

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

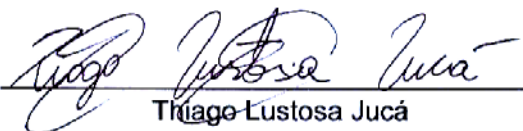
THIAGO LUSTOSA JUCÁ

**Estudo Proteômico de Sementes em Desenvolvimento e
Maduras de Pinhão Manso (*Jatropha curcas L.*)**

FORTALEZA-CE

2010

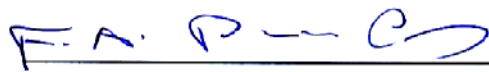
Esta dissertação foi apresentada ao programa de Pós-graduação em Bioquímica do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica, outorgado pela UFC, e encontrar-se-á disposição na Biblioteca Central da referida Universidade. A transcrição ou utilização de qualquer trecho deste trabalho é permitida, desde que seja feito de acordo com as normas da ética científica.



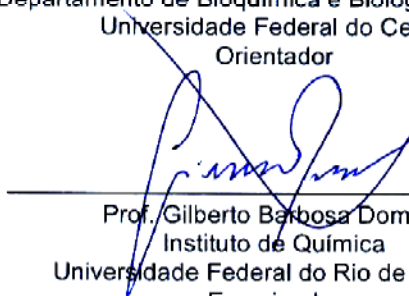
Thiago Lustosa Jucá

Aprovada em: 23/02/2010

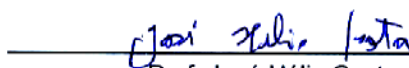
BANCA EXAMINADORA



Prof. Francisco A. P. Campos
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular
Universidade Federal do Ceará
Orientador



Prof. Gilberto Barbosa Domont
Instituto de Química
Universidade Federal do Rio de Janeiro
Examinador



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

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

Estudo Proteômico de Sementes em Desenvolvimento e Maduras
de Pinhão Manso (*Jatropha curcas L.*)

THIAGO LUSTOSA JUCÁ

Esta Dissertação foi Submetida à
Coordenação do Curso de Pós-
Graduação do Departamento de
Bioquímica e Biologia Molecular como
Parte dos Requisitos Necessários à
Obtenção do Grau de Mestre em
Bioquímica, Outorgado pela
Universidade Federal do Ceará.

Orientador: Prof. Francisco A. P. Campos

FORTALEZA-CE

2010

J84e Jucá, Thiago Lustosa
Estudo proteômico de sementes em desenvolvimento e maduras de
pinhão manso (*Jatropha curcas L.*) / Thiago Lustosa Jucá, 2010.
103 f. ;il. color. enc.

Orientador: Prof. Pós-Dr. Francisco de Assis de Paiva Campos
Área de concentração: Bioquímica Vegetal
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Ceará, Centro de
Ciências, Depto. de Bioquímica e Biologia Molecular, Fortaleza, 2010.

1. Pinhão manso. 2. Eletroferese bidimensional. 3. Histoquímica. I.
Campos, Francisco de Assis de Paiva (Orient.). II. Universidade Federal do
Ceará – Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. III. Título.

CDD 574.192

"Se você tiver de parar um pouco, fique sentado, mas sempre olhando para frente, nunca para o caminho já percorrido." (Provérbio chinês)

AGRADECIMENTOS

A Deus pela sua bela criação e pela sabedoria dada aos animais, em especial ao homem, que assim podem estudar e compreender a sua obra prima.

A minha esposa e companheira Muciana Aracely pelo amor incondicional, carinho, atenção e paciência, e a nossa obra de arte, nosso tesouro e maior presente das nossas vidas, Ana Beatriz Cunha Jucá.

Aos meus Pais (Aroldo e Eloneide) pela vida, criação, educação e dedicação. As minhas irmãs Ju, Daniele e a minha princesa Iorita que completam a nossa família. Quem tem uma família de verdade sabe o valor que ela tem.

A minha mais nova família, Sr. Múcio, Dona Ana, Marusa (Chibinha) e Marlécio.

Ao Prof. Francisco A.P. Campos, pela confiança, oportunidades, orientação e a quem devo a minha formação acadêmica durante toda a graduação e mestrado.

Ao Prof. Gilberto Domont, pelo exemplo, dedicação, atenção e por ter me recebido de braços abertos em seu laboratório.

Ao Prof. Hélio Costa, grande homem, exemplo de simplicidade, muito prestativo e sempre atencioso.

Ao pesquisador Márcio da Silva do CBMEG-UNICAMP pela valiosíssima contribuição na construção do banco de ESTs de pinhão manso.

Ao Fábio C. S. Nogueira, um dos poucos estudantes que conheço que quer ser um cientista de verdade, pela disciplina, ensinamentos e aprendizado em química de proteínas e amizade estabelecida nos últimos anos.

Ao Carlos Carmela, pela amizade, ensinamentos em espectrometria de massas e pela enorme atenção sempre dada.

Ao Jeferson Soares, amizade sólida desde a época de graduação, sempre me ajudando de diversas maneiras e mais uma vez foi meu “referee científico” na correção desta dissertação.

A Dona Maria Soares e Dona Eni, amigas e mães que ganhei durante minha passagem pelo Rio, é uma honra e satisfação muito grande ter conhecido gente assim.

Aos amigos do laboratório 1015: Camila amiga desde o início da graduação, que muito contribui com essa dissertação, inclusive cedendo muitos de seu dados, aos “lelés 1, 2 e 3” Ícaro, Bruno e André pela imensa ajuda e contribuição neste trabalho, em especial o André e o Bruno. Ana Raquel (pequena), Manú, Gabi.

Aos amigos em especial Juliana Brasil e Nicholas (bate o pintinho).

Aos amigos do Departamento em especial: Edvar (amigo desde a infância), Fabiano (meu lindo, gordinho amigo para tudo), Cleverson (exemplo e contribuiu com minha formação e me ajudou em muitos momentos), Janne keila, Fredy, Henrique metro e Emmanuel J., grandes amigos.

Aos amigos da Pós-graduação: Diego (orea seca), Bruno (Benildo), Valdinéia, Raquel Sombra, Dani, Hélio, Rafael Simões, Elton, Ito, Mirella, Daniel e Adilton.

FONTES FINANCIADORAS

Este trabalho foi realizado com o suporte das seguintes instituições:

Universidade Federal do Ceará:

- Laboratório de Biologia Molecular de Plantas. (*Prof. Francisco Campos*)

Universidade Federal do Rio de Janeiro

- Laboratório de Química de Proteínas/Proteômica (*Prof. Gilberto Domont*)

Fundação Oswaldo Cruz – Fiocruz

- Laboratório de Toxinologia (*Pesquisador Jonas Perales*)

Agradecimento especial a **PETROBRÁS** pelo suporte financeiro dado na execução deste trabalho.

CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pela concessão da bolsa de Mestrado.

SUMÁRIO

Lista de Figuras.....	x
Lista de Tabelas.....	xii
Abreviaturas.....	xiii
Resumo.....	xiv
Abstract.....	xv
1. INTRODUÇÃO.....	16
1.1 Toxicidade da semente do pinhão manso.....	20
1.2 Biossíntese e deposição de ácidos graxos em sementes oleaginosas.....	23
1.3 A era pós-gênômica e as técnicas de análise proteômica.....	25
1.4 Proteômica baseada em 2-DE.....	26
1.5 Espectrometria de massa.....	27
1.6 Identificação de proteínas por espectrometria de massa.....	28
1.7 Proteômica vegetal.....	30
1.8 Estudos proteômicos com o pinhão manso.....	31
2. OBJETIVOS.....	33
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	34
3.1 Reagentes e Equipamentos.....	34
3.2 Material vegetal.....	35
3.3 Preparo das amostras.....	35
3.4 Extração de proteínas totais.....	35
3.5 Extração de proteínas com tris-HCl 0,1 M, NaCl 0,5 M, pH 8,0 e tampão acetato 0,1 M, NaCl 0,5 M, pH 5,0.....	36
3.6 Obtenção da fração glutelínica.....	36
3.7 Dosagem de proteínas.....	36

3.8 Eletroforese bidimensional, coramento, digitalização e análise dos géis.....	37
3.9 Seleção e processamento dos spots para espectrometria de massa.....	37
3.10 Busca em banco de dados.....	38
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39
4.1 Escolha dos estágios de desenvolvimento das proteínas do endosperma de sementes do pinhão manso.....	39
4.2 Estabelecimento dos mapas bidimensionais das proteínas totais do endosperma de sementes em desenvolvimento e de sementes maduras.....	39
4.3 Identificação de proteínas a partir dos mapas bidimensionais de proteínas totais de sementes maduras.....	41
4.4 Identificação de proteínas menos abundantes.....	61
4.5 Fracionamento e estabelecimento dos mapas bidimensionais de referência do endosperma de sementes em desenvolvimento e maduras do pinhão manso.....	61
4.6 Identificação de proteínas.....	69
4.7 Proteínas identificadas na fração albumínica.....	70
4.8 Proteínas identificadas na fração globulínica.....	75
4.9 Proteínas identificadas na fração glutelínica.....	78
4.10 Utilização de bancos ESTs para a identificação de proteínas.....	82
5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	93
6. REFERÊNCIAS.....	95
7. ANEXO.....	102

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Aspectos gerais da planta de pinhão manso (<i>Jatropha curcas</i>).....	17
FIGURA 2. Aspectos morfológicos e análise histoquímica em sementes em desenvolvimento do pinhão manso nos estágios inicial, intermediário e maduro.....	40
FIGURA 3. Mapas de referência do endosperma de sementes de pinhão manso em desenvolvimento e maduro e do total de spots detectados utilizando o software ImageMaster platinum 5.0 obtidos após extração total de proteínas.....	42
FIGURA 4. Mapas de referência do endosperma de sementes maduras de pinhão manso obtidos após extração total de proteínas. Os spots analisados por espectrometria de massa numerados.....	44
FIGURA 5. Identificação dos spots 52 e 129 como subunidades α e β da Glutelin type-A 3 e da Legumin type B do endosperma de sementes maduras do pinhão manso.....	45
FIGURA 6. Mapas de referência das frações albumínicas e globulínicas do endosperma de sementes em desenvolvimento de pinhão manso e do total de spots detectados utilizando o software ImageMaster platinum 5.0.....	62
FIGURA 7. Mapas de referência da fração glutelínica do endosperma de sementes em desenvolvimento de pinhão manso e do total de spots detectados utilizando o software ImageMaster platinum 5.0.....	63
FIGURA 8. Mapas de referência das frações albumínicas e globulínicas do endosperma de sementes maduras de pinhão manso e do total de spots detectados utilizando o software ImageMaster platinum 5.0.....	64
FIGURA 9. Mapas de referência da fração glutelínica do endosperma de sementes maduras de pinhão manso extraído com tampão tris-HCl 0.1 M pH 8.0 NaCl 0.5 M e do total de spots detectados utilizando o software ImageMaster platinum 5.0.....	65
FIGURA 10. Comparação do padrão de distribuição de massa molecular e do ponto isoelétrico dos spots obtidos a partir da extração das proteínas do endosperma de sementes em desenvolvimento de pinhão manso.....	67
FIGURA 11. Comparação do padrão de distribuição de massa molecular e do ponto isoelétrico dos spots obtidos a partir da extração das proteínas do endosperma de sementes em desenvolvimento de pinhão manso.....	68
FIGURA 12. Mapas de referência da fração albumínica do endosperma de sementes em desenvolvimento de pinhão manso com os spots identificados por espectrometria de massa MALDI-TOF-TOF representados por setas.....	72

FIGURA 13. Representação esquemática mostrando o envolvimento da enzima <i>ent-copalyl diphosphate synthase</i> , identificada na fração globulínica de sementes em desenvolvimento de pinhão manso na rota de biossíntese das giberelinas e do steviol a partir do geranylgeranyl-difosfato.....	73
FIGURA 14. Distribuição funcional relativa das proteínas identificadas na fração albumínica extraída com tampão tris ou acetato do endosperma de sementes em desenvolvimento de pinhão manso.....	74
FIGURA 15. Mapas de referência da fração globulínica do endosperma de sementes em desenvolvimento de pinhão manso com os spots identificados por espectrometria de massa MALDI-TOF-TOF representados por setas.....	76
FIGURA 16. Distribuição funcional relativa das proteínas identificadas na fração globulínica extraída com tampão tris ou acetato do endosperma de sementes em desenvolvimento de pinhão manso.....	77
FIGURA 17. Mapas de referência da fração glutelínica do endosperma de sementes em desenvolvimento de pinhão manso com os spots identificados por espectrometria de massa MALDI-TOF-TOF representados por setas.....	79
FIGURA 18. Distribuição funcional relativa das proteínas identificadas na fração glutelínica extraída com tampão tris do endosperma de sementes em desenvolvimento de pinhão manso.....	80
FIGURA 19. Representação esquemática mostrando o envolvimento da enzima enoyl ACP reductase, identificada na fração glutelínica de sementes em desenvolvimento de pinhão manso, com a reação terminal no ciclo de alongamento dos ácidos graxos.....	81
FIGURA 20. Análise por espectrometria de massa dos peptídeos trípticos eluídos do spot H15 placa 5772.....	85

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Compostos isolados de diferentes tecidos da planta do pinhão manso.....	19
TABELA 2. Procedência dos reagentes utilizados.....	34
TABELA 3. Procedência dos equipamentos utilizados.....	34
TABELA 4. Lista das proteínas do endosperma de sementes maduras do pinhão manso identificadas por MS e MS/MS.....	46
TABELA 5. Lista das proteínas do endosperma de sementes em desenvolvimento do pinhão manso identificadas por MS e MS/MS.....	86
TABELA 6. Lista dos tipos de proteínas no endosperma de sementes em desenvolvimento e maduras de Pinhão manso identificados por MS e MS/MS. As identificações foram organizadas de acordo com sua Classificação funcional.....	84

ABREVIATURAS

SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS
2-DE	Eletroforese bidimensional
NCBI	<i>Centro nacional de informações em biotecnologia</i>
EST	Etiquetas de sequência expressa
cDNA	DNA complementar
IEF	Focalização isoeétrica
pI	Ponto isoeétrico
pH	Potencial hidrogeniônico
MALDI-TOF	Dessorção a laser assistida por Matrix – Tempo de voo
ESI	Ionização por eletropulverização
IPG	Gradiente de pH imobilizado
DTT	Ditiotreitol
TFA	Ácido trifluoroacético
PMF	“Impressão digital” por mapas de peptídeos
SDS	Dodecil sulfato de sódio
PVPP	Polivinilpolipirrolidona

RESUMO

Embora o potencial das sementes de pinhão manso como fonte de matéria prima para a produção de biodiesel seja amplamente reconhecido, pouco se sabe sobre os padrões de deposição de óleo e proteína durante o desenvolvimento da semente. A disponibilidade deste conhecimento será de fundamental importância para a criação de novos genótipos que atendam a demanda das indústrias do biodiesel. Neste trabalho, foi realizada uma análise proteômica inicial do endosperma em desenvolvimento e maduro, objetivando identificar proteínas envolvidas no metabolismo de ácidos graxos assim como proteínas com propriedades alergênicas/tóxicas/antinutricionais que são responsáveis por tornar o resíduo da extração do óleo inadequado para o consumo animal. Através de eletroforese bidimensional (2DE) foram estabelecidos mapas de referência das frações protéicas do endosperma de sementes em desenvolvimento (ESD) e maduras (ESM), que foram obtidas explorando as propriedades de solubilidade diferencial das proteínas do endosperma. Desses mapas de referência, um total 1480 spots foram selecionados (712 “ESD” e 768 “ESM”), retirados dos géis 2DE e digeridos com tripsina para posterior análise por espectrometria de massa. Foram utilizados para as buscas, os bancos de dados do NCBI nr e um banco de dados local de ESTs de sementes em desenvolvimento e durante a germinação de sementes de pinhão manso. Um total de 525 spots foram identificados e classificados funcionalmente. Embora a maioria das proteínas identificadas fosse relacionadas com função de reserva, proteínas envolvidas em vias biossintéticas dos ácidos graxos e dos diterpenos foram identificadas, assim como várias proteínas relacionadas com metabolismo, inibidores de protease e a proteína tóxica curcina. A taxa de identificação relativamente baixa obtida neste estudo pode em parte ser atribuída ao fato de não existir bancos de dados extensos para esta espécie. Os resultados aqui apresentados representam a primeira análise em profundidade do padrão de deposição e identificação das proteínas de sementes de pinhão manso e fixam as bases sobre as quais o proteoma completo de sementes de pinhão manso poderá ser estabelecido.

ABSTRACT

Although the potential of *J. curcas* seeds as a biodiesel source is widely recognized, very little is known about the patterns of oil and protein deposition during seed development. The availability of this knowledge would be of importance for the creation of new genotypes tailored to meet the demands of the biodiesel industry. In this work we have performed an initial proteomic analysis of developing and mature endosperm, aimed at identifying proteins involved in fatty acid metabolism as well as proteins with allergenic/toxic/antinutritional properties that may be responsible for rendering the residue resulting from oil extraction unsuitable for animal. For such two-dimensional reference maps of proteins from developing (DES) and mature (MAT) endosperm were established, taking advantage of the differential solubility properties of the endosperm proteins. From these reference maps, a total of 1480 protein spots (712 "DES" and 768 "MES") were excised from 2DE gels and digested with trypsin and the resulting peptides were analyzed by mass spectrometry. The NCBI nr database and a local EST database from *J. curcas* developing and germinating seeds were used for protein search. A total of 525 protein spots were identified and functionally classified. Even though most of the identified proteins were shown to possess reserve functions, proteins involved in the biosynthetic pathways of fatty acid synthesis and of diterpenes were identified, in addition to various metabolic proteins, proteinase inhibitors and the toxic protein curcin. The relatively low identification rate achieved in this study can at least partially be ascribed to the fact that no extensive database is available for this species. The results here presented represent the first in depth analysis of protein deposition and identification of *J. curcas* seeds and it set the foundations upon which the full proteome of *J. curcas* seeds will be established.

1. INTRODUÇÃO

O pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) (FIGURA 1) é um arbusto, perene, pertencente à família *Euphorbiaceae*, cujas sementes são hoje consideradas uma fonte potencial de matéria prima para a produção de biodiesel. Ela é uma planta de clima tropical e que pode ser cultivada tanto em áreas de baixa como de elevada pluviosidade, quer seja nas fazendas como uma cultura comercial ou como uma cerca viva para proteger campos de pasto contra animais ou contra a erosão dos ventos (OPENSHAW, 2000). Antes de explorar a planta para aplicações industriais, é imperioso que haja informações completas sobre sua biologia, química, e todas as outras utilidades, para que o potencial da planta possa ser utilizado ao máximo.

As grandes variações genéticas na morfologia das sementes e no conteúdo de óleo do pinhão manso representam um grande potencial nos programas de melhoramento desta espécie, particularmente na seleção de genótipos contendo maior conteúdo de óleo e maior produtividade. Kaushik *et al.*, (2007) estudando as características das sementes e o conteúdo de óleo de 24 genótipos coletados na Índia, verificaram uma grande variação nas características morfológicas e no conteúdo de óleo das sementes. Os autores acreditam que este fato pode estar relacionado à ampla distribuição e boa adaptabilidade da espécie as mais diversas condições de precipitação, temperatura e tipo de solo naquela região. Trabalho semelhante foi desenvolvido por Sunil *et al.*, (2008), no qual esses autores, utilizando o método de Soxhlet, avaliaram o conteúdo do óleo de 162 genótipos do pinhão manso coletados na Índia peninsular, que variaram de 22% a 42%. Este método tem sido utilizado para a identificação de linhagens superiores, avaliando as características fenotípicas das plantas registradas *in situ*.

Com intuito de avaliar associações genéticas e variabilidade nas sementes, Rao *et al.*, (2008) realizaram uma profunda e extensa exploração de germoplasmas selvagens de 32 árvores de alta produtividade do pinhão manso provenientes de 11 localidades, que cobriam uma área de 150.000 km² e extensas variações de latitudes e longitudes. Os autores obtiveram resultados semelhantes aos obtidos por Kaushik *et al.*, (2007) e Sunil *et al.*, (2008), onde puderam ser observados diferenças significativas nos traços das sementes, desde a morfologia, o teor de óleo altura da planta, razão flores femininas e masculinas e rendimento das sementes em razão da progênie.



FIGURA 1. Aspectos gerais (folhas, frutos, sementes, inflorescências) da planta de pinhão manso (*Jatropha curcas*).

Uma abordagem diferente foi utilizada por Ram *et al.*, (2008), que através de marcadores moleculares do tipo DNA polimórfico amplificado aleatoriamente (RAPD), avaliaram a diversidade genética de 12 genótipos de pinhão manso estabelecendo relações filogenéticas que resultaram na formação de 3 “clusters” de acordo com a análise baseada no componente principal.

Um dos principais aspectos que desperta interesse no pinhão manso, está no seu óleo, que devido as suas características, pode ser utilizado para a produção de biodiesel (KUMAR *et al.*, 2008). Uma das características responsáveis por esse interesse é a alta porcentagem de ácidos graxos insaturados que fica em torno de 78 a 84%. Um exemplo disso é a composição do óleo de um genótipo de pinhão manso proveniente da Nigéria, que consiste principalmente de ácidos graxos como: ácido palmítico (13%), ácido esteárico (2.53%), ácido oléico (48.8%) e ácido linoléico (34.6%) (SALIMON *et al.*, 2008). Entretanto, estes mesmos autores estudando a composição química do óleo de alguns genótipos provenientes da malásia, a fim de caracterizar melhor suas propriedades físico-químicas, mostraram que essas proporções variam de acordo com o clima e a localidade.

Algumas considerações devem ser feitas quanto ao uso do óleo do pinhão manso como um substituto potencial ao diesel. A viscosidade elevada do óleo, bem como sua baixa qualidade de ignição, torna necessária a transesterificação para que o óleo adquira propriedades similares ao diesel mineral. Para tanto, a produção do biodiesel do pinhão manso associada à utilização de seus co-produtos e também de outros produtos provenientes de diferentes partes da planta, deve ser avaliada economicamente de forma a assegurar a viabilidade da produção de ésteres etil/metil de ácidos graxos do óleo desta planta. (SIRISOMBOON *et al.*, 2007; AUGUSTUS *et al.*, 2002)

Outro aspecto que desperta muito interesse no pinhão manso são as inúmeras substâncias químicas presentes nas várias partes da planta (Tabela 1). O uso de diversas partes do pinhão manso, já há muito tempo, foi descrito na literatura pelas várias utilidades na medicina popular e para fins veterinários.

Tabela 1. Compostos isolados de diferentes tecidos da planta do pinhão manso

Tecido	Substâncias identificadas	Referência
Parte aérea	Ácido cumárico, ácido benzóico, ácido resorsílico, saponinas, taninos.	Hemalatha e Radhakrishnaiah (1993)
casca	Taraxerol e β -sitosterol	Mitra <i>et al.</i> (1970)
folhas	Triterpeno cíclico estigmasterol, flavanóides (apigenina, vitexina e isovitexina)	Mitra <i>et al.</i> (1970), Khafagy <i>et al.</i> (1977), Hufford Oguntimein (1987) Khafagy <i>et al.</i> (1977)
látex	Curaciclina A, octapeptídeo cíclico e a curcaina (protease)	Van den Berg <i>et al.</i> (1995) Nath e Dutta (1991)
sementes	Curcina, ésteres de forbol, esterase, lipase, fitatos, saponinas e inibidor de tripsina.	Stirpe <i>et al.</i> (1976) Adolf <i>et al.</i> (1984), Makkar <i>et al.</i> (1997) Staubmann <i>et al.</i> (1999) Aregheore <i>et al.</i> (1997), Makkar e Becker (1997), Wink <i>et al.</i> (1997)
raízes	β -sitosterol, propacina, diterpenoide jatrophol, cumarina e taraxerol	(Naengchomnong <i>et al.</i> , 1986) (Naengchomnong <i>et al.</i> , 1994)

(KUMAR *et al.*, 2008)

Alguns compostos com atividade antitumoral (curaciclina A e curcina) foram encontrados nesta planta (VAN DEN BERG *et al.*, 1995; JUAN *et al.*, 2003b). Os ésteres de forbol, principal componente responsável pela toxicidade das sementes, têm apresentado em ensaios laboratoriais e em campo propriedades inseticida, fungicida e moluscicida (GOEL *et al.*, 2007). Já o óleo da semente tem sido usado como purgativo, no tratamento de eczemas, dores reumáticas e doenças de pele, além de apresentar atividade antiinflamatória e efeitos abortivos (KUMAR *et al.*, 2008).

O látex do pinhão manso é descrito na literatura pelo seu forte poder inibitório no vírus do masaico do melão, na cicatrização de feridas, e principalmente na redução do tempo de coagulação do sangue humano, entretanto quando diluído, o látex prolonga o tempo de coagulação, e em altas diluições ele impede a coagulação sanguínea. (OSONIYI & ONAJOBI, 2003) (KUMAR *et al.*, 2008). Nath e Dutta (1997) descreveram uma enzima proteolítica do látex, a curcaina, com atividade cicatrizante em camundongos.

Embora muita atenção tenha sido dada à toxicidade e ao alto conteúdo de óleo da semente do pinhão manso, outro aspecto que chama a atenção é a alta tolerância dessa espécie às condições de déficit hídrico. A fim de compreender melhor o mecanismo molecular de tolerância ao sal e a seca, Zhang *et al.*, (2007), isolaram o cDNA de plântulas de pinhão manso que codificava uma aquaporina (JcPIP2), e mostraram que sob condições de déficit hídrico, os níveis dessa proteína eram abundantes na espécie resistente (GaoYou CSC63), enquanto que no genótipo

suscetível (YanBian S1) eram insignificantes, mostrando a importante função desempenhada por essa proteína no rápido crescimento do pinhão manso sob condições de seca.

1.1 Toxicidade da semente do pinhão manso.

Apesar de seu uso na medicina popular, as sementes do pinhão manso são altamente tóxicas. A torta da semente, depois da extração do óleo, é rica em proteínas, mas extremamente tóxica para animais, inclusive para mamíferos, portanto não pode ser usada como ração animal. A exceção é uma variedade com baixos níveis de toxicidade existente no México que é usada para consumo humano após a calcinação (MAKKAR *et al.*, 1998).

Diversos sintomas clínicos foram observados em humanos após consumo acidental das sementes tais como tontura, perda dos reflexos, vômitos, diarreia e em condições extremas até a morte. A presença de diversas substâncias tóxicas na semente (ésteres de forbol, a curcina, inibidores de protease, fitato e saponina) pode estar causalmente relacionada com estes sintomas e conseqüentemente tornam limitado o uso da torta resultante da extração do óleo para a alimentação animal. (MARTINEZ-HERRERA *et al.*, 2006).

Os ésteres de forbol presentes em altas concentrações na semente foram identificados como o principal responsável pela toxicidade da semente (JING *et al.*, 2005). Esses autores estudaram o efeito tóxico do *Jatrophol-I*, um tipo de éster de forbol extraído das sementes do pinhão manso, em larvas do bicho da seda (*Bombyx mori* L.). Os resultados mostraram que a toxicidade aguda causada pela ingestão desses diterpenos, estava associada com mudanças nas atividades de várias enzimas do intestino do inseto e com mudanças patológicas nas células desse órgão. Isso sugere que o sistema digestivo do animal é um sítio de ação do *Jatrophol-I*.

Gandhi *et al.*, (1995), analisando uma fração tóxica extraída a partir do óleo de pinhão manso, verificaram que o componente responsável pela toxicidade era o éster de forbol e que a DL50 dessa fração em ratos era de 6 ml/kg. Os autores também mostraram uma atividade hemolítica tanto do óleo como da fração tóxica, e que esta última quando aplicada sobre a pele de ratos e coelhos, causava uma irritação intensa seguida de necrose.

Os ésteres de forbol são definidos como diterpenos tetracíclicos no qual dois grupos hidroxilas em átomos de carbono vizinhos são esterificados por ácidos graxos. Os ésteres de forbol e seus derivados são tidos como potentes promotores de tumor e em adição a esses efeitos, eles induzem uma notável diversidade de outros efeitos

biológicos em concentrações muito baixas, além de ação primária nas membranas biológicas (GOEL *et al.*, 2007). Esses compostos são moléculas anfífilas e tem a tendência de se ligar a receptores fosfolipídicos de membrana. Esses receptores são geralmente os alvos primários para a ação dos ésteres de forbol. Os efeitos iniciais nas membranas incluem modificação na atividade de receptores celulares, aumento na entrada de nutrientes, como o 2-desoxiglicose, alteração da adesão celular, indução de ácido araquidônico, liberação e síntese de prostaglandinas, inibição de fatores de crescimento epidérmicos aos receptores da superfície celular e alteração no metabolismo de lipídeos (GOEL *et al.*, 2007).

Martinez-Herrera *et al.*, (2006) relataram que a diferença entre variedades tóxicas e de baixa toxicidade, de diferentes regiões climáticas do México, está diretamente relacionada ao alto conteúdo dos ésteres de forbol. O óleo das variedades Mexicanas de baixa toxicidade apresentava quantidades menores dos ésteres de forbol (0,27 mg/ml), já as variedades tóxicas apresentavam uma concentração bem mais elevada (2.49 mg/ml) (MAKKAR & BECKER, 1997). A contribuição relativa dos fatores genéticos e ambientais em determinar os níveis de ésteres de forbol nestes genótipos ainda não é bem entendida (JING *et al.*, 2005; MAKKAR & BECKER, 1997).

A curcina é uma toxina encontrada nas sementes de pinhão manso que causa entre outros efeitos irritação na mucosa gastrointestinal, vômitos, diarreia, além de atuar inibindo fortemente a síntese de proteínas (JUAN *et al.* 2003a). A curcina é uma RIP (as proteínas inativadoras de ribossomos são RNA-N-glicosidases que catalisam a clivagem num sítio específico do RNA, removendo uma adenina do rRNA 28S eucariótico, bloqueando a síntese protéica) e segundo Luo *et al.*, (2007), ela pertence à classe de RIPs do tipo I que possui uma única cadeia de aminoácidos, enquanto que as RIPs dos tipos II possuem duas cadeias (a cadeia A inativadora de ribossomos e a cadeia B lectínica de ligação a célula). Como a curcina não tem a cadeia lectínica, a sua toxicidade é limitada pelo fato dela não entrar na célula. Assim, a curcina é descrita na literatura como sendo bem menos tóxica do que outras fitotoxinas, bem conhecidas, como a ricina (*Ricinus communis*) e a abrina (*Abrus precatorius*) (MAKKAR *et al.*, 1997).

Para a maioria das RIPs do tipo 1 conhecidas, os valores de pI variam entre 8 e 11, com raras exceções abaixo de 7. Entretanto, no pinhão manso, os seis membros da família curcina, são divididos em duas subfamílias de acordo com os seus valores de pI: a família cur A, com pI de 7.9 e a família cur B, com pI predito de 5.4. A família cur A contém a curcina localizada no endosperma, e a família cur B contém a curcina 2 expressa em condições de estresse biótico e abiótico (HUANG *et al.*, 2008).

Juan *et al.*, (2003a) purificaram essa RIP e caracterizaram a sequência do cDNA da curcina observando que a sequência de aminoácidos deduzida indicava que uma pré-proteína com 293 aminoácidos era inicialmente traduzida e que após o processamento, a proteína madura tinha 251 aminoácidos. A sequência de aminoácidos deduzida também mostrou homologia de 33 e 57% com as demais RIPs do tipo I e com a cadeia A das RIPs do tipo 2, respectivamente.

Adicionalmente, Juan *et al.*, (2003b) estudaram os efeitos da curcina na atividade antitumoral através de ensaios de citotoxicidade utilizando um sistema de células livres e um lisado de reticulócitos de coelho para quantificar a atividade inibitória da curcina na biossíntese de proteínas. Os autores observaram um acentuado efeito antitumoral presumivelmente relacionado com a atividade N-glicosidase.

Outros componentes tóxicos presentes em sementes do pinhão manso também foram descritos como: o fitato que diminuem a biodisponibilidade de minerais como cálcio e ferro e comprometem a digestibilidade das proteínas, e inibidores de tripsina que, interferem com os processos fisiológicos de digestão e com o funcionamento das enzimas proteolíticas do pâncreas em ruminantes (MAKKAR *et al.*, 1997).

Além das sementes, outras partes da planta apresentam toxicidade, como: folhas, frutos e látex. As folhas produzem um látex que possui propriedades irritantes para a pele (OSONIYI & ONAJOBI, 2003). Os mesmos autores investigaram e observaram que dependendo da concentração, o látex do pinhão manso possui ação coagulante ou anticoagulante. Gubitiz *et al.*, (1999) citam a presença, no látex, das proteínas curaciclina A e B, sendo que a primeira mostra moderada inibição da atividade das proteínas do complemento (via clássica), bem como da proliferação das células T humanas, como mostrado por Van Den Berg *et al.*, 1995.

O tratamento por radiação ionizante pode servir como um possível método de processamento para inativação ou remoção de alguns fatores antinutricionais tais como ésteres de forbol, fitatos, saponinas e lectinas (SIDDHURAJU *et al.*, 2002; KUMAR *et al.*, 2008). Martínez-Herrera *et al.*, (2006), estudaram a qualidade nutricional e os efeitos de vários tratamentos (processamento hidrotermal, extração com solventes, extração com solvente mais bicarbonato de sódio e radiação ionizante) para inativar os fatores antinutricionais de variedades tóxicas e presumivelmente não-tóxicas da farinha deslipídada do pinhão manso proveniente de diferentes regiões do México. Como resultado, os autores conseguiram inativar os inibidores de tripsina por aquecimento a 121° C por 15 minutos, e os níveis de fitato decresceram através da radiação ionizante a 10 kGy. Os níveis de saponina decresceram com o tratamento de

extração com etanol e irradiação. A extração com etanol seguido por tratamento com bicarbonato de sódio 0,07% diminuiu a atividade lectínica, assim como, o conteúdo dos ésteres de forbol, que foi reduzido em até 97,7% em uma variedade Mexicana. Esses tratamentos permitiram um aumento entre 78,6% e 80,6% da digestibilidade in vitro o que aumentou para 86% com um tratamento térmico.

1.2 Biossíntese e deposição de ácidos graxos em sementes oleaginosas.

Em plantas, as gorduras e óleos representam fontes importantes de armazenagem de carbono reduzido nas sementes que podem também ser utilizados para produção de energia. Esses compostos hidrofóbicos existem principalmente na forma de triacilgliceróis (TAGs) – moléculas de ácidos graxos unidas por ligações ésteres aos três grupos hidroxilas do glicerol – e se acumulam durante a maturação da semente, onde são armazenados até a germinação, após a qual são utilizados como combustível para o crescimento da plântula (GRAHAM, 2008). Os TAGs são armazenados no citoplasma das células do cotilédone ou endosperma, em organelas denominadas oleossomos.

Cada oleossomo possui uma matriz de TAGs circundada por uma monocamada de fosfolípidios e proteínas estruturais denominadas oleosinas, as quais estão usualmente presentes em duas ou mais isoformas altamente conservadas. Os níveis protéicos de oleosinas tipicamente correlacionam-se com os oleossomos, sendo abundantes em sementes com alta proporção de óleos e pequenos oleossomos (HSIEH & HUANG, 2004). Presume-se que as oleosinas funcionem na prevenção do coalescimento dos oleossomos, determinando sua estabilidade. O tamanho reduzido dos oleossomos proporciona uma grande área de superfície por unidade de TAG, o que segundo Graham (2008), seria importante na mobilização dos TAG, porque proporcionaria uma área de superfície suficiente para ação das lipases e/ou interação com os glioxissomos. Os modelos para formação dos oleossomos em sementes em desenvolvimento sugerem que TAGs são continuamente acumulados numa região do retículo endoplasmático que se destaca, na forma de gotículas de óleo envolta por uma monocamada de fosfolípidios.

A síntese dos TAGs durante a maturação da semente ocorre no retículo endoplasmático. A biossíntese dos ácidos graxos vegetais ocorre exclusivamente nos plastídios e compreende basicamente a condensação cíclica de unidades de dois carbonos nas quais o acetil-CoA é o precursor. As cadeias acil em crescimento são ligadas covalentemente a uma proteína ácida de baixo peso molecular, denominada proteína carregadora de acil (ACP, *acyl carrier protein*). Os principais produtos da

síntese de ácidos graxos em plastídeos são o 16:0-ACP e 18:0-ACP que podem ser submetidos a modificações subseqüentes, após serem ligados ao glicerol para formar glicerolipídeos. Além disso, ligações duplas adicionais são inseridas nos ácidos graxos 16:0 e 18:1 pelas isoenzimas dessaturases.

A composição dos ácidos graxos nos lipídeos vegetais varia de acordo com a espécie, por exemplo, as sementes de mamona apresentam altos níveis de ácido ricinoléico e baixos níveis de outros ácidos graxos (ROJAS-BARROS *et al.*, 2004), correspondendo, o ácido ricinoléico, a 90% de todo conteúdo oléico da semente (CHEN *et al.*, 2007; HE *et al.*, 2006). Já em sementes de pinhão manso onde o teor de óleo chega a 60%, os maiores níveis são representados pelo ácido oléico (18:1) e linoléico (18:2) respectivamente, seguidos pelo ácido palmítico (16:0) e esteárico (18:0) (YANG *et al.*, 2009). Os ácidos graxos mais abundantes produzidos nas principais oleaginosas comerciais (soja, dendê, canola e girassol) compreendem apenas quatro dos mais de 200 tipos diferentes, a citar: ácido linoléico, ácido palmítico, ácido láurico e ácido oléico (THELEN & OHLROGGE, 2002).

Um melhor entendimento da biologia molecular do acúmulo de óleo na semente vem emergindo de estudos com outras culturas oleaginosas, particularmente de membros do gênero *Brassica* e seu parente selvagem, *Arabidopsis* (NAMBISAN, 2007). Tong *et al.* (2006), desenvolveram um estudo de caracterização do gene da proteína dessaturase carreadora de estearoil-acil (stearoyl-acyl carrier protein desaturase - SAD), uma importante enzima da biossíntese de ácidos graxos em vegetais superiores, presentes nos plastídeos de sementes em desenvolvimento de pinhão manso. As sementes de pinhão manso contêm aproximadamente 26% de ácidos graxos saturados e 74% de ácidos graxos insaturados, dos quais 42-49% é constituído de ácido oléico. Desse modo, sementes de pinhão manso em desenvolvimento devem possuir uma alta atividade de SAD (TONG *et al.*, 2006).

Augustus *et al.* (2002) confirmaram a elevada porcentagem de ácido oléico e ácido linoléico no óleo do pinhão manso, indicando que esta propriedade pode ser potencialmente explorada na indústria de tintas e esmaltes. Liu *et al.*, (2002) apontam o silenciamento dos genes delta-9 e 12-dessaturase como uma estratégia específica para um acúmulo maior de ácidos esteárico ou oléico, respectivamente, como realizado com outras culturas oleaginosas. Esterases e lipases extraídas de sementes de oleaginosas podem ser potencialmente exploradas em várias aplicações na indústria farmacêutica, na síntese de compostos químicos e em intervenções biotecnológicas em geral. Staubmann *et al.* (1999) isolaram duas novas esterases e uma lipase de semente do pinhão manso e demonstraram que esta lipase (JL) pode

ser utilizada como um potente biocatalisador na hidrólise de triglicerídeos em solventes orgânicos.

A mobilização das reservas lipídicas em sementes oleaginosas é desencadeada durante a germinação, quando as reservas acumuladas precisam ser rapidamente convertidas a metabólitos solúveis que possam ser transportados até a plântula para prover seu crescimento. Este primeiro passo na quebra dos óleos segundo Graham (2008), é a hidrólise catalisada por lipases, dos triacilgliceróis armazenados nos oleossomos, sendo a completa oxidação dos ácidos graxos a CO_2 e H_2O resumida nos seguintes estágios: a oxidação das longas cadeias de ácidos graxos a acetil-CoA (β -oxidação) nos glioxissomos; a conversão do acetil-CoA a compostos de quatro carbonos, via ciclo do glioxilato, e a síntese de malato para gliconeogênese; ou a oxidação do acetil-CoA a CO_2 no ciclo do ácido cítrico e a transferência de elétrons dos carreadores de elétrons reduzidos à cadeia respiratória mitocondrial.

1.3 A era pós-gênômica e as técnicas de análise proteômica

O ano de 2001 ficou marcado pelo surgimento de novos paradigmas em face da conclusão do seqüenciamento do genoma humano. O principal deles é que a seqüência genômica e a função da proteína não podem ser diretamente correlacionadas, pois o seqüenciamento de genes não gera informações que digam respeito à regulação da expressão gênica, modificações pós-traducionais e distribuição espaço-temporal em células e tecidos das proteínas presentes nestes complexos sistemas de interações (FIELDS, 2001).

Assim a necessidade de suprir esta demanda de conhecimentos deu início a era pós-gênômica e levou ao advento das tecnologias “ômicas”, sendo a proteômica designada para a análise de sistemas protéicos. O termo proteoma foi utilizado para designar o conjunto de proteínas expressas por um genoma (WILKINS *et al.*, 1997). Mais recentemente, tal termo foi definido como a análise sistemática da população de proteínas de um tecido, célula ou compartimento celular em um dado momento (WIJK, 2001). Hoje se vislumbra uma enorme gama de aplicações a partir do conhecimento detalhado de proteomas nas mais diversas áreas como: medicina, agropecuária e biotecnologia. Tais aplicações se estendem desde o diagnóstico e terapia de células cancerosas até a descoberta de novas drogas.

Entretanto todos esses avanços na análise de proteomas só foram possíveis graças ao advento e o aperfeiçoamento principalmente das técnicas de eletroforese bidimensional e da espectrometria de massa que tem permitido um entendimento

minucioso dos mais diversos mecanismos celulares (WIJK, 2001). O grande número de proteínas analisadas e a rapidez com a qual os resultados são gerados (“High-throughput Proteomics”) diferenciam as análises proteômicas dos métodos convencionais de análise de proteínas (HIRANO *et al.*, 2004). Assim, o objetivo inicial da proteômica era a identificação em larga escala de todas as proteínas em uma célula ou tecido. Já as aplicações mais atuais se comprometem a analisar vários aspectos funcionais das proteínas tais como: modificações pós-traducionais, interação proteína-proteína, estrutura, atividade e marcadores moleculares (PARK, 2004). Tais objetivos suportam a idéia de que a análise proteômica vai muito além da listagem de proteínas, podendo fornecer indícios substanciais quanto à organização e a dinâmica dos processos metabólicos, regulatórios e de sinalização através dos quais a célula se desenvolve, além de permitir o estudo da função/comportamento dos genes com base nas identificações das proteínas por eles expressas (CANTÚ & CARRILHO 2008).

1.4 Proteômica baseada em 2-DE

A eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida foi inicialmente descrita na década de 70 por Klose (KLOSE, 1975) e O’ Ferrel (O’ FARREL, 1975) independentemente, constituindo uma técnica de separação largamente utilizada para a análise de misturas complexas de proteínas extraídas de células, tecidos ou outras amostras biológicas. Esta técnica promove a separação das proteínas em duas dimensões, de acordo com duas propriedades independentes. Na primeira dimensão, a focalização isoeétrica (IEF), as proteínas são separadas de acordo com seus pontos isoeletricos (pI). Na segunda dimensão, a eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) separa as proteínas de acordo com as seus volumes moleculares.

Um passo fundamental para a utilização em larga escala da eletroforese bidimensional em estudos proteômicos foi o desenvolvimento de tiras de IPG com gradientes imobilizados de pH (GORG *et al.*, 2000). A partir daí milhares de proteínas puderam ser separadas simultaneamente e foi possível obter informações sobre o pI, volume molecular e abundância relativa, assim como modificações pós-traducionais, já que, geralmente, elas provocam mobilidade eletroforética alterada. Um fator determinante nessa técnica é permitir análises posteriores ao fracionamento, como, por exemplo, por espectrometria de massa (GORG *et al.*, 2004).

1.5 Espectrometria de massa

A espectrometria de massa utiliza-se de parâmetros como: rapidez, precisão, acurácia e sensibilidade para determinar a massa molecular de átomos ou moléculas em Daltons (Da), a partir da razão entre a massa e a carga (m/z) de íons na fase gasosa. Com o desenvolvimento de técnicas de ionização suaves como a ionização por dessorção a laser auxiliada por matriz (MALDI) e a ionização por electrospray (ESI), no início da década de 80, tornou-se possível a aplicação da espectrometria de massa na análise de biomoléculas maiores e polares como peptídeos e proteínas (KARAS *et al.*, 1988)(FENN *et al.*, 1989) (DOMON *et al.*, 2006).

A associação dessas novas técnicas com o desenvolvimento de algoritmos computacionais permitiu correlacionar dados obtidos dos espectros de massa de biomoléculas com seqüências existentes em banco de dados. Outro avanço importante foi a conjugação de analisadores de massa em seqüência (MS/MS), tal arranjo aumentou muito o poder de resolução e a sensibilidade da técnica, tornando-a praticamente obrigatória nas análises de moléculas biológicas (MANN *et al.*, 1995; MANN *et al.*, 2001; DOMON *et al.*, 2006).

As aplicações da espectrometria de massa vão desde a resolução de diversos problemas em química de proteínas, tais como: determinação precisa da massa molecular, identificação de proteínas, identificação de modificações pós-traducionais tais como glicosilações e fosforilações, checagem da correção de uma seqüência de aminoácidos, determinação da fidelidade e homogeneidade de proteínas recombinantes, identificação de complexos protéicos não covalentes, detecção de doenças genéticas, até aplicações em áreas como biotecnologia e áreas correlatas (LARSEN & ROEPSTORFF, 2000)(GSTAIGER & AEBERSOLD, 2009)

O espectrômetro de massa tem como componentes básicos três partes: a fonte de ionização (responsável pela introdução de cargas e vaporização da amostra), o analisador (determina a relação m/z do analito) e o detector (detecta a presença do analito). As fontes de ionização podem ser combinadas de diversas formas com os analisadores permitindo a construção de equipamentos híbridos de alto desempenho (DOMON *et al.*, 2006). Uma combinação que tem se mostrado muito eficiente é o MALDI-TOF (*Time of flight*), onde a ionização e dessorção da amostra ocorrem pela diluição desta em uma matriz orgânica, geralmente o ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico, que contém um grupo cromóforo que absorve luz no comprimento de onda do ultravioleta ou infravermelho. À medida que os solventes da matriz e da amostra

evaporam ocorre uma co-cristalização de ambos em uma placa de aço inoxidável contendo micro-fissuras para aplicação da mistura. Este cristal, submetido a tiros de laser na faixa de absorção do cromóforo, provoca uma fotoionização dos analitos pela transferência de carga dos íons da matriz para a amostra e posterior dessorção, fazendo com que entrem na fase gasosa. Após entrarem na fase gasosa os analitos são encaminhados ao analisador do tipo TOF, onde os íons são acelerados por uma diferença de potencial aplicada entre a fonte e o detector e, portanto percorrem um espaço livre (tubo de vóo), sob vácuo, até serem detectados. Por possuírem a mesma voltagem de aceleração, os íons de m/z diferentes se separam no espaço livre e chegam em tempos diferentes proporcionais à raiz quadrada da relação massa/carga (m/z) dos íons. Assim, os componentes individuais em uma mistura de íons são separados de acordo com suas relações m/z , tornando possível a determinação da massa de cada proteína ou peptídeo, submetido à análise, através da geração dos espectros de massa (STEEN & MANN, 2004).

Depois de determinar os valores m/z e a intensidade de todos os picos do espectro, podem-se obter informações em nível de estrutura primária (seqüência) dos peptídeos tripticos. Esta abordagem é chamada MS em tandem, MS/MS ou MS², já que acopla dois estágios de MS e utiliza equipamentos do tipo MS/MS. Nesta técnica um íon-parental (ou precursor) é selecionado no primeiro MS e, no segundo, sofre uma fragmentação, geralmente com um gás inerte, denominada de dissociação induzida por colisão ("Collision-Induced Dissociation, CID"). Os novos picos produzidos pelos produtos gerados (íons-filhos) têm suas relações massa/carga determinadas em um segundo analisador. De modo geral, cerca de seis séries de íons aparecem nos espectros de MS/MS sob baixa energia de colisão. Ocorrem as séries a, b, c, quando a carga permanece na porção N-terminal da molécula e as séries x, y, z quando a carga permanece na porção C-terminal (CHEN, 2008; DOMON *et al.*, 2006 ; LARSEN & ROEPSTORFF, 2000)

1.6 Identificação de proteínas por espectrometria de massa

Atualmente as quatro estratégias principais para a identificação de proteínas por espectrometria de massa são: por mapa de peptídeos (*peptide mass fingerprinting*, PMF), busca através de dados oriundos de MS/MS não processados (MS/MS *ion search*), busca por dados parciais de seqüência (*sequence tag*) e busca por homologia de seqüência (BLAST ou MS-BLAST). Dentre as citadas, a única estratégia que não foi utilizada neste trabalho foi a busca por dados parciais de seqüência (*sequence tag*).

Desde o desenvolvimento da técnica de impressão digital por mapa de peptídeos por Mann *et al.*, (1993), este tem se tornando o método preferido para a identificação de proteínas em larga escala. A digestão enzimática de proteínas com enzimas específicas, como a tripsina, gera um grupo de peptídeos que são característicos de cada proteína. Atualmente, com a rapidez com que os mais diversos genomas têm sido seqüenciados, a chance da correta identificação por PMF é cada vez mais alta. Entretanto algumas limitações como: a presença de mais de uma proteína por spot no gel, digestão incompleta, clivagens inespecíficas e modificações pós-traducionais podem impedir uma identificação confiável. E no caso de genomas não seqüenciados, a identificação por PMF é limitadíssima (LÉON *et al.*, 2007).

Com o refinamento das técnicas de seqüenciamento de DNA e de sua utilização em larga escala na década de 1990, foi possível a construção de bancos de dados cada vez mais sólidos e capazes de abrigar a um número cada vez maior de seqüências obtidas pelos pesquisadores. A partir daí os pesquisadores se deram conta de que o problema de seqüenciamento de peptídeos, utilizando-se dados de MS/MS, poderia ser convertido em um problema de combinação com os bancos de dados sem precisar fazer interpretação de espectros. Essa abordagem tornaria o problema mais simples, visto que fazer uma busca em banco de dados é mais fácil do que processar os dados para seqüenciamento *de novo*, já que um espectro de fragmentação de peptídeos pode não conter informação suficiente para derivar a seqüência completa de aminoácidos sem ambigüidades, mas pode ainda ter informação suficiente para combiná-la de maneira única com uma seqüência peptídica no banco de dados usando somente os fragmentos de íons observados e esperados (CANTÚ & CARRILHO, 2008).

Atualmente existem várias ferramentas de busca (“PeptideSearch”, “Sequest”, “Mascot”, “Sonar MS/MS” e “ProteinProspector”) que correlacionam espectros de massas de fragmentos (não interpretados) de peptídeos com seqüências tanto de aminoácidos como de nucleotídeos registradas em bancos de dados. De forma geral, estes algoritmos têm como objetivo encontrar a seqüência de aminoácidos, em um determinado banco de dados, que melhor descreve os íons fragmentos encontrados em um espectro. As seqüências são procuradas de acordo com a massa do peptídeo intacto (PMF) e com o espectro de fragmentação obtidos para cada peptídeo (MANN *et al.*, 2001; CANTÚ & CARRILHO, 2008).

Outra abordagem para a identificação de proteínas que não estão depositadas em bancos de dados, ou o genoma não está completamente seqüenciado/disponível e que não há seqüências de cDNA suficientes, é a interpretação manual ou automática dos espectros a fim de se derivar a seqüência primária de um determinado peptídeo

baseado única e exclusivamente nos dados obtidos por espectrometria de massas, sem recorrer a banco de dados (seqüenciamento “de novo”) essas seqüências podem ser empregadas em buscas de similaridades de seqüência em programas específicos (MS-BLAST) (SHEVCHENKO *et al.*, 2001).

1.7 Proteômica vegetal

No período de fevereiro de 2004 a fevereiro de 2006 foram identificados 6044 registros no “ISI Web of knowledge” para buscas relacionadas aos termos “proteoma e proteômica”, dos quais apenas 125 referem-se aos termos “planta e proteoma” e 112 para os termos “planta e proteômica”. Embora esses números venham crescendo a cada ano, já que no período de 1999 a 2003, apenas 100 registros foram identificados no “ISI” (ROSSIGNOL *et al.*, 2006).

Já nos períodos seguintes de 2006 a outubro de 2008 foram identificados 10.586 registros no “ISI Web of knowledge” para buscas aos termos “proteoma e proteômica”, dos quais se reduziram a apenas 251 quando os termos usados foram “planta e proteoma” e 272 para os termos “planta e proteômica”, mostrando que as pesquisas na área de proteômica vegetal ainda são muito discretas na literatura.

Muito embora os trabalhos com os termos “proteômica e proteoma” cresçam exponencialmente a cada ano, no ano de 2009 os termos “planta e proteoma” e “planta e proteômica” não alteraram muito em relação ao período de 2006-2008.

Uma das grandes dificuldades encontradas na proteômica vegetal que faz com que ela avance menos em relação às pesquisas proteômicas de microorganismos, por exemplo, em parte é devido à rápida disponibilidade das seqüências genômicas destes e menor complexidade do seu proteoma, somados a uma maior dificuldade na identificação e caracterização de proteínas de organismos vegetais que carecem ou muitas vezes não possuem seqüências genômicas e de ETSs disponibilizadas em bancos de dados (PARK, 2003). Enquanto alguns genomas de plantas têm sido completamente seqüenciados e disponibilizados nos últimos anos, como os de arroz e *Arabidopsis thaliana*, muitas outras espécies de plantas tal como o pinhão manso, ainda carecem de dados genômicos suficientes, o que explica as baixas taxas de identificação de proteínas, desta espécie, através do uso de bancos de dados.

Outras dificuldades são a extração de proteínas de tecidos vegetais já que estes, muitas vezes são recalcitrantes (CARPENTIER *et al.*, 2005) e a presença de proteínas muito abundantes em alguns tecidos vegetais como folha e endosperma, o que dificulta o estudo das proteínas menos abundantes (KRISHNAN *et al.*, 2009).

Apesar dessas limitações, a combinação dos dados de PMF com os dados de MS/MS, tem propiciado a obtenção de alguns sucessos. Estes estudos freqüentemente exploram a disponibilidade dos programas de seqüenciamento ESTs. Estas ESTs podem ser usadas para fazer correlação com os dados de PMF e/ou MS/MS de espécies estritamente relacionadas, ajudando significativamente nos estudos proteômicos de plantas que são pouco estudadas (CHOUDHARY *et al.*, 2001).

Atualmente, o número de ESTs depositadas em bancos de dados, como o NCBI, para espécies de importância econômica como a soja, milho, arroz e trigo, cresce muito rápido a cada dia. Heazlewood e Millar (2006) citam a importância do número total de ESTs únicos e sua relação com o “potencial proteômico”, ou seja, o aumento da chance de se ter um “*match*” favorável com um “*score*” significativo que dê confiança na identificação daquela proteína à medida que o número das ESTs depositadas em banco de dados aumenta

Para a espécie *Jatropha curcas*, existia até abril de 2009, 1.012 ESTs depositadas no NCBI. Em apenas dois meses (junho de 2009) esse número duplicou passando a ser de 2354 ESTs depositadas, dos quais a grande maioria era proveniente de folha e raiz. Atualmente (dezembro de 2009), esse número é de 13.193 (a grande maioria proveniente de embrião), ou seja, um aumento de quase 13 vezes no número de seqüências nucleotídicas depositadas em apenas oito meses.

1.8 Estudos proteômicos com o pinhão manso

Os estudos proteômicos com o pinhão manso ainda são bem discretos na literatura, somente em 2009 foi publicado o primeiro trabalho utilizando essa abordagem por Yang *et al.*, (2009). Os autores realizaram observações ultraestruturais por microscopia eletrônica e fizeram uma análise proteômica do endosperma de sementes durante a germinação. Eles mostraram uma diminuição acentuada no teor de óleo dos oleassomas durante a germinação e um aumento na quantidade de glioxissomos e mitocôndrias o que é compatível com os eventos metabólicos durante a germinação da semente. Já na abordagem proteômica, eles observaram um aumento na expressão de 50 spots envolvidos na mobilização de óleo que estão presentes em várias vias como: β -oxidação, ciclo do glioxalato, glicólise, ciclo do ácido cítrico e gluconeogênese.

Mais recentemente, Liu *et al.*, (2009) descreveram uma análise proteômica comparativa entre o embrião e o endosperma de sementes do pinhão manso. Neste trabalho, os autores mostraram um padrão de similaridade na distribuição de proteínas

em ambos os tecidos o que os levou a selecionar quatorze spots em comum, mas que apresentavam uma mudança significativa no seu perfil de expressão. De acordo com o volume percentual dessas proteínas no embrião e no endosperma, as proteínas do endosperma foram relacionadas com enzimas do catabolismo e com proteínas de reservas utilizadas durante a germinação de sementes, já as proteínas do embrião estavam envolvidas com o anabolismo.

Baseado no que foi exposto acima sobre as características do óleo do pinhão manso e nas propriedades tóxicas e antinutricionais do resíduo proveniente da extração do óleo das sementes o presente trabalho pretende fazer um estudo proteômico das sementes em desenvolvimento e maduras, com o propósito de identificar as proteínas envolvidas na síntese de ácidos graxos, assim como identificar proteínas envolvidas na toxicidade\alergenicidade do resíduo de extração. Estes estudos poderão formar um alicerce sólido para futuros programas de melhoramento genético desta espécie.

2. OBJETIVOS

Estabelecer os proteomas do endosperma de sementes em desenvolvimento e maduras de pinhão manso.

Objetivos específicos

- Estabelecer metodologias para a extração e fracionamento de proteínas do endosperma de sementes de pinhão manso;

- Estabelecer mapas bidimensionais reprodutíveis e de alta qualidade de frações protéicas obtidas a partir de sementes em desenvolvimento e sementes maduras.

- Identificar através de técnicas de espectrometria de massa proteínas obtidas a partir dos géis bidimensionais

- Avaliar as proteínas identificadas em relação a possíveis propriedades tóxicas, antinutricionais e alergênicas, assim como em relação ao seu envolvimento no metabolismo de ácidos graxos e diterpenos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Reagentes e Equipamentos

A procedência dos reagentes e equipamentos utilizados neste trabalho estão listados na Tabela 2 e Tabela 3, respectivamente.

Tabela 2 – Procedência dos reagentes utilizados

Reagente	Fabricante
Acrilamida	GE Healthcare
Agarose	GE Healthcare
Bisacrilamida	GE Healthcare
DeStreak Rehydration Solution	GE Healthcare
Ditiotreitol,	GE Healthcare
Glicina	GE Healthcare
Immobiline™ DryStrip 11cm pH 3-10 4-7 6-11	GE Healthcare
Persulfato de Amônio	GE Healthcare
SDS	GE Healthcare
ácido Trifluoroacético	GE Healthcare
TEMED	GE Healthcare
Thiouréia	GE Healthcare
Tris	GE Healthcare
Uréia	GE Healthcare
Ácido Tricloroacético	Sigma
α -Cyano-4-hydroxycinnamic	Sigma
Acetona	Vetec
Metanol	Vetec
Tripsina	Promega
Acetonitrila	Omnisolv

Tabela 3 – Procedência dos equipamentos utilizados

Reagente	Fabricante
Ettan™ IPGPhor™	GE Healthcare
Espectrômetro de massa ABI 4700	Applied Biosystems

3.2 Material vegetal

As sementes de pinhão manso foram obtidas no campo experimental do Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal do Ceará.

As sementes utilizadas foram divididas em três estágios de acordo com a descrição morfológica realizada por Camila B. Pinheiro (dados de comunicação pessoal). Estágio inicial, onde a testa apresenta coloração amarelada e o endosperma ocupa uma pequena porção da semente; estágio intermediário em que a testa apresenta coloração clara no centro e cinza nas extremidades e o endosperma está em franca expansão, ocupando uma grande porção da semente. E o estágio maduro, em que a testa encontra-se completamente seca e escura e a semente encontra-se em estado de dessecação.

3.3 Preparo das amostras

A eliminação da casca, integumentos internos e do eixo embrionário das sementes foi feita manualmente com o auxílio de microscópio estereoscópico (Leica). O endosperma fragmentado foi deslipidado por tratamento com acetona por 48 horas, liofilizado e macerado até a obtenção de uma farinha fina, o qual foi utilizado para a extração de proteínas.

3.4 Extração de proteínas totais

A extração foi realizada utilizando 10 mg de farinha, misturados com 20 mg de PVPP e 400 µl do tampão de extração (piridina 50 mM, tiouréia 10 mM, SDS 1%, pH 5,0) (ver ANEXO), em seguida agitado por 2 horas a 4 °C. Depois se procedeu uma centrifugação (4 °C a 10.000 x *g* por 30 minutos), após o que o sobrenadante foi cuidadosamente retirado e precipitado com 4 volumes de acetona gelada contendo TCA 10 % por 2 horas a – 20 °C. Seguiu-se uma nova centrifugação (10.000 x *g* por 20 minutos), descartando-se em seguida o sobrenadante e o precipitado ressuspenso em 500 µl de acetona gelada. Esse procedimento foi repetido três vezes e finalmente o precipitado foi secado a vácuo em dessecador

3.5 Extração de proteínas com tris-HCl 0,1 M, NaCl 0,5 M, pH 8,0 e tampão acetato 0,1 M, NaCl 0,5 M, pH 5,0.

Para a extração de proteínas, a farinha e o tampão relevante foram misturados na proporção de 1 : 30 e PVPP na proporção de 1:1. A mistura foi agitada durante 2 horas a 6°C e centrifugada por 30 min, 10.000 g a 6°C. Após a centrifugação o resíduo foi armazenado a – 20°C até sua posterior utilização e o sobrenadante foi posto para dialisar (membrana Spectra/Por, 3,5 kDa “cut off”) contra 50 volumes de água destilada por 48 horas a 4 °C, sendo que neste período a água destilada foi trocada 4 vezes. As frações albumina e globulina foram obtidas por centrifugação (30 min, 10.000 x g a 6°C) do dialisado, liofilizadas e armazenadas a – 20°C até sua posterior utilização.

3.6 Obtenção da fração glutelínica.

O resíduo obtido da extração com tampão tris-HCl 0,1 M, NaCl 0,5 M foi exaustivamente lavado com o mesmo tampão (5x), para a completa remoção das proteínas solúveis neste tampão, e subsequente lavado por mais duas vezes com água destilada. O resíduo obtido foi extraído por 2 horas a temperatura ambiente com uma solução de álcool etílico 80% (1: 30 p/v) para a obtenção da fração enriquecida em prolaminas. Após centrifugação (30 min, 10.000 g, 6°C), o sobrenadante contendo as prolaminas foi descartado e o resíduo foi extraído por 2 hs a temperatura ambiente com uma solução contendo Uréia 6 molar, Triton X-100 1%, 0,5% DTT e 0,5% Pharmalyte. Após centrifugação (30 min, 10.000 g a 6°C) o resíduo foi descartado e o sobrenadante, agora denominado fração glutelina, foi armazenado a -20 °C.

3.7 Dosagem de proteínas

A dosagem de proteínas foi feita utilizando o método de Bradford (1976), utilizando albumina sérica bovina como proteína padrão para construção de uma curva de calibração. Quando necessário, a solubilização das amostras era feita com uma solução de uréia 7M/tiouréia 2M.

3.8 Eletroforese bidimensional, coramento, digitalização e análise dos géis.

As amostras foram solubilizadas em solução de reidratação contendo uréia 7 M, tiuréia 2 M, DTT 65 mM, CHAPS 0,5%, IPG buffer 0,5% e azul de bromofenol e utilizadas para reidratar passivamente tiras de IPG de pH de 3 a 10, 4 a 7 e 6 a 11 de 11cm (Pharmacia Biotech) em uma cuba de reidratação (Pharmacia Biotech) durante 12 horas. A focalização isoeétrica foi realizada no equipamento Ettan™ IPGPhor™ (GE-Healthcare) e focalizada com o seguinte programa: 1º passo 500volts linear por 2 horas, 2º passo 4.000 volts gradiente por 2 horas e 30 minutos e 3º passo 10.000 volts linear até 18000 Volts horas totais.

Após a focalização a tira era incubada sob agitação lenta por 20 minutos com 3 ml de solução de equilíbrio (uréia 6 M, glicerol 30% (v/v), SDS 2% (p/v) , Tris-HCl 0,05 M e traços de azul de bromofenol) contendo 57,8 mg de DTT para a redução das proteínas e, em seguida, alquiladas com 69,3 mg de IAA também em 3 ml de solução de equilíbrio por 20 minutos. Após o equilíbrio, a tira era transferida para um gel de 14 x 14 cm contendo 15% de poliacrilamida com SDS e alimentado por uma fonte Power-Pac 3000 (Bio-Rad). A corrida transcorreu em duas etapas, na primeira foi utilizado 15 mA/gel por 15 minutos e na segunda 25 mA/gel até que o indicador (azul de bromofenol) saísse do gel (em média 4 horas e 30 minutos). Ao fim da eletroforese, os géis obtidos foram incubados com solução corante PhastGel Blue R-350 (ver apêndice) a 0,02% por, no mínimo, 4 horas.

O descoramento com solução descorante (ver ANEXO) ocorreu por aproximadamente 3 horas. Após o descoramento os géis foram armazenados em solução de glicerol (ver ANEXO) a 4 °C. Os géis foram escaneados utilizando-se o programa Labscan v 3.0 (GE-Healthcare) no Umax scanner com sistema integrado de transparência. As imagens foram analisadas no programa ImageMaster 2D (GE-Healthcare) por uma combinação de detecção automática dos spots, feita pelo programa, e detecção manual.

Foi também comparado o padrão de distribuição de massa molecular e do ponto isoeétrico dos spots observados obtidos a partir da extração das proteínas do endosperma de sementes em desenvolvimento e madura de pinhão manso utilizando o programa Microsoft Office Excel 2007.

3.9 Seleção e processamento dos spots para espectrometria de massa

A digestão das proteínas foi feita de acordo com o método de Hellman *et al.*, (1995). Os spots foram selecionados, cortados em pedaços de 1 mm³, totalmente

descolorados em solução de NH_4HCO_3 50 mM / acetonitrila (1:1) em pelo menos 3 lavagens de 15 min., e desidratados com acetonitrila 100% por 5 minutos. O solvente remanescente foi removido dos pedaços de gel em concentrador de amostra *Speed Vac* (Savant). As proteínas foram reidratadas no gelo por 15 minutos, em 15 μL de solução de bicarbonato de amônio 25 mM contendo 0,2 μg de tripsina grau seqüenciamento modificada (Promega). Pedaços do gel foram cobertos com 20 μL do tampão e a digestão realizada a 37°C em banho por 16 horas. Em seguida os peptídeos foram extraídos do gel com solução acetonitrila 50%, TFA 5% em água e concentrados, até um volume de aproximadamente 5 μL no *Speed Vac*.

A mistura de peptídeos da digestão trípica foi misturada 1: 1,5 com uma solução saturada de ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico em acetonitrila 50% / ácido trifluoroacético 0,3% em água. 1 μL da mistura foi aplicada na placa de MALDI e seco à temperatura ambiente antes da análise no espectrômetro de massa.

3.10 Busca em banco de dados

Os espectros de massa obtidos usando-se o equipamento ABI 4700 (Applied Biosystems) foram analisados utilizando o programa MASCOT Daemon program (Matrix Science, London, UK, www.matrixscience.com) como ferramenta de busca nos bancos de dados do NCBI, restringindo para Viridiplantae (Green Plants), em um banco local (ESTs obtidos a partir de bibliotecas de cDNA de sementes em desenvolvimento e de sementes em germinação). Os critérios de busca foram todas as massas moleculares e pontos isoeletricos, cisteínas modificadas por carboxamidometilação e as possíveis modificações, como: oxidação de metionina, fosforilação, cisteínas modificadas por acrilamida. Foi tolerada no máximo uma clivagem perdida e uma variação de massa dos peptídeos de 100 ppm. Foram consideradas positivas para MS/MS as identificações onde pelo menos um peptídeo com *ion score* acima de 35 era encontrado. Já para PMF, o valor mínimo do *protein score* que foi considerado era de 70. As identificações também levaram em conta a relação entre o organismo, no qual as proteínas foram identificadas, e o organismo estudado. O nome de todas as proteínas identificadas neste estudo é dado em inglês para evitar dubiedades que possam surgir com a tradução

A dedução da sequência de aminoácidos foi feita utilizando uma ferramenta de tradução de nucleotídeos no sítio do ExpASY (<http://www.expasy.ch/tools/dna.html>) e a predição do peptídeo sinal foi feita no mesmo sítio utilizando a ferramenta SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.

4.1 Escolha dos estágios de desenvolvimento das proteínas do endosperma de sementes do pinhão manso.

As características morfológicas das sementes de cada um dos três estágios de desenvolvimento aqui estudados estão mostrados na Figura 2a. Estes três estágios de desenvolvimento podem também ser distinguidos tanto através da análise histoquímica qualitativa de lipídeos (Figura 2b), quanto através da análise histoquímica qualitativa de proteínas (Figura 2c) como descrito por Camila B. Pinheiro (dados de comunicação pessoal). Os mapas bidimensionais (Figura 2d) para as proteínas totais mostram também que cada um dos estágios tem um complemento de proteínas distinto.

Como um dos objetivos do presente trabalho era o de identificar proteínas envolvidas na biossíntese de ácidos graxos, nós optamos por nos concentrar no estágio intermediário, onde se observa a deposição de lipídeos e proteínas, e no estágio final no qual esta deposição está se dando com grande intensidade (Figuras 2b e 2c).

4.2 Estabelecimento dos mapas bidimensionais das proteínas totais do endosperma de sementes em desenvolvimento e de sementes maduras

Mapas de referência bidimensionais de alta qualidade foram obtidos a partir do extrato total de proteínas extraídas de sementes em desenvolvimento e sementes maduras (FIGURA 3). A separação das proteínas por focalização isoeletrica foi realizada utilizando tiras de IPG nas faixas de pH de 3-10, 4-7 e 6-11. Foram aplicados 250 µg de proteína por gel. Durante a análise, cada gel foi dividido em quatro quadrantes o que permitiu observar a grande diversidade de spots que variaram em massa de 6 a 97 kDa nas faixas de pH estudadas, sendo predominante o número de spots na faixa de pH de 4-7 com faixa de massa molecular abaixo de 20 kDa. Outro detalhe que chama a atenção é a presença de um grande número de spots básicos observados na faixa de pH de 3 -10 nos géis do endosperma de sementes em desenvolvimento e maduras de pinhão manso quando comparados com os géis do endosperma maduro de sementes de mamona extraídos com o mesmo tampão como descrito por Campos *et al.*, 2010. A análise de detecção de spots utilizando o programa ImageMaster 2D Platinum 5.0, indicou que quando tiras de IPG com pl na faixa de 4 a 7 foram utilizadas, pelos menos cinquenta spots a mais eram visualizados quando comparado com o gel na faixa de pH de 3 a 10 e a resolução dos spots no gel era melhor.

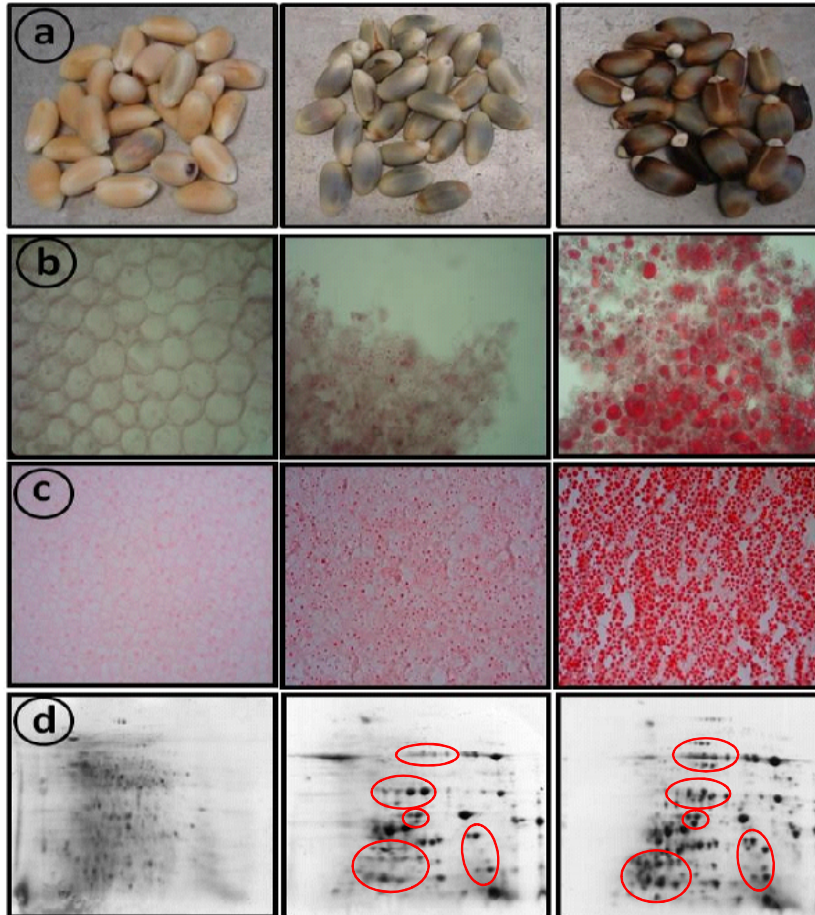


FIGURA 2. Aspectos morfológicos e análise histoquímica em sementes em desenvolvimento do pinhão manso nos estágios inicial, intermediário e maduro. a) Morfologia das sementes em desenvolvimento do pinhão manso. b) Análise histoquímica da deposição de lipídios em sementes em desenvolvimento do pinhão manso. c) Análise histoquímica da deposição de proteínas em sementes em desenvolvimento do pinhão manso. d) Mapas bidimensionais de referência do endosperma de sementes em desenvolvimento do pinhão manso obtidos após extração total de proteínas. A quantidade de proteína aplicada foi de 250 μg . Os géis foram corados com Coomassie brilhante blue.

4.3 Identificação de proteínas a partir dos mapas bidimensionais de proteínas totais de sementes maduras.

Os spots numerados e indicados por setas vermelhas nos géis bidimensionais da FIGURA 4 foram selecionados para a análise por espectrometria de massa. Os spots foram excisados dos géis, digeridos com tripsina e analisados em um espectrômetro de massa MALDI-TOF-TOF (ABI 4700-Applied Biosystems). Os dados obtidos após o processamento de todos os spots foram pesquisados no banco de dados do NCBI nr para Viridiplantae (Green Plants) e num banco local de ESTs do endosperma em desenvolvimento e durante a germinação de sementes de pinhão manso. Este banco de dados foi montado a partir de 16212 sequências, divididos em 9.214 sequências obtidas a partir de sementes em desenvolvimento e 6.998 sequências obtidas de sementes germinantes. Estas sequências ainda não foram depositadas em nenhum banco de dados com acesso livre ao público em geral.

Dos 712 spots analisados, 296 spots foram identificados utilizando o banco local de pinhão manso enquanto apenas 34 spots foram identificados utilizando o banco do NCBI nr (TABELA 4). Quase todos os spots identificados nos mapas bidimensionais eram de proteínas de reserva, sendo as 11S globulinas o grupo predominante (legumin-like protein, 11S globulin seed storage protein, legumin B precursor putative, glutelin type-A 3 precursor putative) seguido das 7S globulinas (vicilin). Outras proteínas que não pertenciam ao grupo das proteínas de reserva foram identificadas como: malate dehydrogenase, putative lactoylglutathione lyase, elongation factor 1-alpha, heat shock protein.

Nossos resultados vão de encontro ao de muitos autores como os dados publicados por Finnie *et al.*, (2004) mostrando que muitos estudos com sementes de cereais e de leguminosas as proteínas de reserva predominam nos géis bidimensionais provenientes do extrato total. Nogueira (2007), desenvolvendo um estudo proteômico baseado em 2-DE com sementes maduras de feijão-de-corda (*Vigna unguiculata*) mostrou que a maioria dos spots identificados eram proteínas de reserva, principalmente, as globulinas 8S.

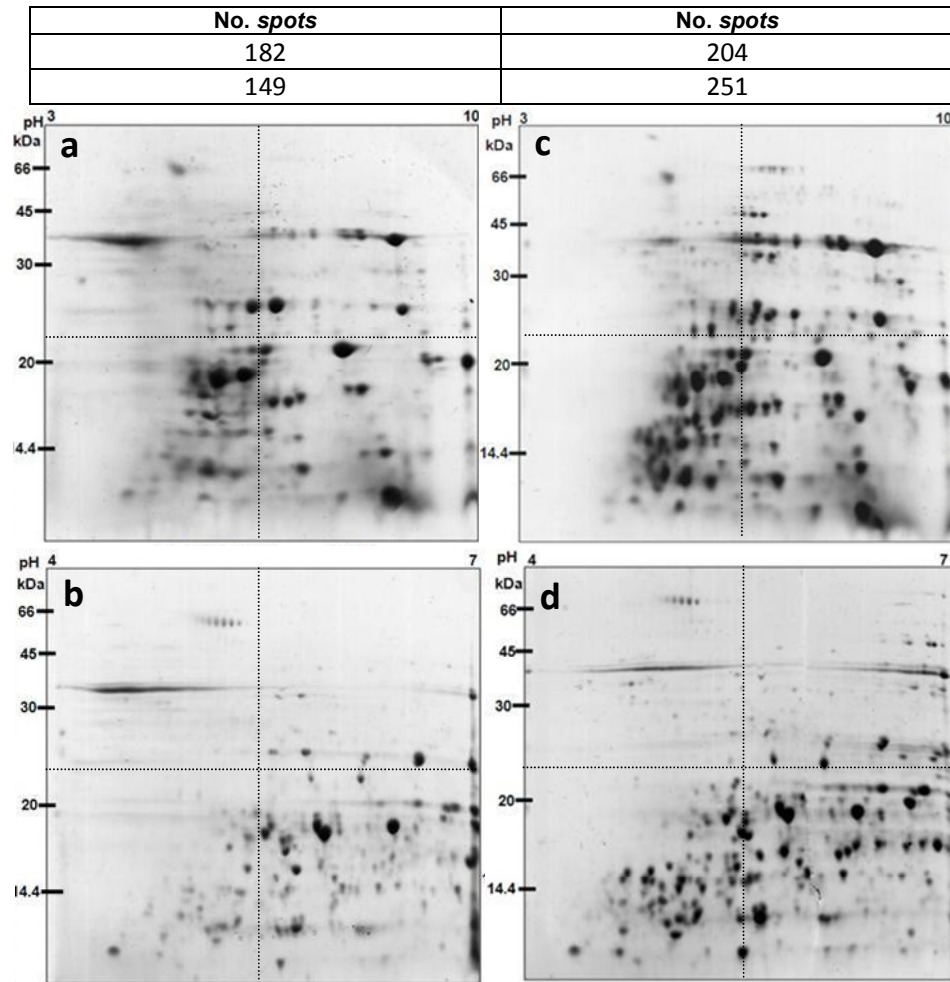


FIGURA 3. Mapas de referência do endosperma de sementes de pinhão manso em desenvolvimento (a e b) e maduro (c e d) e do total de spots detectados utilizando o software ImageMaster platinum 5.0 obtidos após extração total de proteínas. A primeira dimensão foi realizada utilizando tiras de IPG com pH variando de 3-10 e 4-7. A quantidade de proteína aplicada foi de 250 μ g. Os géis foram corados com Coomassie brilhante blue.

Quanto ao grande número de spots relacionados às proteínas de reserva, Magni *et al.*, (2007) relatam que a abundância dessas proteínas assim como a presença de diversas isoformas estão relacionadas ao fato delas serem codificadas por famílias multigênicas, assim como pela ocorrência de modificações pós-traducionais (glicosilação, por exemplo), e o extensivo processamento proteolítico. Como consequência, muitos, se não todos os peptídeos identificados a partir de um extrato de proteínas resolvidos por 2-DE, (como observado para o endosperma maduro de pinhão manso), pertencem à família das proteínas de reserva. Isto significa que todas as demais proteínas relacionadas com metabolismo, defesa, regulação entre outras atividades celulares são pouquíssimo representadas nos géis bidimensionais (ALCHÉ *et al.*, 2006).

Através das sequências dos contigs 194 (glutelin type-A 3 precursor) e contig 206 (legumin B precursor, putative *Ricinus communis*) presentes no banco de EST de pinhão manso foi possível deduzir a sequência completa de aminoácidos utilizando uma ferramenta de tradução de nucleotídeos no sítio do ExpASY (<http://www.expasy.ch/tools/dna.html>) (FIGURA 5). A partir das sequências traduzidas dos contigs foi possível a identificação do sítio de clivagem da região consenso Asn-Gly entre as cadeias α e β , predição do peptídeo sinal (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>), além de evidenciar a abundância dos aminoácidos glutamina e histidina.

A identificação e conseqüentemente as informações sobre a sequência primária destas proteínas só foram possíveis graças à utilização de um banco de dados de ESTs da espécie em estudo. Isto reflete a dificuldade encontrada nos estudos proteômicos de espécies não modelos e mostra ainda que a construção e utilização das ESTs é uma alternativa eficiente, rápida e relativamente barata, se comparado ao seqüenciamento genômico (HEAZLEWOOD e MILLAR 2006) (BHALERAO, 2003).

Nesta primeira parte do trabalho, tentou-se estabelecer o proteoma do endosperma maduro de sementes de pinhão manso através de uma combinação de técnicas de eletroforese bidimensional e espectrometria de massa, a partir do extrato total de proteínas. Muito embora mapas de referência de alta qualidade tenham sido obtidos, o que permitiu a análise de uma quantidade substancial de spots por espectrometria de massa, as identificações revelaram praticamente apenas um grupo de proteínas, as de reserva. Os dados aqui obtidos demonstram que: (1) são necessárias outras abordagens para o estudo sistemático das proteínas menos abundantes presentes no endosperma de pinhão manso. Uma alternativa seria o fracionamento das proteínas presentes no endosperma explorando a sua solubilidade em outros tampões. (2) É indispensável para a identificação de proteínas de espécies não-modelos, o suporte e o incremento de bancos de dados de ESTs, como uma alternativa ao seqüenciamento do genoma.

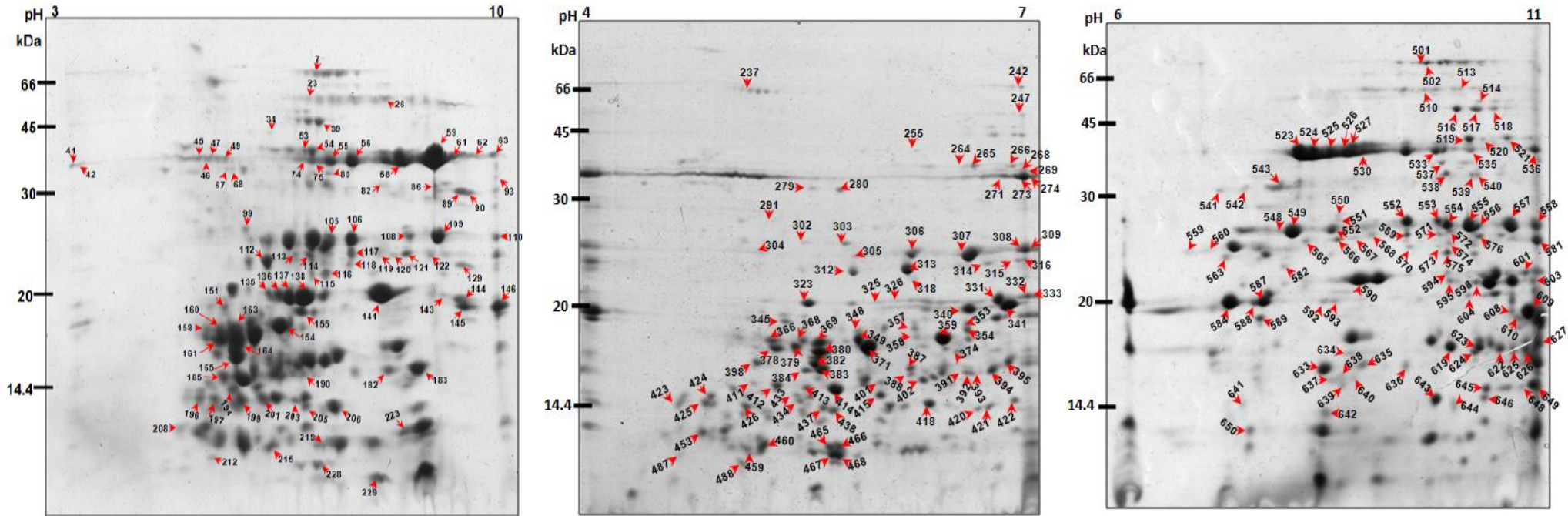


FIGURA 4. Mapas de referência do endosperma de sementes maduras de pinhão manso obtidos após extração total de proteínas. As proteínas foram separadas na primeira dimensão utilizando tiras de IPG com pH variando de 3-10, 4-7 e 6-11. A quantidade de proteína aplicada foi de 250 µg; Os géis foram corados com Coomassie brilhante blue. Os spots analisados por espectrometria de massa estão numerados.

FIGURA 5. Identificação dos spots 52 e 129 como subunidades α e β da Glutelin type-A 3 e da Legumin type B do endosperma de sementes maduras do pinhão manso.

Spot n° ^a	Sequência completa de aminoácidos deduzida a partir dos contigs do banco de EST de pinhão manso. ^b	Identificação da subunidade ^c
	<i>Contig 194</i>	
	<i>5'3' Frame 3</i>	
52 (pH 3-10)	<p>MANSSFLSLGLCFLVLFQTCFGQLEQLTTENRRPWQFRDQRSQQDACRLERINAVEPSRRIQSE AGVTDIWDENDEQFRCAGVVAMRH^uTI^uERGLLLPLYANGPKLIYVL^uGRGI^uHGAVFPG^uC^uPETFC^u SPSEP^uERYGFGAGERESRRFD^uH^uQ^uKVRSR^uLQ^uGDVIALPAGVA^uQ^uWIYNSGRTPLVLV^uQ^uIIDTGN AANQLDEN^uH^uRAFFLAGNP^uQRDV^uQ^uSKRCAFRGSRMPLAGRESRRPSEERSGNIFSGLDE^uQLLAD AFNVNVEVARKIK^uQ^uNDNRGLIVSVERDFELLFPPRSAEEERREREET^uQ^uK^uLEGTGYRPGGG Q^uGRFV^uNG^uVEETF^uC^uTARLV^uH^uNINDPSRADVFNPRAGRLTNING^uQ^uDLPILSYIQLSV^uQ^uKGVLYRNAL MSP^uH^uWNVDA^uH^uSINYFTRGNG^uH^uI^uQ^uIVDDNGETVFDGEV^uQ^uAG^uQ^uILTSP^uQ^uNFVVVKRAGSEGLEWV SFKTNDNAKID^uQLAGRVSAIRSIPEEVLANVF^uQ^uVFREDARRLKEIR^uQ^uEV^uTLFSPGTPSSRN</p>	Glutelin type-A 3 α chain
	<i>Contig 206</i>	
	<i>5'3' Frame 1</i>	
129 (pH 3-10)	<p>MAKHFFFSLSLCLVLLFNVSFASEQVKQENECPLQQQHQCRLDRIEALPDTRI^uQ^uSEAGTIES WNPSRD^uQ^uF^uQ^uCAGVAIVRRVI^uQ^uPNGLLLPAYSNAHQ^uLAFIV^uQ^uGRGITGEMFPG^uC^uPETF^uQ^uEY^uQ^uGAG GSSRVED^uH^uQ^uKVR^uH^uFRPGDIIALPAGVA^uH^uWCYNDGNPVAIYLLDTANSND^uQ^uLDMNPR^uH^uFYLA GNPEDEF^uR^uLYEGRREP^uGSGR^uH^uEGFSSRRRPEGRGTCNNLFCGLDSRLISEAFNIDESLARKL Q^uSENDYRGSIIINVEGKL^uQ^uVVRPART^uQ^uSERE^uQ^uQ^uVGGSGAGGPYLG^uGGGC^uNG^uLEETF^uC^uSMRLKEN IADPSRADVYIPEVGR^uV^uSTINSHNLPILRFLQLSASHVVL^uRNNAVRLP^uH^uW^uH^uLN^uA^uH^uSIYALRG^uQ^uGR V^uQ^uITDEFGEIVFDG^uSVGAG^uQ^uVLTVP^uQ^uNFVVVK^uQ^uAETERFEYITFKTSDNAMTNDLVGRTSAVR^uA LPLEVIANAF^uR^uVSREDARRIKFGREETTLGTSRSRPAGRTAVAS*</p>	Legumin type B β chain

^a Spots numerados de acordo com a Fig. 5 e a Tabela 3.

^b Características ilustradas são: Sublinhado: Clivagem do peptídeo sinal de acordo com SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>); Sublinhado em vermelho: Sítio de clivagem Asn-Gly entre as subunidades α e β e resíduo de cisteínas que formam as pontes de sulfeto entre as subunidades α e β . Sublinhado em azul: Resíduo de Gln e His. Sombreado: Peptídeos identificados por MS/MS de acordo com a tabela 3. A sequência completa de aminoácidos da proteína foi deduzida a partir dos contigs do banco de EST do pinhão manso utilizando o sítio <http://www.expasy.ch/tools/dna.html>

^c Cada spot foi relacionado as subunidades α e β levando em consideração a posição dos peptídeos identificados por MS/MS ao longo da sequência da proteínas identificada.

TABELA 4. Lista das proteínas do endosperma de sementes maduras do pinhão manso identificadas por MS e MS/MS.

Banco local de EST do pinhão manso						NCBI				
Spot n.	MM/pI (kDa)		Protein Score/lon score	Seq. ID Peptídeos	ID (NCBI)	Descrição das proteínas	Protein Score/lon score	Seq. ID Peptídeos	ID (NCBI)	Descrição das proteínas
	Exp.	Teor.								
M7	71.5/6.98	59.7/6.1	88	ELAFGVSER/GTAVVVPAGHPAAFVASR	gb ABO36677.1	vicilin	46	ELAFGVESR	gij137578	Vicilin
M10	71.0/7.34	59.7/6.1	78	ELAFGVSER/GTAVVVPAGHPAAFVASR	gb ABO36677.1	vicilin	-	-	-	-
M12	71.5/7.66	59.7/6.1	36	NNNLEVVCFEINEEGNTR	gb ABO36677.1	vicilin	-	-	-	-
M23	57.2/7.37	59.7/6.1	32	NNNLEVVCFEINEEGNTR	gb ABO36677.1	vicilin	-	-	-	-
M24	59.0/7.57	59.7/6.1	45	GTAVVVPAGHPAAFVASR	gb ABO36677.1	vicilin	-	-	-	-
M26	58.3/8.12	59.7/6.1	42	ELAFGVSER	gb ABO36677.1	Vicilin	41	ELAFGVESR	gij137578	Vicilin
M27	57.9/8.52	59.7/6.1	188	ELAFGVSER/GTAVVVPAGHPAAFVASR/NNNLEVVC FEINEEGNTR	gb ABO36677.1	vicilin	39	ELAFGVESR	gij137578	Vicilin
M28	57.6/8.74	59.7/6.1	56	GTAVVVPAGHPAAFVASR	gb ABO36677.1	vicilin	-	-	-	-
M30	55.1/9.11	59.7/6.1	51	GTAVVVPAGHPAAFVASR	gb ABO36677.1	vicilin	-	-	-	-
M31	55.1/9.23	59.7/6.1	61	GTAVVVPAGHPAAFVASR	gb ABO36677.1	vicilin	-	-	-	-
M34	49.0/6.22	36/8.51	103	GYVGEDQLGQALEGSDVVIIPAGVPR	gb EEF38101.1	malate dehydrogenase	-	-	-	-
M38	47.2/6.84	59.7/6.1	121	AGTPLYLINR/VGQCQSQCER/NPYVFEEHFTSIK	gb ABO36677.1	vicilin	-	-	-	-
M39	47.5/7.02	59.7/6.1	206	AGTPLYLINR/EHGEEGREEEEEAER/NPYVFEEHFTSIK	gb ABO36677.1	vicilin	-	-	-	-
M41	35.1/3.06	51.7/7.7	199	ETFQNVFR/HNQLDQYLR/SLDEQALAESFNVPTEIVR	gb AAD42944.1	11S globulin	-	-	-	-
M42	35.1/3.15	51.7/7.7	194	ETFQNVFR/HNQLDQYLR/SLDEQALAESFNVPTEIVR	gb AAD42944.1	11S globulin	-	-	-	-
M45	37.1/5.09	51.7/7.7	237	ETFQNVFR/HNQLDQYLR/SLDEQALAESFNVPTEIVR	gb AAD42944.1	11S globulin	-	-	-	-
M46	36.9/5.24	51.7/7.7	239	HNQLDQYLR/IRETFQNVFR/SLDEQALAESFNVPTEIVR	gb AAD42944.1	11S globulin	-	-	-	-
M47	37.3/5.35	51.7/7.7	231	ETFQNVFR/HNQLDQYLR/SLDEQALAESFNVPTEIVR	gb AAD42944.1	11S globulin	-	-	-	-
M48	37.3/5.41	51.7/7.7	230	ETFQNVFR/HNQLDQYLR/SLDEQALAESFNVPTEIVR	gb AAD42944.1	11S globulin	-	-	-	-
M49	36.9/5.54	51.7/7.7	263	ETFQNVFR/HNQLDQYLR/SLDEQALAESFNVPTEIVR	gb AAD42944.1	11S globulin	-	-	-	-
M52	39.2/6.56	55.9/7.68	108	LIYVLQGR/DFELLFPPR/GIHGAVFPGPCPETFQSPSE PQR	gb EEF28918.1	glutelin type-A 3	-	-	-	-

TABELA 4. Lista das proteínas do endosperma de sementes maduras do pinhão manso identificadas por MS e MS/MS.

Banco local de EST do pinhão manso							NCBI			
Spot n.	MM/pI (kDa)		Protein Score/lon score	Seq. ID Peptídeos	ID (NCBI)	Descrição das proteínas	Protein Score/lon score	Seq. ID Peptídeos	ID (NCBI)	Descrição das proteínas
	Exp.	Teor.								
M53	39.4/6.78	55.9/7.68	176	DFELLFPPRIQSEAGVTDIWDEDEQFR/GIHGAVFP GCPETFQSPSEPQER	gb EEF28918.1	glutelin type-A 3	-	-	-	-
M54	39.4/6.93	55.9/7.68	200	LIYVLQGR/AFFLAGNPQR/DFELLFPPR/GIHGAVFP GCPETFQSPSEPQER	gb EEF28918.1	glutelin type-A 3	-	-	-	-
M55	36.5/7.21	51.7/7.7	296	AFLGGGQSR/ETFQNVFR/HNQLDQYLR/SLDEQAL AESFNVPTEIVR	gb AAD42944.1	11S globulin	-	-	-	-
M56	36.7/7.56	51.7/7.7	270	ETFQNVFR/HNQLDQYLR/SLDEQALAESFNVPTEIVR	gb AAD42944.1	11S globulin	-	-	-	-
M58	36.9/8.33	51.7/7.7	254	ETFQNVFR/HNQLDQYLR/SLDEQALAESFNVPTEIVR	gb AAD42944.1	11S globulin	40	LVYVQGR	gij6180065	glutelin
M59	38.8/8.91	51.7/7.7	257	ETFQNVFR/HNQLDQYLR/SLDEQALAESFNVPTEIVR	gb AAD42944.1	11S globulin	-	-	-	-
M60	37.6/9.05	51.7/7.7	33	ETFQNVFR	gb AAD42944.1	11S globulin	-	-	-	-
M61	37.3/9.12	51.7/7.7	249	ETFQNVFR/HNQLDQYLR/SLDEQALAESFNVPTEIVR	gb AAD42944.1	11S globulin	-	-	-	-
M62	38.2/9.51	51.7/7.7	248	ETFQNVFR/HNQLDQYLR/SLDEQALAESFNVPTEIVR	gb AAD42944.1	11S globulin	-	-	-	-
M63	38.0/9.85	51.7/7.7	300	AFLGGGQSR/ETFQNVFR/HNQLDQYLR/SLDEQAL AESFNVPTEIVR	gb AAD42944.1	11S globulin	-	-	-	-
M67	34.2/5.56	45.5/7.86	147	DQFQCAGVAIVR/GTCNNLFCGLDSR/LISEAFNIDES LAR/HFYLAGNPEDEFR	gb EEF38213.1	legumin B	39	DPDGYTFELIQ R	gij2494843	Putative lactoylglutathione lyase
M68	34.3/5.62	45.5/7.86	211	DQFQCAGVAIVR/GTCNNLFCGLDSR/LISEAFNIDES LAR/HFYLAGNPEDEFR	gb EEF38213.1	legumin B	-	-	-	-
M69	34.2/5.80	45.5/7.86	374	DQFQCAGVAIVR/GTCNNLFCGLDSR/LISEAFNIDES LAR/HFYLAGNPEDEFR/GITGEMFPGCPETFQEQG AGSSR	gb EEF38213.1	legumin B	-	-	-	-
M74	36.9/6.72	51.7/7.7	264	ETFQNVFR/HNQLDQYLR/HNQLDQYLR/SLDEQAL ESFNVPTEIVR	gb AAD42944.1	11S globulin	-	-	-	-
M75	36.1/6.91	51.7/7.7	183	ETFQNVFR/SLDEQALAESFNVPTEIVR	gb AAD42944.1	11S globulin	-	-	-	-
M76	31.7/6.66	59.76.1	40	NPYVFEHFTSIK	gb ABO36677.1	Vicilin	-	-	-	-
M78	33.7/6.98	59.76.1	85	NPYVFEHFTSIK	gb ABO36677.1	Vicilin	-	-	-	-
M79	31.2/7.12	59.76.1	114	AGTPLYLINR/NPYVFEHFTSIK	gb ABO36677.1	Vicilin	-	-	-	-
M80	33.7/7.18	51.7/7.7	217	ETFQNVFR/HNQLDQYLR/SLDEQALAESFNVPTEIVR	gb AAD42944.1	11S globulin	-	-	-	-
M81	30.0/7.45	59.76.1	39	NPYVFEHFTSIK	gb ABO36677.1	vicilin	-	-	-	-
M82	30.9/8.07	55.9/7.68	44	GIHGAVFPGCPETFQSPSEPQER	gb EEF28918.1	glutelin type-A 3	-	-	-	-

TABELA 4. Lista das proteínas do endosperma de sementes maduras do pinhão manso identificadas por MS e MS/MS.

Banco local de EST do pinhão manso							NCBI			
Spot n.	MM/pI (kDa)		Protein Score/ion score	Seq. ID Peptídeos	ID (NCBI)	Descrição das proteínas	Protein Score/ion score	Seq. ID Peptídeos	ID (NCBI)	Descrição das proteínas
	Exp.	Teor.								
M83	29.4/8.22	59.76.1	30	NPYVFEEHFTSIK	gb ABO36677.1	Vicilin	-	-	-	-
M85	29.1/8.76	49.4/9.15	56	YYCTVIDAPGHR	gb EEF34346.1	elongation factor 1-alpha	56	YYCTVIDAPGHR	gij119150	Elongation factor 1-alpha
M86	31.0/8.90	52.4/6.44	81	HNQLDQYLR/APTEAQQCHLQR	emb CAA64762.1	legumin-like protein	-	-	-	-
M89	29.9/9.3	51.7/7.7	157	AFLGGGQSR/ETFQNVFR/HNQLDQYLR	gb AAD42944.1	11S globulin	-	-	-	-
M90	29.8/9.41	51.7/7.7	159	AFLGGGQSR/ETFQNVFR/HNQLDQYLR	gb AAD42944.1	11S globulin	-	-	-	-
M91	36.1/9.88	59.76.1	78	HNQLDQYLR/SLDEQALAESFNVPTEIVR	gb ABO36677.1	Vicilin	-	-	-	-
M92	34.2/9.88	51.7/7.7	164	HNQLDQYLR/SLDEQALAESFNVPTEIVR	gb AAD42944.1	11S globulin	-	-	-	-
M93	32.3/9.88	51.7/7.7	158	ETFQNVFR/HNQLDQYLR/SLDEQALAESFNVPTEIVR	gb AAD42944.1	11S globulin	-	-	-	-
M94	29.8/9.89	51.7/7.7	93	ETFQNVFR/HNQLDQYLR	gb AAD42944.1	11S globulin	-	-	-	-
M99	25.4/5.84	45.5/7.86	65	LISEAFNIDESLAR (65)	gb EEF38213.1	legumin B	-	-	-	-
M103	24.9/6.55	55.9/7.68	43	AGSEGLEWVSFK	gb EEF28918.1	glutelin type-A 3,	-	-	-	-
M105	24.6/7.20	51.7/7.7	107	AFLGGGQSR/ HNQLDQYLR	gb AAD42944.1	11S globulin	-	-	-	-
M106	24.8/7.56	51.7/7.7	121	AFLGGGQSR/HNQLDQYLR	gb AAD42944.1	11S globulin	39	LVYVQGR	gij6180065	glutelin
M108	24.8/8.49	52.4/6.44	39	HNQLDQYLR	emb CAA64762.1	legumin-like protein	-	-	-	-
M109	24.8/8.99	51.7/7.7	238	AMPLDVLMSYR/AMPLDVLMSYR/AMHSPHWSIN DQR/AMHSPHWSINDQR/KLPILSFMDMSAER	gb AAD42944.1	11S globulin	44	AMPEDVLMNS YR	gij793856	globulin
M110	24.7/9.90	52.4/6.44	99	SLDEQALAESFNVPTEIVR	emb CAA64762.1	legumin-like protein	-	-	-	-
M112	22.4/6.20	55.9/7.68	52	AGSEGLEWVSFK	gb EEF28918.1	glutelin type-A 3	-	-	-	-
M113	23.1/6.63	52.4/6.44	38	HNQLDQYLR	emb CAA64762.1	legumin-like protein	-	-	-	-
M114	22.9/6.85	51.7/7.7	34	HNQLDQYLR	gb AAD42944.1	11S globulin	-	-	-	-
M115	21.1/6.89	51.7/7.7	43	HNQLDQYLR	gb AAD42944.1	11S globulin	-	-	-	-
M116	21.2/7.15	51.7/7.7	82	HNQLDQYLR	gb AAD42944.1	11S globulin	-	-	-	-

TABELA 4. Lista das proteínas do endosperma de sementes maduras do pinhão manso identificadas por MS e MS/MS.

Banco local de EST do pinhão manso							NCBI			
Spot n.	MM/pI (kDa)		Protein Score/ion score	Seq. ID Peptídeos	ID (NCBI)	Descrição das proteínas	Protein Score/ion score	Seq. ID Peptídeos	ID (NCBI)	Descrição das proteínas
	Exp.	Teor.								
M117	23.1/7.54	51.7/7.7	102	AFLGGGQSR/ HNQLDQYLR	gb AAD42944.1	11S globulin	-	-	-	-
M118	22.0/7.51	51.7/7.7	45	HNQLDQYLR	gb AAD42944.1	11S globulin	-	-	-	-
M119	23.1/8.0	59.76.1	170	EVDQAFGR/ ELAFGVSR/ GTAVVVPAGHPAAFVASR	gb ABO36677.1	Vicilin	53	ELAFGVESR	gij137578	Vicilin
M120	22.8/8.22	51.7/7.7	56	HNQLDQYLR	gb AAD42944.1	11S globulin	-	-	-	-
M121	23.0/8.44	51.7/7.7	113	AFLGGGQSR/ HNQLDQYLR	gb AAD42944.1	11S globulin	-	-	-	-
M122	22.9/8.82	59.76.1	91	ELAFGVSR/QNEEWFFGPR	gb ABO36677.1	vicilin	56	ELAFGVESR	gij137578	Vicilin
M128	21.0/9.02	51.7/7.7	54	SLDEQALAESFNVPTEIVR	gb AAD42944.1	11S globulin	76	VSTVNSHNLPI R	gij8118510	legumin-like protein
M129	22.0/9.28	45.5/7.86	260	FEYITFK/ADVYIPEVGR/ALPLEVIANAFR/FLQLSASH VVLVR/VSTINSHNLPILR	gb EEF38213.1	legumin B	-	-	-	-
M130	21.9/9.48	45.5/7.86	168	ALPLEVIANAFR/FLQLSASHVVLVR/VSTINSHNLPILR	gb EEF38213.1	legumin B	-	-	-	-
M133	20.0/5.61	51.7/7.7	58	LDNLNAEPPSR	>gb EEF32199.1	11S globulin subunit beta	-	-	-	-
M135	19.5/6.20	55.9/7.68	89	IQSEAGVTDIWDENDQFR/GIHGAVFPGCPETFQSP SEPKER	gb EEF28918.1	glutelin type-A 3	-	-	-	-
M136	19.5/6.37	55.9/7.68	239	LIYVLQGR/IQSEAGVTDIWDENDQFR/GIHGAVFPG CPETFQSPSEPKER	gb EEF28918.1	glutelin type-A 3,	-	-	-	-
M137	19.4/6.55	52.4/6.44	114	IDSEGGETEIWDPSEDQFCAGVAAYR	emb CAA64762.1	legumin-like protein	-	-	-	-
M138	19.4/6.77	55.9/7.68	198	IQSEAGVTDIWDENDQFR/GIHGAVFPGCPETFQSP SEPKER	gb EEF28918.1	glutelin type-A 3	-	-	-	-
M139	19.5/7.11	55.9/7.68	83	LIYVLQGR/GIHGAVFPGCPETFQSPSEPKER	gb EEF28918.1	glutelin type-A 3	-	-	-	-
M141	19.3/7.95	55.9/7.68	293	IQSEAGVTDIWDENDQFR/GIHGAVFPGCPETFQSP SEPKER	gb EEF28918.1	glutelin type-A 3	-	-	-	-
M142	19.6/8.87	59.76.1	110	ELAFGVSR/GTAVVVPAGHPAAFVASR	gb ABO36677.1	Vicilin	-	-	-	-
M143	19.4/9.01	55.9/7.68	75	IVMELYQDVVPR/VFFDMAVGGQPVGR	>gb ABL67655.1	putative cyclophilin	-	-	-	-
M144	19.1/9.30	55.9/7.68	225	LIYVLQGR/IQSEAGVTDIWDENDQFR/GIHGAVFPG CPETFQSPSEPKER	gb EEF28918.1	glutelin type-A 3,	-	-	-	-
M145	18.5/9.38	55.9/7.68	128	QSEAGVTDIWDENDQFR/GIHGAVFPGCPETFQSP SEPKER	gb EEF28918.1	glutelin type-A 3,	-	-	-	-
M146	18.6/9.91	55.9/7.68	182	IQSEAGVTDIWDENDQFR/GIHGAVFPGCPETFQSP SEPKER	gb EEF28918.1	glutelin type-A 3,	-	-	-	-

TABELA 4. Lista das proteínas do endosperma de sementes maduras do pinhão manso identificadas por MS e MS/MS.

Banco local de EST do pinhão manso							NCBI			
Spot n.	MM/pI (kDa)		Protein Score/ion score	Seq. ID Peptídeos	ID (NCBI)	Descrição das proteínas	Protein Score/ion score	Seq. ID Peptídeos	ID (NCBI)	Descrição das proteínas
	Exp.	Teor.								
M147	18.0/9.93	45.5/7.86	182	ALPLEVIANAFR/FLQLSASHVLR/VSTINSHNLPILR	gb EEF38213.1	legumin B,	-	-	-	-
M148	17.6/9.44	45.5/7.86	73	ALPLEVIANAFR/VSTINSHNLPILR	gb EEF38213.1	legumin B,	-	-	-	-
M149	18.5/5.10	55.9/7.68	34	IQSEAGVTDIWDENDEQFR	gb EEF28918.1	glutelin type-A 3,	-	-	-	-
M150	18.5/5.27	45.5/7.86	68	DQFQCAGVAIVR	gb EEF38213.1	legumin B,	-	-	-	-
M151	18.3/5.51	45.5/7.86	112	DQFQCAGVAIVR/GITGEMFPGCPETFQEQYQGAGGS SR	gb EEF38213.1	legumin B	-	-	-	-
M152	18.7/6.23	55.9/7.68	123	IQSEAGVTDIWDENDEQFR/GIHGAVFPGCPETFQSP SEPQER	gb EEF28918.1	glutelin type-A 3	-	-	-	-
M154	17.2/6.40	55.9/7.68	149	AFFLAGNPQR/DFELLFPPR/QLEGTGYRPGGGQGR	gb EEF28918.1	glutelin type-A 3	-	-	-	-
M155	18.2/6.73	55.9/7.68	301	LIYVLQGR/IQSEAGVTDIWDENDEQFR/GIHGAVFPG CPETFQSPSEPQER	gb EEF28918.1	glutelin type-A 3	-	-	-	-
M156	18.2/6.95	55.9/7.68	43	GIHGAVFPGCPETFQSPSEPQER	gb EEF28918.1	glutelin type-A 3	-	-	-	-
M157	18.5/7.44	55.9/7.68	65	NPYVFEHFTSIK	gb EEF28918.1	glutelin type-A 3	-	-	-	-
M158	17.0/5.21	45.5/7.86	133	DQFQCAGVAIVR/GITGEMFPGCPETFQEQYQGAGGS SR	gb EEF38213.1	legumin B,	-	-	-	-
M159	16.4/6.20	45.5/7.86	215	DQFQCAGVAIVR/LDRIEALEPDTR/GITGEMFPGCPE TFQEQYQGAGGSSR	gb EEF38213.1	legumin B	-	-	-	-
M160	17.1/5.43	45.5/7.86	137	DQFQCAGVAIVR/HFYLAGNPEDEFR/IQSEAGTIESW NPSR	gb EEF38213.1	legumin B	-	-	-	-
M161	16.3/5.45	45.5/7.86	301	DQFQCAGVAIVR/HFYLAGNPEDEFR/IQSEAGTIESW NPSR/GITGEMFPGCPETFQEQYQGAGGSSR	gb EEF38213.1	legumin B	-	-	-	-
M162	15.4/5.39	45.5/7.86	120	DQFQCAGVAIVR/IQSEAGTIESWNPSR	gb EEF38213.1	legumin B	-	-	-	-
M163	17.0/5.70	45.5/7.86	264	DQFQCAGVAIVR/LISEAFNIDESLAR/HFYLAGNPED EFR/IQSEAGTIESWNPSR	gb EEF38213.1	legumin B	-	-	-	-
M164	16.4/5.70	45.5/7.86	296	DQFQCAGVAIVR/IQSEAGTIESWNPSR/GITGEMFPG CPETFQEQYQGAGGSSR	gb EEF38213.1	legumin B	-	-	-	-
M165	15.2/5.71	55.9/7.68	344	IQSEAGVTDIWDENDEQFR/NALMSPHWNVDHSIN YFTR/NALMSPHWNVDHSIN YFTR/GIHGAVFPGCP ETFQSPSEPQER	gb EEF28918.1	glutelin type-A 3	-	-	-	-
M166	17.3/5.91	45.5/7.86	208	LISEAFNIDESLAR/HFYLAGNPEDEFR/HFYLAGNPE DEFR/AFFLAGNPQR	gb EEF38213.1	legumin B	-	-	-	-
M167	16.5/6.00	45.5/7.86	206	GTCNNLFCGLDSR/LISEAFNIDESLAR	gb EEF38213.1	legumin B	-	-	-	-
M168	17.2/6.76	45.5/7.86	33	LISEAFNIDESLAR	gb EEF38213.1	legumin B	-	-	-	-

TABELA 4. Lista das proteínas do endosperma de sementes maduras do pinhão manso identificadas por MS e MS/MS.

Banco local de EST do pinhão manso							NCBI			
Spot n.	MM/pI (kDa)		Protein Score/ion score	Seq. ID Peptídeos	ID (NCBI)	Descrição das proteínas	Protein Score/ion score	Seq. ID Peptídeos	ID (NCBI)	Descrição das proteínas
	Exp.	Teor.								
M171	14.8/6.54	55.9/7.68	190	LIYVLQGR/IQSEAGVTDIWDENDEQFR/GIHGAVFPGCPETFQSPSEPQER	gb EEF28918.1	glutelin type-A 3	-	-	-	-
M172	14.6/6.71	55.9/7.68	91	IQSEAGVTDIWDENDEQFR/GIHGAVFPGCPETFQSPSEPQER	gb EEF28918.1	glutelin type-A 3	-	-	-	-
M173	15.0/6.89	55.9/7.68	222	LIYVLQGR/IQSEAGVTDIWDENDEQFR/GIHGAVFPGCPETFQSPSEPQER	gb EEF28918.1	glutelin type-A 3	-	-	-	-
M176	14.5/7.57	55.9/7.68	116	GGHVTNVNSHNFPILR	gb EEF28918.1	glutelin type-A 3	-	-	-	-
M178	15.9/8.28	51.7/7.7	250	AMHSPHWSINDQR/AMHSPHWSINDQR/EGDMFVIPQFYAALGR/EGDMFVIPQFYAALGR	gb AAD42944.1	11S globulin	-	-	-	-
M181	15.2/8.35	55.9/7.68	39	DFELLFPPR	gb EEF28918.1	glutelin type-A 3	-	-	-	-
M182	14.4/8.15	55.9/7.68	118	GGHVTNVNSHNFPILR	gb EEF28918.1	glutelin type-A 3	-	-	-	-
M183	14.6/8.62	55.9/7.68	116	GGHVTNVNSHNFPILR	gb EEF28918.1	glutelin type-A 3	-	-	-	-
M185	14.1/5.49	55.9/7.68	77	LVHNINDPSR/GIHGAVFPGCPETFQSPSEPQER	gb EEF28918.1	glutelin type-A 3	-	-	-	-
M189	14.2/6.60	55.9/7.68	57	GGHVTNVNSHNFPILR	gb EEF28918.1	glutelin type-A 3	-	-	-	-
M190	14.4/6.78	55.9/7.68	31	GGHVTNVNSHNFPILR	gb EEF28918.1	glutelin type-A 3	-	-	-	-
M191	14.2/6.90	45.5/7.86	50	GGHVTNVNSHNFPILR	gb EEF28917.1	legumin B	-	-	-	-
M184	14.8/9.96	45.5/7.86	33	ALPLEVIANAFR	gb EEF38213.1	legumin B	-	-	-	-
M194	13.4/5.63	55.9/7.68	49	LIYVLQGR	gb EEF28918.1	glutelin type-A 3	-	-	-	-
M196	12.8/5.11	55.9/7.68	42	DFELLFPPR	gb EEF28918.1	glutelin type-A 3	-	-	-	-
M197	12.8/5.35	55.9/7.68	41	DFELLFPPR	gb EEF28918.1	glutelin type-A 3	-	-	-	-
M199	12.6/5.66	51.7/7.7	54	AMHSPHWSINDQR	gb AAD42944.1	11S globulin	-	-	-	-
M201	12.9/6.1	45.5/7.86	78	ADVYIPEVGR/VSTINSHNLPILR	gb EEF38213.1	legumin B	-	-	-	-
M203	12.7/6.65	52.4/6.44	69	LVYVIQGR/ADVYIPEVGR	emb CAA64762.1	legumin-like protein	-	-	-	-
M205	12.5/6.80	45.5/7.86	42	ADVYIPEVGR	gb EEF38213.1	legumin B	-	-	-	-
M206	12.5/7.26	45.5/7.86	86	FLQLSASHVVLRL	gb EEF38213.1	legumin B	-	-	-	-

TABELA 4. Lista das proteínas do endosperma de sementes maduras do pinhão manso identificadas por MS e MS/MS.

Banco local de EST do pinhão manso							NCBI			
Spot n.	MM/pI (kDa)		Protein Score/ion score	Seq. ID Peptídeos	ID (NCBI)	Descrição das proteínas	Protein Score/ion score	Seq. ID Peptídeos	ID (NCBI)	Descrição das proteínas
	Exp.	Teor.								
M207	12.5/8.63	55.9/7.68	39	AFFLAGNPQR	gb EEF28918.1	glutelin type-A 3	-	-	-	-
M210	11.5/5.20	51.7/7.7	35	GDMHIQIVDDSGNTVMDER	sp Q9XHP0.1	11S globulin seed storage protein	-	-	-	-
M213	10.9/5.80	55.9/7.68	213	DFELLFPPR	gb EEF28918.1	glutelin type-A 3	-	-	-	-
M231	9.7/8.71	52.4/6.44	91	IHLANQR/THNLESR	emb CAA64762.1	legumin-like protein	-	-	-	-
M233	11.1/10.0	52.4/6.44	44	AFLGGGQSR	emb CAA64762.1	legumin-like protein	-	-	-	-
M237	65.1/5.14	70.8/5.14	97	TTPSYVAFDTER/NAVVTVPAYFNDSQR/	gb EEF34649.1	heat shock protein	93%	TTPSYVAFDT ER/ NAVVTVPAYFN	gi 123601	Heat shock 70 kDa protein
M242	68.0/6.99	59.76.1	93	GTAVVVPAGHPAAFVASR/NNNLEVVCFEINEEGNTR	gb ABO36677.1	Vicilin	-	-	-	-
M247	52.5/7.00	59.76.1	37	GTAVVVPAGHPAAFVASR	gb ABO36677.1	vicilin	-	-	-	-
M255	39.9/6.48	36.0/8.51	84	GYVGEDQLGQALEGSDVVIIPAGVPR	gb EEF38101.1	malate dehydrogenase	-	-	-	-
M264	36.4/6.61	55.9/7.68	97	LIYVLQGR/AFFLAGNPQR/GIHGAVFPGCPETFQSPS EPQER	gb EEF28918.1	glutelin type-A 3	-	-	-	-
M265	36.7/6.67	55.9/7.68	198	YGFGAGER/LIYVLQGR/AFFLAGNPQR/GIHGAVFPG CPETFQSPSEPQER	gb EEF28918.1	glutelin type-A 3,	-	-	-	-
M266	36.7/6.94	55.9/7.68	240	YGFGAGER/LIYVLQGR/AFFLAGNPQR/QSEAGVTD IWDENDEQFR/GIHGAVFPGCPETFQSPSEPQER	gb EEF28918.1	glutelin type-A 3	-	-	-	-
M268	35.6/7.01	51.7/7.7	49	HNQLDQYLR	gb AAD42944.1	11S globulin	99%	LVYLVQGR	gi 6180065	glutelin
M269	35.3/7.08	51.7/7.7	64	SLDEQALAESFNVPTEIVR	gb AAD42944.1	11S globulin	-	-	-	-
M271	34.5/6.87	51.7/7.7	191	AFLGGGQSR/ETFQNVFR/HNQLDQYLR/IREFQNV FR	gb AAD42944.1	11S globulin	-	-	-	-
M273	34.2/7.00	51.7/7.7	117	ETFQNVFR/HNQLDQYLR/IREFQNVFR	gb AAD42944.1	11S globulin	-	-	-	-
M274	34.3/7.07	51.7/7.7	237	AFLGGGQSR/ETFQNVFR/HNQLDQYLR/IREFQNV FR/TIVPDEREEEEFTYSRPGQSGR	gb AAD42944.1	11S globulin	-	-	-	-
M279	31.7/5.56	53.6/8.6	349	DQFQCAGVAIVR/LDRIEALEPDTR/GTCNNLFCGLDS R/LISEAFNIDESLAR/HFYLAGNPEDEFR/GITGEMFP GCPETFQEQYQAGGSSR	gb AAF73007.1	legumin-like protein	-	-	-	-
M280	31.3/5.76	53.6/8.6	70	HFYLAGNPEDEFR	gb AAF73007.1	legumin-like protein	-	-	-	-
M291	27.1/5.31	53.6/8.6	32	DQFQCAGVAIVR	gb AAF73007.1	legumin-like protein	-	-	-	-
M302	24.9/5.52	53.6/8.6	184	GTCNNLFCGLDSR/HFYLAGNPEDEFR/GITGEMFP GCPETFQEQYQAGGSSR	gb AAF73007.1	legumin-like protein	-	-	-	-

TABELA 4. Lista das proteínas do endosperma de sementes maduras do pinhão manso identificadas por MS e MS/MS.

Banco local de EST do pinhão manso							NCBI			
Spot n.	MM/pI (kDa)		Protein Score/ion score	Seq. ID Peptídeos	ID (NCBI)	Descrição das proteínas	Protein Score/ion score	Seq. ID Peptídeos	ID (NCBI)	Descrição das proteínas
	Exp.	Teor.								
M303	24.7/5.88	53.6/8.6	64	HFYLAGNPEDEFR	gb AAF73007.1	legumin-like protein	-	-	-	-
M304	23.8/5.22	51.7/7.7	78	HNQLDQYLR/SLDEQALAESFNVPTEIVR	gb AAD42944.1	11S globulin	-	-	-	-
M305	23.4/5.87	55.9/7.68	32	ADVFNPR	gb EEF28918.1	glutelin type-A 3,	-	-	-	-
M306	23.5/6.24	55.9/7.68	205	ADVFNPR/LVHNINDPSR/AGSEGLEWVSFK/NALMS PHWNVDHSINYFTR	gb EEF28918.1	glutelin type-A 3,	52	ADVFNPR	gij6180065	Glutelin
M307	23.5/6.63	55.9/7.68	190	ADVFNPR/AGSEGLEWVSFK/NALMSPHWNVDHSI NYFTR	gb EEF28918.1	glutelin type-A 3	54	ADVFNPR	gij6180065	Glutelin
M308	24.2/7.02	55.9/7.68	57	ADVFNPR	gb EEF28918.1	glutelin type-A 3,	57	ADVFNPR	gij6180065	Glutelin
M309	24.1/7.09	55.9/7.68	31	ADVFNPR	gb EEF28918.1	glutelin type-A 3,	-	-	-	-
M312	19.5/5.43	55.9/7.68	202	ADVFNPR/LVHNINDPSR/AGSEGLEWVSFK/ NALMSPHWNVDHSINYFTR	gb EEF28918.1	glutelin type-A 3,	51	ADVFNPR	gij6180065	Glutelin
M313	22.2/6.22	55.9/7.68	164	ADVFNPR/AGSEGLEWVSFK/ NALMSPHWNVDHSINYFTR	gb EEF28918.1	glutelin type-A 3,	46	ADVFNPR	gij6180065	Glutelin
M314	22.8/6.76	51.7/7.7	88	AFLGGGQSR/HNQLDQYLR	gb AAD42944.1	11S globulin	-	-	-	-
M315	22.9/6.98	51.7/7.7	51	HNQLDQYLR	gb AAD42944.1	11S globulin	-	-	-	-
M316	23.0/7.02	51.7/7.7	54	HNQLDQYLR	gb AAD42944.1	11S globulin	-	-	-	-
M318	21.3/6.27	53.6/8.6	31	DQFQCAGVAIVR	gb AAF73007.1	legumin-like protein	-	-	-	-
M323	19.4/5.54	51.7/7.7	55	LDNLNAAEPSR	gb EEF32199.1	11S globulin subunit beta, putative	-	-	-	-
M325	19.5/6.05	55.9/7.68	75	IQSEAGVTDIWDEDEQFR/ GIHGAVFPGCPETFQSPSEPQER	gb EEF28918.1	glutelin type-A 3	-	-	-	-
M326	19.5/6.16	55.9/7.68	87	YGFGAGER/GIHGAVFPGCPETFQSPSEPQER	gb EEF28918.1	glutelin type-A 3	-	-	-	-
M327	19.5/6.24	55.9/7.68	200	YGFGAGER/IQSEAGVTDIWDEDEQFR/ GIHGAVFPGCPETFQSPSEPQER	gb EEF28918.1	glutelin type-A 3	-	-	-	-
M328	19.5/6.34	55.9/7.68	139	IQSEAGVTDIWDEDEQFR/ GIHGAVFPGCPETFQSPSEPQER	gb EEF28918.1	glutelin type-A 3	-	-	-	-
M329	19.5/6.46	55.9/7.68	253	YGFGAGER/LIYVLQGR/IQSEAGVTDIWDEDEQFR/ GIHGAVFPGCPETFQSPSEPQER	gb EEF28918.1	glutelin type-A 3	-	-	-	-
M330	19.5/6.54	55.9/7.68	130	YGFGAGER/IQSEAGVTDIWDEDEQFR/GIHGAVFP GCPETFQSPSEPQER	gb EEF28918.1	glutelin type-A 3	-	-	-	-
M331	19.7/6.85	55.9/7.68	404	YGFGAGER/RPWQFR/LIYVLQGR/IQSEAGVTDIWDE NDEQFR/GIHGAVFPGCPETFQSPSEPQER	gb EEF28918.1	glutelin type-A 3	-	-	-	-

TABELA 4. Lista das proteínas do endosperma de sementes maduras do pinhão manso identificadas por MS e MS/MS.

Banco local de EST do pinhão manso							NCBI			
Spot n.	MM/pI (kDa)		Protein Score/ion score	Seq. ID Peptídeos	ID (NCBI)	Descrição das proteínas	Protein Score/ion score	Seq. ID Peptídeos	ID (NCBI)	Descrição das proteínas
	Exp.	Teor.								
M332	19.9/7.03	55.9/7.68	200	YFGGAGER/GLLLPLYANGPK/IQSEAGVTDIWDEND EQFR/GIHGAVFPGCPETFQSPSEPER	gb EEF28918.1	glutelin type-A 3	-	-	-	-
M333	19.9/7.09	55.9/7.68	169	YFGGAGER/IQSEAGVTDIWDENDEQFR/GIHGAVFP GCPETFQSPSEPER	gb EEF28918.1	glutelin type-A 3	-	-	-	-
M340	19.0/6.63	53.6/8.6	251	LVYVIQGR/APTEAQQCHLQR/GVLGSLYSPSGCPQTF HAEQQSR	emb CAA64762.1	legumin-like protein	-	-	-	-
M341	19.2/6.90	53.6/8.6	296	LVYVIQGR/ITTTQPSHR/APTEAQQCHLQR/GVLGSL YPSGCPQTFHAEQQSR	emb CAA64762.1	legumin-like protein	37	LVYVIQGR	gij6180065	glutelin
M345	18.2/5.39	53.6/8.6	159	DQFQCAGVAIVR/LDRIEALPDTR/IQSEAGTIESWN PSR/GITGEMFPGCPETFQEQYQAGGSSR	gb AAF73007.1	legumin-like protein	-	-	-	-
M348	17.7/5.88	55.9/7.68	31	AFFLAGNPQR	gb EEF28918.1	glutelin type-A 3	-	-	-	-
M349	17.2/5.88	55.9/7.68	192	GLIVSVER/AFFLAGNPQR/DFELLFPPR/QLEGTGYR PGGGQGR	gb EEF28918.1	glutelin type-A 3	-	-	-	-
M353	18.1/6.63	51.7/7.7	47	EGDMFVIPQFYAALGR	gb AAD42944.1	11S globulin	-	-	-	-
M354	17.7/6.63	51.7/7.7	114	AMHSPHWSINDQR/EGDMFVIPQFYAALGR	gb AAD42944.1	11S globulin	-	-	-	-
M357	17.8/6.26	51.7/7.7	47	EGDMFVIPQFYAALGR	gb AAD42944.1	11S globulin	-	-	-	-
M358	17.3/6.28	55.9/7.68	30	DFELLFPPR	gb EEF28918.1	glutelin type-A 3	-	-	-	-
M359	17.3/6.46	55.9/7.68	192	GLIVSVER/AFFLAGNPQR/DFELLFPPR/ QLEGTGYRPGGGQGR	gb EEF28918.1	glutelin type-A 3	-	-	-	-
M366	17.1/5.3	53.6/8.6	152	DQFQCAGVAIVR/IQSEAGTIESWNPSR	gb AAF73007.1	legumin-like protein	-	-	-	-
M368	17.1/5.50	55.9/7.68	31	AFFLAGNPQR	gb EEF28918.1	glutelin type-A 3	-	-	-	-
M369	17.1/5.62	53.6/8.6	384	DQFQCAGVAIVR/LDRIEALPDTR/IQSEAGTIESWN PSR/GITGEMFPGCPETFQEQYQAGGSSR/GITGEMF PGCPETFQEQYQAGGSSR	gb AAF73007.1	legumin-like protein	-	-	-	-
M371	16.8/5.95	53.6/8.6	284	LQVVRPAR/KLQSENDYR/GTCNNLFCGLDSR/HFYL AGNPEDEFR	gb AAF73007.1	legumin-like protein	-	-	-	-
M373	16.6/6.47	53.6/8.6	122	GTCNNLFCGLDSR/HFYLAGNPEDEFR	gb AAF73007.1	legumin-like protein	-	-	-	-
M374	16.5/6.57	53.6/8.6	110	GTCNNLFCGLDSR/HFYLAGNPEDEFR	gb AAF73007.1	legumin-like protein	-	-	-	-
M378	16.6/5.33	53.6/8.6	203	DQFQCAGVAIVR/LDRIEALPDTR/IQSEAGTIESWN PSR/GITGEMFPGCPETFQEQYQAGGSSR	gb AAF73007.1	legumin-like protein	-	-	-	-
M379	16.7/5.47	53.6/8.6	163	GTCNNLFCGLDSR/HFYLAGNPEDEFR	gb AAF73007.1	legumin-like protein	-	-	-	-
M380	16.5/5.61	53.6/8.6	409	DQFQCAGVAIVR/LDRIEALPDTR/IQSEAGTIESWN PSR/GITGEMFPGCPETFQEQYQAGGSSR/GITGEMF PGCPETFQEQYQAGGSSR	gb AAF73007.1	legumin-like protein	-	-	-	-

TABELA 4. Lista das proteínas do endosperma de sementes maduras do pinhão manso identificadas por MS e MS/MS.

Banco local de EST do pinhão manso						NCBI				
Spot n.	MM/pl (kDa)		Protein Score/ion score	Seq. ID Peptídeos	ID (NCBI)	Descrição das proteínas	Protein Score/ion score	Seq. ID Peptídeos	ID (NCBI)	Descrição das proteínas
	Exp.	Teor.								
M382	15.8/5.58	55.9/7.68	317	LIYVLQGR/IQSEAGVTDIWDENDEQFR/GIHGAVFPGCPETFQSPSEPQER	gb EEF28918.1	glutelin type-A 3	-	-	-	-
M383	15.6/5.64	55.9/7.68	208	ADVFNPR/LTNINGQDLPLISYIQLSVQK/NALMSPHWNVDAHSINYFTR	gb EEF28918.1	glutelin type-A 3	54	ADVFNPR	gij6180065	glutelin
M384	15.5/5.52	55.9/7.68	90	LIYVLQGR/IQSEAGVTDIWDENDEQFR	gb EEF28918.1	glutelin type-A 3	-	-	-	-
M387	15.6/6.24	51.7/7.7	229	IHLANQR/AMHSPHWSINDQR/AMHSPHWSINDQR/GDMHIQVDDSGNTVMDE R	gb AAD42944.1	11S globulin	-	-	-	-
M388	15.2/6.24	51.7/7.7	37	AMHSPHWSINDQR	gb AAD42944.1	11S globulin	-	-	-	-
M391	15.4/6.62	55.9/7.68	176	IQSEAGVTDIWDENDEQFR/GIHGAVFPGCPETFQSPSEPQER	gb EEF28918.1	glutelin type-A 3	-	-	-	-
M392	15.3/6.66	55.9/7.68	174	IQSEAGVTDIWDENDEQFR/GIHGAVFPGCPETFQSPSEPQER	gb EEF28918.1	glutelin type-A 3	-	-	-	-
M393	15.4/6.72	55.9/7.68	32	AGSEGLEWWSFK	gb EEF28918.1	glutelin type-A 3	-	-	-	-
M394	16.6/6.92	55.9/7.68	99	AGSEGLEWWSFK/NALMSPHWNVDAHSINYFTR	gb EEF28918.1	glutelin type-A 3	-	-	-	-
M395	15.5/6.79	55.9/7.68	61	NALMSPHWNVDAHSINYFTR	gb EEF28918.1	glutelin type-A 3	-	-	-	-
M398	15.9/5.19	55.9/7.68	161	ADVFNPR/LVHNINDPSR/NALMSPHWNVDAHSINYFTR	gb EEF28918.1	glutelin type-A 3	48	ADVFNPR	gij6180065	glutelin
M401	14.2/6.03	53.6/8.6	187	DQFQCAGVAIVR/IQSEAGTIESWNPSPR/GITGEMFPGCPETFQEQYQAGGSSR	gb AAF73007.1	legumin-like protein	-	-	-	-
M402	15.0/6.32	55.9/7.68	105	AGSEGLEWWSFK/NALMSPHWNVDAHSINYFTR	gb EEF28918.1	glutelin type-A 3	-	-	-	-
M411	14.8/5.17	55.9/7.68	71	IQSEAGVTDIWDENDEQFR	gb EEF28918.1	glutelin type-A 3	-	-	-	-
M412	14.6/5.33	55.9/7.68	48	ADVFNPR	gb EEF28918.1	glutelin type-A 3	48	ADVFNPR	gij6180065	glutelin
M413	14.6/5.52	55.9/7.68	220	LIYVLQGR/IQSEAGVTDIWDENDEQFR/GIHGAVFPGCPETFQSPSEPQER	gb EEF28918.1	glutelin type-A 3	-	-	-	-
M414	14.6/5.73	55.9/7.68	265	ADVFNPR/NALMSPHWNVDAHSINYFTR/NALMSPHWNVDAHSINYFTR/	gb EEF28918.1	glutelin type-A 3	54	ADVFNPR	gij6180065	glutelin
M415	14.3/6.04	55.9/7.68	44	AGSEGLEWWSFK	gb EEF28918.1	glutelin type-A 3	-	-	-	-
M418	13.8/6.37	55.9/7.68	69	AGSEGLEWWSFK	gb EEF28918.1	glutelin type-A 3	-	-	-	-
M420	13.6/6.69	53.6/8.6	67	APTEAQQCHLQR	emb CAA64762.1	legumin-like protein	-	-	-	-
M421	13.7/6.77	53.6/8.6	66	APTEAQQCHLQR	emb CAA64762.1	legumin-like protein	-	-	-	-

TABELA 4. Lista das proteínas do endosperma de sementes maduras do pinhão manso identificadas por MS e MS/MS.

Banco local de EST do pinhão manso							NCBI			
Spot n.	MM/pI (kDa)		Protein Score/ion score	Seq. ID Peptídeos	ID (NCBI)	Descrição das proteínas	Protein Score/ion score	Seq. ID Peptídeos	ID (NCBI)	Descrição das proteínas
	Exp.	Teor.								
M422	13.9/6.95	53.6/8.6	208	ADVYIPEVGR/FLQLSASHVLR/VSTINSHNLPILR	gb AAF73007.1	legumin-like protein	-	-	-	-
M423	13.9/4.67	55.9/7.68	32	DFELLFPPR	gb EEF28918.1	glutelin type-A 3	-	-	-	-
M424	14.2/4.87	55.9/7.68	39	DFELLFPPR	gb EEF28918.1	glutelin type-A 3	-	-	-	-
M425	13.3/4.98	55.9/7.68	32	DFELLFPPR	gb EEF28918.1	glutelin type-A 3	-	-	-	-
M426	13.7/5.12	55.9/7.68	40	DFELLFPPR	gb EEF28918.1	glutelin type-A 3	-	-	-	-
M433	14.3/5.46	55.9/7.68	36	IQSEAGVTDIWDEDEQFR	gb EEF28918.1	glutelin type-A 3	-	-	-	-
M434	13.9/5.50	55.9/7.68	33	AGSEGLEWVSFK	gb EEF28918.1	glutelin type-A 3	-	-	-	-
M437	13.6/5.63	51.7/7.7	107	AMHSPHWSINDQR/VKEGDMFVIPQFYAALGR	gb AAD42944.1	11S globulin	-	-	-	-
M438	13.6/5.71	55.9/7.68	70	AGSEGLEWVSFK/AMHSPHWSINDQR	gb EEF28918.1	glutelin type-A 3	-	-	-	-
M453	12.5/4.82	51.7/7.7	145	AMHSPHWSINDQR/VKEGDMFVIPQFYAALGR/VKEGDMFVIPQFYAALGR	gb AAD42944.1	11S globulin	-	-	-	-
M459	11.9/5.13	53.6/8.6	63	DQFCAGVAIVR	gb AAF73007.1	legumin-like protein	-	-	-	-
M460	12.1/5.24	55.9/7.68	38	DFELLFPPR	gb EEF28918.1	glutelin type-A 3	-	-	-	-
M466	12.0/5.75	55.9/7.68	40	DFELLFPPR	gb EEF28918.1	glutelin type-A 3	-	-	-	-
M467	11.6/5.70	53.6/8.6	103	DQFCAGVAIVR/IQSEAGTIESWNPSR	gb AAF73007.1	legumin-like protein	-	-	-	-
M468	11.6/5.76	53.6/8.6	204	DQFCAGVAIVR/LDRIEALPDTR/IQSEAGTIESWNPSR	gb AAF73007.1	legumin-like protein	-	-	-	-
M465	12.0/5.68	55.9/7.68	74	DFELLFPPR/ QLEGTGYRPGGGQGR	gb EEF28918.1	glutelin type-A 3	-	-	-	-
M487	11.7/4.68	53.6/8.6	44	DQFCAGVAIVR	gb AAF73007.1	legumin-like protein	-	-	-	-
M488	11.3/5.09	53.6/8.6	87	DQFCAGVAIVR/LDRIEALPDTR	gb AAF73007.1	legumin-like protein	-	-	-	-
M497	10.5/5.59	55.9/7.68	47	LVHNINDPSRADVFNPR	gb EEF28918.1	glutelin type-A 3	-	-	-	-
M499	10.1/5.58	55.9/7.68	292	YFGGAGER/IQSEAGVTDIWDEDEQFR/ GIHGAVFPGCPETFQSPSEPQER	gb EEF28918.1	glutelin type-A 3	-	-	-	-
M500	76.0/5.99	59.76.1	33	QNEEWFFPGPR	gb ABO36677.1	vicilin	-	-	-	-

TABELA 4. Lista das proteínas do endosperma de sementes maduras do pinhão manso identificadas por MS e MS/MS.

Banco local de EST do pinhão manso						NCBI				
Spot n.	MM/pI (kDa)		Protein Score/lon score	Seq. ID Peptídeos	ID (NCBI)	Descrição das proteínas	Protein Score/lon score	Seq. ID Peptídeos	ID (NCBI)	Descrição das proteínas
	Exp.	Teor.								
M510	58.0/6.16	59.76.1	33	ELAFGVSER	gb ABO36677.1	vicilin	-	-	-	-
M513	57.2/6.41	59.76.1	31	QNEEWFPGPR	gb ABO36677.1	vicilin	-	-	-	-
M520	39.0/6.60	55.9/7.68	33	GIHGAVFPGCPETFQSPSEPQER	gb EEF28918.1	glutelin type-A 3	-	-	-	-
M522	35.7/4.58	53.6/8.6	152	SLDEQALAESFNVPTEIVR	emb CAA64762.1	legumin-like protein	-	-	-	-
M523	36.3/5.26	53.6/8.6	241	LVYVIQGR/GVLGLSYSPGCPQTFHAEQQSR/GVLGLSYSPGCPQTFHAEQQSR/TIVPDEREEEFYSRPGQSGR/IDSEGGETEIWDPSEDQFCAGVAAAYR	emb CAA64762.1	legumin-like protein	44	HDIGWGAYLR	gij5669782	Hv1LRR2
M524	36.0/5.37	53.6/8.6	344	LVYVIQGR/SLDEQALAESFNVPTEIVR/SLDEQALAESFNVPTEIVR/TIVPDEREEEFYSRPGQSGR	emb CAA64762.1	legumin-like protein	-	-	-	-
M526	35.7/5.63	53.6/8.6	332	LVYVIQGR/ETFQNVFR/HNQLDQYLRL/SLDEQALAESFNVPTEIVR/GVLGLSYSPGCPQTFHAEQQSR	emb CAA64762.1	legumin-like protein	-	-	-	-
M530	36.3/5.74	53.6/8.6	109	GVLGLSYSPGCPQTFHAEQQSR	emb CAA64762.1	legumin-like protein	-	-	-	-
M531	36.5/5.82	53.6/8.6	219	LVYVIQGR/ETFQNVFR/SLDEQALAESFNVPTEIVR	emb CAA64762.1	legumin-like protein	-	-	-	-
M534	36.3/6.33	53.6/8.6	325	LVYVIQGR/ETFQNVFR/HNQLDQYLRL/APTEAQQCHLQR/SLDEQALAESFNVPTEIVR	emb CAA64762.1	legumin-like protein	-	-	-	-
M536	36.0/6.99	53.6/8.6	396	LVYVIQGR/ETFQNVFR/HNQLDQYLRL/APTEAQQCHLQR/SLDEQALAESFNVPTEIVR/GVLGLSYSPGCPQTFHAEQQSR	emb CAA64762.1	legumin-like protein	-	-	-	-
M539	31.4/6.57	53.6/8.6	41	FEYITFK	gb AAF73007.1	legumin-like protein	-	-	-	-
M543	29.8/5.12	55.9/7.68	70	GIHGAVFPGCPETFQSPSEPQER	gb EEF28918.1	glutelin type-A 3	-	-	-	-
M544	30.9/5.25	53.6/8.6	272	LVYVIQGR/ETFQNVFR/GVLGLSYSPGCPQTFHAEQQSR	emb CAA64762.1	legumin-like protein	38	LVYVQGR	gij6180065	glutelin
M547	25.0/5.01	53.6/8.6	128	SLDEQALAESFNVPTEIVR	emb CAA64762.1	legumin-like protein	-	-	-	-
M548	25.0/5.13	53.6/8.6	178	SLDEQALAESFNVPTEIVR	emb CAA64762.1	legumin-like protein	-	-	-	-
M549	25.3/5.21	51.7/7.7	178	GDMHIQIVDDSGNTVMDER/GDMHIQIVDDSGNTVMDER	sp Q9XHP0.1	11S globulin seed storage protein	-	-	-	-
M551	25.7/5.54	53.6/8.6	110	APTEAQQCHLQR/GVLGLSYSPGCPQTFHAEQQSR	emb CAA64762.1	legumin-like protein	-	-	-	-
M552	25.3/5.50	53.6/8.6	256	LVYVIQGR/HNQLDQYLRL/APTEAQQCHLQR/GVLGLSYSPGCPQTFHAEQQSR	emb CAA64762.1	legumin-like protein	-	-	-	-
M555	25.6/6.50	55.9/7.68	124	ADVFNPR/NALMSPHWNVDHSINYFTR	gb EEF28918.1	glutelin type-A 3	41	ADVFNPR	gij6180065	Glutelin
M556	24.0/5.57	53.6/8.6	366	LVYVIQGR/AFLLGGGQSR/GVLGLSYSPGCPQTFHAEQQSR/IDSEGGETEIWDPSEDQFCAGVAAAYR	emb CAA64762.1	legumin-like protein	34	LVYVQGR	gij6180065	glutelin

TABELA 4. Lista das proteínas do endosperma de sementes maduras do pinhão manso identificadas por MS e MS/MS.

Banco local de EST do pinhão manso							NCBI			
Spot n.	MM/pl (kDa)		Protein Score/ion score	Seq. ID Peptídeos	ID (NCBI)	Descrição das proteínas	Protein Score/ion score	Seq. ID Peptídeos	ID (NCBI)	Descrição das proteínas
	Exp.	Teor.								
M560	23.2/4.61	45.5/7.86	33	TNENAQISPLAGR	gb EEF28917.1	legumin B	-	-	-	-
M563	22.4/4.75	45.5/7.86	38	ADIYNPR	gb EEF28917.1	legumin B	38	ADLYNPR	gi 81988	legumin B -
M564	22.7/5.03	53.6/8.6	110	SLDEQALAESFNVPTIVR	emb CAA64762.1	legumin-like protein	-	-	-	-
M565	23.9/5.31	55.9/7.68	127	IQSEAGVTDIWDEDEQFR	gb EEF28918.1	glutelin type-A 3	-	-	-	-
M541	29.0/4.68	55.9/7.68	35	GIHGAVFPGCPETFQSPSEPQER	gb EEF28918.1	glutelin type-A 3	-	-	-	-
M566	24.0/5.54	55.9/7.68	92	IDSEGGETEIWDPSEDQFCAGVAAYR	gb EEF28918.1	glutelin type-A 3	-	-	-	-
M567	24.2/5.67	53.6/8.6	325	LVIYIQGR/AFLGGGQSR/GVLGLSYPSGCPQTFHAEQQSR	emb CAA64762.1	legumin-like protein	-	-	-	-
M568	24.4/5.79	59.76.1	192	ELAFGVSR/NNLEVVCFEINEEGNTR	gb ABO36677.1	vicilin	-	-	-	-
M569	24.5/6.05	53.6/8.6	192	LVIYIQGR/AFLGGGQSR/HNQLDQYLR/GVLGLSYPSGCPQTFHAEQQSR	emb CAA64762.1	legumin-like protein	50	ELAFGVESR	gi 137578	Vicilin
M570	23.2/6.07	53.6/8.6	169	LVIYIQGR/AFLGGGQSR/GVLGLSYPSGCPQTFHAEQQSR	emb CAA64762.1	legumin-like protein	35	LVIYVQGR	gi 6180065	glutelin
M572	24.9/6.36	53.6/8.6	384	LVIYIQGR/AFLGGGQSR/HNQLDQYLR/GVLGLSYPSGCPQTFHAEQQSR/IDSEGGETEIWDPSEDQFCAGVAAYR	emb CAA64762.1	legumin-like protein	36	LVIYVQGR	gi 6180065	glutelin
M573	23.5/6.28	53.6/8.6	54	GVLGLSYPSGCPQTFHAEQQSR	emb CAA64762.1	legumin-like protein	-	-	-	-
M574	23.7/6.35	53.6/8.6	253	LVIYIQGR/APTEAQQCHLQR/GVLGLSYPSGCPQTFHAEQQSR/IDSEGGETEIWDPSEDQFCAGVAAYR	emb CAA64762.1	legumin-like protein	-	-	-	-
M575	22.9/6.35	53.6/8.6	56	HNQLDQYLR	emb CAA64762.1	legumin-like protein	-	-	-	-
M584	19.1/4.76	55.9/7.68	191	YFGGAGER/LIYVLQGR/GIHGAVFPGCPETFQSPSEPQER	gb EEF28918.1	glutelin type-A 3	-	-	-	-
M585	18.7/4.65	45.5/7.86	47	ALPLEVIANAFR	gb EEF38213.1	legumin B	-	-	-	-
M578	22.7/6.54	53.6/8.6	147	LVIYIQGR/GVLGLSYPSGCPQTFHAEQQSR	emb CAA64762.1	legumin-like protein	-	-	-	-
M587	19.1/5.01	55.9/7.68	480	YFGGAGER/LIYVLQGR/IQSEAGVTDIWDEDEQFR/RIQSEAGVTDIWDEDEQFR/GIHGAVFPGCPETFQSPSEPQER	gb EEF28918.1	glutelin type-A	-	-	-	-
M588	19.0/4.93	55.9/7.68	114	YFGGAGER/IQSEAGVTDIWDEDEQFR	gb EEF28918.1	glutelin type-A 3	-	-	-	-
M589	18.0/4.98	55.9/7.68	342	YFGGAGER/LIYVLQGR/IQSEAGVTDIWDEDEQFR/GIHGAVFPGCPETFQSPSEPQER	gb EEF28918.1	glutelin type-A 3	-	-	-	-
M590	20.4/5.71	55.9/7.68	72	IQSEAGVTDIWDEDEQFR	gb EEF28918.1	glutelin type-A 3	-	-	-	-

TABELA 4. Lista das proteínas do endosperma de sementes maduras do pinhão manso identificadas por MS e MS/MS.

Banco local de EST do pinhão manso							NCBI			
Spot n.	MM/pI (kDa)		Protein Score/ion score	Seq. ID Peptídeos	ID (NCBI)	Descrição das proteínas	Protein Score/ion score	Seq. ID Peptídeos	ID (NCBI)	Descrição das proteínas
	Exp.	Teor.								
M593	19.1/5.52	55.9/7.68	189	YFGGAGER/LIYVLQGR/GIHGAVFPGPCPETFQSPSE PQER/GIHGAVFPGPCPETFQSPSE PQER	gb EEF28918.1	glutelin type-A 3	-	-	-	-
M597	21.1/6.69	55.9/7.68	159	LIYVLQGR/IQSEAGVTDIWDENDEQFR	gb EEF28918.1	glutelin type-A 3	-	-	-	-
M598	20.3/6.54	53.6/8.6	282	LVYVIQGR/GVGLSYPGCPQTFHAEQQSR/DSEG GETEIWDPSEDQFQCAGVAAAYR	emb CAA64762.1	legumin-like protein	35	LVYVIQGR	gij6180065	glutelin
M571	24.5/6.27	53.6/8.6	47	HNQLDQYLR	emb CAA64762.1	legumin-like protein	-	-	-	-
M596	20.8/6.59	55.9/7.68	213	YFGGAGER/LIYVLQGR/IQSEAGVTDIWDENDEQFR/ GIHGAVFPGPCPETFQSPSE PQER	gb EEF28918.1	glutelin type-A 3	-	-	-	-
M600	20.3/6.80	53.6/8.6	107	NDSEGGETEIWDPSEDQFQCAGVAAAYR	emb CAA64762.1	legumin-like protein	40	LVYVIQGR	gij6180065	glutelin
M601	21.1/6.91	55.9/7.68	144	LIYVLQGR/IQSEAGVTDIWDENDEQFR	gb EEF28918.1	glutelin type-A 3	-	-	-	-
M602	21.2/6.99	55.9/7.68	284	YFGGAGER/LIYVLQGR/IQSEAGVTDIWDENDEQFR/ GIHGAVFPGPCPETFQSPSE PQER	gb EEF28918.1	glutelin type-A 3	-	-	-	-
M603	20.5/6.97	53.6/8.6	103	LVYVIQGR/APTEAQQCHLQR	emb CAA64762.1	legumin-like protein	-	-	-	-
M604	19.4/6.49	55.9/7.68	29	YFGGAGER	gb EEF28918.1	glutelin type-A 3	-	-	-	-
M613	16.2/4.64	53.6/8.6	127	SLDEQALAESFNVPTEIVR	emb CAA64762.1	legumin-like protein	-	-	-	-
M614	16.6/5.11	51.7/7.7	74	VKEGDMFVIPQFYAALGR/GDMHIQIVDDSGNTVMDE R	sp Q9XHP0.1	11S globulin seed storage protein	-	-	-	-
M615	16.9/5.65	51.7/7.7	174	VKEGDMFVIPQFYAALGR/GDMHIQIVDDSGNTVMDE R/GDMHIQIVDDSGNTVMDE R	sp Q9XHP0.1	11S globulin seed storage protein	-	-	-	-
M616	17.0/5.76	51.7/7.7	105	VKEGDMFVIPQFYAALGR/GDMHIQIVDDSGNTVMDE R	sp Q9XHP0.1	11S globulin seed storage protein	-	-	-	-
M621	16.7/6.66	55.9/7.68	103	AGSEGLEWVSFK/NALMSPHWNVDHSINYFTR	gb EEF28918.1	glutelin type-A 3	-	-	-	-
M623	16.5/6.58	55.9/7.68	85	NALMSPHWNVDHSINYFTR/GIHGAVFPGPCPETFQS PSE PQER	gb EEF28918.1	glutelin type-A 3	-	-	-	-
M625	16.3/6.82	55.9/7.68	210	IQSEAGVTDIWDENDEQFR/GIHGAVFPGPCPETFQSP SE PQER	gb EEF28918.1	glutelin type-A 3	-	-	-	-
M627	16.7/7.00	55.9/7.68	68	ADVFNPR/LIYVLQGR	gb EEF28918.1	glutelin type-A 3	-	-	-	-
M632	14.9/4.96	59.76.1	51	NNNLEVVCFEINEEGNTR	gb ABO36677.1	Vicilin	-	-	-	-
M633	15.4/5.45	45.5/7.86	183	ADIYNPR/GGHVTNVNSHNFPILR	gb EEF28917.1	legumin B,	51	ADLYNPR	gij81988	legumin B
M638	15.1/5.56	55.9/7.68	30	GIHGAVFPGPCPETFQSPSE PQER	gb EEF28918.1	glutelin type-A 3	-	-	-	-

TABELA 4. Lista das proteínas do endosperma de sementes maduras do pinhão manso identificadas por MS e MS/MS.

Banco local de EST do pinhão manso						NCBI				
Spot n.	MM/pI (kDa)		Protein Score/ Ion score	Seq. ID Peptídeos	ID (NCBI)	Descrição das proteínas	Protein Score/ Ion score	Seq. ID Peptídeos	ID (NCBI)	Descrição das proteínas
	Exp.	Teor.								
M639	14.6/5.57	51.7/7.7	41	VKEGDMFVIPQFYAALGR	sp Q9XHP0.1	11S globulin seed storage protein	-	-	-	-
M644	13.7/6.39	55.9/7.68	40	AFFLAGNPQR	gb EEF28918.1	glutelin type-A 3	-	-	-	-

4.4 Identificação de proteínas menos abundantes.

A detecção de proteínas menos abundantes é um problema comum na separação de proteínas por eletroforese bidimensional e na análise proteômica de plantas (KRISHNAN *et al.*, 2009). Muitas estratégias têm sido desenvolvidas para promover a detecção de proteínas pouco abundantes por 2-DE. Por exemplo, enriquecimento de proteínas baseado no fracionamento por tamanho, fracionamento sub-celular para estudos de sub-proteomas, precipitação seletiva, centrifugação utilizando gradientes de densidade de sacarose e cromatografia de troca iônica (SUN *et al.*, 2009) (ROBERT *et al.*, 2007) (ROLLAND *et al.*, 2006). Neste sentido alguns protocolos simples e rápidos vêm sendo descritos na literatura como o de Xi *et al.*, (2006), onde foi utilizado um protocolo de extração de proteínas baseado na precipitação diferencial com polietilenoglicol (PEG). Mais recentemente, Krishnan *et al.*, (2009), desenvolveram um método rápido e simples de excluir as proteínas abundantes de soja, tais como glicininas e β -conglucina precipitando-as com uma solução 10 mM de cálcio, permitindo assim uma análise proteômica avançada desta e de outras leguminosas.

As análises por espectrometria de massa das proteínas totais presentes nos mapas de referência bidimensionais do endosperma maduro de sementes de pinhão manso (FIGURA 4, TABELA 4) mostram que quase a totalidade das proteínas identificadas é representada por proteínas de reserva. Levando isso em consideração, foi utilizada uma metodologia de fracionamento baseada na solubilidade diferencial das proteínas obtidas pela extração da farinha de endosperma nos tampões tris e acetato, com o intuito de obter mapas bidimensionais enriquecidos em proteínas menos abundantes que as proteínas de reserva.

4.5 Fracionamento e estabelecimento dos mapas bidimensionais de referência do endosperma de sementes em desenvolvimento e maduras do pinhão manso.

Mapas de referência bidimensionais de alta qualidade das frações albumínica, globulínica e glutelínica foram obtidas a partir do extrato protéico da farinha do endosperma de sementes em desenvolvimento (FIGURAS 6 e 7) e maduras (FIGURA 8 e 9), extraídas com tampão tris-HCl 0,1 M, NaCl 0,5 M, pH 8,0 e tampão acetato 0,1 M, NaCl 0,5 M, pH 5,0.

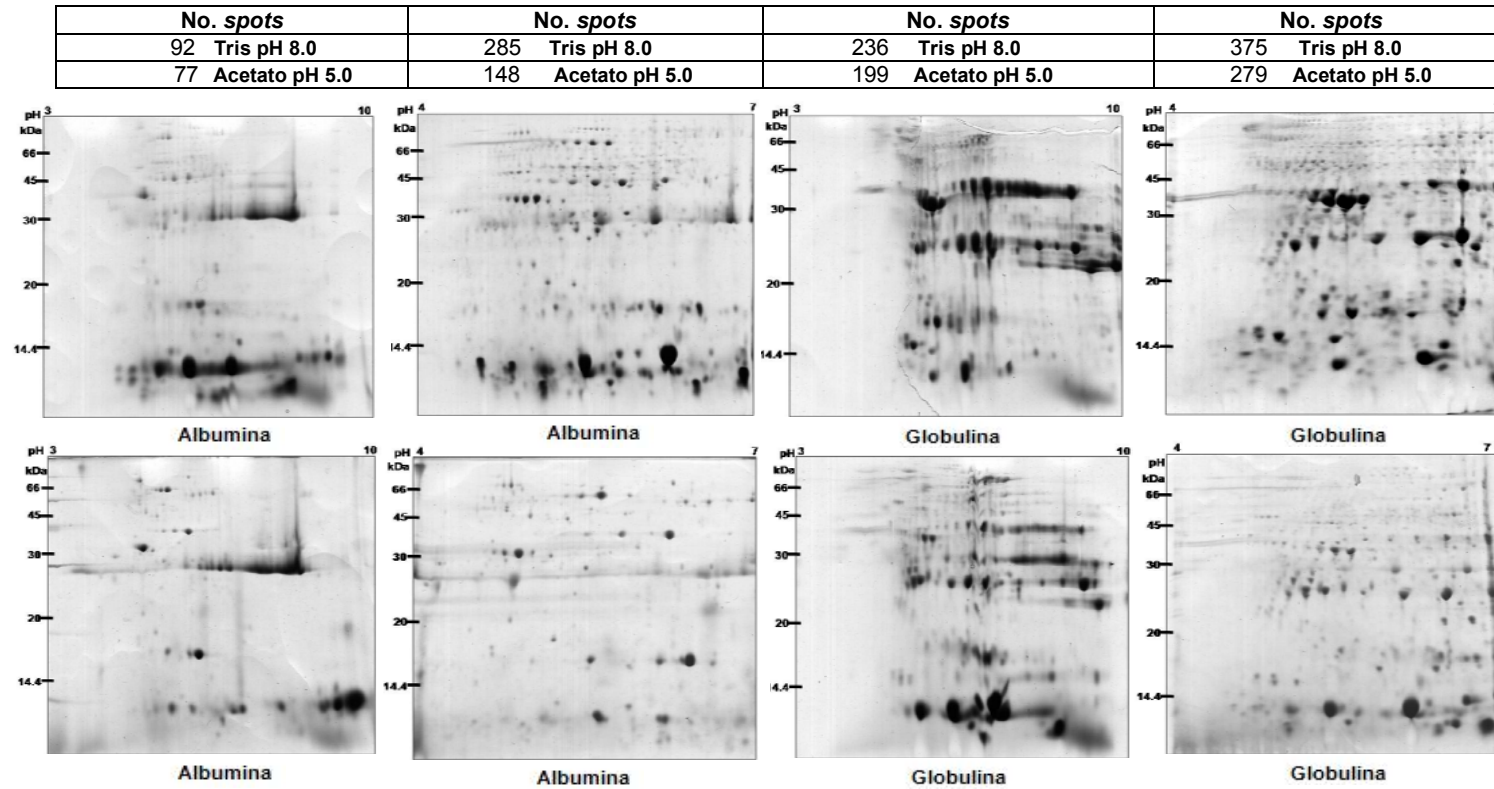


FIGURA 6. Mapas de referência das frações do endosperma de sementes em desenvolvimento de pinhão manso e do total de spots detectados utilizando o software ImageMaster platinum 5.0 (albuminas e globulinas extraídas com tampão tris 0.1 M pH 8.0 NaCl 0.5 M, géis da parte superior; albuminas e globulinas extraídas com tampão acetato 0.1 M pH 5.0 NaCl 0.5 M, géis da parte inferior). As proteínas foram separadas na primeira dimensão utilizando tiras de IPG com pH variando de 3-10 e 4-7. A quantidade de proteína aplicada foi de 250 µg; Os géis foram corados com Coomassie brilhante blue.

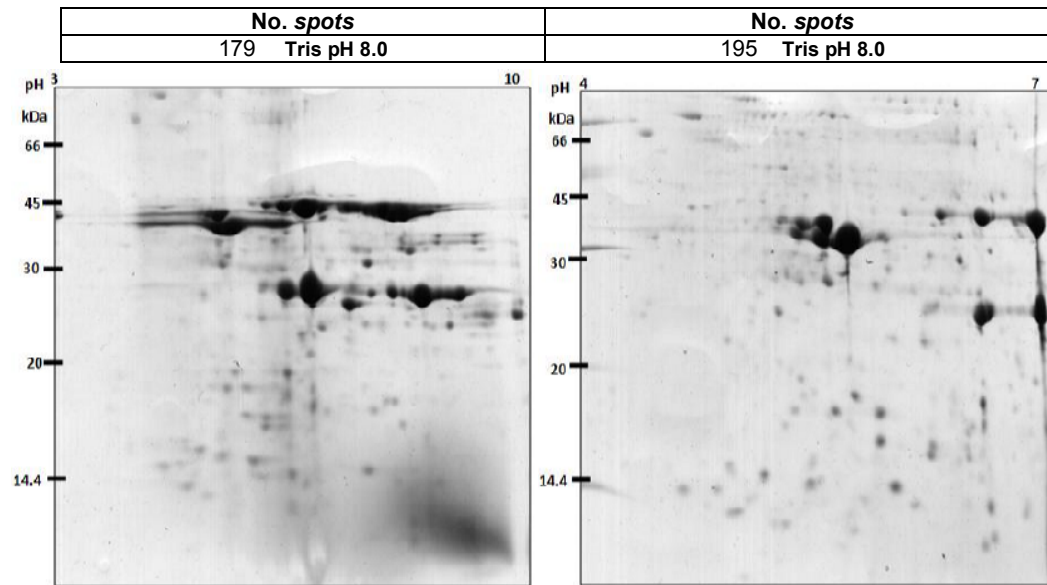


FIGURA 7. Mapas de referência da fração glutelínica do endosperma de sementes em desenvolvimento de pinhão manso extraído com tampão tris 0.1 M pH 8.0 NaCl 0.5 M e do total de spots detectados utilizando o software ImageMaster platinum 5.0. As proteínas foram separadas na primeira dimensão utilizando tiras de IPG com pH variando de 3-10 e 4-7. A quantidade de proteína aplicada foi de 250 µg; Os géis foram corados com Coomassie brilhante blue.

No. spots		No. spots		No. spots		No. spots		No. spots		No. spots	
268	Tris pH 8.0	250	Tris pH 8.0	79	Tris pH 8.0	241	Tris pH 8.0	223	Tris pH 8.0	167	Tris pH 8.0
483	Acetato pH 5.0	372	Acetato pH 5.0	54	Acetato pH 5.0	321	Acetato pH 5.0	345	Acetato pH 5.0	163	Acetato pH 5.0

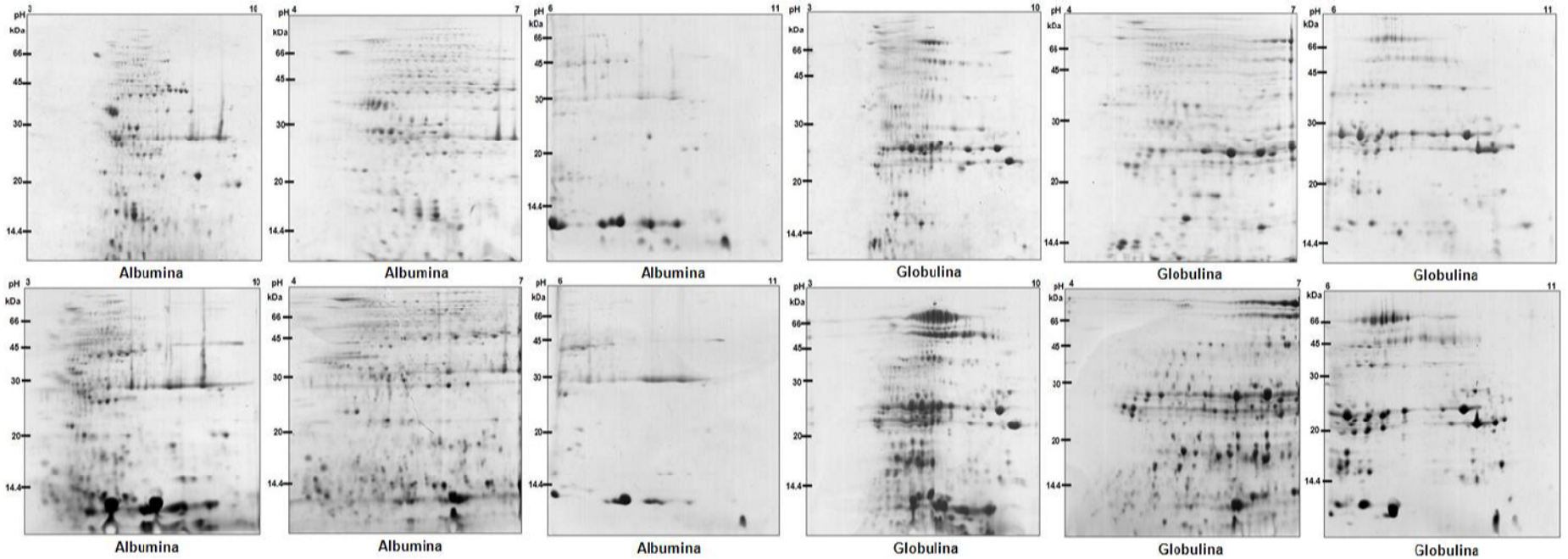


FIGURA 8. Mapas de referência das frações do endosperma de sementes maduras de pinhão manso e do total de spots detectados utilizando o software ImageMaster platinum 5.0 (albuminas e globulinas extraídas com tampão tris 0.1 M pH 8.0 NaCl 0.5 M, géis da parte superior; albuminas e globulinas extraídas com tampão acetato 0.1 M pH 5.0 NaCl 0.5 M, géis da parte inferior). As proteínas foram separadas na primeira dimensão utilizando tiras de IPG com pH variando de 3-10, 4-7 e 6-11. A quantidade de proteína aplicada foi de 250 µg; Os géis foram corados com Coomassie brilhante blue.

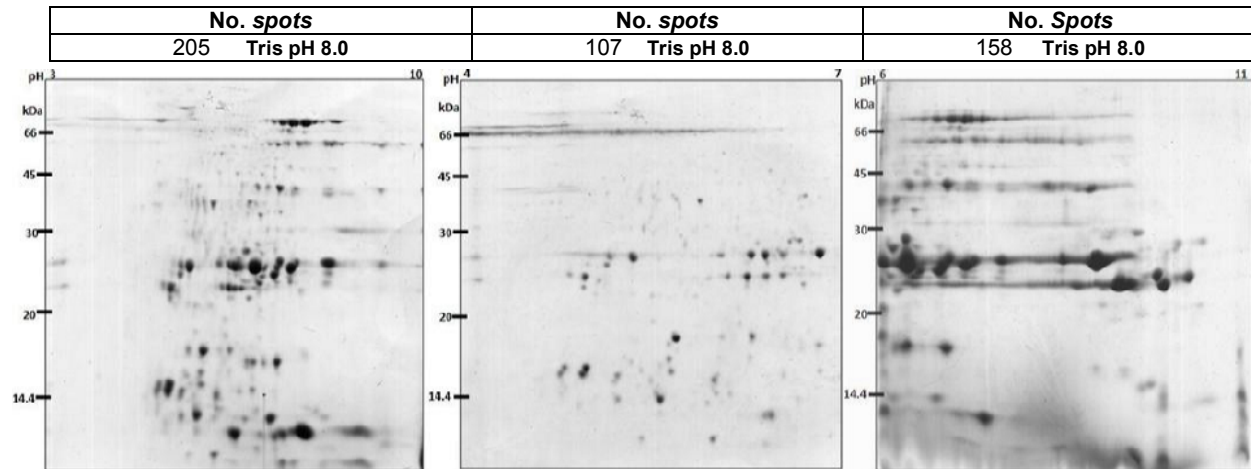


FIGURA 9. Mapas de referência da fração glutelínica do endosperma de sementes maduras de pinhão manso extraído com tampão tris-HCl 0.1 M pH 8.0 NaCl 0.5 M e do total de spots detectados utilizando o software ImageMaster platinum 5.0. As proteínas foram separadas na primeira dimensão utilizando tiras de IPG com pH variando de 3-10, 4-7 e 6-11. A quantidade de proteína aplicada foi de 250 μ g; Os géis foram corados com Coomassie brilhante blue.

Os mapas bidimensionais mostraram que o fracionamento foi eficaz no sentido de obter três frações protéicas onde cada uma delas possuía um complemento particular de proteínas e distinto das proteínas abundantes presentes no extrato total extraído com tampão piridina/SDS (FIGURA 4).

A análise de detecção de spots através do programa ImageMaster 2D Platinum 5.0 revelou que os géis das frações albumínica e globulínica do endosperma em desenvolvimento (FIGURA 6) extraídos com tampão tris-HCl 0,1 M, NaCl 0,5 M, pH 8,0 foram capazes de revelar uma quantidade maior de spots nas faixas de pH de 3-10 e 4-7 quando comparados com o tampão acetato 0,1 M, NaCl 0,5 M, pH 5,0. Já a mesma análise com as mesmas frações e com os mesmos tampões só que com o endosperma maduro revelaram que os géis das frações albumínica e globulínica (FIGURA 8) extraídos com tampão acetato 0,1 M, NaCl 0,5 M, pH 5,0 foram capazes de extrair uma quantidade maior de spots nas faixas de pH de 3-10 e 4-7 quando comparados com o tampão tris-HCl 0,1 M, NaCl 0,5 M, pH 8,0, mas na faixa de pH de 6-11 ocorreu o inverso, isto pode ser explicado pela faixa de pH do tampão acetato que é mais ácido que a faixa de pH do tampão tris.

Um detalhe importante é a quantidade de spots detectada para as frações albumínica do endosperma em desenvolvimento na faixa de pH de 3-10 extraídas com tampão tris-HCl 0,1 M, NaCl 0,5 M, pH 8,0 e acetato 0,1 M, NaCl 0,5 M, pH 5,0 que foi baixa quando comparado com os outros géis. Na FIGURA 10 pode-se observar que os géis do endosperma em desenvolvimento para as frações albumínicas e globulínicas apresentaram uma quantidade muito maior de spots com peso molecular alto se comparados com os géis do fracionamento do endosperma maduro (FIGURA 11) onde prevalecem spots com massa molecular abaixo de 30 kDa. Na FIGURA 11 se observa ainda que as frações obtidas a partir da extração com tampão acetato apresentaram uma diversidade maior de spots tendo muitos destes 20 kDa ou menos quando comparados com as frações obtidas a partir da extração com tampão tris.

Os mapas bidimensionais da fração glutelínica do endosperma de sementes em desenvolvimento extraídas com tampão tris-HCl 0,1 M, NaCl 0,5 M, pH 8,0 (FIGURA 7) apresentaram um perfil de proteínas bem diferenciado da fração glutelínica do endosperma maduro extraído com o mesmo tampão (FIGURA 9). É observado um grupo bem característico de proteínas abundantes tanto nos géis de pH de 3-10 quanto de 4-7 na faixa de 45 a 25 kDa. Na fração glutelínica do endosperma maduro, os géis na faixa pH de 6-11, apresentaram uma grande diversidade de proteínas básicas, abundantes e com um perfil de proteínas muito semelhante ao dos mapas de pH de 6-11 das frações globulínicas do endosperma maduro extraídos tanto com tampão acetato 0,1 M, NaCl 0,5 M, pH 5,0 quanto com o tampão tris-HCl 0,1 M, NaCl 0,5 M, pH 8,0.

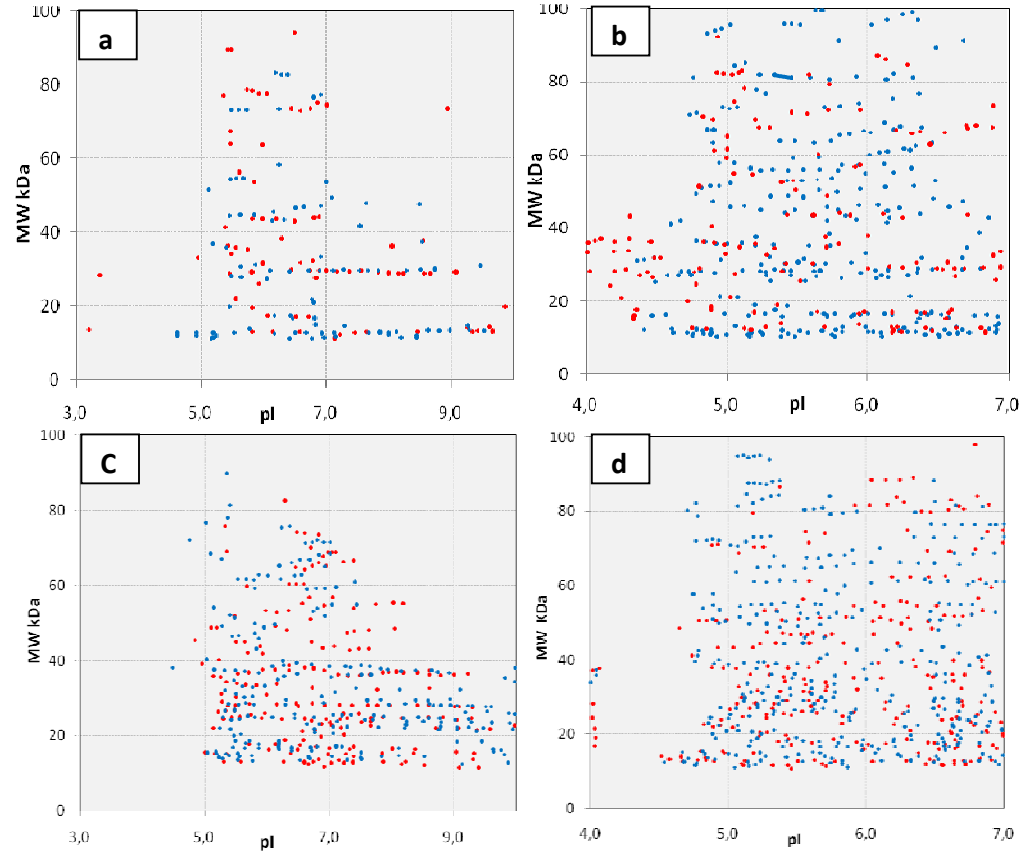


FIGURA 10. Comparação do padrão de distribuição de massa molecular e do ponto isoelétrico dos spots obtidos a partir da extração das proteínas do endosperma de sementes em desenvolvimento de pinhão manso. 1) Spots da fração albumínica extraídos com tris-HCl 0.1 M pH 8.0 NaCl 0.5 M (azul) ou acetato 0.1 M pH 5.0 NaCl 0.5 M (vermelho) na faixa de pH de 3-10 (a) e 4-7 (b) . 2) Spots da fração globulínica extraídos com tris 0.1 M pH 8.0 NaCl 0.5 M (azul) ou acetato 0.1 M pH 5.0 NaCl 0.5 M (vermelho) na faixa de pH de 3-10 (c) e 4-7 (d).

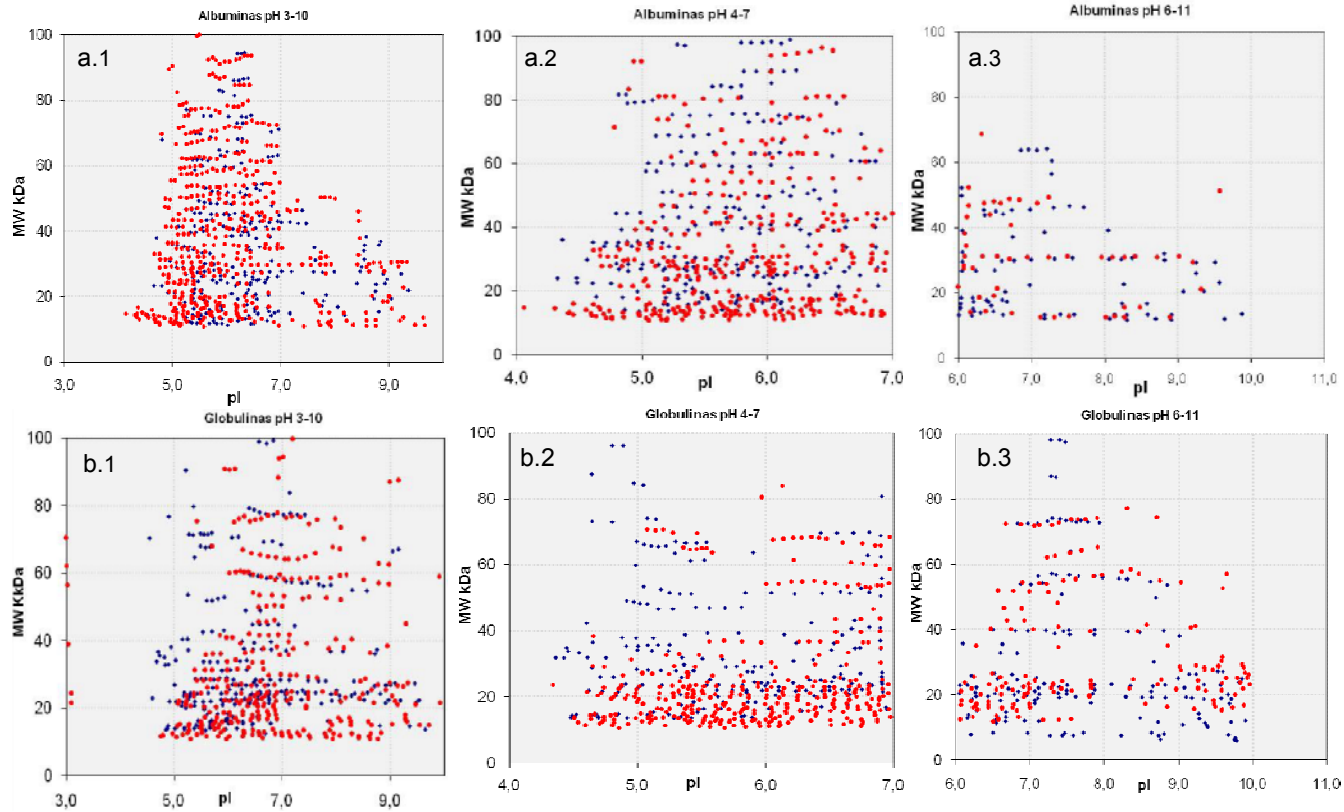


FIGURA 11. Comparação do padrão de distribuição de massa molecular e do ponto isoelétrico dos spots obtidos a partir da extração das proteínas do endosperma de sementes em desenvolvimento de pinhão manso. a) Spots da fração albumínica extraídos com tris-HCl 0.1 M pH 8.0 NaCl 0.5 M (azul) ou acetato 0.1 M pH 5.0 NaCl 0.5 M (vermelho) na faixa de pH de 3-10 (a.1), 4-7 (a.2) e 6-11 (a.3). b) Spots da fração globulínicas extraídos com tris-HCl 0.1 M pH 8.0 NaCl 0.5 M (azul) ou acetato 0.1 M pH 5.0 NaCl 0.5 M (vermelho) na faixa de pH de 3-10 (b.1), 4-7 (b.2) e 6-11 (b.3).

4.6 Identificação de proteínas.

Um total de 300 spots dos mapas bidimensionais (FIGURA 8 e FIGURA 9) do endosperma maduro foram processadas para análise por espectrometria de massa, mas a análise não foi realizada devido a problemas técnicos com o espectrômetro de massa. Sendo assim, só puderam ser analisados por espectrometria de massa os spots dos géis do endosperma em desenvolvimento (FIGURA 6 e FIGURA 7). Os spots foram excisados dos géis, digeridos com tripsina e analisados em um espectrômetro de massa MALDI-TOF-TOF (ABI 4700-Applied Biosystems). Os dados obtidos após o processamento de todos os spots foram pesquisados no banco de dados do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) para Viridiplantae (Green Plants) e num banco local de ESTs de sementes em desenvolvimento e de sementes em germinação de pinhão manso. Dos 768 spots analisados, 181 spots foram identificados utilizando o banco local do pinhão manso enquanto 85 spots foram identificados utilizando o banco do NCBI. Apesar das taxas de identificação ainda serem baixas, foi possível a identificação de uma quantidade muito maior de proteínas menos abundantes, mostrando que esta estratégia de obter frações protéicas enriquecidas em diferentes classes de proteínas de solubilidade específica representa uma estratégia promissora. Na TABELA 5, todas as proteínas identificadas estão listadas, estando também indicadas as massas moleculares e os pI experimentais e teóricos de cada spot, o “ion score” de cada identificação, as seqüências dos peptídeos identificados por MS/MS e os números de entrada no NCBI.

LIU *et al.*, 2009, através de LC-MS/MS identificaram 14 spots que eram comuns no endosperma e no embrião de sementes de pinhão manso mas que quando comparados, mostravam uma grande diferença no padrão de expressão. Os autores identificaram cinco proteínas relacionadas com estresse das quais uma, Hsp 70 que é depositada durante a maturação da semente, foi também identificada nos nossos estudos tanto no endosperma maduro quanto em desenvolvimento; esta proteína está envolvida no enovelamento de proteínas e em especial de proteínas de reserva (SHEWRY *et al.*, 1995).

Nos mapas 2-DE de referência do endosperma em desenvolvimento foi possível a identificação de proteínas que não foram identificadas no endosperma maduro e que estão envolvidos na biossíntese de ácidos graxos e na toxicidade da semente, como: enoyl ACP reductase, acyl-CoA-binding protein, binding/catalytic/coenzyme, lipid binding protein, ent-copalyl diphosphate synthase e a curcina (Tabela 5).

4.7 Proteínas identificadas na fração albumínica.

A grande maioria (85%) das proteínas identificadas nas frações albumínicas extraídas com os tampões tris-HCl 0,1 M, NaCl 0,5 M, pH 8,0 e acetato 0,1 M, NaCl 0,5 M, pH 5,0 não pertencem à categoria das proteínas de reserva, mostrando mais uma vez que o fracionamento foi muito efetivo para a obtenção de frações enriquecidas em determinadas classes de proteínas (FIGURA 12). A presença de proteínas de reserva do tipo legumina, vicilina, etc., deve-se possivelmente a um fenômeno de co-precipitação ocorrido durante a diálise, ou, alternativamente, a um tempo insuficiente de diálise.

Em uma análise proteômica de germinação e crescimento pós-germinativo de pinhão manso, Yang *et al.*, (2009) identificaram cinquenta proteínas que mudavam de expressão durante a embebição. Algumas destas proteínas foram identificadas nos nossos estudos, localizadas principalmente na fração albumínica. Entre elas estavam as proteínas fructose-bisphosphate aldolase, malate dehydrogenase e triose-phosphate isomerase relacionadas com a mobilização de lipídio. Outras proteínas também relacionadas com o metabolismo de lipídio como a lipid binding protein e malate dehydrogenase, putative foram identificadas nos nossos estudos, mas não foram identificadas no trabalho citado. A acyl-CoA-binding protein uma proteína pequena (10 kDa) que se liga a cadeia de ésteres de acil-CoA com alta afinidade e pode funcionar como um transportador intracelular de ésteres de acil-CoA (YURCHENKO *et al.*, 2009) também foi identificada nesta fração.

Na fração albumínica oriunda da extração da farinha do endosperma com tampão acetato, foi identificada a proteína ent-copalyl diphosphate synthase, que é uma enzima plastidial da família das sintases de terpenos (BUCHANAN *et al.*, 2000) e que catalisa a primeira reação de ciclização do geranylgeranyl diphosphate na rota metabólica de síntese de precursores de diterpenos cíclicos (FIGURA 13), tais como as giberelinas e o esteviol (BRANDLE *et al.*, 2007; RICHMAN *et al.*, 1999). Uma análise do banco de ESTs do pinhão manso utilizado neste estudo indicou a presença de vários transcritos que codificam para proteínas relacionadas com a síntese dos compostos isopentenil difosfato e dimetilalildifosfato que são precursores para a síntese de terpenóides tanto a partir de vias citoplasmáticas quanto de vias plastidiais (BUCHANAN *et al.*, 2000). Também foi detectado neste banco de dados transcritos relacionados com a síntese de diterpenos (que se dá nos plastídeos), categoria a qual pertence os ésteres de forbol. Estes resultados dão testemunho do potencial que uma combinação de análise proteômica e transcriptômica pode oferecer para elucidar a via biossintética dos ésteres de forbol.

Diversas isoformas de proteínas relacionadas com estresse oxidativo aqui identificadas, tais como superóxido dismutase, Cu-Zn superoxide dismutase e glutathione S-transferase também foram identificadas por Yang *et al.*, (2009). Outra proteína relacionada com estresse oxidativo, a lactoylglutathione lyase, uma enzima envolvida na conversão do S-d-lactoylglutathione e do lactato foi identificada no nosso estudo e no estudo de Liu *et al.*, (2009), com pinhão manso.

A phospholipase D (PLD), chama a atenção por ter sido identificada através do banco do NCBI, muito embora seu mRNA tenha sido detectado e seqüenciado na biblioteca de cDNA. Esta enzima catalisa a hidrólise da ligação fosfodiéster de glicerofosfolípidos para gerar ácido fosfatídico e um grupo cabeça livre hidrofílico. Em organismos superiores, a PLD especificamente catalisa a hidrólise de fosfatidilcolina a ácido fosfatídico e colina. Sendo o ácido fosfatídico um importante segundo mensageiro em plantas e animais (LIU *et al.*, 2010).

No presente estudo, é digno de nota que nenhum spot relacionado com as albuminas 2S foi identificado seja na fração albumínica ou em outra fração. Já Campos *et al.*, (2010), utilizando um método de fracionamento de proteínas muito semelhante ao realizado neste estudo, identificou inúmeros spots bem abundantes presentes nos géis bidimensionais, como sendo 2S albuminas, além do que obtiveram uma fração albumínica que teve apenas três tipos de proteínas identificadas, a ricina, as 2S albuminas e as aglutininas, curiosamente as principais proteínas envolvidas com a toxicidade da semente de mamona. Este resultado é surpreendente, uma vez que no banco local de ESTs de pinhão manso estão presentes diversos transcritos que codificam para esta proteína. Adicionalmente, um exame dos mapas de referências da fração albumina (FIGURA 6 e FIGURA 8) mostra a presença de diversas proteínas de peso molecular equivalente aos das cadeias que foram as albuminas 2S.

Na fração albumina foram também identificadas proteínas relacionadas com diversos processos celulares como: transdução de sinal (WD-repeat protein e nucleoside diphosphate kinase), Ribossomos e tradução (translation initiation inhibitor, putative), metabolismo de carboidrato (polygalacturonase, putative), energia (glutaredoxin), proteinases (cysteine protease, putative) além da curcina (FIGURA 14).

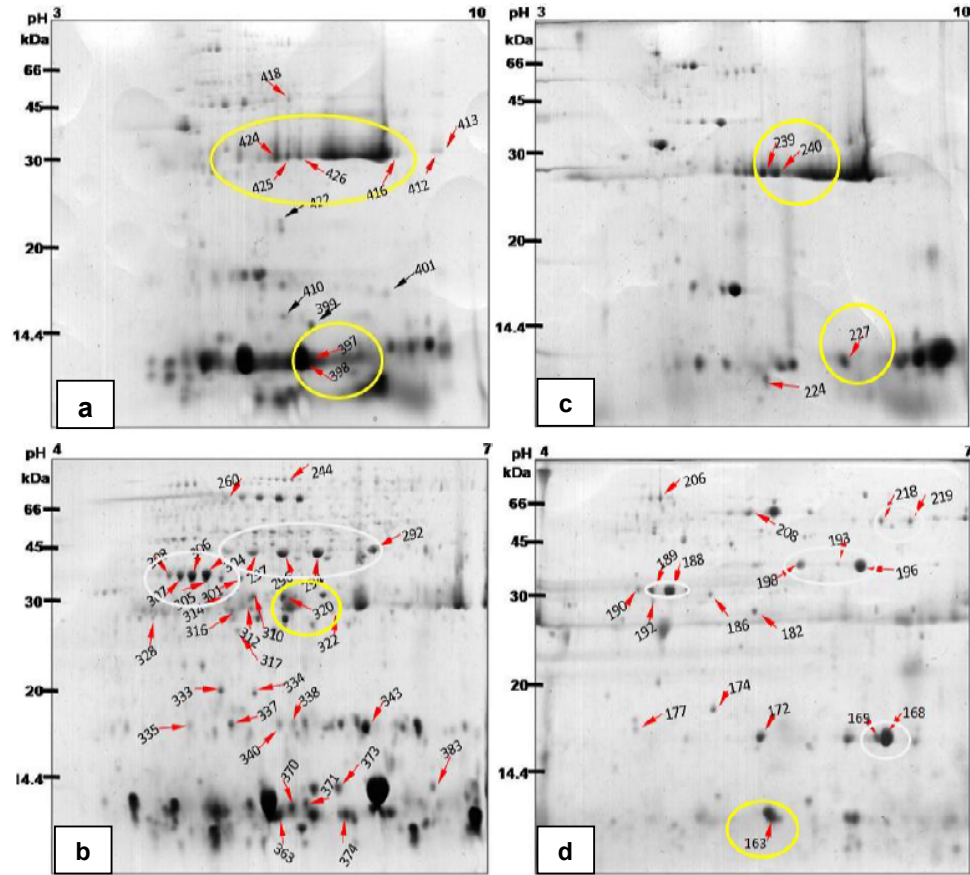


FIGURA 12. Mapas de referência da fração albumínica do endosperma de sementes em desenvolvimento de pinhão manso. Os spots identificados por espectrometria de massa MALDI-TOF-TOF estão representados por setas. As albuminas extraídas com tampão tris-HCl 0.1 M pH 8.0 NaCl 0.5 M nas faixas de pH de 3-10 e 4-7 estão representados nos géis a e b; As albuminas extraídas com tampão acetato 0.1 M pH 5.0 NaCl 0.5 M nas faixas de pH de 3-10 e 4-7 estão representadas nos géis c e d. As setas pretas representam proteínas de reserva, e as setas vermelhas indicam proteínas que não são de reserva. (spot 163 : acyl-CoA-binding protein; spot 227 : lipid binding protein; spot 239 : curcín precursor; spot 240 : curcín precursor; spot 320: binding/catalytic/coenzyme binding; spot 397: ent-copalyl diphosphate synthase; spot 398: ent-copalyl diphosphate synthase; spot 416 : curcín precursor ; spot 424: curcín precursor ; spot 425: curcín precursor; spot 426 : curcín precursor).

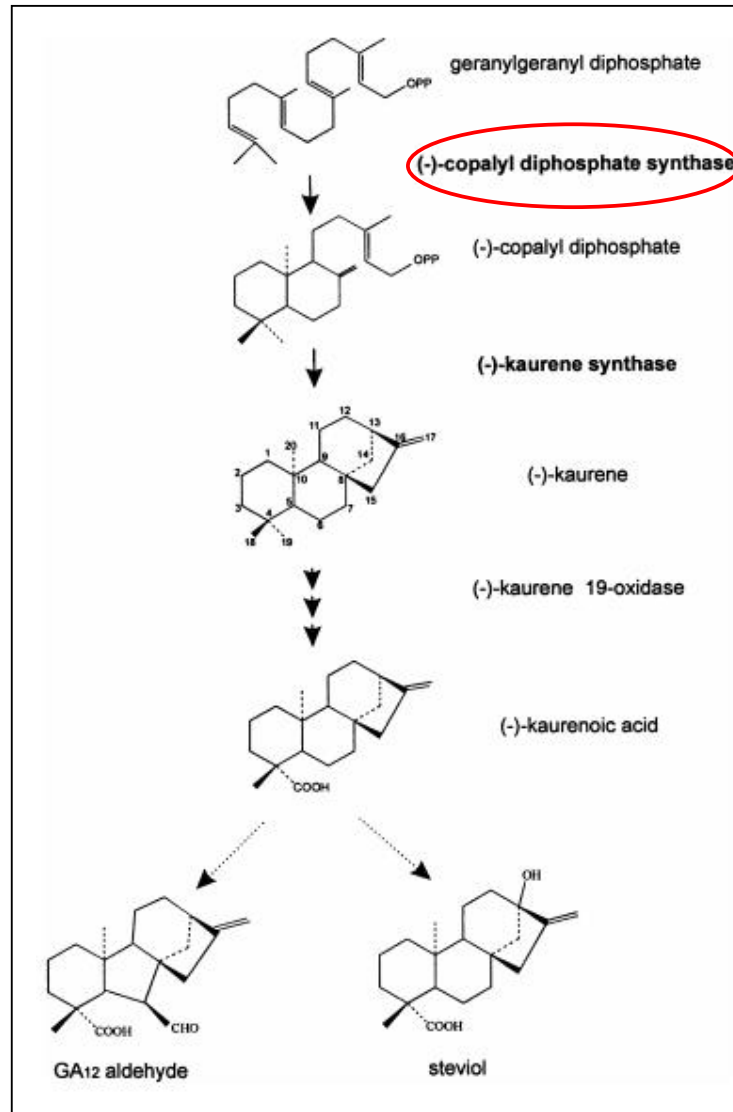


FIGURA 13. Representação esquemática mostrando o envolvimento da enzima *ent-copalyl diphosphate synthase*, identificada na fração globulínica de sementes em desenvolvimento de pinhão manso na rota de biossíntese das giberelinas e do steviol a partir do geranylgeranyl-difosfato (RICHMAN *et al.*, 1999).

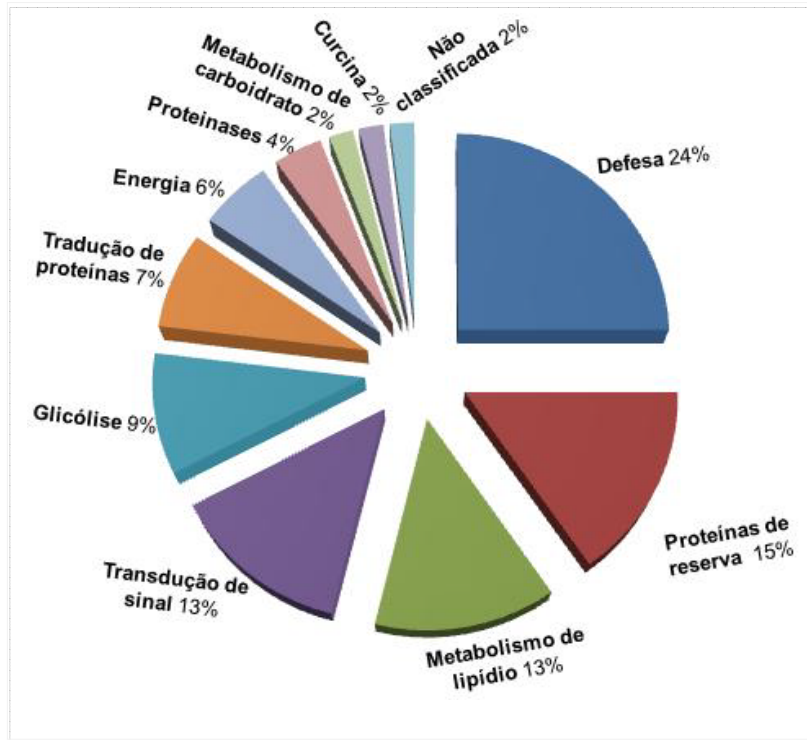


FIGURA 14. Distribuição funcional relativa das proteínas identificadas na fração albumínica extraída com tempão tris ou acetato do endosperma de sementes em desenvolvimento de pinhão manso.

4.8 Proteínas identificadas na fração globulínica.

Na fração globulínica, a grande maioria das proteínas identificadas (75%) foi de proteínas de reserva (FIGURA 15). A análise desta fração permitiu a identificação de proteínas tais como a curcina, que não haviam sido previamente identificadas quando da análise da fração proteínas totais. É digno de nota que a curcina foi identificada unicamente através do banco do NCBI, já que nenhum clone correspondente a curcina foi identificado quando do seqüenciamento dos clones da biblioteca de cDNA de sementes em desenvolvimento e de sementes em germinação e que serviram de bases para a construção do banco de ESTs local usado neste trabalho. É ainda relevante salientar que nos dois artigos já citados (LIU *et al.*, 2009) (YANG *et al.*, 2009) e que tratam da proteômica de sementes do pinhão manso, esta proteína não foi identificada.

Na fração globulínica obtida a partir da extração da farinha de endosperma com tampão tris, foram também identificadas proteínas pertencentes à família das ATPases. As proteínas identificadas foram as subunidades alfa e beta, que estão relacionadas com a produção de ATP a partir de ADP na presença de um gradiente de prótons. Estas proteínas não foram identificadas na fração globulínica obtida a partir da extração da farinha de endosperma com tampão acetato, indicando assim a utilidade da obtenção de frações protéicas a partir de critérios de solubilidade diferencial. Além dessas proteínas, outras relacionadas com diversos processos celulares, como metabolismo secundário (dihydroneopterin aldolase, putative), proteinases (Aspartic proteinase nepenthesin-2 precursor, putative) e transdução de sinal (nucleoside diphosphate kinase) foram identificadas nesta fração (FIGURA 16).

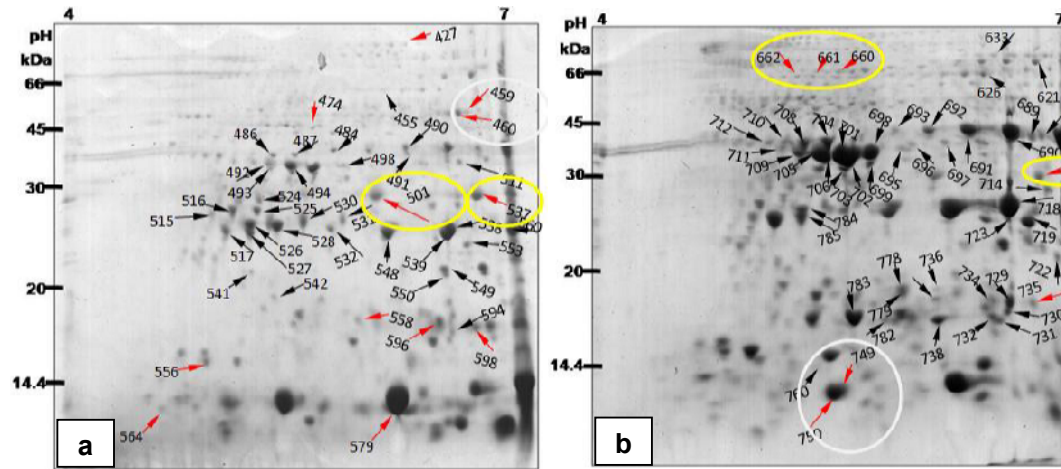


FIGURA 15. Mapas de referência da fração globulínica do endosperma de sementes em desenvolvimento de pinhão manso com os spots identificados por espectrometria de massa MALDI-TOF-TOF representados por setas. A fração globulínica extraída com tampão tris-HCl 0.1 M pH 8.0 NaCl 0.5 M está representada na faixa de pH 4-7 (Gel a); A fração globulínica extraída com tampão acetato 0.1 M pH 5.0 NaCl 0.5 M está representada na faixa de pH 4-7 (Gel b). As setas pretas representam proteínas de reserva, e as setas vermelhas indicam proteínas que não são de reserva. (spot 501 : curcin precursor; spot 537 curcin precursor; spot 662 : : atpA; spot 661 : : atpA; spot 660 : : atpA; spot 750: phytochrome; spot 749: phytochrome; spot 715: curcin precursor).

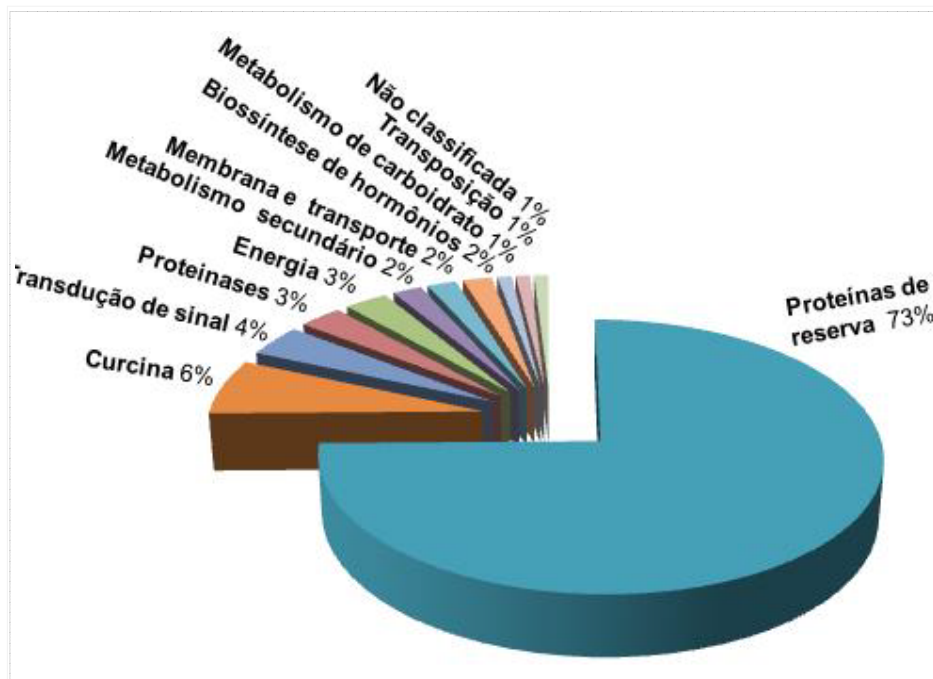


FIGURA 16. Distribuição funcional relativa das proteínas identificadas na fração globulínica extraída com tempão tris ou acetato do endosperma de sementes em desenvolvimento de pinhão manso.

4.9 Proteínas identificadas na fração glutelínica.

A fração glutelínica obtida de acordo o método descrito por DE ANGELIS *et al.*, 2009, foi obtida a partir do resíduo da extração de farinha de endosperma com tampão tris-HCl 0.1 M pH 8.0 NaCl 0.5 M. Esta fração apresentou uma pequena diversidade de proteínas, e contém predominantemente (80%) proteínas de reserva (FIGURA 17). Nesta fração a curcina, que já havia sido identificada na fração globulínica, foi identificada, além de proteínas relacionadas com transdução de sinal (nucleoside diphosphate kinase), metabolismo energético (glutaredoxin), defesa (peroxiredoxin) e glicólise (fructose-bisphosphate aldolase) (FIGURA 18). Nesta fração foram também identificadas diversas chaperoninas tais como a protein disulfide isomerase, a putative cyclophilin e heat shock protein, que já haviam sido identificadas quando da análise do endosperma maduro (TABELA 4). A presença dessas proteínas em frações em que predominam as proteínas de reserva dá testemunho do envolvimento das chaperoninas no enovelamento e montagem das proteínas de reserva no retículo endoplasmático, assim como na catálise da formação de pontes dissulfeto que podem ocorrer inter e intra cadeia das subunidades das proteínas de reserva (MUNTZ *et al.*, 1998; SHEWRY *et al.*, 1995).

Digno ainda de nota, é o fato de que na fração glutelínica foi também identificada a proteína enoyl ACP reductase, enzima que catalisa a última reação no ciclo de alongamento dos ácidos graxos (FIGURA 19) (MASSENGO-TIASSE *et al.*, 2009).

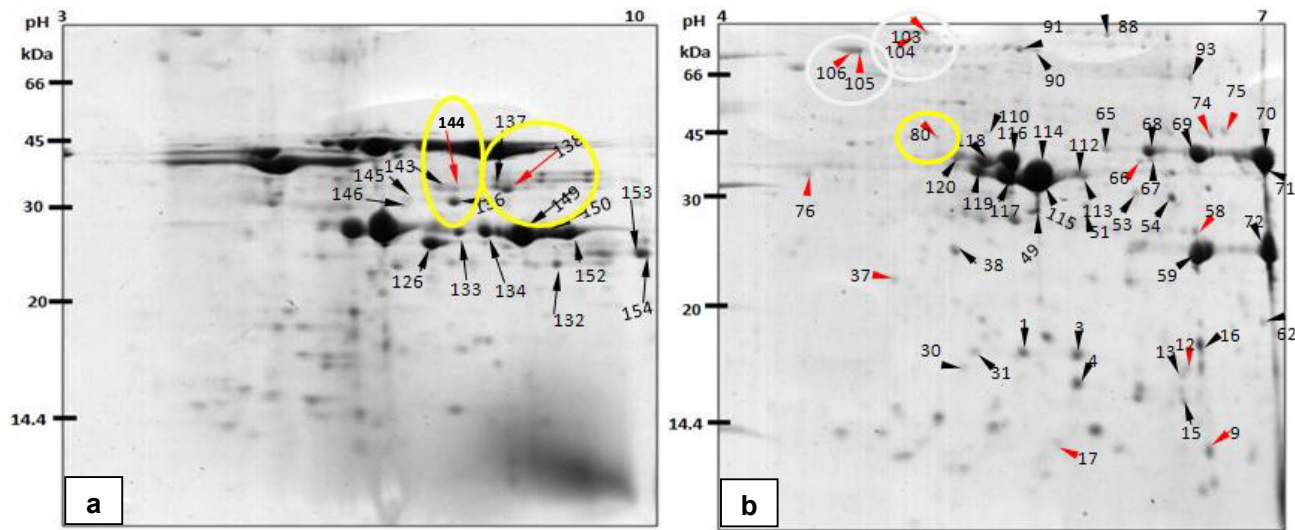


FIGURA 17. Mapas de referência da fração glutelínica do endosperma de sementes em desenvolvimento de pinhão manso com os spots identificados por espectrometria de massa MALDI-TOF-TOF representados por setas. A fração glutelínica extraída com tampão Tris-HCl 0.1 M pH 8.0 NaCl 0.5 M está representada na faixa de pH de 3-10 (Gel a) e 4-7 (Gel b). As setas pretas representam proteínas de reserva, e as setas vermelhas indicam proteínas que não são de reserva. (spot 138 : curcin precursor; spot 144 : curcin precursor; spot 80 : enoyl ACP reductase; spot 103: Protein disulfide-isomerase precursor; spot 104: Protein disulfide-isomerase precursor; spot 105: Protein disulfide-isomerase precursor; spot 106: Protein disulfide-isomerase precursor).

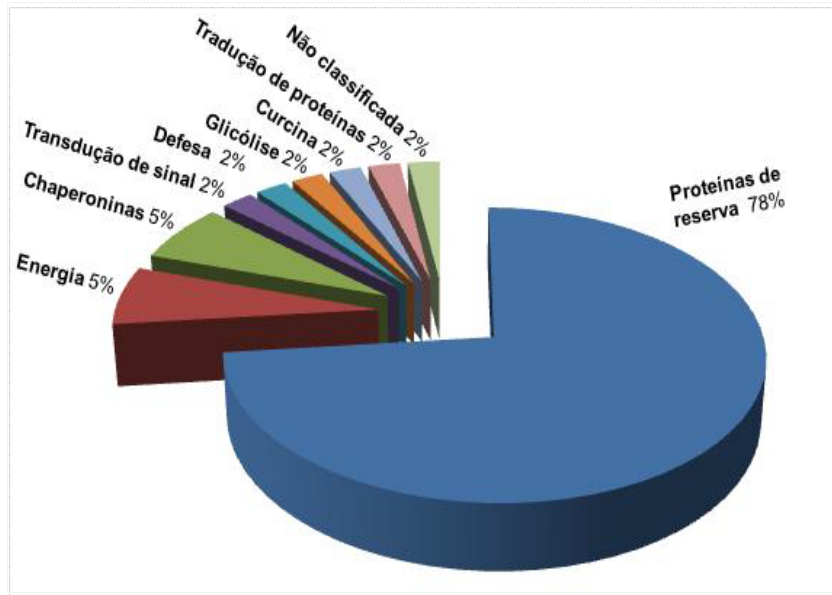


FIGURA 18. Distribuição funcional relativa das proteínas identificadas na fração glutelínica extraída com tampão tris do endosperma de sementes em desenvolvimento de pinhão manso.

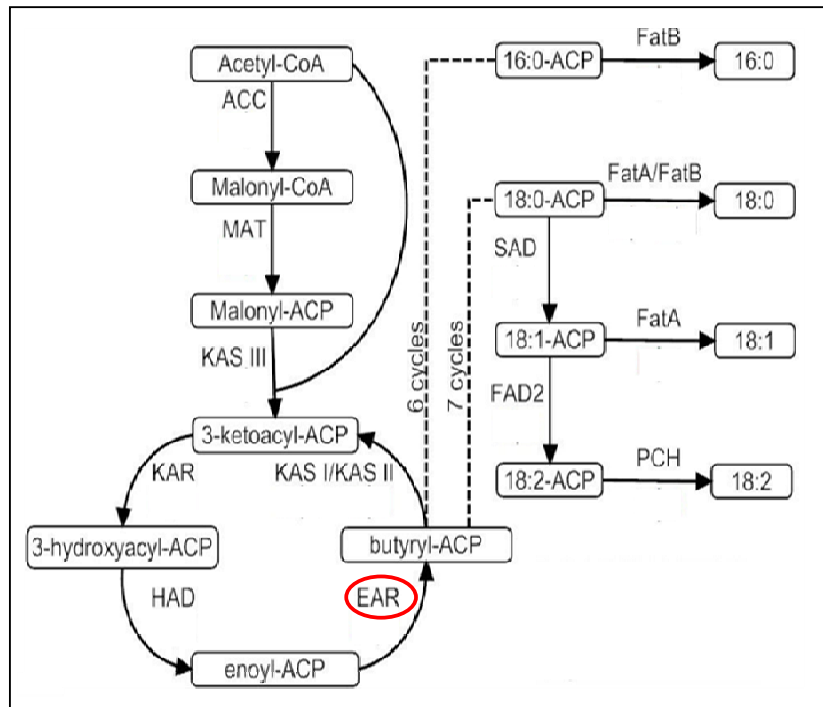


FIGURA 19. Representação esquemática mostrando o envolvimento da enzima enoyl ACP reductase, identificada na fração glutelínica de sementes em desenvolvimento de pinhão manso, com a reação terminal no ciclo de alongamento dos ácidos graxos (MASSENGO-TIASSE *et al.*, 2009).

4.10 Utilização de bancos de ESTs para a identificação de proteínas.

Apesar do grande desafio que é o estudo proteômico de plantas para as quais não estão disponíveis dados genômicos, a utilização dos bancos de ESTs tem permitido avanços significativos. Por exemplo, os estudos de Choudhary *et al.*, (2001) e Østergaard *et al.*, (2004), permitiram a identificação das principais proteínas solúveis em extrato aquoso de cevada e separadas em géis de pH de 4-7, através da utilização de um banco de EST de cevada. Já Kwon *et al.*, (2003), mostraram que a utilização de um banco de EST para a identificação de proteínas por MS foi uma ferramenta valiosa que permitiu a identificação em larga escala de proteínas de *Panax ginseng*.

Os dados apresentados nesta dissertação corroboram a idéia de que o estabelecimento de um banco de dados de ESTs para o mesmo tecido/órgão utilizado na análise proteômica, é uma alternativa à produção de dados genômicos. Muito embora uma fração importante do total das proteínas identificadas tenha sido feita a partir do banco de dados do NCBI, a disponibilidade do banco de ESTs de sementes em desenvolvimento e sementes germinantes ampliou significativamente o número de proteínas identificadas permitindo a identificação de proteínas que puderam ser classificadas funcionalmente em diversas classes (TABELA 6). Por exemplo, no estudo com as proteínas totais do endosperma de sementes maduras, a taxa de identificação foi de 5% quando o banco de dados do NCBI foi usado, mas esta taxa de identificação pulou para 42% com a utilização do banco de dados local (TABELA 4 e TABELA 5). Resultados semelhantes foram obtidos no caso dos estudos com o endosperma de sementes em desenvolvimento. Praticamente todos os spots que foram identificados utilizando o banco do NCBI foram também identificados utilizando o banco local de pinhão manso, sendo uma das exceções a curcina. Por outro lado, muitas proteínas só puderam ser identificadas através do uso do banco de dados local.

Mesmo assim, para um número considerável de spots, a identificação da proteína correspondente não foi possível. Este fato se deve tanto à escassez de informações no nível de sequências de nucleotídeos e de proteínas depositados em bancos de dados e também à diversidade (número), qualidade e tamanho dos ESTs disponíveis no banco local. Após a análise dos dados apresentados neste trabalho terem sido concluídas, cientistas chineses e brasileiros adicionaram aproximadamente 13000 ESTs no banco de dados do NCBI, ampliando para 13.201 o número de ESTs disponíveis para a comunidade científica (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gquery/?term=jatropha+curcas>)

Uma alternativa para a identificação de proteínas de espécies não-modelo baseado em espectrometria de massa é a interpretação manual ou automática dos espectros seguidos por busca de homologia de sequências como o MS-BLAST (CANTÚ & CARRILHO, 2008). Neste estudo foi possível a interpretação manual e automática com alta confiança de um peptídeo de excelente espectro encontrado em vários spots (FIGURA 20), onde se deduziu a sequência completa do peptídeo, mas a busca por similaridade de sequência não obteve resultado, provavelmente por não haver peptídeo com similaridade depositada nos bancos de dados.

TABELA 6. Lista dos tipos de proteínas no endosperma de sementes em desenvolvimento e maduras de Pinhão manso identificados por MS e MS/MS. As identificações foram organizadas de acordo com sua Classificação funcional.

Classificação funcional	Proteínas identificadas
Proteínas de reserva	Legumin-like protein [<i>Ricinus communis</i>]
	11S globulin seed storage protein
	Vicilin GC72-A (<i>Gossypium hirsutum</i>)
	Legumin B - tick bean (fragment)
	Seed storage protein A [<i>Vigna luteola</i>]
	Legumin B precursor, putative [<i>Ricinus communis</i>]
	Glutelin type-A 3 precursor, putative [<i>Ricinus communis</i>]
Chaperoninas, choque térmico, enovelamento	Nutrient reservoir, putative [<i>Ricinus communis</i>]
	Protein disulfide isomerase, putative [<i>Ricinus communis</i>]
	Putative cyclophilin [<i>Citrus cv. Shiranuhi</i>]
	Heat shock protein, putative [<i>Ricinus communis</i>]
	Protein disulfide-isomerase precursor (PDI)
Metabolismo de lipídio	BiP [<i>Glycine max</i>]
	TRP-containing protein [<i>Ostreococcus lucimarinus CCE9901</i>]
	Malate dehydrogenase, putative [<i>Ricinus communis</i>]
	Phospholipase D [<i>Ricinus communis</i>]
Metabolismo de carboidrato	Acyl-CoA-binding protein [<i>Jatropha curcas</i>]
	Enoyl ACP reductase [<i>Olea europaea subsp. europaea</i>]
	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, putative [<i>Ricinus communis</i>]
	Fructose-bisphosphate aldolase, putative [<i>Ricinus communis</i>]
	Triosephosphate isomerase, putative [<i>Ricinus communis</i>]
Ribossomos, tradução de proteínas	Polygalacturonase, putative [<i>Ricinus communis</i>]
	Ribulose-1,5-bisphosphate large subunit [<i>Dendrobium equitans</i>]
	Elongation factor 1-alpha, putative [<i>Ricinus communis</i>]
Energia	Ripening regulated protein DDTFR10-like [<i>Solanum tuberosum</i>]
	Translation initiation inhibitor, putative [<i>Ricinus communis</i>]
Metabolismo secundário	Glutaredoxin [<i>Vernicia fordii</i>]
	Chloroplast septum site-determining protein [<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>]
Transdução de sinal	atpA [<i>Jatropha curcas</i>]
	Dihydroneopterin aldolase, putative [<i>Ricinus communis</i>]
	Nucleoside diphosphate kinase, putative [<i>Ricinus communis</i>]
	WD-repeat protein, putative [<i>Ricinus communis</i>]
Defesa	Lipid binding protein, putative [<i>Ricinus communis</i>]
	Phytochrome [<i>Macrozamia communis</i>]
	Cu-Zn superoxide dismutase [<i>Populus alba</i>]
	Lactoylglutathione lyase, putative [<i>Ricinus communis</i>]
	Peroxioredoxin, putative [<i>Ricinus communis</i>]
Proteinasas, ubiquitinação	Hv1LRR2 [<i>Hordeum vulgare</i>]
	Glutathione-s-transferase Omega, putative [<i>Ricinus communis</i>]
	Cysteine protease, putative [<i>Ricinus communis</i>]
RIP	Aspartic proteinase precursor, putative [<i>Ricinus communis</i>]
Membrana, transporte, receptores	Ubiquitin, putative [<i>Ricinus communis</i>]
	Curcin precursor [<i>Jatropha curcas</i>]
Biossíntese de hormônios	Type IIIa membrane protein cp-wap13 [<i>Vigna unguiculata</i>]
Hipotética	ent-copalyl diphosphate synthase [<i>Arabidopsis thaliana</i>]
Transposição	Hypothetical protein LOC_Os10g28620 [<i>Oryza sativa</i>]
	Transposase mariner transposase undefined product (IC) [<i>Ostreococcus tauri</i>]
Glicosidase, Hidrolase	Alpha-L-arabinofuranosidase [<i>Raphanus sativus</i>]
	Xylan 1,4-beta-xylosidase [<i>Populus alba x Populus tremula</i>]
Ligação, Transporte	Putative carboxymethylenebutenolidase [<i>Arabidopsis thaliana</i>]
	Binding / catalytic/ coenzyme binding [<i>Arabidopsis thaliana</i>]
	ABC (ABC) family transporter [<i>Ostreococcus lucimarinus</i>]

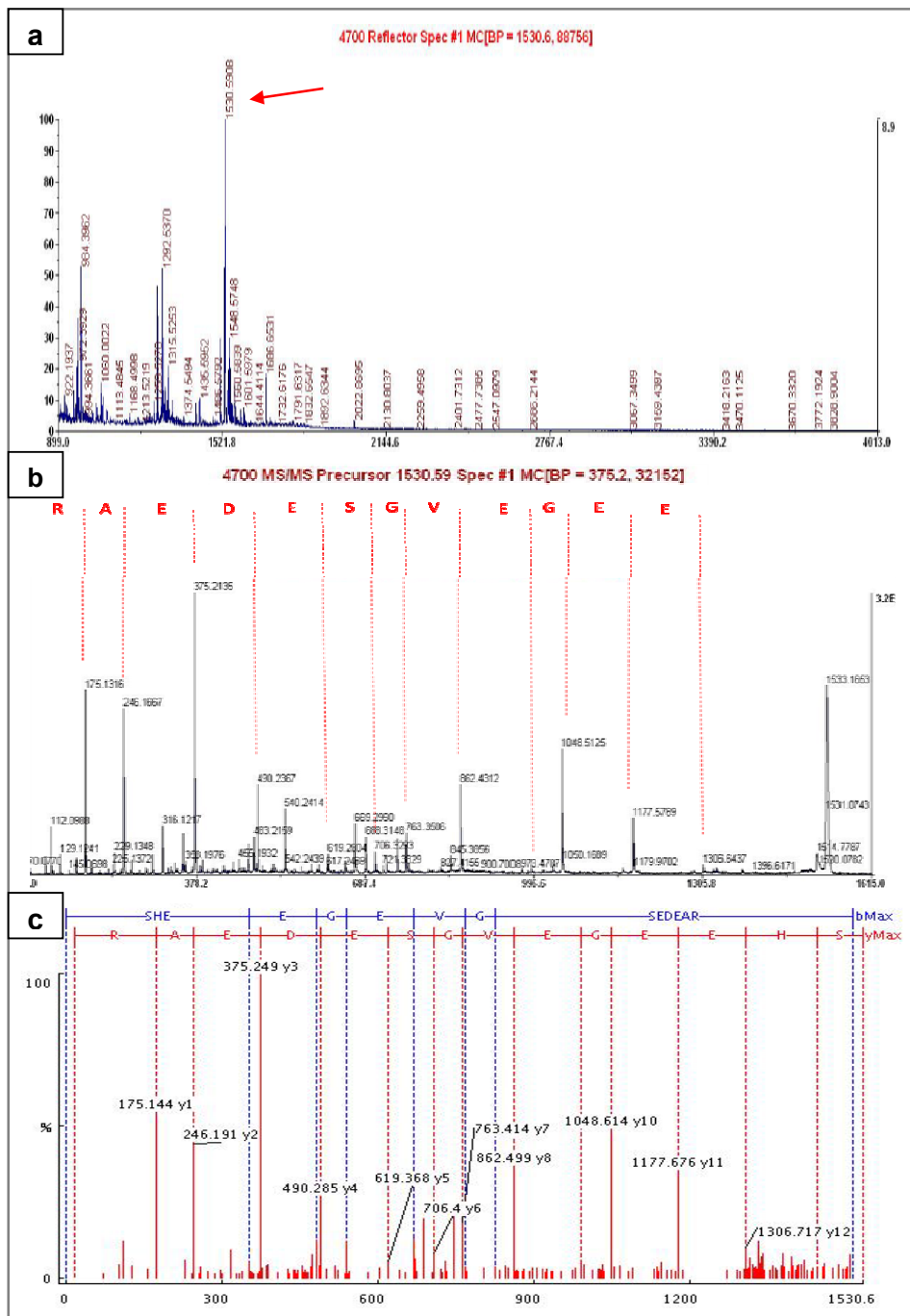


FIGURA 20. Análise por espectrometria de massa dos peptídeos trípticos eluídos do spot H15 placa 5772. (a) Espectro de massa dos peptídeos gerados pela digestão do spot H15 com tripsina. (b) O íon em evidência (1530.5908) foi escolhido para fragmentação e análise de MS/MS, uma seqüência (EEGEVGSEDEAR) foi obtida manualmente a partir desse espectro de fragmentação, pela série “y”. (c) Confirmação da seqüência obtida através de *seqüenciamento Denovo* automático usando o software PeaksOnline 2.0 (HSEE-GEV-GSE-DEAR).

TABELA 5. Lista das proteínas do endosperma de sementes em desenvolvimento do pinhão manso identificadas por MS e MS/MS.

Banco local de EST do pinhão manso						NCBI				
Spot n.	MM/pl (kDa)		Protein Score/Ion score	Seq. ID Peptídeos	ID (NCBI)	Descrição das proteínas	Protein Score/Ion score	Seq. ID Peptídeos	ID (NCBI)	Descrição das proteínas
	Exp.	Teor.								
D1	17.0/5.7	53.6/8.6	45	DQFQCAGVAIVR	gb AAF73007.1	legumin-like protein	-	-	-	-
D3	16.9/5.9	53.6/8.6	153	ADVYIPEVGR/GTCNNLFCGLDSR/ HFYLAGNPEDEFR	gb AAF73007.1	legumin-like protein	-	-	-	-
D3	15.4/5.9	51.7/7.7	40	TIHNLESR	sp Q9XHP0.1	11S globulin seed storage protein	-	-	-	-
D9	12.7/6.7	11.1/6.0	34	HIGGCDATTGLHGEK	gb AAC39481.1	glutaredoxin	71/	-	CAD87535.1	putative xyloglucan endotransglycosylase
D12	16.2/6.59	16.3/6.3	80	GDYAIIDIGR / IIGATNPAESAPGTIR	gb EEF35859.1	nucleoside diphosphate kinase	/ 73	GLVGEIGR/IIGAT NPAESAPGTIR	gi 1346675	Nucleoside diphosphate kinase B
D13	15.9/6.5	45.5/7.8	32	YGFGAGEER	gb EEF28917.1	legumin B, putative [<i>Ricinus communis</i>]	-	-	-	-
D15	14.7/6.56	53.6/8.6	74	ADVYIPEVGR/VSTINSHNLPILR	gb AAF73007.1	legumin-like protein	-	-	-	-
D16	17.4/6.65	51.7/7.7	85	TIHNLESR /SPLAGYTSVMR	sp Q9XHP0.1	11S globulin seed storage protein	-	-	-	-
D17	13.1/5.87	11.1/6.0	41	HIGGCDATTGLHGEK	gb AAC39481.1	glutaredoxin	-	-	-	-
D31	17.1/5.43	55.9/7.6	30	LIYVLQGR	gb EEF28918.1	glutelin type-A 3, putative	-	-	-	-
D37	21.4/4.98	38.0/9.18	-	-	-	-	75 /	-	gi 159477869	chloroplast septum site-determining protein
D38	24.0/5.31	53.6/8.6	61	HFYLAGNPEDEFR	gb AAF73007.1	legumin-like protein	-	-	-	-
D49	27.6/5.77	53.6/8.6	94	DQFQCAGVAIVR/ HFYLAGNPEDEFR	gb AAF73007.1	legumin-like protein	-	-	-	-
D51	28.1/6.04	53.6/8.6	103	KLQSENDYR/ HFYLAGNPEDEFR	gb AAF73007.1	legumin-like protein	-	-	-	-
D54	29.0/6.5	53.6/8.6	107	KLQSENDYR/DQFQCAGVAIVR/ GTCNNLFCGLDSR	gb AAF73007.1	legumin-like protein	-	-	-	-
D58	25.5/6.63	24.2/5.64	111	ALHIVGADKK/LSFLYPASTGR/ VTYPIADPNR	gb EEF43161.1	Peroxioredoxin, putative	-	-	-	-
D59	23.8/6.65	55.9/7.6	44	AGSEGLEWWSFK	gb EEF28918.1	glutelin type-A 3, putative	-	-	-	-
D62	18.5/7.0	55.9/7.6	37	DFELLFPPR	gb EEF28918.1	glutelin type-A 3, putative	-	-	-	-
D65	37.1/6.15	55.9/7.6	33	DFELLFPPR	gb EEF28918.1	glutelin type-A 3, putative	-	-	-	-
D66	34.9/6.33	45.2/4.82	-	-	-	-	75 /	-	gi 145354669	TRP-containing protein
D67	35.3/6.39	55.9/7.6	32	DFELLFPPR	gb EEF28918.1	glutelin type-A 3, putative	-	-	-	-
D68	36.7/6.38	55.9/7.6	107	LIYVLQGR/AFFLAGNPQR/ DFELLFPPR	gb EEF28918.1	glutelin type-A 3, putative	-	-	-	-
D69	36.3/6.65	55.9/7.6	107	LIYVLQGR / AFFLAGNPQR / DFELLFPPR	gb EEF28918.1	glutelin type-A 3, putative	-	-	-	-
D70	35.3/7.0	55.9/7.6	124	LIYVLQGR/AFFLAGNPQR/DFELLFPPR	gb EEF28918.1	glutelin type-A 3, putative	86%	LVYLLQGR	gi 7739791	glutelin
D71	34.1/7.02	51.7/7.7	109	SLDEQALAESFNVPTEIVR/DFELLFPPR	sp Q9XHP0.1	11S globulin seed storage protein	-	-	-	-
D72	24.5/7.01	55.9/7.6	33	AGSEGLEWWSFK	gb EEF28918.1	glutelin type-A 3, putative	-	-	-	-
D74	40.6/6.71	35.6/6.4	-	-	-	-	39	IVQGLHIDEFSR	ref XP_002533463.1	malate dehydrogenase, putative
D75	40.8/6.79	38.6/6.57	76	VAPEVIAEYTVR/LASINVENVEENRR	gb EEF33801.1	fructose-bisphosphate aldolase, putative	43	VAPEVIAEYTVR	gi 218157	cytoplasmic aldolase
D76	32.6/4.5	25.3/4.47	-	-	-	-	59	KLDDYLLTR	gi 78191406	ripening regulated protein DDTFR10-like
D80	39.5/5.2	41.8/8.2	-	-	-	-	57%	VNTLSAGPLR	gi 25989478	enoyl ACP reductase
D88	79.6/6.15	53.6/8.6	39	LISEAFNIDSLAR	gb AAF73007.1	legumin-like protein	-	-	-	-
D90	79.6/6.15	53.6/8.6	91	KLQSENDYR/GTCNNLFCGLDSR/LISEAFNIDE SLAR	gb AAF73007.1	legumin-like protein	-	-	-	-
D91	80.8/6.05	53.6/8.6	193	KLQSENDYR/DQFQCAGVAIVR/ GTCNNLFCGLDSR /HFYLAGNPEDEFR	gb AAF73007.1	legumin-like protein	-	-	-	-
D93	58.6/6.6	53.6/8.6	78	DQFQCAGVAIVR LISEAFNIDSLAR	gb AAF73007.1	legumin-like protein	-	-	-	-
D103	80.2/5.16	73.5/5.06	-	-	-	-	82/	-	gi 62433284	BiP
D104	80.8/5.12	73.4/5.10	-	-	-	-	77 / 78	FDLTGIPPAPR/FE ELNDLFR/NOIDEI VLVGGSTR	gi 224072248	heat shock protein, putative
D105	71.3/4.8	55.4/4.91	193	SDYEFGHTLDAK/AASILASHDPPIFLAK/LSGQ EFENYLAADK	gb EEF48327.1	protein disulfide isomerase, putative	50	SDYEFGHTLDAK	gi 223546830	Protein disulfide-isomerase
D106	71.3/4.7	55.5/4.95	-	-	-	-	99,47%/	GYPTVYFR	gi 11133775	Protein disulfide-isomerase precursor

TABELA 5. Lista das proteínas do endosperma de sementes em desenvolvimento do pinhão manso identificadas por MS e MS/MS.

Banco local de EST do pinhão manso						NCBI				
Spot n.	MM/pI (kDa)		Protein Score/Ion score	Seq. ID Peptídeos	ID (NCBI)	Descrição das proteínas	Protein Score/Ion score	Seq. ID Peptídeos	ID (NCBI)	Descrição das proteínas
	Exp.	Teor.								
D112	32.8/5.98	53.6/8.6	185	DQFQCAGVAIVR/GTCNNLFCGLDSR/ LISEAFNIDESLAR/HFYLAGNPEDEFR	gb AAF73007.1	legumin-like protein	-	-	-	-
D113	32.0/6.0	53.6/8.6	279	DQFQCAGVAIVR/GTCNNLFCGLDSR/ LISEAFNIDESLAR/HFYLAGNPEDEFR	gb AAF73007.1	legumin-like protein	-	-	-	-
D114	33.9/5.76	53.6/8.6	243	DQFQCAGVAIVR/GTCNNLFCGLDSR/ LISEAFNIDESLAR/HFYLAGNPEDEFR	gb AAF73007.1	legumin-like protein	-	-	-	-
D115	30.6/5.8	53.6/8.6	505	DQFQCAGVAIVR/GTCNNLFCGLDSR/ LISEAFNIDESLAR/HFYLAGNPEDEFR/ IQSEAGTIESWNPSR/	gb AAF73007.1	legumin-like protein	-	-	-	-
D116	34.5/5.6	53.6/8.6	390	GITGEMFPGCPETFQEQYQAGGSSR DQFQCAGVAIVR/GTCNNLFCGLDSR/ HFYLAGNPEDEFR/IQSEAGTIESWNPSR/ GITGEMFPGCPETFQEQYQAGGSSR	gb AAF73007.1	legumin-like protein	-	-	-	-
D117	32.0/5.5	53.6/8.6	348	DQFQCAGVAIVR/GTCNNLFCGLDSR/ LISEAFNIDESLAR/HFYLAGNPEDEFR/ GITGEMFPGCPETFQEQYQAGGSSR	gb AAF73007.1	legumin-like protein	-	-	-	-
D119	33.3/5.4	53.6/8.6	366	DQFQCAGVAIVR/GTCNNLFCGLDSR/ LISEAFNIDESLAR/HFYLAGNPEDEFR/ HFYLAGNPEDEFR/IQSEAGTIESWNPSR	gb AAF73007.1	legumin-like protein	-	-	-	-
D120	36.1/5.6	53.6/8.6	144	DQFQCAGVAIVR/GTCNNLFCGLDSR/ HFYLAGNPEDEFR	gb AAF73007.1	legumin-like protein	-	-	-	-
D126	23.6/7.7	51.7/7.7	122	TIHNLESR/SPLAGYTSVMR/AMHSPHWSINDQ R	sp Q9XHP0.1	11S globulin seed storage protein	-	-	-	-
D132	21.7/9.17	53.6/8.6	135	FEYITFK/ADVYIPEVGR/VSTINSHNLPILR	gb AAF73007.1	legumin-like protein	-	-	-	-
D133	24.8/8.0	55.9/7.68	45	LVHINIDPSR	gb EEF28918.1	glutelin type-A 3, putative	-	-	-	-
D134	24.7/8.33	51.7/7.7	90	TIHNLESR/SPLAGYTSVMR	sp Q9XHP0.1	11S globulin seed storage protein	-	-	-	-
D136	27.5/7.97	55.9/7.68	65	AFFLAGNPQR/DFELLFPPR	gb EEF28918.1	glutelin type-A 3, putative	-	-	-	-
D137	29.3/8.4	55.9/7.68	71	AFFLAGNPQR/DFELLFPPR	gb EEF28918.1	glutelin type-A 3, putative	-	-	-	-
D138	29.2/8.59	32.4/8.69	-	-	-	-	104	EAFGFSYSSEHPV LR/VGGTSYFFNDP ESLADAK	gij 18091793	curcin
D144	29.2/7.9	32.4/8.69	-	-	-	-	93,79%	TYLFTDTK	gij 18091793	curcin
D145	28.1/7.4	55.9/7.68	34	DFELLFPPR	gb EEF28918.1	glutelin type-A 3, putative	72/	-	gij 226517324	predicted protein
D149	24.9/8.7	51.7/7.7	413	SPLAGYTSVMR/AMHSPHWSINDQR/AMHSPH WSINDQR/NRDPQSMFLFTPTSR/EGDMFVIQF YAALGR/GDMHIQVDDSGNTVMDER	sp Q9XHP0.1	11S globulin seed storage protein	-	-	-	-
D150	24.6/8.9	51.7/7.7	105	AMHSPHWSINDQR/AMHSPHWSINDQR/NRDP QSMFLFTPTSR	sp Q9XHP0.1	11S globulin seed storage protein	-	-	-	-
D152	24.5/9.3	51.7/7.7	187	AMPLDVLMSYR/AMHSPHWSINDQR/AMPLD VLMNSYR/AMHSPHWSINDQR/NRDPQSMFLFT PTSR	sp Q9XHP0.1	11S globulin seed storage protein	-	-	-	-
D153	22.6/10.1	53.6/8.6	260	FEYITFK/ADVYIPEVGR/ALPLEVIANAFR/FLQ LSASHVVLV/VSTINSHNLPILR	gb AAF73007.1	legumin-like protein	60	ISTVNSHNLPIR	gij 158998780	11S legumin protein
D154	22.8/10.2	53.6/8.6	216	FEYITFK/ADVYIPEVGR/FLQLSASHVVLV/VST INSHNLPILR	gb AAF73007.1	legumin-like protein	60	ISTVNSHNLPIR	gij 158998780	11S legumin protein
D163	12.8/5.7	10.2/6.3	-	-	-	-	95%	LILYGLFK	gij 91992436	acyl-CoA-binding protein
D168	17.5/6.41	15.1/5.47	-	-	-	-	58	AVAVLNSSEGVK/ AVVWHADPDDLK	gij 13274150	putative cytosolic CuZn-superoxide dismutase
D169	17.2/6.35	15.1/5.64	-	-	-	-	52	AVVWHADPDDLK	gij 223548249	cu/zn superoxide dismutase, putative
D172	17.3/5.64	20/8.73	153	YFPAPFPSR	gb EEF29818.1	translation initiation inhibitor, putative	-	-	-	-
D174	19.1/5.37	21.9/6.23	47	/STYQVAALPMDAK/FISDSVEDQTEQLLK THGAPEDIIR	dbj BAF80585.1	Cu-Zn superoxide dismutase	47	THGAPEDIIR	gij 59797458	superoxide dismutase
D177	17.7/4.9	11.8/4.93	-	-	-	-	54%	QDGNVFFR	gij 6433950	SUMO protein
D182	30.5/5.62	27.4/5.89	53	VATPAQAQEVHVELR	gb EEF29228.1	triosephosphate isomerase, putative	53	VATPAQAQEVHFE LR	gij 223527042	triosephosphate isomerase, putative
D186	34.6/5.34	31.9/5.19	37	DPDGYTFELIQR	gij 79317690	lactoylglutathione lyase	-	-	-	-

TABELA 5. Lista das proteínas do endosperma de sementes em desenvolvimento do pinhão manso identificadas por MS e MS/MS.

Banco local de EST do pinhão manso						NCBI				
Spot n.	MM/pI (kDa)		Protein Score/Ion score	Seq. ID Peptídeos	ID (NCBI)	Descrição das proteínas	Protein Score/Ion score	Seq. ID Peptídeos	ID (NCBI)	Descrição das proteínas
	Exp.	Teor.								
D188	35.3/509	26.4/6.22	-	-	-	-	99,98%	TVLVDNEDFLK/ DPDGYTFELLR/ GTPPEPLQVMLR	gij79317690	lactoylglutathione lyase
D189	36/4.99	31.9/5.19	71	DPDGYTFELIQR	gij79317690	lactoylglutathione lyase	71	DPDGYTFELIQR	gij15221116	lactoylglutathione lyase
D190	36.7/4.91	31.9/5.19	58	DPDGYTFELIQR	gij79317690	lactoylglutathione lyase	77/	-	gb AAB39950	xyloglucan endotransglycosylase
D192	33/4.99	41/5.96	41	EEDYPTGTDR	gb EEF49466.1	cysteine protease, putative	46	EEDYPTGTDR	gij16076437	cysteine proteinase
D193	44.1/6.11	36/8.51	66	LFGVTTLDVVR/LKPELLASIEK	gb EEF38101.1	malate dehydrogenase, putative	35	LFGVTTLDVVR	gij126896	Malate dehydrogenase, mitochondrial
D196	43.8/6.25	36/8.51	229	FVVTLLDVVR/DDLFNINAGIVK/ GYVGEDQLGQALEGSDVVIIPAGVPR	gb EEF38101.1	malate dehydrogenase, putative	120	LFGVTTLDVVR/DD LFNINAGIVK	gij223536453	malate dehydrogenase, putative
D198	44.4/5.88	36/8.51	53	GYVGEDQLGQALEGSDVVIIPAGVPR	gb EEF38101.1	malate dehydrogenase, putative	35	LFGVTTLDVVR	gij126896	Malate dehydrogenase, mitochondrial
D206	83.1/5.04	83.7/8.14	-	-	-	-	67,80%	LGFFDGDPK	gij74355968	alpha-L-arabinofuranosidase [<i>Raphanus sativus</i>]
D208	72.6/5.5	81.4/6.0	-	-	-	-	77%	LGFFDGDPSK	gij85813772	xylan 1,4-beta-xylosidase
D218	66.0/6.38	51.5/6.75	40	AHSASITDFGGVGDGVK	gb EEF50572.1	polygalacturonase, putative	-	-	-	-
D219	66.6/6.56	51.5/6.75	45	AHSASITDFGGVGDGVK	gb EEF50572.1	polygalacturonase, putative	-	-	-	-
D224	12.5/7.21	14.6/9.94	32	EGIPPDQQR	gb EEF32073.1	ubiquitin, putative	-	-	-	-
D227	13.3/8.47	12.4/9.0	67	IVVVAQTCGLAFSPGK	gb EEF48944.1	lipid binding protein, putative	-	-	-	-
D239	29.7/7.17	32.4/8.69	-	-	-	-	99.1%	TYLFTDTK/ VGGTSYFFNDPES LADAK	gij18091793	curcumin precursor
D240	29.7/7.36	32.4/8.69	-	-	-	-	39	EAFGFSYSSHEIPV LR	gij18091793/	curcumin precursor
D244	101.0/5.6	91.9/5.4	-	-	-	-	36	DDNPIGATLIGR	gij1698844	phospholipase D
D260	84.4/5.23	91.9/5.4	-	-	-	-	44	HDIGWGAYLR	gij5669782	Hv1LRR2
D292	45.0/6.21	36/8.51	115	GYVGEDQLGQALEGSDVVIIPAGVPR / VAPEVIAEYTVR	gb EEF38101.1	malate dehydrogenase, putative	97,20%	DDLFNLAGLVK	gij126896	Malate dehydrogenase, mitochondrial precursor
D294	43.9/5.84	36/8.51	51	DDLFNINAGIVK	gb EEF38101.1	malate dehydrogenase, putative	-	-	-	-
D296	44.6/5.6	36/8.51	64	GYVGEDQLGQALEGSDVVIIPAGVPR	gb EEF38101.1	malate dehydrogenase, putative	64,00%	GFDKDGLEALRG CDLVLPAAGVPR	gij2497858	Malate dehydrogenase, mitochondrial
D297	43.9/5.41	36/8.51	43	GYVGEDQLGQALEGSDVVIIPAGVPR	gb EEF38101.1	malate dehydrogenase, putative	-	-	-	-
D301	35.1/5.32	31.5/7.63	52	DPDGYTFELIQR	gb EEF43857.1	lactoylglutathione lyase, putative	-	-	-	-
D304	36.8/5.0	31.5/7.63	124	LLHVYR/DPDGYTFELIQR	gb EEF43857.1	lactoylglutathione lyase, putative	99,99%	TVLVDNEDFLK/DP DGYTFELLR/LLH VYR	gij79317690	lactoylglutathione lyase
D305	34.7/5.0	31.5/7.63	47	DPDGYTFELIQR	gb EEF43857.1	lactoylglutathione lyase, putative	99,98%	TVLVDNEDFLK	gij140068658	Glyoxalase/bleomycin resistance protein/dioxygenase
D306	35.9/5.0	31.5/7.63	99	LLHVYR (31) / DPDGYTFELIQR	gb EEF43857.1	lactoylglutathione lyase, putative	-	-	-	-
D307	35.7/4.91	31.5/7.63	99	LLHVYR (31) / DPDGYTFELIQR	gb EEF43857.1	lactoylglutathione lyase, putative	-	-	-	-
D308	35.9/4.84	31.5/7.63	51	DPDGYTFELIQR	gb EEF43857.1	lactoylglutathione lyase, putative	-	-	-	-
D310	30.4/5.61	27.4/5.89	38	VATPAQAQEVHFE LR	gb EEF29228.1	triosephosphate isomerase, putative	83,00%	VATPAQAQEVHFE LR	gij76573375	triosphosphate isomerase-like protein
D312	28.4/5.4	27.4/5.13	30	LPPILDATAEQPPLFDGTR	gb EEF37170.1	glutathione-s-transferase omega	-	-	-	-
D314	30.2/5.25	27.4/5.89	37	VATPAQAQEVHFE LR	gb EEF29228.1	triosephosphate isomerase	-	-	-	-
D316	27/5.27	25.8/5.26	-	-	-	-	77,30%	ALLPDLYR	gij21554208	putative carboxymethylenebutenolidas
D317	27.0/5.27	71.06.96	-	-	-	-	50	ELAFGVESR	gij137578	Vicilin
D322	28.1/5.96	38.6/6.57	29	VAPEVIAEYTVR (29)	gb EEF33801.1	fructose-bisphosphate aldolase, putative	-	-	-	-
D328	31.8/4.47	16.1/6.43	87	GDYAIIGR/IIGATNPAESAPGTR	sp P47920.1	nucleoside diphosphate kinase	99,00%	GDYAIIGR/IIGAT NPAESAPGTR	gij19570344	nucleoside diphosphate kinase 1
D341	16.7/6.0	16.1/6.43	70	GDYAIIGR/IIGATNPAESAPGTR	sp P47920.1	nucleoside diphosphate kinase	99,62%	GDYAIIGR	gij12230332	Nucleoside diphosphate kinase (NDK)
D247	10.2/5.43	51.7/7.73	38	THNLESR	gb EEE93847.1	11S globulin precursor	-	-	-	-

TABELA 5. Lista das proteínas do endosperma de sementes em desenvolvimento do pinhão manso identificadas por MS e MS/MS.

Banco local de EST do pinhão manso						NCBI				
Spot n.	MM/pl (kDa)		Protein Score/Ion score	Seq. ID Peptideos	ID (NCBI)	Descrição das proteínas	Protein Score/Ion score	Seq. ID Peptideos	ID (NCBI)	Descrição das proteínas
	Exp.	Teor.								
D320	30.6/5.62	34.8/8.37	-	-	-	-	48	KAEQYLADSGIPY TIR	gij18404496	binding / catalytic/ coenzyme binding
D333	19.1/5.19	21.9/6.23	43	THGAPDEIR	dbj BAF80587.1	Cu-Zn superoxide dismutase	99,34%	THGAPDELRL	gij59797458	superoxide dismutase
D334	18.8/5.42	21.9/6.23	56	THGAPDEIR	dbj BAF80587.1	Cu-Zn superoxide dismutase	-	-	-	-
D335	16.7/5.0	20.0/8.73	49	YFPAPFPSR	gb EEF29818.1	translation initiation inhibitor, putative	-	-	-	-
D337	16.7/5.26	20/8.73	92	TENAPAALGPYSQAIK/FISDSVEDQTEQLLK	gb EEF29818.1	translation initiation inhibitor, putative	99,34%	ANNLVFLSGVLGL LPETGK	gij110739384	translational inhibitor protein like
D338	16.7/6.68	20/8.73	79	YFPAPFPSR /TENAPAALGPYSQAIK	gb EEF29818.1	translation initiation inhibitor, putative	-	-	-	-
D340	16.7/5.6	20/8.73	41	GDYAIIDGR	sp P47920.1	nucleoside diphosphate kinase	-	-	-	-
D343	16.5/6.18	16.1/6.43	-	-	-	-	39	EHGAPEDGNR	gij12230567	Superoxide dismutase [Cu-Zn]
D363	11.5/5.53	31.5/7.63	98	ALPLEVIANAFR/HFYLAGNPEDEFR/ IQSEAGTIESWNPSR	gb EEF43857.1	-	-	-	-	-
D370	12.0/5.68	20.0/9.77	-	-	-	-	51	ADLYNPR	gij81988	legumin B
D371	12.2/5.78	11.1/6.05	71	TVPNVFIGGK/KLFNQLGAAFK	gb AAC39481.1	glutaredoxin	95,55%	TVPNVFLGGK	gij1732424	glutaredoxin
D373	12.9/5.99	11.1/6.05	143	TVPNVFIGGK/LFNQLGAAFK/ KLFNQLGAAFK	gb AAC39481.1	glutaredoxin	-	-	-	-
D374	11.6/6.0	60.9/5.19	-	-	-	-	50	IPAGTTFFLVNPN DNDLR	gij70672850	seed storage protein A
D383	13.1/6.63	11.1/6.05	129	LFNQLGAAFK/KLFNQLGAAFK	gb AAC39481.1	glutaredoxin	-	-	-	-
D397	12.9/7.23	92.9/5.86	-	-	-	-	44	EFSYNYLLEK	gij15235504	ent-copalyl diphosphate synthase
D398	12.7/7.16	92.9/5.86	-	-	-	-	46	EFSYNYLLEK	gij15235504	ent-copalyl diphosphate synthase
D399	14.7/7.29	53.6/8.65	122	FLQLSASHVLR/VSTINSHNLPILR	gb AAF73007.1	legumin-like protein	48	ISTVNSHNLPIRL	gij158998780	11S legumin protein
D401	16.6/8.58	45.5/7.86	31	GGHVTNNSHNPILR	gb EEF28917.1	legumin B, putative	-	-	-	-
D410	15.1/6.8	53.6/8.65	95	ADVVIPEVGR/VSTINSHNLPILR	gb AAF73007.1	legumin-like protein	45	ISTVNSHNLPIRL	gij158998780	11S legumin protein
D412	31.0/9.36	9.8/5.31	-	-	-	-	78	-	gij31432146	hypothetical protein LOC_Os10g28620
D413	30.6/9.48	32.4/8.69	-	-	-	-	70	QQTLSFTGSYADF LSR/EAFGFSYSSH EIPVLR	gij18091793	curcin
D416	30.4/8.75	32.4/8.69	-	-	-	-	81	QQTLSFTGSYADF LSR/EAFGFSYSSH EIPVLR	gij18091793	curcin
D418	47.7/6.93	38.6/6.57	48	VAPEVIAEYTVR	gb EEF33801.1	fructose-bisphosphate aldolase, putative	48	VAPEVIAEYTVR	gij218157	cytoplasmic aldolase
D422	22.0/6.78	52.4/6.44	31	LVYVIQGR	emb CAA64762.1	legumin-like protein	-	-	-	-
D424	29.8/6.71	32.4/8.69	-	-	-	-	181	QQTLSFTGSYADF LSR/EAFGFSYSSH EIPVLR	gij18091793	curcin
D425	29.6/6.90	32.4/8.69	-	-	-	-	281	QQTLSFTGSYADF LSR/EAFGFSYSSH EIPVLR/VGGTSYF FNDPESLADAK	gij18091793	curcin
D426	29.5/7.1	32.4/8.69	-	-	-	-	319	QQTLSFTGSYADF LSR/EAFGFSYSSH EIPVLR/VGGTSYF FNDPESLADAK	gij18091793	curcin precursor
D427	88.4/6.34	101.5/6.32	-	-	-	-	37	DHANYSPR	gij4163997	alpha-xylosidase precursor
D455	62.5/6.32	53.6/8.65	29	LISEAFNIDSLAR	gb AAF73007.1	legumin-like protein	-	-	-	-
D459	52.2/6.67	49.8/8.82	43	HFDFVTSR	gb EEE70850.1	Aspartic proteinase nepenthesin-2, putative	-	-	-	-
D460	51.9/6.71	49.8/8.82	38	HFDFVTSR	gb EEE70850.1	Aspartic proteinase nepenthesin-2, putative	-	-	-	-
D474	46.3/5.71	39.3/6.24	-	-	-	-	37	VPEGFDELYNR	gij2218152	type IIIa membrane protein cp-wap13
D484	39.3/5.85	55.9/7.68	54	DFELLFPPR	gb EEF28918.1	glutelin type-A 3, putative	-	-	-	-
D486	37.5/5.59	53.6/8.6	43	HFYLAGNPEDEFR	gb AAF73007.1	legumin-like protein	-	-	-	-
D487	38.0/5.44	53.6/8.6	62	HFYLAGNPEDEFR	gb AAF73007.1	legumin-like protein	-	-	-	-

TABELA 5. Lista das proteínas do endosperma de sementes em desenvolvimento do pinhão manso identificadas por MS e MS/MS.

Banco local de EST do pinhão manso						NCBI				
Spot n.	MM/pl (kDa)		Protein Score/Ion score	Seq. ID Peptídeos	ID (NCBI)	Descrição das proteínas	Protein Score/Ion score	Seq. ID Peptídeos	ID (NCBI)	Descrição das proteínas
	Exp.	Teor.								
D490	39.9/6.35	55.9/7.68	38	AFFLAGNPQR	gb EEF28918.1	glutelin type-A 3, putative	81%	LVYLLQGR	gij7739791	glutelin
D491	38.2/6.37	55.9/7.68	33	DFELLFPPR	gb EEF28918.1	glutelin type-A 3, putative	-	-	-	-
D492	35.3/5.41	53.6/8.6	95	LISEAFNIDESLAR/HFYLAGNPEDEFR	gb AAF73007.1	legumin-like protein	-	-	-	-
D493	34.3/5.42	53.6/8.6	101	LISEAFNIDESLAR/HFYLAGNPEDEFR	gb AAF73007.1	legumin-like protein	-	-	-	-
D494	35.1/5.55	53.6/8.6	168	LDRIEALPDTR/LISEAFNIDESLAR/HFYLAGNPEDEFR	gb AAF73007.1	legumin-like protein	-	-	-	-
D498	34.5/5.92	53.6/8.6	71	KLQSENDYR/HFYLAGNPEDEFR	gb AAF73007.1	legumin-like protein	-	-	-	-
D501	28.8/6.14	32.4/8.69	-	-	-	-	93	TYLFTDTK/EAFGF SYSSHEIPVLR	gij18091793	curcín precursor
D507	35.3/6.71	59.76.1	88	GAMSGPYNSR/NNYQLFEVGSR	gb ABO36677.1	vicilin	-	-	-	-
D511	31.9/5.71	53.6/8.6	70	LISEAFNIDESLAR/HFYLAGNPEDEFR	gb AAF73007.1	legumin-like protein	-	-	-	-
D515	26.4/5.0	53.6/8.6	110	HFYLAGNPEDEFR/IQSEAGTIESWNPSR/IQSEAGTIESWNPSR	gb AAF73007.1	legumin-like protein	-	-	-	-
D516	27.1/5.16	53.6/8.6	170	LDRIEALPDTR/HFYLAGNPEDEFR/IQSEAGTIESWNPSR	gb AAF73007.1	legumin-like protein	-	-	-	-
D517	24.5/5.1	53.6/8.6	42	HFYLAGNPEDEFR	gb AAF73007.1	legumin-like protein	-	-	-	-
D524	28.4/5.34	-	54	IGLIYENELAER	gb EEF36024.1	nutrient reservoir, putative	-	-	-	-
D525	27.1/5.33	53.6/8.6	36	HFYLAGNPEDEFR	gb AAF73007.1	legumin-like protein	-	-	-	-
D526	25.4/5.27	53.6/8.6	82	HFYLAGNPEDEFR	gb AAF73007.1	legumin-like protein	-	-	-	-
D527	24.0/5.27	53.6/8.6	177	LDRIEALPDTR/HFYLAGNPEDEFR/IQSEAGTIESWNPSR	gb AAF73007.1	legumin-like protein	-	-	-	-
D528	25.0/5.46	53.6/8.6	217	IEALEPDTR/HFYLAGNPEDEFR/IQSEAGTIESWNPSR	gb AAF73007.1	legumin-like protein	-	-	-	-
D530	25.5/5.65	52.3/6.4	151	IGLIYENELAER/IPAGSAFYLINPAEGQR	gb EEF36024.1	nutrient reservoir, putative	-	-	-	-
D531	25.9/5.91	52.3/6.4	57	IGLIYENELAER	gb EEF36024.1	nutrient reservoir, putative	-	-	-	-
D532	24.9/5.82	55.9/7.68	48	LVHNNDPSR	gb EEF28918.1	glutelin type-A 3, putative	-	-	-	-
D537	28.8/6.83	32.4/8.69	-	-	-	-	380	CVNGVFLKPVQLQR/QQTLSTGYSYADFLSR/EAFGFSYS SHEIPVLR/VGGTS YFFNDPESLADAK	gij18091793	curcín precursor
D538	25.2/6.66	55.9/7.68	36	LVHNNDPSR	gb EEF28918.1	glutelin type-A 3, putative	-	-	-	-
D539	23.9/6.63	55.9/7.68	48	AGSEGLEWWSFK	gb EEF28918.1	glutelin type-A 3, putative	-	-	-	-
D541	20.5/5.29	53.6/8.6	62	DQFQCAGVAIVR/HFYLAGNPEDEFR	gb AAF73007.1	legumin-like protein	-	-	-	-
D542	18.7/5.43	55.9/7.68	32	LIYVLQGR	gb EEF28918.1	glutelin type-A 3, putative	-	-	-	-
D548	24.4/6.23	55.9/7.68	42	LVHNNDPSR	gb EEF28918.1	glutelin type-A 3, putative	-	-	-	-
D549	20.8/6.61	52.4/6.44	52	LVYVIQGR	gb EEE93847.1	legumin-like protein	-	-	-	-
D550	20.2/6.62	52.4/6.44	40	LVYVIQGR	gb EEE93847.1	legumin-like protein	-	-	-	-
D553	20.4/6.89	52.4/6.44	74	LVYVIQGR/HNQLDQYLR	emb CAA64762.1	legumin-like protein	-	-	-	-
D556	14.8/4.97	74.1/10.4	-	-	-	-	75/	-	gij119358823	transposase mariner transposase undefined product (IC)
D558	17.2/6.01	20/8.73	101	GDYAIIGR/IIGATNPAESAPGTR	gb AAA19005.1	nucleoside diphosphate kinase	67	IIGATNPAESAPGTR	gij1346675	Nucleoside diphosphate kinase B
D560	16.2/6.95	52.4/6.44	37	HNQLDQYLR	gb EEE93847.1	legumin-like protein	-	-	-	-
D564	12.6/4.67	22.7/7.9	-	-	-	-	72	-	gij98647394	ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit
D579	12.6/6.22	73.2/5.17	-	-	-	-	84%	LLSPEEVSAMVLA R	gb EEF43398.	heat shock protein, putative
D594	16.5/6.67	55.9/7.68	55	LIYVLQGR	gb EEF28918.1	glutelin type-A 3, putative	-	-	-	-
D596	17.2/6.56	20/8.73	78	GDYAIIGR/IIGATNPAESAPGTR	gb AAA19005.1	nucleoside diphosphate kinase	41	IIGATNPAESAPGTR	gij1346675	Nucleoside diphosphate kinase B
D598	17.0/6.81	14.7/7.97	58	FHGFHGVKPEER	gij223536652	dihydroneopterin aldolase, putative	58	FHGFHGVKPEER	gij223536652	dihydroneopterin aldolase, putative

TABELA 5. Lista das proteínas do endosperma de sementes em desenvolvimento do pinhão manso identificadas por MS e MS/MS.

Spot n.	Banco local de EST do pinhão manso				NCBI					
	MM/pl (kDa)		Protein Score/Ion score	Seq. ID Peptídeos	ID (NCBI)	Descrição das proteínas	Protein Score/Ion score	Seq. ID Peptídeos	ID (NCBI)	Descrição das proteínas
	Exp.	Teor.								
D621	72.1/7.84	55.9/7.68	31	AFFLAGNPQR	gb EEF28918.1	glutelin type-A 3, putative	-	-	-	-
D626	66.0/6.51	45.5/7.86	33	ADVIPEVGR	gb EEF38213.1	legumin B, putative	-	-	-	-
D633	76.6/6.57	59.7/6.1	41	NNYQLFEVGSR	gb ABO36677.1	Vicilin	-	-	-	-
D660	67.5/5.58	59.76.1	53	EAYPGDVFYLHSR	gb ACN72677.1	atpA	-	-	-	-
D661	64.8/5.41	55.4/5.28	34	EAYPGDVFYLHSR	gb ACN72677.1	atpA	-	-	-	-
D662	64.8/5.3	55.4/5.28	-	-	-	-	53	EAYPGDVFYLHSR	gij114522	ATP synthase subunit alpha
D689	40.8/6.81	51.7/7.7	62	ETFQNVFR/HNQLDQYLR	gb AAD42944.1	11S globulin precursor	-	-	-	-
D691	43.0/6.41	55.9/7.68	33	AFFLAGNPQR	gb EEF28918.1	glutelin type-A 3, putative	79	-	gij159480438	katanin p60 catalytic subunit
D690	42.2/6.67	55.9/7.68	79	AFFLAGNPQR/DFELLFPPR	gb EEF28918.1	glutelin type-A 3, putative	-	-	-	-
D692	42.5/6.15	55.9/7.68	37	AFFLAGNPQR	gb EEF28918.1	glutelin type-A 3, putative	-	-	-	-
D693	42.7/5.93	55.9/7.68	35	DFELLFPPR	gb EEF28918.1	glutelin type-A 3, putative	-	-	-	-
D696	39.3/6.03	59.7/6.1	32	NNYQLFEVGSR	gb ABO36677.1	vicilin	-	-	-	-
D695	37.7/5.97	45.5/7.86	35	HFYLAGNPEDEFR	gb EEF38213.1	legumin B, putative	-	-	-	-
D697	39.5/6.52	59.7/6.1	113	NNYQLFEVGSR/ GTAVVVPAGHPAAFVASR	gb ABO36677.1	vicilin	-	-	-	-
D698	36.5/5.77	45.5/7.86	372	KLQSENDYR/DQFCAGVAIVR/ LDRIALEPDTR/GTCNLFQGLDSR/ HFYLAGNPEDEFR/IQSEAGTIESWNPSR	gb EEF38213.1	legumin B, putative	-	-	-	-
D699	33.7/5.77	45.5/7.86	49	HFYLAGNPEDEFR	gb EEF38213.1	legumin B, putative	-	-	-	-
D708	39.0/5.35	45.5/7.86	110	HFYLAGNPEDEFR/IQSEAGTIESWNPSR	gb EEF38213.1	legumin B, putative	-	-	-	-
D709	36.7/5.31	45.5/7.86	136	DQFCAGVAIVR/HFYLAGNPEDEFR/ IQSEAGTIESWNPSR	gb EEF38213.1	legumin B, putative	-	-	-	-
D710	39.3/5.21	45.5/7.86	82	LISEAFNIDESLAR/HFYLAGNPEDEFR	gb EEF38213.1	legumin B, putative	-	-	-	-
D711	37.7/5.2	45.5/7.86	46	HFYLAGNPEDEFR	gb EEF38213.1	legumin B, putative	-	-	-	-
D701	37.3/5.58	45.5/7.86	316	KLQSENDYR/LDRIALEPDTR/LISEAFNIDESL AR/HFYLAGNPEDEFR/IQSEAGTIESWNPSR	gb EEF38213.1	legumin B, putative	-	-	-	-
D702	33.9/5.64	45.5/7.86	257	KLQSENDYR/DQFCAGVAIVR/HFYLAGNPE DEFR/IQSEAGTIESWNPSR	gb EEF38213.1	legumin B, putative	-	-	-	-
D703	32.2/5.62	45.5/7.86	103	DQFCAGVAIVR/HFYLAGNPEDEFR	gb EEF38213.1	legumin B, putative	-	-	-	-
D704	39.7/5.5	45.5/7.86	72	HFYLAGNPEDEFR	gb EEF38213.1	legumin B, putative	-	-	-	-
D705	37.7/5.45	45.5/7.86	138	HFYLAGNPEDEFR/IQSEAGTIESWNPSR	gb EEF38213.1	legumin B, putative	-	-	-	-
D706	34.9/5.49	45.5/7.86	214	LDRIALEPDTR/HFYLAGNPEDEFR/IQSEAGT IESWNPSR	gb EEF38213.1	legumin B, putative	-	-	-	-
D712	39.3/5.33	45.5/7.86	36	HFYLAGNPEDEFR	gb EEF38213.1	legumin B, putative	-	-	-	-
D714	28.7/6.91	55.9/7.68	70	AFFLAGNPQR/DFELLFPPR	gb EEF28918.1	glutelin type-A 3, putative	-	-	-	-
D715	30.5/6.86	32.4/8.69	-	-	-	-	/ 136	QQTLSFTGSYADF LSR/EAFGFSYSSH EIPVLR	gij18091793	curcumin precursor
D718	26.9/6.71	55.9/7.68	333	LVHNINDPSR/AGSEGLEWVSFK/RAGSEGLE WVSFK/NALMSPHWVDASISNYFFTR/NALMS PHWVDASISNYFFTR	gb EEF28918.1	glutelin type-A 3, putative	-	-	-	-
D719	24.9/6.8	51.7/7.7	109	SPLAGYTSVMR/AMPLDVLMSNYR	gb EEE93847.1	11S globulin	-	-	-	-
D720	23.1/6.79	52.4/6.44	60	APTEAQCHLQR	gb EEE93847.1	legumin-like protein	-	-	-	-
D722	21.2/6.98	45.5/7.86	81	ADVIPEVGR/VSTINSHNLPILR	gb EEF38213.1	legumin B, putative	-	-	-	-
D723	25.0/6.65	52.4/6.44	117	LVYVIQGR/ITTPSPSHR/APTEAQCHLQR	emb CAA4762.1	legumin-like protein	-	-	-	-
D729	17.9/6.68	55.9/7.68	36	LIYVLQGR	gb EEF28918.1	glutelin type-A 3, putative	-	-	-	-
D730	17.1/6.67	55.9/7.68	38	LIYVLQGR	gb EEF28918.1	glutelin type-A 3 precursor, putative	-	-	-	-
D371	12.1/5.77	45.5/7.86	132	ADVIPEVGR/FQLSASHVVLVLR/VSTINSHNLP LR	gb EEF38213.1	legumin B, putative	52	ISTVNSHNLPILR	gij158998780	11S legumin protein
D372	12.8/5.82	45.5/7.86	205	ADVIPEVGR/FQLSASHVVLVLR/VSTINSHNLP LR	gb EEF38213.1	legumin B, putative	61	ISTVNSHNLPILR	gij158998780	11S legumin protein

TABELA 5. Lista das proteínas do endosperma de sementes em desenvolvimento do pinhão manso identificadas por MS e MS/MS.

Banco local de EST do pinhão manso						NCBI				
Spot n.	MM/pI (kDa)		Protein Score/Ion score	Seq. ID Peptideos	ID (NCBI)	Descrição das proteínas	Protein Score/Ion score	Seq. ID Peptideos	ID (NCBI)	Descrição das proteínas
	Exp.	Teor.								
D734	17.9/6.54	45.5/7.86	80	FEYITFK/ADVYIPEVGR	gb EEF38213.1	legumin B, putative	70	FHGFHGVKPEER	gij223536652	dihydroneopterin aldolase, putative
D735	17.7/6.82	45.5/7.86	-	-	-	-	137	FHGFHGVKPEER/ LSDTISYTEIYR	gij223536652	dihydroneopterin aldolase, putative
D736	18.6/6.19	45.5/7.86	106	FEYITFK/ADVYIPEVGR/FLQLSASHVVLR	gb EEF38213.1	legumin B, putative	-	-	-	-
D737	17.8/6.2	45.5/7.86	168	FEYITFK/ADVYIPEVGR/FLQLSASHVVLR/VST INSHNLPILR	gb EEF38213.1	legumin B, putative	-	-	-	-
D378	12.6/6.22	45.5/7.86	210	ADVYIPEVGR/FLQLSASHVVLR/VSTINSHNLP LR	gb EEF38213.1	legumin B, putative	-	-	-	-
D749	12.7/5.58	21.2/7.75	-	-	-	-	73	-	gij10637914	phytochrome
D750	12.7/5.51	21.2/7.75	-	-	-	-	78	-	gij10637914	phytochrome
D738	16.6/6.25	45.5/7.86	208	ADVYIPEVGR/FLQLSASHVVLR/VSTINSHNLP LR	gb EEF38213.1	legumin B putative	56	ISTVNSHNLPILR	gij158998780	11S legumin protein
D760	14.3/5.51	45.5/7.86	30	LISEAFNIDESLAR	gb EEF38213.1	legumin B, putative	-	-	-	-
D778	18.6/5.98	45.5/7.86	97	LISEAFNIDESLAR/HFYLAGNPEDEFR	gb EEF38213.1	legumin B, putative	-	-	-	-
D779	18.3/5.98	45.5/7.86	44	HFYLAGNPEDEFR	gb EEF38213.1	legumin B, putative	-	-	-	-
D782	16.6/5.86	45.5/7.86	38	ADVYIPEVGR	gb EEF38213.1	legumin B, putative	-	-	-	-
D783	16.7/5.66	51.7/7.7	115	KLPILSFMDMSAER/GDMHIQIVDDSGNTVMDE R	gb AAD42944.1	11S globulin	-	-	-	-
D784	26.4/5.33	45.5/7.86	54	HFYLAGNPEDEFR	gb EEF38213.1	legumin B, putative	-	-	-	-
D785	25.5/5.34	45.5/7.86	74	HFYLAGNPEDEFR/IQSEAGTIESWNPSR	gb EEF38213.1	legumin B, putative	-	-	-	-

5. Conclusões e Perspectivas.

As sementes do pinhão manso, tal como a semente das Euphorbiaceae em geral, são ricas em lipídeos e proteínas armazenadas no endosperma e que são mobilizadas durante a germinação para propiciar o crescimento e desenvolvimento da plântula (GRAHAM, 2008). No endosperma das sementes, há a predominância de uma classe de proteínas, chamadas genericamente de proteínas de reserva que se distribuem entre diferentes classes quando o fator solubilidade é levado em consideração: albuminas, globulinas, prolaminas, etc. Geralmente, cada tipo particular de semente possui uma categoria de proteína de reserva que tem uma predominância sobre as demais classes. Nas sementes de leguminosas, por exemplo, predominam as globulinas, enquanto que nos cereais predominam as glutelinas (SHEWRY, 1995). Assim, quando da extração de proteínas do endosperma utilizando solventes capazes de extrair todos os tipos de proteínas, há predominância, no extrato protéico, das proteínas de reserva, o que eclipsa a maioria das outras classes de proteínas. Por esta razão, a identificação de proteínas de reserva a partir de géis bidimensionais preparados com tal tipo de fração protéica é tarefa simples, mas a identificação de proteínas que não as de reserva, é tarefa rigorosamente impossível. No presente trabalho nós mostramos que a obtenção de frações protéicas baseadas em critério de solubilidade, adequa-se bem a uma estratégia proteômica baseada em eletroforese bidimensional. Os géis de referência preparados a partir de cada uma das frações disponibilizam centenas de spots para serem processados e analisados no espectrômetro de massa. Esta estratégia poderá ser somada a uma outra na qual cada um dos tipos de frações disponíveis é submetido a cromatografias multidimensionais, em sistemas acoplados ao espectrômetro de massa.

Neste trabalho, a percentagem de sucesso na identificação dos spots foi relativamente baixa, mas isto pode ser melhorado não apenas por um maior rigor na etapa de processamento das amostras especialmente na digestão com tripsina, como também no uso de estratégias alternativas de identificação de proteínas, através, por exemplo, do seqüenciamento de novo. Outro fator importante para a baixa taxa de identificação foi o reduzido número de informação sobre sequências gênicas do pinhão manso disponíveis nos bancos de dados. Muito embora este fator tenha sido parcialmente minorado pelo acesso que tivemos a um banco de ESTs de sementes em desenvolvimento e de sementes em germinação, o número de sequências disponíveis é pequeno, limitando assim as possibilidades de se obter o proteoma completo do endosperma. Recentemente, 13.000 ESTs de pinhão manso foram

depositadas no banco do NCBI o que irá possibilitar a identificação de uma quantidade e uma variedade maior de proteínas a partir dos dados coletados neste estudo.

Os dados aqui apresentados, foram também importantes para mostrar que as combinações de estudos proteômicos e transcriptômicos, oferecem uma oportunidade interessante para que se possam estabelecer as vias biossintéticas de ácidos graxos e dos ésteres de forbol, os principais componentes tóxicos das sementes de pinhão manso. Como estes compostos são sintetizados nos plastídeos, o isolamento destas organelas nas sementes em desenvolvimento e o estabelecimento de seu proteoma, será condição *sine qua non* para o delineamento da rota biossintética destes compostos.

Outro passo que deve ser dado é o refinamento dessas e de outras frações de grupos distintos de proteínas utilizando técnicas de fracionamento mais sofisticadas e menos laboriosas como cromatografias multidimensionais acoplados ao espectrômetro de massa. Assim as identificações poderão ser mais rápidas e práticas, e uma quantidade muito maior de proteínas poderão ser identificadas, estabelecendo proteomas mais abrangentes o que permitirá uma compreensão maior da biologia das sementes do pinhão manso.

6. REFERÊNCIAS

- ALCHÉ, J. D., JIMENEZ-LOPEZ, J. C., WANG, W., CASTRO-LOPEZ, A. J., RODRIGUEZ-GARCIA, M. I. **(2006)**. Biochemical Characterization and Cellular Localization of 11S Type Storage Proteins in Olive (*Olea europaea* L.) Seeds. *J. Agric. Food Chem.*, 54, 5562–5570.
- AUGUSTUS, G. D. P. S., JAYABALANA M., SEILER, G. J. **(2002)**. Evaluation and Bioinduction of Energy Components of Biomass & Bioenergy. 23, 161-164. *Jatropha Curcas*.
- BHALERAO, R. R. **(2003)**. Gene Finding in Populus - The Bioinformatics of a EST Program. PhD Thesis. RIT, 50p.
- BRANDLE, J.E., TELMER, P.G. **(2007)**. Steviol Glycoside Biosynthesis. *Phytochemistry* 68, 1855–1863.
- BUCHANAN, B. B., GRUISSEM, W., JONES, R. L. **(2000)**. Biochemistry & Molecular Biology of Plants. American Society of Plant Physiologists. Pág. 1-1367.
- CARPENTIER, S. C., WITTERS, E., LAUKENS, K., DECKERS, P., SWENNEN, R., PANIS, B. **(2005)**. Preparation of Protein Extracts from Recalcitrant Plant Tissues: An Evaluation of Different Methods for Two-Dimensional Gel Electrophoresis Analysis. *Proteomics*, 5, 2497–2507.
- CAMPOS, F. A. P., NOGUEIRA, F. C. S., CARDOSO, K. C., COSTA, G. G. L., DEL BEM, L. E. V., DOMONT, G. B., DA SILVA, M. J., SOARES, A. A., JUCÁ, T. L. **(2010)**. Proteome Analysis of Castor Bean Seeds. *Pure and Applied Chemistry*. XX-000000.
- CANTÚ, M. D., CARRILHO, E., WULLF, N. A., PALMA, M. S. **(2008)**. Seqüenciamento de Peptídeos Usando Espectrometria de Massas: *Quim. Nova*, Vol. 31, No. 3, 669-675.
- CHEN, G. Q., TURNER, C., HE, X., NGUYEN, T., MCKEON, T. A., CHINGCUANCO, D. L. **(2007)**. Expression Profiles of Genes Involved in Fatty Acid and Triacylglycerol Synthesis in Castor Bean (*Ricinus communis* L.) *Lipids*. 42, 263-274.
- CHOUDHARY, J. S., BLACKSTOCK, W. P., CREASY, D. M., COTTRELL, J. S. **(2001)**. Matching Peptide Mass Spectra to EST and Genomic DNA Databases. *TRENDS in Biotechnology* Vol.19 No.10, October.
- DE ANGELIS, M., MINERVINI, F., CAPUTO, L., CASSONE, A., CODA, R., CALASSO, M. P., DIVELLA, F., DIVELLA, F., GOBBETTI M. **(2009)**. Proteomic Analysis by Two-Dimensional Gel Electrophoresis and Starch Characterization of *Triticum turgidum* L. var. durum Cultivars for Pasta Making. *J. Agric. Food Chem.*, 56, 8619–8628.
- DOMON, B, AEBERSOLD, R. **(2006)**. Mass Spectrometry and Protein Analysis. *Science*, 14 april vol. 312.
- FENN, J. B.; MANN, M.; MENG, C. K.; WONG, S. F.; WHITEHOUSE, C. M. **(1989)** Electrospray Ionization for Mass Spectrometry of Large Biomolecules. *Science*, v. 246, n. 4926, p. 64-71.

- FIELDS, S. (2001). Proteomics in Genome Land. *Science*, vol. 291, N5507, pp. 1221-1224.
- FINNIE, C., MAEDA, K., ØSTERGAARD, O., BAK-JENSEN, K. S., LARSEN, J., SVENSSON, B. (2004). Aspects of the barley seed proteome during development and germination. *Biochemical Society Transactions*, Vol. 32, part 3.
- GANDHI, V. M., CHERIAN, K. M., MULKY, M. J. (1995). Toxicological Studies on Ratanjot Oil. *Fd Chem. Toxic.* Vol. 33, No. 1, pp. 39~2.
- GOEL, G., HARINDER, P. S., MAKKAR, G. F., KLAUS, B. (2007). Phorbol Esters: Structure, Biological Activity, and Toxicity in Animals. *International journal of toxicology*. 26, 279–288.
- GÖRG, A., OBERMAIER, C., BOGUTH, G., HARDER, A., SCHEIBE, B., WILDGRUBER, R., WEISS, W. (2000). The Current State of Two-Electrophoresis with Immobilized pH Gradients. *Electrophoresis*, v. 21, p. 1037-1053.
- GÖRG, A., WEISS, W., DUNN, M. J. (2004). Current Two-Dimensional Electrophoresis Technology for Proteomics. *Proteomics* 2004, 4, 3665–3685.
- GRAHAM, I. A. (2008). Seed Storage Oil Mobilization. *Annu. Rev. Plant biol.* 59:115-142.
- GSTAIGER, M., AEBERSOLD, R. (2009). Applying Mass Spectrometry-Based Proteomics to Genetics, Genomics and Network Biology. *Nature Reviews* volume 10 September, 617.
- GUBITZ, G. M., MITTELBAACH, M., TRABI, M. (1999). Exploitation of the Tropical Oil Seed Plant *Jatropha curcas* L. *Bioresource Technology*. 67, 73-82.
- HEAZLEWOOD, J. L., MILLAR, A. H. (2006). Plant Proteomics: Challenges and Resources, 20-50.
- HELLMAN, U.; WERNSTEDT, C.; GONEZ, J.; HELDIN, C. H. (1995). Improvement of an “In-Gel” digestion procedure for the micropreparation of internal protein fragments for amino acid sequencing. *Analytical Biochemistry*, 224(1), 451-455.
- HE, X., CHEN, G. Q., LIN, J. T., MCKEON, T. A. (2006). Diacylglycerol Acyltransferase Activity and Triacylglycerol Synthesis in Germinating Castor Seed Cotyledons. *Lipids*. 41: 281-285.
- HIRANO, H., ISLAM, N., KAWASKI, H. (2004). Technical Aspects of Functional Proteomics in Plants. *Phytochemistry*, v. 65, p. 1487-1498.
- HSIEH, K., HUANG, A. H. C. (2004). Endoplasmic Reticulum, Oleosins, and Oils in Seeds and Tapetum Cells. *Plant Physiology*, Vol. 136, pp. 3427–3434.
- HUANG, M. X., HOU, P., WEI, Q., XU, Y., CHEN, F. (2008). A Ribosome-Inactivating Protein (Curcin 2) Induced from *Jatropha curcas* can Reduce Viral and Fungal Infection in Transgenic Tobacco. *Plant Growth Regul.* 54:115–123.

- JING, L., FANG, Y., YING, X., WENXING, H., MENG, X., SYED, M. N., FANG, C. **(2005)**. Toxic Impact of Ingested Jatrophol-I on Selected Enzymatic Activities and the Ultrastructure of Midgut Cells in Silkworm, Bombyx Mori L. *Jen* 129 (2).
- JUAN, L., YU, C., YING, X., FANG, Y., LIN, T., FANG, C. **(2003a)**. Cloning and Expression of a Curcin, a Ribosome-Inactivating Protein from the Seeds of *Jatropha curcas*. *Acta Botanica Sinica*. 45, p. 858-863.
- JUAN, L., FANG, Y., LIN, T., FANG, C. **(2003b)**. Antitumor Effects of Curcin from Seeds of *Jatropha Curcas*. *Acta Pharmacol Sin*. 24, 241 -246.
- JUNQUEIRA, M. R. **(2005)**. “Aplicação de Técnicas Proteômicas na Caracterização do Veneno da Serpente *Bothrops insularis* (Viperidae)”. Dissertação. Instituto Oswaldo Cruz. 63p.: il.
- KARAS, M., HILLENKAMP, F. **(1988)**. Laser Desorption Ionization of Proteins with Molecular Masses Exceeding 10000 daltons. *Analytical chemistry*, v. 60, n. 20, p. 2299-2301.
- KAUSHIK, N., KUMAR, K., KUMAR, S., KAUSHIK, N., ROY, S. **(2007)**. Genetic Variability and Divergence Studies in Seed Traits and Oil Content of *Jatropha (Jatropha curcas L.)* Accessions. *Biomass & Bioenergy*. 31, 497-502.
- KLOSE, J. **(1975)** Protein Mapping by Combined Isoelectric Focusing and Electrophoresis of Mouse Tissues – Novel Approach to Testing for Induced Point Mutations in Mammals. *Humangenetik*, v. 26, p. 211 – 243.
- KWON, K. H., KIM, M., KIM, J. Y., KIM, K. W., KIM, S. II., PARK, Y. M., YOO, J. S. **(2003)**. Efficiency Improvement of Peptide Identification for an Organism without Complete Genome Sequence, Using Expressed Sequence Tag Database and Tandem Mass Spectral Data. *Proteomics*, 3, 2305–2309.
- KRISHNAN, H. B., OEHRLE, N. W., NATARAJAN, S. S. **(2009)**. A Rapid and Simple Procedure for the Depletion of Abundant Storage Proteins from Legume Seeds to Advance Proteome Analysis: A Case Study Using *Glycine max*. *Proteomics*, 9, 3174–3188.
- KUMAR, A., SHARMA, S. **(2008)**. An Evaluation of Multipurpose Oil Seed Crop for Industrial Uses (*Jatropha curcas L.*): A Review. *Industrial Crops and Products*. 28, 1-10.
- LARSEN, M. R., ROEPSTORFF, P. **(2000)**. Mass Spectrometric Identification of Proteins and Characterization of their Post-Translational Modifications in Proteome Analysis. *Fresenius J Anal Chem*; 366(6-7): 677-90.
- LEON, I. R., NEVES-FERREIRA, A. G. C., VALENTE, R. H., MOTA, E. M., LENZI, H. L., PERALES, J. **(2007)**. Improved Protein Identification Efficiency by Mass Spectrometry Using N-Terminal Chemical Derivatization of Peptides from *Angiostrongylus costaricensis*, a Nematode with Unknown Genome. *J. Mass Spectrom.*42: 781–792.
- LIU, B., YAO, L., WANG, W., GAO, J., CHEN, F., WANG, S., XU, Y., TANG, L., JIA, Y. **(2010)**. Molecular Cloning and Characterization of Phospholipase D from *Jatropha curcas*. *Mol Biol Rep*, 37:939–946.

- LIU, H., LIU, Y. J., YANG, M. F., SHEN, H. S. (2009). A Comparative Analysis of Embryo and Endosperm Proteome from Seeds of *Jatropha curcas*. *Journal of Integrative Plant Biology*.
- LIU, Q., SINGH, S. P., GREEN, A. G. (2002). High-Stearic and High-Oleic Cotton seed Oils Produced by Hairpin RNA-Mediated Post-Transcriptional Gene Silencing. *Plant Physiology*. 129, p. 1–12.
- LUOA, M. J., LIUB, W. X., YANGA, X. Y., XUA, Y., YANA, F., HUANGB, P., CHENA, F. (2007). Cloning, Expression, and Antitumor Activity. *Russian Journal of Plant Physiology*. 54, No. 2, p. 202–206.
- MAGNI, C., SCARAFONI, A., HERND, A., SESSA, F., PRINSI, B., ESPEN, L., DURANTI, M. (2007). Combined 2D Electrophoretic Approaches for the Study of White Lupin Mature Seed Storage Proteome. *Phytochemistry* 68, 997–1007.
- MAKKAR, H. P. S., ADERIBIGDE, A. O., BECKER, K., (1998). Comparative Evaluation of Non-Toxic and Toxic Varieties of *Jatropha curcas* for Chemical, Composition, Digestibility, Protein Degradability and Toxic Factors. *Food Chemistry*. 62, No 2, p. 207-215.
- MAKKAR, H. P. S., BECKER, K., SPORER, F., WINK, M. (1997). Studies on Nutritive Potential and Toxic Constituents of Different Provenances of *Jatropha curcas*. *J. Agric. Food Chem.* 45, 3152–3157.
- MANN, M., HENDRICKSON, R.C. A., PANDEY, A. (2001). Analysis of Proteins and Proteomes by Mass Spectrometry. *Annual Review of Biochemistry*, 70, 437-473.
- MANN, M., WILM, M. (1995). Electrospray Mass Spectrometry for Protein Characterization. *Trends in Biochemical Sciences*, Amsterdam, v. 6, p. 219-24.
- MANN, M., HØJRUP, P., ROEPSTORFF, P.(1993). Use of Mass Spectrometric Molecular Weight Information to Identify Proteins in Sequence Databases. *Biol Mass Spectrom.* Jun;22(6):338-45.
- MARTINEZ-HERRERA, J., SIDDHURAJU, P., FRANCIS, G., VILA-ORTIZ, G., BECKER, K. (2006). Chemical Composition, Toxic/Antimetabolic Constituents, and Effects of Different Treatments on their Levels, in four Provenances of *Jatropha curcas* L. from Mexico. *Food Chemistry*. 96, 80-89.
- MASSENGO-TIASSA, R. P., CRONANA, J. E. (2009). Review: Diversity in Enoyl-Acyl Carrier Protein Reductases. *Cell.Mol.Life Sci.* 66, 1507 – 1517.
- NAMBISAN, P. (2007). Biotechnological Intervention in *Jatropha* for Biodiesel Production. *Current Science*. 93, no. 10, 25.
- MÜNTZ, K. (1998). Deposition of Storage Proteins. *Plant Molecular Biology* 38: 77–99.
- NATH, L. K., DUTTA, S. K., (1991). Extraction and Purification of Curcain, a Protease from the Latex of *Jatropha curcas* L. *J.Pharm. Pharmacol.* 43, 111–114.
- NOGUEIRA, F. C. S. (2007). Análise Proteômica da Deposição de Proteínas em Sementes em Desenvolvimento e Suspensões Celulares Embriogênicas de Feijão-de-Corda [*Vigna unguiculata* L. (Walp)]. *Dissertação. UFC.* 115p.

- O'FARRELL, P. H. (1975). High-Resolution 2-Dimensional Electrophoresis of Proteins. *Journal of Biological Chemistry*, v. 250, p. 4007-4021.
- OPENSHAW, K. (2000). A Review of *Jatropha curcas*: an Oil Plant of Unfulfilled Promise. *Biomass and Bioenergy*, v. 19, p. 1-15.
- OSONIYI, O., ONAJOBI, F. (2003). Coagulant and Anticoagulant Activities in *Jatropha curcas* Latex. *Journal of Ethnopharmacology* 89, 101–105.
- ØSTERGAARD, O., FINNIE, C., LAUGESEN, S., ROEPSTORFF, P., SVENSSON, B. (2004). Proteome analysis of barley seeds: Identification of major proteins from two-dimensional gels (pl 4–7). *Proteomics*, 4, 2437–2447.
- PARK, O. K. (2003) Proteomic Studies in Plants. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, Vol. 37, No. 1, pp. 133-138. Review.
- RAM, G. S., PARTHIBAN, T. K., KUMAR, R. S., THIRUVENGADAM, V., PARAMATHMA, M. (2008). Genetic Diversity Among *Jatropha* Species as Revealed by RAPD markers. *Genet. Resour. Crop Evol.*, 55, 803-809.
- RAO, G. R., KORWAR, G. R., SHANKER, A. K., RAMAKRISHNA, Y. S. (2008). Genetic Associations, Variability and Diversity in Seed Characters, Growth, Reproductive Phenology and Yield in *Jatropha curcas* (L.) Accessions. *Trees*. 22, 697-709.
- RICHMAN, A. S., GIJZEN, M., STARRATT, A. N., YANG, Z., BRANDLE, J. E. (1999). Diterpene Synthesis in *Stevia rebaudiana*: Recruitment and up-regulation of Key Enzymes from the Gibberellins Biosynthetic Pathway. *The Plant Journal*, 19(4), 411±421.
- ROBERT, S., ZOUHAR, J., CARTER, C., RAIKHEL, N. (2007). Isolation of Intact Vacuoles from Arabidopsis Rosette Leaf-Derived Protoplasts. *Nature protocols* vol.2 no.2.
- ROJAS-BARROS, P., HARO, A., FERNANDEZ-MARTINEZ, J. M. (2004). Isolation of a Natural Mutant in Castor with High Oleic/Low Ricinoleic Acid Content in the Oil. *Crop Science*, v. 44, p. 76-80.
- ROLLAND, N., FERRO, M., EPHRITIKHINE, G., MARMAGNE, A., RAMUS, C., BRUGIERE, S., SALVI, D., SEIGNEURIN-BERNY, D., BOURGUIGNON, J., BARBIER-BRYGOO, H., JOYARD, J., GARIN, J. (2006). A Versatile Method for Deciphering Plant Membrane Proteomes. *Journal of Experimental Botany*, Vol. 57, No. 7, pp. 1579–1589.
- ROSSIGNOL, M., PELTIER, J. B., MOCK, H. P., MATROS, A., MALDONADO, M., JORRIN, J. V. (2006). Plant Proteome Analysis: A 2004-2006 update. *Proteomics*, 6: p. 5529-5548.
- SALIMON, J., ABDULLAH., R., (2008). Physicochemical Properties of Malaysian *Jatropha curcas* Seed Oil. *Sains Malaysiana*. 37, 379-382.
- SHEWRY, P. R., NAPIER, J. A., TATHAM, A. S. (1995). Seed Storage Proteins: Structures and Biosynthesis. *The Plant Cell*, Vol. 7, 945-956.

SHEVCHENKO, A., SUNYAEV, S., LOBODA, A., SHEVCHENKO, A., BORK, P., ENS, W., STANDING, K. G. (2001). Charting the Proteomes of Organisms with Unsequenced Genomes by MALDI-Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry and BLAST Homology Searching. *Anal. Chem.*, 73, 1917-1926.

SIDDHURAJU, P., MAKKAR, H. P. S., BECKER, K. (2002). The Effect of Ionising Radiation on Antinutritional Factors and the Nutritional Value of Plant Materials with Reference to Human and Animal food. *Food Chemistry*, 78, 187-205.

SIRISOMBOONA, P., KITCHAIYA, P., PHOLPHO, T., MAHUTTANYAVANITCH, W. (2007). Physical and Mechanical Properties of *Jatropha curcas* L. Fruits, Nuts and Kernels *Byosystems Engineering*. 97, 201-207.

STAUBMANN, R., NCUBE, I., GUBITZ, G. M., STEINER, W., READ, J. S. (1999). Esterase and Lipase Activity in *Jatropha curcas* L. Seeds. *Journal of Biotechnology*, 75, 117-126.

STEEN, H., MANN, M. (2004). The ABC's (and XYZ's) of Peptide Sequencing. *Nat Rev Mol Cell Biol*;5 (9):699-711.

SUNIL, N., VARAPRASAD, K. S., SIVARAJ, N., KUMAR, T. S., ABRAHAM, B., PRASAD, R. B. N. (2008). Assessing *Jatropha curcas* L. germplasm *in-situ* — A case study. *Biomass & Bioenergy* 32, 198- 202.

CHEN, C. H. (2008). Review of a Current Role of Mass Spectrometry for Proteome. *Analytica Chimica Acta* 624, 16-36.

THELEN, J. J., OHLROGGE, J. B. (2002). Metabolic Engineering of Fatty Acid Biosynthesis in Plants. *Metabolic Engineering*. 4: 12-21.

TONG, L., SHU-MING, P., WU-YUAN, D., DAN-WEI, M., YING, X., MENG, X., FANG, C. (2006). Characterization of a New Stearoyl-Acyl Carrier Protein Desaturase Gene from *Jatropha curcas*. *Biotechnology Letters*, 28: 657-662.

VAN DEN BERG, A. J. J., HORSTEN, S. F. A. J., KETTENES-VAN DEN BOSCH, J. J., KROES, B. H., BEUKELMAN, C. J., LEEFLANG, B. R., LABADIE, R. P. (1995). Curcacycline A- a Novel Cyclic Octapeptide Isolated from the Latex of *Jatropha curcas* L. *FEBS Letters* 358, 215-218.

WIJK, KLAAS J. VAN., (2001). Challenges and Prospects of Plant Proteomics. *Plant Physiology*, Vol. 126, pp. 501-508.

WILKINS, M., WILKINS, K.L., APPEL, R.D., HOCHSTRASSE, D.F. (1997) In: *Proteome Research: New frontiers in functional genomics*. Springer Verlag.

XI, J., WANG, X., LI, S., ZHOU, X., YUE, L., FAN, J., HAO, D. Polyethylene Glycol Fractionation Improved Detection of Low-Abundant Proteins by Two-Dimensional Electrophoresis Analysis of Plant Proteome. (2006). *Phytochemistry* 67, 2341-2348.

YANG, M. F., LIU, Y. J., LIU, Y., CHEN, H., CHEN, F., SHEN, S. H., (2009). Proteomic Analysis of Oil Mobilization in Seed Germination and Postgermination Development of *Jatropha curcas*. *Journal of Proteome Research* XXXX, xxx, 000.

YURCHENKO, O. P., NYKIFORUK, C. L., MOLONEY, M. M. STAHL, U., BANAS, A., STYMNE, S., WESELAKE, R. J. **(2009)**. A 10-kDa acyl-CoA-binding protein (ACBP) from *Brassica napus* enhances acyl exchange between acyl-CoA and phosphatidylcholine. *Plant Biotechnology Journal*, 7, pp. 602–610.

ZHANG, Y., WANG, Y., JIANG, L., XU, Y., WANG, Y., LU, D., CHEN, F. **(2007)**. Aquaporin JcPIP2 is Involved in Drought Responses in *Jatropha curcas*. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 39(10): 787–794

7. ANEXO

7.1 Solução Descorante

Ácido acético: Metanol: Água (1: 3: 6)

7.2 Solução de equilíbrio

Tris/ HCl pH 8,8 50 mM
Glicerol 30 %
Uréia 6 M
SDS 2 %
Azul de bromofenol traços

7.3 Solução corante Phast gel Blue R-350.

Corante estoque

1 tablete em 80 ml de água (agito por 10 min.) + 120 ml de metanol (agito até completa dissolução, filtração)

Corante 0,02%

100 ml de corante estoque + 900 ml de descorante

7.4 Tampão da amostra.

Tris/HCl 1,0 M pH 6,8
Glicerol
SDS 10 %
Azul de bromofenol
Água (dest.) p/ 50 ml.

7.5 Solução de glicerol

Metanol 50 %
Glicerol 5 %

7.6 Tampão de extração

Piridina 50 mM
Tiuréia 10 mM
SDS 1%
pH 5,0 com HCl

7.7 Solução de reidratação

Uréia 7 M
Tiuréia 2 M
DTT* 65 mM
CHAPS* 1 %
IPG Buffer* 0,5 %
Azul de bromofenol* traços

7.8 Tampão de corrida

Tris 0,25 M
Glicina 1,92 M
SDS 1%
Água (dest.) p/ 1000 ml.