associação Brasileira de Tecnologia de Luz Síncrotron (ABTLuS), em Campinas-SP, para a realização das análises de espectrometria de massas.

Os peptídeos foram solubilizados em 12 μ L de ácido fórmico 0,1% e transferidos para vials específicos para a realização das análises. O seqüenciamento dos peptídeos foi promovido em plataforma de cromatografia líquida online UPLC (*nanoAcquity UPLC, Waters*) acoplada a espectrometria de massas com fonte de ionização por eletrôn-spray (ESI) e analisador de massas *Q-TOF Ultima API (MicroMass/Waters)*.

Os espectros MS/MS gerados durante o sequenciamento dos peptídeos foram processados pelo *software* MassLynx v4.1 (*Waters*) e processados posteriormente pelo *software* MASCOT (www.matrixscience.com) que comparou as sequencias obtidas com as depositadas no banco de dados NCBI2010 através do tipo de busca MS/MS Ion Search, com os seguintes parâmetros: modificação fixa carbamidometil (C); modificações varáveis de oxidação (HW e M); valores de massa monoisotopicos; massa protéica irrestrita; tolerância da massa do peptídeo de $\pm 0,1$ Da; tolerância da massa do fragmento de $\pm 0,1$ Da; máximo de clivagens perdidas: 1.

A identificação dos espectros e possíveis similaridades com proteínas já sequenciadas e depositadas no banco de dados foi feita automaticamente e os parâmetros selecionados no relatório da busca (*Peptide Summary Report*) foram: método padrão de *scoring*; limite de significância $p < 0,01$; exigir um *hit* protéico que incluía ao menos um peptídeo em negrito vermelho (filtra peptídeos ou proteínas duplicadas ou homólogas do relatório).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização do amadurecimento pós-colheita dos frutos

Os frutos das amostragens “A” e “B” foram recebidos em fevereiro de 2009 e após limpeza e armazenamento em câmaras com temperatura e umidade controladas, foram deixados amadurecerem. As análises de CO₂ e etileno foram encerradas quando os frutos apresentaram sinais de avançada senescência, como excessivo amolecimento da polpa.

A amostragem “C” foi realizada por Bernardes Silva (2004), e a caracterização dos perfis de CO₂ e etileno foi feita utilizando metodologia diferente para a tomada de gases, mas, a título de comparação, seus dados também são mostrados. Seus resultados foram obtidos a partir da medida de uma alíquota de gás encerrada numa jarra lacrada por ao menos uma hora, contendo um exemplar da amostra, ou seja, a produção de gases pelo fruto foi estimada pela alteração da atmosfera encerrada na jarra. No caso das amostragens “A” e “B”, os valores obtidos resultaram da produção de gases a partir da área da superfície do fruto coberta pela base da seringa acoplada a ele, e, através de cálculos, extrapoladas para a área total do fruto.

A figura 4 mostra que as amostragens realizadas neste trabalho (“A” e “B”), assim como a amostragem de Bernardes Silva (2004) (“C”), apresentaram picos de respiração e etileno, caracterizando o climatério. Na amostragem “A”, houve um pico de respiração no 6º dia pós-colheita e outro ao final das leituras, no 9º dia e, para o etileno, houve um pico no 7º dia pós-colheita. Na amostragem “B”, houve um pico de respiração no 6º dia pós-colheita e outro no 9º dia, enquanto que para o etileno houve um pico no 8º dia pós-colheita. Como se pode observar, na amostragem “C”, houve produção acentuada de CO₂ no 8º dia pós-colheita e no 9º dia para o etileno. Em todas as amostragens, os picos foram observados quando os frutos já se apresentavam com características de maduros, com alterações marcantes na textura da polpa, mais discretas na cor de polpa e sabor adocicado.

Com relação à degradação de amido, houve um perfil comum às três amostragens, com um aparente aumento depois da colheita, perceptível ao redor do 3º dia, seguido de um decréscimo até níveis mínimos.

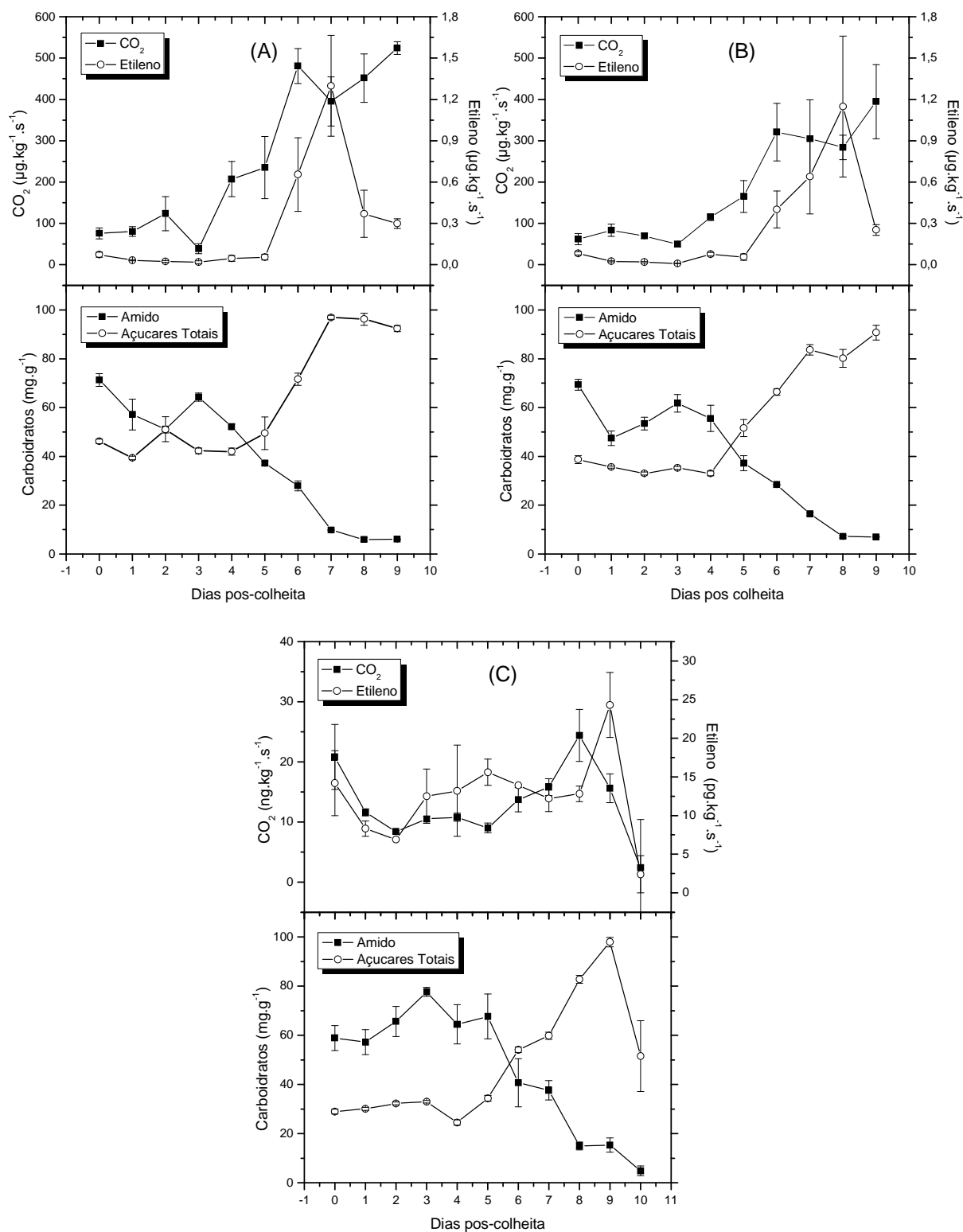


Figura 4. Perfis de respiração, produção de etileno e teores de amido e açúcares solúveis totais em mangas da cultivar “Keitt” durante o amadurecimento pós-colheita de três diferentes amostragens. (A, B e C). Valores expressos pela $\langle \text{média} \rangle \pm \text{erro padrão}$, $n = 4$.

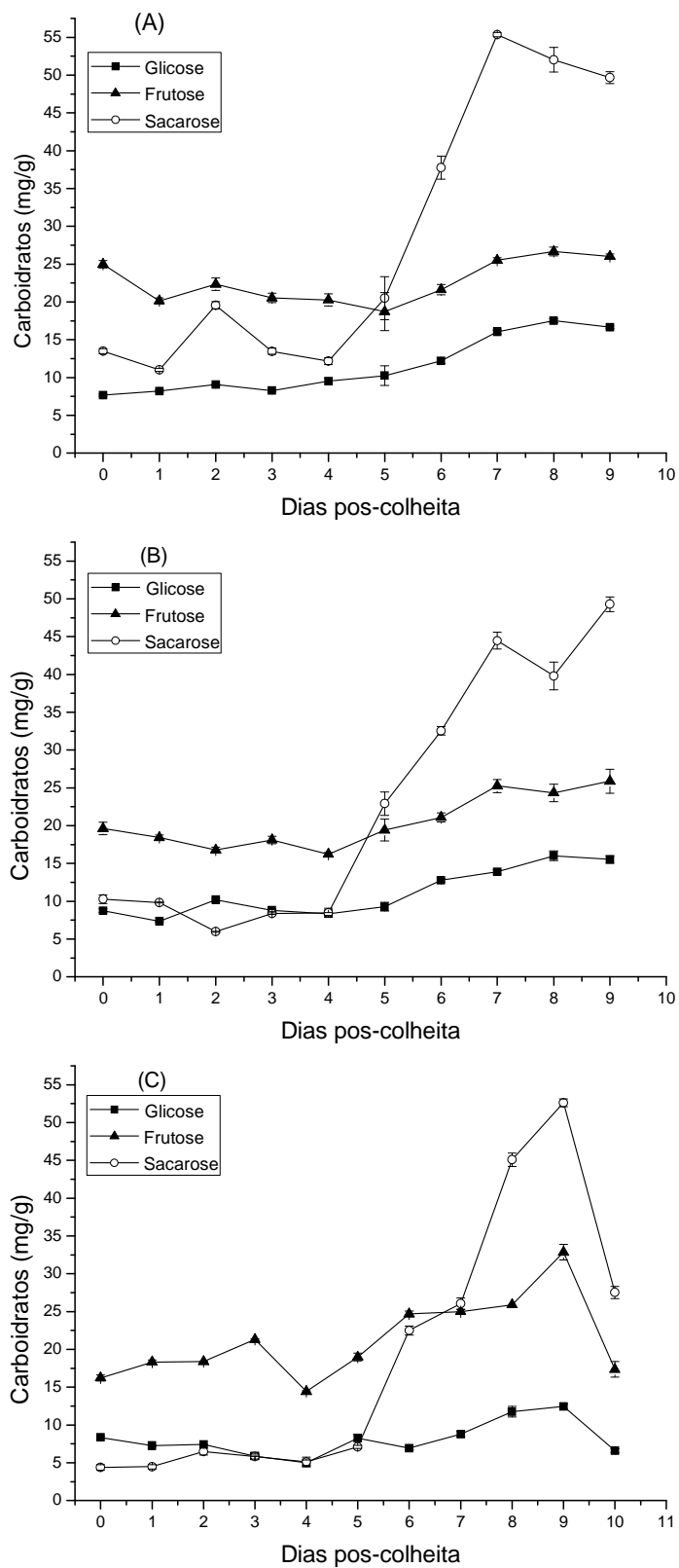


Figura 5. Perfis de açúcares solúveis durante o amadurecimento da manga Keitt de três diferentes amostras (A, B e C). Valores expressos pela $\langle \text{média} \rangle \pm \text{erro padrão}$, $n = 4$.

A análise dos açúcares solúveis (figuras 4 e 5) mostrou que durante o amadurecimento da manga Keitt houve acúmulo de glicose, frutose e sacarose, não sendo detectada a presença de outros açúcares pela metodologia aplicada. A sacarose foi o principal açúcar solúvel encontrado no fruto maduro e seu acúmulo se deu a partir do 4º dia pós-colheita. Já o menor teor de amido foi encontrado no 8º dia para as amostragens A e B, enquanto na amostragem C, no 10º dia (figura 4).

Os teores de amido e de açúcares totais, quando avaliados em conjunto ao longo do amadurecimento da manga Keitt, mostram de maneira gradual um aumento do teor de açúcares em concordância com a diminuição dos teores de amido, logo, o teor final de açúcares solúveis pode ser creditado ao carbono acumulado pelo fruto na forma de amido.

As análises físico-químicas mostraram que a cultivar Keitt apresentou típico comportamento climatérico durante o amadurecimento, apesar de não terem sido observadas alterações significativas da cor do fruto durante todo o período analisado.

As amostragens “A” e “B” foram satisfatórias, apesar de certa heterogeneidade dos frutos. Em relação aos perfis de respiração e produção de etileno, os valores foram superiores aos apresentados por Bernardes Silva (2004) e Koike (2007). Entretanto, um padrão se repetiu nas três análises: um pico de respiração antes do pico de etileno, em concordância com a descrição de Biale e Young (1981), que incluíram a manga no grupo de frutas as quais o etileno aumenta após o pico de CO₂. Já os teores de amido e de açúcares estão de acordo com os obtidos por esses autores e também por Simão e colaboradores (2008).

Apesar das eventuais diferenças entre as amostragens, isso não invalida seu uso nas análises dos perfis de proteínas, pois os dois estádios de maturação foram claramente identificados nos três experimentos, havendo, portanto, uma triplicata biológica, necessária para análise proteômica.

Assim, a partir dos resultados acima descritos, os frutos escolhidos para análises posteriores foram: aqueles amostrados no dia da colheita, para as amostras pré-climatéricas; e para as climatéricas, os frutos com as taxas de respiração próximas de seu pico, uma vez que as análises de açúcares solúveis já indicavam o completo amadurecimento, assim como a aparência da polpa dos frutos. Logo, para as três amostragens, o material relativo ao dia da colheita foi selecionado como

representante do período pré-climatérico e, para o período climatérico, o 7º dia pós-colheita para as amostragens “A” e “B”, e o 8º dia pós-colheita para amostragem “C”.

4.2 Extratos de proteínas

Os tecidos vegetais não são fontes abundantes de proteínas e contém altos níveis de proteases, enzimas oxidativas, polissacarídeos, lipídeos, compostos fenólicos e metabólitos secundários que interferem na extração, separação e identificação protéica. Dessa forma, o protocolo escolhido para extração deve ser otimizado de forma a ser reproduzível e seu extrato conter a maior diversidade de proteínas possível, reduzido número de contaminantes, além de evitar a degradação e modificação protéica (JORRÍN-NOVO *et al.*, 2009; WANG *et al.*, 2008; CARPENTIER *et al.*, 2005).

O método descrito por Carpentier e colaboradores (2005) utilizando fenol tris-tamponado como extrator e solução de acetato de amônio em metanol como precipitante mostrou-se eficiente para as amostras de manga após pequenos ajustes. Os três minutos descritos no método original não foram suficientes para separar completamente as fases orgânica e aquosa do veículo extrator e, além disso, a maior parte do tecido vegetal ficava retida na interface, dificultando a coleta na fase orgânica. Com a alteração do tempo de centrifugação para, no mínimo, 30 minutos, esse problema foi contornado. Com isso, chegou-se ao rendimento de aproximadamente 1 mg de proteínas extraídas para cada 1 g de tecido pulverizado. Esse rendimento equivale ao obtido nas extrações de mamão, após ajustes ao método, também realizadas em nosso laboratório (NOGUEIRA, 2010).

Para verificar a qualidade dos extratos protéicos, foi realizada a eletroforese SDS-PAGE como descrito no item 3.5 e revelado de acordo com o item 3.6. A figura 6 corresponde à imagem do gel contendo as amostras relativas às extrações dos três experimentos, onde podem ser observados perfis protéicos muito semelhantes entre elas, não havendo diferenças significativas quanto às bandas protéicas principais e suas respectivas mobilidades. As bandas estavam bem definidas, visíveis por toda extensão do gel, refletindo a extração de proteínas de diversos tamanhos. Não foram observadas estrias verticais ou outras alterações que sugeririam contaminação das amostras. Portanto, os extratos obtidos mostraram-se adequados para as análises posteriores.

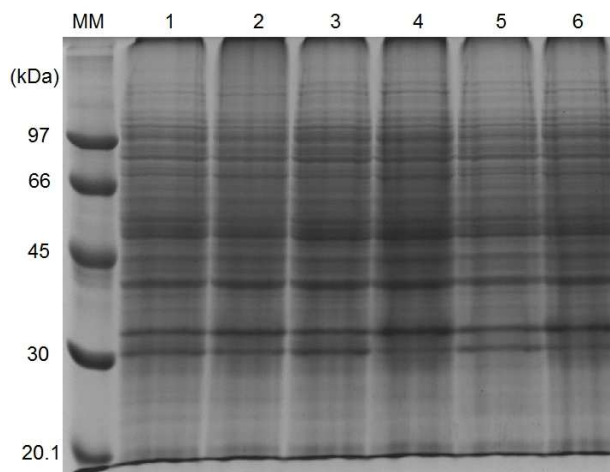


Figura 6. Eletroforese SDS-PAGE (10% poliacrilamida) dos extratos protéicos das amostras de mangas da cultivar Keitt. Amostras dos grupos pré-climatérico e climatérico respectivos às amostragens: “A”: poços 1 e 2, “B”: poços 3 e 4, “C”: poços 5 e 6. Os marcadores de massa molecular são representados por MM, expressos em kDa.

4.3 Obtenção dos mapas protéicos bidimensionais

Antes das análises propriamente ditas, os extratos foram submetidos a eletroforeses bidimensionais e o melhor perfil de separação foi obtido com aplicação de 100 µg de proteínas nas fitas de pH imobilizado de 7 cm de comprimento, focalização isoeétrica no intervalo de pH de 4 a 7 e mini-géis a 12,5% de acrilamida.

Os géis obtidos, corados de acordo com a metodologia descrita no item 3.6 de Materiais e Métodos, apresentaram *spots* com boa resolução, sem presença de estrias verticais e horizontais nos géis, além de perfis semelhantes nos respectivos grupos. A figura 7 mostra dois géis representativos dos perfis das amostras pré-climatérica e climatérica em corrida conjunta com marcadores de massa molecular. Os *spots* estão bem distribuídos ao longo da faixa de pH empregada e a maioria se encontra entre 97 kDa e 30 kDa. Nos dois grupos, observa-se uma grande quantidade de *spots* agrupados, porém definidos, na faixa de 66 kDa e também variações na intensidade nas regiões abaixo de 45 kDa.

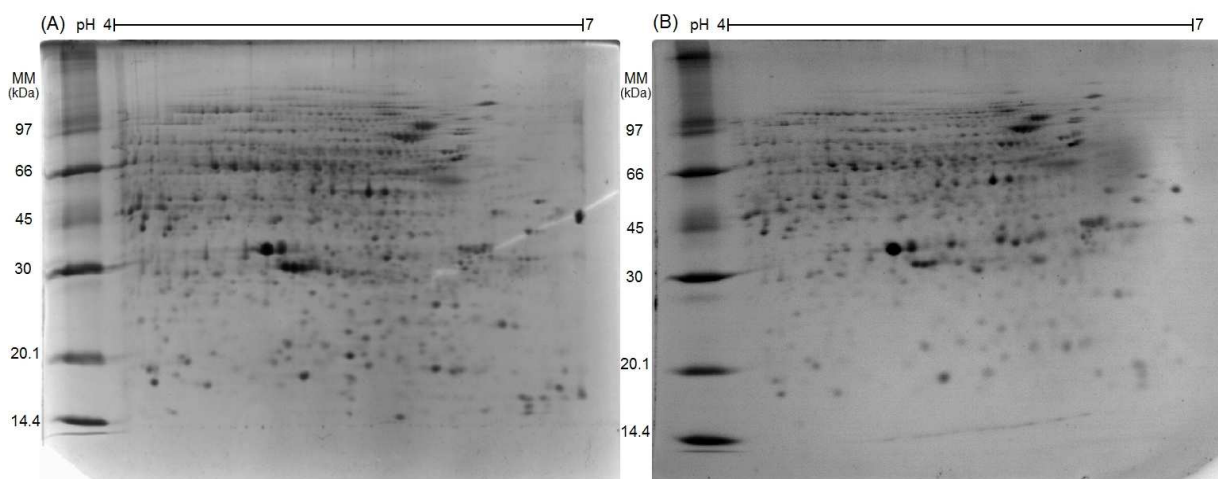


Figura 7. Perfis dos extratos protéicos das amostras de mangas da cultivar Keitt em 2D-PAGE (12,5% acrilamida). Imagens representativas dos grupos pré-climatérico (A) e climatérico (B). Marcadores de massa molecular estão representados por MM.

Nos métodos convencionais de estudos proteômicos as proteínas são visualizadas por técnicas de coloração não-específicas e depois de reveladas, as imagens são quantificadas por densitometria, sendo esperado que as diferenças na intensidade da coloração possam ser correlacionadas com as diferenças na quantidade de proteínas. Tal estratégia é frequentemente criticada por ser de baixo rendimento e apresentar grandes variações de gel para gel que complicam a análise das imagens.

Em um estudo anterior, Tonge e colaboradores (2001) consideraram que a 2-D DIGE é a tecnologia de ponta na detecção de proteínas de géis 2-D porque ela oferece a possibilidade única de padronização interna, reduz o número de géis que devem ser produzidos e sua quantificação é sensível. Além da análise das imagens, que é mais simplificada, a detecção de diferenças reais é substancialmente maior sobre os métodos existentes.

As cianidinas utilizadas na técnica DIGE satisfazem os requisitos necessários para que não haja alterações na mobilidade eletroforética relativa das proteínas durante a corrida. Entretanto, devido à hidrofobicidade dos fluoróforos, a reação de marcação pode causar alterações na solubilidade das proteínas durante a eletroforese (ÜNLU *et al.*, 1997). Para evitar estas e outras alterações como a precipitação protéica antes da entrada no gel, a purificação dos extratos faz-se

necessária, já que elimina sais, lipídeos, ácidos nucleicos, detergentes e outros interferentes.

Além disso, os fluoróforos são projetados para ter uma resposta linear na variação na concentração das proteínas oferecendo grande sensibilidade (BARBIER-BRYGOO, 2004). Entretanto, no estudo sobre a reprodutibilidade dos resultados na comparação entre pares de diferentes combinações de fluoróforos CyDye, Tonge e colaboradores (2001) revelaram que o marcador Cy2 é um fluoróforo fraco, com sinal mais próximo ao produzido pelo plano de fundo e também que a combinação Cy3 versus Cy5 era marginalmente menos variável e mais confiável do que outras combinações.

O sistema de marcação com dois fluoróforos (Cy3 e Cy5) foi, posteriormente, demonstrado por Karp e Lilley (2005) ser de maior reprodutibilidade e melhor custo-benefício para análises comparativas entre dois grupos de amostras, exigindo menor número de replicatas, evitando variações de um gel para outro e melhorando a confiabilidade dos resultados, com alta potência estatística.

Assim, para promover reprodutibilidade, além das três replicatas biológicas, duas replicatas experimentais foram executadas, maximizando a confiança das análises estatísticas. Para isto, 2 tiras de (7 cm pH 4-7) de cada uma das amostras pré-climatérica e climatérica das amostragens "A", "B" e "C, foram submetidas a focalização isoeétrica, totalizando 12 tiras. Para cada amostragem, foram realizadas 2 corridas eletroforéticas em géis SDS-PAGE de 24 cm de comprimento, totalizando 6 géis. Foram afixadas as tiras referentes aos períodos pré-climatérico e climatérico de cada amostragem em seus respectivos géis. Assim, com duas tiras em cada gel, evitou-se, a variação de gel para gel.

Ao fim do processo, as imagens de géis obtidas foram suficientes para utilização na análise comparativa de mapas protéicos utilizando dois fluoróforos e ainda foi um número superior ao mínimo de seis necessárias para atingir potência estatística de 0,8 (KARP e LILEY, 2005).

Imagens representativas dos géis em cada estágio, juntamente com seu respectivo padrão interno, podem ser observadas na figura 8.

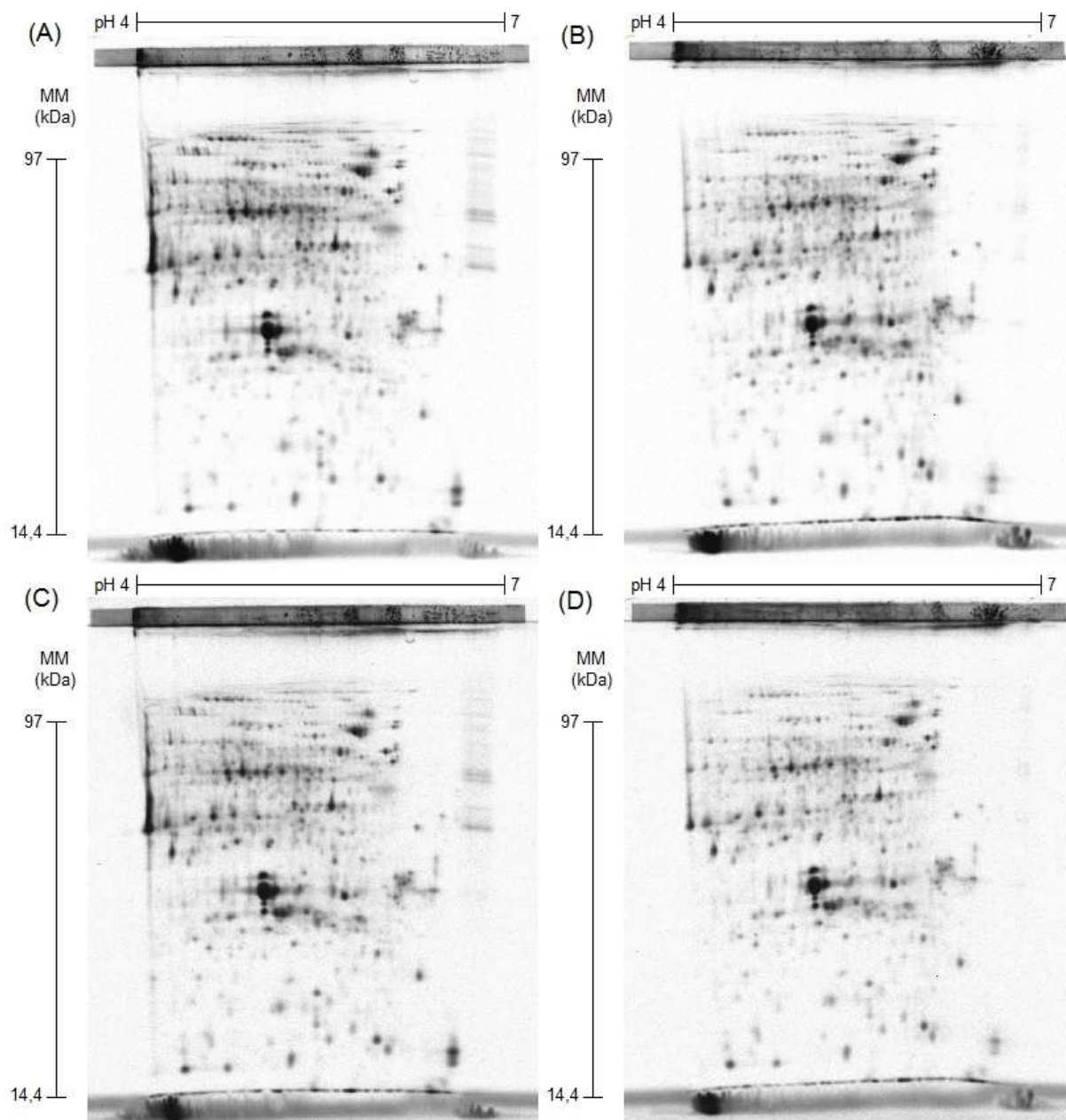


Figura 8. Imagens representativas de separações por 2D-DIGE dos extratos protéicos das amostras de mangas da cultivar Keitt. (A) Amostra pré-climatérica marcada com Cy5. (B) Amostra climatérica marcada com Cy5. (C) Padrão interno marcado com Cy3, relativo ao gel da imagem (A). (D) Padrão interno marcado com Cy3, relativo ao gel da imagem (B).

4.4 Análise diferencial dos *spots*

Foram detectados nas imagens, em média, 365 *spots*, dos quais 206 bem definidos, validados, normalizados e escolhidos para as análises.

Na análise qualitativa, são determinados os *spots* que foram detectados em um grupo e não no outro. Nesse trabalho, foram estimados os valores dos *spots* saturados que, na imagem gaussiana apresentam valor de intensidade igual a zero, não sendo quantificados por este método. Assim, quando essa opção foi selecionada, o valor total do pico do *spot* foi estimado e considerado na análise. Como resultado, três *spots* estavam presentes apenas no estádio pré-climatérico e dois *spots* no climatérico.

Para análise quantitativa, foram detectados 71 *spots* com variações de intensidade além do limite de 1,5 vezes, quando comparados com os respectivos valores de intensidade no grupo controle pré-climatérico. Destes, 36 *spots* apresentaram aumento de abundância superior a 50% e outros 35 *spots* apresentaram diminuição de expressão maior de 33% em relação ao grupo controle, incluindo os resultados da análise qualitativa.

Contudo, para que fossem selecionados apenas os *spots* com diferenças estatisticamente significativas, foi empregado o teste T de Student, com nível de significância de 95%, para que houvesse apenas 5% de probabilidade de erro. Esse teste comparou os valores médios de densidade óptica de um *spot* normalizado de um grupo de frutas com o outro. Os valores das intensidades médias destes *spots* estão descritos na tabela 2, onde a coluna SSP é o número de identificação do *spot* atribuído pelo *software*; as colunas “Climatéricas” e “Pré-climatéricas” correspondem às intensidades médias dos *spots* nos respectivos grupos de frutas; a coluna “Razão C/PC” indica as variações dos valores médios das intensidades dos *spots* no grupo “Climatérico” em relação ao “Pré-climatérico”; por fim, as letras sobrescritas indicam: “d”, *spots* com diminuição de abundância maior que 33%, “u”, *spots* com aumento de abundância acima de 50% e “s”, *spots* saturados. Nas tabelas, o valor exibido pela coluna “Razão C/PC” foi calculado pelo próprio *software* e, mesmo quando houve a detecção do *spot* em apenas um dos grupos, existe um valor especificado, porém, para melhor compreensão, foi omitido. Assim, quando aplicada a análise estatística, 47 *spots* dentre os 206 validados foram selecionados ($p < 0,05$) (tabela 2).

Tabela 2. Intensidade média dos *spots* selecionados pelo teste T ($p < 0,05$).

SSP	Pré-climatéricas	Climatéricas	Razão C/PC
0603 ^d	2054146,9	1121687,6	0,55
0604 ^d	1490985,0	698351,7	0,47
1302	3410328,5	2320752,3	0,68
1404	1556125,5	2053982,9	1,32
1502	1453758,5	914900,9	0,63
1601	845956,6	----	----
1604 ^d	1428689,6	781391,3	0,55
2305 ^d	6219019,0	4092114,8	0,66
2402	8007683,0	5958909,5	0,74
2403	----	2465979,8	----
2501 ^d	14703938,0	8862350,0	0,60
2502	4678601,0	3316771,3	0,71
2608	1163806,0	798318,8	0,69
3102 ^d	6142766,0	3226148,5	0,53
3204	29667840,0	21724376,0	0,73
3206	13863232,0	9383174,0	0,68
3301 ^d	2847433,5	1268102,6	0,45
3307	3934286,3	2943414,8	0,75
3311	3670303,5	----	----
3501	4428547,0	3072528,5	0,69
3502 ^d	4109346,5	2144447,8	0,52
3609	2298350,8	1586489,3	0,69
4602	842364,1	622875,2	0,74
5102 ^u	1159178,9	3000480,5	2,59
5202 ^u	3281670,8	20175172,0	6,15
5212 ^s	1108578,0	27290766,0	24,62
5305 ^u	1181662,5	2858001,8	2,42
5401	2230561,8	1777311,8	0,80
5603 ^d	1650765,0	982208,4	0,60
6105 ^d	4554220,0	2401726,8	0,53
6203 ^s	1673225,0	18668930,0	11,16
6205 ^u	8924183,0	15600867,0	1,75
6206	2900067,5	3333162,0	1,15
6301	2651699,0	2123363,8	0,80
6406 ^u	525000,3	927846,8	1,77

Tabela 2 (Continuação). Intensidade média dos *spots* selecionados pelo teste T ($p < 0,05$).

SSP	Pré-climatéricas	Climatéricas	Razão C/PC
6507	3755919,5	2566946,0	0,68
6605 ^u	5903131,5	10213502,0	1,73
7101	----	3859469,5	----
7202 ^u	1321984,4	12808663,0	9,69
7207 ^u	849621,2	8854491,0	10,42
7301	2130621,3	1629797,9	0,76
7402	1378579,9	2055448,5	1,49
7608	5699538,5	4329533,5	0,76
8103 ^u	4486176,0	7591305,0	1,69
8210 ^u	1816129,9	2835896,3	1,56
8303	2547525,0	2157513,5	0,85
9302	9611553,0	----	----

SSP: número de identificação do *spot*; **C:** coluna relativa ao valor de intensidade média do correspondente *spot* do grupo de frutas climatéricas; **PC:** coluna relativa ao valor de intensidade média do correspondente *spot* do grupo de frutas pré-climatéricas; **Razão C/PC:** calculada pelo *software PDQuest* (Bio-Rad) e omitida nos casos de *spots* presentes em apenas um dos grupos de frutas; **d:** *spots* selecionados pelo *software* com variação negativa (diminuição de abundância maior que 33% em relação ao período pré-climatérico); **u:** *spots* selecionados pelo *software* com variação positiva (aumento de abundância acima de 50% em relação ao período pré-climatérico); **s:** *spots* saturados, com valor de intensidade média estimado pelo *software PDQuest* (Bio-Rad).

Quando os resultados estatísticos foram intersectados com as análises quantitativa e qualitativa, observou-se que tanto os três *spots* presentes apenas no estádio pré-climatérico (1601, 3311 e 9302) e os dois *spots* do climatérico (2403 e 7101) foram, também, estatisticamente diferentes (tabela 2). Além disso, dentre os 71 que mostraram variações na intensidade fora dos limites de 1,5 vezes, o *software* indicou 20 *spots* com diferenças significativas, sendo 10 com aumento de expressão acima dos 50% e outros 10 com diminuição de expressão maior que 33%, em relação ao período pré-climatérico, excluindo os *spots* qualitativos, os saturados e os que estão nos limites marginais (tabela 2).

A figura 9 é uma imagem multicanal, na qual, utilizando recursos do *software*, duas imagens, representativas dos grupos de frutas, foram distorcidas e ajustadas para sobreposição e melhor visualização das alterações na abundância das

proteínas. Optou-se pela coloração azul para a imagem do grupo pré-climatérico e vermelha para a do grupo climatérico. Assim, quanto mais azulados os *spots*, mais abundantes nas frutas pré-climatéricas e, da mesma forma, quanto mais avermelhada, mais abundantes nas climatéricas. Quando as intensidades são intermediárias, um tom rosáceo pode ser visualizado, resultado da sobreposição dos tons azuis e vermelhos em iguais intensidades. Ainda na figura 9, são apontados os *spots* selecionados para identificação por espectrometria de massas.

O número de *spots* selecionados foi similar ao de outros trabalhos com frutos climatéricos. Utilizando a mesma tecnologia, Pedreschi e colaboradores (2009) encontraram 43 *spots* diferencialmente expressos na polpa de pêras submetidas a atmosferas específicas; Lara e colaboradores (2009) encontraram 52 *spots* no mesocarpo de pêssegos submetidos a tratamentos térmicos; porém, Renaut e colaboradores (2008) encontraram quase três vezes mais: 114 *spots* diferencialmente expressos em cascas de pêssegos. Esta variação encontrada nos experimentos depende não somente da amostra ou modelo biológico, mas também do *software*, do profissional, dos tratamentos aplicados, equipamentos e protocolos utilizados, etc., gerando resultados únicos para cada estudo (Karp e Lilley, 2005).

A maioria dos *spots* selecionados apresentou variações menores que 1,5 vezes em sua abundância, entretanto, foram estatisticamente validados, com 95% de confiança nos resultados. Sendo assim, todos os 47 *spots* selecionados pela análise estatística foram isolados de géis preparativos e foram submetidos à digestão com tripsina e sequenciados por espectrometria de massas.

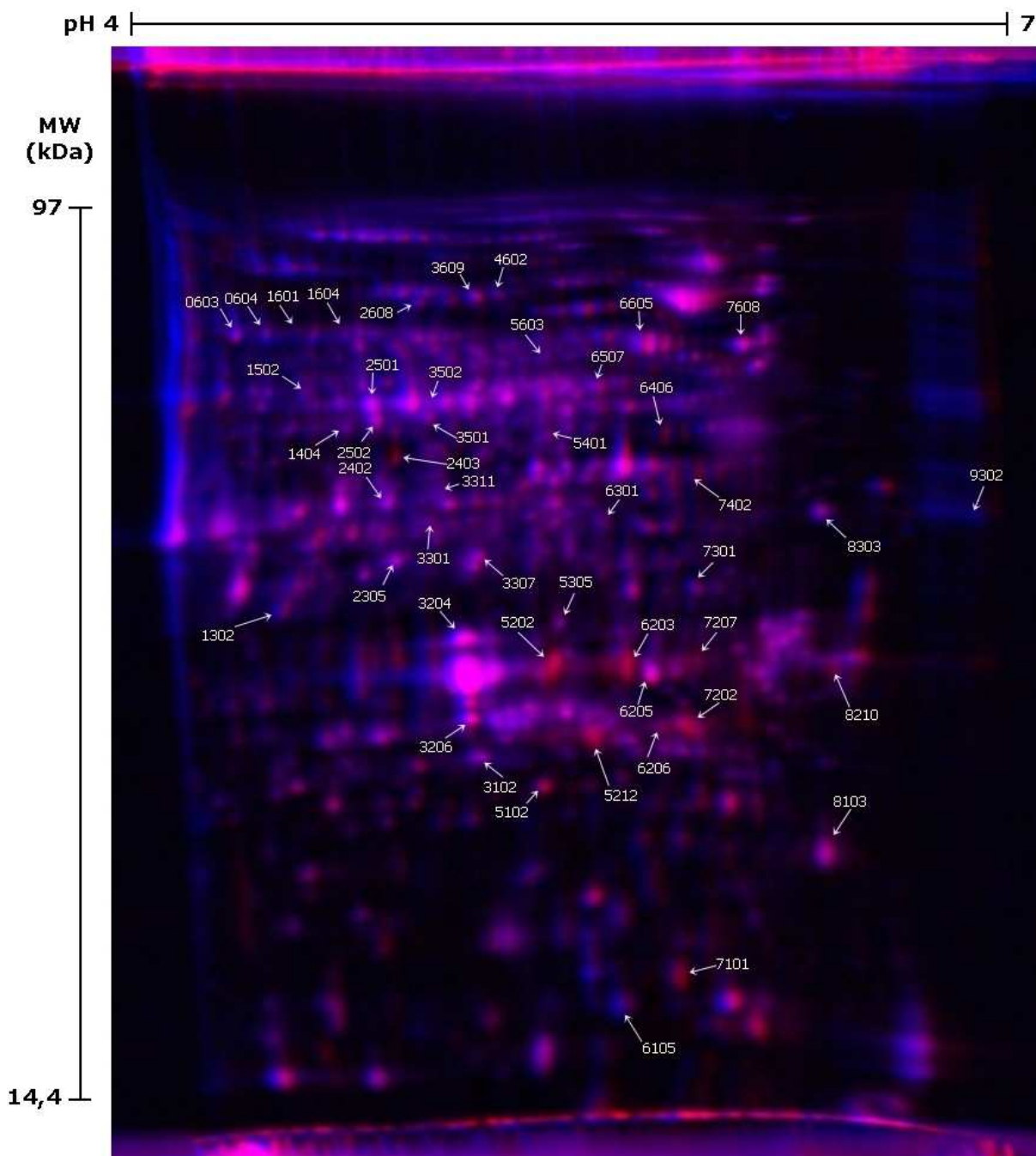


Figura 9. Gel 2D-DIGE com indicação dos spots de proteínas com variação de abundância durante o amadurecimento da manga. A imagem representativa do gel 2D-DIGE foi gerada pela combinação das imagens individuais de fluorescência de dois géis. Em cada gel foi aplicado o *pool* das amostras (marcado com Cy3) e o extrato de proteínas de mangas pré-climatéricas ou o de mangas climatéricas (marcado com Cy5). As imagens de fluorescência Cy5 dos dois géis foram combinadas, sendo arbitrariamente atribuída cor azul para representar a fluorescência derivada das proteínas da amostra de mangas pré-climatéricas e cor vermelha para a fluorescência das proteínas de mangas climatéricas. Os números no alto indicam a faixa de separação da focalização isoeétrica (pH 4-7) e à esquerda está indicada a posição dos marcadores de peso molecular (97 kDa a 14,4 kDa). As setas destacam os spots estatisticamente diferentes, selecionados pelo teste T de Student ($p < 0,05$), e identificados pelos respectivos números de identificação (SSP) gerados pelo *software* PDQuest (Bio-Rad). Intensidades médias descritas conforme tabela 2.

4.5 Sequenciamento das proteínas por espectrometria de massas

Os espectros resultantes do sequenciamento dos 47 spots por ESI-Q-TOF MS/MS foram analisados utilizando o software MASCOT e comparados com sequências depositadas na base de dados de proteínas NCBI atualizada em agosto de 2010 (11346708 sequências; 3868708671 resíduos).

Dentre os 47 *spots*, foram inferidas 58 proteínas diferentes e 2 isoformas, totalizando 60 identificações a partir dos peptídeos sequenciados, sendo 36 *spots* contendo apenas uma proteína e 11 *spots* com mistura de proteínas, como pode ser observado na tabela 3. Nela estão relacionadas: a descrição original da proteína obtida (como aparece na busca) e sua provável identidade, o número de acesso (gi), o organismo de origem da proteína com maior similaridade, o número de identificação do *spot* (SSP), a massa molecular (MM) experimental e teórica, o ponto isoelétrico experimental e previsto, a razão da intensidade média dos *spots* entre os grupos Climatérico/Pré-climatérico (proveniente da análise dos géis), a pontuação (*score*) do MASCOT, o número de consultas que correspondem à proteína (*Matches*) (entre parênteses, o número de consultas repetidas), o número de sequências de peptídeos correspondentes (entre parênteses o número de sequências repetidas), a porcentagem da sequência total protéica coberta e o número de acesso do gene que codifica a proteína homóloga em *Arabidopsis thaliana* (TAIR – www.arabidopsis.org).

Os pontos isoelétricos e massas moleculares experimentais foram calculados e comparados com os dados teóricos. A maioria dos *spots* identificados mostrou boa relação com a massa molecular teórica, com poucas discrepâncias que podem ser explicadas por modificações pós-transcrição, mobilidade eletroforética anormal ou mesmo apresentar massa molecular diferente para algumas proteínas de *Mangifera indica*.

De acordo com Aulak e colaboradores (2004) e Chandramouli e Qian (2009), é comum encontrar múltiplas proteínas ocupando o mesmo *spot* em um gel, problema que poderia ser contornado através da utilização de géis ainda maiores nas separações e intervalos de pH com faixas mais estreitas, aumentando a área de separação entre os *spots*, promovendo um “zoom” e aumentando a cobertura do mapa protéico.

Nos *spots* que apresentaram misturas de proteínas, foram identificados peptídeos ora de domínios conservados entre proteínas, ora específicos de outras classes protéicas, com perfis de mobilidades similares. Contudo, não se pode afirmar com certeza que todas as diferentes proteínas presentes em determinado *spot* têm sua abundância alterada, uma vez que não foi possível estabelecer quais dos peptídeos identificados exerceu maior influência na análise.

Tabela 3. Proteínas de *Mangifera indica* L. identificadas através da análise DIGE durante o amadurecimento do fruto.

SSP	Identidade provável da proteína	No. de acesso	Organismo	MM exp./teor. (kDa)	pl exp./prev.	Razão C/PC	Mascot Score	Matches	Sequências	Cobertura da Sequência	Homólogo em <i>Arabidopsis</i> (TAIR)
0603 ^d	Predicted protein (família da enzima málica)	gi 224142207	<i>Populus trichocarpa</i>	70,2 / 65,4	4,35 / 6,20	0,55	625	19(6)	11(5)	20%	AT1G79750
0604 ^d	Malic enzyme, putative (família da enzima málica)	gi 255546341	<i>Ricinus communis</i>	68,9 / 65,5	4,45 / 5,98	0,47	590	18(4)	11(2)	20%	AT5G25880
1302	Unknown (provável Esterase D / S-formilglutaciona hidrolase)	gi 255636647	<i>Glycine max</i>	37,8 / 30,1	4,50 / 6,65	0,68	279	9(5)	3(2)	16%	AT2G41530
1404	Os06g0192600 (provável ATPase – família AAA)	gi 115466876	<i>Oryza sativa</i> Japonica Group	54,8 / 48,6	4,73 / 6,03	1,32	671	14(2)	14(2)	37%	AT1G53750
1502	Aldehyde dehydrogenase, putative (aldeído desidrogenase)	gi 223550539	<i>Ricinus communis</i>	56,8 / 58,7	4,59 / 7,14	0,63	494	10(5)	8(4)	13%	AT3G48000
1601	PREDICTED: Malate dehydrogenase (NADP+) (superfamília málica)	gi 225445108	<i>Vitis vinifera</i>	68,9 / 65,7	4,56 / 6,27	----	489	16(4)	10(3)	16%	AT5G25880
1604 ^d	Phosphoglucomutase, putative (fosfoglicomutase)	gi 255573724	<i>Ricinus communis</i>	67,7 / 63,5	4,73 / 5,53	0,55	676	20(5)	13(5)	22%	AT1G23190

Tabela 3 (Continuação). Proteínas de *Mangifera indica* L. identificadas através da análise DIGE durante o amadurecimento do fruto.

SSP	Identidade provável da proteína	No. de acesso	Organismo	MM exp./teor. (kDa)	pl exp./prev.	Razão C/PC	Mascot Score	Matches	Sequências	Cobertura da Sequência	Homólogo em <i>Arabidopsis</i> (TAIR)
2305 ^d	Predicted protein (provável malato desidrogenase)	gi 224061310	<i>Populus trichocarpa</i>	41,3 / 35,7	4,91 / 8,53	0,66	359	5(3)	5(3)	14%	AT1G53240
2402	Cytosolic phosphoglycerate kinase (fosfoglicerato quinase)	gi 121485004	<i>Helianthus annuus</i>	46,8 / 42,3	4,88 / 5,82	0,74	890	21(9)	14(6)	34%	AT1G79550
2403	Alcohol dehydrogenase 3 (álcool desidrogenase)	gi 283826827	<i>Mangifera indica</i>	51,1 / 42,1	4,91 / 6,03	---	435	10(3)	9(3)	13%	AT1G77120
2501 ^d	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (subunidade grande de Rubisco)	gi 62902725	<i>Rinorea pubiflora</i>	58,3 / 51,9	4,83 / 6,00	0,60	1170	60(25)	20(10)	43%	ATCG00490
2502	PREDICTED: hypothetical protein (provável enolase)	gi 225455555	<i>Vitis vinifera</i>	55,8 / 48,3	4,85 / 6,17	0,71	1043	26(9)	15(7)	34%	AT2G36530
2608	Unknown (provável transketolase)	gi 118481093	<i>Populus trichocarpa</i>	71,4 / 80,9	4,99 / 6,29	0,69	531	14(4)	11(4)	19%	AT2G45290
3102 ^d	GroES chaperonin, putative (provável chaperonina cpn10)	gi 255550363	<i>Ricinus communis</i>	26,6 / 26,6	5,20 / 8,89	0,53	335	15(7)	5(3)	18%	AT5G20720

Tabela 3 (Continuação). Proteínas de *Mangifera indica* L. identificadas através da análise DIGE durante o amadurecimento do fruto.

SSP	Identidade provável da proteína	No. de acesso	Organismo	MM exp./teor. (kDa)	pl exp./prev.	Razão C/PC	Mascot Score	Matches	Sequências	Cobertura da Sequência	Homólogo em <i>Arabidopsis</i> (TAIR)
3204	Predicted protein (provável proteína da família Band 7)	gi 224140937	<i>Populus trichocarpa</i>	35,3 / 31,5	5,16 / 5,29	0,73	287	6(1)	6(1)	19%	AT5G62740
3206	Hypothetical protein SORBIDRAFT 03g006130 (provável triosefosfato isomerase)	gi 242052109	<i>Sorghum bicolor</i>	29,0 / 27,2	5,17 / 5,36	0,68	407	9(4)	6(3)	27%	AT3G55440
3206	Unknown (provável subunidade alfa tipo 3 de proteasoma)	gi 255641143	<i>Glycine max</i>	29,0 / 27,5	5,17 / 5,60	0,68	396	8(3)	6(3)	25%	AT2G27020
3301 ^d	Acyl-[Acyl-carrier-protein] desaturase / Stearoyl-CoA 9-desaturase (provável esteroil-ACP desaturase)	gi 15224342	<i>Arabidopsis thaliana</i>	44,3 / 45,8	5,04 / 6,05	0,45	451	14(3)	9(3)	23%	AT2G43710
3307	Predicted protein (provável enoil ACP redutase – proteína da superfamília NADB Rossmann – FabI)	gi 224053010	<i>Populus trichocarpa</i>	41,0 / 41,7	5,21 / 9,23	0,75	634	20(7)	10(5)	32%	AT2G05990
3311	Predicted protein (provável aspartate aminotransferase)	gi 224143258	<i>Populus trichocarpa</i>	48,0 / 51,1	5,08 / 8,67	----	843	18(6)	15(4)	30%	AT4G31990

Tabela 3 (Continuação). Proteínas de *Mangifera indica* L. identificadas através da análise DIGE durante o amadurecimento do fruto.

SSP	Identidade provável da proteína	No. de acesso	Organismo	MM exp./teor. (kDa)	pl exp./prev.	Razão C/PC	Mascot Score	Matches	Sequências	Cobertura da Sequência	Homólogo em <i>Arabidopsis</i> (TAIR)
3501	PREDICTED: hypothetical protein isoform 1 (provável S-adenosil-L-homocisteína hidrolase)	gi 225456806	<i>Vitis vinifera</i>	55,8 / 53,7	5,03 / 5,75	0,69	792	17(6)	13(6)	28%	AT4G13940
3502 ^d	ATPase subunit 1 (provável subunidade alfa de ATP sintase)	gi 295311633	<i>Citrullus lanatus</i>	58,8 / 55,6	5,03 / 6,02	0,52	1193	23(10)	19(8)	37%	ATMG01190
3609	Predicted protein (provável chaperona - HSP70 - Tetratric peptide repeat (TPR) profile)	gi 224125136	<i>Populus trichocarpa</i>	72,7 / 65,5	5,19 / 7,21	0,69	329	8(1)	8(1)	11%	AT4G12400
4602	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (subunidade grande de Rubisco)	gi 475734	<i>Juanulloa aurantiaca</i>	73,3 / 52,4	5,27 / 6,41	0,74	249	18(1)	7(1)	17%	ATCG00490
5102 ^u	Superoxide dismutase [Mn] (superóxido dismutase Mn)	gi 464775	<i>Hevea brasiliensis</i>	24,6 / 25,9	5,43 / 7,10	2,59	314	9(5)	5(2)	21%	AT3G10920
5202 ^u	Chitinase (quitinase)	gi 189014948	<i>Mangifera indica</i>	32,3 / 26,4	5,47 / 5,77	6,15	586	13(7)	8(5)	31%	AT3G54420

Tabela 3 (Continuação). Proteínas de *Mangifera indica* L. identificadas através da análise DIGE durante o amadurecimento do fruto.

SSP	Identidade provável da proteína	No. de acesso	Organismo	MM exp./teor. (kDa)	pl exp./prev.	Razão C/PC	Mascot Score	Matches	Sequências	Cobertura da Sequência	Homólogo em <i>Arabidopsis</i> (TAIR)
5212 ^s	Predicted protein (provável adenilato quinase)	gi 224136530	<i>Populus trichocarpa</i>	28,5 / 22,2	5,62 / 5,28	24,62	216	3(2)	3(2)	16%	AT5G26667
5212 ^s	Unknown (provável pirofosfatase inorgânica)	gi 224032889	<i>Zea mays</i>	28,5 / 23,1	5,62 / 5,39	24,62	163	4(0)	4(0)	21%	AT1G01050
5212 ^s	Thaumatococcus-like protein 1 (taumatina 1)	gi 25091401	<i>Pyrus pyrifolia</i>	28,5 / 26,2	5,62 / 5,07	24,62	89	3(2)	1(1)	4%	AT1G20030
5212 ^s	Dehydroascorbate reductase, putative (provável dehidroascorbato redutase)	gi 255588495	<i>Ricinus communis</i>	28,5 / 20,7	5,62 / 5,32	24,62	65	4(0)	2(0)	14%	AT5G16710
5305 ^u	Electron transfer flavoprotein-ubiquinone oxidoreductase, putative (provável flavoproteína-ubiquinona oxidoreductase transportadora de elétrons)	gi 255563713	<i>Ricinus communis</i>	35,6 / 38,0	5,49 / 5,44	2,42	299	8(3)	7(2)	22%	AT5G54770

Tabela 3 (Continuação). Proteínas de *Mangifera indica* L. identificadas através da análise DIGE durante o amadurecimento do fruto.

SSP	Identidade provável da proteína	No. de acesso	Organismo	MM exp./teor. (kDa)	pl exp./prev.	Razão C/PC	Mascot Score	Matches	Sequências	Cobertura da Sequência	Homólogo em <i>Arabidopsis</i> (TAIR)
5305 ^u	Cytochrome C peroxidase, mitochondrial precursor, putative (provável ascorbato peroxidase – Plant Heme)	gi 255558656	<i>Ricinus communis</i>	35,6 / 41,0	5,49 / 7,70	2,42	205	4(1)	4(1)	8%	AT1G77490
5401	S-adenosylmethionine synthetase 4 (AdoMet sintase)	gi 224130888	<i>Populus trichocarpa</i>	52,4 / 43,6	5,45 / 5,68	0,80	740	17(7)	12(6)	39%	AT4G01850
5603 ^d	Phosphoglycerate dehydrogenase (fosfoglicerato desidrogenase)	gi 211906486	<i>Gossypium hirsutum</i>	62,0 / 64,1	5,45 / 7,14	0,60	561	12(6)	11(6)	23%	AT4G34200
6105 ^d	Class II small heat shock protein Le-HSP17.6 (chaperona – HSP17.6)	gi 194466081	<i>Arachis hypogaea</i>	15,9 / 14,5	5,72 / 9,00	0,53	198	10(2)	3(2)	24%	AT5G12020
6203 ^s	Lactoylglutathione lyase, putative (provável lactatoilglutathione liase - Glioxalase 1)	gi 255546389	<i>Ricinus communis</i>	33,4 / 40,9	5,74 / 6,49	11,16	404	10(3)	8(3)	19%	AT1G67280
6205 ^u	Conserved hypothetical protein (desconhecida)	gi 255575139	<i>Ricinus communis</i>	32,6 / 22,3	5,82 / 5,67	1,75	207	8(3)	3(2)	15%	AT1G78780

Tabela 3 (Continuação). Proteínas de *Mangifera indica* L. identificadas através da análise DIGE durante o amadurecimento do fruto.

SSP	Identidade provável da proteína	No. de acesso	Organismo	MM exp./teor. (kDa)	pl exp./prev.	Razão C/PC	Mascot Score	Matches	Sequências	Cobertura da Sequência	Homólogo em Arabidopsis (TAIR)
6205 ^u	Absciscic acid response protein (provável proteína de resposta ao ácido abscísico)	gi 16660407	<i>Cucumis melo</i>	32,6 / 12,9	5,82 / 6.22	1,75	93	2(2)	1(1)	18%	---
6206	Predicted protein (provável dienolactona hidrolase e enzimas relacionadas)	gi 224131618	<i>Populus trichocarpa</i>	28,5 / 26,2	5,85 / 5.24	1,15	280	5(3)	4(3)	26%	AT2G32520
6206	Aluminum-induced protein (provável proteína induzida por Al da superfamília Wali7)	gi 238800460	<i>Cucumis hystrix</i>	28,5 / 25,6	5,85 / 6.08	1,15	87	2(0)	2(0)	6%	AT5G19140
6301	Photosystem II stability/assembly factor HCF136, chloroplast precursor, putative (provável HCF136 - fator de estabilidade do fotossistema II)	gi 255559812	<i>Ricinus communis</i>	43,2 / 43,4	5,65 / 7.11	0,80	220	4(1)	4(1)	9%	AT5G23120
6301	Cysteine Synthase, chloroplastic / chromoplastic (cisteína sintase)	gi 399333	<i>Capsicum annuum</i>	43,2 / 40,5	5,65 / 5.22	0,80	178	4(0)	4(0)	12%	AT3G59760

Tabela 3 (Continuação). Proteínas de *Mangifera indica* L. identificadas através da análise DIGE durante o amadurecimento do fruto.

SSP	Identidade provável da proteína	No. de acesso	Organismo	MM exp./teor. (kDa)	pl exp./prev.	Razão C/PC	Mascot Score	Matches	Sequências	Cobertura da Sequência	Homólogo em <i>Arabidopsis</i> (TAIR)
6301	Predicted protein (provável porfobilinogênio desaminase / hidroximetilbilano sintase)	gi 224081346	<i>Populus trichocarpa</i>	43,2 / 39,6	5,65 / 8,46	0,80	165	5(1)	4(1)	11%	AT5G08280
6406 ^u	Putative progesterone 5-beta-reductase (provável progesterona beta-5-reductase)	gi 295855158	<i>Calotropis procera</i>	58,3 / 44,2	5,86 / 5,33	1,77	78	4(0)	2(0)	2%	AT4G24220
6507	Hypothetical protein (provável subunidade beta de ATP sintase)	gi 147838606	<i>Vitis vinifera</i>	58,8 / 60,0	5,63 / 5,84	0,68	1159	28(13)	15(9)	37%	AT5G08680
6605 ^u	Rubisco large subunit-binding protein subunit beta, chloroplastic (subunidade beta de ligação a Rubisco-cpn60)	gi 2506277	<i>Pisum sativum</i>	64,2 / 63,3	5,80 / 5,85	1,73	1990	41(23)	23(16)	44%	AT5G56500
7101	Superoxide dismutase [Cu-Zn] (superóxido dismutase Cu-Zn)	gi 134682	<i>Solanum lycopersicum</i>	20,4 / 22,3	5,91 / 5,77	---	132	4(0)	3(0)	15%	AT2G28190
7101	Heat shock protein 17.3 (chaperona, HSP17.3)	gi 21807	<i>Triticum aestivum</i>	20,4 / 17,4	5,91 / 5,58	---	71	2(0)	2(0)	10%	AT5G12030

Tabela 3 (Continuação). Proteínas de *Mangifera indica* L. identificadas através da análise DIGE durante o amadurecimento do fruto.

SSP	Identidade provável da proteína	No. de acesso	Organismo	MM exp./teor. (kDa)	pl exp./prev.	Razão C/PC	Mascot Score	Matches	Sequências	Cobertura da Sequência	Homólogo em <i>Arabidopsis</i> (TAIR)
7202 ^u	Glutathione S-transferase (glutathiona S-transferase)	gi 37051105	<i>Pisum sativum</i>	28,8 / 26,8	5,94 / 4,97	9,69	175	4(0)	3(0)	11%	AT5G02790
7207 ^u	Alpha-soluble nsf attachment protein, putative (provável alfa-SNAP)	gi 255559601	<i>Ricinus communis</i>	33,1 / 32,9	5,97 / 5,12	10,42	149	4(0)	4(0)	11%	AT3G56190
7301	Putative DNA-damage-repair/toleration protein DRT 102 (provável proteína de reparo ao dano no DNA (DRT102))	gi 84468444	<i>Trifolium pratense</i>	41,3 / 33,3	5,98 / 5,22	0,76	282	7(3)	4(2)	11%	AT3G04880
7402	Predicted protein (provável transaldolase)	gi 224075445	<i>Populus trichocarpa</i>	47,6 / 47,7	5,98 / 6,38	1,49	707	15(6)	11(6)	26%	AT5G13420
7608	Predicted protein (provável chaperonina - subunidade alfa de ligação a Rubisco)	gi 224132004	<i>Populus trichocarpa</i>	64,2 / 62,2	6,14 / 5,16	0,76	1271	28(17)	16(12)	26%	AT2G28000
8103 ^u	Translationally-controlled tumor protein homolog; Short=TCTP (provável proteína de tumor controlada por tradução)	gi 9979196	<i>Hevea brasiliensis</i>	21,1 / 19,1	6,44 / 4,50	1,69	318	17(6)	4(4)	23%	AT3G16640

Tabela 3 (Continuação). Proteínas de *Mangifera indica* L. identificadas através da análise DIGE durante o amadurecimento do fruto.

SSP	Identidade provável da proteína	No. de acesso	Organismo	MM exp./teor. (kDa)	pI exp./prev.	Razão C/PC	Mascot Score	Matches	Sequências	Cobertura da Sequência	Homólogo em Arabidopsis (TAIR)
8210 ^u	Thaumatococin-like protein (taumatococina 2)	gi 260159572	<i>Pyrus x bretschneideri</i>	32,8 / 26,7	6,47 / 4,98	1,56	159	2(2)	2(2)	6%	AT1G20030
8210 ^u	Hypothetical protein (provável proteína da família 14-3-3)	gi 62149089	<i>Cucumis melo</i>	32,8 / 25,2	6,47 / 4,93	1,56	141	3(1)	3(1)	13%	AT1G35160
8210 ^u	Plastid-lipid-associated protein, chloroplastic (proteínas de plastídeos associadas a lipídeos)	gi 62900641	<i>Citrus unshiu</i>	32,8 / 35,3	6,47 / 5,24	1,56	124	3(1)	2(1)	6%	AT4G22240
8303	Late embryogenesis abundant protein Lea14-A, putative (provável LEA14)	gi 255585293	<i>Ricinus communis</i>	43,6 / 34,7	6,43 / 4,65	0,85	199	6(0)	5(0)	14%	AT2G44060
8303	Enoyl-ACP reductase (enoil ACP redutase)	gi 2653285	<i>Oryza sativa</i>	43,6 / 40,0	6,43 / 9,10	0,85	68	1(1)	1(1)	4%	AT2G05990
9302	Phosphoglycerate kinase (fosfoglicerato quinase)	gi 211906450	<i>Gossypium hirsutum</i>	39,9 / 42,3	6,95 / 5,97	----	290	6(4)	3(3)	11%	AT1G79550

SSP: número de identificação do spot; **MM:** massa molecular (exp.: experimental / teor.: teórica); **d:** spots selecionados pelo software com variação negativa (diminuição de expressão maior que 33% em relação ao período pré-climatérico); **u:** spots selecionados pelo software com variação positiva (aumento de expressão acima de 50% em relação ao período pré-climatérico); **s:** spots saturados; **pI:** ponto isoelétrico (exp.: experimental / prev.: previsto); **Razão C/PC:** razão entre os estádios climatérico (C) e pré-climatérico (PC) da intensidade média dos spots; **Mascot Score:** pontuação do Mascot; **Matches:** número de consultas correspondentes à proteína (entre parênteses, o número de consultas repetidas); **Sequências:** número de sequências de peptídeos correspondentes (entre parênteses o número de sequências repetidas).

4.6 Classificação funcional das proteínas

As proteínas identificadas foram classificadas de acordo com sua principal função biológica em categorias funcionais, a partir das informações exibidas nas bases de dados NCBI/CDD, PantherDB, ExPASy – UniProt/PROSITE, Gene Ontology (GO), EMBL-EBI Interpro e KEGG. A maior parte das proteínas identificadas participa de processos celulares de resposta ao estresse (oxidativo, causado por defesa a patógenos e estresse abiótico) e metabolismo (principalmente energético e biossínteses), como pode ser observado na figura 10.

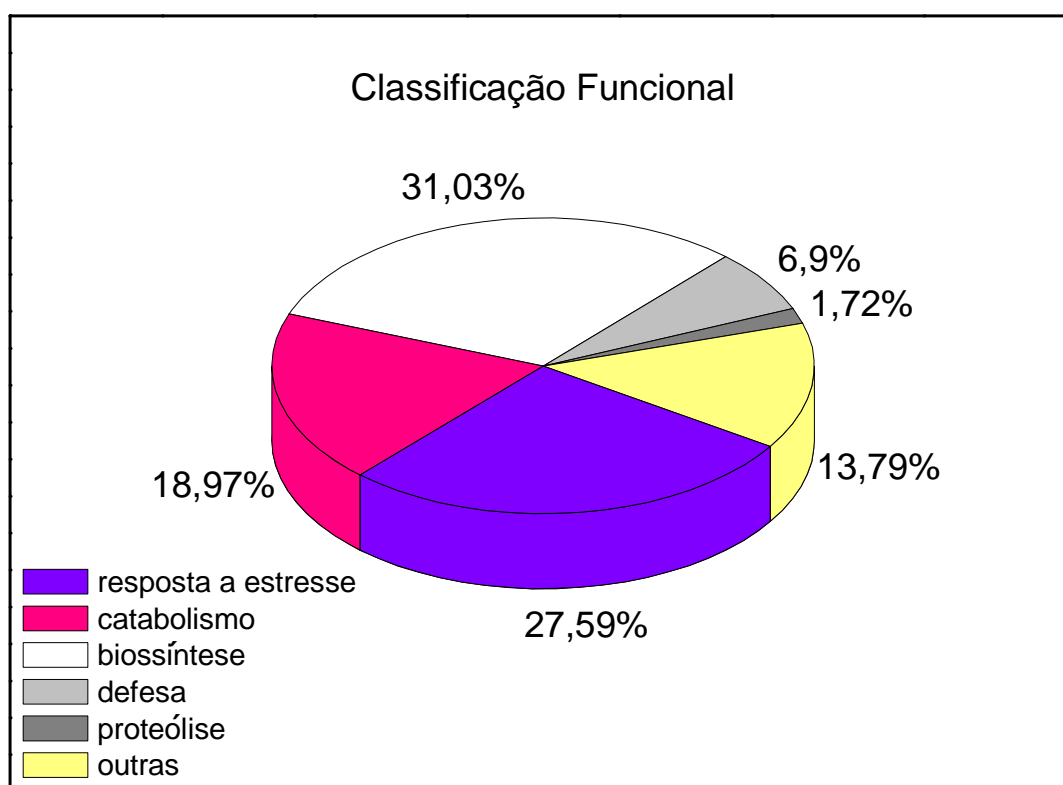


Figura 10. Classificação funcional das proteínas inferidas a partir da identificação dos peptídeos sequenciados dos *spots* com variação de abundância durante o amadurecimento.

Dentre as 60 identificações realizadas foram notadas 58 proteínas diferentes, sendo 34 (58,6%) com abundância aumentada no estágio pré-climatérico e 26 (44,8%) no climatérico. Durante o estágio pré-climatérico, os processos bioquímicos mais proeminentes foram os relacionados à biossíntese (53%), ao catabolismo (19%) e a resposta a estresse (19%); já no climatérico, evidenciou-se a resposta a estresse (38%), o catabolismo (19%) e mecanismos de defesa a agentes externos (12%).

4.6.1 Fixação de carbono

O maior número de *spots* de proteínas identificados como mais abundantes no estágio pré-climatérico está ligado a processos biossintéticos relacionados à fixação de carbono, produção de ácidos graxos e hormônios, já no climatérico, a biossíntese de metabólitos secundários.

A taxa de fotossíntese em folhas difere drasticamente da que ocorre em frutos. Durante o desenvolvimento e amadurecimento de frutos as trocas gasosas são bastante diminuídas em relação às folhas, e o decréscimo na permeabilidade da epiderme pode aumentar consideravelmente o aprisionamento de gases dentro de cavidades do fruto, dentre eles, o CO₂, podendo ter concentrações muito maiores do que a do ambiente externo (SMILLIE, 1991). O CO₂ é convertido a malato e ácido málico em diversos frutos e armazenado em vacúolos, podendo ser utilizado como substrato para processos celulares (BLANKE e LENZ, 1989) e, a partir da ação das enzimas málicas este CO₂ pode ser novamente disponibilizado e processado por mecanismos de fixação de carbono nos cloroplastos do fruto (SMILLIE, 1991). Algumas proteínas com maior abundância no estágio pré-climatérico relacionadas às enzimas málicas (EC 1.1.1.82; 1.1.1.37; 1.1.1.39; 1.1.1.40) foram identificadas nos *spots* 0603, 0604, 1601 e 2305. Os *spots* 0603 e 0604 apresentaram peptídeos da superfamília NADB Rossmann, comuns a uma infinidade de desidrogenases e enzimas óxido-redutoras presentes não apenas na fixação de carbono, mas também em processos metabólicos como a glicólise. Os peptídeos identificados nos *spots* 1601 e 2305 possuem maior similaridade à enzima malato desidrogenase. Por estarem amplamente distribuídas, essas proteínas podem ser encontradas no citosol, parede celular, cloroplastos, mitocôndrias e glioxissomas (figura 11).

O *spot* 3311 foi identificado como uma aspartato aminotransferase (EC 2.6.1.1 – figura 11), enzima que catalisa a reação de conversão de oxalacetato a aspartato durante a fixação de carbono, além de também atuar no metabolismo de diversos aminoácidos.

Quatro *spots* detectados foram identificados como outras duas enzimas relacionadas com a fixação de carbono nos cloroplastos durante o ciclo de Calvin (fase independente da luz): a subunidade grande da ribulose bisfosfato carboxilase (*Rubisco large subunit 1* – *spots* 2501 e 4602) (EC 4.1.1.39), que catalisa a etapa de

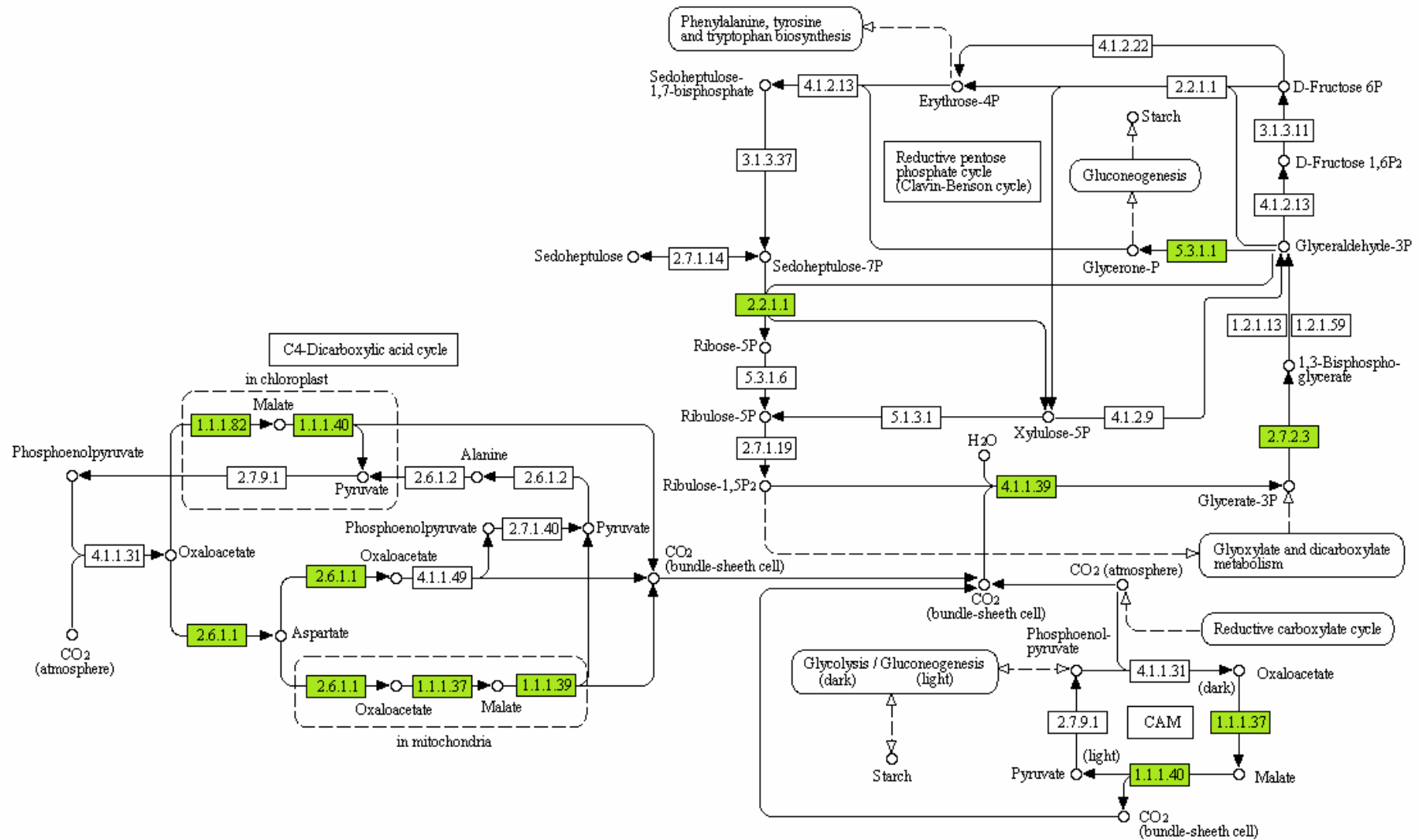


Figura 11: Fixação de Carbono em organismos fotossintéticos (Adaptado de Kegg Pathway ko00710). As enzimas catalizadoras de cada etapa do processo estão identificadas por seus números EC dentro dos retângulos. Os retângulos sem preenchimento não foram identificados e apenas ilustram e completam as outras etapas. Os retângulos destacados em verde indicam as enzimas identificadas em maior abundância no estágio pré-climático nas amostras de mangas da cultivar Keitt: EC 1.1.1.82; 1.1.1.37; 1.1.1.39; 1.1.1.40 – enzimas málicas/malato desidrogenase; EC 2.6.1.1 – aspartato aminotransferase; EC: 2.2.1.1 - trançetolase; EC: 2.7.2.3 – fosfoglicerato quinase; EC 4.1.1.39 – subunidade grande da Rubisco; EC: 5.3.1.1 – triosefosfato isomerase.

fixação primária do CO₂ formando o 3-fosfoglicerato; e a fosfoglicerato quinase (EC 2.7.2.3 – *spots* 2402 e 9302), que catalisa a transferência do grupo fosfato do ATP para a formação do composto 1,3-bisfosfoglicerato, etapa seguinte do ciclo (figura 11). De maneira oposta, a fosfoglicerato quinase atua na segunda fase da glicólise, liberando um ATP, durante a formação de piruvato (figura 12).

O *spot* 2608, correspondente a uma provável transcetolase (EC 2.2.1.1), enzima que também atua na transferência de grupos aldeído ou cetona durante os processos de fixação de carbono (figura 11) e também no catabolismo energético, na via das pentoses fosfato.

Outras três enzimas identificadas relacionadas com a fotossíntese e que também tem suas abundâncias diminuídas no período climatérico foram: a hidroximetilbilano sintase (EC 2.5.1.61), uma desaminase que atua na síntese de anéis tetrapirrólicos como a clorofila; um fator de estabilidade do fotosistema II (HCF136), localizada no tilacóide, sendo ambas as proteínas com peptídeos identificados no *spot* 6301; e triosefosfato isomerase (EC 5.3.1.1 – *spot* 3206), importante também em diversas reações do metabolismo de energético.

Todas essas enzimas citadas relacionadas à fixação de carbono tiveram suas abundâncias reduzidas no estágio climatérico, ou seja, ainda tinham sua abundância elevada logo após sua colheita. Esses resultados confirmam o achado de Chauhan e Pandey (1984) que observaram que a pequena taxa de assimilação de carbono nos frutos de mangas cv. Dashehari diminui ainda mais com o amadurecimento, quando comparadas com as taxas medidas nas folhas da planta. A diminuição da abundância dessas proteínas provavelmente está relacionada com a diferenciação dos cloroplastos em cromoplastos, uma vez que há uma breve mudança na cor da polpa de amarelo esverdeado a amarelo mais forte. Além disso, esta assimilação de carbono pelo fruto durante o período pré-climatérico pode contribuir com o breve aumento observado na síntese de amido nos primeiros dias após a colheita (figura 4 – perfis de degradação de amido), ocorrendo antes da diferenciação total dos cloroplastos em cromoplastos, ainda reflexo da possível atividade das enzimas de síntese atuantes nos frutos no momento em que estavam ligados a planta. Entretanto, mesmo esta contribuição sendo relativamente pequena, é importante para o período que se segue, já que os frutos dependerão do carboidrato armazenado para se suprir de energia.

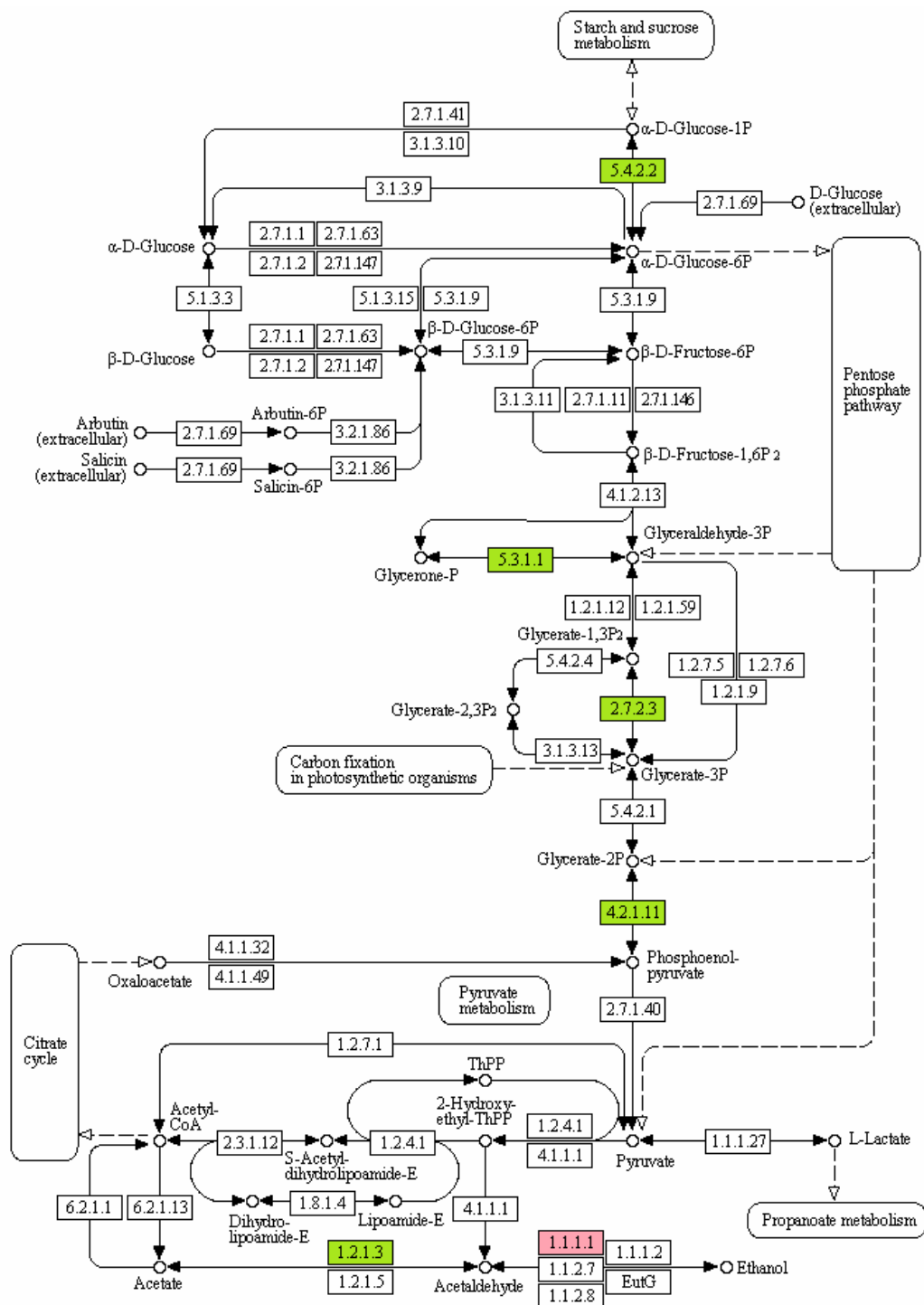


Figura 12: Glicólise e gliconeogênese (Adaptado de Kegg Pathway 00010). As enzimas catalizadoras de cada etapa do processo estão identificadas por seus números EC dentro dos retângulos. Os retângulos sem preenchimento não foram identificados e apenas ilustram e completam as outras etapas. Os retângulos destacados em verde indicam as enzimas identificadas em maior abundância no estágio pré-climático nas amostras de mangas da cultivar Keitt: EC 2.7.2.3 – fosfoglicerato quinase; EC 5.3.1.1 – triosefosfato isomerase; EC 5.4.2.2 – fosfoglicomutase; EC 4.2.1.11 – enolase; EC 1.2.1.3 – aldeído desidrogenase. O retângulo destacado em vermelho indica a enzima identificada em maior abundância no estágio climático: EC 1.1.1.1 – álcool desidrogenase.

4.6.2 Catabolismo energético

A glicólise é a via de degradação dos carboidratos na qual os monossacarídeos são fosforilados e transformados em ácido pirúvico, objetivando o fornecimento de energia química na forma de ATP para a célula. O ácido pirúvico formado é direcionado às vias oxidativas e, quando da baixa concentração de oxigênio, é transformado em acetaldeído (CHITARRA e CHITARRA, 2005).

Além de atuarem na assimilação de carbono, algumas das enzimas já citadas atuam também no catabolismo energético, como a triosefosfato isomerase (*spot* 3206) e fosfoglicerato quinase (*spots* 2402 e 9302). Outras enzimas com menor abundância no climatérico relacionadas ao catabolismo energético (figura 12) foram identificadas como a fosfoglicomutase (EC 5.4.2.2 – *spot* 1604), uma isomerase que atua na transferência de grupamento fosfato na conversão de glicose 1-P a glicose 6-P e na conversão de ribose-1P a ribose-5P, a enolase (EC 4.2.1.11 – *spot* 2502) e a aldeído desidrogenase (EC 1.2.1.3 – *spot* 1502), indicando que provavelmente durante o climatérico a glicólise não seja a via mais utilizada para a obtenção de ATP em mangas já que outras vias do metabolismo energético como o ciclo dos ácidos tricarbóxicos ou ciclo de Krebs, a via das pentoses-fosfato e a cadeia de transporte de elétrons também contribuem para o metabolismo energético durante a maturação dos frutos (CHITARRA e CHITARRA, 2005).

Krishnamurthy, Patwardhan e Subramanyam (1971) observaram que em mangas da cultivar Pairi, houve um acúmulo dos ácidos orgânicos oxo-glutárico e pirúvico, atingindo um pico de concentração em poucos dias após a colheita, sendo sua degradação iniciada concomitantemente com a maior produção de CO₂ durante o climatérico, sugerindo que a glicose solúvel proveniente da hidrólise do amido seria metabolizada a estes ácidos por outras vias metabólicas e então utilizados como substrato para as vias oxidativas, contribuindo assim para o pico respiratório.

Ainda no período pré-climatérico foram identificadas com abundância elevada subunidades dos tipos alfa e beta da família F1 (*spots* 3502 e 6507, respectivamente) de ATP sintase, ou ATPase, já caracterizadas em membranas internas de mitocôndrias e em tilacóides de cloroplastos.

Durante a cadeia de transporte de elétrons, as proteínas do complexo ATPase transferem os prótons da matriz mitocondrial para o espaço intermembrana em reações redox, criando um gradiente de prótons. Este gradiente de prótons leva

a produção de ATP, que ocorre quando eles retornam para a matriz através da formação de canais de íons pelo complexo F₀-F₁-ATPases. A F₀-ATPase é responsável pelo canal, permitindo que o fluxo passivo de prótons através da membrana diminua o gradiente eletroquímico e F₁-ATPase utiliza a energia liberada pelo transporte para sintetizar ATP a partir de ADP e fosfato inorgânico. A subunidade alfa de F₁-ATPase possui sítios de ligação com nucleotídeos, mas não é catalítica, função esta que é característica da subunidade beta (BALLMOOS, WIEDENMANN e DIMROTH, 2009; CAMPBELL, 2003).

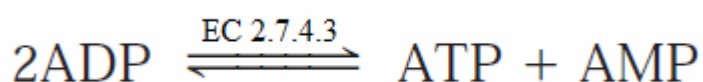
Em uvas foi observada uma diminuição da abundância da subunidade alfa e um aumento na subunidade beta de F₁-ATPase após o “*véraison*”, ocasião em que as mudanças do amadurecimento são observadas, sugerindo que algumas isoformas específicas de proteínas mitocondriais são expressas durante o amadurecimento (GARIBALDI *et al.*, 2007). Já em tomates, foi observado que níveis de mRNA de subunidades de ATPase mitocondrial continuam presentes em níveis elevados nos tomates maduros (PIECHULLA, 1988). Esses achados diferem com o resultado observado com mangas e, o fato dessas subunidades de ATPase mitocondriais e algumas outras proteínas que atuam na glicólise estarem com suas abundâncias reduzidas no climatérico, onde a necessidade de ATP é aparentemente maior, não indicam que houve deficiência na produção de ATP, pois, neste estágio, foram observadas outras proteínas com abundância elevada relacionadas às vias oxidativas do metabolismo energético, correspondendo aos *spots* 7402, 5305 e 5212, que podem contribuir para o aumento da respiração.

Na via das pentoses-fosfato, a transaldolase (EC 2.2.1.2 – *spot* 7402) atua na fase não-oxidativa das vias das pentoses-fosfato, catalisando de maneira reversível a conversão de gliceraldeído-3-fosfato a frutose-6-fosfato.

A flavoproteína-ubiquinona oxidoreductase transportadora de elétrons (ETFQO) (EC 1.5.5.1), que foi uma das proteínas identificadas no *spot* 5305, está presente na membrana mitocondrial e atua na cadeia de transporte de elétrons, onde transfere elétrons de uma flavoproteína da matriz mitocondrial para ubiquinona na membrana interna. As flavoproteínas transportadoras de elétrons (ETF) reduzidas são oxidadas por ETFQO, liberando elétrons para a cadeia respiratória via redução da ubiquinona em ubiquinol. O complexo ETF/ETFQO funciona como acceptor de elétrons de outras desidrogenases flavoprotéicas, atuando também no metabolismo de ácidos graxos (WATMOUGH e FRERMAN, 2010).

A pirofosfatase inorgânica (EC 3.6.1.1), uma das proteínas identificadas no *spot* 5212, com aumento de abundância estimado em 24,62 vezes, atua na fase final da cadeia de transporte de elétrons, hidrolizando um pirofosfato inorgânico (PPi) em dois íons fosfato em presença de cátion bivalente, e a energia liberada por esta reação é estimada ser metade da energia liberada na quebra um ATP (WEINER, STITT e HELDT, 1987).

A enzima adenilato quinase (EC 2.7.4.3), também foi identificada no *spot* saturado 5212, com provável aumento de abundância no climatérico, onde há extensa necessidade de ATP. Essa enzima é responsável pela catálise reversível de ADP em ATP e é essencial na manutenção dos níveis celulares de fosfato de adenosina, pois, após o fim da intensa demanda de ATP pela célula, ela pode reciclar o AMP convertendo-o em ADP, podendo este último ser fosforilado a ATP na mitocôndria (NELSON e COX, 2004), como pode ser observado na reação abaixo:



A enzima álcool desidrogenase (EC 1.1.1.1) foi identificada apenas no estágio climatérico (*spot* 2403) e pode estar relacionada com a síntese de compostos voláteis, uma vez que atua em diversos processos metabólicos promovendo a interconversão de aldeídos, álcoois e cetonas com a redução de NAD a NADH. Em estudo com melões, Manríquez e colaboradores (2006) observaram que diferentes genes que codificam este tipo de enzima foram expressos durante o climatérico e, quando inibidos os genes de ACC oxidase por *anti-sense* e as frutas tratadas com 1-MCP, a expressão dos genes de álcool desidrogenase e a atividade total da enzima foram inibidas, indicando sua regulação pela ação do etileno. Em mangas, os transcritos dos genes *MiADH1* e *MiADH2*, que codificam esta enzima, acumularam-se durante o amadurecimento e são induzidos através da ação dos hormônios etileno e ácido abscísico, de maneira independente (SINGH *et al.*, 2010); além disso, em tomates, genes de álcool desidrogenase parecem estar relacionados com o desenvolvimento de voláteis responsáveis pelo aroma e sabor (SPEIRS *et al.*, 1998) e no amolecimento do fruto (SPEIRS, CORRELL e CAIN, 2002).

4.6.3 Fitormônios

As enzimas málicas (estimuladas no estágio pré-climatérico - *spots* 0603, 0604, 1601 e 2305) atuam também no ciclo de Krebs, importante processo metabólico que promove o aumento da produção de ATP pela célula e também uma grande variedade de potenciais precursores na síntese de aminoácidos, bases nitrogenadas, porfirinas, pirimidinas, ácidos graxos e esteróis.

Medlicot e Thompson (1985) observaram que durante o amadurecimento de mangas Keitt ocorre redução nas concentrações dos ácidos cítrico e málico, que além de contribuir para a diminuição de acidez da polpa, podem ser convertidos a piruvato e a Acetil-CoA, precursor de ácidos graxos, produzidos ainda antes do climatérico. Apesar da ocorrência de pequenas quantidades de ácidos graxos na manga, essas moléculas são também ligadas à síntese de hormônios e voláteis relacionados com o aroma e sabor característicos do fruto (LITZ, 2009). As enzimas enoil-ACP-redutase (EC 1.3.1.9 – *spot* 8303 e provavelmente *spot* 3307) e estearoil-ACP desaturase (EC 1.14.19.1 / EC 1.14.19.2 – *spot* 3301) identificadas no período pré-climatérico, atuam na formação do ácido oléico (C18:Δ9), que participa na sinalização da defesa a estresses mediada pelos ácidos salicílico e jasmônico (KACHROO *et al.*, 2007). O ácido oléico, pode sofrer reduções até a formação da terceira insaturação da cadeia, constituindo o ácido α-linolênico (C18:Δ9,12,15), que está relacionado com a formação de compostos jasmonatos.

Em mutantes de *Arabidopsis thaliana*, nos quais o gene *ssi2* que codifica a proteína estearoil-ACP desaturase foi suprimido, a resposta da sinalização de defesa mediada por ácido jasmônico foi afetada, devido à diminuição de até 90% na atividade da enzima (GAO *et al.*, 2011).

O ácido jasmônico e metil-jasmonato são hormônios vegetais conhecidos por estarem envolvidos na regulação do crescimento, na resposta à injúria ou infecção por patógenos, na modulação da degradação da clorofila, na formação de antocianinas, no desenvolvimento de compostos aromáticos e na produção de etileno na fase pré-climatérica. Estas substâncias estão presentes em baixas concentrações em diversas partes vegetais, mas nos frutos, encontram-se aumentadas (CHITARA e CHITARA, 2005; KUBICKA e ZADERNOWSKI, 2007; LALEL *et al.*, 2003; FAN *et al.*, 1998, MAKKUN e SINGH, 2009).

Fan e colaboradores (1998) sugeriram que os compostos jasmonatos estão envolvidos, juntamente com o etileno, na regulação dos primeiros processos do amadurecimento de frutos climatéricos. Observaram que a concentração de jasmonatos endógenos diminui com a progressão do amadurecimento e que a aplicação exógena de metil-jasmonato aumentou a produção de etileno e as atividades de ACC oxidase e ACC sintase em discos de maçãs pré-climatéricas.

Em relação ao etileno, foram identificadas algumas enzimas diretamente relacionadas com a sua biossíntese, como a S-adenosil-metionina sintase, ou AdoMet sintase (EC 2.5.1.6), identificada no *spot* 5401 e a S-adenosil-L-homocisteína hidrolase (EC 3.3.1.1), no *spot* 3501, ambas com abundância reduzida no climatérico.

Durante a formação do etileno, a etapa limitante do processo é a conversão da S-adenosil-metionina (AdoMet) em ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC). O principal precursor de AdoMet é o aminoácido metionina, que em reação com ATP, catalisada pela enzima AdoMet sintase (*spot* 5401), transfere um grupamento S-adenosil para a metionina liberando um difosfato e um ortofosfato.

A enzima S-adenosil-L-homocisteína hidrolase (*spot* 3501) catalisa a hidrólise reversível de S-adenosil-L-homocisteína a adenosina e homocisteína. A S-adenosil-L-homocisteína é um potente inibidor competitivo da AdoMet (TURNER *et al.*, 2000), logo, essa hidrolase contribui com a promoção da síntese de etileno uma vez que a homocisteína produzida pode ser transformada em metionina por outras enzimas, contribuindo com o aumento da síntese do hormônio.

Ainda nesse ciclo, a enzima cisteína sintase (EC 2.5.1.47), uma das proteínas identificadas no *spot* 6301, com abundância diminuída no climatérico, promove o último passo para a síntese da cisteína. Este aminoácido tem a possibilidade de doar seu grupamento enxofre para formar metionina, através dos intermediários cistationa e homocisteína (BAUR e YANG, 1972).

Essas três enzimas contribuem para o processo de síntese autocatalítica do etileno, cuja rota bioquímica está representada na figura 13. Entretanto, elas apresentaram menor abundância no período climatérico, apesar da liberação do gás para o ambiente ter sido detectada após o pico respiratório. Este fato sugere que a síntese do hormônio ocorreria antes do ponto de detecção e seu excesso seria retido nos tecidos do fruto, tornando sua concentração interna muito superior à externa, suficiente para influenciar os processos celulares subsequentes. Com o

decorrer das alterações na textura da polpa e da casca, típicas de frutos maduros, facilitaria a liberação de gás de seu interior, sendo então detectado pela cromatografia gasosa.

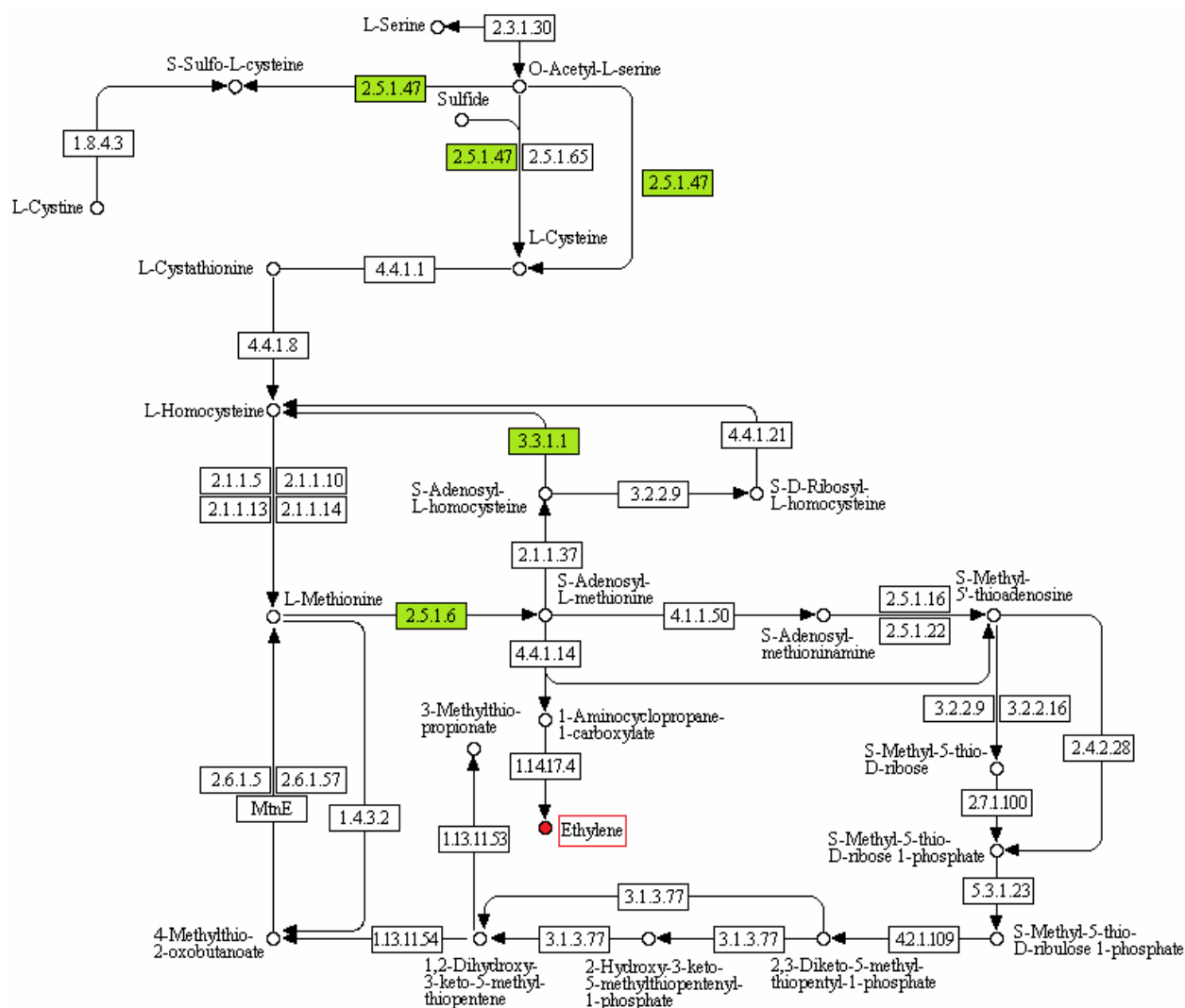


Figura 13. Síntese de etileno a partir do metabolismo dos aminoácidos cisteína e metionina. (Adaptado de KEGG Pathway ko00270, 2010). As enzimas catalizadoras de cada etapa do processo estão identificadas por seus números EC dentro dos retângulos. Os retângulos sem preenchimento não foram identificados e apenas ilustram e completam as outras etapas. Os retângulos destacados em verde indicam as enzimas identificadas em maior abundância no estágio pré-climatérico nas amostras de mangas da cultivar Keitt: EC 2.5.1.6 – AdoMet sintase; EC 3.3.1.1 – S-adenosil-L-homocisteína hidrolase; EC 2.5.1.47 – cisteína sintase.

4.6.4 Biossíntese de metabólitos secundários

A enzima progesterona beta-5 redutase (P5 β R - EC 1.3.1.3) aumentada no período climatérico, de acordo com a intensidade do *spot* 6406, supostamente atua na biossíntese de glicosídeos como 5-beta-cardenolídeos, a partir da redução de progesterona (BAUER *et al.*, 2010). Cardenolídeos são metabólitos secundários esteroidais, tóxicos, com sabor amargo, presentes em diversas angiospermas, muitas vezes utilizados na defesa contra estresses bióticos e abióticos (TAIZ e ZEIGER, 2002; HERL *et al.*, 2009; BAUER *et al.*, 2010).

Alguns processos biossintéticos levam ao acúmulo de metabólitos secundários sem função definida, ou inativos, como parte de um suposto metabolismo silencioso da planta, onde há enzimas que se ligam em diversos substratos dificultando seu real entendimento na fisiologia da planta (LEWINSOHN e GIJZEN, 2009). Bauer e colaboradores observaram que a estrutura dos sítios catalíticos da enzima P5 β R confirmou estudos anteriores de que progesterona não seria seu único substrato *in vivo*, e sugeriram que ela poderia atuar como um elemento de ligação entre diversas rotas metabólicas ou contribuir com o metabolismo silencioso da planta, uma vez que a função exata dessa enzima ainda não foi elucidada.

Em mangas, esta enzima pode ter também diversas funções fisiológicas, já que no estágio climatérico existe uma maior susceptibilidade a infestações de insetos e desenvolvimento de patógenos onde os supostos terpenos ou cardenolídeos produzidos defenderiam a fruta destes ataques.

4.6.5 Proteínas de defesa

Alterando suas condições fisiológicas, as plantas superiores se protegem de vários tipos de estresses como o ataque de patógenos, injúrias, aplicação de produtos químicos (incluindo hormônios e metais pesados), poluentes atmosféricos (ozônio e raios UV) e condições adversas de crescimento (BOWLES, 1990).

Durante o pré-climatérico, algumas enzimas do ciclo de Calvin (fotossíntese), presentes nos *spots* 2501, 4602, 2402 e 9302, foram observadas com sua abundância aumentada. Nesse ciclo, ou durante o metabolismo de compostos de um carbono, ou devido à ação de enzimas de oxidação nos peroxissomos, ou na

dissociação de metileno-tetrahidrofolato no citosol, entre outras vias, há a formação de quantidades significativas de formaldeído, uma molécula conhecida por reagir com grupamentos funcionais de proteínas e ácidos nucleicos, porém, também relacionada com a síntese de aminoácidos e na transdução de sinais relacionados à resposta a stress (TRÉZL *et al.*, 1997; IGAMBERDIEV, BYKOVA e KLECZKOWSKI, 1999; HANSON, GAGE e SHACHAR-HILL, 2000; KORDIC, CUMMINS e EDWARDS, 2001). Durante o processo de desintoxicação, o formaldeído se liga a glutathione reduzida, resultando na S-hidroximetilglutathione, que sofre oxidação pela enzima formaldeído desidrogenase dependente de NAD, formando a S-formilglutathione. A enzima S-formilglutathione hidrolase (EC 3.1.2.12), identificada no *spot* 1302, com maior abundância no período pré-climatérico, participa da última etapa deste processo, transformando a S-formilglutathione em ácido fórmico.

Algumas proteínas de proteção induzidas especificamente em situações patológicas são conhecidas como proteínas relacionadas à patogênese (proteínas PR) (BOWLES, 1990). As quitinases são um exemplo de proteínas PR. Estão presentes em diversos organismos, com funções variadas entre eles. Em animais e plantas, tem como função principal a defesa contra patógenos, contudo, também estão envolvidas em resposta a estresse e processos de crescimento e desenvolvimento (KASPRZEWSKA, 2003). Essa é uma classe de enzimas comumente presentes em tecidos vegetais, mesmo em plantas não produtoras de quitina (PANDIT *et al.*, 2010), sendo responsáveis pela quebra de ligações glicosídicas β 1-4 em resíduos de N-acetilglicosamina de seu principal substrato, a quitina. Esse composto está presente na parede celular de fungos, e sua hidrólise resulta no comprometimento de sua estrutura e consequente lise celular, ajudando na defesa da planta contra a infestação (WONG *et al.*, 2010).

Durante o climatérico, há maior susceptibilidade a infestação de patógenos devido a maior disponibilidade de açúcares, menor resistência física como consequência do amolecimento da polpa, entre outros fatores. O *spot* 5202, identificado como uma quitinase apresentou abundância 6,15 vezes maior no climatérico. Esse resultado concorda com o estudo conduzido por Pandit e colaboradores (2010), que observou que o gene que codifica a expressão da quitinase foi super-expresso durante o climatérico, determinando o estágio de maturação completa de mangas da cultivar Alphonso. Além disso, a ação hidrolítica desta enzima sobre glicoproteínas de parede celular contendo N-acetil-glicosamina

parece ser um facilitador do amolecimento do fruto, como consequência da ação do etileno, durante o climatérico (KASPRZEWSKA, 2003; PANDIT, 2010; ALI, CHIN e LAZAN, 2004). Contudo, embora diversos autores correlacionem esta proteína com processos de crescimento, desenvolvimento e maturação de frutos (ROBINSON, JACOBS e DRY, 1997; SARRY *et al.*, 2004, PANDIT, 2010), não se pode descartar que esta seja apenas uma resposta genérica ao estresse, induzida pelo aumento de etileno durante o climatério.

Taumatinas são proteínas relacionadas à patogênese e resposta ao estresse, mas também são expressas em alguns frutos na ausência de estresse (CLENDENNEN e MAY, 1997; FILS-LYCAON, *et al.*, 1996). Durante o amadurecimento, quitinases e taumatinas apresentaram elevados níveis de transcritos em banana (CLENDENNEN e MAY, 1997) e taumatinas em cereja (FIKS-LYCAON *et al.*, 1996). Entretanto, estes autores utilizaram amostras apresentando ausência de patógenos, e sugerem que estas proteínas possam também estar relacionadas com o próprio processo de amadurecimento dos frutos.

Em todas as regiões produtoras de manga no Brasil há ocorrência de diversas patologias, entre elas, a antracnose, causada pelo fungo *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. Esta doença é de difícil controle, afeta todas as partes da planta e possui grande dispersão dos esporos nos frutos, que, na maioria das vezes, já são comercializados infectados pelos esporos, que permanecem inativos até que se estabeleçam condições propícias para o desenvolvimento, que ocorre, na maioria dos casos, junto com o amadurecimento (LIMA *et al.*, 2007; CUNHA *et al.*, 2000; FISCHER, 2009). Em amostras climatéricas foram identificados dois *spots* correspondendo a proteínas do tipo taumatina: uma das proteínas do *spot* 5212 (taumatina-1) e o *spot* 8210 (taumatina-2), ambas de abundância aumentada neste período. Ainda que não houvesse sinais evidentes de contaminação dos tecidos, o aumento dessas proteínas pode ser parte da resposta à presença de fungos, ou de seus esporos, ainda latentes em todo o período estudado. Estes dois tipos de taumatinas foram também encontrados em estudo com pêssegos submetidos a estresse por frio, em que os autores sugeriram que estas proteínas podem estar relacionadas também com a proteção à injúria por frio (DAGAR, FRIEDMAN, LURIE, 2010).

4.6.6 Resposta a estresse

A maior parte das proteínas identificadas que apresentou variação durante o amadurecimento está relacionada ao estresse e a senescência. A proteção contra estresses oxidativos, bióticos e abióticos está relacionada com proteínas de vias antioxidantes e outras, como as chaperonas ou chaperoninas e as *heat shock proteins* (HSP) ou proteínas de choque térmico (WANG *et al.*, 2004; FAUROBERT *et al.*, 2007).

Chaperonas e HSPs estão presentes em diversas organelas e colaboram com o enovelamento, translocação e degradação de proteínas, estabilização de proteínas e membranas em processos celulares normais e também auxiliam no estabelecimento da conformação funcional da proteína durante o efeito de estresse (PAPP *et al.*, 2003; WANG *et al.*, 2004).

Diversas proteínas da classe das chaperonas e HSP foram identificadas durante os dois estádios estudados, sendo quatro mais abundantes no pré-climatérico e duas no climatérico.

A HSP70 (*spot* 3609), de maior abundância no pré-climatérico, é comumente relacionada a processos de re-enovelamento protéico, na degradação ou no reparo de polipeptídeos que desnaturam durante o estresse e na degradação proteolítica de proteínas instáveis, marcando essas proteínas para os lisossomos ou proteasomos (HARTL, 1996). Em um estudo com *Arabidopsis* geneticamente modificada, a expressão exacerbada de genes codificadores de HSP70 resultou em maior tolerância ao estresse por calor e contribuiu para o crescimento e desenvolvimento ótimo da planta, apesar do pequeno número de plantas transformadas que alcançaram o desenvolvimento pleno (SUNG e GUY, 2003).

A família das HSP de baixa massa molecular (sHSP) estão entre as mais encontradas em plantas. São relacionadas ao estresse e também são expressas em determinados estádios do desenvolvimento. Possuem alta capacidade de se ligar a outras proteínas, prevenindo a agregação e facilitando a ação de outras chaperonas dependentes de ATP no enovelamento (WANG *et al.*, 2004). Na análise dos perfis 2D de proteínas de mangas foram identificadas três sHSP, sendo uma da classe GroES (*spot* 3102) e uma HSP 17,6 (*spot* 6105), com diminuição de abundância acima de 33% no climatérico; e uma HSP 17,3 (*spot* 7101), ocorrendo apenas no estágio climatérico.

Chaperonas são também encontradas em bactérias e organismos eucariotos, contudo, nos cloroplastos de plantas superiores as chaperoninas de 60 kDa (cpn60 – família GroEL), possuem duas subunidades: alfa e beta, e uma co-chaperona (Cpn10 – família GroES), constituída de 2 moléculas ligadas em forma *head-to-tail*, formando uma só proteína de aproximadamente 20 kDa (VIITANEN *et al.*, 1995; WANG *et al.*, 2004). O *spot* 3102 parece corresponder a essa co-chaperona (Cpn10 – família GroES), que junto com a Cpn60 são comumente relacionadas ao correto enovelamento das subunidades de Rubisco (EC 4.1.1.39) (HARTL, 1996). As duas subunidades de cpn60 foram identificadas neste experimento, entretanto, para a subunidade alfa (*spot* 7608), foi notada maior abundância durante o período pré-climatérico, enquanto para a subunidade beta (*spot* 6605) foi notado aumento de 1,73 vezes no estádio climatérico.

Uma ATPase da família AAA+ contendo domínio P-loop NTPase foi identificada no *spot* 1404, aumentado durante o estádio climatérico. Esse domínio protéico está associado a diversas atividades celulares dependentes de energia e tem funcionalidade relacionada com chaperonas, subunidades de proteases, helicases em processos como regulação da homeostase celular, degradação protéica, fusões de membrana, transporte, biogênese de organelas, recombinação, replicação e reparo de DNA (SNIDER, THIBAUT e HOURS, 2008; LATTERICH e PATEL, 2002; LAKSHMINARAYAN *et al.*, 2003).

Em tomates, diversas chaperonas e HSPs são bastante induzidas durante os estádios *breaker* e maduros e estão provavelmente ligadas à prevenção da agregação protéica e renaturação de proteínas agregadas durante o estresse oxidativo sofrido pelo fruto (FAUROBERT *et al.*, 2007).

Os altos níveis de HSP70 e cpn60-alfa encontrados no pré-climatérico e de cpn60-beta no climatérico, bem como a diminuição da abundância da subunidade grande de Rubisco no climatérico (*spots* 2501 e 4206), podem também estar relacionados com a diferenciação de cloroplastos a cromoplastos. No estudo com *Narcissus pseudonarcissus*, durante a formação de suas flores, na diferenciação dos plastídeos em cromoplastos, houve um aumento na abundância das subunidades de cpn60 e HSP70, sendo proposto que essas proteínas são necessárias para que esse processo ocorra corretamente, levando ao acúmulo de carotenóides e degradação da clorofila (BONK *et al.*, 1996). De forma semelhante, em tomates ocorre degradação da subunidade grande da enzima Rubisco durante o

amadurecimento e altos níveis de cpn60-beta foram detectados nos cromoplastos (SCHMITZ, SCHIMIDT e FEIERABEND, 1996). Além disso, foram identificados no *spot* 8210 peptídeos de uma região conservada de proteínas de plastídeos associadas a lipídeos, comumente encontradas nas fibrilinas, com aumento no climatérico.

Fibrilinas desempenham um importante papel na estabilização de fibrilas de carotenóides, plastoglóbulos e tilacóides em plantas superiores (DERUÈRE *et al.*, 1994; POZUETA-ROMERO *et al.*, 1997), mas também já foram caracterizadas previamente como sendo proteínas relacionadas às respostas ao estresse abótico e a ação hormonal exercida pelo ácido abscísico (YANG *et al.*, 2006).

No sequenciamento do *spot* 6205 foram identificados peptídeos de duas proteínas distintas, uma suposta proteína de resposta ao ácido abscísico, homóloga à encontrada em melão, e outra desconhecida, de *Ricinus communis*. Contudo, o *spot* apresentou mobilidade eletroforética sugestiva de que a proteína presente possui massa molecular aparente e ponto isoelétrico diferentes de ambas as proteínas apontadas no sequenciamento. Além disso, os diferentes peptídeos identificados representaram 18% de cobertura da sequência encontrada no melão e 15% de cobertura da de *Ricinus communis*. Em uma busca não redundante de homólogas à proteína desconhecida de *Ricinus communis*, empregando o *software* BLAST, não foram identificados domínios conservados previstos, contudo, foi notada similaridade (93% *query coverage*) com outra proteína de *Arabidopsis thaliana*, supostamente envolvida na defesa contra patógenos, uma vez que o gene codificante mostrou-se regulado positivamente 48h após a inoculação de *Agrobacterium tumefaciens* (DITT *et al.*, 2006). Já o gene que codifica a proteína em melão, também codifica elementos de resposta a etileno (*ethylene-responsive element – ERE*), a baixas temperaturas (*low temperature responsive element – LTRE*) e a metais (*metal responsive element – MRE*), características indicativas de ser esse um gene de resposta ao estresse e a fatores do amadurecimento (HONG *et al.*, 2002).

Uma vez que estas proteínas se mostraram presentes no estágio maduro em mangas, e nesse estágio existe maior possibilidade de desenvolvimento de esporos de fungos e outros patógenos, estas proteínas poderiam estar relacionadas com a proteção e adaptação ao estresse biótico, ou ainda, como parte da resposta do próprio processo de amadurecimento, relacionado às mudanças nos níveis

hormonais, não limitadas ao etileno. A concentração aumentada do fitormônio ácido abscísico já foi evidenciada neste período em mangas da cultivar Keitt (KOIKE, 2007), evidenciando um envolvimento deste do hormônio no processo de amadurecimento do fruto.

A LEA-14 (*late embryogenesis abundant protein*) foi uma das proteínas identificadas no *spot* 8303, com abundância aumentada no estágio pré-climatérico, e está relacionada com a proteção contra o estresse provocado pela deficiência de água em tecidos vegetais e desidratação em sementes. Essas proteínas são acumuladas principalmente no citoplasma e em plastídeos, e são capazes de impedir a agregação protéica provocada pela dissecação em ensaios protéicos *in vitro* (SINGH *et al.*, 2005; GOYAL, WALTON e TUNNACLIFFE, 2005). Uma vez que depois de desligadas da planta-mãe os frutos não recebem mais água e nutrientes, essas proteínas poderiam estar envolvidas com a proteção ao estresse provocado pela colheita e pelo conseqüente aumento na perda de água através da transpiração.

4.6.7 Resposta a estresse oxidativo

O amadurecimento de frutos pode ser descrito como um processo oxidativo, onde ocorre o acúmulo de H_2O_2 , ânions superóxido e lipídeos peroxidados nas membranas. Esses processos envolvem espécies reativas de oxigênio (ROS), que podem rapidamente atacar diversos tipos de moléculas causando deterioração em membranas, peroxidação lipídica, danos em proteínas e ácidos nucléicos, podendo levar a morte celular. O acúmulo de ROS é controlado por meio de sistemas antioxidantes celulares (ROCCO *et al.*, 2006; JIMENEZ *et al.*, 2002). Contudo, essas substâncias reativas não são resultado apenas de reações endógenas, como a fotossíntese e respiração, mas também da exposição à radiação, a alguns compostos químicos reativos, ao estresse e ataque de patógenos, que também podem provocar o aparecimento de ROS (ROLDÁN-ARJONA e ARIZA, 2009).

Uma provável proteína de reparo ao dano no DNA (DRT102) foi identificada no *spot* 7301, que apresentou maior intensidade no estágio pré-climatérico. De acordo com PANG e colaboradores (1993) essa proteína está ligada à resistência da planta aos danos provocados especificamente por raios ultravioleta e pode estar evidenciada neste período devido à exposição das frutas à luz solar durante seu

desenvolvimento no campo que após a colheita foi bastante diminuída, uma vez que as frutas foram armazenadas em câmaras fechadas, com umidade e temperatura controladas, não sendo novamente expostas a radiação direta.

Enzimas associadas ao processo de proteção e captura de ROS, atuantes no ciclo glutatona-ascorbato, como a dehidroascorbato redutase (EC 1.8.5.1 – *spot* saturado 5212) e a ascorbato peroxidase (EC 1.11.1.11 – uma das identificações do *spot* 5305), também foram encontradas em maior abundância no estágio climatérico. Em plantas, a enzima ascorbato peroxidase é a principal responsável pela remoção de íons peróxido no citosol, mitocôndrias e cloroplastos (ROCCO, 2006) e o ciclo glutatona-ascorbato é tido como um dos mais importantes mecanismos antioxidantes nos cloroplastos (figura 14) (KWON *et al.*, 2003).

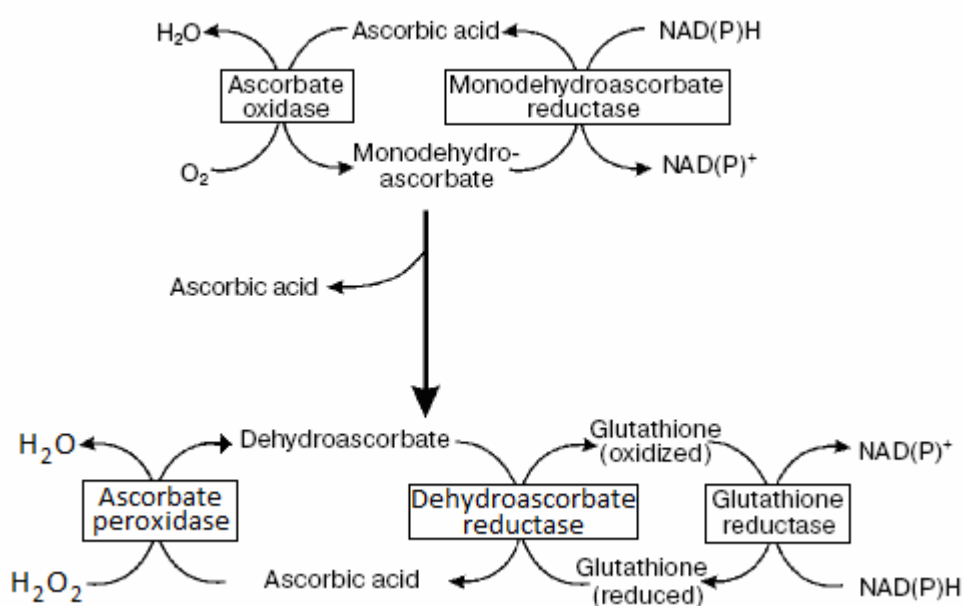


Figura 14. Ciclo glutatona-ascorbato. (Adaptado de JIANG e FELDMAN, 2005 e KEGG Pathway 00053). As enzimas catalizadoras de cada etapa do processo estão identificadas por seus nomes dentro dos retângulos. As enzimas ascorbato peroxidase (EC1.11.1.11) e dehidroascorbato redutase (EC 1.8.5.1) foram encontradas em maior abundância no climatérico. As outras enzimas apenas ilustram as outras etapas do ciclo.

A enzima superóxido dismutase (*spots* 5102 (Mn) e 7101 (Cu-Zn) – EC: 1.15.1.1) também foi identificada no estágio climatérico, sendo que a primeira isoforma apresentou abundância aumentada superior a 50%, enquanto a segunda foi exclusiva desse estágio de maturação. Em concordância com os resultados aqui obtidos, Jimenez e colaboradores (2002) observaram que, em tomates, os níveis de

mRNA que codificam a enzima superóxido dismutase citossólica [Cu-Zn] aumentaram durante a fase tardia do amadurecimento.

Também durante o período climatérico, a enzima lactoilglutaciona liase (glioxalase 1) (EC 4.4.1.5), identificada no *spot* saturado 6203, exibiu aumento de abundância de 11,6 vezes durante o amadurecimento. Esta enzima participa da primeira etapa do catabolismo do metilglioxal produzindo D-lactato, que é facilmente transformado em piruvato e deslocado para o metabolismo energético (figura 15). O metilglioxal é um produto indireto da glicólise e do metabolismo de aminoácidos, citotóxico e está envolvido na produção de ROS e na modificação de proteínas e DNA (KALAPOUS, 1999; YADAV *et al.*, 2005). Sob diferentes tipos de estresse, os níveis de metilglioxal apresentam-se aumentados em plantas mono e dicotiledôneas, sugerindo uma ligação entre esta substância e uma resposta genérica ao estresse (YADAV *et al.*, 2005; HOQUE *et al.*, 2010). Em estudo com maçãs, a aplicação exógena de metilglioxal bis-guanil hidrazona induziu a ativação dos genes *Md-ACS1* e *Md-ACO*, que codificam as enzimas ACC sintase e ACC oxidase, respectivamente, promovendo aumento na produção de etileno nestes frutos alguns dias depois do tratamento (PANG *et al.*, 2010).

Além desta enzima, também participa do processo de detoxificação de metilglioxal a enzima glutaciona S-transferase (EC 2.5.1.18), que catalisa a conjugação de uma infinidade de peróxidos e xenobióticos com o grupamento tiol da glutaciona (HOQUE *et al.*, 2010). Essa enzima foi identificada no *spot* 7202, com abundância aumentada em 9,69 vezes no amadurecimento, e, juntamente com as outras enzimas citadas anteriormente, parecem refletir uma adaptação dos tecidos da manga à presença aumentada de ROS neste período, provavelmente devido ao estresse oxidativo resultante do aumento da taxa respiratória durante o período.

4.6.8 Demais proteínas

No *spot* 3204, mais abundante no período pré-climatérico, foram identificados peptídeos pertencentes ao domínio *band 7* de função não muito definida, comumente encontrados em proteínas do tipo flotilina (reggie). Proteínas deste tipo são encontradas em membranas e estão envolvidas no tráfego vesicular e transdução de sinais, transporte de íons e transporte lipídico (LANGHORST,

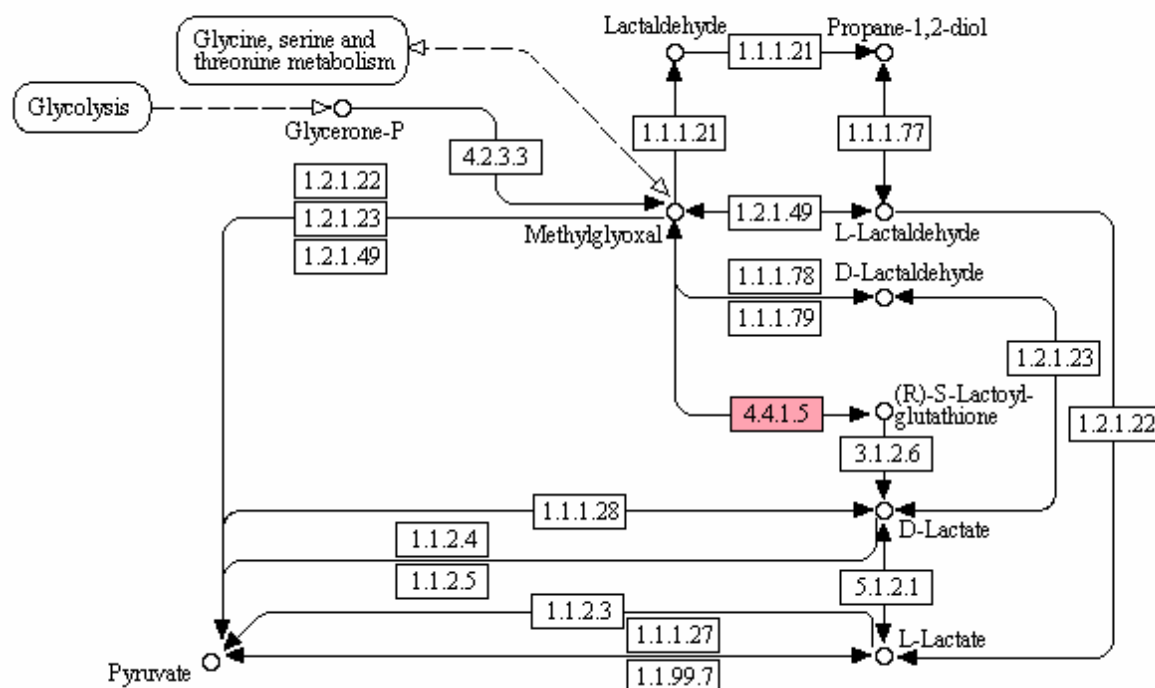


Figura 15. Metabolismo de metilglioxal (Adaptado de KEGG Pathway 00620). As enzimas catalizadoras de cada etapa do processo estão identificadas por seus números EC dentro dos retângulos. Os retângulos em azul não foram identificados e apenas ilustram e completam as outras etapas. O retângulo destacado em vermelho e branco indica que a enzima foi identificada em maior abundância no estágio climatérico nas amostras de mangas da cultivar Keitt: EC 4.4.1.5 – lactoilglutaciona liase (glioxalase 1).

REUTER e STUERMER, 2005). As proteínas dessa família foram observadas em membranas de vacúolos de cultura de células de *Arabidopsis thaliana* e acredita-se que possam estar envolvidas na resposta a estresse, ou ainda, atuar no controle da biogênese da membrana do tonoplasto ou na regulação de transportadores de metabólitos no tonoplasto (JAQUINOD *et al.*, 2007). Também em estudo com *Arabidopsis*, Tang e colaboradores (2008) observaram que essa proteína responde negativamente aos efeitos de brassinosteróides, que são um grupo de fitormônios reguladores do desenvolvimento e crescimento da planta e também estão envolvidos na adaptação a estresses bióticos e abióticos (SASSE, 2003).

Também na amostra de mangas pré-climatéricas foi identificada uma subunidade alfa do tipo 3 de proteassoma, pertencente a um complexo proteolítico encontrado no núcleo e no citoplasma de células eucarióticas, como uma das identificações do *spot* 3206. Essa subunidade alfa faz parte do proteassoma 20-S de aproximadamente 700 kDa que, junto com o complexo regulatório 19-S, compõe o

complexo 26-S, ainda maior, de 2000 kDa (COUX, TANAKA e GOLDBERG, 1996). Esse complexo ataca as proteínas-alvo, modificadas com ubiquitina após sua tradução, permitindo a alteração nos níveis protéicos da planta de forma a maximizar suas chances de sobrevivência sob as mais diversas circunstâncias. Além disso, participa do controle do ciclo celular, programação da morte celular e está relacionado com a modulação da percepção e resposta de hormônios (DREHER e CALLIS, 2007; HERSHKO e CHIECHANOVER, 1998; SANTNER e ESTELLE, 2010).

No trabalho de Kevany e colaboradores (2007), foi demonstrado que em tomates tratados com um inibidor do proteassoma (MG132), quando tratados com etileno, apresentaram níveis aumentados das proteínas do proteassoma. Além disso, esses autores observaram que a ligação do etileno com seus receptores era necessária para que ocorresse a posterior degradação proteolítica de seus receptores, evidenciando o fato de que este complexo proteolítico é modulado por ação hormonal. A ação proteolítica destes complexos, em mangas, poderia também estar relacionada com a diminuição do número de enzimas de síntese do etileno no climatérico, ainda que outras enzimas da síntese estivessem atuando com o máximo de suas atividades.

As proteínas da família 14-3-3 são fatores de regulação bastante difundidos em células eucarióticas. São capazes de se ligar a domínios fosforilados, inibindo-os, como no caso de algumas ATPases que atuam no transporte de prótons, como ocorre com as ATPases de parede celular (P-ATPase). A ligação de 14-3-3 a P-ATPases já foi descrita na adaptação de plantas ao estresse por frio (CHELYSHEVA *et al.*, 2000). Em mamão, Azevedo e colaboradores (2008) observaram um decréscimo na atividade de uma ATPase da membrana celular logo após o pico de etileno, que provavelmente está relacionado à redução da integridade da membrana, já que essa ATPase promove o transporte de prótons mantendo o gradiente eletrolítico da membrana. A diminuição de sua atividade pode induzir ao colapso da membrana e morte celular. Entretanto sugere que isto aconteça em um grupo específico de células, influenciadas pelo pico de etileno. Na polpa de mangas climatéricas foi observado um aumento na abundância da proteína 14-3-3, identificada no *spot* 8210, fato que pode contribuir para a alteração da integridade das membranas e consequente diminuição de textura do fruto durante a senescência.

Foram identificados peptídeos relativos a duas proteínas diferentes no *spot* 6206, sendo um domínio desconhecido, de sequência prevista em *Populus trichocarpa* (submetida ao NCBI em 2006), e um segundo domínio, presente em *Wali7* encontrado em *Cucumis hystrix* (sequência submetida ao NCBI em 2009). O primeiro domínio estaria provavelmente relacionado com a dienolactona hidrolase (EC 3.1.1.5), envolvida no metabolismo de compostos cloroaromáticos em bactérias (LIU, OGAWA e MIYASHITA, 2001), comumente utilizados como pesticidas, enquanto o segundo seria de uma proteína de trigo, com função desconhecida, induzida por alumínio e com domínios similares a diversas outras enzimas (RICHARDS, SNOWDEN e GARDNER, 1994).

No *spot* 7207 foi identificada uma provável proteína de ligação alfa-solúvel sensível ao fator N-etil-maleimida (NSF) (*alpha-soluble NSF attachment protein*) ou alfa-SNAP, com a sequência prevista em *Ricinus communis* (submetida em 2008 ao NCBI), que, assim como aquela presente em batatas (BACHEM *et al.*, 2000), pode atuar no transporte e fusão de vesículas, como acontece nas isoformas de SNAPs de leveduras e mamíferos. Durante o climatérico, este processo pode estar intensificado, uma vez que provavelmente existe a necessidade de fusões de membranas e secreção de enzimas de degradação, por exemplo. Essa hipótese é compatível com a observação de que durante o amadurecimento esse *spot* apresentou aumento de 10,42 vezes.

Também com abundância aumentada, mas em menor escala, de apenas 1,69 vezes, foram identificados peptídeos de um domínio conservado de uma proteína de tumor controlada por tradução (*translationally-controlled tumor protein – TCTP*) no *spot* 8103. A respeito dessa proteína, encontrada abundantemente no látex de *Havea brasiliensis*, ainda que sua função não tenha sido totalmente esclarecida especula-se que possa ter um papel no ciclo celular devido ao alto grau de homologia entre TCTP de diferentes organismos (QIN *et al.*, 2010).

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A aplicação de uma abordagem de estudo assentada na análise proteômica diferencial das polpas de mangas (*Mangifera indica* L.) possibilitou a identificação de proteínas provavelmente implicadas em alterações moleculares que afetam a qualidade pós-colheita. Foram identificadas proteínas relacionadas com processos bioquímicos importantes, como a assimilação de carbono, o catabolismo energético, a resposta ao estresse e a defesa contra patógenos, dentre outras.

As mudanças observadas na abundância relativa das proteínas indicam uma diminuição das enzimas relacionadas à glicólise, em oposição a outras pertencentes a vias metabólicas oxidativas, o que é compatível com a idéia de atender à maior necessidade de energia durante o climatérico. Por outro lado, uma aparente incompatibilidade foi notada em relação à diminuição de enzimas relacionadas com a via de biossíntese de etileno, uma vez que foi observado um pico de produção desse hormônio, sugerindo que os mecanismos de regulação envolvidos podem ser mais complexos do que aparentam ou que as características dos tecidos do fruto afetem a permeabilidade do gás e a medida de sua liberação na pós-colheita.

A presença de proteínas de resposta ao estresse também foi evidenciada nos dois estádios estudados, entretanto, as proteínas ligadas à proteção contra espécies reativas de oxigênio e contra substâncias tóxicas, subprodutos do próprio metabolismo do fruto, foram mais abundantes no estádio climatérico. Da mesma forma, proteínas de defesa contra patógenos, como as taumatinas e quitinases, também estavam abundantes no estádio climatérico, apesar de não terem sido observados sinais de infestação dos tecidos. Uma vez que poderiam atuar na resposta à presença de fungos, ou de seus esporos ainda latentes, sua presença pode ser considerada nas estratégias voltadas para fortalecer as defesas do fruto, na prevenção contra ataque de patógenos. Por outro lado, em relação à firmeza da polpa e à suscetibilidade a danos mecânicos, as quitinases, capazes ainda de atuar sobre resíduos de N-acetil-glicosamina de glicoproteínas da parede celular, podem ser elementos a se considerar em eventuais intervenções voltadas para o controle do processo de amolecimento do fruto.

As técnicas empregadas neste trabalho permitiram identificar um conjunto de proteínas que pode ser de utilidade não apenas no desvendamento das bases bioquímicas da qualidade da manga, mas também servir como pontos de partida de

futuras investigações que podem levar ao aprimoramento do processo de conservação pós-colheita. Dessa forma, os resultados aqui apresentados constituem uma bem-sucedida experiência de aprofundar o entendimento acerca do metabolismo da manga durante o amadurecimento e abrem um leque de oportunidades para novos estudos relacionados à pós-colheita do fruto.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMET, M. Proteomics and Islet Research. In: **The Islets of Langerhans**. pp. 363-390. Ed. Springer. Holanda, 2010.

ALBA, R. *et al.* Transcriptome and selected metabolite analysis reveal multiple points of ethylene control during tomato fruit ripening. **The Plant Cell**, vol. 17, pp. 2954-2965, 2005.

ALI, Z. M.; CHIN, L-H.; LAZAN, H. A comparative study on wall degrading enzymes, pectin modifications and softening during ripening of selected tropical fruits. **Plant Science**, vol. 167, pp. 317-327, 2004.

ARGENTA, L.C; MATTHEIS, J.; FAN, X. Retardamento da maturação de maçãs 'Fuji' pelo tratamento com 1-MCP e manejo da temperatura. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.23, n.2, p.270-273, 2001.

ARGGOUT, X. *et al.* The genome of *Theobroma cacao*. **Nature Genetics**, vol. 43, pp. 101-108, 2011.

AULAK, K. S.; KOECK, T.; CRABB, J. W.; STUEHR, D. J. Proteomic Method for Identification of Tyrosine-Nitrated Proteins. **Methods in Molecular Biology**, vol. 279, pp. 151-165, 2004.

AWAD, M. **Fisiologia pós-colheita de frutos**. 1ª Ed. Nobel. São Paulo, 1993.

AZEVEDO, I. G.; OLIVEIRA, J. G.; SILVA, M. G.; PEREIRA, T.; CORRÊA, S. F.; VARGAS, H.; FAÇANHA, A. R. P-type H⁺-ATPases activity, membrane integrity, and apoplastic pH during papaya fruit ripening. **Postharvest Biology and Technology**, vol. 48, nº 2, pp. 242-247, 2008.

BACHEM, C. W. B. *et al.* Antisense suppression of a potato a-SNAP homologue leads to alterations in cellular development and assimilate distribution. **Plant Molecular Biology**, vol. 43, pp. 473-482, 2000.

BAGINSKY, S. Plant proteomics: Concepts, Applications, and novel strategies for data interpretation. **Mass Spectrometry Reviews**, vol. 28, pp. 93– 120, 2009.

BALLMOOS, C.; WIEDENMANN, A.; DIMROTH, P. Essentials for ATP Synthesis by F1F0 ATP Synthases. **Annu. Rev. Biochem.**, vol. 78, pp. 649-672, 2009.

BARBIER-BRYGOO, H. Introduction/Focus on plant proteomics. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 42, p. 913–917, 2004.

BASSINELLO, P. Z.; CORDENUNSI, B. R.; LAJOLO, F. M. Amylolytic activity in fruits: Comparison of different substrates and methods using banana as model. **J. Agric. Food Chem.**, vol 50, pp. 5781–5786, 2002.

BAUER, P. *et al.* Highly conserved progesterone 5 β -reductase genes (P5 β R) from 5-cardenolide-free and 5 β -cardenolide-producing angiosperms. **Phytochemistry**, vol. 71, pp. 1495-1505, 2010.

BERGMEYER, H. U. **Methods of enzymatic analysis**. 2 ed. New York: Academic Press, v. 3, p. 1212-1215, 1974.

BERNARDES SILVA, A. P. F, DO NASCIMENTO, J. R. O., LAJOLO, F. M., CORDENUNSI, B. R. Starch mobilization and sucrose accumulation in the pulp of keitt mangoes during postharvest ripening. **Journal of Food Biochemistry**, vol. 32, nº 3, pp. 384-395, 2008.

BERNARDES SILVA, A. P. F. **Perfil de carboidratos de diferentes cultivares de manga durante o desenvolvimento e amadurecimento**. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2000.

BERNARDES SILVA, A. P. F. **Caracterização química e enzimática do processo de adoçamento da manga Keitt**. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2004.

BERNARDES SILVA, A. P. F.; LAJOLO, F. M.; CORDENUNSI, B. R. Evolução dos teores de amido e açúcares durante o desenvolvimento e amadurecimento de diferentes cultivares de manga. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** v. 23, pp. 116-120, 2003.

BEYER, W. H. **CRC Standard Mathematical Tables**, 28a. ed. Editora CRC Press, Boca Raton, Florida, EUA, 1987. Citado por: WEISSTEIN, E. W. **Oblate Spheroid**. Disponível em: <<http://mathworld.wolfram.com>>. Acesso em: 25 fev. 2009.

BEZERRA, J. R. M. V.; QUEIROZ, A. J. M.; GASPARETTO, C. A. Reologia de polpa de manga e ajuste dos parâmetros reológicos em função da temperatura. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v.3, n.1, p.37-42, 2001.

BIANCO, L. *et al.* Strawberry proteome characterization and its regulation during fruit ripening and in different genotypes. **Journal of Proteomics**, vol. 72, pp. 586-607, 2009.

BLANKE, M. M. and LENZ, F. Fruit photosynthesis. **Plant, Cell & Environment**, nº 12, pp 31–46, 1989.

BONK, M.; TADROS, M.; VANDEKERCKHOVE, J.; AL-BABILI, S.; BEYER, P. Purification and characterization of chaperonin 60 and heat-shock protein 70 from chromoplasts of *Narcissus pseudonarcissus*. **Plant Physiology**, vol. 111, nº 3, pp. 931-939, 1996.

BORSANI, J. *et al.* Carbon metabolism of peach fruit after harvest: changes in enzymes involved in organic acid and sugar level modifications. **Journal of Experimental Botany**, vol. 60, nº 6, pp 1823-1837, 2009.

BOWLES, D. J. Defense-related proteins in higher plants. **Annu. Rev. Biochem.** vol. 59, pp. 873-907, 1990.

BRECHT, J. K.; YAHIA, E. M. Postharvest Physiology. In: LITZ, R. E. **The Mango: Botany, Production and Uses**. Cap. 14, pp. 484-528. 2ª Edição. CAB International. 2009.

BUTELLI, E. *et al.* Enrichment of tomato fruit with health-promoting anthocyanins by expression of select transcription factors. **Nature Biotech.**, vol. 26, nº 11, pp. 1301-1308, 2008.

CAMPBELL, M. K. **Bioquímica**. cap. 16, pp. 520-545. Editora Artmed, 3ª edição, 2003.

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**, vol. 5, pp. 2497-2507, 2005.

CARPENTIER, S. C.; WITTERS, E.; LAUKENS, K.; VAN ONCKELEN, H.; SWENNEN, R.; PANIS, B. Banana (*Musa ssp.*) as a model to study meristem proteome: acclimation to osmotic stress. **Proteomics**, vol. 7, nº 1, pp. 92-105, 2007.

CHANDRAMOULI, K.; QIAN, P-Y. Proteomics: Challenges, Techniques and Possibilities to Overcome Biological Sample Complexity. **Human Genomics and Proteomics**, vol. 2009, nº 239204, pp. 1-22, 2009.

CHANG, H.; BRUBACHER, M. G.; STRONG, W. Preventing Horizontal Streaks on 2-D gels. Bio-Rad Laboratories - Tips and Techniques. Ed: Alfred Nobel Drive, Hercules-CA, EUA, 2000.

CHAUHAN, P.S.; PANDEY, R.M. Relative ¹⁴C₂ fixation by leaves and fruits, and translocation of 14C-sucrose in mango. **Scientia Horticulturae**, vol 22, nº 1-2, pp. 121-128, 1984.

CHAVES, A. L. S.; MELLO-FARIAS, P. C. Ethylene and fruit ripening From illumination gas to the control of gene expression, more than a century of discoveries. **Genetics and Molecular Biology**, vol. 29, no. 3, pp. 508-515, 2006.

CHELYSHEVA, V. V.; SMOLENSKAYA, I. N.; TROFIMOVA, M. C.; BABAKOV, A. V.; MUROMTSEV, G. S. Role of the 14-3-3 proteins in theregulation of H⁺-ATPase activity in the plasma membrane of suspension-cultured sugar beet cells under cold stress. **FEBS Letters**, vol. 456, pp. 22-26, 1999.

CHEN, Y-F.; ETHERIDGE, N.; SCHALLER, G. E. Ethylene Signal Transduction. **Annals of Botany**. vol. 95, nº6, pp. 901-915, 2005.

CHITARRA, M. I. F.; CHITARRA, A. B. **Pós-colheita de frutos e hortaliças: fisiologia e manuseio**. 2ª Edição. Editora UFLA, 2005.

CLENDENNEN, S. K.; MAY, G. D. Differential gene expression in ripening banana fruit. **Plant Physiology**, vol. 115, pp. 463-469, 1997.

CONSIDINE, M. J.; DALEY, D. O.; WHELAN, J. The expression of alternative oxidase and uncoupling protein during fruit ripening in mango. **Plant Physiology**, vol. 126, pp. 1619-1629, 2001.

CORDENUNSI, B. R. **Síntese da sacarose no amadurecimento da banana: Envolvimento da sacarose sintase e sacarose fosfato sintase**. Tese (Doutorado

em Ciência dos Alimentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1989.

CORDENUNSI, B.R.; LAJOLO, F.M. Starch transformation during banana ripening: sucrose synthase and sucrose phosphate synthase. **J. Agric. Food Chem.**, Washington, v. 43, n. 2, pp. 347-351, 1995.

COUX, O.; TANAKA, K.; GOLDBERG, A. L. Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes. **Annual Review of Biochemistry**, vol. 65, pp. 801-847, 1996.

CRICK, F.H.C. The Central Dogma of Molecular Biology. **Nature**, vol. 227, pp. 561-563, 1970.

CULLIS, C. A. **Plant Genomics and Proteomics**. Ed. John Wiley & Sons. EUA, 2004.

DAGAR, A.; FRIEDMAN, H.; LURIE, S. Thaumatin-like proteins and their possible role in protection against chilling injury in peach fruit. **Postharvest Biology and Technology**, vol. 57, pp. 77-85, 2010).

DERUÈRE, J.; RÖMER, S.; D'HARLINGUE, A.; BACKHAUS, R. A.; KUNTZ, M.; CAMARA, B. Fibril assembly and carotenoid overaccumulation in chromoplasts: A model for supramolecular lipoprotein structures. **Plant Cell**, vol. 6, pp. 119–133, 1994.

DITT, R. F. *et al.* The *Arabidopsis thaliana* transcriptome in response to *Agrobacterium tumefaciens*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, vol. 19, nº 6, pp. 665-681, 2006.

DOLLHOJO, E. T. *et al.* Avaliação da qualidade de manga 'palmer' tratada com 1-metilciclopropeno e armazenada sob refrigeração e condição ambiente. **Rev. Bras. Frutic.**, Jaboticabal, vol. 31, nº 1, 2009.

DONG, L.; LURIE, S.; ZHOU, H.W. Effect of 1-methylcyclopropene on ripening of 'Canino' apricots and 'Royal Zee' plums. **Postharvest Biology and Technology**, vol. 24, nº 2, pp.135-145, 2002.

DREHER, K; CALLIS, J. Ubiquitin, Hormones and Biotic Stress in Plants. **Annals of Botany**, vol. 99, pp 787-822, 2007.

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Cultivo da Mangueira**. EMBRAPA Semi-árido, Sistemas de Produção, vol. 2, 2004. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Manga/CultivodaMangueira/index.htm>>. Acesso em: 24 jun. 2010.

EMPRESA BRALISEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – EMBRAPA, 2004. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Manga/CultivodaMangueira/colheita.htm>>. Acesso em: 03 fev. 2011.

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. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2007.

FABI, J. P.; PERONI, F. H. G.; GOMEZ, M. L. P. A. Papaya, Mango and Guava fruit metabolism during ripening: Postharvest changes affecting tropical fruit nutritional content and quality. **Fresh Produce**, vol. 4, nº 1, pp. 56-66, 2010.

FALEIRO, F. G.; PINTO, A. C. Q.; ROSSETTO, C. J.; FRAGA, L. M. S.; ANDRADE, S. R. M.; BELLON, G. **Avaliação da Origem de Variações Fenotípicas da Manga Keitt Cultivada em São Paulo com Base em Marcadores RAPD.** In: XVIII Congresso Brasileiro de Fruticultura, Florianópolis. Anais do XVIII Congresso Brasileiro de Fruticultura, 2004.

FAN, X.; ARGENTA, L.; MATTHEIS, J.P. Inhibition of ethylene action by 1-methylcyclopropene prolongs storage life of apricots. **Postharvest Biology and Technology**, vol. 20, nº 2, pp.135-142, 2000.

FAN, X.; MATTHEIS, J. P.; FELLMANN, J. K. A role for jasmonates in climacteric fruit ripening. **Planta**, vol.: 204, pp. 444-449, 1998.

FAO – Food and Agriculture Organisation of the United Nations. FAOSTAT Statistics data-base - agriculture. Rome, Italy. 2007.

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

FENNEMA, O. C. **Fennema's Food Chemistry.** 4ª Ed. Marcel Dekker, New York, 2007.

FILS-LYCAON, B. R.; WIERSMA, P. A.; EASTWELL, K. C.; SAUTIERE, P. A cherry protein and its gene, abundantly expressed in ripening fruit, have been identified as thaumatin-like. **Plant Physiology**, vol. 111, pp. 269-273, 1996.

FISCHER, I. H. *et al.* Doenças pós-colheita em variedades de manga cultivadas em Pindorama, São Paulo. **Rev. Bras. Frutic.**, Jaboticabal, vol. 31, nº. 2, 2009.

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

GAO, Q-M; VENUGOPAL, S.; NAVARRE, D.; KACHROO, A. Low 18-1-derived repression of jasmonic acid-inducible defense responses requires the WRKY50 and WRKY51 proteins. **Plant Physiology**, vol. 155, pp. 464-476, 2011.

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

GIOVANNONI, J. J. Genetic Regulation of Fruit Development and Ripening. **The Plant Cell**, vol. 16, pp. s170-s180, 2004.

GIOVANNONI, J. Molecular biology of fruit maturation and ripening. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.**, v. 52, p. 725-749, 2001.

GODOY, A.; MORITA, R. J.; CORDENUNSI, B. R.; LAJOLO, F. M.; NASCIMENTO, J. R. O. Expression analysis of a set of genes related to the ripening of banana and mangoes. **Braz. J. Plant Physiol.**, vol. 21, no. 4, 2009.

GÖRG, A. **2-D Electrophoresis: Principles and Methods**. GE Healthcare Handbooks. Amersham Biosciences UK Ltd. Buckinghamshire, Reino Unido, 2004.

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

HADFIELD, K. A.; DANG, M. G.; PECH, J. C.; BOUZAYEN, M.; BENNETT, A. B. Characterization of ripening-related cDNAs and their expression in ethylene-suppressed Charentais melon fruit. **Plant Physiology**, vol. 122, pp. 977-983, 2000.

HANSON, A.; GAGE, D. A.; SHACHAR-HILL, Y. Plant one-carbon metabolism and its engineering. **Trends in Plant Science**, vol. 5, pp. 206–213, 2000.

HARRIS, D.R.; SEBERRY, J.A.; WILLS, R.B.H.; SPOHR, L.J. Effect of fruit maturity on efficiency of 1-methylcyclopropene to delay the ripening of bananas. *Postharvest Biology and Technology*, vol. 20, n° 3, pp.303-308, 2000.

HARTL, F. U. Molecular chaperones in cellular protein folding. **Nature**, vol. 381, pp. 571-580, 1996.

HATZIMANIKATIS, V. Bioinformatics and Functional Genomics: Challenges and Opportunities, **AICHe Journal**, vol. 46, n° 12, 2340-2343, 2000.

HERSHKO, A.; CIECHANOVER, A. The Ubiquitin System. **Annual Review of Biochemistry**, vol. 67, pp. 425-479, 1998.

HONG, S-H.; KIM, I-J.; YANG, D. C.; CHUNG, W-I. Characterization of an abscisic acid responsive gene homologue from *Cucumis melo*. **Journal of Experimental Botany**, vol. 53, n° 378, pp. 2271-2272, 2002.

HOQUE, A.; URAJI, M.; BANU, M. N. A.; MORI, I. C.; NAKAMURA, Y.; MURATA, Y. The Effects of Methylglyoxal on Glutathione S-Transferase from *Nicotiana tabacum*. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, vol. 74, n° 10, pp. 2124-2126, 2010.

IGAMBERDIEV, A. U.; BYKOVA, N. V.; KLECZKOWSKI, L. A. Origins and metabolism of formate in higher plants. **Plant Physiol. Biochem.**, vol. 37, n°7/8, pp. 503-513, 1999.

JAQUINOD, M. *et al.* A proteomics dissection of *Arabidopsis thaliana* vacuoles isolated from cell culture. **Molecular & Cellular Proteomics**, vol. 6, pp. 394-412, 2007.

JIANG, K.; FELDMAN, L. J. Regulation of Root Apical Meristem Development. **Annu. Rev. Cell Dev. Biol.**, vol. 21, pp.485-509, 2005.

JIMENEZ, A.; CREISSEN, G.; KULAR, B.; FIRMIN, J.; ROBINSON, S.; VERHOEYEN, M.; MULLINEAUX, P. Changes in oxidative processes and components of the antioxidant system during tomato fruit ripening. **Planta**, vol. 214, pp. 751-758, 2002.

JIMENEZ, A.; GÓMEZ, J. M.; NAVARRO, E.; SEVILLA, F. Changes in the antioxidative systems in mitochondria during ripening of pepper fruits. **Plant Physiol. Biochem.**, vol. 40, pp. 515-520, 2002.

JORRÍN-NOVO, J. V. *et al.* Plant proteomics update (2007-2008): Second-generation proteomic techniques, and appropriate experimental design, and data analysis to fulfill MIAPE standards, increase plant proteome coverage and expand biological knowledge. **Journal of Proteomics**, vol. 72, pp. 285-314, 2009.

KACHROO *et al.* The Arabidopsis stearoyl-acyl carrier protein-desaturase family and the contribution of leaf isoforms to oleic acid synthesis. **Plant Mol. Biol.**, vol. 63, pp. 257-271, 2007.

KALAPOUS, M. P. Methylglyoxal in living organisms: Chemistry, biochemistry, toxicology and biological implications. **Toxicology Letters**, vol. 110, pp. 145-175, 1999.

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

KARP, N. A.; LILLEY, K. S. Maximising sensitivity for detecting changes in protein expression: Experimental design using minimal CyDyes. **Proteomics**, nº 5, pp. 3105-3115, 2005.

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

KATZ, E.; FON, M.; LEE, Y. J.; PHINNEY, B. S.; SADKA, A.; BLUMWALD, E. The citrus fruit proteome: insights into citrus fruit metabolism. **Planta**, vol. 226, pp. 989-1005, 2007.

KEVANY, B. M.; TIEMAN, D. M.; TAYLOR, M. G.; CIN, V. D.; KLEE, H. J. Ethylene receptor degradation controls the timing of ripening in tomato fruit. **The Plant Journal**, vol. 52, nº 3, pp. 458-467, 2007.

KOIKE, C. M. **Varição hormonal correlacionada à expressão de enzimas ligadas ao metabolismo do amido durante o desenvolvimento e amadurecimento da manga (*Mangifera indica* cv Keitt)**. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos). Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Universidade de São Paulo, 2007.

KORDIC, S.; CUMMINS, I.; EDWARDS, R. Cloning and Characterization of an S-Formylglutathione Hydrolase from *Arabidopsis thaliana*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, vol. 399, nº 2, pp. 232-238, 2002.

KWON, S-Y.; CHOI, S-M.; AHN, Y-O.; LEE, H-S.; LEE, H-B.; PARK, Y-M.; KWAK, S-S. Enhanced stress-tolerance of transgenic tobacco plants expressing a human dehydroascorbate reductase gene. **J. Plant Physiol.**, vol. 160, pp. 347-353, 2003.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature**, vol. 227, pp. 680-685, 1970.

LAKSHMINARAYAN, M. I.; LEIPE, D. D.; KOONIN, E. V.; ARAVIND, L. Evolutionary history and higher other classification of AAA+ ATPases. **Journal of Structural Biology**, vol. 146, pp. 11-31, 2004.

LANGHORST, M. F.; REUTER, A.; STUERMER, C. A. Scaffolding microdomains and beyond: the function of reggie/flotillin proteins. **Cellular and Molecular Life Sciences**, vol.63, pp. 2228-2240, 2005.

LARA, M. V. *et al.* Biochemical and proteomic analysis of 'Dixiland' peach fruit (*Prunus persica*) upon heat treatment. **Journal of Experimental Botany**, vol. 60, nº 15, pp. 4315-4333, 2009.

LATTERICH, M.; PATEL, S. The AAA team: related ATPases with diverse functions. **Trends in Cell Biology**, vol. 8, nº 2, pp. 65-71, 2008.

LAZAN, H.; ALI, Z. M.; SOH, J.; TALKAN, Z. The biochemical basis of differential ripening in mango. **Acta Horticulturae**, vol. 341, pp. 500-509, 1993. Citado por: BRECHT, J. K.; YAHIA, E. M. Postharvest Physiology. In: LITZ, R. E. **The Mango: Botany, Production and Uses**. Cap. 14, pp. 484-528. 2ª Edição. CAB International. 2009.

LEWINSOHN, E.; GIJZEN, M. Phytochemical diversity: The sounds of silent metabolism. **Plant Science**, vol. 176, nº 2, pp. 161-169, 2009.

LIMA, L. C.; DIAS, M. S. C.; CASTRO, M. V.; RIBEIRO JUNIOR, P. M.; SILVA, E. B. Controle da antracnose e qualidade de mangas (*Mangifera indica* L.) cv. Haden, após tratamento hidrotérmico e armazenamento refrigerado em atmosfera modificada. **Ciênc. agrotec.**, vol. 31, nº 2, pp. 298-304, 2007.

LIMA, M. A. C.; SILVA, A. L.; AZEVEDO, S. S. N.; SANTOS, P. S. **Rev. Bras. Frutic.**, vol. 28, nº 1, pp. 64-68, 2006.

LINCOLN, J. E.; FISHER, R. L. Regulation of Gene Expression by Ethylene in Wild-Type and *rin* Tomato (*Lycopersicon esculentum*) Fruit. **Plant Physiology**, vol. 88, pp. 370-374, 1988.

LITZ, R. E. **The Mango: Botany, Production and Uses**. 2ª Edição. CAB International. 2009.

LIU, S.; OGAWA, N.; MIYASHITA, K. The chlorocatechol degradative genes, *ffdT-CDEF*, of *Burkholderia* sp. Strain NK8 are involved in chlorobenzoate degradation and induced by chlorobenzoates and chlorocatechols. **Gene**, vol. 268, nº 1-2, pp. 207-214, 2001.

LIZADA, C. Mango, In: SEYMOUR, G.; TAYLOR, J. and TUCKER, G. **Biochemistry of fruit ripening**. London, cap. 8, p.255-271, 1993.

LONG, T. A.; BRADY, S. M.; BENFEY, P. N. System approaches to identifying gene regulatory networks in plants. **Annu. Rev. Cell Dev. Biol.**, vol. 24, pp. 81-103, 2008.

MANRÍQUEZ, D.; EL-SHARKAWY, I.; FLORES, F. B.; EL-YAHYAOU, F.; REGAD, F.; BOUZAYEN, M.; LATCHÉ, A.; PECH, J-C. Two highly divergent alcohol dehydrogenases of melon exhibit fruit ripening-specific expression and distinct biochemical characteristics. **Plant Molecular Biology**, vol. 61, pp. 675-685, 2006.

MEDLICOTT, A. P.; THOMPSON, A.K. Analysis of sugar and organic acids in ripening mango fruit (*Mangifera indica* var. Keitt) by high performance liquid chromatography. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, vol. 36, pp. 561–566, 1985

MERCADANTE, A. Z.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Effects of ripening, cultivar differences and processing on the carotenoid composition of mango. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, vol. 46, pp. 128–130, 1998.

MERCADANTE, A. Z.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B.; BRITTON, G. HPLC and mass spectrometric analysis of carotenoids from mango. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, vol. 45, pp. 120–123, 1997.

MITCHAM, E. J.; McDonald, R. E. Cell wall modification during ripening of 'Keitt' and 'Tommy Atkins' mango fruit. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, vol. 117, pp. 919–924, 1992. Citado por: BRECHT, J. K.; YAHIA, E. M. Postharvest Physiology. In: LITZ, R. E. **The Mango: Botany, Production and Uses**. Cap. 14, pp. 484-528. 2ª Edição. CAB International. 2009.

MOLINA, E. *et al.* **Análise Econômica da Produção de Manga na Região do Escritório de Desenvolvimento Rural de Jaboticabal – SP**. In: XLII Congresso Brasileiro de Economia e Sociologia Rural, Campo Grande. Anais do XLII Congresso Brasileiro da Sober, 2004.

MONTALVO, E.; GARCIA, H. S.; TOVAR, B.; MATA, M. Application of exogenous ethylene on postharvest ripening of refrigerated 'Ataulfo' mangoes. **LWT - Food Science and Technology**, vol. 40, nº 8, pp. 1466-1472, 2007.

MUCCILLI, V. *et al.* Proteome analysis of *Citrus sinensis* L. (Osbeck) flesh at ripening time. **Journal of Proteomics**, vol. 73, pp. 134-152, 2009.

NASCIMENTO, J. R. O. **Purificação, caracterização e expressão da sacarose-fosfato sintase durante o amadurecimento da banana**. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 1997.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger Principles of Biochemistry**. 4ª Edição. Nova Iorque: W. H. Freeman, 2004.

NILO, R. *et al.* Proteomic analysis of peach fruit mesocarp softening and chilling injury using difference gel electrophoresis (DIGE). **BMC Genomics**, vol. 11, nº 43, pp 1-20, 2010.

NOGUEIRA, S. B. **Análise diferencial do proteoma da polpa do mamão durante o amadurecimento utilizando eletroforese bidimensional.** Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2010.

PAGE, D. *et al.* Protective proteins are differentially expressed in tomato genotypes differing for their tolerance to low-temperature storage. **Planta**, vol. 232, nº 2, pp. 483-500, 2010.

PAINE, J. A. *et al.* Improving the nutritional value of Golden Rice through increased pro-vitamin A content. **Nature Biotech.**, vol. 23, nº 4, pp. 482-487, 2005.

PANDIT, S. S. *et al.* Expression profiling of various genes during the fruit development and ripening of mango. **Plant Physiology and Biochemistry**, vol. 48, pp. 426-433, 2010.

PANG, Q.; HAYS, J. B.; RAJAGOPAL, I.; SCHAEFER, T. S. Selection of Arabidopsis cDNAs that partially correct phenotypes of *Escherichia coli* DNA-damage-sensitive mutants and analysis of two cDNAs that appear to express UV-specific dark repair activities. **Plant Molecular Biology**, vol. 22, nº 3, pp. 411-426, 1993.

PANG, X. M.; NADA, K.; KUROSAWA, T.; BAN, Y.; MORIGUCHI, T. Effect of methylglyoxal bis-(guanyldiazide) on polyamine and ethylene biosynthesis of apple fruit after harvest. **Acta Physiol. Plant**, vol. 32, pp. 1005-1010, 2010.

PAPP, E.; NARDAI, G.; SÖTI, C.; CSERMELY, P. Molecular chaperones, stress proteins and redox homeostasis. **Biofactors**, vol. 17, pp. 249-257, 2003.

PEDRESCHI, R. *et al.* Gel-Based Proteomics Approach to the Study of Metabolic Changes in Pear Tissue during Storage. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, nº 57, pp. 6997-7004, 2009.

PEDROSA, J. M.; PIERRE, F. C. Técnicas de Pós-colheita e expansão da cultura da manga no Estado de São Paulo. **Rev. Brás. Frutic. Jaboticabal**, v. 24, nº 2, pp. 381-384, 2006.

PERONI, F. H. G.; KOIKE, C.; LOURO, R. P.; PURGATTO, E.; NASCIMENTO, J. R. O.; LAJOLO, F. M.; CORDENUNSI, B. R. Mango Starch Degradation. II. The Binding of α -Amilase e β -Amilase to the Starch Granule. **J. Agric. Food Chem.**, vol 56, pp. 7416-7421, 2008.

PIECHULLA, B. Differential expression of nuclear- and organelle-encoded genes during tomato fruit development. **Planta**, vol. 174, nº 4, pp. 505-512, 1988.

PIGNATARO, V.; CANTON, C.; SPADAFORA, A.; MAZZUCA, S. Proteome from lemon fruit flavedo reveals that this tissue produces high amounts of the Cit s1 germin-like isoforms. **J. Agric. Food Chem.**, vol. 58, nº 12, pp. 7239-7244, 2010.

PINO, J.; MESA, J.; MUNOZ, Y.; MARTI, M.P.; MARBOT, R. Volatile components from mango (*Mangifera indica* L.) cultivars. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, vol. 53, pp. 2213–2223, 2005.

PINTO, A. C. Q., *et al.* Melhoramento Genético. In: GENÚ, P. J. C.; PINTO, A. C. Q. (eds). **A cultura da mangueira**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica. pp. 51-92, 2002. Citado por FALEIRO, F. G.; PINTO, A. C. Q.; ROSSETTO, C. J.; FRAGA, L. M. S.; ANDRADE, S. R. M.; BELLON, G. **Avaliação da Origem de Variações Fenotípicas da Manga Keitt Cultivada em São Paulo com Base em Marcadores RAPD**. In: XVIII Congresso Brasileiro de Fruticultura, Florianópolis. Anais do XVIII Congresso Brasileiro de Fruticultura, 2004.

POZUETA-ROMERO, J. Tools of engineering in plants. In: VALPUESTA, V. **Fruit and Vegetable Biotechnology**. Cap. 2, p. 12-32, 2002. Woodhead Publishing Ltd, Inglaterra, 2002.

POZUETA-ROMERO, J.; 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**, vol. 115, pp. 1185–1194, 1997.

PURGATTO, E. **Efeito do ácido indol-3-acético no metabolismo amido-sacarose durante o amadurecimento da banana (*Musa spp.*)**. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2001.

PURGATTO, E.; NASCIMENTO, J. R. O.; LAJOLO, F. M.; CORDENUNSI, B. R. The onset of starch degradation during banana ripening is concomitant to changes in the content of free and conjugated forms of indole-3-acetic acid. **J. Plant Physiol.** Waterbury, v.159, pp. 1105-1111, 2002.

QIN, X. *et al.* Molecular cloning, characterization and expression of cDNA encoding translationally controlled tumor protein (TCTP) from *Jatropha curcas* L. **Molecular Biology Reports**. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s11033-010-9980-x> . Acessado em: 18, jan. 2011.

RENAULT, J. *et al.* Quantitative proteomic analysis of short photoperiod and low-temperature responses in bark tissues of peach. **Tree Genetics & Genomes**, nº 4, pp. 589-600, 2008.

RICHARDS, K. D.; SNOWDEN, K. C.; GARDNER, R. C. Wali6 and wali7. Genes induced by aluminum in wheat (*Triticum aestivum* L.) roots. **Plant Physiology**, vol. 105, nº 4, pp. 1455-1456, 1994.

ROBINSON, S.P.; JACOBS, A.K.; DRY, I.B. A class IV chitinase is highly expressed in grape berries during ripening. **Plant Physiology**, vol.114, nº 3, pp.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**, vol.6, nº13, pp. 3781-3791, 2006.

ROLDÁN-ARJONA, T.; ARIZA, R. R. Review: Repair and tolerance of oxidative DNA damage in plants. **Mutation Research**, vol. 681, pp. 169-179, 2009.

ROSE, J. K. C.; SALADIÉ, M. **Proteomic analysis and Fruit Ripening**. In: Proc. 5th Int. Postharvest Symp. Acta Hort. (ISHS), vol. 682, pp. 211-224, 2005.

RUEBELT, M. C.; LIPP, M.; REYNOLDS, T. L.; ASTWOOD, J. D.; ENGEL, K-H.; JANY, K-D. Application of Two-Dimensional Gel Electrophoresis To Interrogate Alterations in the Proteome of Genetically Modified Crops. 2. Assessing Natural Variability. **J. Agric. Food Chem.**, vol. 54, n^o 6, pp. 2162–2168, 2006.

SALTVEIT, M. E. Effect of ethylene on quality of fresh fruits and vegetables. **Postharvest Biology and Technology**, vol. 15, n^o 3, pp. 279-292, 1999.

SANDHU, J. S.; KRASNYSKY, S. F.; DOMIER, L. L.; KORBAN, S. S.; OSADJAN, M. D.; BUETOW, D. E. Oral immunization of mice with transgenic tomato fruit expressing respiratory syncytial virus-F protein induces a systemic immune response. **Transgenic Research**, vol. 9, pp. 127-135, 2000.

SANTNER, A.; ESTELLE, M. The ubiquitin-proteasome system regulates plant hormone signaling. **The Plant Journal**, vol. 61, pp. 1029-1040, 2010.

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**, vol. 4, pp. 201–215, 2004.

SASSE, J. M. Physiological Actions of Brassinosteroids: An Update. **J. Plant Growth Regul.**, vol. 22, pp. 276-288, 2003.

SCHMITZ, G.; SCHMIDT, M.; FEIERABEND, J. Comparison of the expression of a plastidic chaperonin 60 in different plant tissues and under photosynthetic and non-photosynthetic conditions. **Planta**, vol. 200, n^o 3, pp. 326-336, 1996.

SCHNABLE, P. S. *et al.* The B73 maize genome: complexity, diversity and dynamics. **Science**, vol. 326, n^o 5956, pp. 1112-1115, 2009.

SHAW, M. M.; RIEDERER, B. M. Sample preparation for two-dimensional gel electrophoresis. **Proteomics**, n^o 3, pp. 1408-1417, 2003.

SILVA e SILVA, A. M.; CORRÊA, G. C.; REIS, E. M. Proteômica – uma abordagem funcional do genoma. **Saúde & Ambiente em Revista**, vol. 2, n^o 2, pp. 01-10, 2007.

SIMÃO, R. A.; BERNARDES SILVA, A. P. F.; PERONI, F. H. G.; NASCIMENTO, J. R. O.; LOURO, R. P.; LAJOLO, F. M., CORDENUNSI, B. R. Mango Starch Degradation. I. A Microscopic View of the Granule during Ripening. **J. Agric. Food Chem.**, vol 56, pp. 7410-7415, 2008.

SINGH, R. K.; SANE, V. A.; MISRA, A.; ALI, S. A.; NATH, P. Differential expression of the mango alcohol dehydrogenase gene family during ripening. **Phytochemistry**, vol. 71, pp. 1485-1494, 2010.

SINGH, S.; CORNILESCU, C. C.; TYLER, R. C.; CORNILESCU, G.; TONELLI, M.; LEE, M. S.; MARKLEY, J. L. Solution structure of a late embryogenesis abundant protein (LEA14) from *Arabidopsis thaliana*, a cellular stress-related protein. **Protein Science**, vol. 14, nº 10, pp. 2601-2609, 2005.

SMILLIE, R. M. Calvin cycle activity in fruit and the effect of heat stress. **Scientia Horticulturae**, nº 51, pp. 83-95, 1992.

SMITH *et al.* The photocontrol of gene expression in higher plants. In: Smith H., ed. **Regulation of enzyme synthesis and activity in higher plants**. San Diego, Academic Press, p. 93-125, 1977. Citado por: 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**. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2007.

SMITH, A. M.; ZEEMAN, S. C.; SMITH, S. M. Starch Degradation. **Annu. Rev. Plant Biol**, vol 56, pp. 73-98, 2005.

SNIDER, J.; THIBAUT, G.; HOURLY, W. A. The AAA+ superfamily of functionally diverse proteins. **Genome Biology**, vol. 9, nº 4, p. 216.1-216.8, 2008.

SPEIRS, J., LEE, E., HOLT, K., KIM, Y.D., SCOTT, N.S., LOVEYS, B., SCHUCH, W. Genetic manipulation of alcohol dehydrogenase levels in ripening tomato fruit affects the balance of some flavor aldehydes and alcohols. **Plant Physiology**, vol. 117, pp. 1047-1058, 1998.

SPEIRS, J.; CORRELL, R.; CAIN, P. Relationship between ADH activity, ripeness and softness in six tomato cultivars. **Scientia Horticulturae**, vol. 93, pp. 137-142, 2002.

SUNG, D.Y.; GUY, C.L. Physiological and molecular assessment of altered expression of Hsc70-1 in *Arabidopsis*. Evidence for pleiotropic consequences. **Plant Physiology**, vol. 132, pp. 979-987, 2003.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant Physiology**. 3ª Ed. Sinauer Associates. Ago. 2002.

TANG, W.; DENG, Z.; OSES-PRIETO, J.; SUZUKI, N.; ZHU, S.; ZHANG, X.; BURLINGAME, A. L.; WANG, Z-Y. Proteomics studies of brassinosteroid signal transduction using prefractionation and two-dimensional DIGE. **Molecular & Cellular Proteomics**, vol. 7, pp. 728-738, 2008.

THARANATHAN, R. N.; YASHODA, H. M.; PRABHA, T. N. Mango (*Mangifera indica* L.), "The King of Fruits"—An Overview', **Food Reviews International**, v. 22, nº 2, pp. 95-123, 2006.

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

TONGE, R., *et al.* Validation and development of fluorescence two-dimensional differential gel electrophoresis proteomics technology. **Proteomics**, n° 1, pp. 377-396, 2001.

TRÉZL, L. *et al.* Endogenous formaldehyde level of foods and its biological significance. **Z. Lebensm. Unters. Forsch. A.**, vol. 205, pp. 300-304, 1997.

TUCKER, G.A. Introduction, In: SEYMOURG; TAYLOR, J. TUCKER eds. **Biochemistry of Fruit Ripening**, London: Academic Press, cap.1, 1-51p, 1993.

ÜNLU, M.; MORGAN, M. E.; MINDEN, J. S. Difference gel electrophoresis: A single gel method for detecting changes in protein extracts. **Electrophoresis**, n° 18, pp. 2071-2077, 1997.

VIITANEN, P. V. *et al.* Functional characterization of the higher plant chloroplast chaperonins. **J. Biol. Chem.**, vol. 230, n° 30, pp. 18158-18164, 1995.

WANG, B.; WANG, J.; FENG, X.; LIN, L.; ZHAO, Y; JIANG, W. Effects of 1-MCP and exogenous ethylene on fruit ripening and antioxidants in stored mango. **Plant Growth Regulation**, vol. 57, n° 2, pp. 185–192, 2009.

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, n5, p.244-252, 2004.

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

WATMOUGH, N. J.; FRERMAN, F. E. Review: The electron transfer flavoprotein: ubiquinone oxidoreductases. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics**, vol. 1797, n° 12, pp. 1910-1916.

WEINER, H.; STITT, M.; HELDT, H. W. Subcellular compartmentation of pyrophosphate and pyrophosphatase in leaves. *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 893, pp. 13-21, 1987.

WESTERMEIER, R. Sensitive, Quantitative, and Fast Modifications for Coomassie Blue Staining of Polyacrylamide Gels. **Proteomics**, vol. 6, n° 2, pp. 61-64, 2006.

WILKINS, M. R. *et al.* **Proteome Research: New Frontiers in Functional Genomics**. Springer: Berlin, 1997. Citado por: ZOLLA, L. *et al.* Proteomics as a complementary tool for identifying unintended side effects occurring in transgenic maize seeds as a result of genetic modification. **Journal of Proteome Research**, vol. 7, pp 1850-1861, 2008.

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

YADAV, S. K.; SINGLA-PAREEK, S. L.; RAY, M.; REDDY, M. K.; SOPORY, S. K. Methylglyoxal levels in plants under salinity stress are dependent on glyoxalase I and glutathione. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, vol. 337, pp. 61-67, 2005.

YANG, S. F.; HOFFMAN, N. E. Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. **Annu. Rev. Plant. Physiol.**, vol. 35, pp. 155-189, 1984.

YANG, Y.; SULPICE, R.; HIMMELBACH, A.; MEINHARD, M.; CHRISTMANN, A.; GRILL, E. Fibrillin expression is regulated by abscisic acid response regulators and is involved in abscisic acid-mediated photoprotection. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, vol. 103, n° 15, pp. 6061-6066, 2006.

YIN, X-R *et al.* Ethylene-induced modulation of genes associated with the ethylene signaling pathway in ripening kiwifruit. **Journal of Experimental Botany**, vol. 58, n° 8, pp. 2097-2108, 2008.

YU, T-S.; ZEEMAN, S. C.; THORNEYCROFT, D.; FULTON, D. C.; DUSTAN, H.; LUE, W-L.; HEGEMANN, B.; TUNG, S-Y.; UMEMOTO, T.; CHAPPLE, A.; TSAI, D-L.; WANG, S-M; SMITH, A. M.; CHEN, J.; SMITH, S. M. α -Amylase Is Not Required for Breakdown of Transitory Starch in *Arabidopsis* Leaves. **J. Biol. Chem.**, vol 280, n° 280, pp. 9773-9779, 2005.

ZHANG, C.; DING, Z.; Xu, X.; WANG, Q.; Qin. G.; TIAN, S. Crucial roles of membrane stability and its related proteins in the tolerance of peach fruit to chilling injury. **Amino Acids**, vol. 39, n° 1, pp. 181-194, 2010.

ZHANG, W.; LI, F.; NIE, L. Review: Integrating multiple 'omics' analysis for microbial biology: application and methodologies. **Microbiology**, vol. 156, pp. 187-301, 2010.

ZOLLA, L.; RINALDUCCI, S.; ANTONIOLI, P.; RIGHETTI, P. G. Proteomics as a complementary tool for identifying unintended side effects occurring in transgenic maize seeds as a result of genetic modification. **Journal of Proteome Research**, vol. 7, pp 1850-1861, 2008.