



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA/FITOTECNIA

MOAB TORRES DE ANDRADE

PROTEÔMICA QUANTITATIVA E HISTOLOGIA DO PERICARPO DE AÇAÍ
(*Euterpe oleracea* Mart.) EM DESENVOLVIMENTO

FORTALEZA

2018

MOAB TORRES DE ANDRADE

PROTEÔMICA QUANTITATIVA E HISTOLOGIA DO PERICARPO DE AÇAÍ (*Euterpe oleracea* Mart.) EM DESENVOLVIMENTO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Agronomia/Fitotecnia. Área de concentração: Fisiologia, Bioquímica e Biotecnologia Vegetal.

Orientador: Prof. Francisco A. P. Campos.

Coorientador: Prof. Fábio C. S. Nogueira.

FORTALEZA

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- A568p Andrade, Moab Torres de.
Proteômica quantitativa e histologia do pericarpo de açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) em desenvolvimento /
Moab Torres de Andrade. – 2018.
80 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Programa de
Pós-Graduação em Agronomia (Fitotecnia), Fortaleza, 2018.
Orientação: Prof. Dr. Francisco de Assis de Paiva Campos.
Coorientação: Prof. Dr. Fábio César Sousa Nogueira.
1. *Euterpe oleracea* Mart.. 2. Pericarpo. 3. Proteoma. 4. Desenvolvimento. 5. Histologia. I. Título.
CDD 630
-

MOAB TORRES DE ANDRADE

PROTEÔMICA QUANTITATIVA E HISTOLOGIA DO PERICARPO DE AÇAÍ (*Euterpe
oleracea* Mart.) EM DESENVOLVIMENTO

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Agronomia/Fitotecnia da Universidade Federal
do Ceará, como requisito parcial à obtenção do
título de Mestre em Agronomia/Fitotecnia. Área
de concentração: Fisiologia, Bioquímica e
Biotecnologia Vegetal.

Aprovada em: ___/___/_____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Francisco de Assis de Paiva Campos (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dra. Emanoella Lima Soares
Plant Genetics Department, University of Liège, Bélgica

Prof. Dr. Fábio César Sousa Nogueira
Departamento de Bioquímica, Instituto de Química,
Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ)

A minha amada e saudosa mãe, Maria José
Torres de Andrade (*in memoriam*), dedico.

AGRADECIMENTOS

Louvo o **SENHOR Deus**, Rocha minha e Redentor meu, por seu **Cristo** bendito, meu Amigo, meu Senhor e Salvador, que nunca me faltou e sempre esteve comigo, por sua graça maravilhosa que não entendo, nem mereço, apenas me rendo, creio e agradeço (*Soli Deo Gloria*).

Ao **Prof. Francisco A. P. Campos**, pela oportunidade, orientação, cobrança, confiança e exemplo de comprometimento com o trabalho científico.

Ao **Prof. Fábio C. S. Nogueira**, por oportunizar excelente experiência, pelo aprendizado e por todas contribuições essenciais para concretização deste trabalho (inclusive nos livrar da PM).

À **Dra. Emanoella Lima Soares** (“Manuzetti”), pelo auxílio fundamental no planejamento deste trabalho, pela ajuda na coleta, histologia e pela amizade que guardo com carinho e admiração.

Ao **Prof. Gilberto B. Domont**, pela acolhida, conselhos e entusiasmo científico contagiante.

À **Profa. Arlete Aparecida Soares**, pelo estágio, formação e por disponibilizar a infraestrutura do Laboratório de Anatomia e Morfologia Vegetal, do qual também sou grato a toda equipe que tão bem me recebeu.

Ao **Prof. Ítalo A. C. Coutinho**, pela disponibilidade, presteza e ajuda na interpretação das imagens histológicas.

À **Prof. Rosilene O. Mesquita**, pela disponibilidade e contribuições na qualificação e ao **Dr. Fabiano M. Teixeira**, que especialmente contribuiu na escrita, pela amizade e companheirismo durante o mestrado (também por Maria Isabel).

À equipe Unidade Proteômica: **Ana Beatriz, Clarissa, Erika** (especialmente por toda ajuda no uso dos equipamentos), **Isis, Joab, Larissa, Liege, Lidiane, Prof. Magno, Mariana, Michelle, Natália, Rafael, Renata, Vinicius, Yara** (“imunda”), pela acolhida, ajuda, companheirismo (o velho café na Dilcinha), pelo imenso prazer da convivência.

Aos técnicos do LabProt (LADETEC), **Joseph e Gabriel** por todo auxílio no uso do espectrômetro, disponibilidade e pelo descontraído racha no fim de tarde.

Aos amigos do Laboratório de Biologia Molecular de Plantas (BIOPLANT): **Evanildo Jéssica, Isabeli, Magda, Raquel** (obrigado especial por toda ajuda no Rio), **Roberto** (o grande amigo “Betin”), **Taís e Vitor**, pela convivência, ajuda na condução do trabalho, conversas (aquele açai com Betin) e pela amizade que sempre levarei em meu coração.

À **minha família**, esteio em minha vida, que mesmo longe me apoia e me sustenta com suas incessantes preces.

À minha amada noiva **Carolina A. Brito**, pela compreensão, carinho, amor e pelo apoio nos momentos mais difíceis dessa caminhada.

Aos meus irmãos de batalha **Daniel Coelho e Domingos Neto**, companheiros que estiveram comigo nessa jornada, dividindo lutas e também bons momentos, de descontração, risos, pizza e amizade que retém minha eterna gratidão e admiração.

Aos amigos de moradia na República do Adailto, na vila residencial do campus da UFRJ

À **Universidade Federal do Ceará** e ao **Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia**, pela oportunidade de realização do curso de mestrado.

Ao **CNPq** pela concessão da bolsa de mestrado.

À **Universidade Federal do Rio de Janeiro**, em especial **Instituto de Química** pela disponibilidade da utilização de sua infraestrutura.

Ao **Laboratório de Apoio ao Desenvolvimento Tecnológico (LADETEC-UFRJ)** pelo apoio e aparelhamento nas análises de espectrometria e massas.

E a **todos** que de alguma forma contribuíram para que esse trabalho pudesse acontecer, de todo coração:

Muitíssimo Obrigado!

"Grandes são as obras do *SENHOR*,
dignas de estudo para quem as ama." (Salmos
111.2 - TEB)

RESUMO

O pericarpo de açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) tem despertado grande interesse econômico e científico, especialmente devido presença de compostos bioativos. Entretanto, informações genéticas da espécie, bem como sobre a dinâmica metabólica e histológica durante desenvolvimento do pericarpo são escassas. Assim, o objetivo desse estudo foi a análise histológica e proteômica quantitativa do pericarpo em desenvolvimento de *E. oleracea*. Para isso, frutos foram coletados e agrupados em 12 estádios de desenvolvimento (E0: botão floral – E11: fruto maduro), os quais foram submetidos a análise histológica e histoquímica. Essa análise revelou marcantes mudanças estruturais no pericarpo, como a intensa divisão celular responsável pela formação das camadas de esclerênquima e de parênquima fundamental no mesocarpo, resultando na estratificação do pericarpo maduro em quatro camadas. Foi observado no pericarpo a presença de ráfides, deposição nos estádios avançados de lipídeos e acúmulo subepidérmico de antocianinas. A partir desses resultados, foram selecionados quatro estádios (E3, E6, E9 e E11) para análise proteômica, que contou com extração de proteínas pelo método Tris/fenol, digestão com tripsina (abordagem *shotgun*), marcação isobárica dos peptídeos com o reagente iTRAQ® 4-plex, pre-fracionamento dos peptídeos marcados em HPLC equipado com coluna HILIC e análise em espectrômetro de massas de alta resolução e desempenho (Q-Exactive Plus). A análise dos dados resultou em 4286 proteínas identificadas, das quais 476 apresentaram abundância diferencial entre os estádios ($p < 0,05$), envolvidas majoritariamente, no metabolismo de carboidratos e metabolismo secundário. Observou-se que os processos de glicólise e respiração celular são estimulados no E3 e E11, correspondente com os momentos de elevada divisão celular e o amadurecimento do pericarpo, respectivamente. A maior abundância, no início e final do desenvolvimento, de proteínas da via de fenilpropanóides se relaciona com a lignificação, expansão celular e acúmulo de ácidos fenólicos no pericarpo. O processo de acúmulo de antocianinas no pericarpo responde ao aumento da expressão das proteínas leucoantocianidina dioxigenase, antocianidina O-3-glicosiltransferase e UDP-glicosiltransferase. O presente trabalho apresenta as principais mudanças histológicas no desenvolvimento do pericarpo e preenche as lacunas de dados proteômicos para *Euterpe oleracea*, de maneira a contribuir para futuras melhorias biotecnológicas da cultura.

Palavras-chave: *Euterpe oleracea* Mart. Pericarpo. Proteoma. Desenvolvimento. Histologia.

ABSTRACT

The pericarp of açai (*Euterpe oleracea* Mart.) has aroused great economic and scientific interest, especially by the presence of bioactive compounds. However, information regarding the genetics of the species, as well as metabolic and histological dynamics during pericarp development are scarce. Thus, the objective of this study was the histological and quantitative proteomic analysis of the developing pericarp of *E. oleracea*. To this purpose, fruits were collected and grouped in 12 stages of development (E0: floral bud - E11: ripe fruit), which were submitted to histological and histochemical analysis. Such analysis demonstrated noticeable structural changes in the pericarp, such as intense cell division responsible by formation of the layers of sclerenchyma and fundamental parenchyma in the mesocarp, resulting in the stratification of the mature pericarp into four layers. In the pericarp were observed the presence of raphides, deposition in the advanced stages of lipids and subepidermal accumulation of anthocyanins. Considering these data, four stages (E3, E6, E9 and E11) were selected for proteomic analysis, with protein extraction by Tris/Phenol method, trypsin digestion (shotgun approach), isobaric labeling of peptides with the reagent iTRAQ® 4-plex, pre-fractionation of labeled peptides in HPLC equipped with HILIC column and high-performance mass spectrometer (Q-Exactive Plus) analysis. Data analysis resulted in 4286 identified proteins, of which 476 presented differential abundance between the stages ($p < 0.05$), mostly involved in carbohydrate metabolism and secondary metabolism. It was observed that the processes of glycolysis and cellular respiration are stimulated in E3 and E11, corresponding to the moments of high cell division and ripening of the pericarp, respectively. The higher abundance at the beginning and end of the development of phenylpropanoid pathway proteins is related to the lignification, cellular expansion and accumulation of phenolic acids in the pericarp. The process of anthocyanin accumulation in the pericarp responds to the increase in abundance of the leucoanthocyanidin dioxygenase, anthocyanidin O-3-glycosyltransferase and UDP-glycosyltransferase proteins. The present work presents the main histological changes in the development of the pericarp and fills the gaps of proteomic data for *E. oleracea*, in order to contribute to future biotechnological improvements in this crop.

Keywords: *Euterpe oleracea* Mart. Pericarp. Proteome. Development. Histology.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Detalhe do porte da planta e dos frutos de <i>Euterpe precatoria</i> (A) e <i>Euterpe oleracea</i> (B)	16
Figura 2 – Série histórica da quantidade de citações em cada ano (A) e número de publicações por ano (B) com o termo <i>E. oleracea</i>	19
Figura 3 – Antocianinas e flavonoides encontrados em <i>E. oleracea</i>	22
Figura 4 – Visão geral das vias de biossíntese de flavonoides e antocianinas.....	24
Figura 5 – Compostos fenólicos detectados no açáí	26
Figura 6 – Frutos de <i>Euterpe oleracea</i> em diferentes estádios de desenvolvimento	31
Figura 7 – Estádios de desenvolvimento selecionados para o estudo proteômico (E3, E6, E9 e E11)	32
Figura 8 – Fluxograma operacional com as principais etapas para análise do proteoma de <i>E. oleracea</i>	33
Figura 9 – Cromatograma do Fracionamento HILIC das amostras de <i>Euterpe oleracea</i>	35
Figura 10 – Cromatogramas das sete frações em nano cromatografia líquida acoplada a espectrômetro de massas	37
Figura 11 – Reprodutibilidade do padrão cromatográfico na análise de espectrometria de massas entre as replicatas biológicas	38
Figura 12 – Exemplo de espectrograma de MS2 apresentando padrão de fragmentação	39
Figura 13 – Espectro de MS2 mostrando a detecção dos íons repórteres (m/z: 114, 115, 116 e 117) utilizados na análise quantitativa dos peptídeos	40
Figura 14 – Morfologia do fruto e semente de <i>E. oleracea</i> no estágio maduro (E11)	42
Figura 15 – Visão global do desenvolvimento do pericarpo de <i>Euterpe oleracea</i> em secção transversal de todos os estádios de maturação	43
Figura 16 – Principais mudanças estruturais durante o desenvolvimento do pericarpo de <i>Euterpe oleracea</i>	44
Figura 17 – Detalhe do epicarpo e parênquima fundamental externo (PFE) do pericarpo de <i>Euterpe oleracea</i>	46
Figura 18 – Detalhe do parênquima fundamental interno (PFI) e principais compostos armazenados no estágio final de desenvolvimento (E11) do pericarpo de <i>Euterpe oleracea</i>	47

Figura 19 – SDS-PAGE do perfil de proteínas dos estádios de desenvolvimento (E3, E6 E9 e E11) do pericarpo de <i>E. oleracea</i>	49
Figura 20 – Resultado do total de proteínas identificadas na análise proteômica do pericarpo de <i>E. oleracea</i>	51
Figura 21 – Número de proteínas relacionadas nas subclasses de metabolismo	52
Figura 22 – Divisão do número de proteínas Up e Down reguladas entre os contrastes dos estádios de desenvolvimento do pericarpo de <i>E. oleracea</i>	53
Figura 23 – Distribuição nas classes funcionais das proteínas Down e Up reguladas nos contrastes entre os estádios de desenvolvimento	54
Figura 24 – Variação da abundância relativa nos diferentes estádios de desenvolvimento do pericarpo de <i>E. oleracea</i> (E3, E6, E9 e E11) para as proteínas fenilalanina amônia-liase (PAL), 4-cumarato:CoA ligase 2 e 4 (4CL2, 4CL4) e cinamil-CoA redutase (CCR)	61
Figura 25 – Variação da abundância relativa nos diferentes estádios de desenvolvimento (E3, E6, E9 e E11) para as proteínas flavonoide 3'5'-hidroxilase (F3'5'H), leucoantocianidina dioxigenase (LDOX), antocianidina O-3glicosiltransferase (3GT) e UDP-glicosiltransferase 89B1 (UGT)	64
Figura 26 – Esquema da regulação de biossíntese de antocianinas pelo aumento da expressão das enzimas leucoantocianidina dioxigenase (LDOX), antocianidina O-3- glicosiltransferase (3GT) e UDP-glicosiltransferase 89B1 (UGT), responsáveis pelas etapas finais da via biosintética	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Descrição morfológica dos estádios de desenvolvimento da semente de E. oleracea, selecionadas para estudo histológico	30
Tabela 2 – Proteínas diferencialmente expressas durante o desenvolvimento do pericarpo de E. oleracea envolvidas com o metabolismo de carboidratos	57
Tabela 3 – Relação das proteínas up reguladas no E11, metabólitos secundários eventualmente presentes no pericarpo de Euterpe oleracea	67
Tabela 4 – Proteínas diferencialmente expressas durante o desenvolvimento do pericarpo de E. oleracea envolvidas no metabolismo secundário	68

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	OBEJTIVOS	15
2.1	Objetivo geral	15
2.2	Objetivos específicos	15
3	REVISÃO DE LITERATURA	15
3.1	Descrição botânica do açaizeiro	15
3.2	Importância econômica	17
3.3	Principais componentes nutricionais do fruto de <i>E. oleracea</i>	19
3.4	Compostos bioativos presentes no pericarpo de <i>E. oleracea</i>	20
3.5	Desenvolvimento do fruto e proteômica	27
4	MATERIAIS E MÉTODOS	30
4.1	Coleta e histologia de frutos de <i>E. oleracea</i>	30
4.2	Coleta e preparo da amostra para análise proteômica	31
4.3	Extração de proteínas e digestão trípica	33
4.4	Marcação com iTRAQ e fracionamento <i>off-line</i> HILIC	34
4.5	Análise de espectrometria de massas – LC-MS/MS	36
4.6	Análise de dados	38
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
5.1	Histologia do desenvolvimento do pericarpo de <i>E. oleracea</i>	41
5.2	Análise proteômica do pericarpo de <i>E. oleracea</i>	48
5.2.1	Identificação de proteínas	49
5.2.2	Análise quantitativa do proteoma	53
6	CONCLUSÃO	70
	REFERÊNCIAS	71

1 INTRODUÇÃO

O açazeiro (*Euterpe oleracea* Mart.) é uma monocotiledônea pertencente à família Arecaceae, que tem despertado grande interesse econômico e científico, em função do excelente potencial alimentar da polpa do seu fruto, a qual é fonte de compostos bioativos (COSTA et al., 2013). Esses compostos apresentam atividade antioxidante e anti-inflamatória, além de evidências de redução do risco de carcinogênese, tais atividades se dão principalmente por parte de ácidos fenólicos, flavonoides e antocianinas, que estão presentes em abundância no fruto (YAMAGUCHI et al., 2015).

Consequentemente, o açaí tem sido bastante explorado no setor agroindustrial na produção de polpa para o consumo *in natura*, como também sua potencialidade nutracêutica têm sido amplamente estudadas na indústria farmacêutica (HEINRICH; DHANJI; CASSELMAN, 2011). Além disso, sua utilização como matéria prima alternativa para produção de cosméticos já é bem consolidado (SANTANA; LIMA; MOURÃO, 2014).

O estado do Pará é o maior produtor de açaí do Brasil, o qual em 2014 exportou cerca de 4,9 mil toneladas de polpa de açaí, o que fez circular 54 milhões de reais na região, correspondendo a 84% da pauta de exportação de sucos do estado (CONAB, 2016). Isso evidencia a importância dessa cultura na economia familiar local, haja vista que boa parte da produção é procedente do extrativismo do açaí nativo.

Entretanto, seu potencial agrícola não é totalmente explorado, em parte decorrente da heterogeneidade genotípica da população de plantas de açaí (OLIVEIRA et al., 2007). Isso contribui para obtenção de frutos muitas vezes com baixo rendimento para processamento, de qualidade inferior para consumo e desuniformes.

Em termos de melhoramento genético, esforços têm sido realizados pela Embrapa Amazônia Oriental, com o objetivo de reunir e organizar um banco de germoplasma e selecionar genótipos com características agronômicas promissoras (FARIAS-NETO; RESENDE; OLIVEIRA, 2012). Todavia, para abordagens mais eficientes e específicas de melhoramento, é imprescindível o conhecimento genético aprofundado da espécie, da expressão da informação genética, bem como seu controle sobre o metabolismo e consequentes mudanças no fruto.

Atualmente, o genoma de duas espécies da família Arecaceae foram sequenciados, que são o dendezeiro (*Elaeis guineenses*) e a tamareira (*Phoenix dactylifera*) (AL-DOUS et al., 2011; SINGH et al., 2013). Entretanto, para *E. oleracea* os principais repositórios internacionais de dados de genes e proteínas, tais como NCBI e UniProt, disponibilizam apenas 17 sequências

gênicas e 11 proteínas registradas. Portanto, estudos empreendendo a análise e identificação do proteoma do açaí se tornam relevantes em função da pouca quantidade de dados genéticos e pelo apelo biotecnológico, dada a crescente importância econômica.

Nesse sentido, a identificação e avaliação do proteoma do açaí, que é todo o conjunto de proteínas expresso por um genoma de um tecido ou organismo em determinada condição (WILKINS et al., 1995), é fundamental para o direcionamento de estratégias de melhoramento genético. Ademais, a variabilidade quantitativa do proteoma durante o desenvolvimento, que é dinamicamente alterado por meio de diversos mecanismos de controle de expressão gênica, também é importante para o conhecimento específico das mudanças no metabolismo do fruto, ao longo das diferentes condições de desenvolvimento (CHEN et al., 2002; ROSS et al., 2004).

Adicionalmente, o conhecimento e análise histológica do desenvolvimento do pericarpo do açaí pode fornecer uma visão global e esclarecer quais processos estão relacionados com o tamanho em espessura do pericarpo do açaí, que podem auxiliar no aumento da produtividade da cultura (VREBALOV et al., 2009). Além disso, acompanhar mudanças envolvidas no desenvolvimento das características de interesse nutricional e funcional, como o teor de antocianinas específicas e metabólitos que conferem imunidade a doenças (HEINRICH; DHANJI; CASSELMAN, 2011; YAMAGUCHI et al., 2015).

De posse desse conhecimento, é possível relacionar as mudanças do proteoma do açaí com as principais alterações morfo/anatômicas do fruto e características de interesse agrônomo e assim inferir quais rotas metabólicas são cruciais para o desenvolvimento desses traços, bem como qual o padrão proteico expresso ao longo do desenvolvimento que proporciona tais mudanças.

2 OBEJTIVOS

2.1 Objetivo geral

Analisar quantitativamente o proteoma e o padrão histológico do pericarpo de frutos em desenvolvimento de *E. oleracea*

2.2 Objetivos específicos

- Caracterizar as mudanças histológicas durante o desenvolvimento do pericarpo de *E. oleracea*.
- Realizar testes histoquímicos para detecção de lipídeos e proteínas.
- Caracterizar o proteoma do pericarpo de *E. oleracea* em diferentes etapas de maturação.
- Avaliar quantitativamente a abundância das proteínas do pericarpo de *E. oleracea* nos seus diferentes estádios de maturação.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Descrição botânica do açazeiro

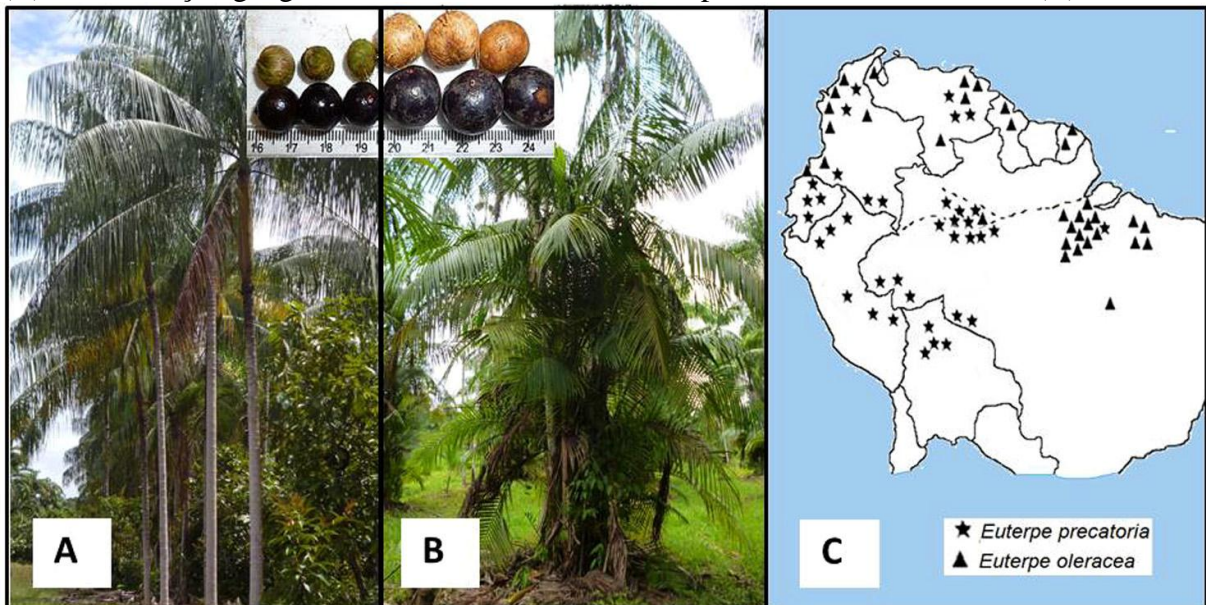
O açazeiro é uma palmeira de médio porte que apresenta considerável importância agrícola e extrativista na região amazônica, devido sua utilização na extração tanto de palmito como de frutos com elevado valor nutritivo. Essa planta pertence à família botânica Arecaceae, terceira família de maior importância para o homem, que abrange mais de 2600 espécies organizadas em 181 gêneros (BAKER; DRANSFIELD, 2016).

Pertencente a subfamília *Arecoideae*, o açazeiro é do gênero *Euterpe*, o qual é representado por sete espécies no total, das quais três espécies são conhecidas como açazeiro.

As diferentes espécies são comumente diferenciadas em função do crescimento e sua utilização. A espécie *E. edulis*, conhecida vulgarmente como açai “juçara” ou “palmito”, ocorre geralmente na região de Mata Atlântica é preferencialmente utilizada para extração de palmito, assim como seu nome popular sugere (DANELLI; FISCH; VIEIRA, 2016). *E. precatoria* é vulgarmente denominada “açai-do-amazonas” ou “açai-solteiro”, devido ao seu tipo de crescimento caracterizado por um estipe solitário e é explorada na produção de frutos e palmito. Por sua vez, *E. oleracea* é conhecida como “açai-do-pará” ou “açai-de-touceira”, pelo hábito de crescimento cespitoso típico dessa espécie, seus frutos são utilizados comercialmente na produção de polpa, principalmente pelo maior rendimento (Figura 1 A e B).

Os açazeiros ocorrem espontaneamente na América Central e Sul, nesta última principalmente na bacia amazônica, onde têm seu centro de diversidade (HEINRICH; DHANJI; CASSELMAN, 2011). Em termos de Brasil, a espécie *E. precatoria* ocorre principalmente em regiões baixadas e terras altas na Amazônia ocidental, enquanto que a predominância de *E. oleracea* se concentra na parte oriental, tipicamente em zonas alagadas dos estuários do Rio Amazonas (Figura 1C). Nessas regiões, a população se beneficia pelo consumo, coleta e venda dos frutos dos açazeiros nativos, principalmente *E. oleracea*, e assim o açaí se apresenta como uma importante fonte de renda e segurança alimentar (YAMAGUCHI et al., 2015).

Figura 1 – Detalhe do porte da planta e dos frutos de *Euterpe precatoria* (A) e *Euterpe oleracea* (B) e distribuição geográfica da ocorrência das duas espécies na América do Sul (C)



Fonte: Yamaguchi et al. (2015).

A palmeira multicaule *E. oleracea*, pode atingir até 25 perfilhos por planta, com caules de 7-18 cm de diâmetro e altura variando de 3 a 20 metros (OLIVEIRA et al., 2007; YAMAGUCHI et al., 2015). Na parte final de cada caule inserem-se de 8 a 14 folhas compostas pinadas, arranjadas em filotaxia espiralada e são compostas por folíolos opostos ao longo da folha (OLIVEIRA et al., 2007). As inflorescências são fixadas logo abaixo das folhas e são compostas por cerca de 80% e 20% de flores masculinas e femininas, respectivamente. Essas flores são dispostas nas ráquulas da inflorescência arranjadas em trímeras e ocorre fecundação predominantemente cruzada. A polinização é feita principalmente por insetos e pelo vento, além de que apresenta assincronia de floração, do tipo protândrica e a propagação do açaí se dá predominantemente via semente (OLIVEIRA et al., 2007).

O açaizeiro apresenta fruto glabro e globoso de coloração variando de verde brilhante a roxo/purpura, com 2,6 a 3 gramas quando maduro, diâmetro variando de um a dois centímetros e com uma única semente marrom amarelada no interior do fruto, a qual ocupa cerca de 85 a 90% do volume do fruto (PAULA, 1975; POMPEU; SILVA; ROGEZ, 2009; SABBE et al., 2009). O fruto de açaí é classificado do tipo baga, uma vez que seu endocarpo não é esclerificado na maturidade e todo pericarpo destaca-se facilmente da semente com uma simples pressão mecânica manual. Do ponto de vista estrutural, o pericarpo maduro apresenta (i) epiderme bastante cutinizada, (ii) parênquima fundamental externo, (iii) zona mediana esclerenquimatosa, (iv) parênquima interno composto de células de maior diâmetro onde se localizam os feixes vasculares com bainha esclerificada e finalmente a (v) delgada epiderme interna ou endocarpo (PAULA, 1975).

Apesar do trabalho previamente citado a respeito da anatomia do fruto de *E. oleracea* (PAULA, 1975), informações a respeito da ontologia do pericarpo de açaí e quais as mudanças estruturais que ocorrem ao longo do desenvolvimento continuam ausentes.

3.2 Importância econômica

O termo açaí deriva do tupi “yá-çai”, que significa fruta-que-chora em referência a característica do fruto de desprender seu suco facilmente ao pressioná-lo. Essa polpa que corresponde ao pericarpo do fruto de açaí é muito apreciado na região Norte do Brasil, porém vem ganhando notoriedade em todo país e cenário internacional, fazendo parte da balança comercial de exportações (YAMAGUCHI et al., 2015).

O açaí é uma das frutas com maior crescimento de demanda no cenário nacional e internacional, com aumento no consumo interno e externo, além do aumento considerável no preço médio por quilograma pago ao extrativista.

Segundo a Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB, 2016), o valor médio pago ao extrativista aumentou de R\$ 1,02 para R\$ 2,13 no período de 2006 a 2014, aumento de 108%. No período de 2013 a 2014 houve uma redução da produção de devido a fatores climáticos, de 202 para 198 mil toneladas, entretanto o mercado continua aquecido no cenário internacional. Os principais clientes do Brasil são os EUA e o Japão, que demandam 48,7 e 41,6 %, respectivamente, e os outros países dividem 9,7%.

O estado do Pará é o principal produtor de açaí do Brasil, com 54% da produção anual seguido do Amazonas com 33,6%, Maranhão 7% , Acre 2% e o restante da produção fica a cargo do Amapá, Rondônia e Roraima, (CONAB, 2016). Nesses estados, o açaí é tradicionalmente utilizado pela população na culinária local, compondo vários pratos típicos da

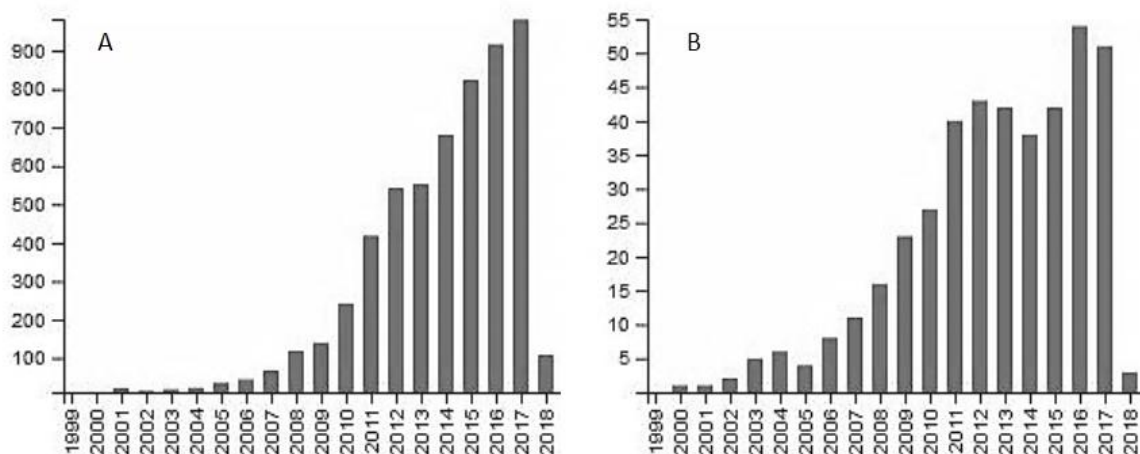
região, decorrente em parte de seu potencial nutritivo e funcional, além de suas aplicações na medicina popular alternativa.

De acordo com a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA, 2016) na região Norte do país o açaí é um importante fator socioeconômico, devido ao desenvolvimento de uma ampla gama de produtos utilizando o açaí. Dentre esses produtos se destaca o açaí batido para consumo imediato, a polpa industrializada congelada e o corante natural produzido a partir da antocianina do fruto empregado na indústria farmacêutica e de cosméticos. Ainda segundo a mesma fonte, nos últimos cinco anos houve um crescimento na quantidade de alimentos processados inseridos no mercado, dentro e fora do país, que contém açaí na composição. Desses produtos, 22% correspondem a novas formulações de sucos, 12% bebidas energéticas e esportivas, 9% lanches diversos, 7% sobremesas e sorvetes, 5% no setor de bebidas lácteas e 3% correspondente a doces e balas. Os países mais representativos na inovação e lançamento de produtos foram os Estados Unidos da América (30%), Brasil (19%) e Canadá (8%).

Assim como na indústria, o interesse científico concernente ao açaí tem crescido significativamente. De acordo com dados do Web of Science, na última década a citação do termo *E. oleracea* teve um aumento de 14 vezes (>1.300%); e o número de trabalhos publicados por ano foi elevado 4,6 vezes (>300%), saindo de 11 publicações em 2007 para 51 em 2017 (Figura 2).

Grande parte desse interesse sobre o açaí, deve-se ao apelo funcional do fruto como superfruta, devido ao seu comprovado poder antioxidante e medicinal. A maioria dos trabalhos publicados exploram as potenciais aplicações dos extratos do fruto e folha açaí, avaliação da capacidade antioxidante, anti-inflamatória da polpa e os efeitos do consumo do açaí na dieta (JENSEN et al., 2008; TONON; BRABET; HUBINGER, 2010). Além de otimizações das metodologias de extração de compostos para fins industriais (ALCÁZAR-ALAY et al., 2017; CAVALCANTI; SANTOS; MEIRELES, 2011; POMPEU; SILVA; ROGEZ, 2009).

Figura 2 – Série histórica da quantidade de citações em cada ano (A) e número de publicações por ano (B) com o termo *E. oleracea*.



Fonte: Web of Science (2018 - <https://apps.webofknowledge.com>)

3.3 Principais componentes nutricionais do fruto de *E. oleracea*

A polpa de açaí, assim como o suco, são reconhecidamente energéticos e de relevância nutricional, além de apresentar propriedades funcionais, por ser rico em compostos bioativos presentes no fruto, já exploradas em vários estudos (HEINRICH; DHANJI; CASSELMAN, 2011). Assim, comprovadamente o açaí é uma fonte alimentar que além nutrir e saciar a fome, ainda proporciona benefícios a saúde do consumidor.

A literatura apresenta extensa relação de trabalhos mostrando a composição nutricional da polpa do açaí, porém existe certa variabilidade, em termos de valores de concentração, dos componentes de acordo com o genótipo, processamento e metodologia para obtenção da massa seca da polpa (CARVALHO et al., 2017; SCHAUSS et al., 2006). De maneira aproximada, a maioria dos dados apontam para uma composição nutricional, na qual se destacam a grande quantidade de lipídeos no fruto alcançado entre 430 a 520 g/kg (43-52%), 25-40% de fibras dietéticas, 10% de proteínas e cerca de 500 calorias por 100 g de massa seca (CARVALHO et al., 2017; YAMAGUCHI et al., 2015).

O fruto de açaí apresenta um perfil de ácidos graxos especialmente saudável. Os ácidos graxos presentes no fruto se dividem nas proporções de 26,1% saturados, 60,6% de monoinsaturados e 13,3% de poli-insaturados. Dentre os saturados predominam os ácidos graxos ácido palmítico (16:0) e esteárico (18:0); nos monoinsaturados o oleico (18:1 Δ^9), principalmente, e palmitoleico (16:1 Δ^9); por fim os poli-insaturados destacam-se o ácido linoleico (18:2 $\Delta^{9,12}$) e o α -linolênico (18:3 $\Delta^{9,12,15}$) (SCHAUSS et al., 2006). A ingestão de polpa de açaí pode melhorar o perfil de lipídeos séricos no sangue de vários animais modelos e modular a expressão de genes envolvido na homeostase do colesterol sanguíneo, como os genes

LDL-R e os genes que codificam transportadores do tipo cassete de ligação ao ATP, cuja maior expressão e atividade induz a excreção do colesterol sanguíneo (SOUZA et al., 2012).

O conteúdo de açúcares do fruto de *E. oleracea* é reduzido, seus sólidos solúveis totais (°Brix) varia de 3,7 a 8,5 apenas, o que leva à costumeira adição, em algumas localidades, de xaropes ou caldas para incrementar o sabor e conteúdo calórico da polpa ou bebida (CARVALHO et al., 2017). Os principais açúcares presentes na polpa são glicose, frutose e maltose, nas concentrações de 8, 4 e 1 g.kg⁻¹ de massa seca, respectivamente (SCHAUSS et al., 2006).

Ainda no pericarpo do açaí, podem ser encontradas três frações de polissacarídeo de diferentes massas moleculares (200, 26-60, 4-12 kDa), os quais são compõem-se principalmente de arabinose, ácido galacturônico e galactose, sendo classificados como arabinogalactanos do tipo II (HOLDERNESS et al., 2011). Esses polissacarídeos, induzem robustas respostas imunes inatas em culturas de células T ($\gamma\delta$), encontradas na mucosa intestinal que contribuem para respostas imunes efetivas, com implicações no tratamento de asma e doenças infecciosas (HOLDERNESS et al., 2011).

O perfil de aminoácido das proteínas do açaí exibe grande proporção de alguns aminoácidos essenciais. O hidrolisado proteico do açaí apresenta lisina como terceiro aminoácido mais abundante (8,7%), seguido de leucina (8,6%) além de valina (6,7%) e fenilalanina (5,7) entre os 10 mais abundantes (SCHAUSS et al., 2006).

3.4 Compostos bioativos presentes no pericarpo de *E. oleracea*

Existe uma grande quantidade de trabalhos relatando os benefícios a saúde de vários compostos encontrados produzidos nos frutos de *E. oleracea*. Isso tem despertado grande interesse, podendo contribuir para o avanço do conhecimento a respeito da espécie e identificação desses compostos. Os principais e mais reportados grupos de moléculas encontradas no fruto de açaí são: antocianinas, flavonoides, ácidos fenólicos, procianidinas, lignanas e estilbenos (COSTA et al., 2013; HEINRICH; DHANJI; CASSELMAN, 2011).

Esses compostos são metabólitos secundários, comuns em plantas, que apresentam funcionalidades biológicas, tais como: aumento da capacidade antioxidante do plasma sanguíneo humano e consequente redução do estresse oxidativo pela eliminação de radicais livres (JENSEN et al., 2008; KANG et al., 2012; MERTENS-TALCOTT et al., 2008); redução do dano oxidativo e inflamação de células cerebrais (POULOSE et al., 2012); redução do risco de doenças coronárias pela vasodilatação (ROCHA et al., 2007); efeito protetivo contra carcinogênese do cólon em ratos (FRAGOSO et al., 2012, 2013); atividade antiproliferativa em

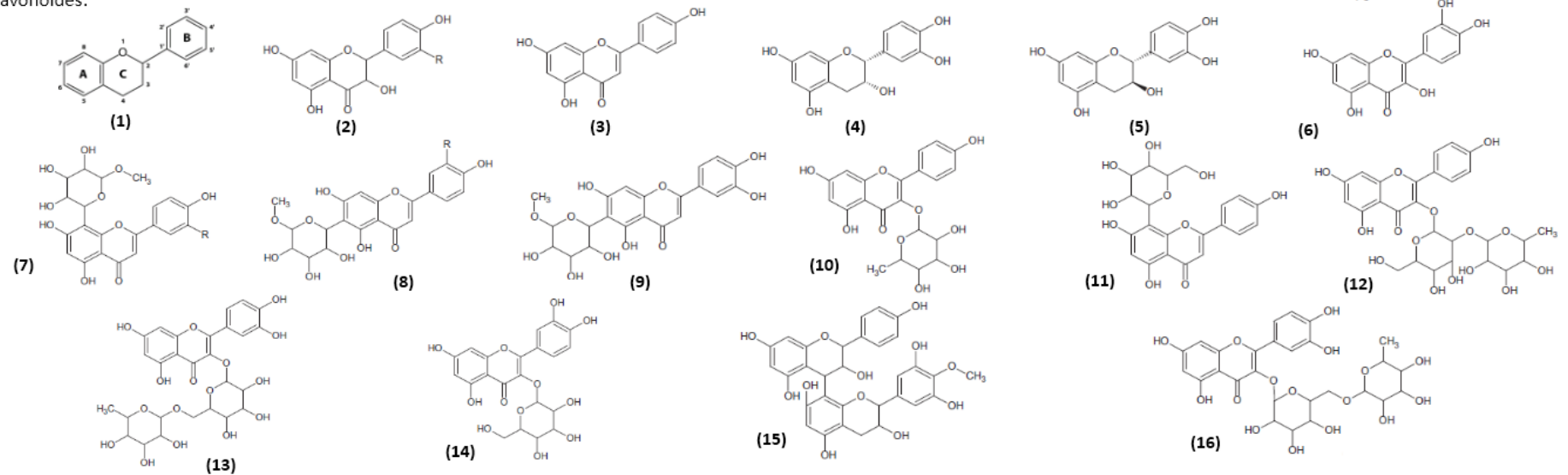
gliomas cerebrais, em células MDA-468 humanas de câncer de mama e em células HL-60 responsáveis pela leucemia, além de atividade pró-apoptótica nestas últimas (DEL POZO-INSFRAN; PERCIVAL; TALCOTT, 2006; HOGAN et al., 2010).

Os metabólitos bioativos mais abundantes no pericarpo de açaí são as antocianinas (YAMAGUCHI et al., 2015). O teor total de antocianinas se apresenta por volta 3,19 mg g⁻¹ de massa seca, do qual duas espécies de antocianinas se destacam com predominantes, que são cianidina-3-rutenosídeo (1,93 mg g⁻¹) e cianidina-3-glicosídeo (1,17 mg g⁻¹) (DEL POZO-INSFRAN; PERCIVAL; TALCOTT, 2006; HEINRICH; DHANJI; CASSELMAN, 2011; SCHAUSS et al., 2006). A presença de outras antocianinas como cianidina-3-sambubiosídeo, peonidina-3-rutenosídeo, peonidina-3-glicosídeo e pelagordina-3-glicosídeo (Figura 3), também são reportadas para o pericarpo do açaí (COSTA et al., 2013; DE ROSSO et al., 2008; HEINRICH; DHANJI; CASSELMAN, 2011; SCHAUSS et al., 2006).

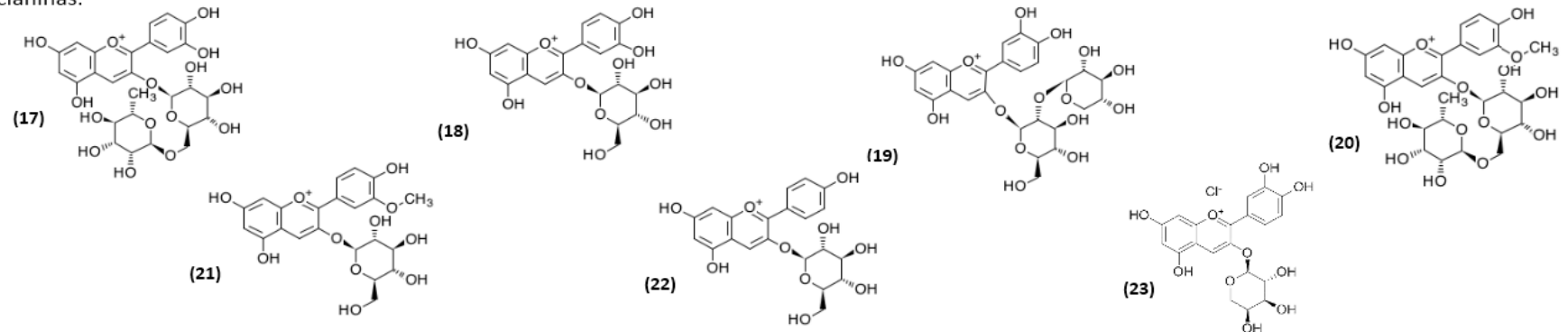
As antocianinas são o tipo mais comum flavonoides pigmentados encontrados na natureza e desempenham um importante papel ecológico, pela coloração de partes vegetativas, flores, frutos e sementes (HOLTON; CORNISH, 1995). Sua estrutura é formada por dois anéis fenólicos aromáticos (A e B), interligados por uma anel heterocíclico central com um oxigênio, (C; Figura 3 (1)), o qual com nível de oxidação mais elevado tem um açúcar ligado ao carbono 3 (Figura 3, FORKMANN, 1991). Diferentes classes de antocianinas são definidas acordo com glicosilações adicionais e/ou modificações dos substituintes em torno dos anéis da estrutura, especialmente no anel B (Figura 3), o que modifica o comprimento de onda luminoso absorvido e conseqüentemente a coloração (FALCONE FERREYRA; RIUS; CASATI, 2012; FORKMANN, 1991).

Figura 3 – Antocianinas e flavonoides encontrados em *E. oleracea*

Flavonoides:



Antocianinas:



Fonte: Yamaguchi et al. 2015; Heinrich et al. 2011; KEGG (www.genome.jp/kegg/). – (1) Esqueleto básico dos flavonoides e antocianinas; (2) R=H: di-hidrocampferol, R=OH: taxifolina; (3) apigenina; (4) (-)-epicatequina; (5) (+)-catequina; (6) quecertina; (7) R=OCH₃: escoparina, R=OH: orientina; (8) R=H: isovitexina, R=OH: homo-orientina; (9) iso-orientina; (10) Campferol rahminosídeo; (11) vilexina; (12) Campferol rutenosídeo; (13) rutina; (14) quecertina 3-glicosídeo; (15) pro-antocianidina; (16) quecertina rutenosídeo; (17) cianidina 3-rutenosídeo; (18) cianidina 3-glicosídeo; (19) cianidina 3-sambubiosídeo; (20) peonidina 3- rutenosídeo; (21) peonidina 3-glicosídeo; (22) pelagordina 3-glicosídeo; (23) cianidina 3-arabinosídeo.

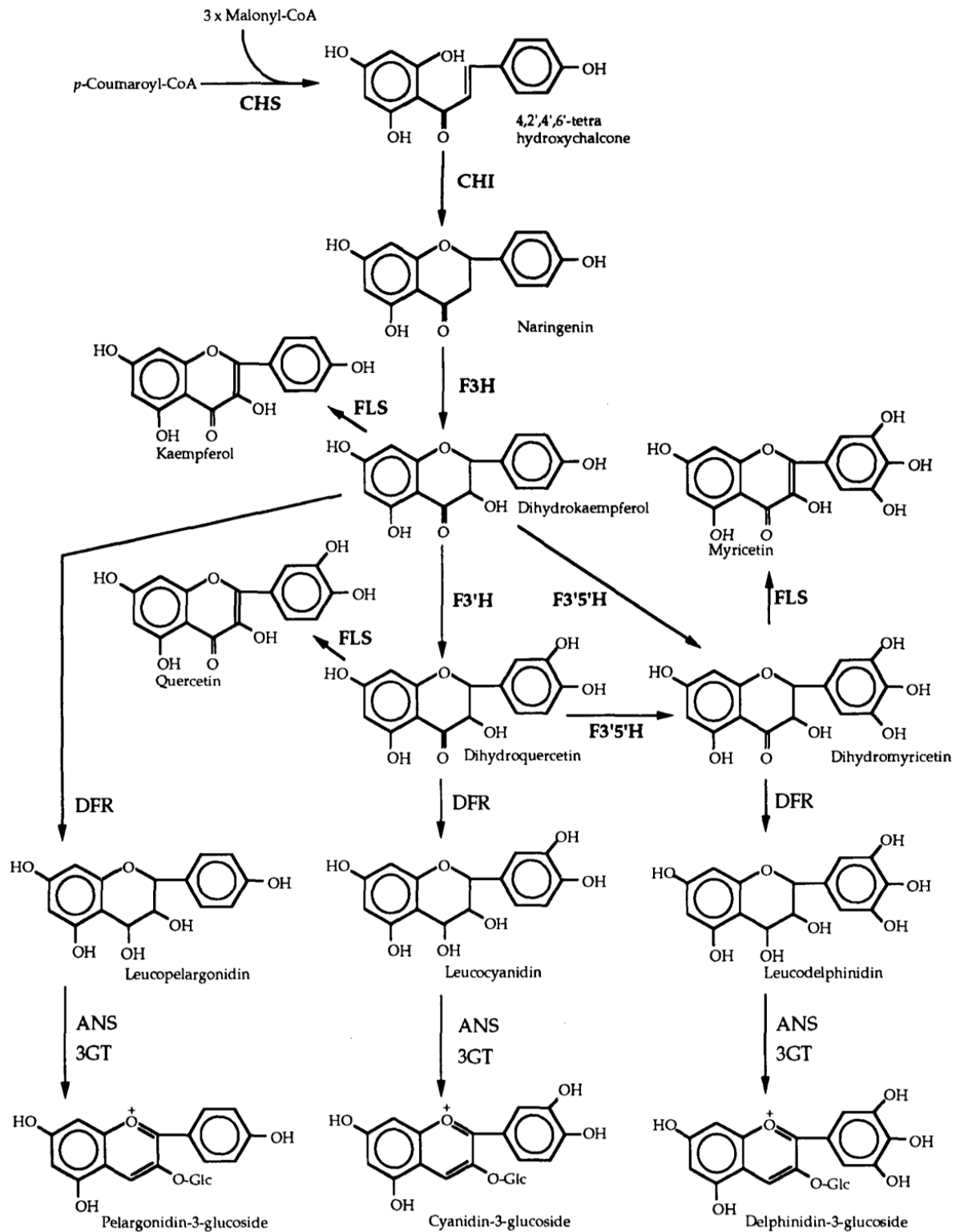
A via de biossíntese de antocianinas é bem estabelecida na literatura e amplamente explorada, principalmente no melhoramento de plantas ornamentais (FALCONE FERREYRA; RIUS; CASATI, 2012; FORKMANN, 1991; MOL et al., 1989). O passo inicial da biossíntese de flavonoides e antocianinas depende de um precursor da via dos fenilpropanóides, o p-coumaroil-CoA, e três moléculas malonil-CoA para gerar chalcona, condensação catalisada pela enzima chalcona sintase (CHS), (Figura 4 HOLTON; CORNISH, 1995; SHIRLEY, 1996). No segundo passo, a enzima chalcona isomerase (CHI) é responsável por acelerar a lenta conversão espontânea de chalcona em narigenina (flavanona), a qual em seguida, sofre adição de uma hidroxila na posição três do anel heterocíclico pela atividade da flavanona 3-hidroxilase (F3H), resultando na formação de um di-hidroflavonol (di-hidrocanferol; Figura 4; HOLTON; CORNISH, 1995).

Neste ponto da via, o di-hidrocanferol é utilizadas como molécula precursora para síntese de vários metabolitos secundários por meio de subseqüentes hidroxilações, por meio da atividade das enzimas flavonoide 3'-hidroxilase (F3'H) e flavonoide 3'5'-hidroxilase (F3'5'H), que produzem di-hidroquercetina e di-hidromiricetina, respectivamente (HOLTON; CORNISH, 1995). Esses compostos quando reduzidos, pela ação da di-hidroflavonol 4-redutase (DFR), convertem-se em três espécies de leucoantocianidinas, leucopelagordina, leucocianidina e leucodelphinidina, as quais sofrem seguida oxidação, desidratação e glicosilação formando a seu pigmento correspondente, pelagordina (*Pelargonidin* em inglês) variando do laranja ao vermelho, cianidina (*Cyanidin* em inglês) vermelho a magenta e delphinidina (*Delphinidin* em inglês) magenta a roxo (FALCONE FERREYRA; RIUS; CASATI, 2012; HOLTON; CORNISH, 1995). Esses dois passos finais para a formação do pigmento são catalisados pela enzima dependente de 2-oxoglutarato, a sintase de antocianidina (ANS), também chamada de leucoantocianidinas di-oxigenase (LDOX), e por último UDP-glicose:flavonoide 3-O-glicosiltransferase a 3-glicosil transferase (3GT), proteína responsável pela adição do açúcar (Figura 4).

Em petúnias, todas as enzimas, F3'5'H, DFR, ANS e 3GT são rigorosamente reguladas, e seus níveis de expressão estão diretamente relacionados com o acúmulo de antocianinas nos tecidos vegetais (HUIITS et al., 1994; QUATTROCCHIO et al., 1993).

Adicionalmente, o controle da síntese de flavonoides e antocianinas tem sido atribuído a regulações a nível transcricional dos genes estruturais da via, por meio de fatores de transcrição envolvidos em respostas a diversos estímulos (PETRONI; TONELLI, 2011; TAKOS et al., 2006).

Figura 4 – Visão geral das vias de biossíntese de flavonoides e antocianinas



Fonte: Holton e Cornish (1995). Abreviações: CHS, chalcona sintase; CHI, chalcona isomerase; F3H, flavanona 3-hidroxilase; FLS, sintase de flavonol; F3'H, flavonoide 3'-hidroxilase; F3'5'H, flavonoide 3'5'-hidroxilase; DFR, dihidroflavonol 4-redutase; ANS, sintase de antocianidina; 3GT, 3-glicosil transferase.

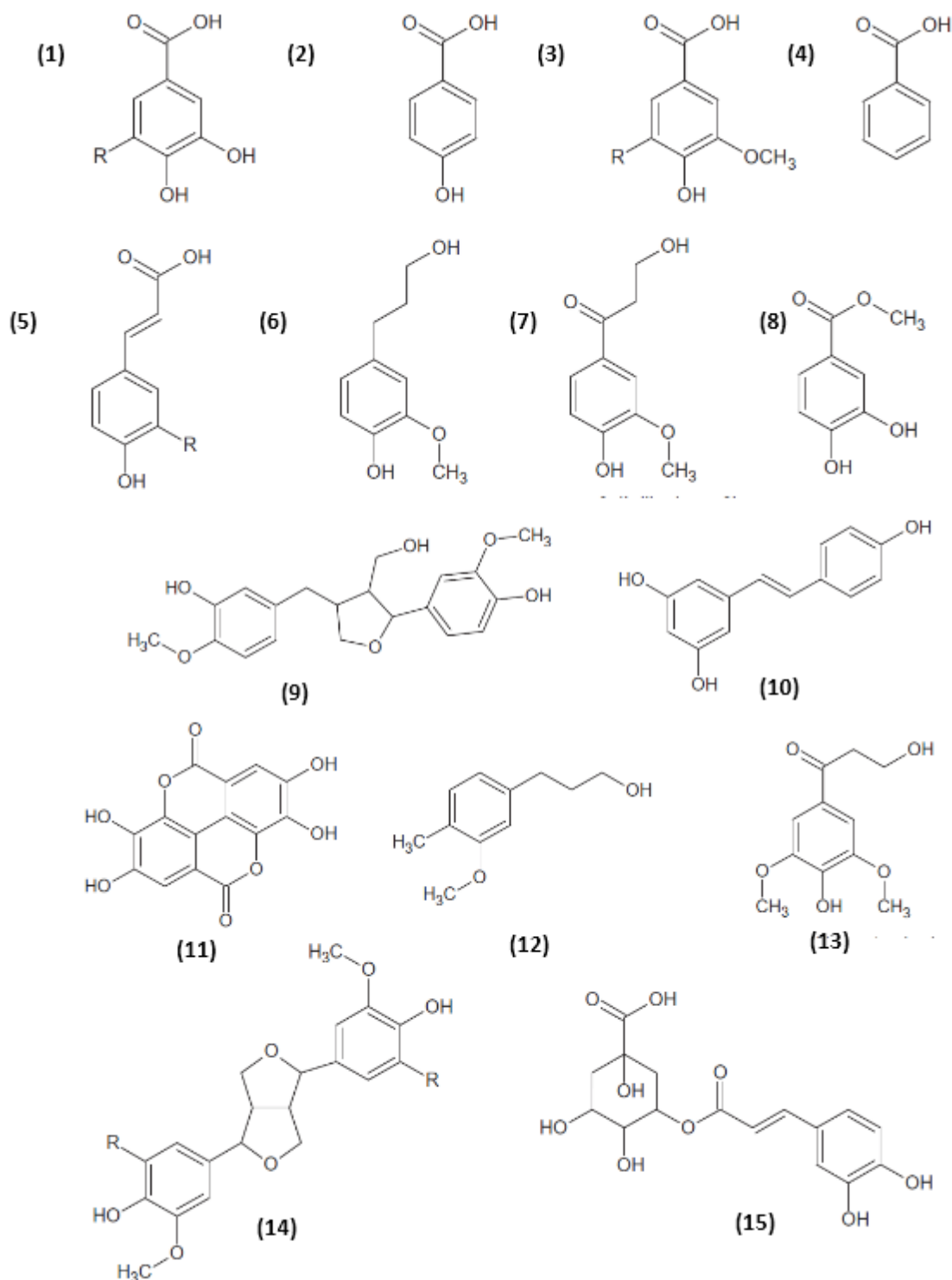
Um estímulo que notadamente induz a produção de antocianinas é a radiação, em especial a ultravioleta (ZORATTI et al., 2014). Embora o mecanismo de sinalização não esteja bem claro, a quantidade de transcrito do fator de transcrição MYB R2R3, em *Malus domestica* aumenta com a exposição a luz, ao passo que a produção de antocianinas no fruto é estimulada (ALLAN; HELLENS; LAING, 2008; TAKOS et al., 2006). Adicionalmente, são reportados outros fatores de transcrição que atuam, juntamente com o MYB, na interação e ativação dos genes relacionados a síntese de flavonoides (WALKER et al., 1999; ZORATTI et al., 2014).

Em *Zea mays* ocorre a ação simultânea com um fator de transcrição com motivo estrutural bHLH (*helix-loop-helix*), enquanto que em *Arabidopsis* existe uma divisão na qual metade inicial da via é regulada apenas por fatores MYB e os genes finais da via são regulados pela combinação MYB, bHLH e WD40 (ZORATTI et al., 2014). O fator WD40 apresenta sequência conservada de 40 aminoácidos, repetida em tandem, codificada pelo locus TRANSPARENT TESTA GLABRA, o qual regula o desenvolvimento de tricomas, produção de mucilagem em sementes e pigmentação por antocianinas (WALKER et al., 1999). Até o momento, pouco se sabe a respeito da regulação da via biosintética de antocianinas em *Areaceae*.

O fruto de *E. oleracea* também apresenta uma gama de derivados da via de síntese de antocianinas (Figura 3), como os flavonoides homoorientina, orientina (mais abundantes), taxifolina desoxi-hexose, isovitexina, escoparina (SCHAUSS et al., 2006), (+)-catequina, (-)epicatequina, rutina, apigenina di-glicosídeo, apigenina 6-glicosídeo luteolina di-glicosídeo, luteolina 8-glicosídeo, taxifolina 3-ramnosídeo, velutina, di-hidroxi-7',3',5'-trimetoxiflavona, di-hidrocampeferol 3-β-D-glicosídeo e seus isômeros (COSTA et al., 2013; GALLORI et al., 2004; HEINRICH; DHANJI; CASSELMAN, 2011; KANG et al., 2011; PACHECO-PALENCIA; DUNCAN; TALCOTT, 2009; SCHAUSS et al., 2006). A presença de dímeros e trímeros de procianidinas, os chamados taninos condensados, são igualmente documentados (PACHECO-PALENCIA; DUNCAN; TALCOTT, 2009).

Ácidos fenólicos também são encontrados em quantidades da ordem 31,2 mg g⁻¹ GAE (equivalente de ácido gálico), no pericarpo de *E. oleracea* (COSTA et al., 2013; KANG et al., 2012). Seu conteúdo de fenóis é composto por ácidos como o protocatecuico, *p*-hidroxibenzóico, vanílico, siríngico, ferúlico, gálico, benzóico, *p*-cumárico, ácido elágico, entre outros (Figura 5; COSTA et al., 2013; DEL POZO-INSFRAN; PERCIVAL; TALCOTT, 2006). A maioria desses ácidos são sintetizados por meio da via dos fenilpropanóides, os quais são tidos como poderosas moléculas antioxidantes *in vitro* (GARZÓN et al., 2017).

Figura 5 – Compostos fenólicos detectados no açaí



Fonte: Yamaguchi et al. (2015) – (1) R=OH: ácido gálico, R=H: protocateuico; (2) *p*-hidroxibenzoico; (3) R=H: ácido vanílico, R=OCH₃: siríngico; (4) ácido benzoico; (5) R=H: ácido cumárico, R=OH: cafeico, R=OCH₃: ferúlico; (6) álcool di-hidroconiferil; (7) 3,4'-dihidroxi-3'-metoxipropiofenona; (8) metil éster protocateuico; (9) lariciresinol; (10) resveratrol; (11) ácido elágico; (12) hidroconiferil; (13) 3-hidroxi-1-(4-hidroxi-3,5-dimetoxifenil)-1-propanone; (14) R=H: pinoresinol, R=OCH₃: siringaresinol; (15) ácido clorogênico.

Nove moléculas intimamente relacionadas com lignina, as lignanas, foram isoladas do fruto de *E. oleracea* e apresentaram elevada capacidade antioxidante e citoprotetora para células estressadas com H₂O₂ (CHIN et al., 2008). Em especial a lignana (+)-seringaresinol apresentou proteção quase equivalente (53%) a quecertina (60%), utilizada como controle positivo (CHIN et al., 2008). As lignanas descobertas no fruto de *E. oleracea* são dos tipos estruturais ariltetrahidronaftaleno, dihidrobenzofurano, furofuranos, 8-O-4'-neolignana e tetrahidrofurano (CHIN et al., 2008).

As lignanas e neolignanas conferem resistência as paredes celulares vegetais, são formadas a partir da dimerização de duas moléculas de ácido cafeico, de ácido ferúlico, ou álcool coniferil, reação que é mediada por peroxidases ou pelo acoplamento oxidativo espontâneo, devido a sua reatividade intrínseca (WARD, 1993).

Apesar da importância da via dos fenilpropanóides, informações objetivas sobre a dinâmica temporal durante o desenvolvimento do pericarpo de *E. oleracea*, são escassas. Além de gerar precursores para variados ramos do metabolismo secundário, a via do fenilpropanóides tem grande importância na defesa vegetal contra patógenos, especialmente pela produção de fitoalexinas e o ácido salicílico, os quais são derivados do esqueleto fenilpropano (C₆C₃) gerado pela desaminação do aminoácido fenilalanina catalisada pela PAL (fenilalanina amônia-liase), a qual somada a outras enzimas como cinamato 4-hidroxilase (C4H) e 4-cumarato:CoA ligase (4CL), constituem o cerne desta via (DIXON et al., 2002).

3.5 Desenvolvimento do fruto e proteômica

O desenvolvimento do fruto nas plantas pode ser dividido em quatro etapas que são a formação do ovário na flor (i), o qual após a fecundação inicia o processo mitótico intenso (ii), seguido de uma etapa de expansão do volume celular (iii) e finalmente a maturação do fruto (iv) tornando-o apto a dispersão (GIOVANNONI, 2004; SEYMOUR et al., 2013). Todo o processo é mediado e controlado pelo envolvimento de fitormônios bem como por fatores de transcrição da família de genes MADS-box, que modulam a expressão gênica espacialmente e temporalmente de acordo com a etapa de desenvolvimento do fruto (GIOVANNONI, 2004; VREBALOV et al., 2009).

Atualmente, com a evolução da bioinformática e de ferramentas como a espectrometrias de massas, as quais permitem a análise de grande quantidade de dados, esforços estão sendo feitos no sentido de entender os mecanismos moleculares de processos fundamentais no desenvolvimento de sementes e frutos com maior abrangência sobre sua

fisiologia e biologia (MOLASSIOTIS et al., 2013; PINHEIRO et al., 2013; SHAH et al., 2015, 2016; SOARES et al., 2014).

O conhecimento do proteoma de frutos tem permitido acessar os padrões proteicos que protagonizam diversos processos, como resposta as fungos, vírus e estresses abióticos, amadurecimento climatéricos e não climatérico, além de esclarecer certas mudanças durante a deterioração pós-colheita (MARONDEDZE; GEHRING; THOMAS, 2014; MOLASSIOTIS et al., 2013; OWITI et al., 2011). O proteoma do tomate (*Solanum lycopersicum* L.), por exemplo, no início do desenvolvimento do fruto apresenta abundância de proteínas de síntese e metabolismo de aminoácidos, as quais posteriormente são substituídas por proteínas dos processos de fotossíntese, formação de parede celular e no final do desenvolvimento as proteínas envolvidas no metabolismo de carbono e fosforilação oxidativa são intensamente expressas (FAUROBERT et al., 2007). Em *Phoenix dactylifera* (Arecaceae), foram identificadas 189 proteínas diferencialmente expressas durante o desenvolvimento de suas tâmaras, as quais evidenciaram que processos como biossíntese de antocianina, glicólise, ciclo de Krebs e degradação de parede celular foram estimulados, enquanto que as expressão de proteínas envolvidas na fotossíntese e via das pentoses fosfato decresceu na maturação (MARONDEDZE; GEHRING; THOMAS, 2014).

Os trabalhos citados acima utilizam a abordagem *gel-based*, na qual a análise de MS é direcionada para proteínas que foram, em gel 2-DE, visualmente expressas de maneira contrastante, o que limita a velocidade, sensibilidade e cobertura do proteoma, omitindo possíveis informações importantes (MCDONALD; YATES, 2002). Atualmente, a abordagem *gel-free* do tipo *shotgun*, na qual as proteínas são submetidas digestão enzimática seguida de análise direta dos peptídeos por MS, tem otimizado a velocidade, abrangência do proteoma e sensibilidade (ZHANG et al., 2013).

Adicionalmente, é possível além de verificar a presença, quantificar a expressão das proteínas de determinada amostra utilizando marcação química dos seus peptídeos (ZHANG et al., 2013). Em especial, a marcação química por iTRAQ (*isobaric tag for relative and absolute quantitation*) apresenta vantagens por possibilitar a quantificação por meio da análise da intensidade dos íons repórteres no espectro de MS², após a fragmentação o que reduz a complexidade do espectro de MS¹, facilitando a identificação da proteína (ROSS et al., 2004).

Recentemente, essa técnica tem sido aplicada em vários trabalhos para avaliar o proteoma de uma variedade de frutos e grãos em desenvolvimento, tais como arroz negro (*Oryza sativa* L. indica var. SSP), melão oriental (*Cucumis melo* var. *makuwa* Makino), uva (*Vitis vinifera* e *Vitis rotundifolia*), trigo (*Triticum aestivum*) e kiwi (*Actinidia arguta*) (CHEN

et al., 2016; GUO et al., 2017; KAMBIRANDA et al., 2014; LIN et al., 2017; MA et al., 2014; MARTÍNEZ-ESTESO et al., 2013). Também em estudo avaliando duas variedades dendezeiro (*Elaeis guineenses*), foram identificadas 826 proteínas, das quais 200 e 157 tiveram a expressão temporal elevada e reduzida, respectivamente, e a elevada atividade de fosforilação oxidativa foi crítica para o acúmulo de óleo no fruto (LOEI et al., 2013).

Essas análises proteômicas tem ajudado a esclarecer como as mudanças do perfil proteico afetam o metabolismo desses tecidos, bem como a regulação do desenvolvimento, como por exemplo do processo de transdução de sinal na regulação coordenada que liga o metabolismo de carboidratos e a biossíntese de antocianinas durante o desenvolvimento do arroz negro (CHEN et al., 2017).

À despeito da importância econômica e ecológica da família Arecaceae, existem poucos estudos sobre o proteoma das palmeiras (CHAKRABORTY et al., 2015). Além dos trabalhos supracitados tratando do desenvolvimento de frutos de *Phoenix dactylifera* e *Elaeis guineenses*, há registros de apenas alguns outros trabalhos com as mesmas espécies, analisando o proteoma de embriões zigóticos e somáticos (SGHAIER-HAMMAMI; DRIRA; JORRÍN-NOVO, 2009), interação planta-patógeno/praga (MARQUÉS; DURAN-VILA; DARÒS, 2011; RASOOL et al., 2015), efeito de estresses abióticos (RABEY et al., 2015) e comparação de variedades (OOI et al., 2015). Diante dessa escassez de informações, se fazem necessários estudos para conhecer o proteoma das palmeiras, principalmente as de interesse econômico, no sentido de apoiar possíveis melhorias biotecnológicas da qualidade e produtividade dessas culturas (CHAKRABORTY et al., 2015).

Dada a importância do fruto de *E. oleracea*, a análise do padrão histológico do pericarpo, assim como a variabilidade do seu proteoma durante o desenvolvimento é fundamental para o entendimento da biologia celular desse tecido, no intuito de preencher lacunas de dados proteômicos e auxiliar estratégias de melhoramento vegetal mediante abordagens biotecnológicas. Além disso, esse conhecimento pode ser importante na domesticação dessa palmeira e produção de variedades que potencializem a cadeia produtiva do açaí, que ainda depende do extrativismo.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Coleta e histologia de frutos de *E. oleracea*

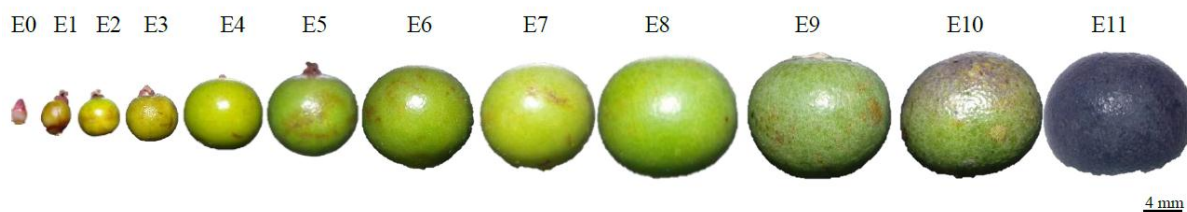
Os frutos de *E. oleracea* foram coletados em um plantio particular localizado no distrito de Taíba, no município São Gonçalo do Amarante, litoral do Ceará, plantas com cerca de dois anos idade e em plena produção de frutos. Os frutos coletados foram agrupados em 12 estádios correspondentes à uma escala crescente de maturação do fruto (Tabela 1, Figura 6), previamente estabelecida em trabalhos anteriores e que abrange desde o estágio de desenvolvimento de botão floral (estádio 0) ao estágio maduro (estádio 11).

Tabela 1 – Descrição morfológica dos estádios de desenvolvimento da semente de *E. oleracea*, selecionadas para estudo histológico

Estádios	Diâmetro médio	Aspectos morfológicos
E0	2,6 ±0,2	Botão floral
E1	4,3 ±0,2	Pericarpo verde brilhoso, semiesférico, estigma aparente, endosperma nuclear
E2	4,9 ±0,2	Pericarpo verde brilhoso, esférico, estigma aparente, endosperma nuclear
E3	6,2 ±0,1	Pericarpo verde brilhoso, esférico, estigma aparente, endosperma nuclear
E4	8,0 ±0,4	Pericarpo verde brilhoso, estigma aparente, endosperma nuclear
E5	8,5 ±0,2	Pericarpo verde brilhoso, estigma aparente, celularização inicial do endosperma
E6	10,4 ±0,2	Pericarpo verde brilhoso, esférico, celularização inicial do endosperma
E7	11,3 ±0,3	Pericarpo verde brilhoso, celularização do endosperma
E8	12,3 ±0,1	Pericarpo verde brilhoso, endosperma celular e semente sem resistência ao corte
E9	13,6 ±0,4	Pericarpo verde opaco, endosperma celular e semente com resistência ao corte
E10	13,2 ±0,3	Pericarpo em transição de verde para roxo
E11 (Maduro)	12,5 ±0,4	Pericarpo totalmente roxo

Fonte: dados da pesquisa.

Figura 6 – Frutos de *Euterpe oleracea* em diferentes estádios de desenvolvimento



Fonte: dados da pesquisa.

Após a coleta, os frutos foram transportados para o Laboratório de Biologia Molecular de Plantas (LBMP), do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular (DBBM) da Universidade Federal do Ceará – UFC, onde foram lavados, previamente cortados para facilitar a fixação em solução Karnovsky (KARNOVSKY, 1965, com adaptações), seguida de desidratação em série alcoólica (10 - 100%, 1h cada). O material foi infiltrado e incluído em resina plástica glicol-metacrilato (Historesin Leica). Depois da inclusão o material foi cortado em secção transversal em micrótomo rotativo de avanço automático (Leica® RM 2065), obtendo-se secções de 5 µm, que foram distendidas em água e montadas em meio hidratado ou com Tissue Mount (Tissue-TEK) quando permanentes. Por fim, procedeu-se com a coloração dos cortes e visualização e registro das imagens com câmera digital (HP Photosmart R967) acoplada na ocular de um microscópio óptico (Leica® DM4000).

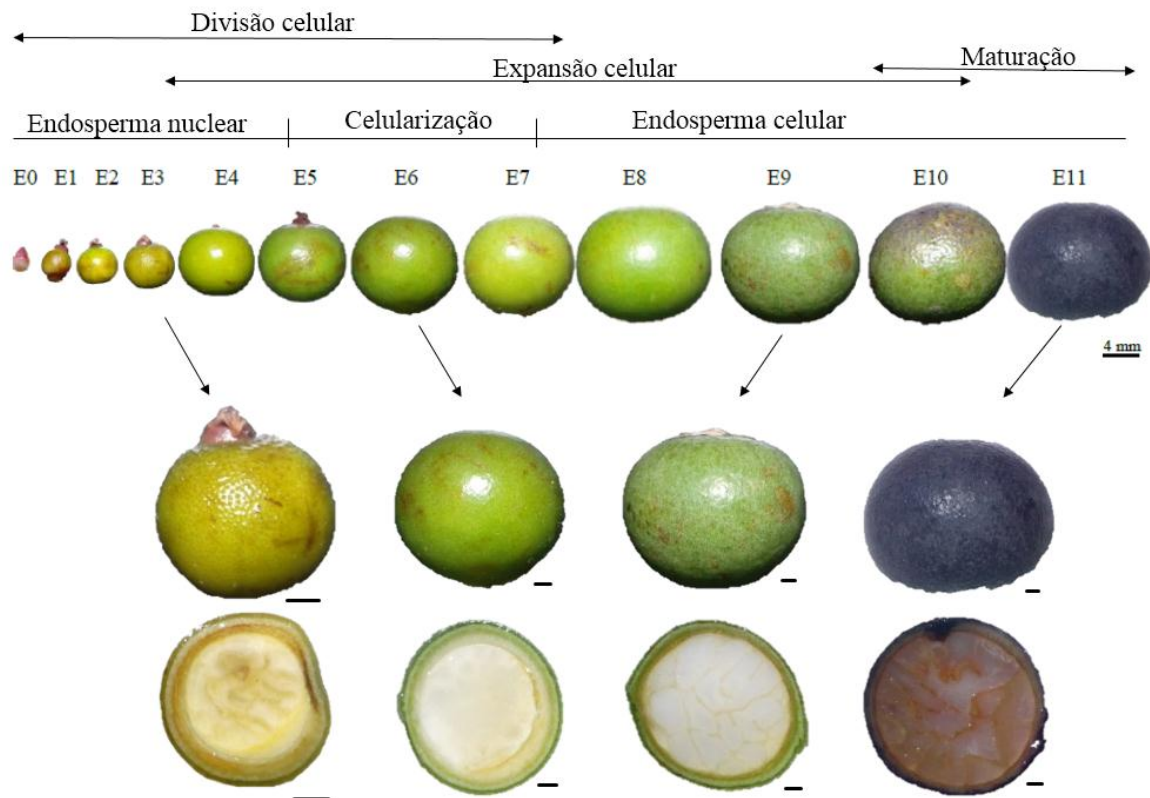
Para evidenciar detalhes estruturais foram utilizados os corantes azul de toluidina, fuccina básica e solução safrablau (safranina + azul de astra) de acordo com metodologias previamente descrita (BUKATSCH, 1972; O'BRIEN; FEDER; MCCULLY, 1964). Para detecção de lipídeos totais, foi utilizada solução de etanol 70% contendo o reagente Sudan III (PEARSE, 1953), a qual foi aplicada sobre os corte por 15 – 30 min, estes em seguida lavados e montados em meio hidratado. A detecção histoquímica de proteínas foi realizada com a aplicação de solução de Xilidine Ponceau 0,1% em ácido acético 3% (VIDAL, 1970).

4.2 Coleta e preparo da amostra para análise proteômica

Com base na análise histológica, foram selecionados quatro estádios de desenvolvimento para proceder com o estudo do proteoma do açaí (E3, E6, E9 e E11; Figura 7). A escolha dos estádios levou em consideração as principais etapas gerais do desenvolvimento (Figura 7), sendo elevada divisão celular inicial (E3), início da expansão celular e ausência de divisão (E6 e E9, respectivamente), e estágio final do desenvolvimento (E11) no qual o fruto está maduro, tecido do pericarpo totalmente diferenciado e pronto para a

colheita. Os frutos de cada estágio foram identificados tomando referência o diâmetro, firmeza do endosperma e coloração do pericarpo (Tabela 1), sendo colhidos de plantas diferentes três amostras de frutos para cada estágio de desenvolvimento, que correspondem às replicatas biológicas. Em seguida os frutos foram transportados para o LBMP, onde foram resfriados rapidamente com nitrogênio líquido, mantidos sob refrigeração (-20 °C) e posteriormente liofilizados (LABCONCO, modelo 195).

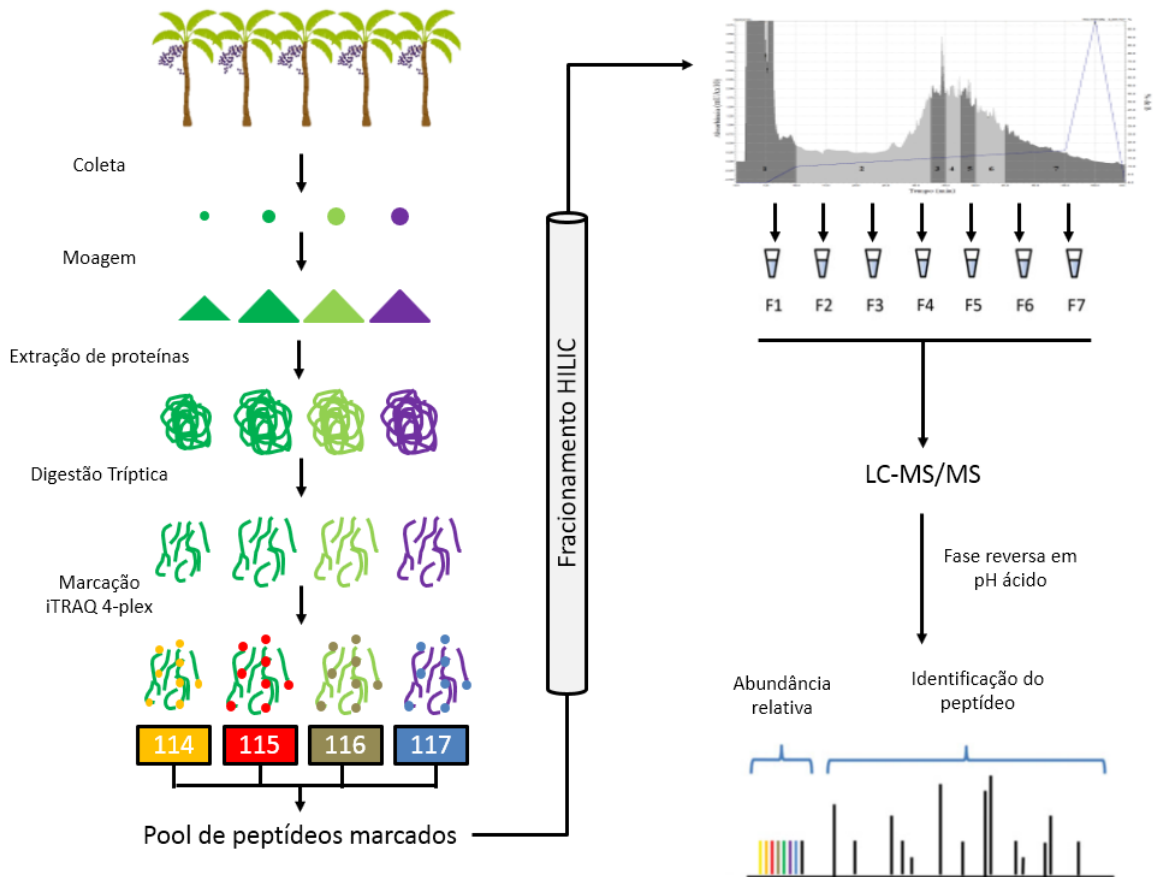
Figura 7 – Estádios de desenvolvimento selecionados para o estudo proteômico (E3, E6, E9 e E11) e a relação de todos os estádios com as principais características do desenvolvimento



Fonte: dados da pesquisa; barra dos estádios selecionados: 1 mm.

Após a liofilização, o pericarpo foi cuidadosamente separado da semente. A amostra do pericarpo moída, em moinho doméstico de grãos, retirou-se o excesso de lipídeos e pigmentos, com imersão em acetona P.A. sob agitação, com posterior troca de acetona e secagem à temperatura ambiente. A amostra seca foi submetida a moagem, em moinho doméstico de grãos, para completa redução do tamanho das partículas, sendo coletado somente a fração do pó extrafino, o qual foi utilizado para extração de proteínas. A Figura 8 abaixo, apresenta as principais etapas operacionais do estudo proteômico.

Figura 8 – Fluxograma operacional com as principais etapas para análise do proteoma de *E. oleracea*



Fonte: Adaptado de Handakumbura et al. (2017).

4.3 Extração de proteínas e digestão triptica

A extração de proteínas foi realizada conforme metodologia previamente descrita (FAUROBERT; PELPOIR; CHAÏB, 2007). Foram pesados 40 mg da amostra liofilizada e homogeneizadas em 800 μ L do tampão de extração pH 8,0 (500 mM Tris-HCl, 50 mM EDTA, 700 mM sacarose, 100 mM KCl, 2% β -mercapetotanol, 1 mM PMSF), essa mistura foi agitada por 10 minutos à 5 ± 2 °C e em seguida adicionado o mesmo volume de fenol saturado com Tris-HCl. Após aplicação do fenol, a amostra foi agitada por mais 10 minutos à temperatura ambiente, imediatamente centrifugada (10 min, 5500 g, 4 °C) e a fase fenólica no topo foi cuidadosamente coletada e transferida para um novo tubo. No novo tubo, foi acrescido o mesmo volume inicial de tampão de extração, submetido a agitação por três minutos, e novamente centrifugação e coleta. As proteínas foram precipitadas com a adição de quatro vezes o volume de solução de precipitação (acetato de amônio 0,1 M, em metanol) e incubação *overnight* à -20 °C. Após a precipitação repetiu-se a centrifugação, seguida de lavagem do *pellet* (3x) com a

solução de precipitação, lavagem final com acetona gelada e secagem à temperatura ambiente sob vácuo (Concentrator plus, Eppendorf). O resultado da extração foi analisado por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), utilizando 20 µg de proteínas, dosadas com base em ensaio de quantificação com reagente Bradford.

As proteínas foram solubilizadas em solução de ureia 7M, tiouréia 2M, bicarbonato de trietilamônio (TEAB) 100 mM, verificada a concentração de proteínas pelo método fluorimétrico quantitativo Qubit® (2.0 fluorometer, Invitrogen), de acordo com as instruções do fabricante e aplicado 1% deoxicolato de sódio (SDC). Em seguida, 60µg de proteínas de foram submetidas a redução com tris(2-carboxietil) fosfina hidrocloreto (TCEP) 10 mM por 1 hora a 30° C, acompanhada de alquilação com iodo acetamida (IAA) 40 mM por 30 minutos, temperatura ambiente. Depois foi realizada diluição com TEAB 100 mM (1:9 v/v) seguida de adição de tripsina (Promega corp. Madison, WI, USA) para quebra proteolítica controlada das proteínas, em uma razão de 1:50 (µg /µg) por 18 horas a 37 °C (NÚÑEZ et al., 2017). A reação de tripsinização foi encerrada com aplicação de ácido trifluoroacético (TFA, 10%) para reduzir à pH 2, aproximadamente. Finalizada a tripsinização, realizou-se a limpeza inicial com o intuito de separar o SDC da amostra, por centrifugação à 10.000 g, por 10 min e transferência do sobrenadante. O sobrenadante foi aplicado colunas *stage tips* confeccionadas com resina C18 Poros R2 (Applied Biosystems), para eluição dos sais e concentração dos peptídeos por meio de um gradiente de acetonitrila (ACN, 50 e 70%). Os peptídeos passaram por secagem, foram ressuspenso de maneira padronizada com 15 µL TEAB 20 mM e quantificados novamente com Qubit®.

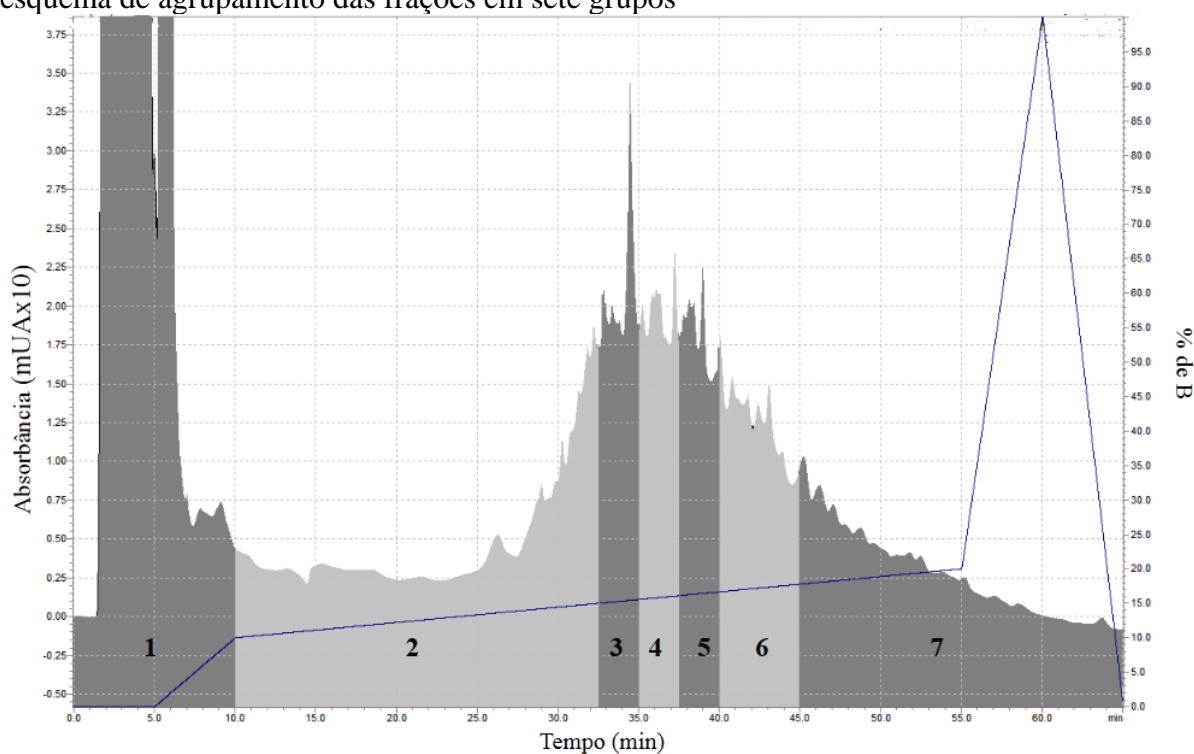
4.4 Marcação com iTRAQ e fracionamento *off-line* HILIC

Com objetivo de analisar, além da presença, o nível de expressão das proteínas do pericارpo de açáí, foi utilizado a abordagem de marcação isobárica, com o uso reagente iTRAQ® (AB Sciex, *4-plex*), de acordo com as recomendações do fabricante. Na marcação, a aplicação dos reagentes correspondentes aos diferentes íons repórteres de 114, 115, 116 e 117 Da foram distribuídos nas amostras dos diferentes estádios de desenvolvimento (x 3 replicatas biológicas). Após a aplicação, a reação foi incubada por uma hora à temperatura ambiente e em seguida as soluções foram agrupadas em três grupos referentes as replicatas biológicas, por fim a reação foi encerrada com aplicação de 200 µL de TFA 10% e o volume da mistura foi reduzido sob vácuo em concentrador até aproximadamente 10 µL.

Posteriormente, cada mistura foi diluída em 100 µL de solução A (ACN 90%, TFA 0,1%) fracionada por meio de cromatografia líquida de alta performance (HPLC), para diminuir

a complexidade da amostra e eliminar o excesso de reagente iTRAQ. O processo de fracionamento foi realizado em cromatógrafo UFLC Shimadzu, equipado com coluna de interação hidrofílica HILIC (*Hydrophilic interaction liquid chromatography*; Cromatec, 2,0 mm x 15 cm, 3 μ m, TKSgel Amide-80). Cada mistura de peptídeos marcados foi aplicada na coluna e eluídas por meio de gradiente de fase móvel entre solução orgânica A e solução aquosa B (TFA 0,1%), o qual foi iniciado com 100% do solvente A por 5 min, seguido de aumento progressivo de B, alcançando 10% aos 10 min, 20% aos 55 min, 100% aos 60 min e reduzindo à 0% aos 65 min, sob fluxo de 0,2 mL min⁻¹. A eluição dos peptídeos foi monitorada por meio de leituras de absorvância nos comprimentos de onda de 216 e 280 nm. Após o fracionamento, as frações foram agrupadas com o cuidado para manter separados os picos de maior intensidade, resultando em sete frações para cada replicata biológica (Figura 9). Essas frações foram secas sob vácuo, ressuspensas em 16 μ L ácido fórmico 0,1% e transferidas para os tubos (*vials*) de aplicação no espectrômetro de massas.

Figura 9 – Cromatograma do Fracionamento HILIC das amostras de *Euterpe oleracea* e esquema de agrupamento das frações em sete grupos



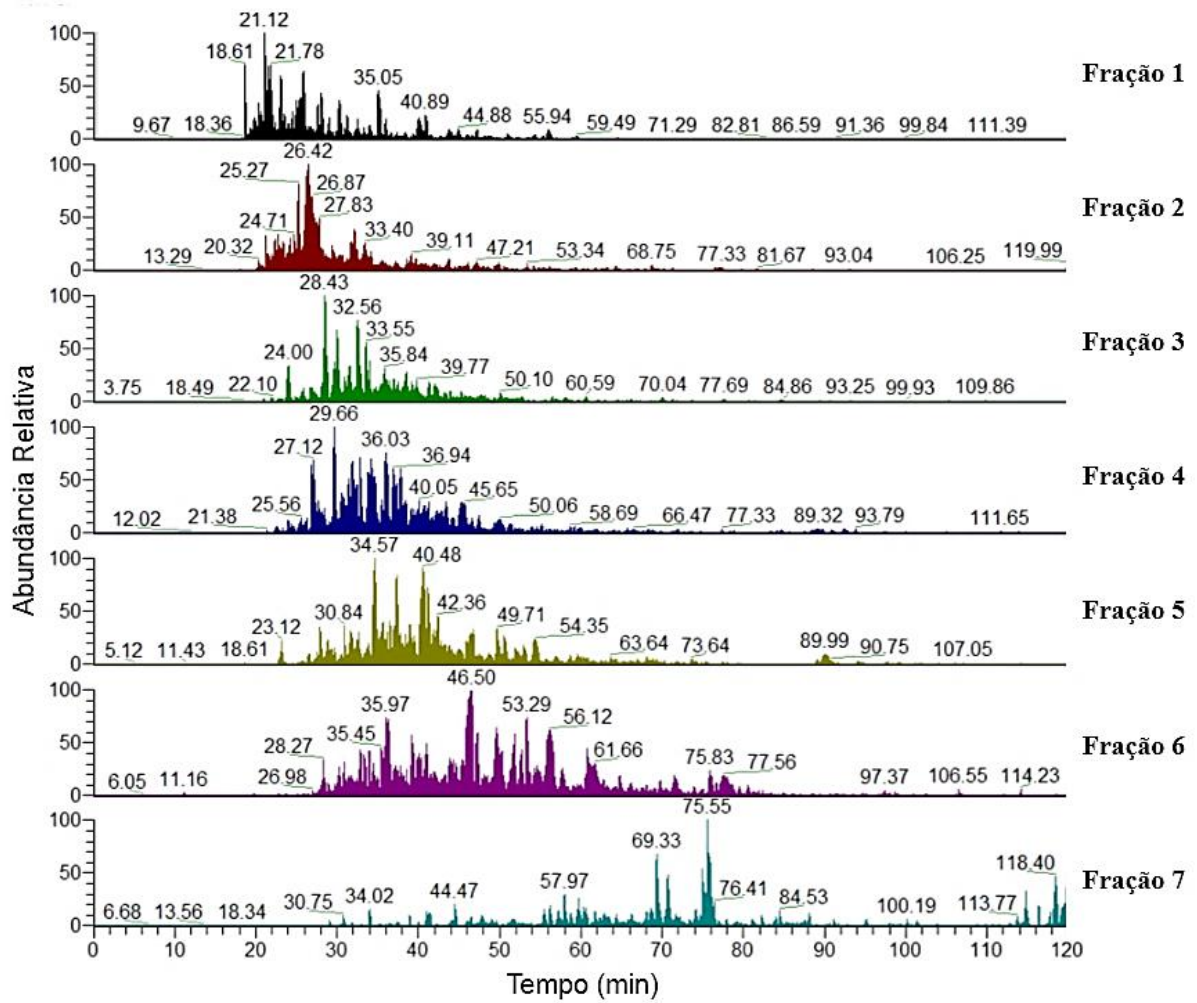
Fonte: dados da pesquisa. B – Solução de ácido trifluoroacético 0,1%

4.5 Análise de espectrometria de massas – LC-MS/MS

As frações agrupadas foram analisadas em triplicatas técnicas por nanocromatografia líquida (Easy-nLC 1000, Thermo Scientific) acoplada à espectrômetro de massas híbrido Quadropolo-Orbitrap (Q Exactive Plus, Thermo Scientific). Como padrão do laboratório foi injetado 4 µl da solução de peptídeos sob fluxo de 200 nL/min em uma pré-coluna (3 cm x 100 µm de diâmetro interno, resina ReproSil-Pur C18, 5 µm, Dr. Maisch GmbH; Ammerbuch, Germany) e coluna (30 cm x 75 µm diâmetro interno, resina ReproSil-Pur C18, 3 µm Dr. Maisch GmbH; Ammerbuch, Germany), na qual foi aplicado um gradiente de 120 min começando de 100% da fase A (0,1% ácido fórmico, 5% ACN) até 45% da fase B (0,1% ácido fórmico, 95% ACN) em 100 min, de 45 a 95% da fase B em 7 min e 13 min com 95% da fase B. Ao final, as colunas foram reequilibradas para uma nova corrida. A ionização e transferência dos íons foi feita utilizando fonte de nano-eletrospray (Thermo Scientific), em polaridade positiva, com potencial de 2.4 kV e aquecimento de 250 °C.

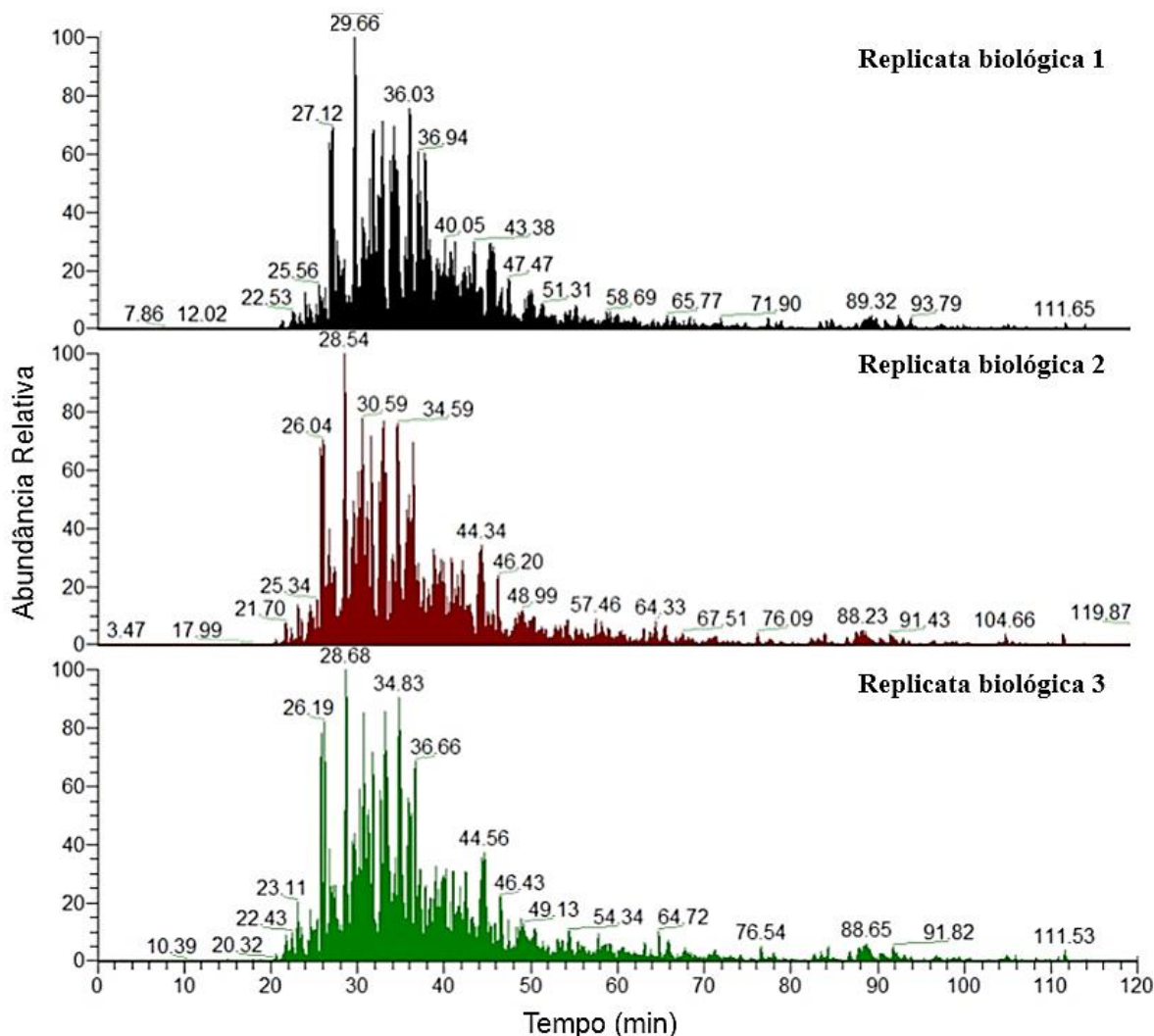
O espectrômetro de massas operou no modo de aquisição análise dependente de dados (*Data dependent analysis - DDA*), com *Full scan* no MS¹ na faixa de 375 – 2000 m/z, resolução de 70.000 (para m/z 200), AGC (*Automatic Gain Control*) definido em 1x10⁶ e tempo máximo de injeção de 50 ms. Foram selecionados até 15 íons mais abundantes e fragmentados em célula de colisão HCD (*Higher-energy collisional dissociation*), com energia de colisão normalizada em 30 (NCE) e os fragmentos analisados no MS² usando resolução de 17.500 (para m/z 200), tempo máximo de injeção de 100 ms, AGC de 1x10⁵, janela de isolamento de 2,0 m/z e exclusão dinâmica de 45 s. Para os íons sem determinação de carga e com apenas uma carga não foram adquiridos espectros de MS². Os cromatogramas e espectros foram visualizados pelo software Xcalibur v.2.1., nos quais foi verificado o padrão cromatográfico quanto à complexidade de cada fração (Figura 10) e a reprodutibilidade entre as replicatas biológicas (Figura 11).

Figura 10 – Cromatogramas das sete frações em nano cromatografia liquida acoplada a espectrômetro de massas



Fonte: dados da pesquisa.

Figura 11 – Reprodutibilidade do padrão cromatográfico na análise de espectrometria de massas entre as replicatas biológicas



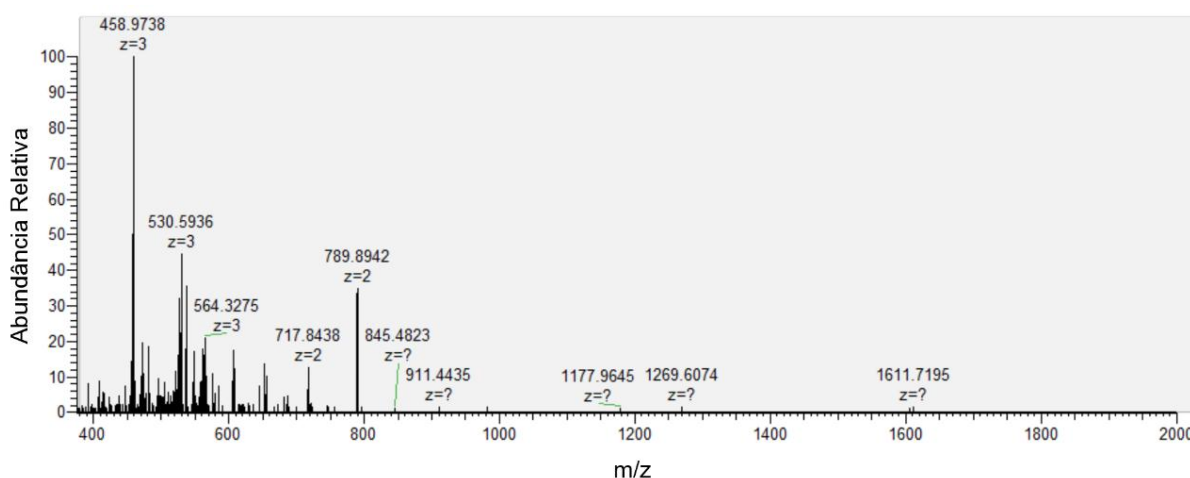
Fonte: dados da pesquisa.

4.6 Análise de dados

Os espectros experimentais obtidos foram analisados por meio do software Proteome Discoverer 2.1 (Thermo Scientific). A identificação dos peptídeos por combinação de espectro de peptídeos (*Peptide Spectrum Match* - PSM) foi realizada com o algoritmo Sequest HT, contra uma base de dados da família Arecaceae combinada com *Arabidopsis*, disponíveis nas bases de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI - <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) e Uniprot (<http://www.uniprot.org/>), respectivamente. A busca foi feita obedecendo os critérios a seguir: tolerância de massa do peptídeo de 10 ppm; tolerância de massa dos fragmentos 0,1 Da no MS²; clivagem por tripsina, com limite máximo de duas clivagens perdidas; como modificações variáveis a oxidação da metionina (+ 15,995 Da),

marcação por iTRAQ4plex (+ 144,102 Da em lisina, tirosina e extremidade N-terminal) e modificação fixa a carbamidometilação da cisteína (+ 57,021 Da). Para estimar a taxa de falsa descoberta ou FDR (*False Discovery Rate*) foi utilizada a ferramenta Target Decoy PSM Validator, que processa os dados contra uma base de dados reversa e estima a FDR. Só foram consideradas as proteínas identificadas com no mínimo um peptídeo único, alta confiança e presentes em duas ou três replicatas biológicas.

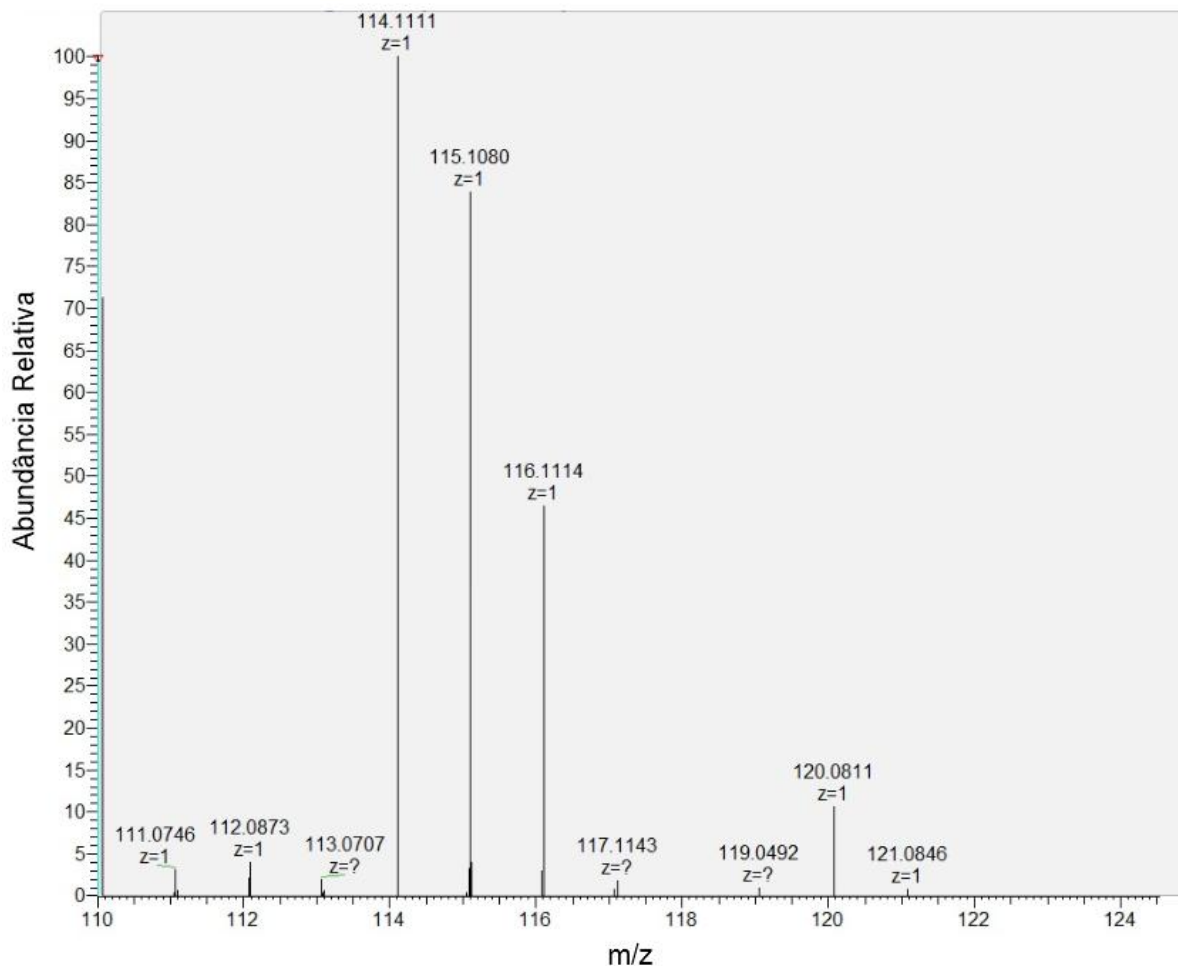
Figura 12 – Exemplo de espectrograma de MS² apresentando padrão de fragmentação de íons resultantes da dissociação em HCD utilizado para identificação da sequência do peptídeo por PSM



Fonte: dados da pesquisa.

A análise quantitativa dos íons repórteres foi realizada por meio do software PatternLab (*PatternLab for Proteomics 4.0*), utilizando a ferramenta Isobaric Analyzer contida no programa de acordo com as recomendações propostas pelo designer do software (CARVALHO et al., 2016). Foram consideradas diferencialmente expressas as proteínas que satisfizeram os seguintes parâmetros: quantificação de dois ou mais peptídeos únicos por proteína; p-valor de corte de $<0,05$, baseado no procedimento de Benjamini-Hochberg; e valor de *fold change* $\leq 0,6$ e $\geq 1,5$. Essa análise foi realizada para todas combinações entre os estádios de desenvolvimento do fruto, (que foram E6/E3, E3/E3, E9/E6, E11/E3, E11/E6 e E11/E9), nas quais o resultado reportado de *fold change* (em logaritmo neperiano), quando positivo indica que a expressão da proteína foi maior na amostra correspondente ao numerador em relação ao denominador, e vice-versa. Esse resultado em logaritmo neperiano foi utilizado, em alguns casos, para plotagem de gráficos apresentando o *fold change* médio das mudanças de abundância durante o desenvolvimento do pericarpo, nos quais foi atribuído valor zero ao E3 como padrão inicial.

Figura 13 – Espectro de MS² mostrando a detecção dos íons repórteres (m/z: 114, 115, 116 e 117) utilizados na análise quantitativa dos peptídeos.



Fonte: dados da pesquisa.

As proteínas identificadas foram agrupadas de acordo com suas categorias funcionais e também com sua participação direta em processos celulares e rotas metabólicas. A classificação e agrupamento foi realizado manualmente, utilizando a descrição específica de cada proteína e conforme resultados de pesquisa nos bancos do *Kegg Pathway Database* (www.genome.jp/kegg/) e Uniprot. Para as proteínas não caracterizadas foi realizado um BLAST local, contra o banco de dados de *Arabidopsis*, por meio do software NCBI Genome Workbench – NIH (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/gbench/>). Quando possível, para classes de proteínas específicas, foi realizada comparação por meio de BLAST com bancos de dados disponíveis para parede celular (WallProtDB), peptidases e inibidores (MEROPS; CLEMENTE; JAMET, 2015; RAWLINGS; BARRETT; BATEMAN, 2012).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Histologia do desenvolvimento do pericarpo de *E. oleracea*

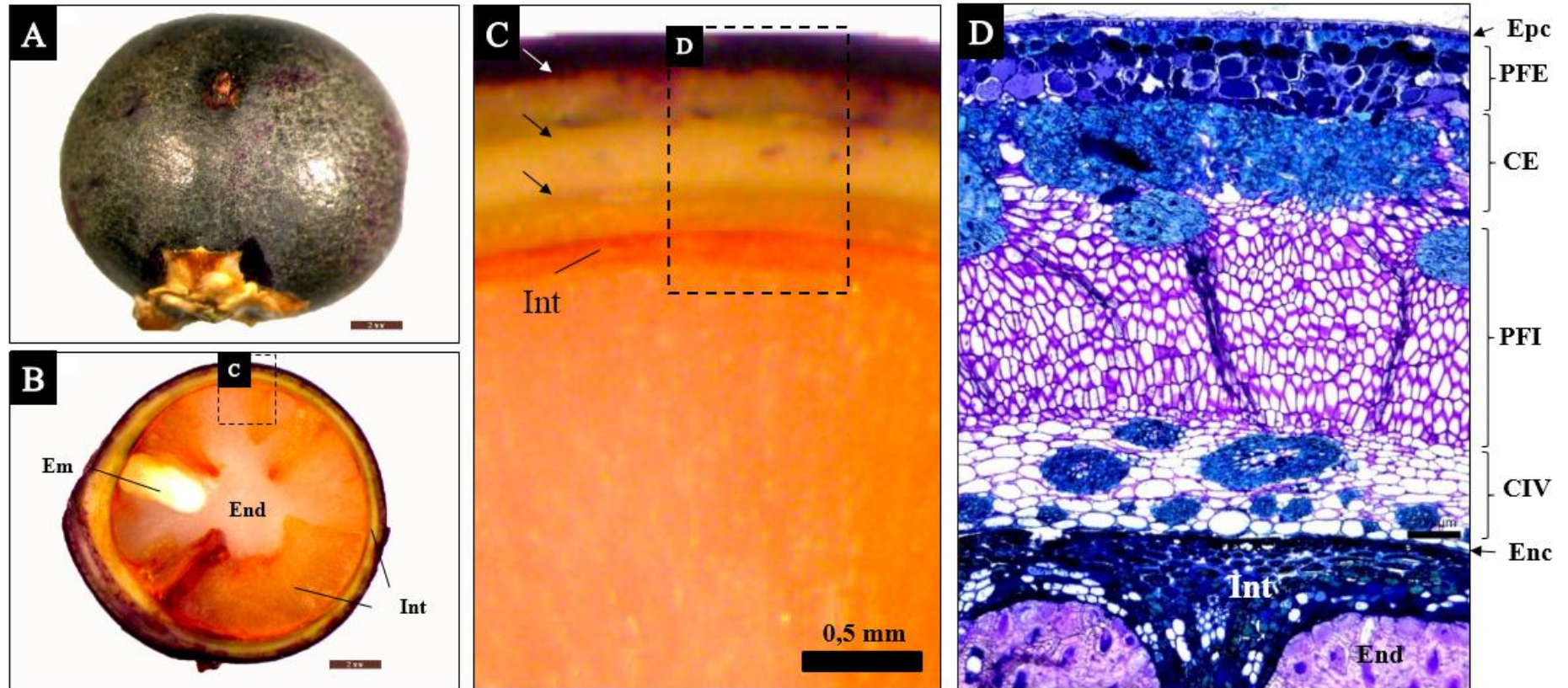
E. oleracea apresenta frutos monospermicos, de semente volumosa, embrião situado lateralmente, endosperma esbranquiçado e ruminado pelo tegumento, pericarpo carnoso de coloração roxo escuro na maturidade e endocarpo não esclerificado (Figura 14A-C).

No estágio maduro (E11), o pericarpo se apresenta estratificado, no qual é possível visualizar quatro camadas teciduais distintas (Figura 14C). A Figura 14D mostra todas as camadas em microscopia de luz, (i) a primeira camada é composta pelo epicarpo (Epc), derivado da epiderme externa do ovário, e o parênquima fundamental externo (PFE), tecido no qual acontece o acúmulo característico de antocianinas; (ii) logo abaixo situa-se uma camada esclerenquimática (CE), formada por braquiesclereídes de parede espessa e irregular; (iii) a terceira camada constitui-se de outra porção interna de parênquima fundamental (PFI), com células de paredes pecto-celulósicas finas, vacuoladas e de grande diâmetro; (iv) o último estrato de células mais interno (CIV), contém grande quantidade de feixes vasculares envoltos em uma bainha de esclerênquima, esse feixes se inserem em uma matriz parenquimática de células grandes, vacuoladas e com muitos espaços intercelulares. Paula (1975) descreve o pericarpo de maneira semelhante, porém com menor número de camadas quando trata como uma camada única o PFI e a CIV.

Ao longo do desenvolvimento do pericarpo, foram observadas mudanças estruturais e químicas no tecido (Figura 15). O estágio de botão floral apresenta uma composição de células com características meristemáticas, com parede delgada, núcleo espesso e volume reduzido, nota-se também cordões procambiais iniciando a diferenciação e uma região central com elevada atividade mitótica (Figura 15 E0, Figura 16A-B).

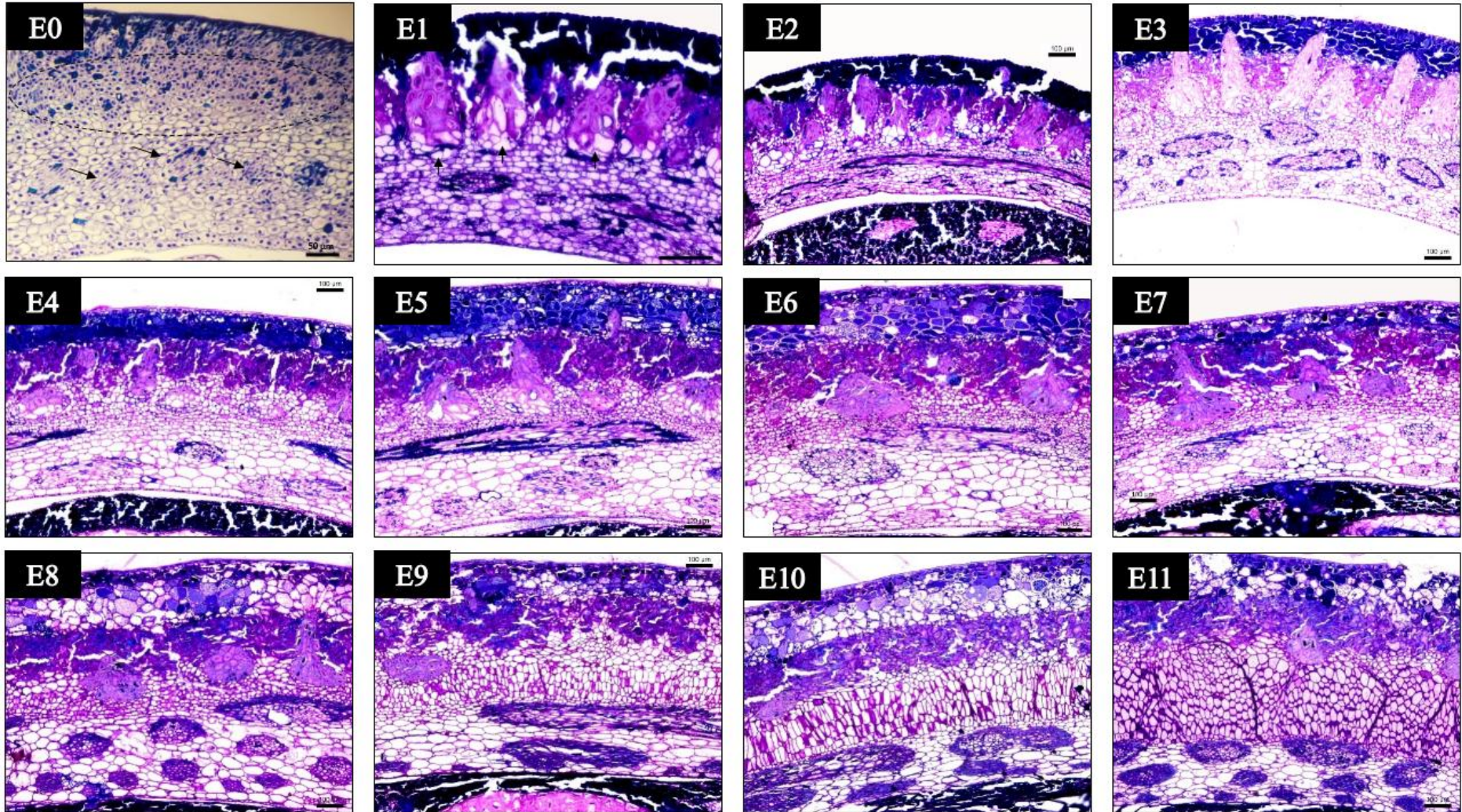
Durante o desenvolvimento do pericarpo da macaúba (*Acrocomia aculeata* - Arecaceae), também da subfamília Arecoideae, é reportada uma região meristemática, que dá origem a novas células de parênquima e idioblastos contendo ráfides e taninos, tal região foi denominada de meristema adaxial (REIS; MERCADANTE-SIMÕES; RIBEIRO, 2012). Por definição, o meristema adaxial (MA) corresponde a um tecido meristemático presente adaxialmente nas folhas vegetais, que contribui para o espessamento desse órgão (CUTLER; BOTHA; STEVENSON, 2011).

Figura 14 – Morfologia do fruto e semente de *E. oleracea* no estágio maduro (E11). A – visão geral do fruto inteiro; B – Visão de secção do fruto mostrando embrião (Em), endosperma ruminado (End) e integumento com rumações (Int); C – Detalhe do pericarpo com divisões de camadas (setas); D – Fotografia em microscópio de luz evidenciando as principais características do perfil transversal do pericarpo



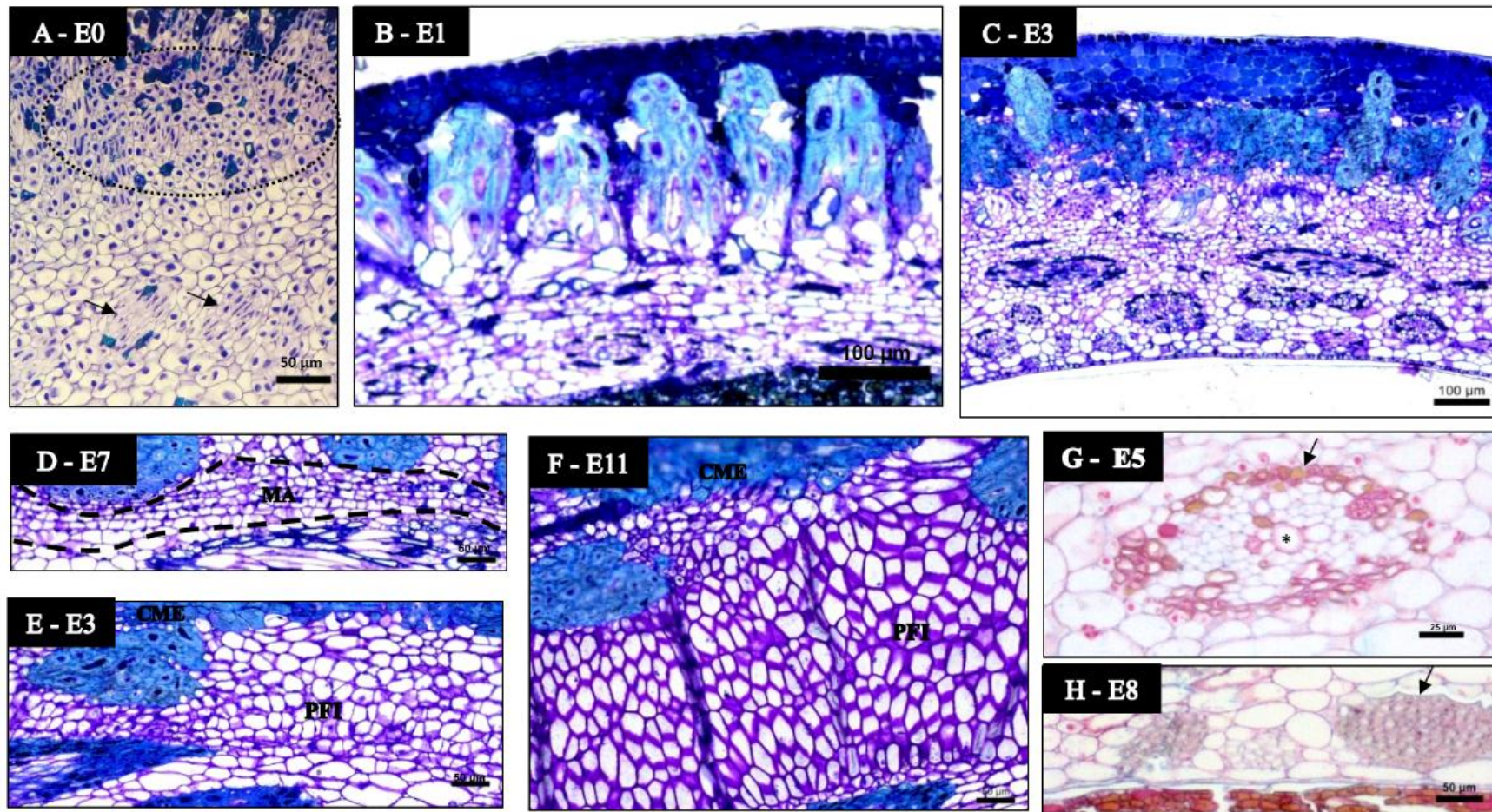
Fonte: dados da pesquisa. Epc - epicarpo, PFE - parênquima fundamental externo, CE - camada esclerenquimática mediana, PFI - parênquima fundamental interno, CIV - camada interna vascularizada, Enc - vestígios do endocarpo.

Figura 15 – Visão global do desenvolvimento do pericarpo de *Euterpe oleracea* em secção transversal de todos os estádios de maturação



Fonte: dados da pesquisa.

Figura 16 – Principais mudanças estruturais durante o desenvolvimento do pericarpo de *Euterpe oleracea*. A - detalhe do E0 mostrando o meristema central (MC, circulado) e os cordões procambiais em diferenciação (setas) B – diferenciação em grupos de células esclerenquimáticas; C – camada única de esclerênquima formada; D – Detalhe histológico do Meristema adaxial (MA) no estágio de maturação E7; E – Diferenciação do Parênquima fundamental interno (PFI) no estágio E8; F – padrão anatômico do PFI na maturidade; G e H – detalhe das mudanças dos feixes vasculares presentes camada mais interna do pericarpo, nos estádios E5 e E8 respectivamente, setas indicam abainha do feixe, * indica vaso condutor do xilema.



Fonte: dados da pesquisa.

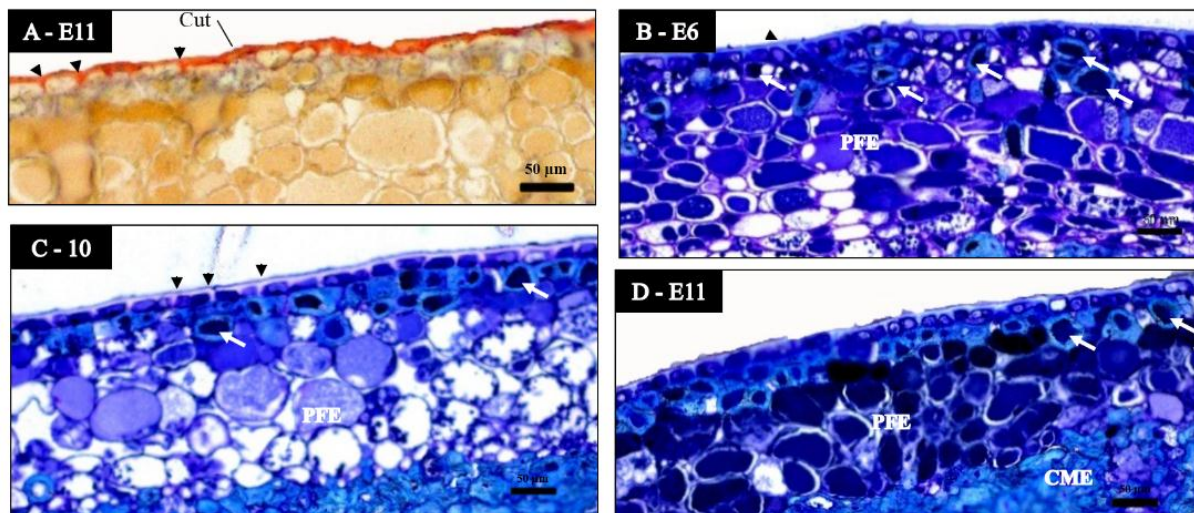
No presente estudo, o MA forma uma camada que acompanha toda extensão do pericarpo, que é em parte responsável pelo aumento em espessura do pericarpo, resultante da intensa divisão mitótica e formação de duas camadas de células totalmente distintas (Figura 15, Figura 16A-F). Algumas células na região do MA se dividem e iniciam rapidamente sua diferenciação em células esclerenquimáticas, diferenciação que ocorre em aglomerados de células separados que se projetam para a periferia do pericarpo, essas células apresentam parede celular espessa e lignificada, lume reduzido contendo compostos fenólicos e formato irregular (Figura 16A-C). A deposição e lignificação das paredes é descompassada e tem um sentido centrípeto, iniciando das células mais externas para as mais internas. Pontuações na parede são visíveis no início do processo de lignificação. Logo no estágio E3, esses aglomerados de células coalescem formando um tecido contínuo com várias camadas de células do tipo braquiesclereídes (Figura 16C).

A presença de esclerênquima no pericarpo é uma característica recorrente em várias espécies da família Arecaceae, sendo observada em *Oenocarpus minor*, na forma de feixes subepidérmicos de braquiesclereídes (MENDONÇA et al., 2008), também na periferia do pericarpo em *Eugeisona utilis* (BOBROV et al., 2012), no pericarpo de *Acrocomia aculeata*, juntamente com a presenças de fibras (MAZZOTTINI-DOS-SANTOS et al., 2015; REIS; MERCADANTE-SIMÕES; RIBEIRO, 2012) e também em várias espécies da tribo Borasseae, como *Latania lontaroides*, *Lodoicea maldivica* e *Borassus flabellifer* (ROMANOV et al., 2011).

Essa característica é importante pela proteção e resistência mecânica, que esse tipo de tecido esclerenquimático confere ao fruto e semente. Alguns frutos de Arecaceae apresentam pirênios, que é uma estrutura mais especializada de caráter pétreo, com células extremamente lignificadas e que se originam do pericarpo, por vezes do endocarpo, envolvendo toda semente, exceto na região do poro germinativo próximo ao embrião (MAZZOTTINI-DOS-SANTOS et al., 2015).

Com a formação dessa camada esclerenquimática, o pericarpo, que era um contínuo de células, isola uma porção de células parenquimáticas próximas do epicarpo, camada denominada parênquima fundamental externo (PFE; Figura 16C, Figura 17). Esse tecido é composto por cerca de 4 a 6 camadas de células, em geral de grande diâmetro e com paredes pecto-celulósicas delgadas. Essas células inicialmente mostram conteúdo citoplasmático denso, possivelmente compostos fenólicos (Figura 17B). Nos estádios de desenvolvimento intermediários, o citoplasma dessas células torna-se translucido e acumula antocianinas no final do desenvolvimento (Figura 17C-D).

Figura 17 – Detalhe do epicarpo e parênquima fundamental externo (PFE) do pericarpo de *Euterpe oleracea*. A – Detalhe da cutícula (Cut) no E11, pontas cheias indicam a deposição de cutina nas paredes anticlinais das células do epicarpo; B, C e D - Detalhe das mudanças do conteúdo celular das células do PFE nos estádios E6, E10 e E11, respectivamente, setas brancas indicam células taníferas próximas ao exocarpo



Fonte: dados da pesquisa.

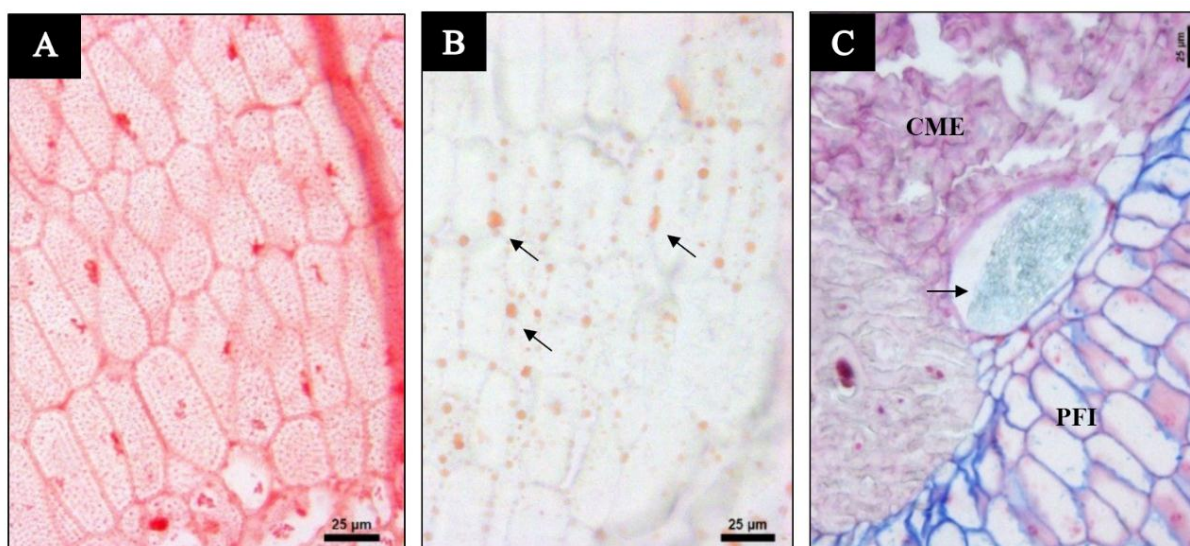
O MA persiste ativo até o estágio E7 com aparente atividade de divisão celular (Figura 16D). No E8, próximo do final do desenvolvimento, o conjunto total de células torna-se diferenciado no parênquima fundamental interno (PFI), o qual tem suas células expandidas no sentido anticlinal nos estádios posteriores (Figura 16E-F). Nos estádios finais, nessa camada é possível observar a presença o acúmulo de proteínas nas paredes dessas células (Figura 18A) e detecção de gotículas de lipídeos, por reação com sudan III (Figura 18B). É possível inferir que essa camada de diferenciação tardia, seja a principal responsável pelo acúmulo de proteínas e lipídeos e do pericarpo de *E. oleracea*.

Em *Acrocomia aculeata*, ocorre padrão semelhante de diferenciação do MA e deposição de reserva lipídica durante a fase final do desenvolvimento (MAZZOTTINI-DOS-SANTOS et al., 2015; REIS; MERCADANTE-SIMÕES; RIBEIRO, 2012). Semelhantemente, em *Elaeis guineenses* praticamente todo o conteúdo lipídico do pericarpo é acumulado nas últimas três semanas de desenvolvimento do fruto (JEJE; ODETOLA; ZIMMERMANN, 1978).

Os feixes vasculares ficam imersos em matriz parenquimática localizada na parte inferior do pericarpo (Figura 16G-H). Os feixes vasculares apresentam 2 a 3 elementos de vaso do xilema posicionado no centro do feixe, com floema distribuído em toda circunferência do feixe e grande quantidade de parênquima. Essa distribuição tipifica o feixe vascular como anficrival. Mais externamente situa-se uma bainha de células com citoplasma denso, conteúdo

fenólico, ligeiramente maiores que as células do parênquima e com paredes ligeiramente espessadas (Figura 16G). Essa bainha a partir do estágio E8 se torna esclerificada, com significativo espessamento da parede, redução do lúmen, algumas células mantêm o conteúdo fenólico. A maioria das células internas do feixe também esclerificam e aparentemente o feixe perde a função de transporte (Figura 16H).

Figura 18 – Detalhe do parênquima fundamental interno (PFI) e principais compostos armazenados no estágio final de desenvolvimento (E11) do pericarpo de *Euterpe oleracea*. A - Detalhe do acúmulo de proteínas na parede celular coradas com xilidine ponceau; B – Detecção de lipídeos (corante Sudan III) nas células do PFI, na forma de gotículas de lipídeos (setas); C – Cristais de oxalato de cálcio na forma de ráfides (seta), visualizado numa cavidade entre a CME o PFI.



Fonte: dados da pesquisa.

No epicarpo e endocarpo (epiderme externa e interna, respectivamente), observou-se padrão de divisão celular unicamente no plano anticlinal, cujas células oriundas dessas divisões são de pequeno diâmetro, formato retangular e paredes pectocelulósicas. Esse padrão de divisão não contribuiu com o aumento da espessura do pericarpo. Com o desenvolvimento da semente o endocarpo é pressionado pelo tegumento e colapsa no final do desenvolvimento.

No epicarpo, ocorre o processo de cuticularização, que corresponde a deposição de cutina e cera acima do limite da parede. A cutinização das paredes periclinais e anticlinais das células epidérmicas também acontece (Figura 17). Concomitantemente, forma-se uma camada de células imediatamente abaixo, que são distintas das demais do PFE, as quais apresentam paredes lignificadas, espessadas e conteúdo celular provavelmente tanífero ou fenólico (Figura 17B-D, setas brancas).

A presença de células taníferas e idioblastos fenólicos, por vezes esclerenquimáticos, próximas a epiderme do pericarpo é característica comum entre as

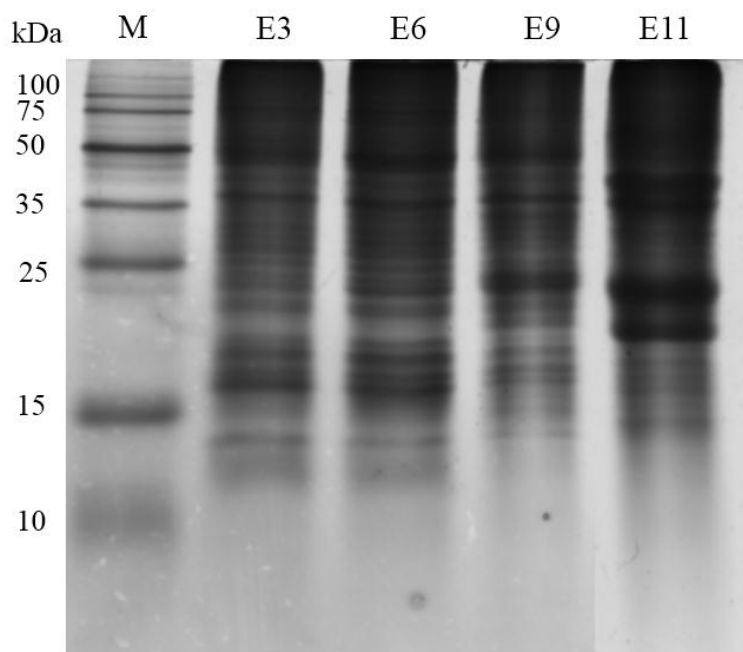
Arecaceae (MAZZOTTINI-DOS-SANTOS et al., 2015). Mendonça et al. (2008), estudando o pericarpo de *Oenocarpus minor* (Arecoideae) percebeu células taníferas semelhantes abaixo da epiderme além de outras maiores e mais abundantes no mesocarpo. Em algumas espécies como *Satranala decussivalvae*, *Bismarckia nobilis*, *Medemia argun*, *Lodoicea maldivica* e *Latania lontaroides* forma-se uma estrutura denominada hipoderme, oriunda das células do parênquima que se especializam para a função de revestimento e proteção (ROMANOV et al., 2011).

A presença de cristais do oxalato de cálcio, na forma de ráfides, também foi verificada no pericarpo, situado numa espécie de cavidade entre a camada esclerenquimática e o PFI, foi raramente encontrado no pericarpo e até o presente momento não foi reportado para *E. oleracea* (Figura 18C). Em *A. aculeta* foi descrito grande quantidade de idioblastos contendo ráfides no endocarpo de seu fruto (MAZZOTTINI-DOS-SANTOS et al., 2015; REIS; MERCADANTE-SIMÕES; RIBEIRO, 2012). As ráfides são encontradas ubiquamente em Arecaceae, sendo conhecidas em todos os órgãos de palmeiras, especialmente em embriões da subfamília Arecoideae (UHL; DRANSFIELD, 1988; ZONA, 2004).

5.2 Análise proteômica do pericarpo de *E. oleracea*

A análise prévia por meio de SDS-PAGE das proteínas extraídas do pericarpo de *E. oleracea* (Figura 19), revelou que significativas diferenças entre os perfis eletroforéticos de cada estádios de desenvolvimento, como a intensificação de bandas no E11 (próximo da altura de 25 e 35 kDa). Além disso, foi visualizado a redução da abundância de bandas de baixa massa molecular dos estádios finais (aproximadamente 13 kDa). Os estádios iniciais do desenvolvimento (E3 e E6) apresentam perfil bastante semelhante e consideravelmente mais complexo do que os estádios finais (E9 e E11).

Figura 19 – SDS-PAGE do perfil de proteínas dos estádios de desenvolvimento (E3, E6 E9 e E11) do pericarpo de *E. oleracea*



Fonte: dados da pesquisa.

5.2.1 Identificação de proteínas

A análise proteômica das amostras do pericarpo de *E. oleracea*, resultou na identificação total de 4.286 proteínas com no mínimo um peptídeo único e FDR de 1% (Tabela suplementar, anexada em mídia digital). Dessas proteínas, cerca de 55,6% foram identificadas a partir de sequências de proteínas do genoma de *Elaeis guineensis*, que é a palmeira mais próxima filogeneticamente (BARRETT et al., 2016), 40,1% foram identificadas com base no banco de proteínas de *Phoenix dactylifera* e o restante (4,3%) identificadas como proteínas de *A. thaliana* e outras palmeiras.

As proteínas identificadas foram divididas em 19 classes funcionais, com base na verificação da descrição das proteínas na base de dados *Kegg Pathway Database* (www.genome.jp/kegg/, Figura 20, Tabela suplementar). Proteínas envolvidas em várias funções foram contabilizadas em mais de uma classe. As classes com maior número de proteínas identificadas (excetuando-se outras) foram de proteínas envolvidas com o metabolismo de carboidratos, metabolismo de aminoácidos, não caracterizadas, proteínas de parede celular, biossíntese de proteínas e metabolismo de lipídeos (Figura 20).

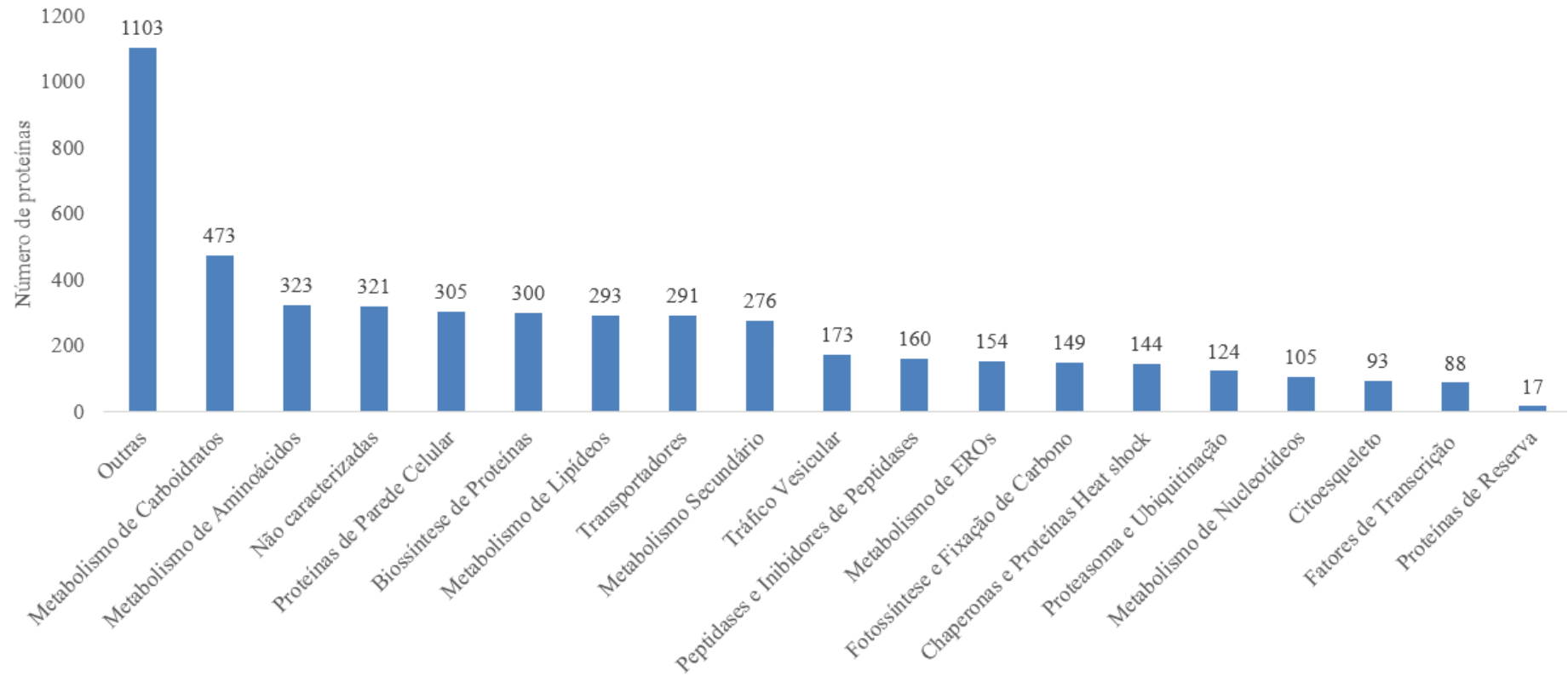
Adicionalmente, as classes de metabolismo de carboidratos, metabolismo de aminoácidos, metabolismo de lipídeos e metabolismo secundários foram subdivididas para

detalhamento de quais proteínas foram identificadas nas rotas metabólicas específicas que compõem esses processos metabólicos mais amplos (Figura 21, Tabela suplementar).

Dentre as rotas do metabolismo de carboidratos, a glicólise e gliconeogênese foi a rota com maior número de proteínas identificadas, seguida por metabolismo da sacarose e amido (Figura 21 A). A maioria das proteínas do metabolismo secundário identificadas, são relacionadas às vias dos fenilpropanóides e biossíntese de flavonoides (Figura 21 B). Do metabolismo de lipídeos as classes com maior abundância de proteínas foram de degradação e biossíntese de ácidos graxos (Figura 21 C). A subclasse do metabolismo de aminoácidos com maior número de proteínas identificadas (88 proteínas) foi do metabolismo de cisteína e metionina (Figura 21 D).

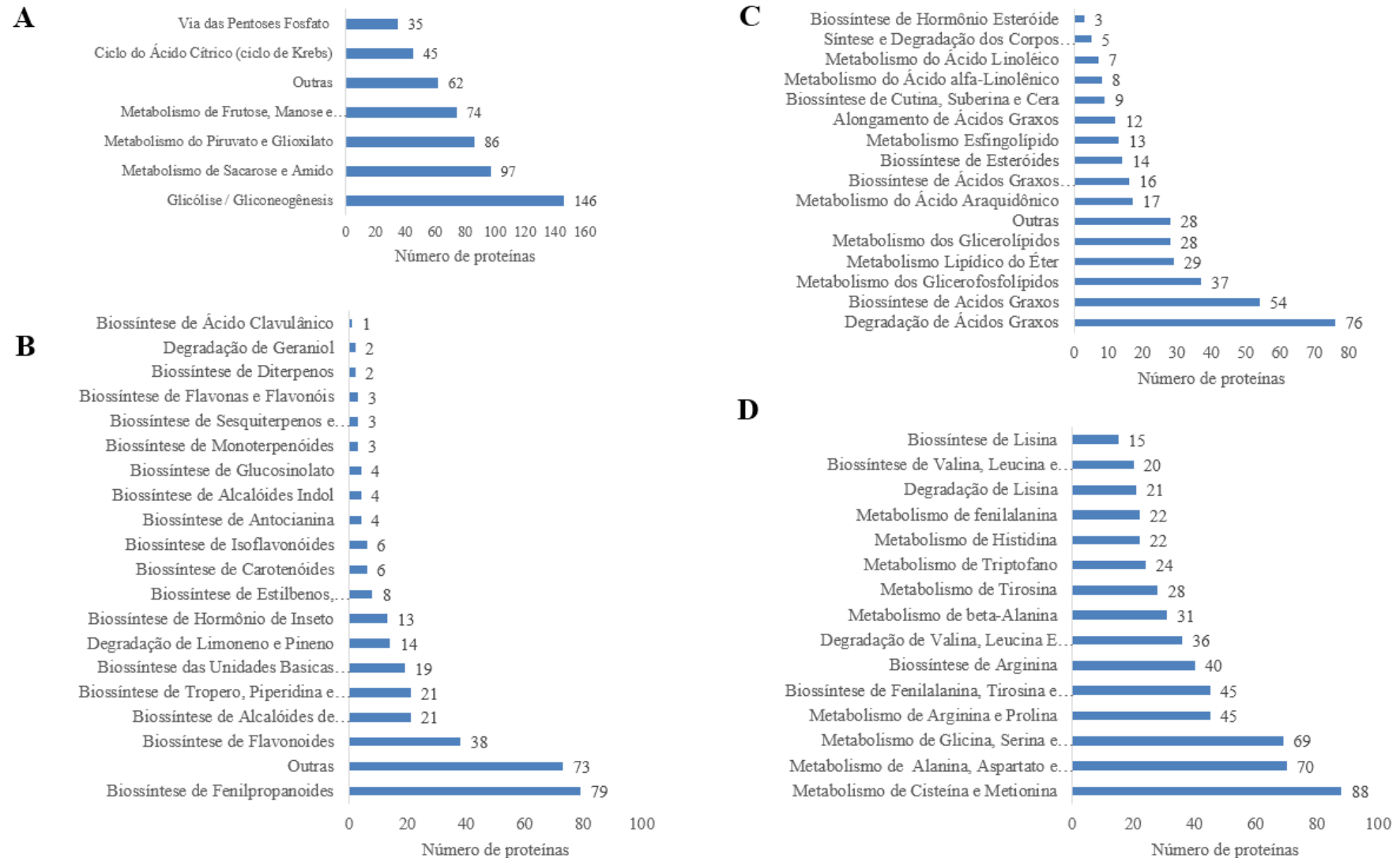
Entre os estádios de desenvolvimento não houve diferença em termos de identificação, qualitativamente as proteínas identificadas estavam presentes em todas as amostras, com exceção do E11 que diferiu no número de proteínas, porém todas compartilhadas com os demais estádios. Portanto, no tocante ao desenvolvimento do fruto será explorado principalmente os resultados quantitativos da abundância relativa das proteínas. Essa similaridade qualitativa, é aparentemente comum quando utiliza-se a técnica de marcação iTRAQ, sendo explorado apenas os dados quantitativos, entretanto estes dados apresentam maior confiabilidade e precisão quanto a abundância da proteína na amostra.

Figura 20 – Resultado do total de proteínas identificadas na análise proteômica do pericarpo de *E. oleracea*.



Fonte: dados da pesquisa.

Figura 21 – Número de proteínas relacionadas nas subclasses de metabolismo de carboidratos (A), metabolismo secundário (B), metabolismo de lipídeos (C) e metabolismo aminoácidos (D) do pericarpo de *E. oleracea* em desenvolvimento.



Fonte: dados da pesquisa.

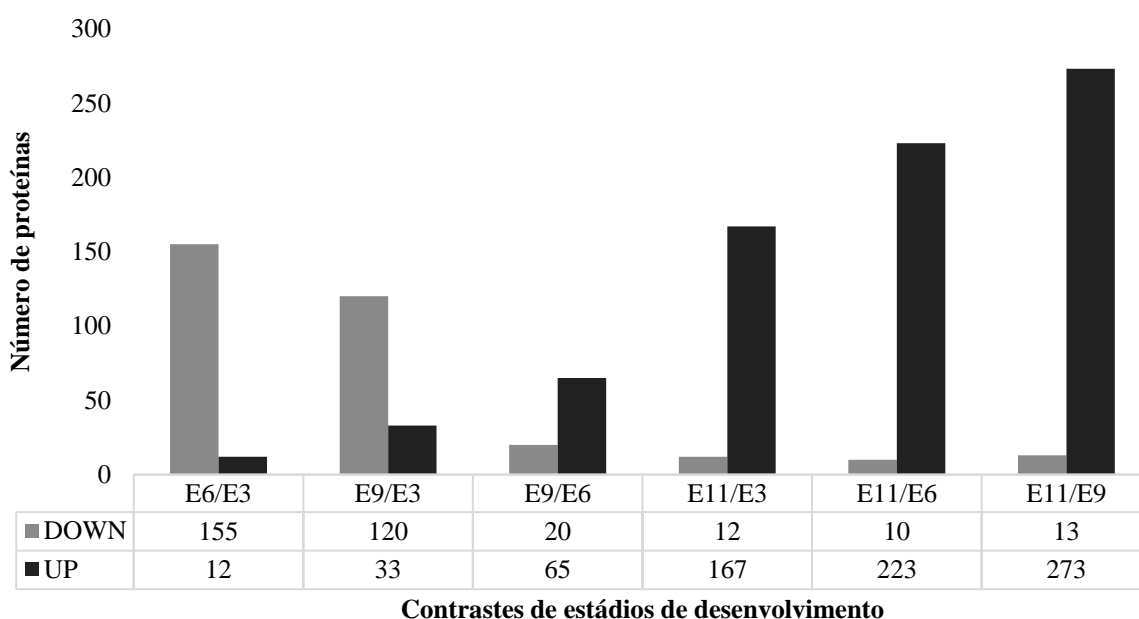
5.2.2 Análise quantitativa do proteoma

A análise quantitativa das proteínas do pericarpo de *E. oleracea*, resultou em 476 proteínas diferencialmente expressas ($p < 0,05$) ao longo do desenvolvimento do fruto, com mínimo de dois peptídeos únicos (Tabela suplementar, aba Quant). Grande parte das proteínas foi diferencialmente abundante somente nos contrastes com o estágio E11 (Figura 22).

Nos contrastes entre os estádios iniciais, existe maior proporção de proteínas com diminuição de abundância (*Down* reguladas) de uma soma de 155 proteínas, proteínas envolvidas em sua maioria com processos como metabolismo de carboidratos e biossíntese de amino ácidos, enquanto que apenas 12 proteínas tiveram seus níveis de abundância elevados (Figura 22). O quadro se repete com a relação entre o E3 e o E9. No entanto, a partir do contraste E9/E6 e principalmente com relação ao E11 o padrão se inverte, com a maioria das proteínas apresentando abundância diferencial elevada (*Up* reguladas), especialmente proteínas envolvidas no metabolismo de carboidratos e metabólitos secundários (Figura 23).

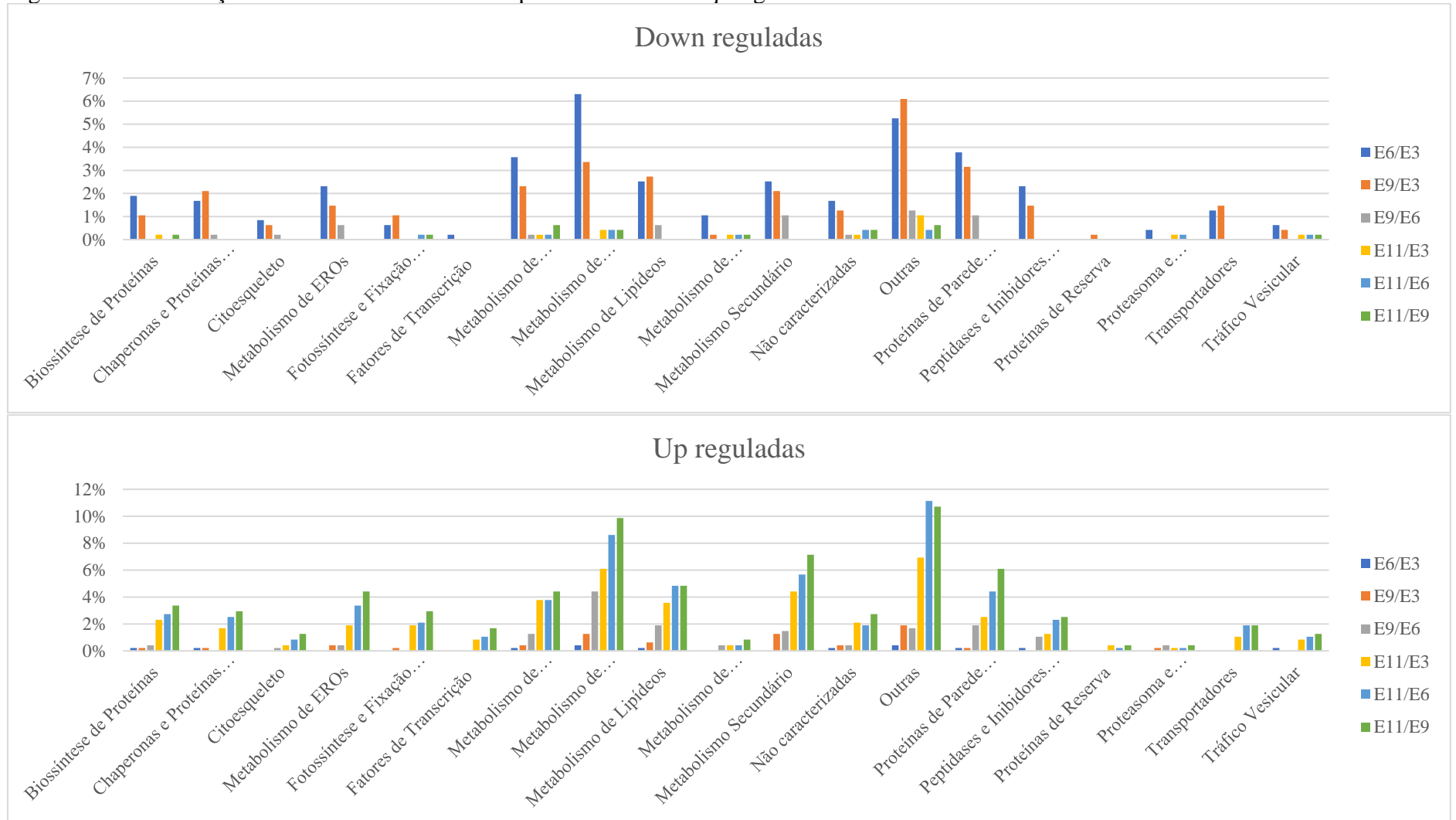
Ao longo do desenvolvimento, as classes de proteínas que mais sofreram regulação foram metabolismo de carboidratos, metabolismo secundário metabolismo de aminoácidos, outras e metabolismo de lipídeos (Figura 23).

Figura 22 – Divisão do número de proteínas *Up* e *Down* reguladas entre os contrastes dos estádios de desenvolvimento do pericarpo de *E. oleracea*



Fonte: dados da pesquisa.

Figura 23 – Distribuição nas classes funcionais das proteínas *Down* e *Up* reguladas nos contrastes entre os estádios de desenvolvimento



Fonte: dados da pesquisa.

5.2.2.1 Proteínas envolvidas no metabolismo de carboidratos

O metabolismo de carboidratos é central em todo o desenvolvimento, desde os estádios iniciais nos quais existe elevada divisão celular, quando fornece as unidades básicas para biossíntese de todas as macromoléculas celulares essenciais, como ácidos nucleicos, proteínas, lipídeos de membrana e parede celular, até mesmo na maturação do fruto participando do acúmulo de metabólitos secundários, açúcar e senescência do fruto.

No presente estudo, 48 proteínas do metabolismo de carboidratos foram diferencialmente expressas no pericarpo de *E. oleracea*, sendo 25 com abundância relativa unicamente elevada, 7 reduzidas e 16 que foram diferentemente reguladas, diminuindo e depois aumentando (esse padrão se repetiu para várias proteínas de outras classes) ao longo do desenvolvimento (Tabela 2).

A redução da abundâncias de proteínas como fosfoglicerato mutase (EC:5.4.2.12), frutose-bifosfato aldolase (EC:4.1.2.13) e diidrolipoil desidrogenase (EC:1.8.1.4) no estágio E6 (E6/E3), indica que a atividade glicolítica e produção de energia na forma de ATP foi superior no E3 do que E6, o que é também compatível com a redução da expressão da subunidade O da ATP sintase mitocondrial (EC:3.6.3.14) no estágio E6 (FC de 0,44 e 0,36; Tabela suplementar). Nos estádios finais de maturação, essas proteínas juntamente com as desidrogenases do piruvato/isocitrato (EC:1.2.4.1, EC:1.1.1.41) e a fosfoglicerato quinase (EC:2.7.2.3), envolvidas no metabolismo de carboidratos e respiração celular, são reguladas positivamente (Tabela 2). Tal padrão, foi semelhantemente observado no desenvolvimento do fruto de *Phoenix dactylifera* (MARONDEDZE; GEHRING; THOMAS, 2014).

Esses dados sugerem que o pericarpo de *E. oleracea* apresenta dois momentos de grande demanda metabólica durante o seu desenvolvimento. No primeiro momento (E3) esse metabolismo supri os requerimentos da divisão celular e produção de novas células e de tecidos, que foi observado na análise histológica (Figura 15, Figura 16) e o segundo relacionado ao amadurecimento do fruto, quando os frutos são de modo geral muito ativos metabolicamente, favorecendo o acúmulo de metabólitos, nutrientes e modificações estruturais (GIOVANNONI, 2004; SEYMOUR et al., 2013), mudanças que aparentemente iniciam no E9 e culminam no estágio maduro (E11) do pericarpo de *E. oleracea*.

O aumento da abundância de proteínas da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial também foi verificado no final do desenvolvimento. A expressão de duas subunidades do complexo I NADH desidrogenase (EC:1.6.5.3) foi substancialmente elevada no E11, juntamente com um componente do complexo IV citocromo c oxidase (EC:1.9.3.1)

que teve sua abundância majorada no mesmo estágio de desenvolvimento (Tabela suplementar 1). Isso indica o aumento da respiração no pericarpo de *E. oleracea*, no momento final do seu desenvolvimento. Esse padrão de aumento da respiração celular no final do desenvolvimento é característico de frutos climatéricos, geralmente em resposta a um pico de produção de etileno (GIOVANNONI, 2004). Adicionalmente, a presença no pericarpo da enzima 1-aminociclopropano-1-carboxilato oxidase (Tabela suplementar), ou ACC oxidase (EC:1.14.17.4), que junto com a ACC sintase são responsáveis pela regulação e produção de etileno no tecido vegetal (DONG; FERNANDEZ-MACULET; YANG, 1992), corrobora com a afirmativa de que o metabolismo do fruto de *E. oleracea* obedece ao padrão climatérico de desenvolvimento.

De modo geral, foi perceptível que o nível de expressão das proteínas envolvidas no catabolismo de carboidratos é regulado de maneira estreitamente coordenada com o desenvolvimento do fruto, de forma a suprir as demandas metabólicas de cada etapa de desenvolvimento, com maior preeminência os momentos marcados pela atividade mitótica e amadurecimento.

Tabela 2 – Proteínas diferencialmente expressas durante o desenvolvimento do pericarpo de *E. oleracea* envolvidas com o metabolismo de carboidratos

Proteína ID	Descrição	Fold change médio					
		E6/E3	E9/E3	E9/E6	E11/E3	E11/E6	E11/E9
XP_019708948.1	PREDICTED: 2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase [Elaeis guineensis]	0.4951	-	-	-	-	-
XP_008803614.1	PREDICTED: 6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating 1-like [Phoenix dactylifera]	0.5241	0.5633	-	-	2.0503	1.9175
XP_010917535.1	PREDICTED: 6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating 2, chloroplastic [Elaeis guineensis]	-	-	2.2819	-	-	-
XP_010943467.1	PREDICTED: aconitate hydratase, cytoplasmic-like [Elaeis guineensis]	-	-	-	-	1.9838	2.0017
XP_010941493.1	PREDICTED: dihydrolipoyl dehydrogenase, mitochondrial-like [Elaeis guineensis]	0.5957	-	2.3117	-	2.3798	2.1837
XP_008791284.1	PREDICTED: enolase [Phoenix dactylifera]	-	-	1.7092	-	-	-
XP_010930218.1	PREDICTED: fructokinase-1 [Elaeis guineensis]	0.6041	-	-	2.7649	3.4384	3.593
XP_010932289.1	PREDICTED: fructose-bisphosphate aldolase 1, cytoplasmic-like [Elaeis guineensis]	0.5939	0.5179	1.6803	1.0608	2.3257	2.3537
XP_008799938.1	PREDICTED: fructose-bisphosphate aldolase cytoplasmic isozyme-like [Phoenix dactylifera]	-	-	-	2.0117	2.4498	2.5093
XP_010912493.1	PREDICTED: fructose-bisphosphate aldolase, chloroplastic [Elaeis guineensis]	-	-	-	4.5177	-	2.5421
XP_010939741.1	PREDICTED: glucose-6-phosphate isomerase 1, chloroplastic [Elaeis guineensis]	0.5226	-	1.8058	2.2773	3.1772	-
XP_008811018.1	PREDICTED: glucose-6-phosphate isomerase 1, chloroplastic [Phoenix dactylifera]	0.522	-	-	-	-	-
XP_008786409.1	PREDICTED: glucuronoxylan 4-O-methyltransferase 3 [Phoenix dactylifera]	0.7687	0.4538	-	-	-	2.6538
XP_010942312.2	PREDICTED: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase A, chloroplastic [Elaeis guineensis]	-	-	-	-	3.5184	3.3804
XP_010930713.1	PREDICTED: isocitrate dehydrogenase [NAD] catalytic subunit 5, mitochondrial-like [Elaeis guineensis]	-	-	-	2.0689	3.3201	3.3003
XP_010941130.1	PREDICTED: L-lactate dehydrogenase A-like [Elaeis guineensis]	0.4291	0.4211	-	-	-	-
XP_008805334.1	PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: 6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating 1, chloroplastic-like [Phoenix dactylifera]	-	-	2.7899	-	-	-
XP_010908489.1	PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: alpha,alpha-trehalose-phosphate synthase [UDP-forming] 5 [Elaeis guineensis]	0.5993	0.4907	-	-	-	-
XP_008776997.1	PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: alpha-1,4 glucan phosphorylase L isozyme, chloroplastic/amyloplastic [Phoenix dactylifera]	-	-	2.895	-	-	-

XP_017701298.1	PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: bifunctional fucokinase/fucose pyrophosphorylase [Phoenix dactylifera]	-	-	-	0.3806	0.3545	0.3817
XP_010940832.1	PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha-3, chloroplastic [Elaeis guineensis]	-	-	2.2728	-	-	-
XP_010938368.1	PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: sucrose synthase 4 [Elaeis guineensis]	0.5627	2.0198	2.1212	2.7264	3.1614	1.5357
XP_010935901.1	PREDICTED: malate dehydrogenase, cytoplasmic [Elaeis guineensis]	0.6065	0.6175	-	2.8236	5.1449	5.4904
XP_010918525.1	PREDICTED: NAD-dependent malic enzyme 59 kDa isoform, mitochondrial [Elaeis guineensis]	0.5582	0.5822	-	-	2.0442	3.1268
XP_008786343.1	PREDICTED: phosphoenolpyruvate carboxykinase [ATP]-like [Phoenix dactylifera]	-	-	-	1.9194	3.4764	2.2842
XP_010917497.1	PREDICTED: phosphoglucomutase, cytoplasmic 2 [Elaeis guineensis]	0.6351	-	2.0689	4.0431	4.8647	3.6038
XP_017696421.1	PREDICTED: phosphoglucomutase, cytoplasmic 2-like [Phoenix dactylifera]	-	-	-	2.5831	2.7429	2.9832
XP_010936568.1	PREDICTED: phosphoglycerate kinase 3, cytosolic [Elaeis guineensis]	1.1688	-	-	2.6859	1.0576	1.8368
XP_010916659.1	PREDICTED: probable alpha,alpha-trehalose-phosphate synthase [UDP-forming] 7 [Elaeis guineensis]	-	0.6244	-	-	-	-
XP_010932642.1	PREDICTED: probable fructokinase-6, chloroplastic [Elaeis guineensis]	0.609	-	1.7489	2.6725	4.7875	3.3301
XP_010911601.1	PREDICTED: probable mannitol dehydrogenase [Elaeis guineensis]	1.0212	2.0917	1.7665	10.74	5.865	6.1966
XP_008809345.1	PREDICTED: probable mannitol dehydrogenase [Phoenix dactylifera]	0.4009	-	-	-	-	-
XP_008804304.1	PREDICTED: putative aconitate hydratase, cytoplasmic [Phoenix dactylifera]	0.5729	0.6213	-	-	2.375	2.0117
XP_010913868.1	PREDICTED: pyrophosphate--fructose 6-phosphate 1-phosphotransferase subunit alpha [Elaeis guineensis]	-	2.2233	5.0581	-	-	-
XP_008796200.1	PREDICTED: pyrophosphate--fructose 6-phosphate 1-phosphotransferase subunit alpha [Phoenix dactylifera]	-	-	-	-	-	2.7401
XP_008787025.1	PREDICTED: ribose-phosphate pyrophosphokinase 4 [Phoenix dactylifera]	-	-	-	-	-	2.3726
XP_008794578.1	PREDICTED: ribulose-phosphate 3-epimerase, cytoplasmic isoform [Phoenix dactylifera]	-	-	-	1.4434	2.1255	1.5857
XP_010907658.1	PREDICTED: sorbitol dehydrogenase [Elaeis guineensis]	0.5735	2.3537	3.1931	2.9125	3.5396	-
XP_008812457.1	PREDICTED: sorbitol dehydrogenase-like [Phoenix dactylifera]	-	2.6432	2.7429	-	-	-
XP_008788340.1	PREDICTED: starch synthase 3, chloroplastic/amyloplastic [Phoenix dactylifera]	-	-	1.8478	11.508	-	8.602
XP_008776278.1	PREDICTED: sucrose nonfermenting 4-like protein [Phoenix dactylifera]	-	-	-	-	2.2412	-
XP_010921619.1	PREDICTED: sucrose synthase 4 [Elaeis guineensis]	-	1.7986	-	-	-	-
XP_010937618.1	PREDICTED: triosephosphate isomerase, cytosolic [Elaeis guineensis]	-	-	-	-	2.832	2.2056
XP_008781273.1	PREDICTED: uncharacterized protein LOC103701091 [Phoenix dactylifera] (Q0WW53 - Phosphoglycerate mutase family protein)	0.4738	0.4868	-	-	3.2642	3.4973

XP_008801515.1	PREDICTED: uncharacterized protein LOC103715609 [Phoenix dactylifera] (Q0WPA5 - O-fucosyltransferase family protein)	-	-	-	-	-	2.2524
XP_010920077.1	PREDICTED: uncharacterized protein LOC105044009 [Elaeis guineensis] (A0A1I9LTS6 - Heteroglycan glucosidase 1)	-	-	-	2.9183	3.297	3.7136
XP_010923122.1	PREDICTED: uncharacterized protein LOC105046272 [Elaeis guineensis] (A0A1I9LR68 - Glycosyl hydrolase family protein)	-	-	-	2.2345	2.1793	2.5043
XP_008804801.1	PREDICTED: UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase [Phoenix dactylifera]	0.5839	-	1.5699	-	-	2.1858

Fonte: dados da pesquisa.

5.2.2.2 Proteínas envolvidas no metabolismo secundário

Durante o desenvolvimento do pericarpo de *E. oleracea*, das 276 proteínas identificadas do metabolismo secundário, 47 proteínas foram diferencialmente expressas, em pelo menos um contraste analisado (Tabela 4).

A via do metabolismo secundário com maior número proteínas reguladas foi via dos fenilpropanóides, com 22 proteínas diferencialmente expressas. Essa via nas plantas contribui de forma essencial para as respostas contra estresses bióticos e abióticos do ambiente, tendo importante papel adaptativo para gimnospermas e angiospermas de modo geral (VOGT, 2010). Além desse importante papel, no caso específico de *E. oleracea* essa via é objeto de grande interesse pelo seu envolvimento na produção de ácidos fenólicos com propriedades funcionais e precursores para biossíntese de flavonoides.

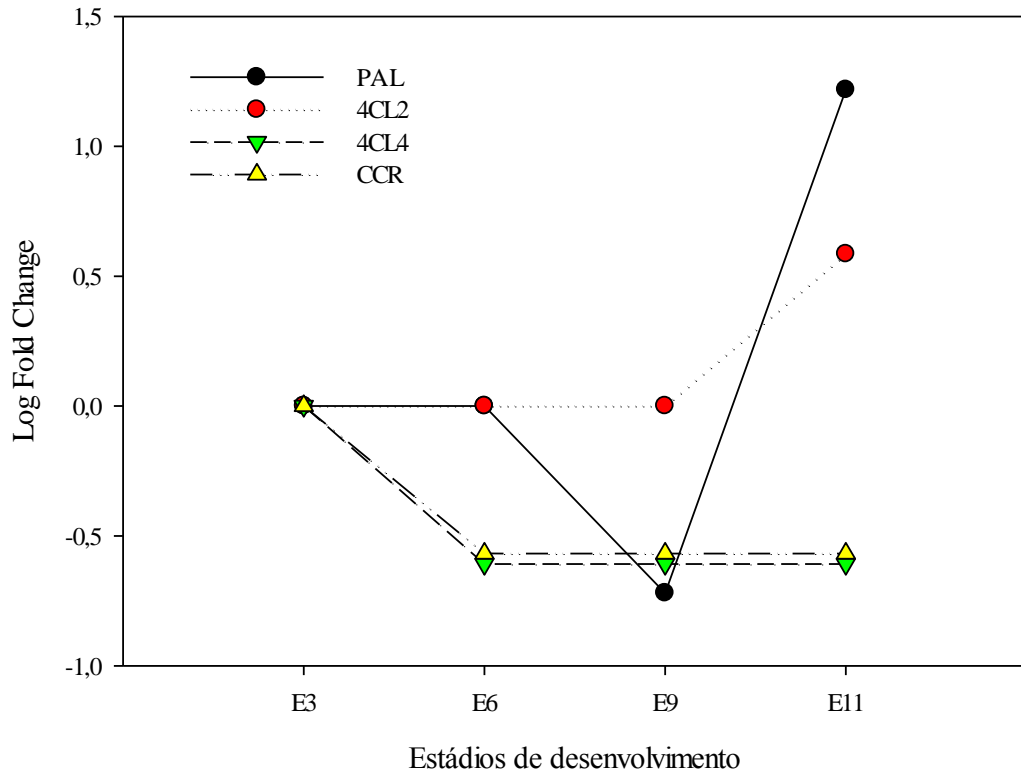
A fenilalanina amônia-liase (PAL - EC 4.3.1.24), foi a proteína da via mais intensamente regulada durante o desenvolvimento do pericarpo (Tabela 4, Figura 24). Essa enzima é regulada para um nível de abundância menor no estágio E9 (E9/E3: 0,42 e E9/E6:0,55) e altamente expressa no E11, com níveis de expressão até 10 vezes maiores (Figura 24). Além da PAL, outras 15 enzimas tiveram aumento no nível de expressão no E11. Esses dados sugerem que no amadurecimento do fruto de *E. oleracea*, toda via de fenilpropanóides é estimulada e o acúmulo de compostos fenólicos ocorre no período final do desenvolvimento. Esse estímulo também é importante na produção do precursor *p*-cumaril-CoA para biossíntese de flavonoides e antocianinas.

A PAL é enzima chave da via dos fenilpropanóides, responsável pela desaminação não oxidativa do aminoácido aromático fenilalanina que gera o ácido cinâmico, que é a reação inicial da via dos fenilpropanóides (VOGT, 2010). Várias cópias do gene da PAL são encontrados nas plantas, de quatro em *Arabidopsis* até nove em arroz, os quais respondem diferenciadamente a estresses, além de serem expressos de maneira controlada em função do desenvolvimento e posição (BHUIYAN et al., 2008; HAMBERGER et al., 2007). No início do desenvolvimento do pericarpo (E3 e E6), a maior expressão da PAL pode estar relacionada na produção de compostos de defesa contra patógenos e inibição da herbivoria, além da produção de células lignificadas nesse estágio.

As isoformas 2 e 4 da enzima 4-cumarato:CoA ligase (4CL - EC 6.2.1.12) também apresentaram a mesma tendência redução e aumento da abundância, no início e final do desenvolvimento, respectivamente. Essa diferença temporal se deu alternada entre as duas isoformas (Tabela 4, Figura 24). Essa proteína realiza a ligação da coenzima-A ao ácido 4-

cumárico, formando *p*-cumaril-CoA, compostos importante nas diversas ramificações do metabolismo secundário (VOGT, 2010).

Figura 24 – Variação da abundância relativa nos diferentes estádios de desenvolvimento do pericarpo de *E. oleracea* (E3, E6, E9 e E11) para as proteínas fenilalanina amônia-liase (PAL), 4-cumarato:CoA ligase 2 e 4 (4CL2, 4CL4) e cinamil-CoA redutase (CCR)



Fonte: dados da pesquisa. Log: dados transformados em logaritmo neperiano.

Em *Arabidopsis* são expressas quatro isoformas da enzima 4CL, que apresentam papéis sobrepostos e distintos no metabolismo de fenilpropanóides, uma vez que a 4CL1 e 4CL2 são expressas preferencialmente em células lignificadas, 4CL4 também contribui de forma moderada na biossíntese de lignina e a 4CL3 é expressa em uma ampla gama de tipo de células, sendo correlacionada na biossíntese de flavonoides (LI et al., 2015). No presente estudo, a maior expressão de 4CL4 no E3 pode estar relacionada com a diferenciação e lignificação da camada de braquiesclereídes do pericarpo, que foi observada desde o E3, enquanto que no E11 o acúmulo de 4CL2 acompanha a regulação geral da via, sugerindo uma possível sobreposição de papéis entre 4CL2 e 4CL3 no acúmulo de flavonoides e antocianinas (Figura 24).

Além da PAL e 4CL4, a enzima cinamil-CoA redutase (CCR - EC 1.2.1.44) teve maior expressão no E3. Essa enzima é responsável pela redução, dependente de NADPH, dos compostos p-cumaril-CoA, Cafeoil-CoA e feruloil-CoA, reação que ramifica e desvia o fluxo de carbono na via dos fenilpropanóides para a produção de precursores da biossíntese de monolignóis, lignanas e lignina (VOGT, 2010). O *knock out* do gene CCR1 em *Arabidopsis*, resulta em considerável redução da produção de lignina e acúmulo de feruloil malato (DERIKVAND et al., 2008). Adicionalmente, o final do desenvolvimento (E11), a enzima cinamil álcool desidrogenase (EC:1.1.1.195) teve nível de abundância elevado, a qual catalisa a reação seguinte à CCR na produção dos álcoois precursores de lignina. cumaril, coniferil e sinapil. Assim, esses dados indicam que a expressão das principais enzimas da via dos fenilpropanóides é maior no início e final do desenvolvimento, favorecendo a produção de lignina e ácidos fenólicos no pericarpo de *E. oleracea*.

O nível de expressão de 10 peroxidases no pericarpo variou grandemente durante o desenvolvimento (Tabela 4). Sete peroxidases foram diferencialmente reguladas em um único momento do desenvolvimento (peroxidases 3₍₃₎, 31, 64, 72₍₂₎), ao passo que outras três foram inversamente reguladas em ocasiões diferentes (12, 35 e 72).

Todas essas enzimas são da classe III de peroxidases (EC:1.11.1.7, doador: peróxido de hidrogênio oxiredutase), família multigênica presente em todas as plantas terrestres, com marcante versatilidade catalítica e envolvidas em uma ampla gama de processos durante todo ciclo de vida vegetal (BAKALOVIC et al., 2006; PASSARDI et al., 2005). Um processo tipicamente atribuído as peroxidases é oxidação de monolignóis, que constitui o último passo de formação do polímero de lignina, de extrema importância para o desenvolvimento células traqueais e adaptação das plantas ao ambiente terrestre (FERNÁNDEZ-PÉREZ et al., 2015). Além desse papel na lignificação da parede secundária de plantas, as peroxidases também estão envolvidas no crescimento celular, pela regulação e produção apoplástica de espécies reativas de oxigênio (EROs), que agem quebrando ligações covalentes dos componentes poliméricos da parede celular, resultando no seu afrouxamento e permitindo a expansão da célula movida pela pressão de turgor (FRANCOZ et al., 2015).

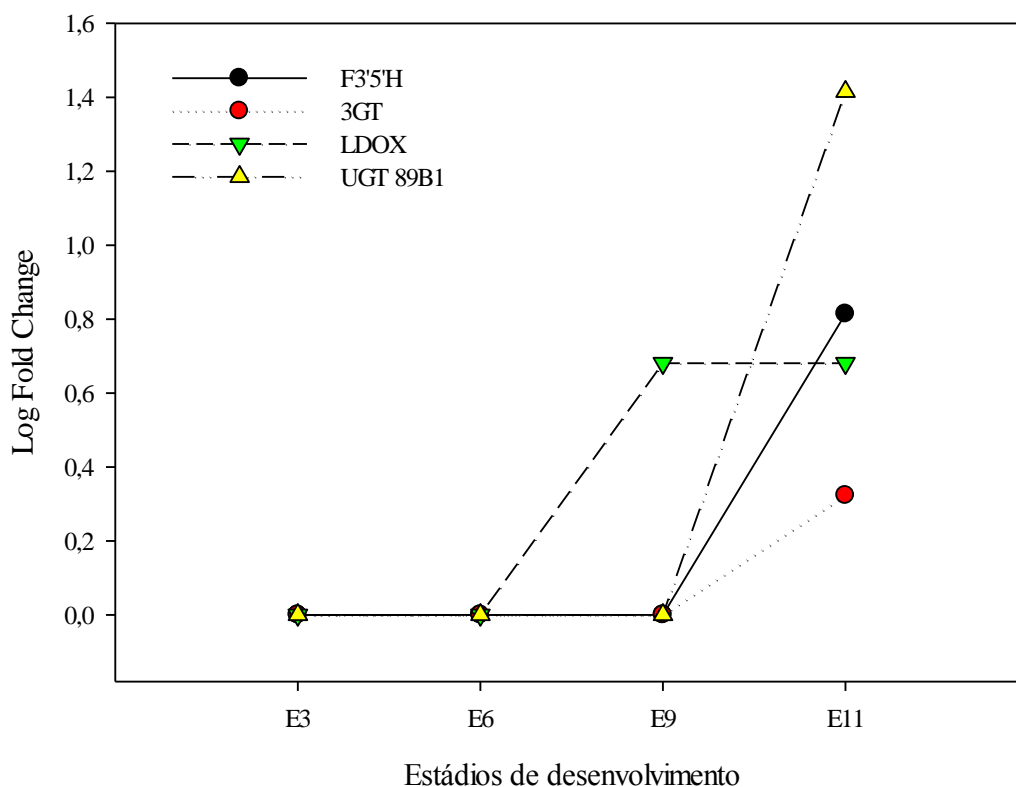
Das peroxidases encontradas no presente estudo, apenas para as isoenzimas 64 e 72 existem evidências experimentais do envolvimento na oxidação de monolignóis e consequente produção de lignina, como por exemplo, o *knock out* da PRX 72 em *Arabidopsis* causa afinamento das paredes secundárias das fibras interfasciculares do caule (FERNÁNDEZ-PÉREZ et al., 2015).

No pericarpo de *E. oleracea* a lignificação é praticamente constante durante o desenvolvimento. Devido aos diferentes papéis das peroxidases no desenvolvimento vegetal é forçoso concluir uma relação totalmente direta, entretanto, é possível inferir que as peroxidases com maior expressão no E3 e E6 (Tabela 4), estavam em grande parte comprometidas com o processo de lignificação das células, uma vez que ocorre intensa diferenciação de braquiesclereídes (peroxidases 3, 12, 35 e 72). A peroxidase 31, que foi regulada positivamente apenas no E9 (Tabela 4), provavelmente está implicada na expansão das células do PFI e lignificação das bainhas dos feixes vasculares, processos que ocorrem nesse momento do desenvolvimento. As demais peroxidases positivamente reguladas no E11 (peroxidases 3₍₂₎, 12, 35, 64 e 72; Tabela 4), estão possivelmente relacionadas no processo de amadurecimento do fruto, no qual existe uma correlação com o aumento da atividade de peroxidases que atuam na modificação da parede, regulando sua extensibilidade (ANDREWS et al., 2000; PASSARDI et al., 2005).

Com relação a via biosintética de flavonoides e antocianinas, na presente análise quantitativa cinco proteínas foram diferencialmente expressas durante o desenvolvimento (Tabela suplementar, Tabela 4). Dentre as quais, quatro proteínas de grande relevância para biossíntese de flavonoides pigmentados tiveram seus níveis de expressão aumentados no período final do desenvolvimento (E9 e E11), que foram: flavonoide 3'5'-hidroxilase (F3'5'H), leucoantocianidina dioxigenase (LDOX/ANS) antocianidina O-3glicosiltransferase (3GT) e UDP-glicosiltransferase 89B1 (UGT). O aumento da abundância da LDOX se dá no E9 e enquanto que a F3'5'H e 3GT ocorre no E11 (Figura 25).

Essas enzimas executam as reações finais da rota de biossíntese de flavonoides. A enzima F3'5'H (EC:1.14.13.88) é responsável pela adição de hidroxilas nas posições 3' e 5' do anel B nos di-hidroflavonoides, reação que é essencial para a produção de antocianinas do tipo delphinidina, que confere a coloração azul e violeta em flores (FALCONE FERREYRA; RIUS; CASATI, 2012). A LDOX (EC:1.14.11.19) realiza a conversão de leucoantocianidina em antocianidina, a expressão dessa proteína é essencial para síntese de proantocianinas, antocianinas e desenvolvimento de vacúolos em *Arabidopsis* (ABRAHAMS et al., 2003). A enzima 3GT (EC:2.4.1.115) utiliza UDP-glicose para glicosilar antocianidinas, reação de síntese das antocianinas (HOLTON; CORNISH, 1995).

Figura 25 – Variação da abundância relativa nos diferentes estádios de desenvolvimento (E3, E6, E9 e E11) para as proteínas flavonoide 3'5'-hidroxilase (F3'5'H), leucoantocianidina dioxigenase (LDOX), antocianidina O-3glicosiltransferase (3GT) e UDP-glicosiltransferase 89B1 (UGT)



Fonte: dados da pesquisa. Log: dados transformados em logaritmo neperiano.

Esses dados sugerem que a expressão das enzimas relacionadas com os passos iniciais da via de biossíntese de flavonoides, como chalcona sintase, chalcona isomerase e flavanona 3-hidroxilase, permanece sem alterações significativas ao longo dos estádios analisados, enquanto que a abundância das proteínas responsáveis pelos passos finais aumenta.

Outra proteína que apresentou a controle positivo de abundância de foi a UDP-glicosiltransferase 89B1 (UGT), com *fold change* de 4,1 no E11 (Tabela 4). Essa UGT (EC:2.4.1.-), também chamada flavonol 3-O-glicosiltransferase UGT89B1 (EC:2.4.1.91), apresenta atividade *in vitro* de glicosilação em ácidos benzoicos e também em flavonoides (e.g. quecertina), nas posições 3, 7 e 4' do esqueleto do flavonoide (LIM et al., 2002, 2004). A ação das UGTs nas plantas desempenha papel regulador da homeostase de fenilpropanóides e flavonoides, modificando os compostos quanto a solubilidade, estabilidade, potencial tóxico, bem como influencia na compartimentalização e atividade biológica (LE ROY et al., 2016). Portanto, tal regulação e atividade sugere que a UGT também esteja envolvida na produção de

antocianinas no pericarpo, bem como no aumento da variedade de espécies de flavonoides, resultando num perfil de compostos fenólicos glicosilados complexo.

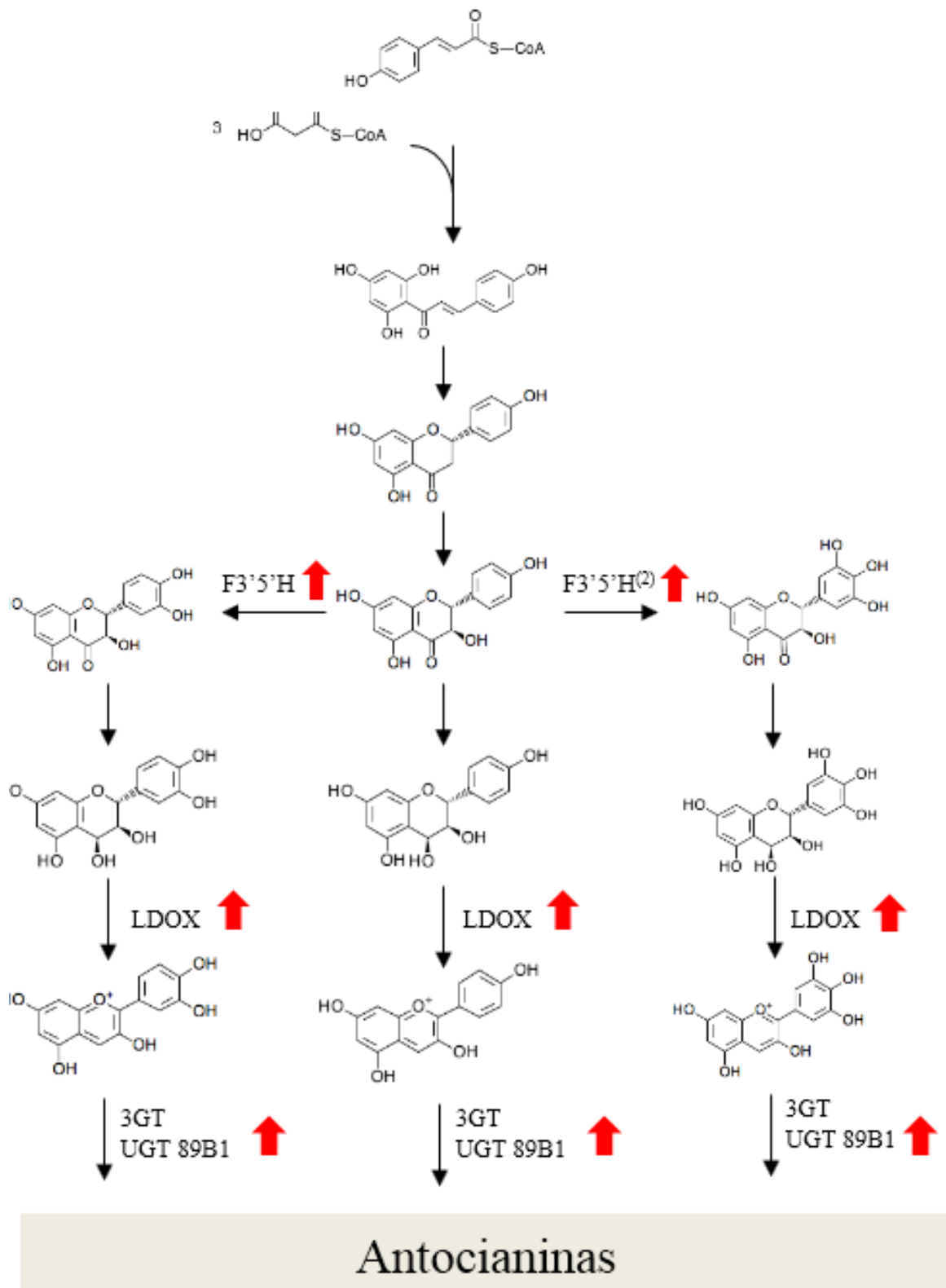
Assim, considerando o acúmulo de flavonoides pigmentados no pericarpo de *E. oleracea* no final do desenvolvimento, o aumento da expressão de LDOX, 3GT e UGT seguramente está relacionado com esse processo. Tal aumento, direciona o *pool* de metabólitos implicados nas vias a montante desse ponto, para a produção de antocianinas no pericarpo, tal como ocorre a redução dos compostos fenólicos no final do desenvolvimento de mirtilo e romã (BEN-SIMHON et al., 2011; JAAKOLA et al., 2002).

Curiosamente, o aumento da abundância de LDOX se dá no E9, quando o pericarpo ainda mostra coloração verde, ao passo que as proteínas 3GT e UGT, que realiza a reação subsequente só foi verificada no E11, o que indica um possível acúmulo transitório de antocianidinas e proantocianidinas, as quais são posteriormente glicosiladas formando a antocianina cianidina 3-glicosídeo e suas derivadas, que são abundantes no pericarpo de *E. oleracea* (GARZÓN et al., 2017).

Plantas que expressam F3'5'H geralmente apresentam antocianinas do tipo delphinidina, entretanto, isso não acontece no pericarpo de *E. oleracea*, no qual predomina antocianinas do tipo cianidina (GARZÓN et al., 2017; SCHAUSS et al., 2006). A possível razão para isso, está na separação temporal, que também foi verificada entre o aumento da expressão de LDOX e F3'5'H. Quando ocorre o aumento da expressão de F3'5'H (E11), o *pool* de dihidroflavonoides foi anteriormente direcionado para síntese de antocianinas (E9), do tipo cianidina. Por sua vez, o aumento da expressão e atividade da F3'5'H pode estar relacionada com o acúmulo das flavonas orientina e homoorientina, ambas apresentam hidroxilas na posição 3', que são as espécies de flavonoides predominantes no pericarpo (GARZÓN et al., 2017).

Diante do exposto, foi evidente que produção de flavonoides e antocianinas no pericarpo de *E. oleracea* respondem ao aumento da expressão das enzimas LDOX, 3GT e UGT, responsáveis pelas etapas finais da via biosintética, além da F3'5'H que atua no aumento da diversidade de flavonoides (Figura 26).

Figura 26 – Esquema da regulação de biossíntese de antocianinas pelo aumento da expressão das enzimas leucoantocianidina dioxigenase (LDOX), antocianidina O-3-glicosiltransferase (3GT) e UDP-glicosiltransferase 89B1 (UGT), responsáveis pelas etapas finais da via biossintética



Com relação aos estilbenos, a enzima responsável pela produção de pterostilbeno, a trans-resveratrol di-O-metiltransferase, teve a expressão aumentada no E9, sugerindo maior quantidade de substrato (resveratrol), bem como do produto nesse momento do desenvolvimento. O pterostilbeno é uma importante fitoalexina de defesa vegetal que recentemente atraiu muita atenção devido suas propriedades farmacológicas, como potencial fungicida 5 a 10 maior que o resveratrol, propriedades anticâncer, atividade hipolipidêmica e antidiabética (SCHMIDLIN et al., 2008). No pericarpo de *E. oleracea* é documentada a presença do estilbeno resveratrol, em baixas concentrações (SCHAUSS et al., 2006; YAMAGUCHI et al., 2015), entretanto não existe registro da ocorrência de pterostilbeno.

De maneira semelhante, no presente estudo outras proteínas do metabolismo secundário tiveram aumento da expressão no final do desenvolvimento do pericarpo, o que indica de forma indireta a presença dos metabólitos resultantes da atividade dessas proteínas, metabólitos esses com potencial uso farmacêutico e indústria alimentícia, como o caso do pterostilbeno e furaneol, respectivamente (SCHMIDLIN et al., 2008). Até o presente momento, a ocorrência desses compostos no açaí não é relatada na literatura. A relação das proteínas e seus respectivos substratos/produtos metabólicos, pode ser visualizada na tabela abaixo.

Tabela 3 – Relação das proteínas *up* reguladas no E11 e metabólitos secundários docilmente presentes no pericarpo de *Euterpe oleracea*

Descrição da Proteína	Metabólitos Envolvidos	Classe de Composto
scopoletin glucosyltransferase-like	Scopolin	Furanocumarinas
2-methylene-furan-3-one reductase	4-hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanone (Furaneol)	Furano; aromático, confere flavor em alimentos
momilactone A synthase-like	Momilactone A	Diterpenóide
trans-resveratrol di-O-methyltransferase-like	Pterostilbene	Estilbeno
secoisolariciresinol dehydrogenase-like	Secoisolariciresinol, (-)-matairesinol	Lignana
tropinone reductase-like 3	Tropinone, pseudotropine	Alcaloides
tuliposide A-converting enzyme 2, chloroplastic-like	6-tuliposide A, tulipalin A	Lactona

Fonte: dados da pesquisa.

Tabela 4 – Proteínas diferencialmente expressas durante o desenvolvimento do pericarpo de *E. oleracea* envolvidas no metabolismo secundário

Query	Description	Fold change médio					
		E6/E3	E9/E3	E9/E6	E11/E3	E11/E6	E11/E9
XP_010914844.1	PREDICTED: 2-methoxy-6-polyprenyl-1,4-benzoquinol methylase, mitochondrial [Elaeis guineensis]	-	-	-	2.1902	2.2078	2.5068
XP_010925514.1	PREDICTED: 2-methylene-furan-3-one reductase [Elaeis guineensis]	-	-	-	1.9778	2.4327	2.5447
XP_010913649.1	PREDICTED: 4-coumarate--CoA ligase 2 [Elaeis guineensis]	-	-	-	-	-	1.795
XP_010943943.1	PREDICTED: 4-coumarate--CoA ligase-like 4 [Elaeis guineensis]	0.5444	-	-	-	-	-
XP_010943467.1	PREDICTED: aconitate hydratase, cytoplasmic-like [Elaeis guineensis]	-	-	-	-	1.9838	2.0017
XP_010913576.1	PREDICTED: aldehyde dehydrogenase family 2 member B7, mitochondrial [Elaeis guineensis]	0.5076	0.6065	-	-	-	-
XP_008793866.1	PREDICTED: aldehyde dehydrogenase family 2 member B7, mitochondrial-like [Phoenix dactylifera]	-	0.5857	-	1.9484	2.1447	2.2412
XP_010930724.1	PREDICTED: aldehyde dehydrogenase family 3 member H1 [Elaeis guineensis]	-	-	-	-	2.349	-
XP_008781593.1	PREDICTED: aldehyde dehydrogenase family 3 member H1 [Phoenix dactylifera]	-	-	-	-	1.1219	1.1794
XP_010913632.1	PREDICTED: anthocyanidin 3-O-glucosyltransferase 7-like [Elaeis guineensis]	-	-	-	1.4948	1.412	1.2498
XP_008789337.1	PREDICTED: aspartate aminotransferase, cytoplasmic [Phoenix dactylifera]	-	-	-	2.4918	3.0587	2.5447
XP_010922562.1	PREDICTED: beta-glucosidase 1-like [Elaeis guineensis]	-	-	-	2.8634	-	-
XP_010934914.1	PREDICTED: caffeic acid 3-O-methyltransferase [Elaeis guineensis]	0.6114	-	-	-	-	-
XP_010922610.1	PREDICTED: cinnamoyl-CoA reductase 1 [Elaeis guineensis]	0.5667	-	-	-	-	-
XP_010943210.1	PREDICTED: cinnamyl alcohol dehydrogenase 2-like [Elaeis guineensis]	-	-	-	2.9565	2.7429	1.9484
XP_008793701.1	PREDICTED: cytochrome P450 86B1 [Phoenix dactylifera]	-	0.3657	0.5046	-	-	4.4862
XP_019702177.1	PREDICTED: cytochrome P450 98A2-like [Elaeis guineensis]	-	-	-	3.4591	2.1771	2.8893
XP_010907122.1	PREDICTED: diphosphomevalonate decarboxylase MVD2, peroxisomal [Elaeis guineensis]	-	-	-	-	-	2.5987
XP_010910221.1	PREDICTED: flavonoid 3',5'-hydroxylase 1-like [Elaeis guineensis]	-	-	-	-	2.0259	2.5143
XP_010911781.2	PREDICTED: geraniol 8-hydroxylase-like [Elaeis guineensis]	-	1.007	-	-	-	2.7871
XP_010925766.1	PREDICTED: hydroquinone glucosyltransferase-like [Elaeis guineensis]	-	-	1.6636	-	-	-
XP_010931307.1	PREDICTED: laccase-3-like [Elaeis guineensis]	-	0.5827	-	-	-	-
XP_008776918.1	PREDICTED: leucoanthocyanidin dioxygenase-like [Phoenix dactylifera]	-	1.8851	2.0709	-	-	-
XP_010920221.1	PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: primary amine oxidase [Elaeis guineensis]	-	-	1.887	-	-	-
XP_010917564.1	PREDICTED: momilactone A synthase-like [Elaeis guineensis]	-	-	-	-	3.1143	4.4282

XP_008785855.1	PREDICTED: peroxidase 12 [Phoenix dactylifera]	-	0.4566	0.5071	-	-	2.6327
XP_010914386.1	PREDICTED: peroxidase 3 [Elaeis guineensis]	-	-	0.6169	-	-	-
XP_008798069.1	PREDICTED: peroxidase 31 [Phoenix dactylifera]	-	1.7385	2.1297	-	-	-
XP_010905285.1	PREDICTED: peroxidase 35 [Elaeis guineensis]	0.6090	-	-	2.4571	3.0132	3.4008
XP_008784560.1	PREDICTED: peroxidase 3-like [Phoenix dactylifera]	-	-	-	3.2414	4.0593	5.0128
XP_008812662.1	PREDICTED: peroxidase 3-like [Phoenix dactylifera]	-	-	-	-	2.7677	3.8884
XP_008806161.2	PREDICTED: peroxidase 64-like [Phoenix dactylifera]	-	-	-	-	4.5177	3.5325
XP_010924103.1	PREDICTED: peroxidase 72 [Elaeis guineensis]	0.5577	-	-	-	-	-
XP_008792878.1	PREDICTED: peroxidase 72-like [Phoenix dactylifera]	0.5499	0.5294	-	2.291	3.5751	3.8076
XP_008784965.1	PREDICTED: peroxidase 72-like [Phoenix dactylifera]	0.6200	-	-	-	-	-
XP_008785254.1	PREDICTED: phenylalanine ammonia-lyase-like [Phoenix dactylifera]	-	0.4283	0.5527	3.4729	10.623	9.0793
XP_008788523.1	PREDICTED: phosphomevalonate kinase [Phoenix dactylifera]	-	0.5337	-	3.0344	2.7047	3.4042
XP_010924018.1	PREDICTED: probable NAD(P)H dehydrogenase (quinone) FQR1-like 1 [Elaeis guineensis]	-	-	-	1.9838	-	-
XP_010932965.1	PREDICTED: protein STRICTOSIDINE SYNTHASE-LIKE 3 [Elaeis guineensis]	-	0.6288	-	-	-	-
XP_010936719.1	PREDICTED: scopoletin glucosyltransferase-like [Elaeis guineensis]	-	0.993	0.6364	-	2.1085	2.7594
XP_008798880.1	PREDICTED: secoisolariciresinol dehydrogenase-like [Phoenix dactylifera]	-	1.9601	-	3.0988	-	2.4424
XP_008777439.1	PREDICTED: shikimate O-hydroxycinnamoyltransferase-like [Phoenix dactylifera]	0.5102	-	-	-	-	-
XP_008792251.1	PREDICTED: trans-resveratrol di-O-methyltransferase-like [Phoenix dactylifera]	-	2.9624	3.1677	-	-	-
XP_008803494.1	PREDICTED: tropinone reductase-like 3 [Phoenix dactylifera]	-	-	-	1.8927	2.3941	2.7732
XP_008803545.1	PREDICTED: tuliposide A-converting enzyme 2, chloroplastic-like [Phoenix dactylifera]	-	2.2956	1.7524	-	-	1.7789
XP_010943331.1	PREDICTED: UDP-glycosyltransferase 89B1 [Elaeis guineensis]	-	-	-	-	-	4.1165
XP_010915753.1	PREDICTED: uroporphyrinogen decarboxylase 1, chloroplastic [Elaeis guineensis]	-	-	-	-	-	3.5219

6 CONCLUSÃO

O presente trabalho apresenta as principais mudanças no padrão histológico do pericarpo de *E. oleracea* durante seu desenvolvimento, como atividade do meristema adaxial na formação de camadas do pericarpo, que contribuem com o aumento da espessura, além de evidenciar o acúmulo de antocianinas e lipídeos.

A análise proteômica resultou na identificação de 4286 proteínas no pericarpo de *E. oleracea* e indicou a expressão diferencial de 494 proteínas, que estão na maioria envolvidas no metabolismo secundário e de carboidratos.

A regulação da expressão dessas proteínas mostrou que o metabolismo de carboidratos e da via dos fenilpropanóides são estimuladas nos estádios iniciais e finais do desenvolvimento, atendendo elevadas demandas metabólicas durante os processos de divisão celular, lignificação, acúmulo de ácidos fenólicos e mudanças metabólicas no amadurecimento do fruto. Além disso, foi evidente que produção de flavonoides e antocianinas respondem ao aumento da expressão das enzimas leucoantocianidina dioxigenase (LDOX), antocianidina O-3glicosiltransferase (3GT) e UDP-glicosiltransferase 89B1 (UGT), responsáveis pelas etapas finais da via biosintética.

Até o presente momento, as informações descritas nesse estudo não foram anteriormente reportadas, as quais apresentam considerável importância biotecnológica, podendo contribuir para trabalhos futuros de melhoramento vegetal, além de fornecer dados sobre a espécie e sua biologia celular.

REFERÊNCIAS

- ABRAHAMS, S. et al. The Arabidopsis TDS4 gene encodes leucoanthocyanidin dioxygenase (LDOX) and is essential for proanthocyanidin synthesis and vacuole development. **The Plant Journal**, v. 35, n. 5, p. 624–636, 2003.
- AL-DOUS, E. K. et al. Articles De novo genome sequencing and comparative genomics of date palm (*Phoenix dactylifera*). **Nature Biotechnology**, v. 29, n. 6, p. 521–527, 2011.
- ALCÁZAR-ALAY, S. C. et al. Obtaining anthocyanin-rich extracts from frozen açai (*Euterpe oleracea* Mart.) pulp using pressurized liquid extraction. **Food Science and Technology**, v. 37, n. 1, p. 48–54, 2017.
- ALLAN, A. C.; HELLENS, R. P.; LAING, W. A. MYB transcription factors that colour our fruit. **Trends in Plant Science**, v. 13, n. 3, p. 99–102, 2008.
- ANDREWS, J. et al. Peroxidase isozyme patterns in the skin of maturing tomato fruit. **Plant, Cell & Environment**, v. 23, n. 4, p. 415–422, 2000.
- BAKALOVIC, N. et al. PeroxiBase: A class III plant peroxidase database. **Phytochemistry**, v. 67, n. 6, p. 534–539, 2006.
- BAKER, W. J.; DRANSFIELD, J. Beyond Genera Palmarum: progress and prospects in palm systematics. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 182, n. 2, p. 207–233, 2016.
- BARRETT, C. F. et al. An introduction to plant phylogenomics with a focus on palms. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 182, n. 2, p. 234–255, 2016.
- BEN-SIMHON, Z. et al. A pomegranate (*Punica granatum* L.) WD40-repeat gene is a functional homologue of Arabidopsis TTG1 and is involved in the regulation of anthocyanin biosynthesis during pomegranate fruit development. **Planta**, v. 234, n. 5, p. 865–881, 2011.
- BHUIYAN, N. H. et al. Gene expression profiling and silencing reveal that monolignol biosynthesis plays a critical role in penetration defence in wheat against powdery mildew invasion. **journal of Experimental Botany**, v. 60, n. 2, p. 509–521, 2008.
- BOBROV, A. V. C. et al. Gynoecium and fruit histology and development in *Eugeissona* (*Calamoideae*: *Arecaceae*). **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 168, n. 4, p. 377–394, 2012.
- CARVALHO, A. V. et al. Chemical composition and antioxidant capacity of açai (*Euterpe oleracea*) genotypes and commercial pulps. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 97, n. 5, p. 1467–1474, 2017.
- CARVALHO, P. C. et al. Integrated analysis of shotgun proteomic data with PatternLab for proteomics 4.0. **Nature Protocols**, v. 11, n. 1, p. 102–117, 2016.
- CAVALCANTI, R. N.; SANTOS, D. T.; MEIRELES, M. A. A. Non-thermal stabilization mechanisms of anthocyanins in model and food systems — An overview. **Food Research**

International, v. 44, n. 2, p. 499–509, 2011.

CHAKRABORTY, S. et al. Proteomics of Important Food Crops in the Asia Oceania Region: Current Status and Future Perspectives. **Journal of Proteome Research**, v. 14, n. 7, p. 2723–2744, 2015.

CHEN, L. et al. iTRAQ-Based Quantitative Proteomics Analysis of Black Rice Grain Development Reveals Metabolic Pathways Associated with Anthocyanin Biosynthesis. **PLoS one**, v. 11, n. 7, p. 1–25, 2016.

CHEN, L. et al. Proteomic Analysis Reveals Coordinated Regulation of Anthocyanin Biosynthesis through Signal Transduction and Sugar Metabolism in Black Rice Leaf. **International journal of molecular sciences**, v. 18, n. 12, p. 1–20, 2017.

CHEN, W. et al. Expression Profile Matrix of Arabidopsis Transcription Factor Genes Suggests Their Putative Functions in Response to Environmental Stresses. **The Plant Cell**, v. 14, n. 3, p. 559–574, 2002.

CHIN, Y. W. et al. Lignans and Other Constituents of the Fruits of *Euterpe oleracea* (Açaí) with Antioxidant and Cytoprotective Activities. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 17, p. 7759–7764, 2008.

CLEMENTE, H. S.; JAMET, E. WallProtDB, a database resource for plant cell wall proteomics. **Plant Methods**, v. 11, n. 1, p. 1–7, 2015.

CONAB. **Companhia Nacional de Abastecimento, Conjuntura mensal - Açaí (fruto)**. Disponível em: <www.conab.gov.br>. Acesso em: 20 dez. 2017.

COSTA, A. G. V. et al. Bioactive compounds and health benefits of exotic tropical red – black berries. **Journal of Functional Foods**, v. 5, n. 2, p. 539–549, 2013.

CUTLER, B. D. F.; BOTHA, T.; STEVENSON, D. W. **Anatomia Vegetal : Uma Abordagem Aplicada (Portuguese Edition) Anatomia Vegetal : Uma Abordagem Aplicada (Portuguese Edition)**. [s.l.] Artmed Editora, 2011.

DANELLI, M. F.; FISCH, S. T. V.; VIEIRA, S. A. Análise Da Estrutura E Biomassa Florestal De áreas De Colheita De Frutos De Juçara (*Euterpe Edulis* Mart.) No Litoral Norte E Serra Do Mar-sp. **Ciência Florestal**, v. 26, n. 3, p. 773–786, 2016.

DE ROSSO, V. V. et al. Determination of anthocyanins from acerola (*Malpighia emarginata* DC.) and açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) by HPLC–PDA–MS/MS. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 21, n. 4, p. 291–299, 2008.

DEL POZO-INSFRAN, D.; PERCIVAL, S. S.; TALCOTT, S. T. Acai (*Euterpe oleracea* Mart.) polyphenolics in their glycoside and aglycone forms induce apoptosis of HL-60 leukemia cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 4, p. 1222–1229, 2006.

DERIKVAND, M. M. et al. Redirection of the phenylpropanoid pathway to feruloyl malate in *Arabidopsis* mutants deficient for cinnamoyl-CoA reductase 1. **Planta**, v. 227, n. 5, p. 943–

956, 2008.

DIXON, R. A. et al. The phenylpropanoid pathway and plant defence — a genomics perspective. **Molecular Plant Pathology**, v. 3, n. 5, p. 371–390, 2002.

DONG, J. G.; FERNANDEZ-MACULET, J. C.; YANG, S. F. A. Purification and characterization of 1-aminocyclopropane-1- carboxylate oxidase from apple fruit. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 89, n. 20, p. 9789–9793, 1992.

FALCONE FERREYRA, M. L.; RIUS, S. P.; CASATI, P. Flavonoids: biosynthesis, biological functions, and biotechnological applications. **Frontiers in Plant Science**, v. 3, n. September, p. 1–15, 2012.

FARIAS-NETO, J. T. DE; RESENDE, M. D. V. DE; OLIVEIRA, M. DO S. P. DE. Seleção simultânea em progênies de açaizeiro irrigado para produção e peso do fruto. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, n. 2, p. 532–539, 2012.

FAUROBERT, M. et al. Major Proteome Variations Associated with Cherry Tomato Pericarp Development and Ripening. **Plant Physiology**, v. 143, n. 3, p. 1327–1346, 2007.

FAUROBERT, M.; PELPOIR, E.; CHAÏB, J. Phenol Extraction of Proteins for Proteomic Studies of Recalcitrant Plant Tissues. In: THIELLEMENT, H. et al. (Eds.). . **Plant Proteomics: Methods and Protocols**. 355. ed. New Jersey: Humana Press Inc, 2007. p. 399.

FERNÁNDEZ-PÉREZ, F. et al. Suppression of Arabidopsis peroxidase 72 alters cell wall and phenylpropanoid metabolism. **Plant Science**, v. 239, p. 192–199, 2015.

FORKMANN, G. Flavonoids as Flower Pigments: The Formation of the Natural Spectrum and its Extension by Genetic Engineering. **Plant Breeding**, v. 106, n. 1, p. 1–26, 1991.

FRAGOSO, M. F. et al. Inhibition of Mouse Urinary Bladder Carcinogenesis by Açaí Fruit (*Euterpe oleracea* Martius) Intake. **Plant foods for human nutrition**, v. 67, n. 3, p. 235–241, 2012.

FRAGOSO, M. F. et al. Açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) feeding attenuates dimethylhydrazine-induced rat colon carcinogenesis. **Food and Chemical Toxicology**, v. 58, p. 68–76, 2013.

FRANCOZ, E. et al. Phytochemistry Roles of cell wall peroxidases in plant development. **Phytochemistry**, v. 112, p. 15–21, 2015.

GALLORI, S. et al. Polyphenolic Constituents of Fruit Pulp of *Euterpe oleracea* Mart. (Açaí palm). **Chromatographia**, v. 59, n. 11, p. 739–743, 2004.

GARZÓN, G. A. et al. Polyphenolic composition and antioxidant activity of açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) from Colombia. **Food Chemistry**, v. 217, p. 364–372, 2017.

GIOVANNONI, J. J. Genetic Regulation of Fruit Development and Ripening. **The Plant Cell**, v. 16, n. suppl 1, p. 170–181, 2004.

GUO, X. et al. iTRAQ-based Protein Profiling and Fruit Quality Changes at Different

Development Stages of Oriental Melon. **BMC Plant Biology**, v. 17, n. 1, p. 1–20, 2017.

HAMBERGER, B. et al. Genome-wide analyses of phenylpropanoid- related genes in *Populus trichocarpa*, *Arabidopsis thaliana*, and *Oryza sativa*: the *Populus* lignin toolbox and conservation and diversification of angiosperm gene families 1. **Botany**, v. 85, n. 12, p. 1182–1201, 2007.

HANDAKUMBURA, P. P. et al. Plant iTRAQ-Based Proteomics. **Current Protocols in Plant Biology**, v. 2, n. June, p. 158–172, 2017.

HEINRICH, M.; DHANJI, T.; CASSELMAN, I. Phytochemistry Letters Açai (*Euterpe oleracea* Mart.) — A phytochemical and pharmacological assessment of the species' health claims. **Phytochemistry Letters**, v. 4, n. 1, p. 10–21, 2011.

HOGAN, S. et al. Antiproliferative and antioxidant properties of anthocyanin-rich extract from açai. **Food Chemistry**, v. 118, n. 2, p. 208–214, 2010.

HOLDERNESS, J. et al. Polysaccharides Isolated from Açai Fruit Induce Innate Immune Responses. **PLoS one**, v. 6, n. 2, 2011.

HOLTON, T. A.; CORNISH, E. C. Genetics and Biochemistry of Anthocyanin Biosynthesis. **The Plant Cell**, v. 7, n. July, p. 1071–1083, 1995.

HUITS, H. S. et al. Genetic control of dihydroflavonol 4-reductase gene expression in petunia. **The Plant Journal**, v. 6, n. 6, p. 295–310, 1994.

JAAKOLA, L. et al. Expression of Genes Involved in Anthocyanin Biosynthesis in Relation to Anthocyanin, Proanthocyanidin, and Flavonol Levels during Bilberry Fruit Development 1. **Plant Physiology**, v. 130, n. October, p. 729–739, 2002.

JEJE, A. A.; ODETOLA, A. O.; ZIMMERMANN, M. H. Transpiration and oil accumulation rates for developing oil palm fruits *Elaeis guineensis* Jacq. **Acta Botanica Neerlandica**, v. 27, n. 3/4, p. 213–228, 1978.

JENSEN, G. S. et al. In vitro and in vivo antioxidant and anti-inflammatory capacities of an antioxidant-rich fruit and berry juice blend. Results of a pilot and randomized, double-blinded, placebo-controlled, crossover study. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 18, p. 8326–8333, 2008.

KAMBIRANDA, D. et al. iTRAQ-Based Quantitative Proteomics of Developing and Ripening Muscadine Grape Berry. **Journal of Proteome Research**, v. 13, n. 2, p. 555–569, 2014.

KANG, J. et al. Flavonoids from açai (*Euterpe oleracea* Mart.) pulp and their antioxidant and anti-inflammatory activities q. **Food Chemistry**, v. 128, n. 1, p. 152–157, 2011.

KANG, J. et al. Bioactivities of açai (*Euterpe precatoria* Mart.) fruit pulp, superior antioxidant and anti-inflammatory properties to *Euterpe oleracea* Mart. **Food Chemistry**, v. 133, n. 3, p. 671–677, 2012.

- KARNOVSKY, J. M. A Formaldehyde-Glutaraldehyde Fixative of High Osmolality for Use in Electron Microscopy. **The Journal of Cell Biology**, v. 27, n. 2, p. 1–149, 1965.
- LE ROY, J. et al. Glycosylation Is a Major Regulator of Phenylpropanoid Availability and Biological Activity in Plants. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, n. May, p. 1–19, 2016.
- LI, Y. et al. Four Isoforms of Arabidopsis 4-Coumarate : CoA Ligase Have Overlapping yet Distinct Roles in. **Plant Physiology**, v. 169, n. December, p. 2409–2421, 2015.
- LIM, E. et al. The Activity of Arabidopsis Glycosyltransferases toward Salicylic Acid , 4-Hydroxybenzoic Acid , and Other Benzoates. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 1, p. 586–592, 2002.
- LIM, E. et al. Arabidopsis Glycosyltransferases as Biocatalysts in Fermentation for Regioselective Synthesis of Diverse Quercetin Glucosides. **Biotechnology and bioengineering**, v. 87, n. 5, p. 623–631, 2004.
- LIN, M. et al. iTRAQ-based quantitative proteomic analysis reveals alterations in the metabolism of Actinidia arguta. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–11, 2017.
- LOEI, H. et al. Proteomic Analysis of the Oil Palm Fruit Mesocarp Reveals Elevated Oxidative Phosphorylation Activity is Critical for Increased Storage Oil Production. **Journal of Proteome Research**, v. 12, n. 11, p. 5096–5109, 2013.
- MA, C. et al. iTRAQ-based quantitative proteome and phosphoprotein characterization reveals the central metabolism changes involved in wheat grain development. **BMC genomics**, v. 15, n. 1, p. 1–20, 2014.
- MARONDEDZE, C.; GEHRING, C.; THOMAS, L. Dynamic changes in the date palm fruit proteome during development and ripening. **Horticulture research**, v. 1, n. May, p. 1–15, 2014.
- MARQUÉS, J.; DURAN-VILA, N.; DARÒS, J. Plant Physiology and Biochemistry The Mn-binding proteins of the photosystem II oxygen-evolving complex are decreased in date palms affected by brittle leaf disease. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 49, n. 4, p. 388–394, 2011.
- MARTÍNEZ-ESTESO, M. J. et al. iTRAQ-based protein profiling provides insights into the central metabolism changes driving grape berry development and ripening. **BMC Plant Biology**, v. 13, n. 1, p. 167, 2013.
- MAZZOTTINI-DOS-SANTOS, H. C. et al. Ontogenesis of the pseudomonomerous fruits of *Acrocomia aculeata* (Arecaceae): a new approach to the development of pyrenarium fruits. **Trees**, v. 29, n. 1, p. 199–214, 2015.
- MCDONALD, W. H.; YATES, J. R. Shotgun proteomics and biomarker discovery. **Disease markers**, v. 18, n. 2, p. 99–105, 2002.
- MENDONÇA, M. S. DE et al. Morfo-anatomia do fruto e semente de *Oenocarpus minor* Mart. (Arecaceae). **Revista Brasileira de Sementes**, v. 30, n. 1, p. 90–95, 2008.

- MERTENS-TALCOTT, S. U. et al. Pharmacokinetics of Anthocyanins and Antioxidant Effects after the Consumption of Anthocyanin-Rich Açai Juice and Pulp (*Euterpe oleracea* Mart.) in Human Healthy Volunteers. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 17, p. 7796–7802, 2008.
- MOL, J. et al. Saying it with genes: molecular flower breeding. **Trends in Biotechnology**, v. 7, n. 6, p. 148–153, 1989.
- MOLASSIOTIS, A. et al. Proteomics in the fruit tree science arena: New insights into fruit defense, development, and ripening. **Proteomics**, v. 13, n. 12–13, p. 1871–1884, 2013.
- NÚÑEZ, E. V. et al. Application of iTRAQ Shotgun Proteomics for Measurement of Brain Proteins in Studies of Psychiatric Disorders. In: GUEST, P. (Ed.). **Proteomic Methods in Neuropsychiatric Research, Advances in Experimental Medicine and Biology**. 974. ed. [s.l.] Springer International Publishing, 2017. p. 219–227.
- O'BRIEN, T. P.; FEDER, N.; MCCULLY, M. E. Polyehromatic Staining of Plant Cell Walls by Toluidine Blue O. **Protoplasma**, v. 59, n. 2, p. 368–373, 1964.
- OLIVEIRA, M. DO S. P. DE et al. Genetic diversity among accessions of assai palm based on RAPD markers. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, n. 6, p. 1645–1653, 2007.
- OOI, T. E. K. et al. Differential abundance analysis of mesocarp protein from high- and low-yielding oil palms associates non-oil biosynthetic enzymes to lipid biosynthesis. **Proteome Science**, 2015.
- OWITI, J. et al. iTRAQ-based analysis of changes in the cassava root proteome reveals pathways associated with post-harvest physiological deterioration. **The Plant Journal**, v. 67, n. 1, p. 145–156, 2011.
- PACHECO-PALENCIA, L. A.; DUNCAN, C. E.; TALCOTT, S. T. Phytochemical composition and thermal stability of two commercial açai species, *Euterpe oleracea* and *Euterpe precatoria*. **Food Chemistry**, v. 115, n. 4, p. 1199–1205, 2009.
- PASSARDI, F. et al. Peroxidases have more functions than a Swiss army knife. **Plant Cell Reports**, v. 24, n. 5, p. 255–265, 2005.
- PAULA, J. E. DE. Anatomia de *Euterpe oleracea* Mart. (*Palmae da Amazônia*). **Acta Amazonica**, v. 5, n. 3, p. 265–278, 1975.
- PEARSE, A. G. E. **Histochemistry theoretical and applied**. Boston: Little, Brown And Company, 1953.
- PETRONI, K.; TONELLI, C. Plant Science Recent advances on the regulation of anthocyanin synthesis in reproductive organs. **Plant Science**, v. 181, n. 3, p. 219–229, 2011.
- PINHEIRO, C. B. et al. Proteome Analysis of Plastids from Developing Seeds of *Jatropha*. **Journal of Proteome Research**, v. 12, n. 11, p. 5137–5145, 2013.

- POMPEU, D. R.; SILVA, E. M.; ROGEZ, H. Bioresource Technology Optimisation of the solvent extraction of phenolic antioxidants from fruits of *Euterpe oleracea* using Response Surface Methodology. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 23, p. 6076–6082, 2009.
- POULOSE, S. M. et al. Anthocyanin-rich Açai (*Euterpe oleracea* Mart.) Fruit Pulp Fractions Attenuate Inflammatory Stress Signaling in Mouse Brain BV-2 Microglial Cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 4, p. 1084–1093, 2012.
- QUATTROCCHIO, F. et al. Regulatory Genes Controlling Anthocyanin Pigmentation Are Functionally Conserved among - Plant Species and Have Distinct Sets of Target Genes. **The Plant Cell**, v. 5, n. 11, p. 1497–1512, 1993.
- RABEY, H. A. EL et al. Proteome Analysis for Understanding Abiotic Stress (Salinity and Drought) Tolerance in Date Palm (*Phoenix dactylifera* L .). **International journal of genomics**, v. 2015, p. 1–11, 2015.
- RASOOL, K. G. et al. Identification of Proteins Modulated in the Date Palm Stem Infested with Red Palm Weevil (*Rhynchophorus ferrugineus* Oliv .) Using Two Dimensional Differential Gel Electrophoresis and Mass Spectrometry. **International journal of molecular sciences**, v. 16, n. 8, p. 19326–19346, 2015.
- RAWLINGS, N. D.; BARRETT, A. J.; BATEMAN, A. MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. **Nucleic acids research**, v. 40, n. D1, p. 343–350, 2012.
- REIS, S. B.; MERCADANTE-SIMÕES, M. O.; RIBEIRO, L. M. Pericarp development in the macaw palm *Acrocomia aculeata* (Arecaceae). **Rodriguésia**, v. 63, n. 3, p. 541–549, 2012.
- ROCHA, A. P. M. et al. Endothelium-dependent vasodilator effect of *Euterpe oleracea* Mart. (Açaí) extracts in mesenteric vascular bed of the rat. **Vascular Pharmacology**, v. 46, n. 2, p. 97–104, 2007.
- ROMANOV, M. S. et al. Pericarp development and fruit structure in borassoid palms (Arecaceae–Coryphoideae–Borasseae). **Annals of Botany**, v. 108, n. 8, p. 1–14, 2011.
- ROSS, P. L. et al. Multiplexed Protein Quantitation in *Saccharomyces cerevisiae* Using Amine-reactive Isobaric Tagging Reagents * □. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 3, n. 12, p. 1154–1169, 2004.
- SABBE, S. et al. Effect of a health claim and personal characteristics on consumer acceptance of fruit juices with different concentrations of açai (*Euterpe oleracea* Mart.). **Appetite**, v. 53, n. 1, p. 84–92, 2009.
- SANTANA, M. DE F. S. DE; LIMA, A. K. V. O. DE; MOURÃO, M. Avaliação Prospectiva do Açai: Análise através dos pedidos de patentes e referências bibliográficas. **Revista GEINTEC**, v. 4, n. 1, p. 437–452, 2014.
- SCHAUSS, A. G. et al. Phytochemical and Nutrient Composition of the Freeze-Dried Amazonian Palm Berry, *Euterpe oleracea* Mart. (Acai). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 22, p. 8598–8603, 2006.

- SCHMIDLIN, L. et al. A Stress-Inducible Resveratrol O -Methyltransferase Involved in the Biosynthesis of Pterostilbene in Grapevine 1. **Plant Physiology**, v. 148, n. 3, p. 1630–1639, 2008.
- SEYMOUR, G. B. et al. Fruit Development and Ripening. **Annual Review of Plant Biology**, v. 64, p. 219–241, 2013.
- SGHAIER-HAMMAMI, B.; DRIRA, N.; JORRÍN-NOVO, J. V. Comparative 2-DE proteomic analysis of date palm (*Phoenix dactylifera* L .) somatic and zygotic embryos. **Journal of Proteomics**, v. 73, n. 1, p. 161–177, 2009.
- SHAH, M. et al. Proteomic Analysis of the Endosperm Ontogeny of *Jatropha curcas* L. Seeds. **Journal of Proteome Research**, v. 14, n. 6, p. 2557–2568, 2015.
- SHAH, M. et al. Deep proteome analysis of gerontoplasts from the inner integument of developing seeds of *Jatropha curcas*. **Journal of Proteomics**, v. 143, p. 346–352, 2016.
- SHIRLEY, B. W. Flavonoid biosynthesis: “new” functions for an “old” pathway. **Trends in Plant Science**, v. 1, n. 11, p. 377–382, 1996.
- SINGH, R. et al. Oil palm genome sequence reveals divergence of interfertile species in old and new worlds. **Nature**, v. 500, n. 7462, p. 335–339, 2013.
- SOARES, E. L. et al. Proteome Analysis of the Inner Integument from Developing *Jatropha curcas* L . Seeds. **Journal of Proteome Research**, v. 13, n. 8, p. 3562–3570, 2014.
- SOUZA, M. O. DE et al. The hypocholesterolemic activity of açai (*Euterpe oleracea* Mart.) is mediated by the enhanced expression of the ATP-binding cassette , subfamily G transporters 5 and 8 and low-density lipoprotein receptor genes in the rat. **Nutrition research**, v. 32, n. 12, p. 976–984, 2012.
- TAKOS, A. M. et al. Light-Induced Expression of a MYB Gene Regulates Anthocyanin Biosynthesis in Red Apples. **Plant Physiology**, v. 142, n. 3, p. 1216–1232, 2006.
- TONON, R. V.; BRABET, C.; HUBINGER, M. D. Anthocyanin stability and antioxidant activity of spray-dried açai (*Euterpe oleracea* Mart.) juice produced with different carrier agents. **Food Research International**, v. 43, n. 3, p. 907–914, 2010.
- UHL, N. W.; DRANSFIELD, J. Book Reviews Genera Palmarum . A classification of palms based on the work of Harold E . Photomorphogenesis in Plants. **South African Journal of Botany**, v. 54, n. 5, p. 511–515, 1988.
- VOGT, T. Phenylpropanoid Biosynthesis. **Molecular Plant**, v. 3, n. 1, p. 2–20, 2010.
- VREBALOV, J. et al. Fleshy Fruit Expansion and Ripening Are Regulated by the Tomato SHATTERPROOF Gene TAGL1. **The Plant Cell**, v. 21, n. October, p. 3041–3062, 2009.
- WALKER, A. R. et al. The TRANSPARENT TESTA GLABRA1 Locus, Which Regulates Trichome Differentiation and Anthocyanin Biosynthesis in Arabidopsis, Encodes a WD40

Repeat Protein. **The Plant Cell**, v. 11, n. July, p. 1337–1349, 1999.

WARD, R. S. Lignans, Neolignans, and Related Compounds. **Natural Product Reports**, v. 10, n. 1, p. 1–28, 1993.

WILKINS, M. R. et al. Progress with Proteome Projects: Why all Proteins Expressed by a Genome Should be Identified and How To Do It. **Biootechnology and Genetic Engineering Reviews**, v. 13, n. December 1995, p. 19–50, 1995.

YAMAGUCHI, K. K. DE L. et al. Amazon acai: Chemistry and biological activities: A review. **Food Chemistry**, v. 179, p. 137–151, 2015.

ZHANG, Y. et al. Protein Analysis by Shotgun/Bottom-up Proteomics. **Protein Analysis by Shotgun / Bottom-up Proteomics**, v. 113, n. 4, p. 2343–2394, 2013.

ZONA, S. Raphides in Palm Embryos and their Systematic Distribution. **Annals of Botany**, v. 93, n. 4, p. 415–421, 2004.

ZORATTI, L. et al. Light-controlled flavonoid biosynthesis in fruits. **Frontiers in Plant Science**, v. 5, n. October, p. 1–16, 2014.