

Universidade Federal do Ceará
Centro de Ciências
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica

Georgia Mesquita de Oliveira

**Prospecção de proteínas envolvidas no amadurecimento pós-colheita
da graviola (*Annona muricata L.*).**

Fortaleza – CE

2011

Georgia Mesquita de Oliveira

**Prospecção de proteínas envolvidas no amadurecimento pós-colheita
da graviola (*Annona muricata L.*).**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. José Hélio Costa

Georgia Mesquita de Oliveira

**Prospecção de proteínas envolvidas no amadurecimento pós-colheita
da graviola (*Annona muricata L.*).**

Aprovada em: 30/08/211

BANCA EXAMINADORA

Prof. José Hélio Costa
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular
Universidade Federal do Ceará

Profa. Dirce Fernandes de Melo
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular
Universidade Federal do Ceará

Dra. Maria Lúcia Torres Franklin
Bolsista de Desenvolvimento Científico Regional do CNPq
Universidade Estadual do Ceará

**Aos meus amados pais Maria Irlanda e
Alísio, e ao meu namorado Simão**

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. José Hélio Costa agradeço a confiança, os incentivos e a orientação na realização deste trabalho.

À Profa. Dirce Fernandes de Melo agradeço aos momentos de estímulo nas reuniões de segunda-feira e pela disponibilidade em participar da banca examinadora do trabalho de Dissertação.

À Dra. Maria Lúcia Torres Franklin pela disponibilidade em participar da banca examinadora do trabalho de dissertação.

Ao Prof. Dr. José Tadeu Abreu de Oliveira do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular por disponibilizar o seu laboratório e equipamentos para a realização de parte deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Francisco de Assis Paiva Campos do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular por disponibilizar o seu laboratório e equipamentos para a realização de parte deste trabalho.

Ao Sr. Ivanildo pela gentileza por ceder às graviolas utilizadas neste trabalho.

Ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará e aos professores do Departamento.

Ao amigo Welves pela amizade incondicional e disponibilidade para responder as inúmeras dúvidas durante o período do Mestrado.

Ao João Henrique por ter escrito o projeto sobre proteômica da graviola no período do Mestrado.

A bolsista de Iniciação Científica Khaterine Beatriz pela ajuda no preparo do material durante o trabalho e pela sua amizade, conselho e companheirismo.

Ao amigo Vladimir por toda ajuda incondicional, paciência e ensinamento, sempre se mostrando acessível e disposto na produção dos mapas bidimensionais.

Ao colega Thiago pelas contribuições valiosas nas análises dos mapas bidimensionais.

As técnicas Natália e Francisca pela disposição e enorme ajuda durante todo o trabalho.

A Deborah e Nayara por todo momento de descontração, carinho e estímulo.

Aos todos do laboratório de Bioenergética: Neuza, Karine, Pedro, Camila, Barbára, Karine, Carol, Carine, Beatriz, Andresiane, Lívia, Alana, Edson, Rafael, Dalton, Nila e Flávio pelo agradável convívio.

A todos os amigos da Faculdade: Juliana Montezuma, Kharla Patoilo e Suelen Carneiro que de longe torceram pela finalização deste trabalho.

Aos meus pais, Maria Irlanda Mesquita de Oliveira e Francisco Alísio de Oliveira (em memória) que me propiciaram a vida e a minha formação como pessoa. A minha mãe por me propiciar a continuidade nos estudos até a pós-graduação, pela compreensão, incentivo e amor incondicional em todos os momentos da minha vida.

A meu irmão Ciro por dividir os melhores momentos de minha vida e estar presente em todos os piores. Aos meus sobrinhos Matheus e Maria Elis pela alegria que traz para nossa família.

Ao meu namorado Simão Melo Gurgel por todo amor, paciência, estímulo e dedicação na minha vida.

Principalmente a Deus, por me confortar nas horas não tão boas e me dar forças para seguir sempre em frente.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

FONTES FINANCIADORAS

Este trabalho foi realizado graças ao auxílio das seguintes instituições:

A Fundação de Amparo a Pesquisa no Estado do Ceará pela concessão da bolsa de Pós-Graduação a autora deste trabalho.

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pelo financiamento do projeto.

Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, cujos laboratórios esta pesquisa foi realizada.

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

Albert Einstein.

RESUMO

A graviola (*Annona muricata* L.) é uma fruta bastante utilizada na alimentação, pois fornece vitaminas, carboidratos, proteínas, lipídios, fibras e outras moléculas para nutrição humana. Nos últimos anos a graviola (fruto tropical exótico) tem apresentado uma posição de destaque na economia brasileira, principalmente para Estados do Nordeste como Ceará, Alagoas, Bahia e Pernambuco. A alta produção do fruto de graviola no Nordeste se dá principalmente pela floração ocorrer durante o ano todo, contudo estima-se que a perda pós-colheita chega a 50% da produção, como ocorre com outros frutos nativos ou exóticos. Tal perda pós-colheita do produto se deve à acelerada taxa de desenvolvimento e senescência do fruto. Apesar de haver alguns estudos sobre graviola, o entendimento bioquímico e molecular do processo de amadurecimento é muito limitado tornando-se importante avançar nesses conhecimentos a fim de desenvolver estratégias para o aumento da vida de prateleira desse fruto. No presente trabalho, buscou-se por um melhor protocolo de extração de proteínas da polpa de graviola para gerar mapas bidimensionais e identificação de possíveis proteínas envolvidas no amadurecimento pós-colheita do fruto. Os frutos de graviola no estágio pré-climatérico foram colhidos e deixados amadurecer a temperatura de 25° C por até 8 dias. Amostras da polpa do fruto foram coletadas nos tempos 0, 2, 4, 6 e 8 dias pós-colheita e usadas para a extração de proteínas e estabelecimento de géis bidimensionais (2D). Dois diferentes métodos de extração de proteínas foram testados e o que apresentou melhor rendimento e *spots* com boa resolução em géis bidimensionais foi escolhido para análise de proteínas. Os géis bidimensionais foram analisados através do programa Image Master para a identificação de *spots* específicos e ou diferenciais, bem como determinação de seus pontos isoelétricos (pIs) e de respectivas massas moleculares (MM). Os dados de pI e MM foram usados para rastrear proteínas homólogas em angiospermas através de buscas nos bancos de dados UniProtKB/Swiss-Prot e UniProtKB/TrEMBL dispondo de mais de 16 milhões de informações depositadas. Géis 2D inicialmente produzidos na faixa de pH de 3 a 10 revelaram proteínas concentradas na região de pHs mais ácidos. Tal fato determinou que a faixa de pH de 4 a 7 fosse usada para melhor separação dos *spots* em análises seguintes. Após análise dos géis bidimensionais 21 *spots* específicos e 6 *spots* diferenciais foram selecionados. As análises em bancos de dados possibilitaram inferir sobre 26 proteínas. Entre essas proteínas, várias estavam relacionadas com o amadurecimento de frutos em outras espécies tais como: proteínas com expressão regulada pelo etileno, proteínas relacionadas com o estabelecimento

das características organolépticas do fruto e proteínas do metabolismo energético. Com relação ao metabolismo energético proteínas da via glicolítica, ciclo de Krebs e CTE foram inferidas. Estudos prévios sobre a participação da via alternativa de elétrons no amadurecimento climatérico da graviola foram reforçados. Entretanto, nesse trabalho foi observado que além da oxidase alternativa (AOX), outros componentes podem participar da regulação dessa via. Os resultados obtidos revelam possíveis proteínas alvo para o desenvolvimento de estratégias bioquímicas e ou moleculares no controle do amadurecimento pós-colheita da graviola.

ABSTRACT

The soursop (*Annona muricata* L.) fruit is widely used in food, because it provides vitamins, carbohydrates, proteins, lipids and other molecules for human nutrition. In recent years, soursop (exotic tropical fruit) has had a prominent position in the Brazilian economy, especially for northeastern states such as, Ceara, Alagoas, Bahia and Pernambuco. The high production of soursop fruit is mainly in the Northeast by flowering occurs throughout the year, however it is estimated that the post-harvest losses reach 50% of production, as with other native or exotic fruits. Such post-harvest losses of the product are due to the accelerated rate of development and senescence of the fruit. Although some studies on Graviola, biochemical and molecular understanding of the maturation process is very limited making it important to move forward on this knowledge to develop strategies for increasing the shelf life of fruit. In this study, we sought a better protocol for protein extraction from soursop pulp to generate two-dimensional maps and identification of potential proteins involved in post-harvest ripening of the fruit. The soursop fruit in pre-climacteric stage were collected and allowed to ripen at 25 ° C for up to 8 days. Samples of the fruit pulp were collected at 0, 2, 4, 6 and 8 days post-harvest and used for protein extraction and establishment of two-dimensional gels (2D). Two different protein extraction methods were tested and the best one concerning performance and spots with good resolution in two-dimensional gel was chosen for protein analysis. The two-dimensional gels were analyzed using the Image Master for the identification of specific or differential spots, as well as determination of their isoelectric points (IPs) and their molecular masses (MM). The pI and MM data were used to track homologous proteins in angiosperms through searches on databases UniProtKB / Swiss-Prot and UniProtKB / Tremble featuring more than 16 million deposited information. 2D gels initially produced in the pH range 3 to 10 revealed the protein concentrated in the more acidic pHs. This fact determined the pH range 4-7 was used for better separation of spots in the following analysis. After two-dimensional gel analysis of 21 specific spots and 6 differential spots were selected. The analysis in databases allowed inferences about 26 proteins. Among these proteins, several were related to fruit ripening in other species such as proteins with expression regulated by ethylene, protein related to the establishment of the organoleptic characteristics of the fruit and proteins of energy metabolism. With respect to the metabolism of proteins glycolytic pathway, Krebs cycle and ETC were inferred. Previous studies on the participation of the alternative pathway of electrons in the ripening of climacteric graviola

have been strengthened. However, this study also showed that in addition to the alternative oxidase (AOX), other components may participate in the regulation of this pathway. The results reveal possible protein targets for the development of strategies and biochemical and molecular control of postharvest ripening of soursop.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Aspectos gerais (flores, folhas e frutos) da *Annona muricata* L.....23
- Figura 2.** Avaliação macroscópica dos diferentes estágios de amadurecimento da Graviola. 40
- Figura 3.** Eletroforese de proteínas da polpa de *Annona muricata*, em gel de poliacrilamida 12% (SDS-PAGE). As proteínas foram extraídas pelo método de Sarry et al. (2004) nos dias 0 e 8 e foram aplicada 15 µg de proteínas em cada poço.. M: Marcador de massa molecular; High-Range Rainbow; Poços 1 e 2: amostras do dia 0; Poços 3 e 4: amostras do dia 8.44
- Figura 4.** Eletroforese de proteínas da polpa de *Annona muricata*, em gel de poliacrilamida 12% (SDS-PAGE). As proteínas foram extraídas pelo método de Giribaldi et al. (2007) nos dias 0,2,4,6 e 8 e foram aplicada 15 µg de proteínas em cada poço. M: Marcador de massa molecular; High-Range Rainbow; Poços 1 a 5: amostras do dia 0; 2, 4, 6 e 8.44
- Figura 5.** Mapas bidimensionais de proteínas da polpa de *Annona muricata* no 8° dia pós-colheita. As proteínas extraídas pelo método de Sarry et al. (2004) estão representada no mapa A. As proteínas extraídas pelo método de Giribaldi et al. (2007) estão representadas no mapa B. As proteínas, foram separadas na primeira dimensão utilizando tiras de IPG na faixa de pH de 3-10. A quantidade de proteínas aplicada foi de 300µg.....48
- Figura 6.** Mapas bidimensionais de proteínas da polpa de *Annona muricata* extraídas pelo método de Giribaldi et al.(2007) nos dias 0, 2, 4, 6 e 8 pós-colheita. As proteínas, foram separadas na primeira dimensão utilizando tiras de IPG na faixa de pH de 3-10. A quantidade de proteínas aplicada foi de 300µg.....49
- Figura 7.** Mapa bidimensional da polpa de *Annona muricata* extraída pelo método Giribaldi et al.(2007) correspondendo ao dia 0 pós colheita. As proteínas foram separadas na primeira dimensão utilizando tiras de IPG na faixa de pH de 4-7. A quantidade de proteínas aplicada foi de 300µg. Os géis foram corados com Coomassie brilhante blue .51
- Figura 8.** Mapa bidimensional da polpa de *Annona muricata* extraída pelo método Giribaldi et al.(2007) correspondendo ao 2° dia pós colheita. As proteínas foram separadas na primeira dimensão utilizando tiras de IPG na faixa de pH de 4-7. A quantidade de proteínas aplicada foi de 300µg. Os géis foram corados com Coomassie brilhante blue .52
- Figura 9.** Mapa bidimensional da polpa de *Annona muricata* extraída pelo método Giribaldi et al.(2007) correspondendo ao 4 dia pós colheita. As proteínas foram separadas na primeira dimensão utilizando tiras de IPG na faixa de pH de 4-7. A quantidade de proteínas aplicada foi de 300µg. Os géis foram corados com Coomassie brilhante blue .53
- Figura 10.** Mapa bidimensional da polpa de *Annona muricata* extraída pelo método Giribaldi et al.(2007) correspondendo ao 6° dia pós colheita. As proteínas foram separadas na

primeira dimensão utilizando tiras de IPG na faixa de pH de 4-7. A quantidade de proteínas aplicada foi de 300µg. Os géis foram corados com Coomassie brilhante blue.54

Figura 11. Mapa bidimensional da polpa de *Annona muricata* extraída pelo método Giribaldi et al.(2007) correspondendo ao 8ºdia pós colheita. As proteínas foram separadas na primeira dimensão utilizando tiras de IPG na faixa de pH de 4-7. A quantidade de proteínas aplicada foi de 300µg. Os géis foram corados com Coomassie brilhante blue.55

Figura 12. Organização da cadeia respiratória de plantas. A oxidase alternativa (AOX) está representada no número 5. Fonte: MARIANO, 200569

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Constituintes e volumes utilizados na preparação do gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	36
Tabela 2. Composição do gel de poliacrilamida utilizado na eletroforese (2-DE).....	37
Tabela 3. Avaliação quantitativa das proteínas da polpa da graviola extraídas pelos métodos de Sarry et al. (2004) e de Giribaldi et al (2007) utilizando o método de Bradford (1976).	41
Tabela 4. Lista das proteínas inferidas da polpa de <i>Annona muricata</i> durante o amadurecimento.	58

ABREVIATURAS E DEFINIÇÕES

1D - PAGE - Eletroforese em Gel de Poliacrilamida em uma dimensão (do inglês, *One Dimensional Polyacrylamide Gel Electrophoresis*)

2D-PAGE - Eletroforese em Gel de Poliacrilamida em duas dimensões (do inglês, *Two Dimensional Polyacrylamide Gel Electrophoresis*)

IEF- Focalização Isoelétrica (do inglês, *Isoelectric Focussing*)

pI - Ponto Isoelétrico

SDS-PAGE - Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com Dodecil Sulfato de Sódio (do inglês, *Sodium Dodecyl Sulphate – Polyacrylamide Gel Electrophoresis*)

Spot- Banda 2D de proteínas

SDS - Dodecil Sulfato de Sódio

TEMED - N, N, N', N'-tetrametilenodiamina

TRIS - Tris-hidroximetilaminometano

NADH - Nicotinamida adenina dinucleotídeo

CoQ - Coenzima Q

QH₂ - Ubiquinol

AOX - Oxidase alternativa

CTE - Cadeia de transporte de elétrons

IPP- Isopentenil difosfato

ROS- Espécies reativas de oxigênio

MDH - Malato desidrogenase

POD - Peroxidases

ERF - Fator de transcrição responsivo ao etileno

SUMÁRIO

RESUMO	ix
ABSTRACT	x
LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE TABELAS	xii
ABREVIATURAS	xiii
1 INTRODUÇÃO	19
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
2.1 A Graviola.....	21
2.2 Amadurecimento de Frutos.....	24
2.3 A Era Pós-Genômica.....	26
2.4 Método de Análise	27
2.4.1 Extração de proteínas para eletroforese 2D.....	27
2.4.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida em uma dimensão (1D-PAGE).....	29
2.4.3 Eletroforese bidimensional.....	29
2.5 Proteômica Vegetal	31
3 OBJETIVOS	33
3.1 Objetivo Geral.....	33
3.2 Objetivos Específicos.....	33
4 MATERIAIS E MÉTODOS	34
4.1 Coleta do Material Biológico	34
4.2 Processamento do Material Vegetal.....	34
4.3 Extração de Proteínas Totais.....	34
4.3.1 Método de Sarry et al. (2004).....	34
4.3.2 Método de Giribaldi et al. (2007)	35
4.4 Dosagem de Proteínas	35
4.5 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida em Condições Desnaturantes (SDS-PAGE) ..	35
4.6 Eletroforese Bidimensional.....	36

4.7	Análise e Prospecção de Proteínas.....	38
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
5.1	Análise macroscópica dos frutos de graviola durante o amadurecimento pós-colheita 39	
5.2	Avaliação Quantitativa das Proteínas de Graviola.....	41
5.3	Avaliação Qualitativa das Proteínas de Graviola.....	42
5.4	2-DE das Proteínas de Graviola	45
5.5	Análise e Prospecção das Proteínas	57
6	CONCLUSÃO.....	70
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71

1 INTRODUÇÃO

A graviola (*Annona muricata L.*) apresenta um grande potencial de comercialização no mercado interno e grande perspectivas para a exportação (BARBOSA; SOARES; CRISÓSTOMO, 2003). A região semiárida do Nordeste destaca-se por possui condições ótimas de clima e solo para o desenvolvimento deste fruto (NOBRE *et al.*, 2003). A graviola desempenha um papel vital na nutrição humana, pois apresentam na sua composição carboidratos, proteínas, lipídeos e fibras (TACO, 2006) além de vitaminas e polifenóis (SPADA *et al.*, 2008).

No entanto, segundo (LIMA; ALVES; FILGUEIRAS, 2010) anualmente ocorrem inúmeras perdas deste fruto devido a vários fatores, dentre eles o rápido amadurecimento e reduzida vida pós-colheita (AZIZ; YUSOF, 1994). Essas mudanças fisiológicas levam progressivamente a um maior desgaste e perda da qualidade do fruto (SHEWFELT *et al.*, 1999). Assim, o valor econômico e a aceitabilidade do mercado consumidor são prejudicados devido à diminuição da qualidade do produto.

Na tentativa de diminuir essas perdas, várias pesquisas tem sido realizadas, envolvendo questões relacionadas às mudanças físicas (SACRAMENTO *et al.*, 2003), químicas (LIMA *et al.*, 2003), bioquímicas (LIMA; ALVES; FILGUEIRAS, 2006) e no controle pós- colheita (LIMA; ALVES; FILGUEIRAS, 2010). Na literatura, encontram-se vários estudos com outros frutos, investigando o processo de amadurecimento (SEYMOUR, 1993; BONGHI; TRAINOTTI, 2006; PRASANNA; PRABHA; THARANATHAN, 2007;), amolecimento (VICENTE *et al.*, 2007) e controle pós-colheita (VICENTE *et al.*, 2005).

Estes estudos esclarecem processos relacionados ao amadurecimento dos frutos e contribuem para o desenvolvimento de tecnologias relacionadas ao controle ou regulação. Estas tecnologias vêm utilizando ferramentas físicas, químicas e de biologia molecular (PAYASI; SANWAL, 2010). Entre os tratamentos físicos podemos destacar; a atmosfera modificada (RAGHAVAN *et al.* 2005), tratamento com radiação gama (SURENDRANATHAN, 2005) e revestimento de quitosona (WIN *et al.*, 2007). No tratamento químico destacamos; a aplicação de metil jasmonato (TZORTZAKIS; ECONOMAKIS, 2007) e 1-MCP (BRON; JACOMINO; PINHEIRO, 2006). A biologia molecular utiliza plantas transgênicas com superexpressão (GLICK, 2004) ou RNA antisense

(NUNEZ-PALENIUS *et al.*, 2007) e manipulação de fatores de transcrição (NATH *et al.*, 2007). No entanto, alguns métodos são tecnologias não largamente disponíveis ou necessitam de grande investimento financeiro (PAYASI; SANWAL, 2010).

Apesar de nos últimos anos muitas questões terem sido elucidadas, o completo entendimento dos processos fisiológicos e bioquímicos inerentes ao amadurecimento ainda não foi alcançado. Novas tecnologias, como a análise proteômica estão permitindo identificar e entender o padrão de expressão de proteínas nos diferentes estágios do amadurecimento do fruto. Alguns métodos de identificação de proteínas têm sido utilizados neste sentido e trabalhos com uma abordagem proteômica foram realizados para diferentes frutos: *Vitis vinifera* (GIRIBALDI *et al.*, 2007; GIRIBALDI; GIUFFRIDA, 2010; ZHANG *et al.*, 2008), *Solanum lycopersicum* (FAUROBERT *et al.*, 2007; KOK *et al.*, 2008; MOORE *et al.*, 2002; PIRRELLO *et al.*, 2009; ROCCO *et al.*, 2006), *Fragaria vesca* (BIANCO *et al.*, 2009) e *Citrus sinensis* (MUCCILLI *et al.*, 2009). No entanto, a utilização de umas das técnicas principais da proteômica, a eletroforese bidimensional, juntamente com a busca em banco de dados específicos, também podem fornecer respostas das proteínas envolvidas no amadurecimento.

Neste trabalho, apresentamos dados que podem fornecer uma maior compreensão do papel que as proteínas exercem em vias metabólicas associadas ao amadurecimento. Este conhecimento possibilitará futuramente propor estratégias que reduzam a velocidade dos processos fisiológicos e bioquímicos durante o amadurecimento.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A Graviola

A gravioleira é classificada botanicamente segundo JOLY (2002) no reino Plantae, divisão Magnoliophyta, classe Magnoliopsida, ordem Magnoliales, família Annonaceae, subfamília Annonideae, gênero *Annona* e espécies *Annona muricata* L. O gênero *Annona* é o de maior importância, pois é fonte de frutos comestíveis como a graviola (*Annona muricata*), a pinha (*Annona squamosa*), a condessa (*Annona reticulata*), a cherimóia (*Annona cherimola*) e a atemóia (*Annona squamosa* e *Annona cherimola* (LIMA *et al.*, 2006).

Conforme TORRES e SANCHES (1995), a graviola é uma baga ou sincarpo, geralmente ovóide ou elipsóide de cor verde escura medindo de 15 a 50 cm de comprimento e com 10 a 25 cm de diâmetro, coberta por espinhos suaves de 0,3 cm a 0,8 cm. A gravioleira é uma planta tropical originária da América Central e dos Vales Peruanos. Nos principais países produtores como a Venezuela, Porto Rico e Costa Rica, as gravioleiras encontradas se diferenciam pela forma, sabor e consistência de seus frutos. Considerando essas características são conhecidos os tipos; Morada, Lisa e Blanca (LIMA *et al.*, 2003).

No Brasil, a gravioleira é uma árvore pequena, que mede entre 5 e 6 metros de altura, com folhas largas de cor verde escura, de aparência tenra e brilhante. Produz um fruto comestível, com polpa branca em forma de coração (CORRÊA, 1984; MAAS *et al.*, 2001). A exploração comercial relativamente recente da graviola no Brasil tem dificultado um diagnóstico sobre a cultura no país.

A região semi-árida do Nordeste brasileiro, destaca-se como região produtora de graviola por encontrar condições ótimas de clima e solo para o seu desenvolvimento (NOBRE *et al.*, 2003). No sertão e litoral do Nordeste predomina o cultivo da graviola Nordestina mais popularmente conhecida como Crioula ou Comum. Este tipo, possui frutos cordiformes, de casca verde escura com terminações estilares proeminentes, peso entre 1,5 e 3,0 kg, polpa com sabor doce a sub-ácido (CRUZ *et al.*, 2000). A gravioleira é uma das fruteiras tropicais com maior potencial para exploração econômica. A crescente demanda e o interesse pela polpa por parte do consumidor e das indústrias de suco, sorvetes e doces, justificam a inclusão da graviola no mercado das frutas tropicais brasileiras de maior aceitação comercial. Além da região Nordeste, a graviola é amplamente cultivada nas regiões Norte, Centro-Oeste e Sudeste

do Brasil como reflexo de sua importância (MICHELETTI *et al.*, 2001). A cultura da graviola, além de ser utilizada na alimentação humana vem sendo utilizada como fitoterápico devido as suas propriedades medicinais presentes nas folhas, frutos, sementes e raízes (MENDONÇA *et al.*, 2002).

Apesar do grande potencial que a cultura apresenta ao Brasil, o país não é um dos grandes produtores, isso decorre principalmente da falta de incentivos para expansão econômica, pelas técnicas de manejo inadequadas e por problemas fitossanitários que levam a baixa produtividade (OLIVEIRA, 2001). Há vários problemas fitossanitários que limitam o cultivo dessa planta, entre os quais se destaca; a broca, considerada como uma das piores pragas. A gravioleira é atacada também por fungos, vírus (JUNQUEIRA *et al.*, 2002) e fitonematóides (CAMPOS *et al.*, 2002; MOURA; PEDROSA; MONTEIRO, 1999; MOURA; MARANHÃO; GUIMARÃES, 2005; SHARMA; PINTO; LOOF, 1985). Além disso, a alta perecibilidade do fruto da graviola e o curto período de conservação após a colheita (AZIZ; YUSOF, 1994) são responsáveis por altos índices de perdas e por dificuldades no abastecimento de mercados tradicionais e potenciais de consumo da fruta fresca (LIMA *et al.*, 2010). Apesar dos problemas de conservação pós-colheita, a graviola ainda é uma fruta pouco estudada.

Estudo relacionado ao amadurecimento da graviola ainda é escasso. Assim, pesquisas na tentativa de compreender melhor as transformações que a graviola sofre durante o amadurecimento poderá viabilizar o desenvolvimento de estratégias biotecnológicas para a redução de perdas pós-colheita e, portanto, melhora a conservação da qualidade do fruto por um período compatível com a demanda do mercado consumidor.



Figura 1. Aspectos gerais (flores, folhas e frutos) da *Annona muricata* L.

2.2 Amadurecimento de Frutos

Os frutos constituem um produto alimentar comercialmente importante e nutricionalmente indispensáveis. Ele é um órgão especializado que se desenvolve a partir de um ovário fertilizado. Em plantas superiores oferece uma grande variedade de qualidades como aroma, suculência, flavor e textura. Eles desempenham um papel vital na nutrição humana, pela suplementação de nutrientes e vitaminas essenciais ao crescimento e manutenção da saúde. Nutricionalmente, são ricos em carboidratos (energéticos), minerais, vitaminas (do complexo B, C e K em algumas instâncias), β -caroteno (pró-vitamina A), e compostos fenólicos (antioxidantes) (PRASANNA; PRABHA; THARANATHAN, 2007).

O desenvolvimento do fruto é dividido em três principais fases. A primeira fase é caracterizada por divisões celulares e crescimento rápido. A segunda fase, o fruto aumenta no tamanho, principalmente através da expansão celular. A última fase corresponde ao amadurecimento do fruto e é caracterizada pela dramática mudança nas cores, textura e gosto, que contribuem para a qualidade sensorial do fruto (PIRRELLO *et al.*, 2009).

Baseado no seu padrão de respiração e na biossíntese de etileno durante o amadurecimento, os frutos colhidos podem ser classificados como climatérios ou não-climatérios. Os frutos climatéricos podem ser amadurecidos depois de colhidos da planta parental. Esses frutos são caracterizados por apresentar um grande aumento na taxa de respiração e formação de etileno, originando o denominado “pico climatérico” no início do amadurecimento pós-colheita. Em seguida, ocorre uma queda brusca na atividade respiratória culminando com o envelhecimento e posterior morte do fruto. (GAMAGE; REHMAN, 1999). Já os frutos não-climatéricos não são capazes de continuar seu processo de amadurecimento depois de retirados da planta parental. Eles não ficam mais doces ou melhoram o sabor. Esses frutos produzem pequena quantidade de etileno endógeno, e não responde ao tratamento com etileno externo. Os frutos não-climatéricos apresentam comparativamente baixo perfil e gradual declínio no padrão de respiração e produção de etileno, através do processo de amadurecimento (GAMAGE; REHMAN, 1999).

O amadurecimento do fruto é acompanhado por um amolecimento constituindo-se em um dos fatores mais importantes que determinam a qualidade e aceitabilidade do fruto para o consumo. A polpa do fruto ou mesocarpo é uma parte comestível do fruto e é composta de

uma fina parede de células de estoque parenquimatosa. Essas células são caracterizadas pela proeminente parede celular consistindo de um complexo conjunto de polissacarídeos e proteínas. A parede celular contém: 35% de pectina, 25% de celulose, 20% de hemicelulose e 10% estrutural, proteínas ricas em hidroxiprolina (BROWNLEADER *et al.*, 1999). A progressiva despolimerização da principal classe de polissacarídeos da parede celular tal como: pectina, celulose e hemicelulose durante o amadurecimento pode levar a um excessivo amolecimento.

Essas mudanças são interpostas por enzimas que modificam a parede celular, como poligalacturonase (PG), pectina metil esterase (PME), liase pectato (PEL), celulose, xiloglucana-endo-transglucosidase/hidrolase e proteínas que se ligam a expansinas, as quais podem agir sequencialmente ou sinergicamente (PAYASI *et al.*, 2009).

Um dos fatores limitantes que influencia a perda e prejuízo econômico é a reduzida vida pós-colheita. O super amadurecimento dos frutos levam a um excessivo amolecimento, resultando em resíduos e danos durante o transporte e manipulação. O retardo do processo de amadurecimento e senescência aumenta o período de estoque e vida do fruto fresco. Aumento de tempo de vida do fruto fresco, não somente ajuda o produtor a evitar perdas pós-colheita por um longo período, mas também resulta em valor adicional para o fruto. Parcial sucesso tem sido alcançado para controlar ou regular o amadurecimento do fruto por uma variedade de meios, incluindo ferramentas física, química e de biologia molecular. Nenhum método simples é completamente efetivo no controle do amadurecimento de fruto climatérico. O uso de várias estratégias pré-colheita e pós-colheita são necessárias para controlar com sucesso o amadurecimento do fruto (PAYASI *et al.*, 2009).

Os avanços recentes na biologia molecular têm fornecido uma melhor compreensão da bioquímica do amadurecimento do fruto, tanto quanto tem ajudado na manipulação genética em todo o processo de amadurecimento. Essa técnica pode ser usada para manipular o processo de amadurecimento geneticamente, promovendo significantes vantagens comerciais. O fruto resultante tem um longo tempo de vida nas prateleiras e são mais resistentes a doenças e a fracionamento durante o transporte. O maior obstáculo em busca desse objetivo em outros frutos concentra-se na falta de conhecimento da bioquímica fundamental do processo de amadurecimento. Acredita-se que no futuro muitos aspectos do amadurecimento poderão ser regulados e usados para a manipulação dos frutos, em benefícios dos consumidores. (PRASANNA; PRABHA; THARANATHAN, 2007).

Nos últimos anos, vários estudos foram dedicados à compreensão da fisiologia dos frutos com ênfase no amadurecimento (BONGHI E TRAINOTTI, 2006; GIOVANNONI, 2001; PRASANNA; PRABHA; THARANATHAN, 2007; SEYMOUR, 1993; WHITE, 2002), no amolecimento (VICENTE *et al.*, 2007), e controle pós-colheita e deterioração dos frutos (VICENTE *et al.*, 2005) (PAYASI *et al.*, 2009), contudo, informações relacionadas a proteínas envolvidas no amadurecimento ainda permanecem escassas na literatura.

2.3 A Era Pós-Genômica

O desenvolvimento de tecnologias aplicadas na biologia tem gerado grande produção de informações na área de genômica de plantas, através do sequenciamento de diferentes organismos (VIEIRA *et al.*, 2006). Os dados gerados pelo sequenciamento do genoma, embora relevantes são limitados, tornando necessária a integração com outras técnicas que permitem estudar tanto os processos de transcrição das informações contidas nos genes quanto os seus produtos: as proteínas. Esta constatação deu início a uma nova etapa na pesquisa biológica conhecida como era pós-genômica, promovendo o desenvolvimento e aperfeiçoamento de técnicas utilizadas nos estudos de transcritos (transcriptômica), proteínas (proteômica) e metabólitos (metabolômica) todas integradas pela bioinformática (PALSSON, 2002; WECKWERTH *et al.*, 2004).

Embora a proteômica tenha ganhado destaque nos últimos anos, o termo proteoma se refere ao conjunto de proteínas que são expressas pelo genoma de um organismo ou tipo celular (HAYNES; YATES, 2000). O objetivo inicial da proteômica era a identificação em larga escala de todas as espécies de proteínas na célula ou tecido. As aplicações atualmente são diversificadas para a análise de vários aspectos funcionais da proteína tal como: modificações pós-traducionais, interação proteína-proteína, atividade e estrutura (PARK, 2004). Além desses aspectos, podemos citar também o estudo do seu nível de expressão, suas funções e mecanismos regulatórios (BLACKSTOCK; WEIR, 1999).

Existem diversos tipos de estudos proteômicos. A abordagem proteômica clássica é o estudo da expressão proteica global (*expression proteomics*), que envolve a criação de mapas quantitativos das proteínas expressas em diferentes condições fisiológicas onde são comparados entre eles. Informações deste tipo de estudo podem permitir a identificação de proteínas de transdução de sinal ou identificar proteínas específicas de estados patológicos e estados fisiológicos diversos (GRAVES E HAYSTEAD, 2002).

A proteômica tornou-se uma área de pesquisa muito promissora na última década, trazendo grandes avanços e aplicações para quase todas as áreas da biologia e biomedicina (GÖRG *et al.*, 2004). As principais técnicas usadas na proteômica são eletroforese bidimensional (2D) e a espectrometria de massa (ROCHA *et al.*, 2005), que combinadas com análise computacional de imagens e base de consulta de dados são poderosas ferramentas para identificação e caracterização de proteínas (WILDGRUBER *et al.*, 2000).

2.4 Método de Análise

2.4.1 Extração de proteínas para eletroforese 2D

A qualidade da amostra protéicas é sem dúvida um fator crítico, na obtenção de uma boa separação principalmente para a eletroforese bidimensional (2D). Assim, o entendimento das características das proteínas torna-se importante para o estudo. As proteínas celulares têm propriedades bioquímicas amplas, incluindo carga, tamanho, hidrofobicidade, susceptibilidade à proteólise, modificações pós-traducionais e interações com outras moléculas. E uma vez que, essas propriedades variam com a espécie, estágio de desenvolvimento, célula, tipo de tecido e condições de crescimento, protocolos de extrações diferentes têm sido usados para estudos proteômicos (SHEORAN *et al.*, 2009). A extração de proteína em plantas é particularmente desafiadora, do que em outros organismos devido às características metabólicas e estruturais dos tecidos vegetais, incluindo a matriz da parede celular (CARPENTIER *et al.*, 2005; SARAVANAN; ROSE, 2004; WANG *et al.*, 2003; WANG *et al.*, 2006; VÂLCU; SCHLINK, 2006).

Os frutos são considerados tecidos recalcitrantes e ao contrário de outros tecidos, eles contêm compostos que fortemente interferem na extração de proteínas para análise de 2D (ROSE *et al.*, 2004). Há uma abundância de compostos interferentes, polissacarídeos (SAMAJ; THELEN, 2007), sais, polifenóis (CARPENTIER *et al.*, 2005), pigmentos, ácidos nucleicos, e outros metabólitos secundários que pode causar estrias horizontais e verticais, manchas e número reduzido de *spots* de proteínas distintamente resolvido em gel 2-D (GOMEZ-VIDAL *et al.*, 2008). Existem muitos estudos, abordando o desenvolvimento de protocolos de preparação ideal de amostra para diferentes tecidos vegetais recalcitrantes (CARPENTIER *et al.*, 2005; SARAVANAN; ROSE, 2004; WANG *et al.*, 2003; VÂLCU; SCHLINK, 2006).

Embora, existam protocolos específicos para alguns frutos como uva, maçã, banana, morango e pêra (PEDRESCHI *et al.*, 2007; ROSE *et al.*, 2004; SONG *et al.*, 2006; WANG *et al.*, 2006) não há um protocolo específico para *A. muricata*. Além disso, *A. muricata* apresenta interferentes na sua composição como: carboidratos (TACO, 2006), e polifenóis (KUSKOSKI *et al.*, 2006) que precisam ser removidos na extração para obtenção de um bom resultado. O método ideal de extração deve ser capaz de extrair o máximo possível de espécies protéicas, reduzir o nível de contaminantes, minimizar a degradação e modificações protéicas e ser altamente reprodutível (JORRÍN-NOVO *et al.*, 2009).

Os tecidos de plantas são ricos em proteases (WANG; TAI; CHEN, 2008), que causam degradações proteolíticas e perdas de proteínas de alta massa molecular. As proteases são liberadas quando as células são rompidas, podendo ocorrer proteólise em larga escala, o que leva a erros na identificação das proteínas ou diminuição do rendimento da proteína desejada (RABILLOUD, 1996). O rendimento das extrações de proteínas está relacionado ao tamanho da pulverização, geralmente quanto mais fino, maior será a concentração de proteínas obtidas (WANG; TAI; CHEN, 2008). Os dois métodos de extração utilizados neste estudo foram baseados na precipitação com TCA e depois acetona ou diretamente com TCA/acetona, um método geral que tem sido amplamente utilizado para a extração de proteínas vegetais (DAMERVAL *et al.*, 1986; CARPENTIER *et al.*, 2005; JORGE *et al.*, 2005; REQUEJO; TENA, 2005; REQUEJO; TENA, 2006; CURTO *et al.*, 2006). Assim, a precipitação com ácido tricloroacético (TCA) foram realizadas durante cada extração para inativar as proteases. Apesar disso, deve-se levar em conta a dificuldade de se inativar completamente todas as proteases (LAEMMLI, 1970).

Os compostos fenólicos podem construir complexos irreversíveis com proteínas. Por isso, a precipitação das proteínas no método de SARRY *et al.* (2004) e no método de GIRIBALDI *et al.* (2007) com ácido tricloroacético e/acetona foi muito útil para minimizar a degradação destes e diminuir compostos interferentes, tais como sais, polifenóis, polissacarídeos e ácidos nucleicos. No método de GIRIBALDI *et al.* (2007), também foi utilizado polivinilpirrolidona (PVPP) (GRANIER, 1988; FLENGSRUD; KOBRO, 1989; MÉCHIN *et al.*, 2003) para aumentar a remoção de compostos polifenólicos.

Os solventes orgânicos como etanol ou acetona são utilizados para a remoção de lipídeos que interagem com proteínas de membranas, entretanto podem ocorrer perdas significativas de proteínas se estas forem solúveis em solventes orgânicos (GÖRG; WEISS;

DUNN, 2004). Após a remoção dos compostos interferentes, os polipeptídeos devem ser solubilizados. Entretanto, as proteínas obtidas pelo método de precipitação com TCA são difíceis de serem ressolubilizadas (NANDAKUMAR *et al.*, 2003). O típico tampão de proteínas de plantas para análise de 2D, consiste de 7 M uréia, 2 M tiouréia, 20 mM DTT, 2–4% CHAPS, e 2% anfólitos carregados (VINCENT *et al.*, 2007; RABILLOUD, 2000; WANG *et al.*, 2003; WANG *et al.* 2006; ISAACSON *et al.*, 2006). O aumento da solubilização das amostras pode ocorrer quando se utiliza o ultra-som, para homogeneizar o material e romper as células (VOET.; VOET.; PRATT, 1999).

2.4.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida em uma dimensão (1D-PAGE)

A eletroforese em uma dimensão (1D) em gel de poliacrilamida é relativamente simples. Estes sistemas, dependendo das condições de extração de proteínas, podem ser classificados como dissociantes ou não-dissociantes, sendo mais utilizado o dissociantes.

Em sistemas dissociantes, as proteínas são solubilizadas em um tampão contendo dodecilsulfato de sódio (SDS), o qual é o agente dissociante mais comumente usado. O SDS circunda uniformemente a proteína, formando uma micela. A interação entre o SDS e as proteínas produz cargas negativas para todas as proteínas e a magnitude dessas cargas dependerá da massa molecular das proteínas. Todas as proteínas migrarão em direção ao eletrodo positivo durante a eletroforese e a separação será baseada apenas na massa molecular das proteínas. As proteínas de menor massa molecular se movem mais rapidamente através do gel do que as maiores. Este tipo de eletroforese é geralmente conhecido como SDS-PAGE, devido à combinação do tratamento das proteínas com SDS e a eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) (LAEMMLI, 1970).

2.4.3 Eletroforese bidimensional

A eletroforese bidimensional (2-DE), descrita por O'Farrell (1975), atualmente permanece como uma das ferramentas centrais para expressão proteômica. A introdução de melhorias substanciais no passado rendeu à eletroforese bidimensional a capacidade de resolver milhares de proteínas simultaneamente em um simples gel. A técnica é excepcional na sua habilidade para indicar proteínas com modificações pós-traducionais e isoformas. Outras aplicações envolvem análise de pureza, detecção de marcadores de doenças, análise da

diferenciação celular, pesquisa sobre o câncer e descoberta de drogas (KRAJ; SILBERRING, 2008).

A eletroforese bidimensional de proteínas segue duas propriedades independentes, em dois passos principais. O primeiro passo, é a focalização isoeletrica (IEF) que permite separar as proteínas através do ponto isoeletrico (pI). O pI é definido como o pH no qual a proteína não apresenta carga elétrica líquida e não pode migrar no campo elétrico. No segundo passo, as proteínas são separadas de acordo com seu peso molecular em um gel de poliacrilamida com dodesilsulfato de sódio (SDS-PAGE) (KRAJ; SILBERRING, 2008).

A técnica é largamente utilizada no estudo de animais e microrganismos, e tem sido usada com sucesso na separação de proteínas de plantas (CHANG *et al.*, 2000; DOMINGUEZ-PUIGJANER; VENDRELL; LUDEVID, 1992; GRANIER, 1988).

Desde a introdução da técnica de 2DE, diversas modificações foram feitas, principalmente na primeira dimensão. Antes, os anfólitos eram utilizados para estabelecer o gradiente de pH para separação das proteínas pelo ponto isoeletrico. Entretanto, o uso de anfólito com essa finalidade tem diversos problemas, incluindo a incapacidade de correrem grandes quantidades de proteínas necessárias para a microsequência, pouca estabilidade do gradiente de pH durante a eletroforese e frequente falta de reprodutibilidade dos géis entre os laboratórios. O uso dos gradientes de pH imobilizados (IPG) para a separação por cargas na 2DE solucionou muitos dos problemas. Há diversas faixas de pH, variando de faixas ampla a estreitas. A flexibilidade na escolha das faixas de pH a serem utilizadas é de grande utilidade para separar eficientemente o maior número de proteínas possíveis (CLERO; BELLATO, 2002).

Após serem submetidas a 2DE, as proteínas são visualizadas através de métodos de detecção específicos para cada objetivo, como por exemplo, detecção de proteínas totais e modificações pós-traducionais. Dentre os diversos métodos para coloração de proteínas, os mais usados são coloração por azul de Coomassie e coloração por prata, devido ao custo, facilidade de uso e compatibilidade com métodos de caracterização microquímica, tais como sequência automática de aminoácidos e espectrometria de massa (CLERO; BELLATO, 2002).

Apesar da técnica de 2DE ter o potencial de separar milhares de proteínas e ser a técnica mais utilizada para a análise de proteomas, ela apresenta algumas limitações para

proteínas muito ácidas ou básicas, proteínas de baixa abundância e para proteínas hidrofóbicas, geralmente presentes nas membranas celulares (CLERO; BELLATO, 2002). Porém, diversos procedimentos podem ser adotadas para contornar tais limitações, dentre eles, o pré-fracionamento da amostra, utilização de faixas estreitas de pH para realização de IEF, fracionamento sub-celular e/ou remoção das proteínas mais abundantes da amostra (HANCOCK *et al.*, 2002).

No geral, a 2DE é um método de separação eficiente, porque todas as proteínas numa amostra são separadas simultaneamente, fornecendo informações úteis sobre pI, massa molecular, expressão e abundância relativa e modificações pós-traducionais pela alteração da mobilidade eletroforética (CLERO; BELLATO, 2002).

2.5 Proteômica Vegetal

A incidência de estudo proteômico em plantas têm aumentado nos últimos anos, devido em parte a disponibilidade e desenvolvimento de tecnologias proteômicas. A maior parte, dos estudos na área de proteômica vegetal está concentrada em pesquisas com organismos modelo e com as culturas que rendem lucros (LAMBERT *et al.*, 2005).

Uma das maiores dificuldades da proteômica vegetal é a capacidade de identificação de proteínas de espécies, cujos genomas ainda não foram sequenciados. A identificação e caracterização de proteínas são aceleradas pela disponibilidade de sequências genômicas e sequências expressas (EST - *Expressed Sequence Tags*). Na sequência de ESTs as proteínas podem ser identificadas por sequências de peptídeos. A outra forma seria realizar buscas baseada na homologia com proteínas de outras espécies vegetais.

Outra dificuldade encontrada na proteômica é uma boa preparação da amostra. A extração do máximo número de proteínas de uma dada célula, tecido, órgão ou organismo é o mais importante passo para subsequente separação, resolução e identificação das proteínas (PARK, 2004). Neste sentido, especial atenção deve ser destinada ao preparo inicial da amostra, em que diferentes métodos de extração podem ser testados e utilizados para isolar e testar as proteínas de tecidos vegetais (CARPENTIER *et al.*, 2005; NATARAJAN *et al.*, 2005). O tecido vegetal possui muitos componentes que interferem com a extração de proteínas tais como: compostos fenólicos, pectinas, componentes ácidos e proteinases. Além

disso, a presença da parede celular torna mais difícil a extração do tecido vegetal do que o tecido animal. (BARRACLOUGH *et al.*, 2004).

Diversas pesquisas vêm sendo realizadas na área da proteômica vegetal, como por exemplo, análise da resposta de plantas a estresses ambientais: baixas temperaturas (BAE *et al.*, 2003), estresse salino (DANI *et al.*, 2005), estresse hídrico (PROTEOPAR, 2007) ou ainda alterações no perfil padrão de expressão de proteínas em frutos durante o amadurecimento (GIRIBALDI *et al.*, 2007; ROCCO *et al.*, 2006).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Estudos prospectivos de proteínas relacionadas ao amadurecimento pós-colheita da graviola (*Annona muricata L.*).

3.2 Objetivos Específicos

- ❖ Avaliar o melhor método de extração para graviola.
- ❖ Elaborar mapas bidimensionais reprodutíveis da polpa do fruto durante o amadurecimento.
- ❖ Correlacionar às proteínas inferidas com as vias metabólicas ativas no processo de amadurecimento.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Coleta do Material Biológico

A coleta das graviolas (*Annona muricata L.*) tipo Crioula foi proveniente do sítio Félix, localizado no município de Paraipaba-Ceará. As graviolas foram selecionadas na maturidade fisiológica e apresentavam tamanho uniforme e casca sem danos físicos. Após a coleta, as graviolas foram transportadas em temperatura ambiente aproximadamente a 25° C para o Laboratório de Bioenergética, da Universidade Federal do Ceará, em Fortaleza.

4.2 Processamento do Material Vegetal

As graviolas foram lavadas com água destilada e secas para a retirada de resíduos. Elas foram separadas em cinco grupos e cada grupo tinha três repetições. Os grupos analisados estavam no intervalo de 0, 2, 4, 6 e 8 dias de amadurecimento, após a colheita. De acordo com o período de análise, a polpa foi pesada em aproximadamente 7g, congelada em nitrogênio líquido e armazenada em freezer a -80°C para posterior análise.

4.3 Extração de Proteínas Totais

4.3.1 Método de Sarry et al. (2004)

O método descrito por Sarry *et al.* (2004) foi utilizado com modificações para a extração de proteínas totais. Aproximadamente 7g de polpa foi macerada em nitrogênio líquido até a obtenção de um pó fino. A pulverização com nitrogênio líquido ajuda a romper as paredes celulares das plantas e minimiza a ocorrência de proteólise e outras formas de degradações protéicas. O pó foi misturado com uma solução de TCA/acetona 12,5%, contendo 28 mM de β -mercaptoetanol na proporção de 1:10 (p/v). Em seguida, o material foi filtrado e incubado durante 1 hora a -20°C para a precipitação das proteínas. Posteriormente, as proteínas foram precipitadas por centrifugação a 10000g por 15 minutos a 4°C. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado duas vezes com etanol 85%. Após essa etapa, o precipitado foi seco a temperatura ambiente ou até o etanol evaporar completamente.

4.3.2 Método de Giribaldi et al. (2007)

O método descrito por Giribaldi *et al.* (2007) foi utilizado para a extração de proteínas totais. Aproximadamente 7g de polpa da graviola foi macerada em nitrogênio líquido até obtenção de um pó fino ao qual foi adicionado tampão Tris HCl 50mM, tiuréia 2M, uréia 7M, Triton - 100 X 2%, pH 7,5 na proporção de 1:3 (p/v) 1% ditioneitol (DTT) e 2% polivinilpirrolidona (PVPP) sob agitação, a 4 °C durante 1h. Após este período, o material foi centrifugado a 8000g durante 30 minutos, recuperando-se o sobrenadante foi adicionado 12,5% de ácido tricloroacético (TCA) na proporção (1:2). Em seguida, esse sobrenadante foi acondicionado à - 80 °C, durante 3 horas para precipitação das proteínas. Posteriormente, foi realizada uma centrifugação durante 15 minutos a 13500g a 4°C.

Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e as proteínas precipitadas foram lavadas duas vezes com acetona gelada e repetiu-se a centrifugação em idênticas condições. O sobrenadante foi descartado e o precipitado resultante foi seco a temperatura ambiente. As amostras de cada grupo foram ressuspensas em 300µl de tiuréia 2M e uréia 7M. Em seguida, o material foi centrifugado a 10000 g por 2 minutos para a remoção de polímeros insolúveis, para posterior dosagem de proteínas.

4.4 Dosagem de Proteínas

A dosagem de proteínas foi realizada utilizando o método de Bradford (1976), utilizando albumina sérica bovina (BSA) como proteína padrão para construção de uma curva de calibração.

4.5 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida em Condições Desnaturantes (SDS-PAGE)

A eletroforese de proteínas foi realizada em gel de poliacrilamida 12% em presença de SDS (SDS-PAGE), de acordo com o protocolo descrito por Laemmli (1970), adaptado para o uso em placas. As amostras analisadas a partir do método de Sarry et al. (2004) correspondiam aos dias 0 e 8 e as amostras do método de Giribaldi et al. (2007) correspondiam aos dias 0, 2, 4, 6 e 8. As amostras foram ressuspensas em tampão de amostra SDS-PAGE 1X (Tris-HCl 62,5 mM pH 6,8, SDS 2,0% (m/v), glicerol 2% (v/v), β -

mercaptoetanol 5,0% (v/v), azul de bromofenol 0,1% (m/v) e incubadas em banho-maria a 100°C por 10 minutos. Após esse tratamento, 15 µg de cada amostra foi aplicada no gel de poliacrilamida 12% e a corrida eletroforética foi realizada a uma voltagem constante de 100V, fornecida por uma fonte Electrophoresis Power Supply – EPS 601, em tampão de corrida Tris-HCl 25 mM, pH 8,3 contendo Glicina 192 mM e SDS 0,1%.

Após a corrida eletroforética as bandas proteicas foram coradas durante 2 horas com Coomassie Brilliant Blue R-250 0,1% (p/v), preparado em metanol 30% (v/v) e ácido acético 10% (v/v). Para a visualização das bandas proteicas, o gel foi descorado por imersão em solução de metanol 30%(v/v) e ácido acético 7% (v/v).

O marcador de massa molecular utilizado *foi o Low-Range Rainbow* (GE- Healthcare) no volume de 5µL.

Tabela 1. Constituintes e volumes utilizados na preparação do gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).

Componentes	Volume utilizado para main gel (12%)	Volume utilizado para stacking gel (4%)
1,5 M Tris –HCl, pH 8,8	1250 µL	315 µL
30% N,N´-metil bisacrilamida	50 µL	2,5 µL
10% dodecil sulfatode sódio (SDS)	2000 µL	320 µL
N,N´,N,N´-tetrametiletenodiamina (TEMED)	5 µL	0,2 µL
10% persulfato de amônio	5 µL	12 µL
H ₂ O Milli-Q	1650 µL	1840 µL
Total	4960 µL	2490 µL

4.6 Eletroforese Bidimensional

As amostras foram solubilizadas em solução de reidratação (uréia 7 M, tiuréia 2M, DTT 65 mM, CHAPS 0,5% p/v, IPG buffer 0,5% v/v e azul de bromofenol 0,002% p/v) para um volume final de 250µl. O sistema de reidratação passiva Immobiline Drystip Reswelling Tray (Amersham Biosciences) foi utilizado e os géis com gradiente de pH imobilizado (tiras de IPG), fabricados pela GE-Healthcare, foram mantidos em contato com a solução durante 16 horas. As tiras de IPG tinham 13cm de comprimento e as faixas de pH estavam no intervalo de 4 a 7. A focalização isoeétrica foi realizada no equipamento Ettan IPGPhor III

(GE- Healthcare) utilizando o seguinte programa: 1º passo 50 volts durante 1:00 h, 2º passo 200 volts durante 1: 30 h, 3º passo 500 volts durante 0: 30 h, 4º passo 500 volts durante 1: 00 h, 5º passo 10000 volts até atingir 18000 volts totais.

Após a focalização, as tiras de IPG foram equilibradas sob agitação fraca em 3 ml de solução de equilíbrio (6M uréia, glicerol 30%, SDS 2%, Tris-HCl 50 mM e traços de azul de bromofenol) com DTT (2% p/v) durante 15 minutos para redução das amostras. Em seguida, a mesma solução de equilíbrio foi utilizada para alquilar as proteínas com IAA (2% p/v) durante 15 minutos. Após essa fase, as tiras foram transferidas para o topo de um gel e fixados com ágar 0,5%.

O SDS-PAGE da segunda dimensão foi realizado em géis com concentração de 12,5% de 14 cm x 14 cm contendo 45 mL de Main Gel submergidos em tampão de corrida. A corrida ocorreu em duas etapas, na primeira foi utilizado 15 mA/gel durante 1:00 h e na segunda 30 mA/gel até que o indicador (azul de bromofenol) saísse do gel (aproximadamente 5 horas). A corrida foi realizada com voltagem constante a 300 V utilizando a fonte Power-Supply-EPS 601 (GE- Healthcare). O marcador molecular *High Raing Raibow* (GE-Healthcare) foi utilizado no volume de 7 µL.

Após a corrida, os géis foram fixados utilizando-se 3 soluções. A solução 1 continha etanol 30% e ácido fosfórico 2% e permaneceu em contato overnight com os géis. A solução 2 era constituída de ácido fosfórico 2% e permaneceu em contato com os géis durante 1 30 h, mas a cada 30 minutos foram realizadas trocas da solução. A solução 3 era constituída de etanol 18%, ácido fosfórico 2% e sulfato de amônio 15% e permaneceu em contato com os géis durante 30 minutos. Em seguida, eles foram corados com solução de Coomassie Coloidal G-250 durante à noite. Os géis foram conservados em solução de ácido acético 5%.

Tabela 2. Composição do gel de poliacrilamida utilizado na eletroforese (2-DE)

SOLUÇÕES ESTOQUES	VOLUME	CONCENTRAÇÃO FINAL
Acrilamida (30%, m/v)-bisacrilamida (0,8%, m/v)	16,7 mL	12,5%
Tampão Tris-HCl a 1,5 M, pH 8,8	10 mL	0,375 M
Dodecil sulfato de sódio (SDS) a 10%	0,4 mL	0,10%
Persulfato de amônio a 10%	200 µL	0,05%
N,N,N',N'-Tetrametilenodiamino (TEMED)	13,5 µL	0,03%
H ₂ O Milli-Q	12,8 mL	-

4.7 Análise e Prospecção de Proteínas

Todas as triplicatas de cada gel foram escaneadas utilizando-se o programa Labscan v. 5.0 (GE-Healthcare) no ImageScanner (Amersham Biosciences). As imagens foram analisadas no programa ImageMasterTM 2D Platinum v.7.0 (GE-Healthcare). As imagens foram ajustadas e assim puderam ser comparadas e filtradas. Os *spots* de cada imagem foram detectados usando os parâmetros de detecção de *spot*.

Após a detecção dos *spots* de forma automática foi necessário adicionar manualmente os *spots*. No entanto, os *spots* eram adicionados somente se houvessem repetições de *spot* em pelo menos dois géis da triplicata. Assim, os *spots* seriam adicionados no terceiro gel caso não estivesse presente. No entanto, se o *spot* estivesse presente em apenas um gel ele não seria considerado como presente na amostra. Posteriormente foi estabelecida a correspondência entre os mesmos *spots* identificados nos diferentes géis (*matching*) e para isso foi utilizada primeiramente a ferramenta automática do programa e a edição manual. O gel master foi utilizado como referência para todas as modificações realizadas. O gel é imagem virtual que compreende todos os *spots* presentes em todos os géis da análise. Todas as comparações entre *spots* e entre os géis, assim como a edição e o agrupamento de *spots*, foram coordenadas através do gel master.

Após a comparação dos géis, os *spots* comuns e diferencialmente expressos foram detectados para cada dia analisado durante o amadurecimento. Esses *spots* tiveram seus atributos determinados (ponto isoelétrico e massa molecular) e em seguida foram analisados pelo programa *Swiss Prot* para prospecção de proteínas relacionadas ao amadurecimento pós-colheita da graviola.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Análise macroscópica dos frutos de graviola durante o amadurecimento pós-colheita

Os frutos de graviola, coletados 30 dias após a antese, correspondiam ao estágio pré-climatérico como observado por BIALE e BARCUS (1970). Os tempos escolhidos para a coleta das amostras da polpa (3 frutos para cada tempo) foram: 0, 2, 4, 6 e 8 dias pós-colheita (Figura 2). Conforme foi observado no momento da coleta da polpa, nos tempos 0 e 2 dias, o fruto apresentava-se com casca dura e de cor verde, polpa rígida e de cor branca, estando de acordo com o esperado para o estágio pré-climatérico. Nos dias 4 e 6 a polpa apresentava consistência mole e succulenta. As colorações da casca e da polpa foram mantidas. No dia 8, sinais de deterioração do fruto foram bem visíveis como o escurecimento da casca e da polpa que já não era tão branca. A polpa estava bem mais mole com características de apodrecimento. De acordo com o BIALE e BARCUS (1970) e BRASIL (2001) o pico do estágio climatérico é atingido 4 dias após a colheita enquanto que o pós-climatérico é melhor caracterizado após 7 dias. Portanto, os tempos (0, 2, 4, 6 e 8 dias pós-colheita) escolhidos para análise proteômica da polpa de graviola, utilizada nesse estudo, englobam os estágios pré-climatérico, climatérico e pós-climatérico.

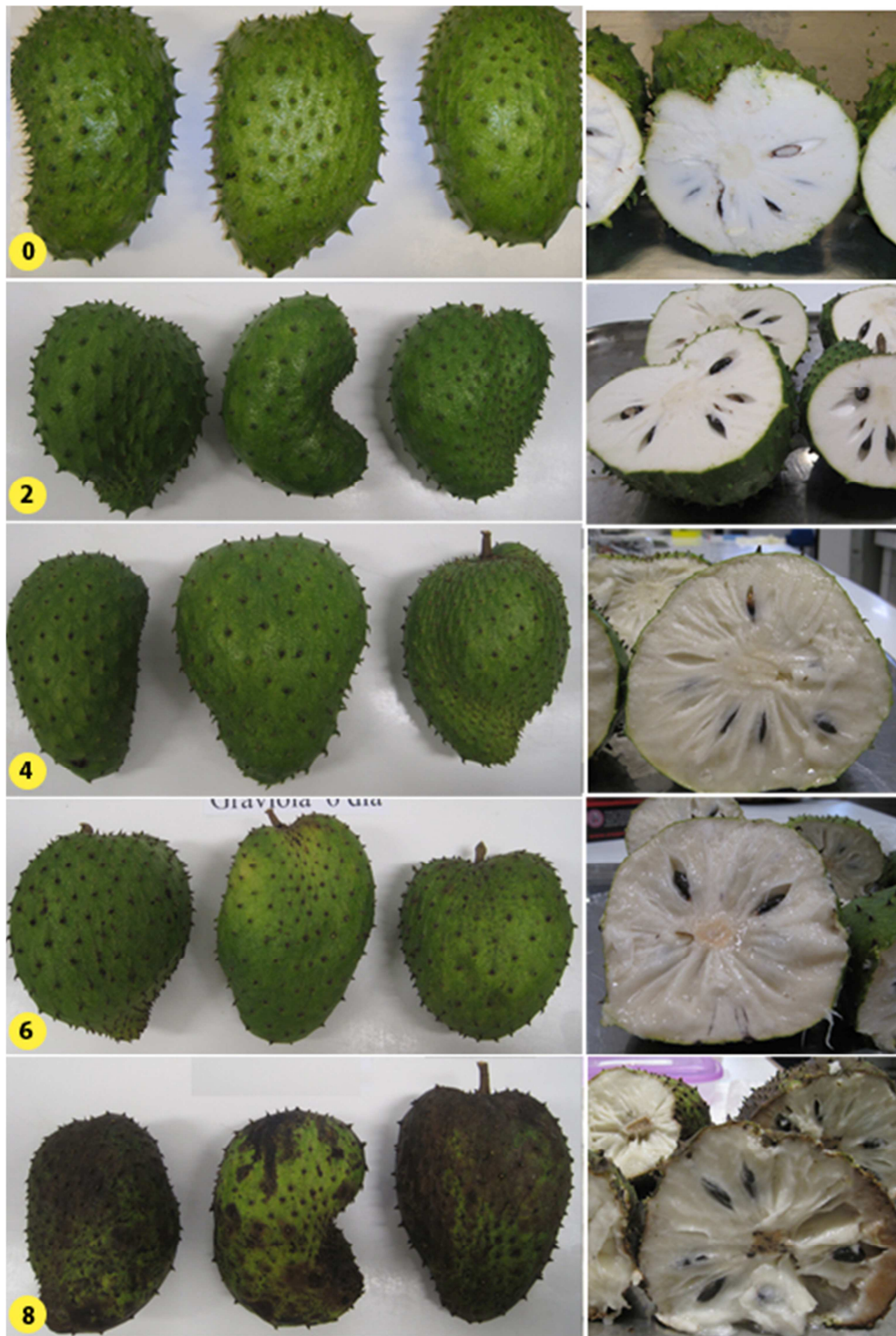


Figura 2. Avaliação macroscópica dos diferentes estágios de amadurecimento da Graviola.

5.2 Avaliação Quantitativa das Proteínas de Graviola

Para avaliar a eficiência de um protocolo de extração protéica é necessária a quantificação das proteínas no extrato (JORRÍN-NOVO et al., 2009). Assim, a primeira avaliação foi realizada em termos da concentração de proteínas totais presentes nas amostras, utilizando-se o método de BRADFORD (1976).

Os rendimentos das proteínas extraídas através do 1º método variaram, conforme pode ser observado na Tabela 3. O rendimento das extrações para os dias 0 e 8º foram de 0,94 e 4,0 mg/g, respectivamente. O baixo rendimento das extrações para o dia 0 pode estar ligado ao fato de que rendimentos de 0,1-1,0 mg/g, são normalmente obtidos quando há um baixo teor de proteínas e grandes quantidades de compostos nos tecidos vegetais interferindo nas extrações (CARPENTIER et al., 2005; SARAVANAN; ROSE, 2004; SONG et al., 2006; WANG et al., 2006). Apesar de tentativas de obter amostras protéicas mais puras a remoção dos interferentes das amostras extraídas através do 1º método foi dificultada devido às poucas etapas do método, bem como as peculiaridades dos componentes utilizados. Portanto, as diferenças encontradas entre os dias 0 e 8º talvez sejam devido à permanência desses interferentes durante a dosagem. Apesar disso, o método de BRADFORD (1976) é considerado mais resistente a ação de agentes interferentes e apresenta maior sensibilidade em relação ao nível de detecção e logo continuou sendo utilizado.

Tabela 3. Avaliação quantitativa das proteínas da polpa da graviola extraídas pelos métodos de Sarry et al. (2004) e de Giribaldi et al (2007) utilizando o método de Bradford (1976).

Dias analisados	Método de Sarry et al.(2004) de extração de proteínas (mg/g)	Método de Giribaldi et al.(2007) de extração de proteínas (mg/g)
0	0,94	22
2º.	-	5,3
4º.	-	40
6º.	-	26
8º.	4	46

As quantificações das proteínas extraídas seguindo-se o protocolo de GIRIBALDI também variaram, conforme se observa na mesma Tabela. O rendimento para os dias 0, 2, 4, 6, e 8 foram de 22, 5,3, 40, 26 e 46 mg/g de proteínas, respectivamente. No entanto, o conteúdo de proteínas não foi semelhante aos valores encontrados por GIRIBALDI et al. (2007) que obteve nos estágios finais de amadurecimento dos frutos de uva, que era apenas de 0.29 e 0.30 mg / g de proteínas.

A distinta quantificação protéica nas polpas de graviola para os métodos de Sarry et al. (2004) e GIRIBALDI et al. (2007) mostrados na Tabela 3 parece ser reflexo de fatores que variam desde do conteúdo de interferentes presentes em cada fase analisada as limitações dos métodos de extração utilizados

Contudo, a quantificação protéica com as amostras extraídas pelo método de GIRIBALDI ao longo do período de 0 a 8 dias revelou sua maior eficiência quando comparada ao método de extração protéica de SARRY et al. (2004).

5.3 Avaliação Qualitativa das Proteínas de Graviola

Os perfis protéicos da polpa de graviola resultantes dos métodos de extração segundo SARRY et al. (2004) e GIRIBALDI et al. (2007) foram avaliados através de SDS-PAGE. A qualidade de migração das amostras pode ser observada através das Figuras 3 e 4.

A Figura 3 revela qualidade da fração protéica incompatível com a desejada, tal observação é reflexo do grande arraste detectado nos poços onde as amostras foram aplicadas. Segundo GÖRG et al. (1997) há diferença na precipitação direta de extratos de proteínas sendo que a utilização de TCA/acetona (método segundo SARRY et al. (2004)) é mais eficiente do que TCA e acetona sozinha (método segundo GIRIBALDI et al. (2007)). A precipitação de proteínas com TCA em acetona é comumente usada. Tal protocolo de extração de proteínas foi desenvolvido inicialmente por DAMERVAL et al. (1986) para extração de proteínas de plântulas de trigo. O protocolo é baseado na desnaturação sob condições ácidas ou condições hidrofóbicas para ajudar a concentrar proteínas e remover contaminantes. No entanto, o maior problema com a precipitação TCA em acetona é a resolubilização das proteínas precipitadas. Isto é particularmente verdadeiro para proteínas de alto peso molecular, conforme poder ser observado na Figura 3. Isso pode explicar a diminuição de proteínas maiores que 52 KDa.

Já a Figura 4 mostra uma qualidade superior á das proteínas extraídas pelo método segundo SARRY et al. (2004). Quando as duas Figuras são comparadas, verifica-se que as proteínas do método de GIRIBALDI et al. (2007) estavam mais definidas que o outro método. Provavelmente esse método segundo GIRIBALDI et al. (2007) permitiu a eliminação de muitos interferentes como: carboidratos, pigmentos e compostos fenólicos. Um dos fatores que possivelmente contribuiu para a eliminação da maior parte desses interferentes foi o maior tempo de precipitação das proteínas, superior a duas horas à $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (em comparação a 1 hora à $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, utilizado no método segundo SARRY et al. (2004). Além disso, a adição de polivinilpirrolidona (PVPP), substância que conhecidamente remove compostos polifenólicos (GÖRG et al., 2004), deve ter contribuído para a remoção desses interferentes específicos. Através do método GIRIBALDI et al. (2007)), a análise da SDS-PAGE revelou que a precipitação com TCA e depois com acetona causou perda de algumas proteínas de baixo peso molecular (Figura 4), indicando dificuldade de precipitar tais proteínas. Contudo, alguma perda de proteínas de baixo peso molecular também foi observada através do método segundo SARRY et al. (2004) (Figura 3).

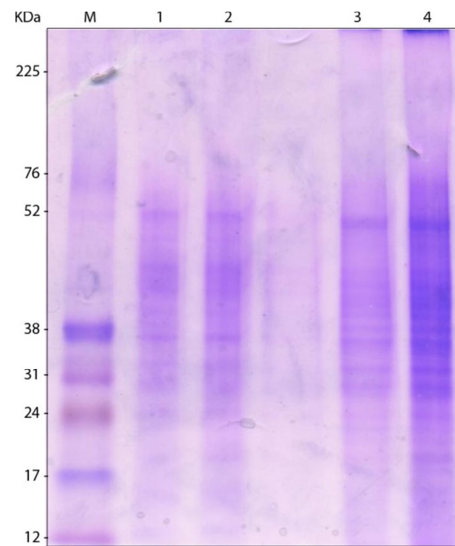


Figura 3. Eletroforese de proteínas da polpa de *Annona muricata*, em gel de poliacrilamida 12% (SDS-PAGE). As proteínas foram extraídas pelo método de Sarry et al. (2004) nos dias 0 e 8 e foram aplicada 15 µg de proteínas em cada poço. M: Marcador de massa molecular; High-Range Rainbow; Poços 1 e 2: amostras do dia 0; Poços 3 e 4: amostras do dia 8.

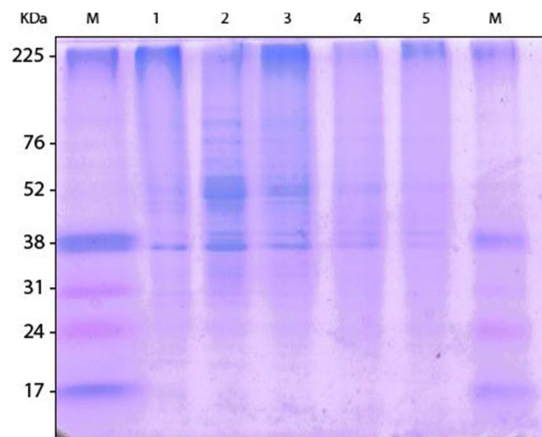


Figura 4 Eletroforese de proteínas da polpa de *Annona muricata*, em gel de poliacrilamida 12% (SDS-PAGE). As proteínas foram extraídas pelo método de Giribaldi et al. (2007) nos dias 0,2,4,6 e 8 e foram aplicada 15 µg de proteínas em cada poço. M: Marcador de massa molecular; High-Range Rainbow; Poços 1 a 5: amostras do dia 0; 2, 4, 6 e 8.

Aparentemente, os dois procedimentos utilizados influenciaram na extração de proteínas e conseqüentemente na qualidade das amostras obtidas. Entre os dois procedimentos utilizados observou-se que o método segundo GIRIBALDI et al. (2007) foi o que apresentou maior qualidade no perfil protéico, provavelmente devido ao maior número de etapas com componentes específicos que contribuíram para pureza das amostras.

5.4 2-DE das Proteínas de Graviola

Os extratos protéicos obtidos através dos dois referidos métodos foram analisados por eletroforese bidimensional. Embora o protocolo de SARRY et al. (2004) já tenha demonstrado ser menos eficiente que o de GIRIBALDI et al. (2007) (Tabela 3 e Figuras 3 e 4) para extração das proteínas de polpa de graviola, amostras do 8º dia foram escolhidas para comparação entre os perfis protéicos. Inicialmente as proteínas foram separadas em tiras de gradiente de pH imobilizado com intervalo de pH 3-10.

O mapa bidimensional das proteínas extraídas pelo método de SARRY et al. (2004) (Figura 5A) apresentou proteínas pouco resolvidas na região básica, pois possuía estrias e poucos *spots*, sugerindo incompleta ressolubilização das proteínas e precipitação. A precipitação através desse método foi realizada durante 1 hora a -20°C, talvez tempo insuficiente para concentração de todas as proteínas. Já a ressolubilização das proteínas foi inicialmente feita com tiuréia 2M e uréia 7M e posteriormente realizada com solução de reidratação que possivelmente permitiu que não somente as proteínas, mas também compostos interferentes tenham sido carreados juntos. Como resultado, um arrasto foi observado na região básica do mapa (Figura 5A), um problema previamente reportado para amostras de outras espécies preparadas através da precipitação com TCA/acetona (CARPENTIER et al., 2005).

Já o mapa bidimensional das proteínas extraídas pelo método de GIRIBALDI et al. (2007), apresentou melhor resolução com vários *spots* distribuídos na faixa ácida, básica e nas regiões de baixo e alto peso molecular (Figura 5B). Considerando as comparações entre os dois métodos com ênfase na resolução do mapa bidimensional revelado, o método de GIRIBALDI et al. (2007) foi escolhido para continuar o estudo. As proteínas da polpa de graviola nos tempos 0, 2, 4, 6 e 8 dias pós-colheita, extraídas pelo método GIRIBALDI et al. (2007) foram analisadas em eletroforese 2D usando tiras de gradiente de pH imobilizado com

intervalo de pH 3-10 (Figura 6). A maioria dos *spots* foram localizados predominantemente na faixa ácida com a presença de poucos *spots* nos extremos da faixa de pH de 3 a 10. Os poucos spots encontrados na faixa básica pode ser devido a perda de proteínas. Existem algumas perdas de proteínas em vários estágios do processo de 2-DE, incluindo o carregamento das proteínas para as tiras da primeira dimensão (IPG), focalização isoeletrica (IEF) e etapa de equilíbrio das proteínas (ZUO; SPEICHER, 2000).

Assim, para evitar perdas de proteínas alguns cuidados devem ser tomados durante o processo de preparação das amostras. As proteínas devem permanecer solúveis durante as etapas da eletroforese 2-D, principalmente na fase de focalização isoeletrica correspondente a primeira dimensão (WALKER, 2005). A solubilização de proteína esta intimamente ligada ao processo de quebra de interações envolvidas na agregação (RABILLOUD, 1996), que incluem as pontes dissulfeto, pontes de hidrogênio, forças de Van der Waals, interações iônicas e interações hidrofóbicas. Se essas interações não são suficientemente desestabilizadas, as proteínas podem formar agregados e/ou precipitar, resultando em artefatos ou perda da amostra. Isto é particularmente crítico durante a etapa de focalização isoeletrica (IEF) na primeira dimensão, onde os problemas de agregação de proteínas e precipitação ocorrem mais freqüentemente. Portanto, normalmente as soluções de solubilização contêm uma série de compostos incluindo agentes caotrópicos, detergentes, agentes redutores, tampões, sais e anfólitos.

Dentre os compostos caotrópicos, a uréia é bastante eficiente na ruptura das ligações de hidrogênio. Ela desnatura as proteínas pelo rompimento das ligações não covalentes e iônicas entre os resíduos de aminoácidos (SHAW; RIEDERER, 2003), levando ao desdobramento e desnaturação da proteína. Em contraste, a tiouréia é muito adequada para a quebra das interações hidrofóbicas, aumentando a solubilização de proteínas de membranas hidrofóbicas (MOLLOY et al., 1998; RABILLOUD, 1998). Dessa forma, como características do método Giribaldi et al. (2007), a tiuréia foi usada em combinação com uréia para aumentar a solubilidade de proteínas de membranas (BOUCHERIE et al., 1995). Além disso, diferentes detergentes, como o detergente não iônico Triton X-100 ou o detergente zwitteriônicos, sulfonato de 3-[(3-cloroamidopropil) dimetilamonio]-1-propano (CHAPS) (GÖRG; WEISS; DUNN, 2005) foram utilizados para impedir as interações hidrofóbicas entre os domínios de proteínas hidrofóbicas, evitando a perda destas devido à agregação e precipitação. Detergentes zwitteriônico geralmente oferecem melhor poder de solubilização (CHEVALLET et al., 1998; PERDEW; SCHAUP; SELIVONCHICK, 1983).

Adicionalmente agentes redutores como o ditioneitol (DTT) e o 2-mercaptoetanol foram usados para promover a redução e prevenir a re-oxidação das pontes dissulfeto. Tais agentes são necessários na clivagem das pontes intra e intermoleculares dissulfeto para se obter um desdobramento completo da proteína (RABILLOUD, 1996). Anfólitos, presentes nas soluções de reidratação, também contribuem para a melhor solubilidade das proteínas (GÖRG; WEISS; HJELMELAND, 1990; WESTERMEIER; NAVEN; HOPKER, 2002).

Além desses cuidados para prevenir a perda das proteínas, a quantidade de proteína presente no gel é um fator importante. Sabe-se que um dos fatores para obtenção de uma boa resolução dos géis é a quantidade de proteínas aplicadas (GORG et al 2004 e CHANG et al 2003). GORG et al. (2004) ressalta que a aplicação de até 1 mg de proteína pode ser utilizada sem carregar a imagem dos géis com spots sobrepostos. Já KARP, LILLEY.(2007) chamam atenção da necessidade da reprodutibilidade de dados, sugerindo que sejam feitos pelos menos triplicatas nos géis, em idênticas condições, para minimizar possíveis artefatos advindos da metodologia.

Portanto, foi padronizada a aplicação de 300 µg de amostras protéicas e foram realizadas triplicatas. A escolha do método de coloração também é um dos fatores importantes envolvidos na revelação das proteínas (WESTERMEIER; MAROUGA, 2005). Além disso, escolha de um método simples facilita a obtenção de resultados. Portanto, os géis foram corados com CBB G-250 coloidal, que além de ser um método simples apresenta um baixo custo. A coloração feita com o CBB coloidal permitiu detectar spots fracos nos géis, pois o contato entre os géis e o corante foi prolongado a fim de obter uma boa reprodutibilidade. A reprodutibilidade entre as repetições do mesmo estágio de amadurecimento da graviola e principalmente entre os estágios de amadurecimento são fundamentais para a visualização de perfis protéicos diferentes. No entanto, a obtenção de mapa bidimensional reprodutível não é somente um pré-requisito, mas também uma tarefa desafiadora (SAMAJ; THELEN, 2007), pois cada etapa pode interferir na aquisição de mapas de qualidade.

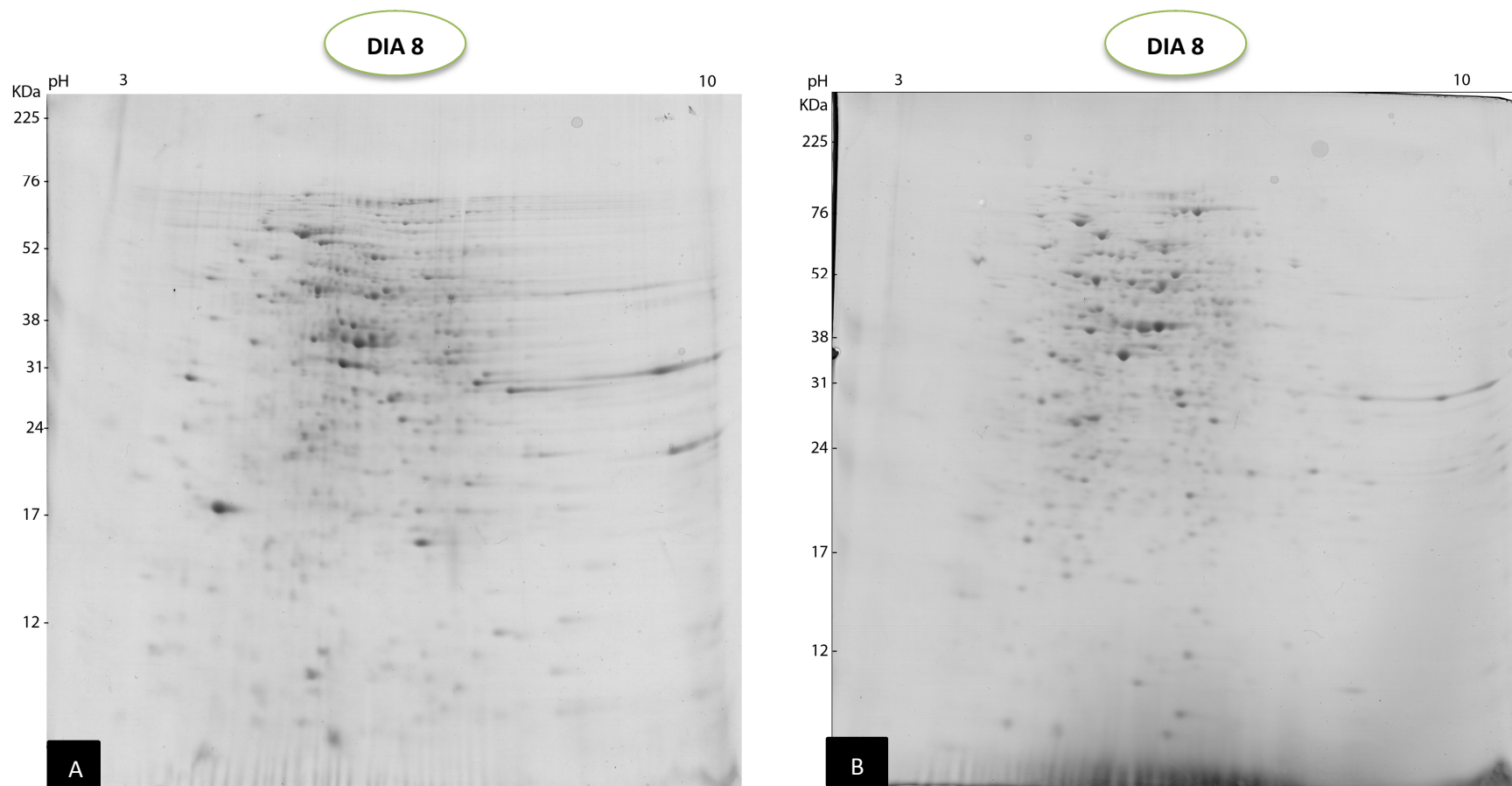


Figura 5. Mapas bidimensionais de proteínas da polpa de *Annona muricata* no 8º dia pós-colheita. As proteínas extraídas pelo método de Sarry et al. (2004) estão representada no mapa A. As proteínas extraídas pelo método de Giribaldi et al. (2007) estão representadas no mapa B. As proteínas, foram separadas na primeira dimensão utilizando tiras de IPG na faixa de pH de 3-10. A quantidade de proteínas aplicada foi de 300µg.

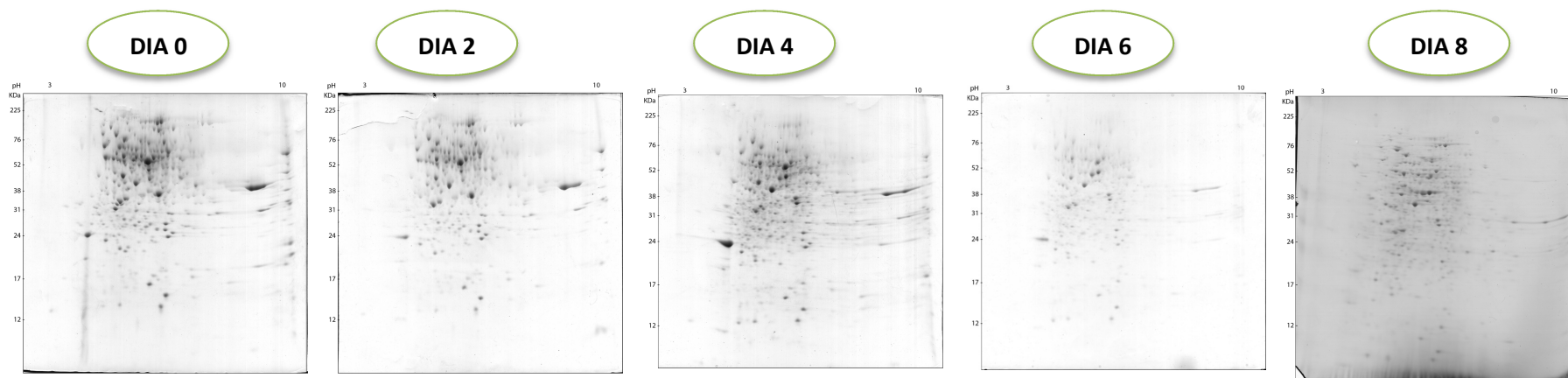


Figura 6. Mapas bidimensionais de proteínas da polpa de *Annona muricata* extraídas pelo método de Giribaldi et al.(2007) nos dias 0, 2, 4, 6 e 8 pós-colheita. As proteínas, foram separadas na primeira dimensão utilizando tiras de IPG na faixa de pH de 3-10. A quantidade de proteínas aplicada foi de 300 μ g.

)

Após terem sido feitos géis com intervalo de pH de 3-10 para todos os dias analisados, optamos para obter uma melhor resolução nos mapas bidimensionais. A escolha da faixa de pH é um dos fatores que afetam a visualização das mudanças de expressão de proteínas (GORG et al., 1999). Portanto, foi utilizada uma faixa mais estreita de pH (4 a 7) distribuída linearmente em 13 cm. Uma grande quantidade de spots podem ocorrer utilizando faixas mais estreitas de pH para isofocalização contribuindo para a diminuição da co-migração de proteínas em géis bidimensionais (CHAVES, 2004) e sobreposição de proteínas (overlapping). Um maior número de spots foram obtidos na faixa de pH entre 4 e 7, mostrando que houve uma melhora significativa na resolução das proteínas quando uma faixa de pH mais estreita foi utilizada. Nas Figuras 7, 8, 9, 10 e 11 estão demonstrados os perfis protéicos dos frutos da graviola nos diferentes estágios de desenvolvimento na faixa de pH de 4-7.

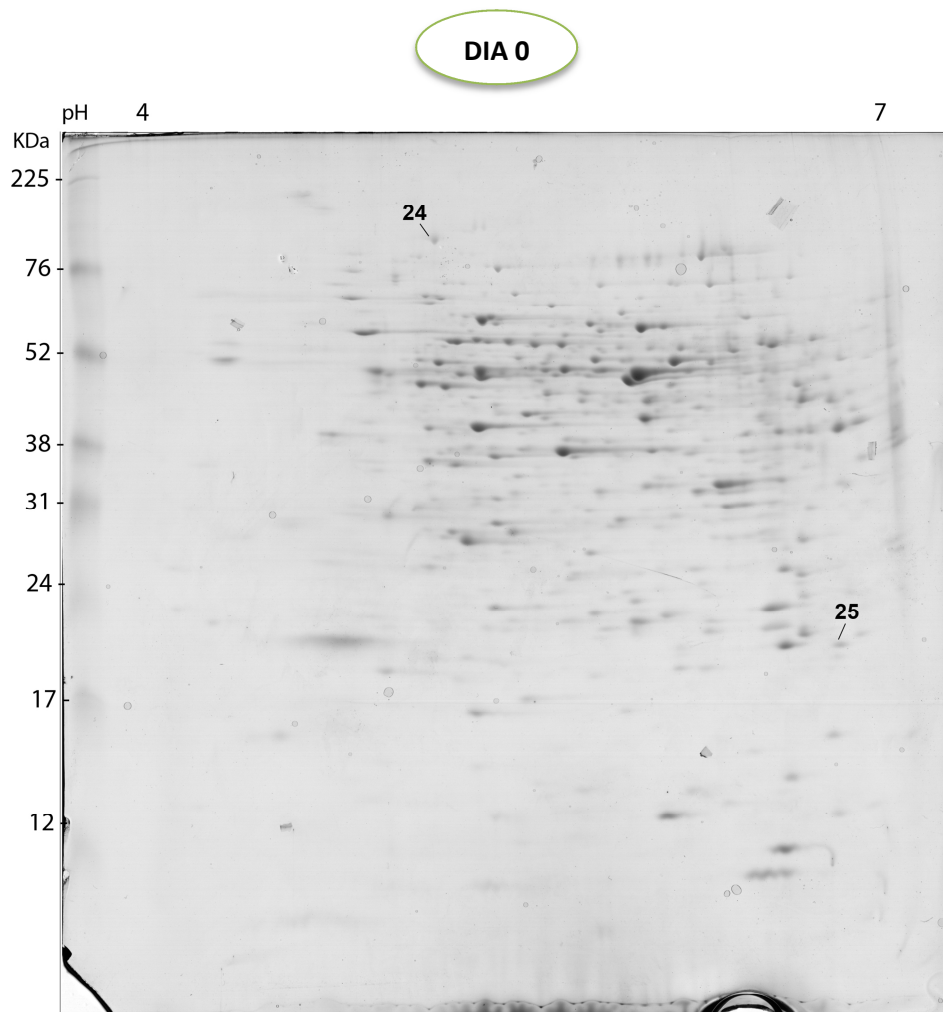


Figura 7. Mapa bidimensional da polpa de *Annona muricata* extraída pelo método Giribaldi et al. (2007) correspondendo ao dia 0 pós colheita. As proteínas foram separadas na primeira dimensão utilizando tiras de IPG na faixa de pH de 4-7. A quantidade de proteínas aplicada foi de 300 μ g. Os géis foram corados com Coomassie brilhante blue

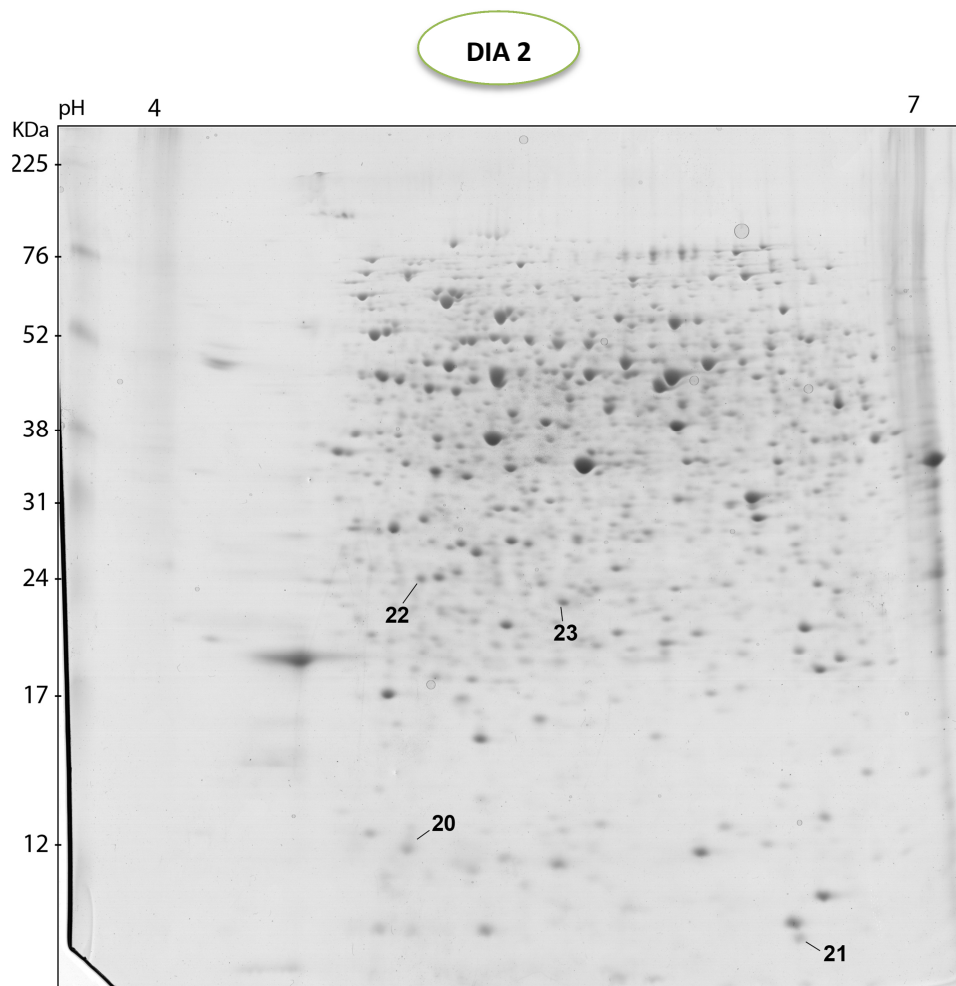


Figura 8. Mapa bidimensional da polpa de *Annona muricata* extraída pelo método Giribaldi et al. (2007) correspondendo ao 2º dia pós colheita. As proteínas foram separadas na primeira dimensão utilizando tiras de IPG na faixa de pH de 4-7. A quantidade de proteínas aplicada foi de 300µg. Os géis foram corados com Coomassie brilhante blue

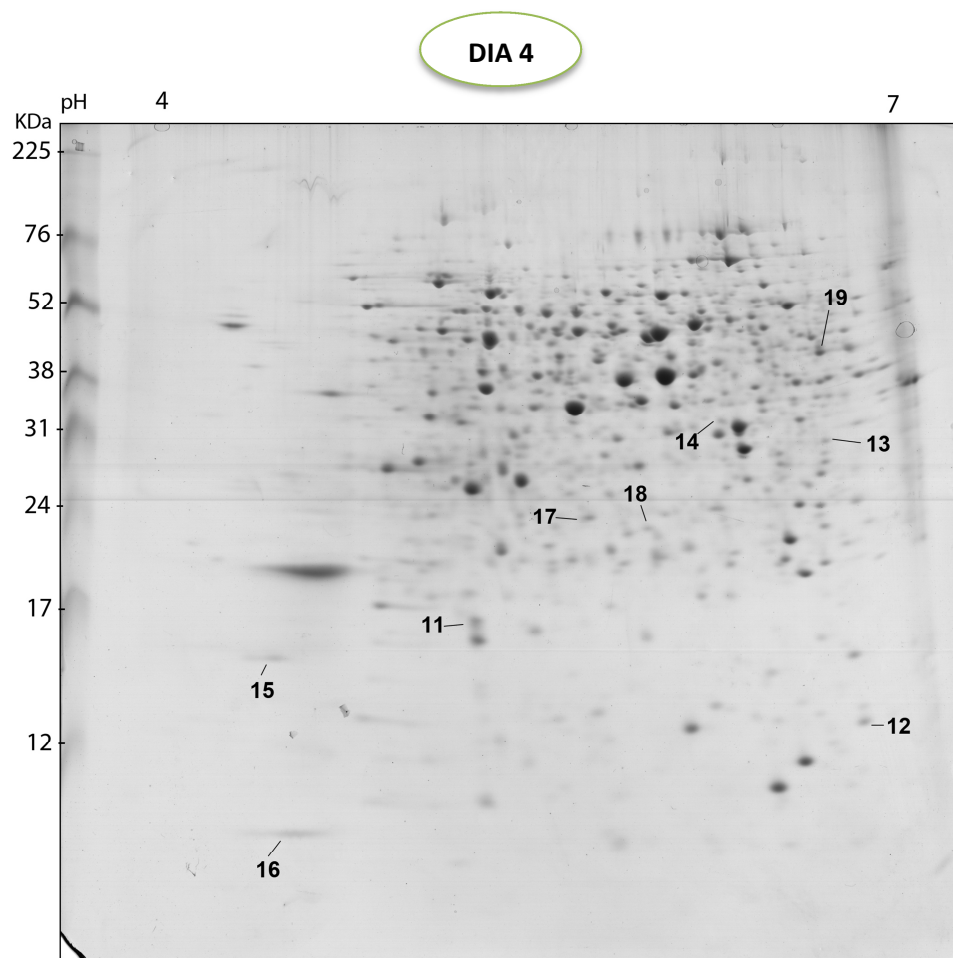


Figura 9. Mapa bidimensional da polpa de *Annona muricata* extraída pelo método Giribaldi et al. (2007) correspondendo ao 4 dia pós colheita. As proteínas foram separadas na primeira dimensão utilizando tiras de IPG na faixa de pH de 4-7. A quantidade de proteínas aplicada foi de 300µg. Os géis foram corados com Coomassie brilhante blue

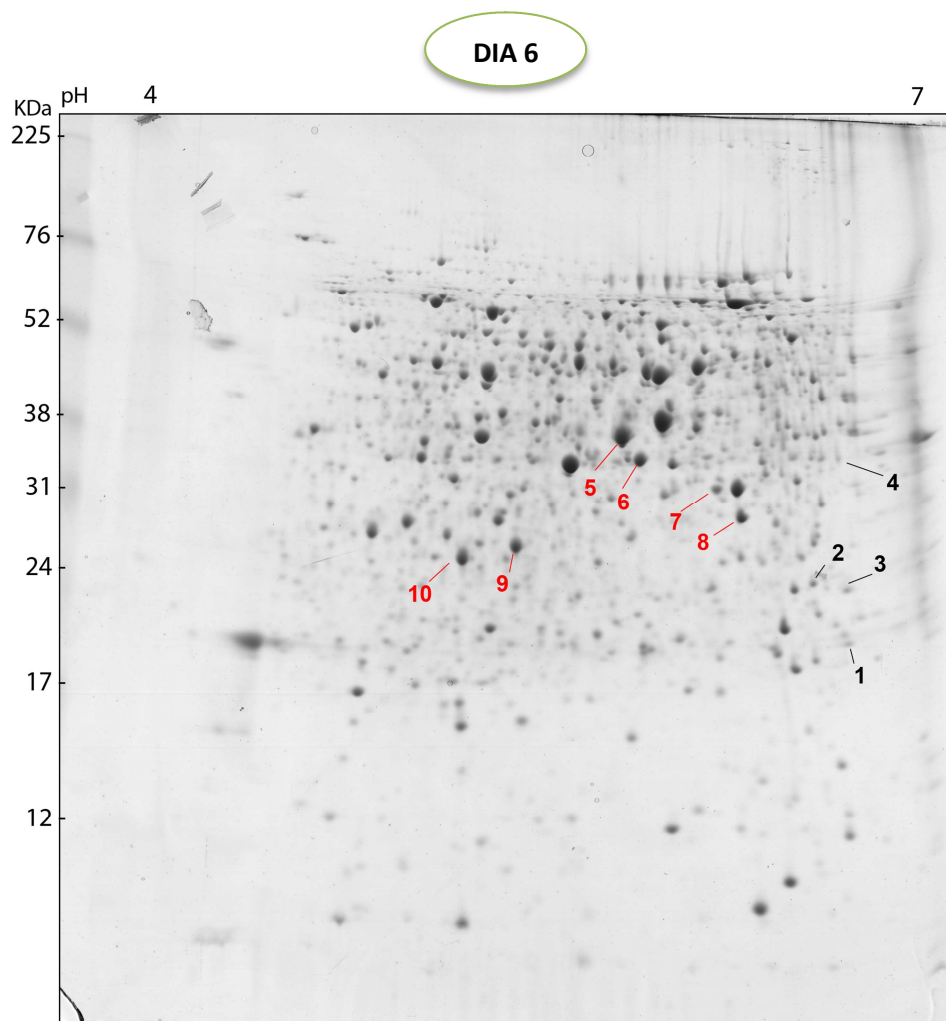


Figura 10. Mapa bidimensional da polpa de *Annona muricata* extraída pelo método Giribaldi et al. (2007) correspondendo ao 6º dia pós colheita. As proteínas foram separadas na primeira dimensão utilizando tiras de IPG na faixa de pH de 4-7. A quantidade de proteínas aplicada foi de 300µg. Os géis foram corados com Coomassie brilhante blue

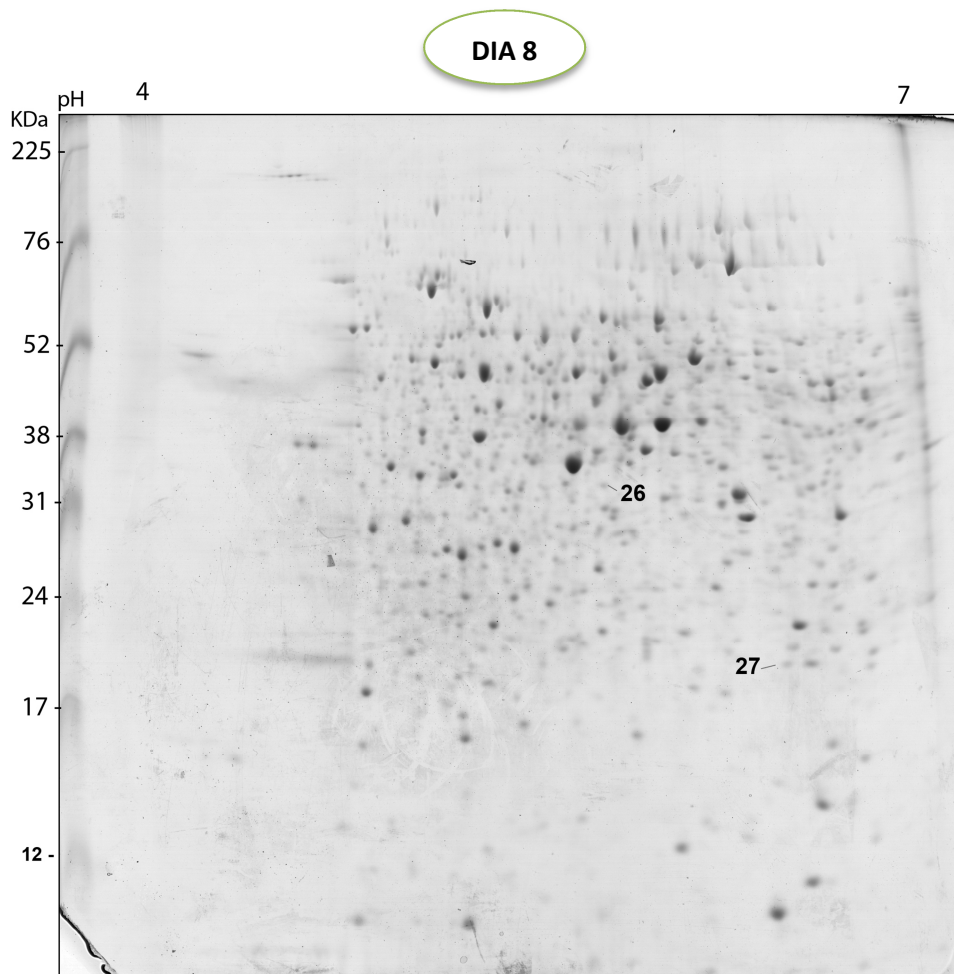


Figura 11. Mapa bidimensional da polpa de *Annona muricata* extraída pelo método Giribaldi et al. (2007) correspondendo ao 8º dia pós colheita. As proteínas foram separadas na primeira dimensão utilizando tiras de IPG na faixa de pH de 4-7. A quantidade de proteínas aplicada foi de 300µg. Os géis foram corados com Coomassie brilhante blue

A adequada preparação de amostra de proteínas, removendo seletivamente os interferentes por meio da precipitação (BERKELMAN; STENSTED, 1998; SHAW; RIEDERER, 2003) é fundamental para a análise de 2D, contudo as vezes as proteínas não sofrem os processos de desnaturação, redução e solubilização corretamente e assim não garante géis com boa resolução.

Os géis que tiveram problemas na corrida não foram utilizados para a análise comparativa, pois perfil encontrava bem diferente dos demais mapas. Logo, as chances de erro durante a análise poderiam aumentar, atrapalhando o resultado final. Comparando-se os números de spots dos diferentes estágios de amadurecimento obtidos para uma mesma faixa de pH 4-7, pode-se observar que o 8 dia apresenta um maior número de proteínas de 31 a 12KDa do que o primeiro dia zero. Estes dados estão de acordo com aqueles apresentados para banana (CARPENTIER et al., 2005), para os quais proteínas obtidas pelo método TCA foram mais bem resolvidas na região próxima a 25 kDa.

Os mapas apresentaram poucas estrias verticais mostrando que o extrato estava livre de sal e outros agregados protéicos (GÖRG et al., 1999). No entanto, os mapas apresentavam algumas estrias horizontais, possivelmente devido à insuficiente solubilização de algumas proteínas mais abundantes ou com maior massa molecular ou sua incompleta focalização na primeira dimensão. Alta carga de proteínas, no qual resulta no carregamento de muitas proteínas dentro da amostra usando as tiras de IPG para a preparação da corrida pode permitir agregação de proteínas. Isto pode resultar em precipitação de proteínas em pontos isoelétricos no qual leva a estrias horizontais. Um longo período de focalização, contaminação com ácido nucleico (GÖRG et al., 1997), componentes fenólicos, carboidratos (CARPENTIER et al., 2008) podem causar estrias horizontais (RABILLOUD, 2000). Mapas com boa resolução não apresentam estrias verticais ou horizontais, facilitando a detecção dos spots para análises posteriores.

5.5 Análise e Prospecção das Proteínas

As análises comparativas dos géis feitas usando a ferramenta Image Master Platinum na versão 7.0 revelaram *spots* diferencialmente expressos nos cinco dias de amadurecimento pós-colheita analisados. Entretanto, essas análises demonstraram que *spots* especificamente expressos nos cinco dias analisados também foram encontrados. Alguns *spots* comuns ou específicos não puderam ser adequadamente selecionados, pois a separação das proteínas não apresentava, em alguns pontos, resolução suficiente. Desta forma, foram selecionados para a identificação 21 *spots* expressos especificamente e 6 *spots* expressos diferencialmente. Os *spots* expressos especificamente foram anotados nos géis com uma seta preta, já os expressos diferencialmente foram anotados com uma seta vermelha (Figuras de 7 a 11)

A presença de 2, 4, 9, 4 e 2 *spots* expressos especificamente foram observadas nos géis dos dias 0, 2, 4, 6 e 8, respectivamente enquanto que os 6 *spots* diferenciais estavam presentes nos dias 2, 4, 6 e 8 (Figuras 10). Os *spots* expressos selecionados foram analisados ainda através da ferramenta Image Master para a obtenção do ponto isoelétrico (pI) e massa molecular (MM) experimentais em cada estágio de amadurecimento do fruto. A seguir, dispendo desses dados, os 21 *spots* específicos e os 6 diferenciais foram analisados quanto a possível identificação protéica através de buscas de pIs e MMs de proteínas de angiospermas nas bases de dados UniProtKB/Swiss-Prot (53.1473 entradas) e UniProtKB/TrEMBL (16.504.022 entradas). Considerando que uma angiosperma tem entre 20.000 e 60.000 genes e embora exista razoável variabilidade entre as espécies, esses dois bancos de dados são bem representativos para inferir sobre a identificação de proteínas na graviola, uma angiosperma basal, da ordem Magnoliales.

Alguns spots foram relacionados com mais de uma proteína encontrada nos bancos de dados. Contudo, cuidado foi tomado para correlacionar as proteínas da polpa de graviola com proteínas de funções conhecidas no processo do amadurecimento de frutos em outras angiospermas e assim se chegar a uma inferência.

As proteínas inferidas estão listadas na tabela 4 de acordo com a numeração dos *spots* específicos e diferenciais (1 a 27) da polpa de graviola. Cada *spot* com seu pI e MM experimentais de graviola está correlacionado com o pI/MM de proteínas de angiospermas de função conhecida, predita ou hipotética Tabela 4.

Tabela 4. Lista das proteínas inferidas da polpa de *Annona muricata* durante o amadurecimento.

Spot	pI	Massa Molecular (Da)	Proteína Identificada em Angiospermas	pI/MM da proteína	Acesso no Protein Knowledgebase (UniprotKB)	Função metabólica
1	6,82	21791	Ethylene-responsive transcription factor WIN1 (Arabidopsis)	pI: 6.85, Mw: 21696	WIN1_ARATH (Q9XI33)	Via de sinalização de ETILENO (fator de transcrição)
2	6,65	26053	Nuclear transcription factor Y subunit B- 6 (Arabidopsis)	pI: 6.66, Mw: 26136	NFYB6_ARATH (Q84W66)	Via de sinalização do ÁCIDO ABSCÍSICO (fator de transcrição)
			Trichome differentiation protein GL1 (Arabidopsis)	pI: 6.66, Mw: 26113	GL1_ARALY (Q947R4)	
3	6,79	23306	GATA transcription factor 19 (Arabidopsis)	pI: 6.79, Mw: 23319	GAT19_ARATH (Q6QPM2)	Fator de transcrição
			Cytochrome b-c1 complex subunit Rieske-4, mitochondrial Nicotiana tabacum (Common tobacco)	pI: 6.63, Mw: 23314	UCRI4_TOBAC (P51134)	Subunidade do Complexo III (cadeia transportadora de elétrons)
4	6,74	36702	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (soybean)	pI: 6.73, Mw: 36764	Q2I0H4_SOYBN (Q2I0H4)	Metabolismo dos carboidratos (via glicolítica)
			Glyceraldehyde-3-dehydrogenase C subunit	pI: 6.73, Mw: 36724	Q07CZ3_SOYBN (Q07CZ3)	

5	5,86	38986	Bifunctional dihydroflavonol 4-reductase/flavanone 4-reductase Pyrus communis (Pear)	5,9 / 38674 pI: 5.86, Mw: 38934	DFRA_PYRCO (Q84KP0)	Biossíntese de Flavanóides
			Cinnamyl alcohol dehydrogenase Citrus sinensis (Sweet orange)	pI: 5.89, Mw: 38927	A2IB51_CITSI (A2IB51)	
			Cinnamyl alcohol dehydrogenase Populus tomentosa (Chinese white poplar)	pI: 5.86, Mw: 38958	B3VKY7_POPTO (B3VKY7)	
			Cinnamyl alcohol dehydrogenase Capsicum annuum (Bell pepper)	pI: 5.83, Mw: 39022	B5LAT8_CAPAN (B5LAT8)	
6	5,95	36520	Cinnamyl alcohol dehydrogenase 2 ^a Festuca arundinacea	pI: 5.89, Mw: 38913	Q947S1_FESAR (Q947S1)	Defesa de planta
			Polygalacturonase-inhibiting protein Pyrus pyrifolia (Chinese pear)			

			cinnamoyl-CoA reductase Eucalyptus pilularis	pI: 5.96, Mw: 36498	D0VVE7_PYRPY (D0VVE7)	
			but three proteins related to phenolic compounds metabolism, cinnamyl-alcohol dehydrogenase 5, cinnamyl-alcohol dehydrogenase 1, and chorismate mutase,	pI: 5.94, Mw: 36584	D5FQ75_9MYRT (D5FQ75)	
7	6,25	32740	Alternative oxidase 1c, mitochondrial Arabidopsis thaliana Aldo/keto reductase,	pI: 6.19, Mw: 32847	AOX1C_ARATH (O22048)	Respiração alternativa mitocondrial
8	6,34	31154	putative Ricinus communis (Castor bean)	pI: 6.33, Mw: 31235	B9REP9_RICCO (B9REP9)	
9	5,45	28557	Malate dehydrogenase Ricinus communis (Castor bean)	pI: 5.44, Mw: 28576	B9T5E3_RICCO (B9T5E3)	Metabolismo dos carboidratos
10	5,24	27741	Ethylene-responsive transcription factor RAP2-3 (Arabidopsis)	pI: 5.22, Mw: 27758	RAP23_ARATH (P42736)	Via de sinalização de ETILENO (fator de transcrição)
			Caffeoyl-CoA O-methyltransferase 2	pI: 5.28, Mw: 27764		

			Eucalyptus globulus (Blue gum)		CAMT2_EUCGL (Q9SWB8)	
11	5,31	15924	Polcalcin Ricinus communis (Castor bean)	pI: 5.31, Mw: 15912	B9SC49_RICCO (B9SC49)	
12	6,85	12742	Dolichol-phosphate mannosyltransferase	pI: 6.82, Mw: 12759	B4FHW9_MAIZE (B4FHW9)	
13	6,71	28709	Tropinone reductase Solanum tuberosum (Potato)	pI: 6.76, Mw: 28677 pI: 6.74, Mw: 28744	Q9AR59_SOLTU (Q9AR59) Q9M3N1_SOLTU (Q9M3N1)	
			Peroxidase 59 (Arabidopsis)			
				pI: 6.35, Mw: 32016	PER59_ARATH (Q39034)	
14	6,30	32051	Class III peroxidase 47 Oryza sativa	pI: 6.33, Mw: 31992	Q5U1P6_ORYSJ (Q5U1P6)	Processo catabólico do H2O2
			Alternative oxidase, mitochondrial (Sauromatum guttatum)	pI: 6.11, Mw: 32201	AOX1_TYPVN (P22185)	
15	4,51	14805	Acyl carrier protein Zea mays (Maize)	pI: 4.51, Mw: 14835	B6UIR7_MAIZE (B6UIR7)	Biossíntese de Ácidos graxos
16	4,55	9865	Acyl carrier protein 1, mitochondrial Arabidopsis thaliana	pI: 4.42, Mw: 9827	ACPM1_ARATH (P53665)	Biossíntese de Ácidos graxos

			Acyl carrier protein Zea mays (Maize)	pI: 4.32, Mw: 9912	B6U944_MAIZE (B6U944)	
17	5,76	23545	Lactoylglutathione lyase Zea mays (Maize)	pI: 5.72, Mw: 23556	B6UGW8_MAIZE (B6UGW8)	
18	6,03	21808	Germin-like protein 2-4 Oryza sativa subsp. japonica (Rice)	pI: 6.11, Mw: 21790	GL24_ORYSJ (Q6ESF0)	Defesa de planta
19	6,69	42326	Flavin-containing monooxygenase	pI: 6.73, Mw: 42387	YUC10_ARATH (Q9FVQ0)	Biossíntese de auxina
20	5,02	12415	UDP-glucosyltransferase Ricinus communis (Castor bean)	pI: 5.28, Mw: 12417	B9S0C2_RICCO (B9S0C2)	Transferência de grupos hexosil
21	6,52	10439	NADH-ubiquinone oxidoreductase fe-s protein Ricinus communis (Castor bean)	pI: 6.49, Mw: 10406	B9TA68_RICCO (B9TA68)	Atividade NADH dehydrogenase (ubiquinona)
22	5,07	24719	Ethylene-responsive transcription factor 1B (ERF1B) Arabidopsis thaliana	pI: 5.03, Mw: 24695	ERF92_ARATH (Q8LDC8)	Indução por Etileno, jasmonato, Ácido salicílico (SA)
23	5,62	22901	Ubiquinone biosynthesis protein Ricinus communis (Castor bean)	pI: 5.67, Mw: 22871	B9REC5_RICCO (B9REC5)	Processo de biossíntese da ubiquinona
24	5,22	115565	Calcium-transporting	pI: 5.36, Mw:	ECA2_ARATH (O23087)	Transporte de cálcio

			ATPase 2, endoplasmic reticulum-type Arabidopsis thaliana	115831		
25	6,82	18815	-			
26	5,83	32484	Triosephosphate isomerase Zea mays (Maize)	pI: 6.15, Mw: 32481	B4F820_MAIZE (B4F820)	Metabolismo dos carboidratos (via glicolítica)
27	6,54	19354	Ethylene-responsive transcription factor ERF071 Arabidopsis thaliana	pI: 6.41, Mw: 19347	ERF71_ARATH (O22259)	Via de sinalização de ETILENO (fator de transcrição)

As proteínas inferidas revelaram possíveis vias metabólicas ativas durante o amadurecimento pós-colheita da graviola. Em frutos verdes (tempos 0 e 2º dias), as proteínas específicas/diferenciais foram relacionadas com transdução de sinal, metabolismo respiratório, transporte e síntese de proteínas. Já em frutos maduros/senescentes (4º, 6º e 8º dias) foram encontradas proteínas relacionadas com defesa, energia, transporte, transdução de sinal, metabolismo secundário e metabolismo respiratório (Tabela 4).

Entre as proteínas identificadas, 4 delas foram relacionadas com fatores de transcrição responsivos ao hormônio etileno, spots 1º, 10º que estão presentes no 6 dia, spot 22º que está presente no 2 dia e spot 27º que está presente no 8 dia (Figuras 8, 10 e 11) indicando que este hormônio estaria atuando em diferentes fases do processo de amadurecimento pós-colheita da graviola. Sabe-se que o etileno está envolvido na indução do início do amadurecimento (PRASANNA; PRABHA; THARANATHAN, 2007) em frutos climatéricos. O processo se inicia com a transdução do sinal, no qual o etileno se liga em célula alvo através de receptores, desencadeando a ativação de fatores de transcrição e indução de genes relacionados ao etileno (GIOVANNONI, 2004). Fatores de transcrição responsivos ao etileno (ERFs) são proteínas que respondem a sinais extracelulares para modular a expressão gênica positivamente ou negativamente (GU et al., 2002). Estudos com ameixa revelaram que o próprio acúmulo de *ERFs* estava relacionado com uma produção diferenciada de etileno durante o amadurecimento do fruto (EL-SHARKAWY et., 2009). Desta forma, podemos sugerir que a presença de fatores de transcrição responsivos ao etileno durante a transição de fruto verde para maduro na graviola pode estar ligada a produção de etileno, levando a indução de genes relacionados com o amadurecimento do fruto.

As transformações iniciadas pelo etileno provocam mudanças nas características organolépticas do fruto e isso é acompanhado pelo aumento, diminuição ou constância das vias metabólicas no tecido vegetal. Na graviola foi inferida a presença da peroxidase (spot 14, Tabela 4) no 4º dia de maturação. De acordo com LIMA et al. (2002) essa proteína foi encontrada no fruto da graviola até o 4º dia de amadurecimento e a sua atividade foi aumentada nesse período. A peroxidase (POD) está relacionada com as mudanças na cor, variações de aroma, alterações no teor de vitaminas e mudanças na textura (KAO, 2003; CAMPOS et al., 2004; MACIEL et al., 2007). Além disso, a peroxidase funciona protegendo os tecidos vegetais contra os efeitos tóxicos do H₂O₂, formado durante o metabolismo celular. As peroxidases (PODs) estão localizadas nas células das frutas na forma parcialmente solúvel no citoplasma e parcialmente insolúvel quando ligada covalentemente e ionicamente à parede

das células (CLEMENTE, 1998). No período de maturação, há um aumento da atividade enzimática devido ao aumento da solubilidade da enzima (LAURENTE; CLEMENTE, 2005) promovendo maiores mudanças no amadurecimento do fruto. Portanto, ela tem sido considerada uma das principais enzimas responsáveis pela qualidade e deterioração em muitos frutos (MELLO; CLEMENTE, 1996). Outra proteína identificada, relacionada com características organoléptica foi a cinamil álcool desidrogenase (CAD) (spot 5, Tabela 4). Essa enzima está envolvida na biossíntese de compostos aromáticos (MITCHELL; JELENKOVIC 1995). Além disso, ela está relacionada com o desenvolvimento e defesa da planta contra estresses abióticos e bióticos (KIEDROWSKI et al., 1992; MITCHELL et al., 1994; RAES et al. 2003).

Ao longo do amadurecimento ocorrem alterações bioquímicas que podem desencadear um processo de estresse, induzindo a expressão de proteínas relacionadas à resposta ao estresse como as proteínas de defesa. A proteína *germin-like* (GLPs) (spot 18) foi inferida estar presente no 4º dia do amadurecimento. De acordo com EL-SHARKAWY et al. (2010) essa proteína está relacionada com a defesa e a sua acumulação no amadurecimento do fruto parece ser regulada pelo etileno. Outra proteína relacionada à defesa de acordo com a literatura é a proteína inibidora da poligalacturonase (PGIP) (MATTEO et al., 2006). No referido estudo tal proteína (spot 6, Tabela 4) foi inferida ser expressa diferencialmente no 6º dia do amadurecimento. As PGIPs são glicoproteínas encontradas em plantas interagindo com poligalacturonase (PG) secretada por microrganismos patogênicos. As poligalacturonases são enzimas que degradam o ácido poligalacturônico na parede celular. As PGIPs sintetizadas pelas plantas retardam as funções das poligalacturonases (PG), prevenindo a degradação da parede e limitando o crescimento de patógenos na planta (OESER et al., 2002). Os frutos maduros, nos quais tem sido observada uma menor expressão de PGIPs, são mais suscetíveis ao ataque de patógenos (LORENZO et al., 2001; DI et al. 2006). O possível aumento de PGIPs no 6º dia de amadurecimento da graviola pode indicar o aparecimento de patógenos contribuindo ainda mais para a degradação do fruto em fase avançada de amadurecimento.

Algumas proteínas foram relacionadas com a ativação de enzimas do metabolismo energético como enzimas da via glicolítica, ciclo de Krebs e cadeia transportadora de elétrons (CTE). A glicólise é uma via central do metabolismo, pois quando as demandas energéticas aumentam subitamente, a glicose é oxidada para produzir energia na forma de ATP. Na glicólise, várias reações são catalisadas por uma sequência de 10 enzimas para liberar duas moléculas do piruvato. Entre essas enzimas estão a triose-fosfato isomerase (spot 26), e a

Gliceraldeído 3 fosfato desidrogenase (spot 4), que foram inferidas aqui estar presentes no amadurecimento da graviola. A triose-fosfato isomerase participa convertendo diidroxiacetona fosfato em gliceraldeído-3-fosfato. ROCCO et al. (2006) observou um aumento dos níveis dessa enzima no tomate maduro. Já a Gliceraldeído 3 fosfato desidrogenase catalisa uma etapa subsequente da via glicolítica convertendo gliceraldeído 3 fosfato em bifosfoglicerato. Em uva, um fruto não climatérico, os teores dessa enzima são aumentados no fruto verde (GIRIBALDI et al., 2007). Tal diferença em relação aos resultados de graviola, apresentados nesse estudo, pode ser justificado devido a graviola ser um fruto climatérico e a regulação da via glicolítica ser mais necessária no amadurecimento que é acompanhado por um pico respiratório típico.

A malato desidrogenase (spot 9) foi identificada no 6º dia de amadurecimento. Alguns estudos têm relacionado tais proteínas com o amadurecimento de frutos. TAUREILLES-SAUREL *et al.* (1995) observaram que a atividade da malato desidrogenase foi elevada em bagas de uva durante o amadurecimento. ROCCO et al. (2006) identificou malato desidrogenase aumentada em um cultivar de tomate maduro. Por outro lado, GIRIBALDI et al. (2007) identificaram a malato desidrogenase, mas houve pouca mudança durante o desenvolvimento da uva. A malato desidrogenase apresenta isoformas citossólicas e mitocondriais.

O aumento da malato desidrogenase (MDH) mitocondrial no amadurecimento pode ser explicado quando avaliamos a sua participação no metabolismo respiratório. Nas mitocôndrias, a malato desidrogenase atua na reação final do ciclo de Krebs reduzindo NAD a NADH e gerando oxaloacetato (OAA) que deve ser regenerado ao final de cada volta (MARZZOCO; TORRES, 2007). A produção de OAA deve ser capaz de reagir com outro acetil-CoA e continuar o ciclo de Krebs, o NADH produzido será oxidado na fosforilação oxidativa para produção de ATP (TAIZ; ZEIGER, 2004). Já no citoplasma, a enzima malato desidrogenase (MDH) catalisa a reação de OAA para malato produzindo NAD^+ que é necessário para a glicólise. No entanto, se o malato citosólico é transportado para o vacúolo, então a atividade MDH citosólica será de conduzir a síntese de malato, a partir de OAA, até que o equilíbrio seja restabelecido. Levando-se em consideração que, o ácido málico aumenta durante o amadurecimento da graviola (LIMA et al., 2002). A malato desidrogenase parece funcionar no sentido da síntese de ácido málico, que influenciará na qualidade organoléptica da fruta madura. A glicólise e o ciclo de Krebs são vias do metabolismo primário da célula, portanto não é de surpreender que estas proteínas estejam presentes em um processo com um

alto requerimento energético como é o amadurecimento. Essas vias estão ativas no amadurecimento produzindo substrato para a cadeia de elétrons mitocondrial.

Após a colheita do fruto, a respiração torna-se um dos mais importantes processos fisiológicos em frutos climatéricos. A mitocôndria desempenha um importante papel no metabolismo energético, sendo responsável por um pico característico de liberação de CO₂ durante o amadurecimento. Então, nesse contexto, se justifica a participação de enzimas da via glicolítica, do ciclo de Krebs, bem como da CTE encontradas como possíveis enzimas envolvidas no amadurecimento da graviola.

Como enzimas da CTE envolvidas no amadurecimento da graviola pode-se inferir sobre a presença da NADH ubiquinona oxidoreductase (spot 21), componente do complexo I da CTE, localizado na membrana interna da mitocôndria. O complexo I (NADH: quinona oxidoreductase) é um ponto de entrada para elétrons na cadeia de transporte de elétrons. Na mitocôndria o complexo I oxida NADH regenerando o NAD⁺ para a matriz mitocondrial. Os dois elétrons da oxidação do NADH vão reduzir a UQ (ubiquinona) para UQH₂ (ubiquinol) na membrana interna. O complexo I é cada vez mais reconhecido como um dos principais contribuintes para a formação de ROS (espécies reativas de oxigênio). No amadurecimento também foi identificada proteínas da biossíntese da ubiquinona (spot 23). As cadeias laterais de ubiquinona são produzidas através da via dos isoprenoides. Na verdade, a biossíntese de isoprenóides envolve o movimento de acetil CoA entre mitocôndria e citoplasma. O acetil CoA utilizado no citoplasma para a biossíntese do isopentenil difosfato (IPP) é derivado a partir do citrato, que vem do piruvato a partir da glicólise. Este citrato é transferido para o citoplasma e então transformado em oxaloacetato e Acetil-CoA, que podem então ser incorporados em mevalonato, e, portanto, em IPP e assim formando a cadeia prenil de ubiquinona.

Curiosamente, além da NADH ubiquinona oxidoreductase e de um possível aumento de ubiquinona disponível, também foi inferida a expressão diferencial da oxidase alternativa (AOX) (spot 7) ao longo do amadurecimento da graviola caracterizando assim a participação da via alternativa de transporte de elétrons mitocondrial. A via alternativa de transporte de elétrons é uma via não fosforilante, e tem na oxidase alternativa (AOX) seu principal ponto de modulação. A explosão respiratória típica do processo de amadurecimento de frutos climatéricos tem sido associada principalmente a presença dessa via alternativa de elétrons (ALMEIDA et al., 1999; CONSIDINE et al., 2001; BRASIL, 2002).

A via alternativa de transporte de elétrons mitocondrial foi muito bem caracterizada em polpa de graviola durante o amadurecimento pós-colheita (0 a 8 dias) por BRASIL et al. (2002). O referido autor estudou essa via de transporte de elétrons através da atividade da AOX, que se apresentou ser no mínimo 2 vezes maior em mitocôndrias de polpa de fruto maduro quando comparada a de fruto verde. O pico de produção de CO₂ e etileno foram coincidentes com o climatérico respiratório, e ocorreu ao mesmo tempo em que o aumento do consumo de oxigênio pela via alternativa. BRASIL et al. (2002) através de resultados de immunoblottings, revelaram a presença de uma banda protéica 34 k Da em frutos de até 4 dias pós-colheita. Em frutos do 5^o ao 8^o dia pós-colheita (senescência), 3 proteínas com massas moleculares aparentes de 32, 34 e 36 kDa foram observadas. Tais bandas foram relacionadas com a possível existência de uma família multigênica da AOX diferentemente expressa durante o amadurecimento da graviola. Nos resultados obtidos através do presente estudo, a proteína AOX obtida por inferência de pI e MM apresentava uma massa molecular de 32740 Da (spot 7) que é aproximadamente coincidente com a massa molecular de uma das bandas de AOX detectadas por BRASIL et al. (2002). Então, assim como observado por BRASIL et al. (2002), os resultados presentes, também sugerem uma participação da via alternativa de elétrons no amadurecimento climatérico da graviola, contudo com a regulação dessa via pode envolver além da AOX, quantidade de ubiquinona e ou de outros componentes da via como a NADH ubiquinona oxidoreductase.

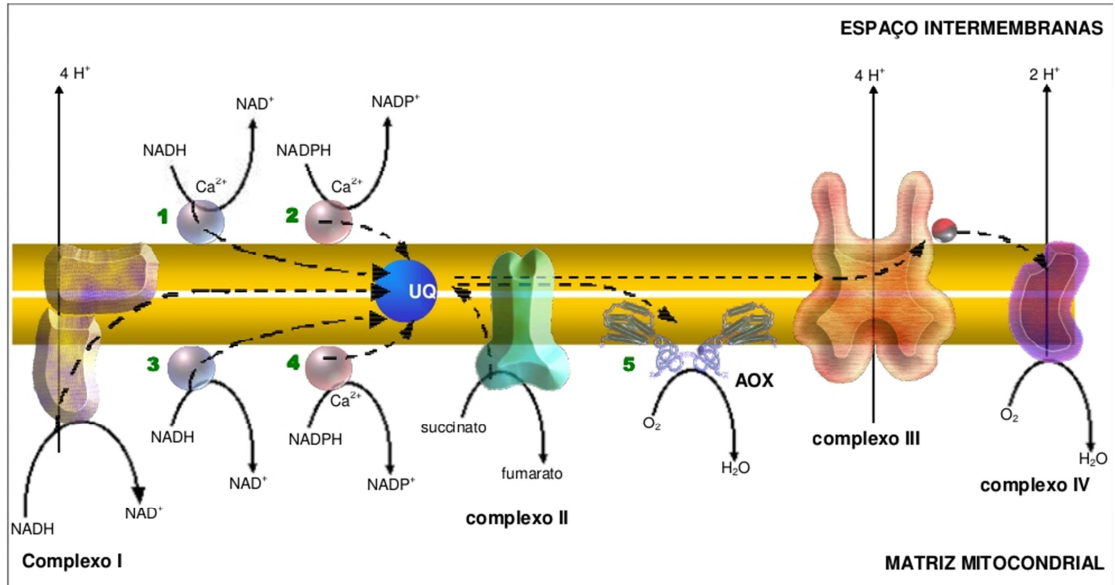


Figura 12. Organização da cadeia respiratória de plantas. A oxidase alternativa (AOX) está representada no número 5. Fonte: MARIANO, 2005

6 CONCLUSÃO

Neste estudo, o método de extração de proteínas selecionado para polpa da graviola permitiu gerar mapas bidimensionais reprodutíveis, sendo possível a análise comparativa dos mapas em diferentes estádios de maturação.

A partir dos mapas bidimensionais foi possível prospectar e inferir sobre as proteínas relacionadas ao amadurecimento através de buscas em banco de dados *UniProtKB/Swiss-Prot* e *UniProtKB/TrEMBL*. Entre as proteínas inferidas estavam algumas envolvidas na regulação pelo etileno, defesa do fruto e metabolismo energético onde foram expressas mais fortemente, mostrando que essas vias são ativas e fundamentais durante o amadurecimento.

Os resultados observados no presente estudo também reforçam sobre uma participação da via alternativa de elétrons no amadurecimento climatérico da graviola, entretanto, além da oxidase alternativa (AOX), outros componentes parecem participar da regulação dessa via como: quantidade de ubiquinona e ou expressão da NADH ubiquinona oxidoreductase.

A investigação iniciada neste trabalho revela possíveis proteínas alvo para aplicação de estratégias bioquímicas e ou moleculares no controle do amadurecimento pós-colheita da graviola.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, A. M. JARMUSZKIEWICZ, W. KHOMSI, H. *et al.* Cyanide-resistant, ATP-synthesis-sustained, and uncoupling-protein-sustained respiration during postharvest ripening of tomato fruit. **Plant Physiology**, v. 119, n. 4, p. 1323, 1999.
- ANTONIA MARÍN, M. CANO, P.; FÜSTER, C. Freezing preservation of four Spanish mango cultivars (*Mangifera indica* L.): chemical and biochemical aspects. **Zeitschrift fur Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung**, v. 194, n. 6, p. 566-569, jun 1992.
- AZIZ, P. A.; YUSOF, S. Physico-chemical characteristics of soursop fruit (*Annona muricata*) during growth and development. **ASEAN Food Journal**, v. 9, n. 4, p. 147-150, 1994.
- BAE, M. S. CHO, E. J. CHOI, E. Y.; PARK, O.K. Analysis of the Arabidopsis nuclear proteome and its response to cold stress. **The Plant Journal**, v. 36, n. 5, p. 652–663, 2003.
- BARBOSA, Z. SOARES, I.; CRISÓSTOMO, L. A. Crescimento e absorção de nutrientes por mudas de gravioleira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 25, n. 3, p. 519–522, 2003.
- BARRACLOUGH, D. A general method for two-dimensional protein electrophoresis of fruit samples. **Postharvest Biology and Technology**, v. 32, n. 2, p. 175-181, maio 2004.
- BERKELMAN, T.; STENSTED, T. **2-D electrophoresis using immobilized pH gradients: principles and methods**. Sweden: Amersham Biosciences Inc., 1998. p. 100
- BIALE, J. B.; BARCUS, D. E. Respiratory patterns in tropical fruits of the Amazon Basin. **Tropical Science**, v. 12, n. 2, p. 93-104, 1970.
- BIANCO, L. LOPEZ, L. SCALONE, A. G. *et al.* Strawberry proteome characterization and its regulation during fruit ripening and in different genotypes. **Journal of proteomics**, v. 72, n. 4, p. 586–607, 2009.
- BLACKSTOCK, W. P.; WEIR, M. P. Proteomics: quantitative and physical mapping of cellular proteins. **Trends in biotechnology**, v. 17, n. 3, p. 121–127, 1999.
- BLANKE, M. M.; LENZ, F. Fruit photosynthesis. **Plant, Cell and Environment**, v. 12, n. 1, p. 31-46, jan 1989.
- BONGHI, C.; TRAINOTTI, L. Genomic tools for a better understanding of the fruit ripening process. **Stewart Postharvest Review**, v. 2, n. 2, p. 1–10, 2006.
- BOUCHERIE, H. DUJARDIN, G. KERMORGANT, M. *et al.* Two-dimensional protein map of *Saccharomyces cerevisiae*: construction of a gene-protein index. **Yeast (Chichester, England)**, v. 11, n. 7, p. 601-13, 15 jun 1995.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, p. 248-54, 7 maio 1976.

BRASIL, I. M. **Tese de doutorado**. Universidade Federal do Ceará, Ceará, Brasil. 2001.

BRASIL, I. M. MAIA, G. A. FIGUEIREDO, R. W. DE; *et al.* Participation of Alternative Oxidase in the Postharvest Ripening of Soursop Fruit (*Annona muricata*). **Proc. Interamer. Soc. Trop.**, v. 47, p. 119--121, 2003.

BRON, I. U. JACOMINO, A. P.; PINHEIRO, A. L. Influence of ripening stage on physical and chemical attributes of "Golden" papaya fruit treated with 1-Methylcyclopropene. **Bragantia, Campinas**, v. 65, p. 553–558, 2006.

BROWNLEADER, M. JACKSON, P. MOBASHERI, A. *et al.* Molecular aspects of cell wall modifications during fruit ripening. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 39, n. 2, p. 149–164, 1999.

BRUINSMA, J.; PAULL, R. E. Respiration during postharvest development of soursop fruit, *Annona muricata* L. **Plant physiology**, v. 76, n. 1, p. 131, 1984.

CALEGARIO, F. COSSO, R.; FAGIAN, M. Stimulation of potato tuber respiration by cold stress is associated with an increased capacity of both plant uncoupling mitochondrial protein (PUMP) and alternative. **Jornal Bioenergetics and Biomembranes**, v. 35, n. 3, p. 211-220, 2003.

CAMPOS, V. CAMPOS, J. SILVA, L. DUTRA, M.; ZAMBOLIM, L. Manejo de doenças causadas por nematóides em frutíferas. **Manejo integrado: fruteiras tropicais-doenças e pragas. Viçosa, MG: Suprema Gráfica e Editora**, p. 185–238, 2002.

CAMPOS, Â. D. FERREIRA, A. G. HAMPE, M. M. V. *et al.* Atividade de peroxidase e polifenoloxidase na resistência do feijão à antracnose. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, 2004.

CARPENTIER, S. C. S. C. WITTERS, ERWIN; LAUKENS, KRIS; *et al.* Preparation of protein extracts from recalcitrant plant tissues: an evaluation of different methods for two-dimensional gel electrophoresis analysis. **Proteomics**, v. 5, n. 10, p. 2497-507, jul 2005.

CARPENTIER, S. C. PANIS, B. VERTOMMEN, A. *et al.* Proteome analysis of non-model plants: A challenging but powerful approach. **Mass spectrometry reviews**, v. 27, n. 4, p. 354–377, 2008.

CHANG, J. REMMEN, H. VAN; CORNELL, J. RICHARDSON, A.; WARD, W. F. Comparative proteomics: characterization of a two-dimensional gel electrophoresis system to study the effect of aging on mitochondrial proteins. **Mechanisms of ageing and development**, v. 124, n. 1, p. 33–41, 2003.

CHANG, W. W. P. HUANG, L. SHEN, M. *et al.* Patterns of protein synthesis and tolerance of anoxia in root tips of maize seedlings acclimated to a low-oxygen environment, and identification of proteins by mass spectrometry. **Plant Physiology**, v. 122, n. 2, p. 295, 2000.

CHAVES, D. F. S. **Análise proteômica das estirpes selvagem, ntrC-e nifA-de Herbaspirillum seropedicae**. [S.l.]: Curitiba,, 2004.

CHEVALLET, M. SANTONI, V. POINAS, A. *et al.* New zwitterionic detergents improve the analysis of membrane proteins by two-dimensional electrophoresis. **Electrophoresis**, v. 19, n. 11, p. 1901–1909, 1998.

CLEMENTE, E. Purification and thermostability of isoperoxidase from oranges. **Phytochemistry**, v. 49, n. 1, p. 29–36, 1998

CLERO, L. DI; BELLATO, C. PROTEOMA-Avanços Recentes em Técnicas de Eletroforese Bidimensional e Espectrometria de Massa. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, v. 29, p. 158–164, 2002.

CONSIDINE, M.; DALEY, D. The expression of alternative oxidase and uncoupling protein during fruit ripening in mango. **Plant Physiology**, v. 126, p. 1619–1629, 2001.

CORRÊA, M. P. Dicionário de plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. **Ministério da Agricultura – IBDF**, 1984.

CRUZ, F. L. BARETTO, W. S. MUNIZ, W. S. *et al.* **Caracterização físico-química de três tipos de graviola (*Annona muricata* L.)**. Resumos do XVI Congresso Brasileiro de Fruticultura. **Anais**. 2000.

CRUZ-HERNÁNDEZ, A.; GÓMEZ-LIM, M. A. Alternative oxidase from mango (*Mangifera indica*, L.) is differentially regulated during fruit ripening. **Planta**, v. 197, n. 4, p. 569–576, 1995.

CURTO, M. CAMAFEITA, E. LOPEZ, J. A. *et al.* A proteomic approach to study pea (*Pisum sativum*) responses to powdery mildew (*Erysiphe pisi*). **Proteomics**, v. 6 Suppl 1, p. S163-74, abr 2006.

DAMERVAL, C. VIENNE, D. DE; ZIVY, M.; THIELLEMENT, H. Technical improvements in two-dimensional electrophoresis increase the level of genetic variation detected in wheat-seedling proteins. **Electrophoresis**, v. 7, n. 1, p. 52-54, 1986.

DANI, V. SIMON, W. J. DURANTI, M.; CROY, R. R. D. Changes in the tobacco leaf apoplast proteome in response to salt stress. **Proteomics**, v. 5, n. 3, p. 737–745, 2005.

DI, C. ZHANG, M.; XU, S. Role of poly-galacturonase inhibiting protein in plant defense. **Critical reviews in**, 2006.

DOMINGUEZ-PUIGJANER, E. VENDRELL, M.; LUDEVID, M. D. Differential protein accumulation in banana fruit during ripening. **Plant Physiology**, v. 98, n. 1, p. 157–162, 1992.

EL-SHARKAWY, I. SHERIF, S. MILA, I. BOUZAYEN, M.; JAYASANKAR, S. Molecular characterization of seven genes encoding ethylene-responsive transcriptional factors during plum fruit development and ripening. **Journal of experimental botany**, v. 60, n. 3, p. 907-22, jan 2009.

EL-SHARKAWY, I. MILA, I. BOUZAYEN, M.; JAYASANKAR, S. Regulation of two germin-like protein genes during plum fruit development. **Journal of experimental botany**, v. 61, n. 6, p. 1761-70, jun 2010.

FAUROBERT, MIREILLE; MIHR, C. BERTIN, N. *et al.* Major proteome variations associated with cherry tomato pericarp development and ripening. **Plant physiology**, v. 143, n. 3, p. 1327-46, mar 2007.

FLENGSRUD, R.; KOBRO, G. A method for two-dimensional electrophoresis of proteins from green plant tissues. **Analytical biochemistry**, v. 177, n. 33, 1989.

FREITAS, A. A. FRANCELIN, M. F. HIRATA, G. F. CLEMENTE, E.; SCHMIDT, F. L. Atividades das enzimas peroxidase (POD) e polifenoloxidase (PPO) nas uvas das cultivares benitaka e rubi e em seus sucos e geléias. **Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas**, v. 28, n. 1, p. 172–172, 2008.

GAMAGE, T.; REHMAN, M. Post harvest handling of foods of plant origin. **Handbook of Food Preservation**, p. 11–46, 1999.

GASPAR, T.H.; PENEL, C.L.; THORPE, T.; GREPPIN, H. Peroxidases: a survey of their biochemical and physiological roles in higher plants. **Genève: Université de Genève, Centre de Botanique, Genève**, 1982. 313p.

GIOVANNONI, J. Molecular regulation of fruit ripening. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol**, 2001.

GIRIBALDI, M.; GIUFFRIDA, M. G. Heard it through the grapevine: proteomic perspective on grape and wine. **Journal of proteomics**, v. 73, n. 9, p. 1647-1655, ago 2010.

GIRIBALDI, M. PERUGINI, I. SAUVAGE, F.-X.; SCHUBERT, A. Analysis of protein changes during grape berry ripening by 2-DE and MALDI-TOF. **Proteomics**, v. 7, n. 17, p. 3154-70, set 2007.

GLICK, B. R. Bacterial ACC deaminase and the alleviation of plant stress. **Advances in applied microbiology**, v. 56, p. 291–312, 2004.

GRANIER, F. Extraction of plant proteins for two-dimensional electrophoresis. **Electrophoresis**, v. 9, n. 11, p. 712-718, nov 1988.

GRAVES, P.; HAYSTEAD, T. A. J. Molecular biologist's guide to proteomics. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 66, n. 1, p. 39-63, 2002.

GUERRA, N. LIVERA, A.; ROCHA, J. Storage of soursop (*Annona muricata*) in polyethylene bags with ethylene absorbent. **American Society of Agricultural Engineers (ASAE)**, p. 617–622, 1995.

GÓMEZ-VIDAL, S. TENA, M. LOPEZ-LLORCA, L. V.; SALINAS, J. Protein extraction from *Phoenix dactylifera* L. leaves, a recalcitrant material, for two-dimensional electrophoresis. **Electrophoresis**, v. 29, n. 2, p. 448-56, jan 2008.

GÖRG, A. OBERMAIER, C. BOGUTH, G. *et al.* Very alkaline immobilized pH gradients for two-dimensional electrophoresis of ribosomal and nuclear proteins. **Electrophoresis**, v. 18, n. 3-4, p. 328-37, 1997.

GÖRG, A. OBERMAIER, C. BOGUTH, G.; WEISS, W. Recent developments in two-dimensional gel electrophoresis with immobilized pH gradients: wide pH gradients up to pH 12, longer separation distances and simplified procedures. **Electrophoresis**, v. 20, n. 4-5, p. 712-7, 1999.

GÖRG, A. WEISS, WALTER; DUNN, M. J. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. **Proteomics**, v. 4, n. 12, p. 3665-85, dez 2004.

GÖRG, A. WEISS, WALTER; DUNN, M. J. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics (vol. 4, Issue 12, pp. 3665-3685). **PROTEOMICS**, v. 5, n. 3, p. 826-827, fev 2005.

GU, Y. Q. WILDERMUTH, M. C. CHAKRAVARTHY, S. *et al.* Tomato transcription factors Pti4, Pti5, and Pti6 activate defense responses when expressed in Arabidopsis. **The Plant Cell Online**, v. 14, n. 4, p. 817, 2002.

HANCOCK, W. S. WU, S. L. STANLEY, R. R.; GOMBOCZ, E. A. Publishing large proteome datasets: scientific policy meets emerging technologies. **Trends in biotechnology**, v. 20, n. 12, p. 39-44, 2002.

HAYNES, P. A.; YATES III, J. R. Proteome profiling-pitfalls and progress. **Yeast**, v. 17, n. 2, p. 81-87, 2000.

HJELMELAND, L. M. **Guide to Protein Purification (Methods in Enzymology)**. [S.l.]: Academic Press, University of Connecticut Health Center, 1990. v. 182p. 253-264

ISAACSON, T. DAMASCENO, C. M. B. SARAVANAN, RAMU S; *et al.* Sample extraction techniques for enhanced proteomic analysis of plant tissues. **Nature protocols**, v. 1, n. 2, p. 769-74, jan 2006.

JIMENEZ, A. CREISSEN, G. KULAR, B. *et al.* Changes in oxidative processes and components of the antioxidant system during tomato fruit ripening. **Planta**, v. 214, n. 5, p. 751-758, 2002.

JOLY, A. B. **Botânica: introdução à taxonomia vegetal**. 13. ed. [S.l.]: Nacional, 2002. p. 13

JORGE, I. NAVARRO, R. M. LENZ, C. *et al.* The holm oak leaf proteome: analytical and biological variability in the protein expression level assessed by 2-DE and protein identification tandem mass spectrometry de novo sequencing and sequence similarity searching. **Proteomics**, v. 5, n. 1, p. 222-34, jan 2005.

JORRÍN-NOVO, J. V. MALDONADO, A. M. ECHEVARRÍA-ZOMEÑO, S. *et al.* Plant proteomics update (2007-2008): Second-generation proteomic techniques, an appropriate experimental design, and data analysis to fulfill MIAPE standards, increase plant proteome coverage and expand biological knowledge. **Journal of proteomics**, v. 72, n. 3, p. 285-314, 13 abr 2009.

JUNQUEIRA, N. CUNHA, M. ANJOS, J. *et al.* Controle das doenças da gravioleira. **Controle de doenças de plantas: fruteiras. Viçosa: Suprema Gráfica e Editora**, v. 1, p. 405–443, 2002.

KAO, C. H.; HSU, S. Y. Differential effect of sorbitol and polyethylene glycol on antioxidant enzymes in rice leaves. **Plant growth regulation**, v. 39, n. 1, p. 83–90, 2003.

KARP, N. A.; LILLEY, K. S. Design and analysis issues in quantitative proteomics studies. **Proteomics**, v. 7, p. 42-50, 2007.

KAYS, S. J. **Postharvest physiology of perishable plant products**. New York: Van Nostrand Reinhold, 1991. p. 526

KIEDROWSKI, S. KAWALLECK, P.; HAHLBROCK, K. Rapid activation of a novel plant defense gene is strictly dependent on the Arabidopsis RPM1 disease resistance locus. **The EMBO**, 1992.

KOK, E. LEHESRANTA, S. DIJK, J. VAN; *et al.* Changes in Gene and Protein Expression during Tomato Ripening – Consequences for the Safety Assessment of New Crop Plant Varieties. **Food Science and Technology International**, v. 14, n. 6, p. 503-518, 2008.

KRAJ, A.; SILBERRING, J. **Introduction to proteomics**. 1. ed. [S.l.]: Wiley-Interscience, 2008. p. 376

KUMAR, S. PATIL, B.; SINHA, S. Cyanide resistant respiration is involved in temperature rise in ripening mangoes. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 168, n. 2, p. 818–822, 1990.

KUSKOSKI, E. M. E. M. ASUERO, A. G. A. G. MORALES, M. T. M. T.; FETT, R. Frutos tropicais silvestres e polpas de frutas congeladas: atividade antioxidante, polifenóis e antocianinas. **Ciência Rural**, v. 36, n. 4, p. 1283–1287, ago 2006.

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

LAMBERT, J. P. J.-P. ETHIER, M. SMITH, J. C. J. C.; FIGEYS, D. Proteomics: from gel based to gel free. **Analytical chemistry**, v. 77, n. 12, p. 3771–3788, 15 jun 2005.

LAURENTI, C.; CLEMENTE, E. Avaliação da atividade da peroxidase em carambola (*Oxalidacia avertroha*) em diferentes estádios de maturação. **Acta Scientiarum**, v. 27, n. 1, p. 159–163, 2005.

LIMA, M. A. C. D. ALVES, R.E.; FILGUEIRAS, H.A.C. Comportamento respiratório e amaciamento de graviola (*Annona muricata L.*) Após tratamentos pós-colheita com cera e 1-metilciclopropano. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 34, n. 1, p. 155–162, 2010.

LIMA, M. A. C. D. ALVES, RICARDO ELESBÃO; FILGUEIRAS, HELOÍSA ALMEIDA CUNHA. Mudanças relacionadas ao amaciamento da graviola durante a maturação pós-colheita. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, n. 12, p. 1707-1713, dez 2006.

LIMA, M. A. C. D. ALVES, RICARDO ELESBÃO; FILGUEIRAS, HELOÍSA ALMEIDA CUNHA; ENÉAS-FILHO, J. Comportamento respiratório e qualidade pós-colheita de graviola (*Annona muricata* L.) “morada” sob temperatura ambiente. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 25, n. 1, p. 49-52, abr 2003.

LIMA, M. A. C. DE; ALVES, RICARDO ELESBÃO; FILGUEIRAS, HELOÍSA ALMEIDA CUNHA. **Avaliação da Qualidade e da Suscetibilidade ao Escurecimento Oxidativo de Graviola (*Annona muricata* L.) Durante a Maturação Pós-Colheita**. Proc. Interamer. Soc. Trop. Hort. **Anais**. 2002.

LORENZO, G. D.; D’OVIDIO, R. The role of polygalacturonase-inhibiting proteins (PGIPs) in defense against pathogenic fungi. **Annual review of Phytopathol**, v. 39, 2001.

MAAS, P. J. M. MAAS-VAN DE KAMER, H. JUNIKKA, L. MELLO-SILVA, R. DE; RAINER, H. Annonaceae from Central-eastern Brazil. **Rodriguésia**, v. 52, n. 80, p. 65–98, 2001.

MACIEL, H. P. F. GOUVÊA, C. M. C. P.; PASTORE, G. M. Extração e caracterização parcial de peroxidase de folhas de *Copaifera langsdorffii* Desf. **Ciênc. Tecnol. Aliment**, v. 27, n. 2, p. 221–225, 2007.

MARZZOCO, A.; TORRES, B. B. **Bioquímica básica**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007.

MATTEO, A. D. BONIVENTO, D. TSERNOGLOU, D.; FEDERICI, L. Polygalacturonase-inhibiting protein (PGIP) in plant defence: a structural view. **Phytochemistry**, v. 67, p. 528-33, 2006.

MAXWELL, D. P. WANG, Y.; MCINTOSH, L. The alternative oxidase lowers mitochondrial reactive oxygen production in plant cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 96, n. 14, p. 8271-8276, 1999.

MENDONÇA, V. RAMOS, J. ARAÚJO NETO, S. *et al.* Substratos e quebra de dormência da semente na formação do porta-enxerto de graviola Cv. RBR. **Revista Ceres (Brasil)**. v. 49, n. 286, p. 657–668, 2002.

MELLO, E.; CLEMENTE, E. Thermostability of crude extract of peroxidase from pineapple. **Revista Unimar, Marília**, v. 18, n. 4, p. 757–763, 1996.

MICHELETTI, S. M. F. B. AGRA, A. G. S. D. M. BARBOSA, G. V. S.; GOMES, F. L. CONTROLE DE *Cerconota anonella* (SEPP.) (LEP.: OECOPHORIDAE) E DE *Bephratelloides pomorum* (FAB.) (HYM.: EURYTOMIDAE) EM FRUTOS DE GRAVIOLA (*Annona muricata* L.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 23, n. 3, p. 722-725, dez 2001.

MILLER, I. CRAWFORD, J.; GIANAZZA, E. Protein stains for proteomic applications: which, when, why? **Proteomics**, v. 6, n. 20, p. 5385-408, out 2006.

MINARIK, P. TOMASKOVA, N. KOLLAROVA, M.; ANTALIK, M. Malate dehydrogenases-structure and function. **General physiology and biophysics**, v. 21, n. 3, p. 257–266, 2002.

MITCHELL, H.; HALL, J. Elicitor-induced cinnamyl alcohol dehydrogenase activity in lignifying wheat (*Triticum aestivum* L.) leaves. **Plant physiology**, 1994.

MITCHELL, W. C.; JELENKOVIC, G. Characterizing NAD- and NADP-dependent alcohol dehydrogenase enzymes of strawberries. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 120, n. 5, p. 798–801, 1995.

MOLLOY, M. P. HERBERT, B. R. WALSH, B. J. *et al.* Extraction of membrane proteins by differential solubilization for separation using two-dimensional gel electrophoresis. **Electrophoresis**, v. 19, n. 5, p. 837–44, maio 1998.

MOORE, S. VREBALOV, J. PAYTON, P.; GIOVANNONI, JIM. Use of genomics tools to isolate key ripening genes and analyse fruit maturation in tomato. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, n. 377, p. 2023–2030, out 2002.

MOURA, R. M. MARANHÃO, S. R. V. L.; GUIMARÃES, L. M. P. Soursop, a new host of *Rotylenchulus reniformis*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30, n. 4, p. 437–437, 2005.

MOURA, R. PEDROSA, E.; MONTEIRO, A. Morte súbita: uma nova doença da gravioleira (*Annona muricata*), causada pelo nematóide *Pratylenchus coffeae*. **Fitopatologia Brasileira, Brasília**, v. 23, n. 2, p. 92–99, 1999.

MUCCILLI, V. LICCIARDELLO, C. FONTANINI, D. *et al.* Proteome analysis of *Citrus sinensis* L.(Osbeck) flesh at ripening time. **Journal of proteomics**, v. 73, n. 1, p. 134–152, 2009.

MÉCHIN, V. CONSOLI, L. GUILLOUX, M. LE; DAMERVAL, C. An efficient solubilization buffer for plant proteins focused in immobilized pH gradients. **Proteomics**, v. 3, n. 7, p. 1299–302, jul 2003.

NANDAKUMAR, M. SHEN, J. RAMAN, B.; MARTEN, M. R. Solubilization of trichloroacetic acid (TCA) precipitated microbial proteins via NaOH for two-dimensional electrophoresis. **Journal of Proteome Research**, v. 2, n. 1, p. 89–93, 2003.

NATARAJAN, S. XU, C. CAPERNA, T. J. T. J.; GARRETT, W. M. W. M. Comparison of protein solubilization methods suitable for proteomic analysis of soybean seed proteins. **Analytical biochemistry**, v. 342, n. 2, p. 214–220, 15 jul 2005.

NATH, P. SANE, A. P. TRIVEDI, P. K. SANE, V. A.; ASIF, M. H. Role of transcription factors in regulating ripening, senescence and organ abscission in plants. **Stewart Postharvest Review**, v. 3, n. 2, p. 1–14, 2007.

NOBRE, R. G. FERNANDES, P. D. GHEYI, H. R. *et al.* Germinação e formação de mudas enxertadas de gravioleira sob estresse salino. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 38, n. 12, p. 1365–1371, 2003.

NUNEZ-PALENIUS, H. G. HUBER, D. J. KLEE, H. J.; CANTLIFFE, D. J. Fruit ripening characteristics in a transgenic “Galia” male parental muskmelon (*Cucumis melo* L. var. *reticulatus* Ser.) line. **Postharvest biology and**, v. 44, p. 95–100, 2007.

OESER, B. PATRICK, M. H. MULLER, U. TUDZYNSKI, P.; TENBERGE, K. B. Poligalacturonase is a pathogenicity factor in the *Claviceps purpurea* interaction. **Fungal genetics and biology**, v. 36, p. 176-186, 2002.

OLIVEIRA, M. Graviola Produção: aspectos técnicos. **Frutas do Brasil**, n. 15, p. 78, 2001.

OLIVIERA, S. GUERRA, N. B. SUCUPIRA, M. MARIA, I.; SOUZA LIVERA, A. V. Polyphenoloxidase activity, polyphenols concentration and browning intensity during soursop (*Annona muricata*, L.) maturation. **Journal of food science**, v. 59, n. 5, p. 1050–1052, 1994.

O'FARRELL, P. H. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. **Journal of biological chemistry**, v. 250, n. 10, p. 4007, 1975.

PALSSON, B. In silico biology through omics. **Nature biotechnology**, v. 20, n. 7, p. 649–650, 2002.

PARK, OHKMAE K. Proteomic studies in plants. **Journal of biochemistry and molecular biology**, v. 37, n. 1, p. 133-138, 31 jan 2004.

PAYASI, A. MISHRA, N. N. CHAVES, A. L. S.; SINGH, R. Biochemistry of fruit softening: an overview. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, v. 15, n. 2, p. 103-113, 28 jun 2009.

PAYASI, A.; SANWAL, G. G. G. RIPENING OF CLIMACTERIC FRUITS AND THEIR CONTROL. **Journal of Food Biochemistry**, v. 34, n. 4, p. 679–710, 7 ago 2010.

PEDRESCHI, R. VANSTREELS, E. CARPENTIER, S. *et al.* Proteomic analysis of core breakdown disorder in Conference pears (*Pyrus communis* L.). **Proteomics**, v. 7, n. 12, p. 2083-99, jun 2007.

PERDEW, G. H. SCHAUP, H. W.; SELIVONCHICK, D. P. The use of a zwitterionic detergent in two-dimensional gel electrophoresis of trout liver microsomes. **Analytical biochemistry**, v. 135, n. 2, p. 453–455, 1983.

PINHEIRO, H.; BORGES, R. Activity of alternative oxidase and plant uncoupling mitochondrial protein in potato tubers stored at low temperature or submitted to artificial aging. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 16, n. 2, p. 69–76, 2004.

PIRRELLO, J. REGAD, F. LATCHE, A. PECH, J.-C.; BOUZAYEN, M. Regulation of tomato fruit ripening. **CAB**, v. 4, p. 1 -14, 2009.

PRASANNA, V. PRABHA, T. N.; THARANATHAN, R. N. Fruit ripening phenomena-an overview. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 47, n. 1, p. 1–19, jan 2007.

PROTEOPAR (Programa Proteoma estresse hídrico em cafeeiro. Paraná). Análise proteômica do Café. Disponível em: <http://nfn.genopar.org:8080/proteopar/publicacoes/Resumo_5oSimposioDePesquisaDosCafeDoBrasil.pdf>. Acesso em: 2 fev. 2011.

RABILLOUD, T. Use of thiourea to increase the solubility of membrane proteins in two-dimensional electrophoresis. **Electrophoresis**, v. 19, n. 5, p. 758-60, maio 1998.

RABILLOUD, THIERRY. Solubilization of proteins for electrophoretic analyses. **Electrophoresis**, v. 17, n. 5, p. 813–829, 1996.

RABILLOUD, THIERRY. **Proteome research: two-dimensional gel electrophoresis and identification methods**. [S.l.]: Springer verlag, 2000. p. 57-106

RAES, J. ROHDE, A.; CHRISTENSEN, J. Genome-wide characterization of the lignification toolbox in Arabidopsis. **Plant**, 2003.

RAGHAVAN, G. S. V. VIGNEAULT, C. GARIÉPY, Y. MARKARIAN, N. R.; ALVO, P. Refrigerated and control/modified atmosphere storage. **Proc. Fruits Sci. Technol.**, p. 23–52, 2005.

REQUEJO, R.; TENA, M. Proteome analysis of maize roots reveals that oxidative stress is a main contributing factor to plant arsenic toxicity. **Phytochemistry**, v. 66, n. 13, p. 1519-28, jul 2005.

REQUEJO, R.; TENA, M. Maize response to acute arsenic toxicity as revealed by proteome analysis of plant shoots. **Proteomics**, v. 6 Suppl 1, p. S156-62, abr 2006.

ROBARDS, K. PRENZLER, P. D. TUCKER, G. SWATSITANG, P.; GLOVER, W. Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. **Food Chemistry**, v. 66, n. 4, p. 401–436, 1999.

ROCCO, M. D'AMBROSIO, C. ARENA, S. *et al.* Proteomic analysis of tomato fruits from two ecotypes during ripening. **Proteomics**, v. 6, n. 13, p. 3781-91, jul 2006.

ROCHA, T. L. COSTA, P. H. A. DA; MAGALHÃES, J. C. C. *et al.* **ELETROFORESE BIDIMENSIONAL E ANÁLISE DE PROTEOMAS**. . Brasília, DF: [s.n.], 2005

ROSE, JOCELYN K C; BASHIR, S. GIOVANNONI, J. J. JAHN, M. M.; SARAVANAN, RAMU SUBRAMANIAN. Tackling the plant proteome: practical approaches, hurdles and experimental tools. **The Plant journal : for cell and molecular biology**, v. 39, n. 5, p. 715-33, set 2004.

SACRAMENTO, C. K. D. FARIA, J. C. CRUZ, F. L. D. *et al.* Caracterização física e química de frutos de três tipos de gravioleira (*Annona muricata L.*). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 25, n. 2, p. 329-331, ago 2003.

SAMAJ, J.; THELEN, J. J. **Introduction to proteomics: A brief historical perspective on contemporary approaches**. [S.l.]: Springer Berlin Heidelberg, 2007. p. 370

SARAVANAN, RAMU S; ROSE, JOCELYN K C. A critical evaluation of sample extraction techniques for enhanced proteomic analysis of recalcitrant plant tissues. **Proteomics**, v. 4, n. 9, p. 2522-32, set 2004.

SARRY, J.-E. SOMMERER, N. SAUVAGE, F.-X. *et al.* Grape berry biochemistry revisited upon proteomic analysis of the mesocarp. **Proteomics**, v. 4, n. 1, p. 201-15, jan 2004.

SEYMOUR, G. B. Banana. **Biochemistry of Fruit Ripening**. London: Chapman and Hall, 1993. p. 83-106.

SHARMA, R. PINTO, A.; LOOF, P. Declínio da gravioleira (*Annona muricata L.*) nas condições de Cerrado do Distrito Federal. **Nematologia Brasileira, Piracicaba**, v. 9, p. 32, 1985.

SHAW, M. M.; RIEDERER, B. M. Sample preparation for two-dimensional gel electrophoresis. **Proteomics**, v. 3, n. 8, p. 1408–1417, 2003.

SHEORAN, I. ROSS, A; OLSON, D.; SAWHNEY, V. Compatibility of plant protein extraction methods with mass spectrometry for proteome analysis. **Plant Science**, v. 176, n. 1, p. 99-104, jan 2009.

SHEWFELT, R. What is quality? **Postharvest biology and technology**, v. 15, p. 197-200, 1999.

SINGH, S.; PAL, R. Response of climacteric-type guava (*Psidium guajava L.*) to postharvest treatment with 1-MCP. **Postharvest Biology and Technology**, v. 47, n. 3, p. 307-314, mar 2008.

SONG, J. BRAUN, G. BEVIS, E.; DONCASTER, K. A simple protocol for protein extraction of recalcitrant fruit tissues suitable for 2-DE and MS analysis. **Electrophoresis**, v. 27, n. 15, p. 3144-51, ago 2006.

SPADA, P. D. S. SOUZA, G. G. N. DE; BORTOLINI, G. V. HENRIQUES, J. A. P.; SALVADOR, M. Antioxidant, mutagenic, and antimutagenic activity of frozen fruits. **Journal of Medicinal Food**, v. 11, n. 1, p. 144–151, 2008.

SPINOLA, M. C. M. CÍCERO, S. M.; MELO, M. D. Alterações bioquímicas e fisiológicas em sementes de milho causadas pelo ao envelhecimento acelerado. **Scientia Agricola**, v. 57, n. 2, p. 263-270, 2000.

STALIKAS, C. Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. **Journal of separation science**, 2007.

STEVENS, M. A. Citrate and malate concentrations in tomato fruits: Genetic control and maturational effects. **J Am Soc Hort Sci**, v. 97, p. 655–658, 1972.

SURENDRANATHAN, K. Post-harvest biotechnology of fruits with special reference to banana–Perspective and scope. **Indian Journal of Biotechnology**, v. 4, n. 1, p. 39–46, 2005.

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

TACO. **Tabela Brasileira de Composição de Alimentos**. 2. ed. Campinas, SP: NEPA-UNICAMP, 2006. p. 113

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004.

TAUREILLES-SAUREL, C. ROMIEU, C. G. ROBIN, J. P.; FLANZY, C. Grape (*Vitis vinifera* L.) malate dehydrogenase. II. Characterization of the major mitochondrial and cytosolic isoforms and their role in ripening. **American journal of enology and viticulture**, v. 46, n. 1, p. 29-36, 1995.

TORRES, W.; SANCHES, L. LA Guanabano. **Instituto Colombiano Agropecuario**, p. 100, 1995.

TZORTZAKIS, N. G.; ECONOMAKIS, C. D. MAINTAINING POSTHARVEST QUALITY OF THE TOMATO FRUIT BY EMPLOYING METHYL JASMONATE AND ETHANOL VAPOR TREATMENT. **Journal of Food Quality**, v. 30, n. 5, p. 567-580, out 2007.

VICENTE, A. R. SALADIE, M. ROSE, J.K.C.; LABAVITCH, J. M. The linkage between cell wall metabolism and fruit softening: looking to the future. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 87, n. 8, p. 1435–1448, 2007.

VICENTE, A. CIVELLO, P. MARTINEZ, G. *et al.* Control of postharvest spoilage in soft fruit. **Stewart Postharvest Review**, v. 1, n. 4, p. 1–11, 2005.

VIEIRA, L. G. E. ANDRADE, A. C. COLOMBO, C. A. *et al.* Brazilian coffee genome project: an EST-based genomic resource. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 18, n. 1, p. 95–108, 2006.

VINCENT, D. ERGÜL, A. BOHLMAN, M. C. *et al.* Proteomic analysis reveals differences between *Vitis vinifera* L. cv. Chardonnay and cv. Cabernet Sauvignon and their responses to water deficit and salinity. **Journal of experimental botany**, v. 58, n. 7, p. 1873-92, jan 2007.

VOET, D. VOET, J. G.; PRATT, C. W. **Fundamentals of biochemistry**. London: John Wiley & Sons, 1999.

VÂLCU, C.-M.; SCHLINK, K. Efficient extraction of proteins from woody plant samples for two-dimensional electrophoresis. **Proteomics**, v. 6, n. 14, p. 4166-75, jul 2006.

WALKER, J. **The proteomics protocols handbook**. 3. ed. New Jersey: Humana Press, 2005.

WANG, W. SCALI, M. VIGNANI, R. *et al.* Protein extraction for two-dimensional electrophoresis from olive leaf, a plant tissue containing high levels of interfering compounds. **Electrophoresis**, v. 24, n. 14, p. 2369-75, jul 2003.

WANG, W. TAI, F.; CHEN, SHAONING. Optimizing protein extraction from plant tissues for enhanced proteomics analysis. **Journal of separation science**, v. 31, n. 11, p. 2032-2039, jun 2008.

WANG, W. VIGNANI, R. SCALI, M.; CRESTI, M. A universal and rapid protocol for protein extraction from recalcitrant plant tissues for proteomic analysis. **Electrophoresis**, v. 27, n. 13, p. 2782-6, jul 2006.

WECKWERTH, W. LOUREIRO, M. E. WENZEL, K.; FIEHN, O. Differential metabolic networks unravel the effects of silent plant phenotypes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 20, p. 7809, 2004.

WESTERMEIER, R.; MAROUGA, R. Protein detection methods in proteomics research. **Bioscience reports**, v. 25, n. 1, p. 19–32, 2005.

WESTERMEIER, REINER; NAVEN, T.; HOPKER, H. R. **Proteomics in practice: a laboratory manual of proteome analysis**. [S.l.]: Wiley-VCH, 2002. v. 5

WHITE, P. J. J. Recent advances in fruit development and ripening: an overview. **Journal of experimental botany**, v. 53, n. 377, p. 1995, 1 out 2002.

WILDGRUBER, R. HARDER, A. OBERMAIER, C. *et al.* Towards higher resolution: Two-dimensional Electrophoresis of *Saccharomyces cerevisiae* proteins using overlapping narrow immobilized pH gradients. **Electrophoresis**, v. 21, n. 13, p. 2610–2616, 2000.

WIN, N. JITAREERAT, P. KANLAYANARAT, S.; SANGCHOTE, S. Effects of cinnamon extract, chitosan coating, hot water treatment and their combinations on crown rot disease and quality of banana fruit. **Postharvest biology and technology**, v. 45, n. 3, p. 333–340, 2007.

ZHANG, J. MA, H. FENG, J. *et al.* Grape berry plasma membrane proteome analysis and its differential expression during ripening. **Journal of experimental botany**, v. 59, n. 11, p. 2979-2990, jan 2008.

ZUO, X.; SPEICHER, D. W. Quantitative evaluation of protein recoveries in two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. **Electrophoresis**, v. 21, n. 14, p. 3035-47, ago 2000.