

Universidade Federal de Pelotas
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial



DISSERTAÇÃO

**Perfil de expressão diferencial de proteínas associadas às
alterações pós-colheita em maçãs cv. Gala, clone Baigent**

Renata Silva Moura

Pelotas, 2011

Renata Silva Moura

**Perfil de expressão diferencial de proteínas associadas às alterações
pós-colheita em maçãs cv. Gala, clone Baigent**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia Agroindustrial

Orientação: César Luís Girardi

César Valmor Rombaldi

Pelotas, 2011

Banca Examinadora

César Luís Girardi

César Valmor Rombaldi

Luciano Consoli

Fabio Chaves

Dedico à minha família.

Agradecimentos

Ao professor Dr. Cesar Luis Girardi, pela preciosa orientação, confiança e incentivo na realização deste trabalho, e ao professor Dr. César Valmor Rombaldi pelas contribuições e participação no comitê de orientação.

Ao Dr. Luciano Consoli pelo apoio, e pelo suporte técnico e científico na realização deste trabalho.

À Embrapa pela oportunidade na realização de meus experimentos, em especial aos colegas do laboratório de Pós-colheita da Embrapa Uva e Vinho, Norma e Wanderson pela amizade e companhia.

Também aos colegas do Laboratório de Biotecnologia da Embrapa Trigo, Diana, Valdirene pela ajuda, atenção e amizade.

À minha amiga Tatiane Storch pela companhia, conselhos e conversas que com certeza serão inesquecíveis pra mim.

Aos colegas de moradia da Pousada dos Estagiários da Embrapa pelos momentos de alegria compartilhados, em especial a Cindy, Daniel e Marcelo.

Como poderia esquecer de minhas melhores amigas Lidiane, Joyce, Greici e Michele, que sempre torceram e me deram força na minha caminhada até aqui.

Aos demais professores do Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial pelas valorosas lições passadas.

Ao funcionário Marcos, sempre disposto a ajudar e pela amizade.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudo.

Por fim, agradeço a Deus e a minha família, em especial meus pais, Áurea e Gilberto que sempre me dão força e me apóiam em minhas escolhas.

“Que força é esta, eu não sei; tudo que sei é que existe, e está disponível apenas quando alguém está num estado em que sabe exatamente o que quer, e está totalmente determinado a desistir até conseguir”

Alexander Graham Bell

Resumo

MOURA, Renata Silva. **Perfil de expressão diferencial de proteínas associadas às alterações pós-colheita em maçãs cv. Gala, clone Baigent.** 2010. 69f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

A macieira (*Malus domestica*), originária da Europa e Ásia, pertence à família Rosaceae, sub-família da pomáceas. A maçã é um fruto de clima temperado de importância comercial, principalmente em seu estado *in natura*. Dentre as principais cultivares de macieira produzidas no Brasil, destacam-se a Fuji e a Gala, como a mais preferida pelos consumidores brasileiros, por apresentar frutos com boas características sensoriais como aparência, polpa crocante e suculenta. Porém, esses atributos são rapidamente perdidos durante o armazenamento sob refrigeração (AR). Dentre os principais problemas detectados durante o armazenamento refrigerado, estão a diminuição da firmeza de polpa e a ocorrência de polpa farinhenta. Vários estudos demonstraram que estes distúrbios fisiológicos têm relação com o etileno, sendo que seus mecanismos ainda não foram elucidados. Com o intuito de se buscarem mais explicações sobre os mecanismos moleculares da interação destes eventos com o etileno, este trabalho propoe uma análise global do sistema, utilizando a proteômica como métodos de estudo. Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi identificar e caracterizar proteínas diferencialmente expressas durante o armazenamento, associando-as à ação do etileno e com as mudanças ocorridas nos frutos da cv. Gala – clone Baigent. Nos géis obtidos a partir de eletroforeses bidimensionais foram detectados, utilizando o programa PDQuest, 565 spots na amostra de maçãs aos 8 meses de AR em frutos que foram tratados com 1-MCP, 452 spots para amostra com 8 meses AR em frutos sem 1-MCP, e 348 spots para amostra correspondente aos frutos por ocasião da colheita. Numa análise quantitativa, ao se compararem os tratamentos com e sem 1-MCP, e se considerando apenas as proteínas presentes em ambos os tratamentos, 120 delas aumentaram ou diminuíram de intensidade. Além disso, se verificou que 62 spots foram detectados apenas nas amostras tratadas ou nas não tratadas com 1-MCP; 160 spots foram somente detectados nas amostras correspondentes à colheita ou às amostras tratadas com 1-MCP; e, 80 spots foram somente detectados nas amostras correspondentes à colheita ou às amostras não tratadas com 1-MCP. A identificação e o estudo das respectivas funções constituem as etapas futuras do trabalho.

Palavras-chave: firmeza, AR, proteômica, 1-MCP, etileno.

Abstract

MOURA, Renata Silva. **Profile of differentially expressed proteins associated with post-harvest changes in apples cv. Gala, clone Baigent**. 2010. 69f. Dissertation (Masters Degree) - Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial. Universidade Federal de Pelotas

The apple (*Malus domestica*), from Europe and Asia, belongs to the family Rosaceae, sub-family pomaceas. The apple is a temperate fruit of commercial importance, especially in its fresh state. Among the main apple cultivars grown in Brazil, we are Fuji and Gala, as the most preferred by consumers in Brazil, produced fruits with good sensory characteristics such as appearance, crisp and juicy pulp. However, these attributes are quickly lost during storage under refrigeration (AR). Among the main problems encountered during cold storage, are the decrease in firmness and the occurrence of mealy pulp. Several studies have shown that these physiological disorders are related to ethylene, and its mechanisms have not yet been elucidated. In order to seek further explanation of the molecular mechanisms of interaction of these events with the ethylene, this work proposes a comprehensive analysis of the system using proteomics to study methods. In this context, the objective was to identify and characterize differentially expressed proteins during storage, linking them to the action of ethylene and with changes in fruits of cv. Gala - Baigent clone. In the gels from two-dimensional electrophoresis were detected using the PDQuest program, 565 spots in the sample of apples at 8 months of RA in fruit treated with MCP-1, 452 sample spots for eight months without an RA in fruits - MCP, 348 spots corresponding to sample the fruits at harvest. In a quantitative analysis, when comparing treatments with and without 1-MCP, and considering only the proteins present in both treatments, 120 of them increased or decreased in intensity. Moreover, it was found that 62 spots were detected only in samples treated or not treated with the MCP-1, 160 spots were detected only in samples corresponding to the crop or the samples treated with 1-MCP, and 80 spots were detected only in samples corresponding to the collection or to samples not treated with 1-MCP. The identification and study of their functions are the next steps in the work.

Keywords: firmness, AR, proteomics, 1-MCP, ethylene.

Lista de Figuras

- Figura 1:** Produção de maçãs no Brasil nos últimos quarenta anos.....18
- Figura 2:** Esquema ilustrativo das duas etapas da 2D-PAGE. A) Separação por ponto isoelétrico. B) Separação por peso molecular.....26
- Figura 3:** Firmeza de polpa das amostras na colheita, 8 meses AR sem 1-MCP e das amostras armazenadas 8 meses em atmosfera refrigerada e tratadas com 1-MCP39
- Figura 4:** Farinosidade de polpa no tratamento 8 meses AR sem 1-MCP e 8 meses AR com 1-MCP.....40
- Figura 5:** Produção de etileno das amostras armazenadas 8 meses em atmosfera refrigerada com e sem 1-MCP retiradas da câmara e deixadas 7 dias em temperatura ambiente.....41
- Figura 6:** Gel monodimensional dos extratos protéicos de maçã (1-4) amostra 8 meses AR sem 1-MCP, (5-8) amostra 8 meses com 1-MCP, (9-12) amostra colheita e M marcador de peso molecular coradas com Comassie Blue G250.....42
- Figura 7:** Curva padrão da absorbância da Bovine Gamma Globulin (BGG) em sete concentrações(0,125 mg/mL, 0,250 mg/mL, 0,500 mg/mL, 0,750 mg/mL, 1 mg/mL, 1,5 mg/mL e 2 mg/mL).....43
- Figura 8:** Géis monodimensionais de Bovine Serum Albumin (BSA) na quantidades de 0,6 ng à 400 ng.....45
- Figura 9:** Géis 2D (pH 4-7) das amostras na hora da colheita coradas com Nitrato de Prata.....46
- Figura 10:** Géis 2D (pH 4-7) das amostras armazenadas 8 meses em atmosfera refrigerada sem 1-MCP e coradas com Nitrato de Prata.....47
- Figura 11:** Géis 2D (pH 4-7) das amostras tratadas com 1-MCP e armazenadas 8 meses em atmosfera refrigerada coradas com Nitrato de Prata.....48
- Figura 12:** Número de spots detectados nos géis bidimensionais das amostras 8 meses AR sem 1-MCP, 8 meses AR com 1-MCP e Colheita.....49
- Figura 13:** Em (a) (●) spots da amostra 8 meses AR sem 1-MCP (gel da direita) demonstraram ter valor superior à 2 vezes o volume dos mesmos spots da amostra tratada com 1-MCP (gel da esquerda), e os spots da amostra controle demonstraram ter volume correspondente a 50% ao volume dos spots da amostra tratada. Em (b) Curva demonstrando limiar superior (___) e limiar

inferior (—) , sendo o intervalo entre eles os spots que não demonstraram diferenças na quantidade entre os tratamentos.....51

Figura 14: (●) Spots diferencialmente expressos entre as amostras tratadas com 1-MCP e armazenadas 8 meses em atmosfera refrigerada (gel da direita) e as amostras armazenadas 8 meses sem atmosfera refrigerada sem 1-MCP (gel da esquerda).....52

Figura 15: Géis bidimensionais (Strip pH 4-7) de (a) 8 meses AR + 1-MCP, (b) 8 meses AR sem 1-MCP e (c) colheita coloridos com Comassie Blue G250.....52

Figura 16: Spots diferencialmente expressos à um nível de significância de $P \leq 0,05\%$ entre as amostras de polpa de maçãs no momento de colheita (Colheita), maçãs armazenadas 8 meses sob atmosfera refrigerada sem MCP (8 meses AR) e maçãs armazenadas 8 meses sob atmosfera refrigerada com MCP (8 meses AR +MCP).....54

Lista de Tabelas

Tabela 1: Qualidade de frutos de maçãs cv. 'Gala' – clone Baigent colhidas em maturação fisiológica.....38

Tabela 2: Quantidade de proteína encontrada pelo método de Bradford nos extratos de maçã.....44

Lista de abreviaturas e siglas

AVG	Aminoetoxivinilglicina
ACN	Acetonitrila
ACO	1-aminociclopropano-1-carboxílico oxidase
CHAPS	Ciclohexilamino dimetilamônio propano sulfonado
2D	Eletroforese bidimensional
Da	Dalton
DNA	do inglês: "Deoxyribonucleic acid" Ácido desoxirribonucleico
DTT	Ditiotreitol
ESI	do inglês: "electron spray ionization" Ionização por Eletronspray
IEF	Isoeletrofocalização
IPG	do inglês: "Immobilized pH gel" Gradiente de pH Imobilizado
KDa	Quilodalton
mA	Miliampere
MALDI	do inglês: "matrix assisted laser desorption ionization" Ionização dessorção a laser assistida por matriz
MM	Massa molecular
EM	Espectrometria de massa
1-MCP	Metilciclopropeno
ng	Nanograma
PAGE	do inglês: "Polyacrylamide Gel Electrophoresis" Eletroforese em gel de poliácridamida
pI	Ponto Isoelétrico
PVPP	Polivinilpolipirrolidona
rpm	Rotações por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sódio
TBP	Tributilfosfina
TCA	Ácido tricloroacético
TEMED	N,N-Tetrametilritilmodiamina
TFA	Ácido trifluoroacético
TOF	do inglês: "Time of flight" Tempo de voo
V	Volts
Vhr	Voltagem/hora

VhT	Voltagem/hora total
W	Watts

Sumário

1. Introdução.....	16
2. Revisão da Literatura.....	18
2.1. Maçã: características, produção e armazenamento.....	18
2.2. Armazenamento sob atmosfera refrigerada.....	20
2.3. Tratamento com 1-metilciclopropeno.....	21
2.4. Proteômica.....	23
2.5. Extração de proteínas de maçã.....	24
2.6. Eletroforese Bidimensional.....	25
2.7. Espectroscopia de massas.....	27
3. Material e Métodos.....	29
3.1. Material Vegetal.....	29
3.2. Análises físico-químicas.....	29
3.2.1. Firmeza de polpa.....	29
3.2.2. Farinosidade de polpa.....	29
3.2.3. Acidez titulável.....	30
3.2.4. Sólidos solúveis totais.....	30
3.3. Produção de Etileno.....	30
3.4. Extração de proteínas de maçã.....	31
3.5. Preparo dos minigéis.....	31
3.6. Quantificação das proteínas.....	32
3.7. Focalização Isoelétrica.....	32
3.7.1. Rehidratação das tiras de Gradiente de pH imobilizado.....	32
3.7.2. Isoeletrofocalização.....	33
3.8. Equilíbrio das tiras de gradiente de pH imobilizado (IPG).....	33
3.9. Segunda Dimensão.....	34
3.10. Coloração dos géis.....	34
3.10.1. Coloração com nitrato de prata.....	34
3.10.2. Coloração utilizando Coomassie Blue G250.....	35
3.11. Análise dos géis.....	35
3.12. Digestão triptica das proteínas.....	35

3.13. Purificação das proteínas.....	36
3.13.1. Purificação utilizando ZipTip.....	36
3.13.2. Purificação utilizando método de degradação de sal por evaporação.....	37
3.14. Espectrometria de massas.....	37
4. Resultados e Discussões.....	38
4.1. Análises Físico-Químicas.....	38
4.2. Extração das proteínas de maçã.....	41
4.3. Quantificação do extrato protéico de maçã.....	42
4.4. Teste da sensibilidade de coloração.....	44
4.5. Eletroforese Bidimensional.....	45
4.6. Espectrometria de massas.....	53
5. Conclusões.....	57
6. Referencias Bibliográficas.....	58

1. Introdução

A maçã é uma fruta climatérica e o uso de atmosfera controlada com pequenas concentrações de oxigênio e baixa temperatura de armazenamento, bem como o tratamento com 1-metilciclopropeno (1-MCP), um inibidor da percepção de etileno, são eficazes para retardar o amadurecimento dos frutos (DELL et al., 2002; ASIF et al., 2006). Vários autores relataram regulação diferencial de etileno em relação as características de qualidade na maçã, e verificaram uma relação direta a produção de etileno e a produção de aroma durante a maturação em maçã (DANDEKAR et al., 2004; WANG et al., 2007). Wilkinson et al. (1995) verificaram ainda, a repressão de genes codificadores por proteínas do transporte endocelular em tomates mutantes em um receptor do etileno, sugerindo, que estes genes podem ser etilenos-dependentes.

Genes receptores de etileno foram identificados em muitas espécies de plantas, sendo que suas expressões são regulados diferencialmente de acordo com tecido, estágio de desenvolvimento estímulos ambientais (LASHBROOK et al., 1998; SATO-NARA et al., 1999, RASORI et al., 2002 and CIN et al., 2005). Todos estes estudos sugerem que genes que tem sua expressão reguladas pelo etileno, codificam por proteínas que estão diretamente associadas as mudanças de aroma, cor e textura que ocorrem durante o amadurecimento dos frutos. Muitas proteínas relacionadas à síntese de etileno e ao processo de maturação, podem ser alteradas em quantidade e/ou atividade. Além da grande número de proteínas cuja síntese é influenciada pelo etileno, também é possível que possa haver outras proteínas envolvidas nestes mecanismos que ainda não foram investigadas (TATSUKI, ENDO, OHKAWA; 2007).

Na busca de uma maior compreensão dos mecanismos fisiológicos e moleculares deste processo, a proteômica é uma alternativa que deve fornecer-nos uma representação mais precisa do estado celular da fruta. Proteômica é uma ferramenta sistemática para o estudo global nas mudanças das proteínas, fornecendo uma ligação essencial com a transcriptômica. O proteoma não é estacionário, muda com o desenvolvimento do organismo e com qualquer mudança no seu ambiente (KAZMI & KRULL, 2001). Sendo assim, o proteoma

reflete o estado atual do funcionamento do sistema, ou seja, a expressão funcional do genoma (BANDIL, 2008).

A eletroforese bidimensional (2D) é uma técnica de separação de proteínas baseada em duas características físico-químicas das proteínas: carga elétrica e a massa molecular. A primeira dimensão corresponde a uma eletroforese de focalização isoeletrica (IEF), onde as proteínas são separadas até atingirem o ponto isoeletrico (pH em que o somatório de cargas é igual a zero). Na segunda dimensão, as proteínas são separadas em géis SDS-PAGE de acordo com as massas moleculares (LANÇAS et al., 2003).

A etapa mais crítica em qualquer estudo do proteoma é a extração de proteínas e preparação da amostra. O ideal é a utilização de um protocolo reproduzível para isolar e solubilizar as proteínas de uma determinada amostra, e que possua o mínimo de resíduos de contaminantes não-proteicos. Frutos são considerados, entre os tecidos vegetais, os que têm maior dificuldade em obter proteínas de alta qualidade adequadas para análise proteômica, devido a um baixo teor de proteína e a presença de substâncias interferente, tais como pigmentos, carboidratos, polifenóis, polissacarídeos e amido (WANG et al., 2006; SHEORAN et al., 2009, SONG, et al., 2006).

O objetivo deste trabalho é identificar as proteínas que são diferencialmente expressas durante o armazenamento refrigerado, visto que estas, possam ser reguladas pelo etileno e assim, relacionadas com mudanças fisiológicas ocorrentes na pós-colheita.

2. Revisão da Literatura

2.1. Maçã: produção e características

A macieira (*Malus domestica*) é uma planta da família das rosáceas, sub-família das pomáceas. A maçã é uma fruta de clima temperado de maior importância comercial como fruta *in natura*, tanto no contexto internacional como no nacional (GIRARDI et al., 2004).

A produção brasileira da maçã obteve um significativo crescimento ao longo dos últimos 30 anos com a implantação dos pomares comerciais nas regiões elevadas do sul do Brasil, compreendendo o sul do Paraná, a Região Serrana e o meio oeste do Estado de Santa Catarina e a serra Gaúcha no norte do Estado do Rio Grande do Sul (ABPM, 2010). Na safra 1973/74, a produção foi de 1.528 toneladas, aumentando para 993.225 toneladas na safra de 2006/07 (Figura 1).

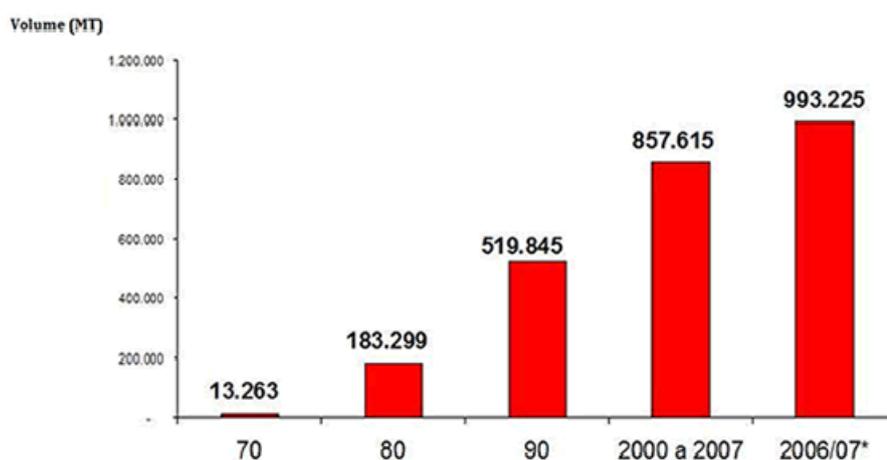


Figura 1: Produção de maçãs no Brasil nos últimos quarenta anos

Fonte: ABPM, 2010.

Atualmente a cultura da maçã é uma atividade econômica relevante na Região Sul do país, com repercussão no cenário internacional, contribuindo com aproximadamente 1,5% da produção mundial (WOSIACKI et al., 2000; ABPM, 2010; GIRARDI et al., 2004). A região sul apresenta destaque na produção de maçã por apresentar as melhores condições climáticas para o

cultivo da macieira. Assim sendo, dados da ABPM (2010), demonstram que o cultivo da maçã brasileira na safra 2007/2008 ocorreu em 37.430 ha sendo 55% destes no estado de Santa Catarina, 37% no Rio Grande do Sul, 1,2% Paraná, e 6,8% distribuídos em outros estados.

O número de cultivares de macieira é bastante amplo, em razão dos trabalhos de melhoramento genético, utilização de hibridações, seleções clonais e mutações. Porém, mesmo com muitas cultivares disponíveis para os produtores, 94% dos pomares brasileiros são formados com as cultivares “Gala” (58%) e “Fuji” (36%) (FERREIRA, 2010).

A cultivar Gala é a primeira a ser colhida – fevereiro – com 55% da produção total; a Fuji, cuja colheita se dá em abril, é a mais resistente para frigoconservação, participando com 40% da produção; os 5% restantes estão Golden Delicious, Cripps Pink, Baigent, Eva, Braeburn, entre outras (FERREIRA, 2010).

A maior produção visa a atender o aumento do mercado consumidor de frutas *in natura*, visto que o consumidor se tornou muito exigente em relação à qualidade e, por isso, as maçãs passam por um processo de seleção e classificação rigorosas, para satisfazer a essa exigência (WOSIACKI et al., 2002).

A ‘Gala’ é a principal cultivar em exploração no Brasil (ABPM, 2010), visto que é uma cultivar de maçã que foi rapidamente aceita na maior parte do mundo, por apresentar frutos com boa coloração e aparência, e polpa crocante e suculenta (DENARDI & CAMILO, 1992).

O cultivar ‘Gala’ produz frutos muito atrativos, com a epiderme lisa, brilhante, vermelho rajada sobre fundo amarelo e geralmente com pouco *russeting*. O tamanho dos frutos é pequeno a médio e o formato redondo-cônico. A polpa é de coloração amarelo-creme, firme, crocante, suculenta, bem balanceada em ácidos e sólidos solúveis (CAMILO & DENARDI, 2006). Ela apresenta várias mutações somáticas, geralmente mais coloridas que a “tradicional”, com destaque para Royal Gala, Imperial Gala, Mondial Gala, Galaxy, Baigent, Maxi-Gala e Lisgala (FIORAVANÇO, 2009).

A Baigent é uma mutação natural de Royal Gala ocorrida no pomar do Sr. Paul Brookfield na Baía de Hawes na Nova Zelândia em janeiro de 1985. O período de colheita inicia no final de janeiro até o mês de fevereiro dependendo

de condições climáticas e período de floração. A coloração é antecipada em torno de 15 dias em relação a Royal Gala, este fato facilita a redução de passadas na colheita. Os frutos possuem um padrão de cor distinto estendendo-se sobre a superfície inteira do fruto de cor predominantemente vermelho vivo com manchas de cor terra completando com salientes listras vermelhas mais escuras (MULLER, 2007).

As maçãs da cv. 'Gala', mesmo sendo uma das primeiras cultivares a ser colhida, e de encontrar um mercado ávido para maçã fresca e de qualidade superior, uma parte da produção deve ser armazenada em câmaras frigoríficas para futura comercialização (LUNARDI et. al.(a), 2004).

2.2. Armazenamento sob atmosfera refrigerada

O período de armazenagem de maçãs, principalmente da cultivar 'Gala', não deve ser muito prolongado, visto que as perdas qualitativas podem inviabilizar as maçãs para a comercialização (BRACKMANN & CERETTA, 1999). A partir de abril o mercado já começa a ser abastecido por frutas frigorificadas com a oferta declinando fortemente a partir de setembro, quando já começa a ser difícil a manutenção da qualidade em câmaras, mesmo com a utilização de atmosfera controlada. Assim, nessa época há uma queda da oferta com conseqüente aumento de preços (TODA FRUTA, 2006).

Após três meses de armazenamento refrigerado, uma série de fatores como podridões e distúrbios fisiológicos, incluindo a formação de polpa farinhenta, diminuem a qualidade da maçã (BRACKMANN, 1992). Entretanto, com o uso da atmosfera controlada, assim como o uso de 1-MCP (1 metilciclopropeno) o período de armazenamento da maçã 'Gala' pode alcançar seis a nove meses, dependendo das condições de armazenamento e do ponto de colheita. A longevidade dessa maçã geralmente é limitada pela baixa firmeza, pelo amarelecimento, pela ocorrência de degenerescência senescente da polpa, pela polpa farinácea, pela rachadura nas frutas e pelas podridões (GIRARDI et al., 2004).

A polpa farinhenta é um distúrbio fisiológico que ocorre quando a maçã é armazenada por longos períodos, caracterizando-se pela polpa seca, sem suculência, sendo que, freqüentemente, ocorre associado à rachadura na

epiderme e na polpa (SAQUET, BRACKMANN & STORCK; 1997). O aspecto farinhento das maçãs está associado com a incapacidade das células de se romperem e liberarem o conteúdo líquido quando lhes é aplicada uma força, como ocorre durante a mastigação. Logo, o fruto é considerado menos suculento quando as células do tecido da maçã facilmente se separam umas das outras em vez de se romperem (DE SMEDT, PAUWELS & BAERDEMAEKER; 1998). A suculência de maçãs, portanto, tem relação com o grau de maturação dos frutos, ou seja, quanto mais maduro o fruto, menos suculento será, pois conforme o fruto amadurece, decresce a adesão célula a célula e conseqüentemente, aumenta a separação entre elas. Esta característica de polpa seca e tecido desagregado dão sensação palatável de fruto farinhento (DE SMEDT, PAUWELS & BAERDEMAEKER; 1998; BARREIRO et al.,1999).

Várias pesquisas têm sido conduzidas visando o desenvolvimento de técnicas e tratamentos, que combinadas com a atmosfera refrigerada, possam manter a qualidade dos frutos, ampliando sua vida pós-colheita. Estudos comprovam que em atmosfera controlada onde se monitoram as concentrações de O₂ e CO₂ o período de armazenamento pode ser estendido em até oito meses. A atmosfera com um baixo teor de oxigênio e alto nível de gás carbônico efetivamente inibe a síntese e sua ação. O oxigênio é um dos substratos do ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico oxidase (ACCoxidase), enzima que cataliza a conversão do ACC a etileno, enquanto o gás carbônico é considerado como um inibidor competitivo da ligação do etileno ao seu receptor (BRACKMANN et al. 2004; SAQUET,1997; LUNARDI et al. (b), 2004).

2.3. Tratamento com 1-Metilciclopropeno (MCP)

A maçã, por ser um fruto climatérico, apresenta uma pronunciada elevação na taxa respiratória durante o amadurecimento a qual é estimulada pelo etileno. Este, por sua vez, é considerado um fitoregulador, o qual atua em fases diversificadas, como crescimento, desenvolvimento e senescência, mas principalmente no amadurecimento de frutas climatéricas (KLUGE et al., 1997). O etileno desempenha um papel importante e decisivo durante o

armazenamento, pois estimula o amadurecimento dos frutos na câmara frigorífica.

Normalmente é mencionado que, quando se trata de cultivares da mesma espécie, a intensidade respiratória e a duração do armazenamento atuam em sentido proporcional contrário, ou seja, quanto mais elevada for a respiração de um determinado fruto, menor será o seu tempo de conservação (STEFFENS, 2007). Parâmetros físico-químicos de qualidade tais como a firmeza da polpa e, especialmente, a cor verde dos frutos, são afetados pela ação do etileno, proporcionando assim, frutos com baixa firmeza e mais amarelos, reduzindo o tempo de armazenamento (STREIF, 1992).

A produção endógena de etileno é uma parte essencial do amadurecimento das frutas climatéricas e, provavelmente, atua como um ativador de processos de etileno-dependente (THEOLOGIS, 1992). A maioria das estratégias comerciais para aumentar a longevidade de produtos vegetais são baseados em evitar a exposição ao etileno e / ou tentar minimizar sua produção e sua ação durante a maturação, colheita, transporte, armazenagem e manuseio (WATKINS, 2002).

Dentro deste contexto, uma nova estratégia para controlar a produção de etileno e, portanto, maturação e senescência das frutas, especialmente climatéricos, como a maçã, é o uso de um inibidor da percepção de etileno, 1-metilciclopropeno (1-MCP). Este composto age ligando-se aos receptores de etileno, inibindo sua ação (BLANKENSHIP & DOLE, 2003). O aumento da produção e da concentração interna de etileno e os eventos controlados por esse fitohormônio em frutos climatéricos são prevenidos ou atrasados com a aplicação de 1-MCP (WATKINS, 2006). Em maçãs, o 1-MCP retarda a maturação, o que mantém a qualidade por um espaço maior de tempo (BARITELLE et al., 2001).

A eficácia do 1-MCP é influenciada pela cultivar, condições de armazenamento, temperatura do tratamento, tempo de maturação dos frutos, e tempo de colheita (BLANKENSHIP & DOLE, 2003). A eficácia do 1-MCP diminuiu significativamente dependendo do tempo de aplicação após a colheita (MIR et al., 2001). Tatsuki, Endob & Ohkawa (2007) concluíram que quanto mais tarde é a aplicação de 1-MCP, menor será sua eficácia, visto que genes receptores de etileno não foram inibidos nos frutos tratados tardiamente.

O amolecimento é prevenido ou retardado pela ação do 1-MCP, sendo seus efeitos muitas vezes intimamente associados com a produção de etileno (WATKINS et al., 2000; MIR et al., 2001; PRE-AYMARD et al., 2003).

Frutas climatéricas como o tomate, a maçã e pera, apresentam genes comuns que regulam o amadurecimento, sendo que estas frutas demonstram freqüentemente o apoio da expressão de genes etileno-dependente e etileno-independente durante os processos de maturação (GIOVANNONI, 2004).

Tem sido demonstrado que o amadurecimento de frutos é acompanhado por alterações na síntese protéica e com o surgimento de novas enzimas que catalisam varias dessas alterações (BRADY e O'CONNELL, 1976; DILLEY et al., 1993). Algumas proteínas sintetizadas durante o amadurecimento tem sido caracterizadas como a poligalacturonase, ACC sintase e ACC oxidase, mas as funções de muitas permanecem desconhecidos (ABDI, HOLFORD & MCGLASSON; 2002).

2.4. Proteômica

Proteômica é uma abordagem sistemática para o estudo de mudanças nas proteínas, fornecendo uma ligação essencial entre o transcriptômica (SANTOS, TEIXEIRA & SÁ-CORREIA; 2004). A proteômica consiste no estudo das proteínas expressas a partir de um genoma, portanto, o proteoma é o conjunto de todas as proteínas que intervêm nos processos biológicos de uma espécie (LANÇAS et. al, 2003).

O proteoma observável de uma única célula, definido como a coleção de todas as proteínas existentes em seu fenótipo molecular específico, é altamente dinâmico e dependente do tipo e do estado da célula (GODOVAC-ZIMMERMANN & BROWN, 2001). Portanto, o proteoma não é estacionário, muda com o desenvolvimento do organismo e com qualquer mudança no seu ambiente (KAZMI & KRULL, 2001). Sendo assim, o proteoma reflete o estado atual do funcionamento do sistema, ou seja, a expressão funcional do genoma (BANDIL, 2008).

A obtenção da sequência de nucleotídeos do genoma de um organismo é apenas o primeiro passo que, no entanto, abre caminho à realização de muitos outros estudos. Porém, somente através da inspeção da sequência do

genoma não é possível obter informação sobre o nível de expressão de genes e proteínas, ou sobre características das proteínas expressas, tais como o seu tempo de $\frac{1}{2}$ vida, a sua localização sub-celular, eventuais modificações pós-traducionais, interações proteína-proteína e proteína-DNA, a estrutura e a função biológica das proteínas (SANTOS, TEIXEIRA & SÁ-CORREIA; 2004).

O interesse em análises de proteomas tem aumentado recentemente devido ao alto número de seqüências disponibilizadas pelos projetos de seqüenciamento de genomas. O estudo do proteoma de um organismo pode ser realizado pela exploração da alta capacidade de resolução da eletroforese bidimensional (2-DE) (JUNGBLUT & WITTMANN-LIEBOLD, 1995) acoplada à análise das massas dos peptídeos das proteínas através da espectrometria de massa (ANDRADE et al., 2005).

Nos projetos de proteomas, um dos objetivos primários é separar e visualizar o máximo de proteínas possível de um tecido, permitindo que sejam catalogadas computacionalmente e estudadas por técnicas analíticas. Atualmente a eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida é o método mais eficiente de separação simultânea de centenas ou milhares de proteínas (SOUSA et al., 2007). Os géis bidimensionais são vantajosos na medida em que conferem uma visão global do proteoma de um determinado tecido e permitem a pré-separação das proteínas da amostra por ponto isoelétrico (pI) e peso molecular (PM).

2.5. Extração de proteínas de maçã

A etapa mais crítica em qualquer estudo do proteoma é a extração de proteínas e preparação da amostra. O ideal é a utilização de um protocolo reproduzível para isolar e solubilizar as proteínas de uma determinada amostra, e que possua o mínimo de resíduos de contaminantes não-proteicos (ROSE & SALADIÉ, 2005). Frutos são considerados, entre os tecidos vegetais, os que têm maior dificuldade em obter proteínas de alta qualidade adequadas para análise proteômica, devido a um baixo teor de proteína e a presença de substâncias interferente, tais como pigmentos, carboidratos, polifenóis, polissacarídeos e amido (SONG et. al., 2006).

Maçãs contêm em torno de 0,2% de proteínas medidas pelo método Kjeldahl, porém deste apenas de 50-80% é nitrogênio derivado de proteínas (BEVERIDGE & WEINTRAUB; 1997). No entanto, Neilsen et al. (1993) avaliou o conteúdo de proteína de diferentes cultivares de maçã, e encontrou valores variáveis entre 0,175-0,378% dependendo da cultivar.

O método de extração ideal deve não só captar o maior número possível de proteínas a partir de uma amostra biológica, também deve ser compatível com análise da proteína (SHEORAN et. al., 2009). Uma série de protocolos de extração de proteínas têm sido publicados para os tecidos de plantas (CARPENTIER et al., 2005), e ainda protocolos específicos são otimizados de acordo com o objetivo do estudo. Comparando o número de estudos sobre a compatibilidade dos diferentes métodos de coloração dos géis e posterior análise espectrometria de massa, pouco tem sido feito para avaliar métodos de extração de proteínas que sejam efetivos para análise e identificação destas utilizando técnicas baseadas em MS (SHEORAN et. al., 2009).

Fenol e ácido tricloroacético (TCA) em métodos de extração de determinados tecidos de plantas, resultam em um teor de proteína superior e géis 2D (bidimensional) de boa qualidade (WANG et al., 2006).

2.6. Eletroforese Bidimensional

A eletroforese bidimensional é uma técnica de separação de proteínas baseada em duas características físico-químicas das proteínas: carga elétrica e a massa molecular. Este método é amplamente utilizado em proteômica, possibilitando o estudo do produto final da expressão gênica em larga escala (O'FARRELL, 1975). A primeira dimensão corresponde a uma eletroforese de focalização isoeletrica (IEF), onde as proteínas são separadas até atingirem o ponto isoeletrico (pH em que o somatório de cargas é igual a zero). Na segunda dimensão, as proteínas são separadas em géis SDS-PAGE de acordo com as massas moleculares (HERNÁNDEZ, 2009).

O ponto isoeletrico de uma proteína corresponde ao valor de pH no qual o somatório de todas as suas cargas parciais é igual a zero. Esta propriedade depende da força iônica, da natureza do tampão usado e qualquer outro soluto presente no meio, mas não depende da concentração da proteína. O ponto

isoeletrico de uma proteina e determinado por uma tecnica conhecida como focalizacao isoeletrica (eletrofocalizacao) (ROCHA et. al., 2010). Esta tecnica consiste em submeter a amostra a uma migracao eletroforetica em fita de gel contendo um gradiente de pH. Assim, as proteinas migram horizontalmente no gel ate chegarem ao pH do seu respectivo pI (ponto isoeletrico).

Na segunda etapa, a fita resultante da primeira dimensao e submetida a tradicional Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS para uma segunda separacao das proteinas, agora pela diferenca no peso molecular das moléculas. O resultado final consiste em um gel com diversos discos (spots) dispersos, cada um correspondendo a uma proteina particular. O poder de separacao e tao grande que duas proteinas que diferem em apenas um aminoacido carregado podem ser prontamente distinguidas (ROCHA et. al., 2010).

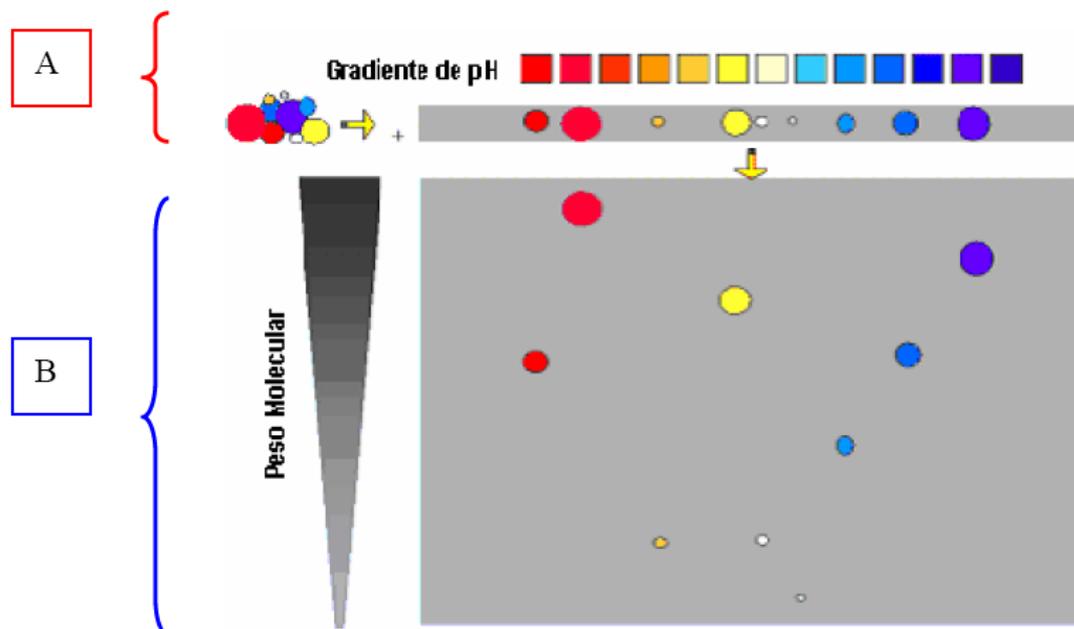


Figura 2: Esquema ilustrativo das duas etapas da 2D-PAGE.
A) Separação por ponto isoeletrico. B) Separação por peso molecular.
Fonte: JING, 2003

2.7. Espectroscopia de massas

Durante a última década, a espectrometria de massas (EM) tornou-se rapidamente, o método analítico de eleição para a identificação e caracterização de proteínas (KICMAN; PARKIN; ILES; 2007). O espectrômetro de massa é um instrumento analítico capaz de converter moléculas neutras em íons na forma gasosa, sendo assim, permite que compostos sejam identificados após produção de íons e sua posterior separação e detecção baseada em sua massa, conferindo alto nível de especificidade com sensibilidade (BANDIL, 2008; KICMAN, PARKIN, ILES, 2007).

Um espectrômetro de massas tem como principais componentes a fonte íons, o analisador de massas e o detector. O desenvolvimento de novas técnicas de ionização possibilitou a análise de proteínas e peptídeos por meio de espectrometria de massa, a partir da década de 80. O surgimento de técnicas mais brandas de ionização foi especialmente útil para a ionização de macromoléculas propensas a fragmentação, permitindo inclusive a análise de complexos formados por interações não covalentes.

Um dos primeiros métodos de ionização foi bombardeamento de átomos rápido, que foi utilizado na análise dos peptídeos e proteínas de fase líquida. Este método tem várias limitações entre as quais se destacam o nível de sensibilidade em picomoles, a baixa gama de massas e a diferença na eficiência de ionização de peptídeos hidrofóbicos, o que limita a análise de misturas complexas (HERNANDEZ, 2009).

As técnicas de ionização que predominam hoje nos equipamentos desenvolvidos para análise de proteínas são a eletroneutralização (ESI) e a desorção a laser auxiliada por matriz (MALDI). Já os analisadores de massa mais utilizados para análise de proteína são os analisadores do tipo quadrupolo (Q), geralmente associado à fonte de ionização por eletronebulização e os analisadores do tipo tempo de voo (TOF) associado à fonte de ionização por desorção a laser (LOGRADO, 2009).

Na técnica MALDI-TOF, a fonte de ionização é um laser (geralmente o comprimento de onda é de 337nm). Neste caso a amostra é depositada previamente junto à matriz orgânica, sendo as mais utilizadas o ácido alfa-ciano-4-hidroxicinâmico, ácido sinapínico ou ácido 2,5-dihidróxido benzóico

capazes de absorver a energia no comprimento de onda do laser utilizado. Quando o laser incide na amostra, a energia absorvida é utilizada tanto para ionizar os analitos (peptídeos) através da transferência de prótons da matriz para os peptídeos, como para desorver estas moléculas ionizadas em uma câmara submetida a uma grande diferença de potencial elétrico. Os íons são acelerados até entrarem numa região livre de campo, o tubo de vôo. O analisador do tipo tempo de vôo (TOF) permite obter a relação massa/carga do peptídeo. Tendo a mesma carga e mesma quantidade de movimento ao final da aceleração, os íons mais pesados demoram mais tempo para percorrer o tubo do que os mais leves. O tempo de vôo para cada íon detectado é plotado num espectro podendo-se deduzir para cada pico uma relação m/z . A dedução da sequência de aminoácidos do peptídeo analisado é feita através de buscas em bancos de dados e a proteína pode assim ser identificada (ALIPO, 2008).

3. Materiais e Métodos

3.1. Material vegetal

As maçãs da cultivar Gala – clone Baigent, foram colhidas no mês de fevereiro de 2009 em um pomar comercial de 2º ano de produção no município de Caxias do Sul/RS. No momento da colheita, as frutas apresentavam uma coloração vermelha, sendo este o ponto de colheita usualmente praticado na região.

Imediatamente após a colheita, as frutas foram selecionadas e padronizadas quanto ao estágio de maturação e acondicionadas em câmaras de 300 L. Uma parte das frutas colhidas foi tratada durante 12 horas/25°C com 625 ppb de 1-MCP (Agro Fresh - 0,14%), sendo outra parte mantidas sob as mesmas condições porém sem o tratamento com 1-MCP. Ao final das 12 horas as amostras tratadas com 1-MCP e não tratadas foram transferidas para câmara de refrigeração à temperatura de 0°C e umidade relativa de $\pm 95\%$. As análises foram realizadas nas amostras mantidas por 8 meses em armazenagem refrigerada mais sete dias de manutenção em temperatura ambiente ($\pm 25^\circ\text{C}$), para simular um período de comercialização.

3.2. Análises físico-químicas

3.2.1. Firmeza de polpa

A Firmeza da polpa foi determinada com auxílio de penetrômetro manual, munido de ponteira de 11 mm, expressando-se os resultados em Newtons (N). Em cada fruta foram realizadas 2 leituras, em lados diametralmente opostos, na seção equatorial da fruta e após remoção da epiderme.

3.2.2. Farinosidade de polpa

Para a medição da farinosidade de polpa, a mesma foi cortada em formato de discos (diâmetro 10 mm, espessura de 5 mm), e mantidos sob

pressão reduzida em 20 ml de uma solução 12% de sacarose por 1 hora. Em seguida, as amostras foram agitadas por 4 horas (25° C, 130 rpm). O peso dos discos foi medido antes (W_0) e depois (W), da agitação. O grau de farinosidade é calculado utilizando a seguinte fórmula $\{(W_0 - W)/(W_0) \times 100\}$. Os valores são expressos em percentual de colapso de polpa (Nara et al., 2001).

3.2.3. Acidez titulável (AT)

A determinação deste parâmetro, foi feita em uma amostra de 10 mL do suco de cada repetição, diluídos em 90 mL de água destilada, e titulados empregando uma bureta digital com solução de hidróxido de sódio 0,1 N até pH 8,1 determinado com pHmetro digital. Os valores expressaram-se em cmolL⁻¹.

3.2.4. Sólidos solúveis totais (SST)

Para a medida dos sólidos solúveis totais, foi utilizado refratômetro Atago modelo PR 101 (0 a 45%) com correção para temperatura, sendo os valores expressos em °Brix.

3.3. Produção de Etileno

A determinação de etileno foi feita por cromatografia em fase gasosa, utilizando um cromatógrafo a gás, equipado com uma coluna de aço inox 1/8, preparado com Porapak® N, e um detector de ionização de chama. As temperaturas da câmara de injeção, coluna e do detector foram de 80°C, 90°C e 200°C, respectivamente. Uma solução gasosa de etileno a 10ppm foi utilizada como padrão. Para a determinação da produção de etileno, aproximadamente 1Kg de frutos foram condicionadas em frascos hermeticamente fechados, durante 1 hora a 25°C. Passado esse período coletou-se, com auxílio de seringas hipodérmicas, 1mL da atmosfera gasosa. A quantificação foi feita correlacionando-se a média das alturas dos picos relativos a cada amostra com a média das alturas dos picos obtidos da solução padrão de etileno.

3.4. Extração das proteínas de maçã

O método de extração das proteínas de maçã foi baseado no protocolo de Zheng et al. (2007) com pequenas modificações. As amostras (1 grama) foram maceradas em nitrogênio líquido, suspensas em 4 mL do tampão de extração (sacarose 0,7 M, KCl 0,1 M, EDTA 50 mM pH 8,5, TRIS HCl 0,5 M pH 8,5, PVPP 1%, DTT 40 mM, H₂O q.s.p), homogeneizadas em vortex por 1 minuto e deixadas em repouso por 10 minutos no gelo. Foi adicionado 4 mL de fenol pH 8,0 agitando gentilmente por 10 minutos. Em seguida as amostras foram centrifugadas à 10800 rpm por 15 minutos em temperatura de 4°C. A fase fenólica foi recuperada e a ela foi adicionado 3 mL do tampão de extração. O extrato foi homogeneizado por 5 minutos e centrifugado a 10800 rpm por 15 minutos em temperatura de 4°C. Ao sobrenadante recuperado foi adicionado uma solução de precipitação (DTT 0,5 mM, TCA 10% p/v, Acetona q.s.p.) em um volume correspondente a 4 vezes o volume ao sobrenadante recuperado, e deixado em repouso overnight à -20°C. O extrato então foi centrifugado à 10800 rpm por 10 minutos em temperatura de 4°C e o sobrenadante foi descartado. Foi adicionado 5 mL da solução de lavagem (DTT 1,5 mM, Acetona q.s.p.) ao precipitado e deixado em repouso por 1 hora à -20°C. A amostra foi então centrifugada à 10800 rpm por 10 minutos em temperatura de 4°C. O sobrenadante foi descartado e a etapa de lavagem foi repetida. Em seguida ao pellet foi adicionado 1,8 mL TCA/Acetona e homogeneizado e colocado em repouso por 1 hora à -20°C. Após foram centrifugados e o sobrenadante foi descartado. Os pellets foram então secos em Speed Vac e pesados. Enfim, os pellets foram ressuspensos em tampão (uréia 7 M, tiouréia 2 M, CHAPS 4%, DTT 20 mM, TBP 5 mM, ABS 2% v/v, Bio Lyte Ampholyte pH 3-10 e Ampholyte solution pH 4-6) em uma proporção de 20 uL de tampão para cada 1 mg de amostra.

3.5. Preparo dos minigéis

Após a realização de cada série de extração, seguida da ressuspensão e quantificação das proteínas, foi preparado em gel de 10 cm x 8,5 cm (Mini-PROTEAN II Cell, Bio Rad), com o objetivo de confirmar o perfil de expressão

das proteínas, visto como recurso para verificar se a extração foi bem sucedida. As proteínas foram desnaturadas em tampão de 0,5 M Tris-HCl pH6,8, 10% (v/v) glicerol, 10% (p/v) SDS, 5% (v/v) β-mercaptoetanol, 1% (p/v) azul de Bromofenol, por 1 min a 95°C. Em seguida, foram submetidas à eletroforese. As amostras foram aplicadas em gel de acrilamida (4% p/v), e submetidas a uma corrente inicial de 50 V por 15 minutos, antes de migrarem no gel de corrida, preparado com 12,5% (p/v) de acrilamida, a 70 V por 2 horas, em tampão Laemmli inferior (25 mM Tris, 192 mM glicina) e superior (25 mM Tris, 192 mM glicina, 0,1% (p/v) SDS).

3.6. Quantificação das proteínas

A quantificação das proteínas extraídas foi realizado para a padronização da aplicação da carga de proteínas na primeira dimensão (IEF) e foi baseado no método Bradford (1976).

3.7. Focalização Isoelétrica

Para a isoeletrofocalização foram utilizadas tiras comerciais de gel de poliacrilamida com gradiente de pH imobilizado (IPG). As faixas de pH utilizadas foram pH 4-7 linear em tiras de 17 cm. Tais tiras foram rehidratadas e posteriormente submetidas a isoeletrofocalização, como descrito detalhadamente a seguir.

3.7.1. Rehidratação das tiras de Gradiente de pH imobilizado

Para a rehidratação das tiras gradiente de pH 4-7 foi adicionado ao volume das amostras correspondente a aproximadamente 800ug de proteína, e tampão de rehidratação (URÉIA 7 M, TIURÉIA 2 M, CHAPS 2%, DTT 20 mM, TCEP-HCl 5 mM, TRITON 100x 1%) para completar o volume de 300uL na tiras de 17cm, segundo recomendações do fabricante.

A rehidratação foi feita na cuba de IEF da seguinte forma: após aplicar a amostra em um das canaletas da cuba, o plástico que protege o gel das tiras

de IPG foi retirado cuidadosamente e as tiras foram posicionadas com o gel voltado para baixo na canaleta. Esse processo foi repetido para cada uma das amostras a serem analisadas. O gel foi coberto com 1,5 mL de óleo mineral. Para que o gel absorvesse a solução contendo as proteínas, a cuba com canaletas carregadas, foi deixada à temperatura ambiente durante 30 minutos.

3.7.2. Isoeletrofocalização

Depois de reidratada, a cuba foi posicionada sobre o aparelho 2DGE Protean IEF cell (BIORAD) onde a isoeletrofocalização foi conduzida. As condições para isoeletrofocalização (IEF) foram: temperatura de 20°C e amperagem de 50uA por tira. A IEF ocorreu em nas seguintes etapas: 12h de reidratação a 50V, 100 V por 1 h, 200V por 1 h, 400V por 1 h, 700V por 1 h, 5000 V por 4 h e 8000 V até atingir 72.000 Vh. Após a IEF as tiras de IPG foram colocadas em placas com canaletas para as strips, e imediatamente congeladas a -20°C onde permaneceram armazenadas até posterior utilização.

3.8. Equilíbrio das tiras de gradiente de pH imobilizado (IPG)

Para realização da segunda dimensão, os tubos de ensaio contendo as tiras de IPG submetidas à primeira dimensão foram retirados do freezer -20°C. Em cada uma das canaletas foram adicionados 5mL de tampão de equilíbrio (6M uréia, 75mM Tris-HCl pH 8,8, 20% glicerol) contendo 100mg de (DTT). Após agitação leve durante 10 minutos em mesa agitadora, a solução de cada canaleta foi substituída por 5mL de tampão de equilíbrio contendo 125 mg de iodoacetamida. Nessa solução, as tiras foram deixadas por mais 10 minutos sob agitação.

Após o equilíbrio, as tiras de IPG foram submetidas por 10 segundos em tampão para cuba 1X (1,4% Glicina, Trizma Base 0,3%, SDS 0,1%) e imediatamente submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS (SDS-PAGE).

3.9. Segunda Dimensão

A segunda dimensão, que envolve a realização de uma corrida eletroforética em gel de poliacrilamida na presença de SDS (SDS-PAGE), foi realizada em cuba tipo Multi Gels Electrophoresis Units (Bio-Rad). Foram preparados géis na concentração 30% de solução de acrilamida 40%T 2,67%C, 1,5% de SDS 10%, 50% Tris-HCl 1M pH 8,8, 0,15% de TEMED e 0,30% de APS 10%. As tiras de IPG foram posicionadas horizontalmente no topo dos géis em contato com os mesmos. A manutenção da tira junto à superfície do gel foi garantida pela adição de 3mL de gel de agarose 0,3% em tampão Tris-glicina contendo 3 gotas de bromofenol.

A corrente durante a eletroforese, foi limitada a 15mA/gel, 7V/gel e 1W/gel no início da corrida e 15mA/gel, 25V/gel, 3W/gel no final da corrida, sendo a temperatura mantida à 15°C mantida por refrigeração com circulador termostático.

3.10. Coloração dos géis

3.10.1. Coloração com nitrato de prata

Após a eletroforese, os géis foram deixados por 1 hora sob agitação num recipiente contendo solução de fixação (40% etanol e 10% ácido acético). Em seguida esta solução foi trocada por uma solução de sensibilização (formaldeído 0,04%, tiosulfato de sódio 0,05%, acetato de potássio 8%, etanol 30%) durante 30 minutos. Após os géis foram lavados duas vezes por 5 minutos em água e mergulhados na solução de coloração (AgNO_3 0,1%, formaldeído 0,025%) por 30 minutos. Novamente em seguida os géis foram lavados em água duas vezes por trinta segundos e então mergulhados na solução de revelação (HSO_3Na 30uM, KCaO_2 2,5%, formaldeído 0,04%). Após os géis terem obtido a coloração desejada, foram colocados em uma solução STOP de EDTA 1,46%.

3.10.2. Coloração utilizando Coomassie Blue G250

Para análise em espectrometria de massas a coloração utilizada foi segundo protocolo de Pink et al. (2010) com algumas modificações, na qual os géis foram colocados em uma solução de coloração (sulfato de alumínio 5%, etanol 10%, CBB G250 0,02%, ácido fosfórico 8%) por no mínimo 3 horas, em seguida colocados em uma solução de ácido fosfórico 2% , etanol 10% por 30 minutos, e após foram colocados em H₂O milliQ e deixados overnight.

3.11. Análise dos géis

As imagens dos géis bidimensionais foram digitalizadas utilizando o densitômetro GS-800 (Bio-Rad) juntamente com o The Discovery Series™ Quantiry One Quantitation Software (Version 4.4; Bio-Rad). As imagens obtidas foram posteriormente analisadas no programa Series™ Discovery PDQuest Gel 2D software de análise (versão 8.0; Bio-Rad). Os pontos protéicos foram detectados automaticamente pelo programa e em seguida foram feitas correções manuais. Os spots foram quantificados em unidades de volume (área versus intensidade) e a normalização foi efetuada dividindo-se o volume de cada spot pela soma total de volumes de todos os spots, de forma que cada volume normalizado representa uma porcentagem do volume total.

Os géis representativos de cada tratamento foram comparados para verificar diferenças nos perfis de proteínas. Para consideram uma proteína expressa apenas em um dos tratamentos, o critério utilizado foi o aparecimento ou desaparecimento do spot no gel. Para considerar diferença quantitativa de expressão, foi considerado aumento ou diminuição de pelo menos uma vez e meia o volume normalizado.

3.12. Digestão tríptica das proteínas

Os géis corados com Coomassie Blue G250, foram utilizados para o recorte de proteínas, visto que aquela é uma coloração compatível para análise de proteínas em MS. As proteínas foram recortadas dos géis de forma que o diâmetro fosse do tamanho dos pontos protéicos. Os fragmentos de gel

contendo as proteínas recortadas e armazenadas à -20°C até o momento do uso.

Os spots recortados foram retirados do freezer e colocados a temperatura ambiente. Em seguida os spots foram macerados e lavados com 50uL de solução de descoloração (ácido acético 10% , metanol 40%) durante 30 minutos, este processo foi realizado duas vezes. Retirada a solução de descoloração, foi adicionado 50uL de solução de lavagem (bicarbonato de amônio 50mM) durante 15 minutos. Os spots foram lavados com 50uL de acetonitrila durante 15 minutos e em seguida foi adicionado novamente 50uL da solução de lavagem por mais 15 minutos. Retirada a solução de lavagem, foi adicionada 50uL de solução de desidratação (acetonitrila) por mais 15 minutos, sendo que esta etapa foi repetido mais uma vez. Após retirar a solução de desidratação, os tubos com os spots foram colocados no gelo durante 10 minutos, e em seguida foi adicionada 5uL por tubo de solução de digestão (tripsina 20ng/uL). Após 10 minutos, assim que o volume de tripsina foi absorvido pelo gel, os tubos foram deixados overnight em estufa à 37°C. Após duas 2 horas de digestão foi adicionado 5uL de tampão de digestão (25mM NH₄HCO₃ + metanol 20%) para compensar o volume perdido por evaporação.

A primeira extração foi realizada com 15uL de solução de extração (Ácido trifluoracético 0,5%, Acetonitrila 40%, metanol 10%) durante 15 minutos. Em seguida o extrato foi transferido para novos tubos. A segunda extração foi realizada com 15uL de acetonitrila durante 15 minutos. O extrato foi então transferido e unido ao primeiro extrato, ficando com um único produto de digestão trípica no volume total de 30uL. Em seguida, o extrato foi seco em Speed Vac à temperatura ambiente.

3.13. Purificação das Proteínas

3.13.1. Purificação utilizando ZipTip

Após a digestão, os peptídeos secos em Speed Vac, devem ser resuspendidos em solução de TFA 0,1%, sendo o volume final de 15uL. Após

as amostras foram purificadas utilizando kit ZipTip conforme indicação do fabricante.

3.13.2. Purificação utilizando método de degradação de sal por evaporação

Após a digestão, os peptídeos devem ser secos em Speed Vac e ressuspensos em 30uL H₂O miliq. Em seguida, as amostras foram novamente colocadas em Speed Vac com temperatura de 40°C em um tempo de 30 minutos, sendo que estes processos foram repetidos mais uma vez. Após as amostras foram ressuspensas em 30uL de 0,1% TFA/ 50% ACN, e armazenadas sob temperatura de -80°C até o momento da injeção.

3.14. Espectrometria de massas

Após hidrólise as amostras foram misturadas com uma matriz de ácido a-cyano 4-hydroxicinâmico em solução 50 % de acetonitrila e 1 % de ácido trifluoroacético, para então serem analisadas no MALDI-TOF ou MALDI-TOFTOF.

Os espectros foram adquiridos no modo refletido com o dispositivo “extração atrasada”, na faixa massa/carga de 800 a 4000 daltons. As misturas foram aplicadas na placa (1 µl) e secas à temperatura ambiente. No MALDI-TOF-TOF, além do espectro de MS, foi gerado espectros MS/MS a partir da fragmentação dos dez íons m^os abundantes.

4. Resultados e Discussões

4.1. Análises Físico-Químicas

Pode-se verificar na Tabela 1 que os frutos colhidos apresentavam-se dentro do ideal para uma armazenamento prolongado estabelecido para a cultivar Gala (Girardi et al., 2001). Obteve-se um valor médio de 12,68 °brix e 8,29 Cmol/L para acidez titulável. Na tabela também podemos observar uma diminuição na acidez titulável nos frutos tratados quando comparados as amostras da colheita, sendo um valor de $4,36 \pm 0,32$ Cmol/L para as amostras 8 meses AR sem 1-MCP e $4,29 \pm 0,43$ Cmol/L para as amostras armazenadas 8 meses em atmosfera refrigerada e tratadas com 1-MCP. Em geral tratamentos com 1-MCP atrasa a perda de acidez titulável, porém há relatos de ausência de efeitos ou respostas incoerentes durante os tratamentos (WATKINS, 2006).

Tabela 1: Qualidade de frutos de maçã cv. Gala – clone Baigent colhidas em maturação fisiológica.

	Colheita	8 meses AR sem 1-MCP	8 mese AR com 1-MCP
AT (Cmol/L)	$8,29 \pm 0,61$	$4,358 \pm 0,32$	$4,292 \pm 0,43$
SS (°Brix)	$12,68 \pm 0,90$	$13,78 \pm 1,03$	$13,7 \pm 0,43$

Os resultados para firmeza e farinosidade de polpa das frutas analisadas podem ser visualizados nas Figuras 3 E 4 abaixo. Observa-se que as amostra tratadas com 1-MCP apresentaram firmeza de polpa superior a 60N ($68,86 \pm 5,3892$), que é considerado o valor mínimo de firmeza para consumo e comercialização de maçãs da variedade ‘Gala’ (MIR et al., 2001). Já as amostras armazenadas 8 meses em atmosfera refrigerada sem o 1MCP apresentaram valores de firmeza abaixo do mínimo indicado ($55,575 \pm 8,3811$). Portanto o uso do 1-MCP na pós-colheita de frutos reduziu a perda de firmeza durante o armazenamento. Este resultado condiz com Brackmann et al. (2008)

onde o uso do AVG (aminoetoxivinilglicina) na pré-colheita em conjunto com o uso do 1-MCP no pós-colheita manteve os frutos mais firmes após 8 meses de armazenamento refrigerado. Sendo tanto o AVG quanto o 1-MCP agentes inibidores da biossíntese e da ação do etileno, respectivamente, pode-se afirmar que a redução da firmeza de polpa é um processo etileno dependente (SISLER & SEREK, 1997).

Analisando a figura 4 podemos notar que a farinosidade de polpa é reduzida nas amostras tratadas com 1-MCP quando comparadas com as amostras não tratadas. Nesta análise fica evidente que o tratamento com 1-MCP auxilia na manutenção da qualidade dos frutos durante armazenamentos prolongados. Pre-Arymard et. al. (2002) observam que a aplicação de 1-MCP previniu o desenvolvimento de polpa farinhenta em maçãs 'Anna', que é uma cultivar precoce e perde rapidamente a firmeza e a suculência. Hallett e Harker (1992) concluíram que a farinosidade em maçã foi associado com baixa adesão entre células vizinhas, e uma resistência relativamente alta à ruptura celular.

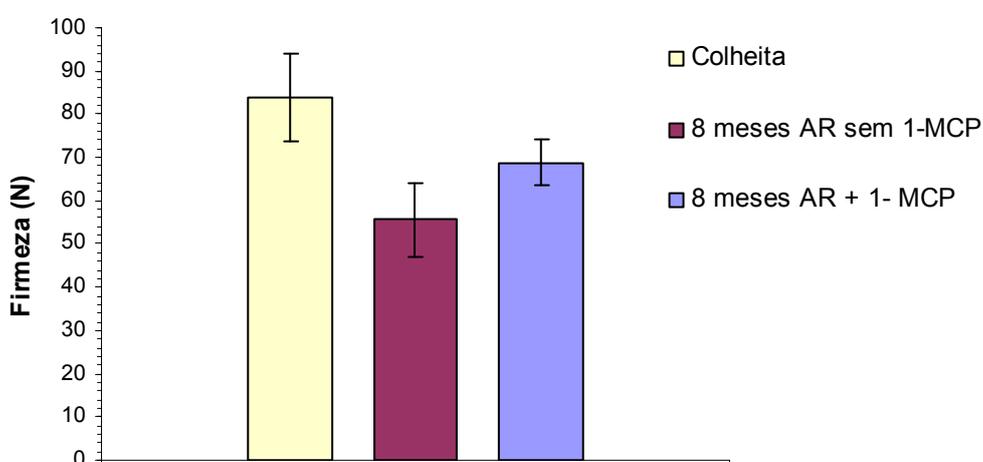


Figura 3: Firmeza de polpa das amostras na colheita, 8 meses AR sem 1-MCP e das amostras armazenadas 8 meses em atmosfera refrigerada e tratadas com 1-MCP

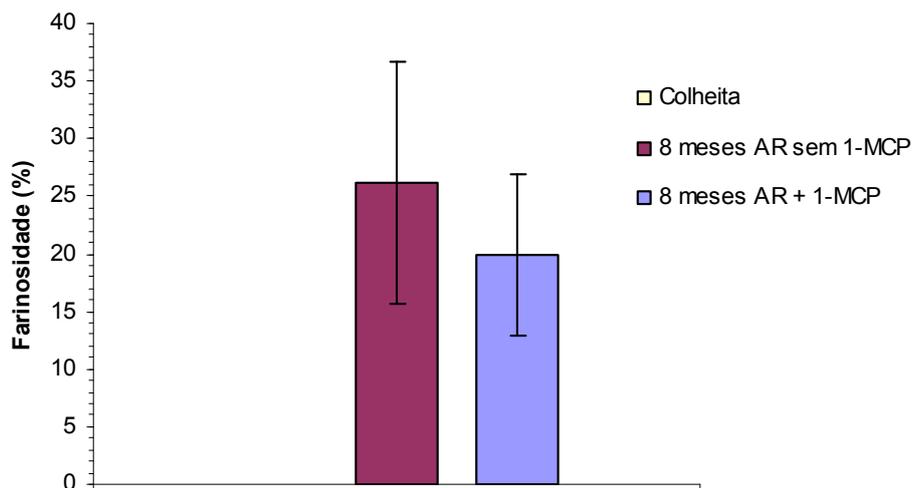


Figura 4: Farinosidade de polpa no tratamento 8 meses AR sem 1-MCP e 8 meses AR com 1-MCP.

Os resultados para produção de etileno das amostras são mostrados na Figura 5 abaixo. Como esperado, as amostras que apresentaram maior produção de etileno foram as amostras armazenadas 8 meses em atmosfera refrigerada sem 1-MCP ($404,71 \pm 2,68$), porém podemos verificar também que aos 8 meses de armazenamento o 1-MCP não inibiu totalmente a biossíntese do etileno, apresentando um valor de $338,82 \pm 5,47$. O 1-MCP interage com os receptores do etileno, inibindo assim as ações etileno dependente em frutos, porém quando os frutos tratados são armazenados por longos períodos, o 1-MCP diminui sua ação e o fruto passa novamente a produzir etileno. Isto ocorre, devido ao fato de que com o tempo o fruto passa a produzir novos receptores de etileno (BLANKENSHIP & DOLE, 2003), sendo que estes ficam livres para agir e atuar novamente no fruto.

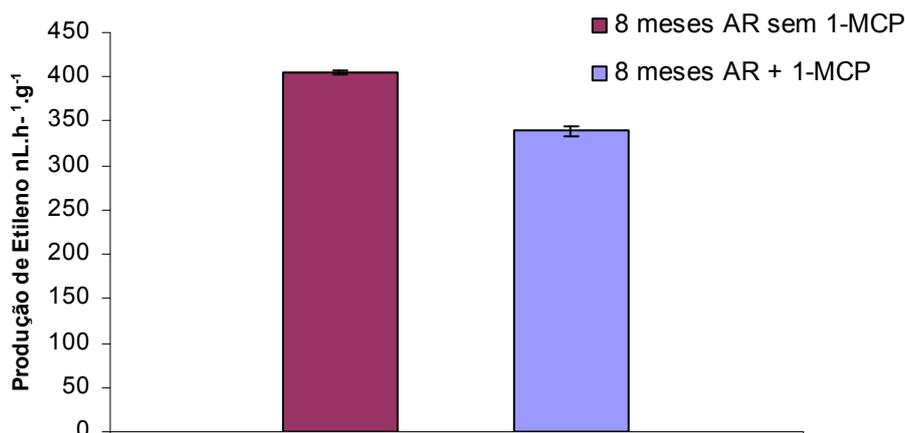


Figura 5: Produção de etileno das amostras armazenadas 8 meses em atmosfera refrigerada com e sem 1-MCP retiradas da câmara e deixadas 7 dias em temperatura ambiente.

4.2. Extração das proteínas de maçã

O método utilizado permitiu a extração de uma grande quantidade de proteínas da polpa de maçã, pois foi observada nos géis tanto monodimensionais quanto bidimensionais a presença de proteínas ácidas, básicas de altas e baixas massas moleculares. Na Figura 6 podemos observar a pureza das proteínas extraídas, visto a boa separação das bandas é possível verificar uma maior concentração de proteínas entre os pesos de 100KDa e 50KDa. Mesmo sendo um gel monodimensional, já é possível observar algumas proteínas que estão sendo diferencialmente expressas.

Muitos métodos utilizados na extração de proteínas de diferentes tecidos, incluindo de vegetais, animais e/ou microrganismos, tem sido testados (PECK *et al.*, 2001; ABDI *et al.*, 2002, SANTONI *et al.*, 1998, AL DAMERVAL *et al.*, 1986). Esses protocolos serviram como base para o estabelecimento da metodologia utilizada nesse trabalho utilizando polpa de frutos, sendo a extração com fenos a que melhor apresentou rendimento e concentração dos extratos.

Barraclough *et al.* (2004) testou três protocolos de extração de proteínas, TCA-Acetona, SDS e Fenol, em tecidos de maçã e abacate sendo

todas elas reprodutíveis em laboratório. Zheng *et al.* (2007) testou os mesmos três protocolos para extração de proteínas de casca de maçã e morango sendo que o protocolo Fenol apresentou maior rendimento, assim como melhor separação por SDS-PAGE.

A literatura relata que a extração fenólica produz uma amostra mais pura (HURKMAN & TANAKA, 1986). Componentes não protéicos como ácidos nucléicos, fenóis, lipídios e carboidratos normalmente são responsáveis por provocar manchas em géis bidimensionais (SARAVANAN & ROSE, 2004). Estes elementos são mais facilmente removidos da amostra uma vez que permanecem junto à fase solúvel do tampão, enquanto as proteínas ficam solúveis na fase fenólica.

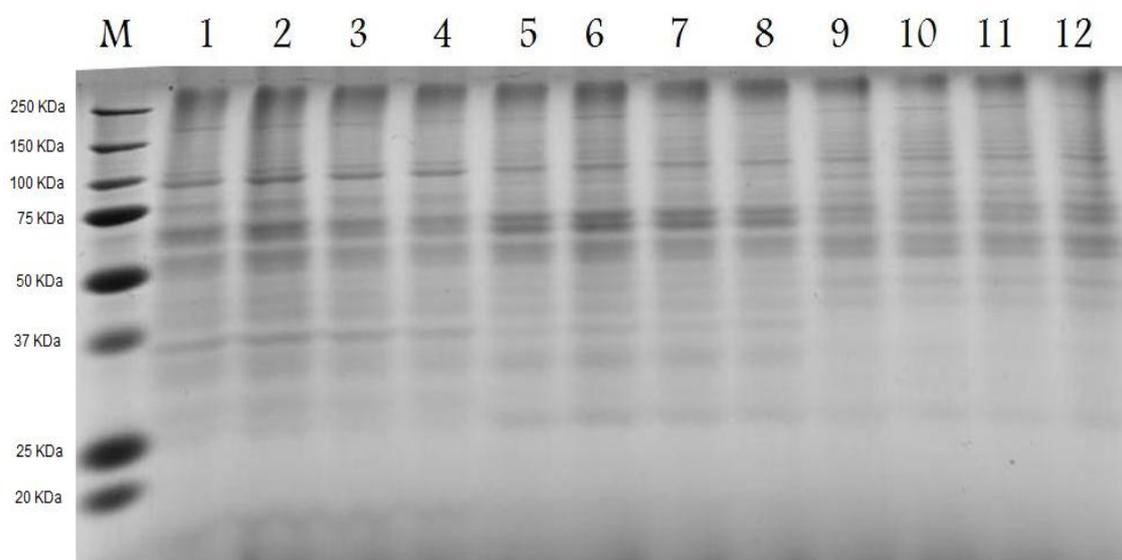


Figura 6: Gel monodimensional dos extratos protéicos de maçã (1-4) amostra 8 meses AR sem 1-MCP, (5-8) amostra 8 meses com 1-MCP, (9-12) amostra colheita e M marcador de peso molecular coradas com Comassie Blue G250.

4.3. Quantificação do extrato protéico de maçã

Para a quantificação foi preparada uma curva padrão (Fig. 7) utilizando-se como referência concentrações conhecidas de BGG (Bovine Gamma Globulin). A partir desta curva e da equação da reta com ela obtida, executo-se a quantificação das proteínas extraídas da polpa de maçã, os quais podem ser visualizados na Tabela 2.

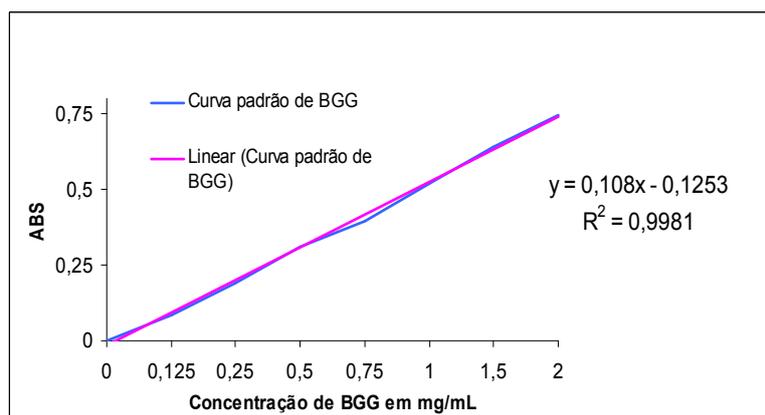


Figura 7: Curva padrão da absorbância da Bovine Gamma Globulin (BGG) em sete concentrações (0,125mg/mL, 0,250mg/mL, 0,500mg/mL, 0,750mg/mL, 1mg/mL, 1,5mg/mL e 2mg/mL).

As quantidades totais de proteínas extraídas foram em torno de 3200µg/grama de tecido vegetal (0,32% de proteína em polpa de maçã fresca). Esses dados estão de acordo com a literatura que relata valores de proteína em polpa de maçã entre 0,2 à 0,4%, sendo que estes valores são variáveis entre as diferentes cultivares (BEVERIDGE & WEINTRAUB, 1997).

Sendo assim, torna-se claro que o método utilizado neste trabalho para a extração de proteínas de maçã, é de caráter prático reprodutível tanto quantitativamente, evidenciado pelo elevado teor de proteína extraída, quanto qualitativamente comprovado anteriormente pela qualidade do gel monodimensional (Fig. 6).

Tabela 2: Quantidade de proteína encontrada pelo método de Bradford nos extratos de maçã

Amostra	Descrição	Proteína (mg/mL)
1	8 meses sem 1-MCP	8,478 ± 0,01136
2	8 meses sem 1-MCP	7,905 ± 0,05746
3	8 meses sem 1-MCP	7,709 ± 0,04004
4	8 meses sem 1-MCP	7,799 ± 0,0200
5	8 meses com 1-MCP	7,539 ± 0,0028
6	8 meses com 1-MCP	7,679 ± 0,07171
7	8 meses com 1-MCP	8,305 ± 0,02641
8	8 meses com 1-MCP	7,382 ± 0,03677
9	Colheita	8,288 ± 0,01652
10	Colheita	7,855 ± 0,04392
11	Colheita	7,772 ± 0,02259
12	Colheita	8,348 ± 0,02351

4.4. Teste da sensibilidade de coloração

A coloração com nitrato de prata, sem dúvida, continua a ser o método mais sensível para a coloração permanente de proteínas em géis de poliacrilamida (PINK et. al., 2010). O limite de detecção para este tipo de coloração é segundo Merril et .al. (1980) de 0,01ng por banda, porém a coloração de géis em prata reduz a eficiencia da digestão e portanto a identificação das proteínas por espectrometria de massas. Na Figura 8 pode-se visualizar o gel 1-D preparado de BSA (Bovine serum albumin) nas concentrações de 0,6ng à 400ng por banda. Podemos perceber que o método de coloração utilizando Comassie Blue G250 apresentou alta sensibilidade, visto que, foi possível visualizar bandas com baixas concentrações de proteínas como a de 0,6 e 0,8ng. Este resultado está de acordo com os estudos de Pink et.al. (2010) nos quais relataram um limite de detecção de 0,075ng por banda de BSA.

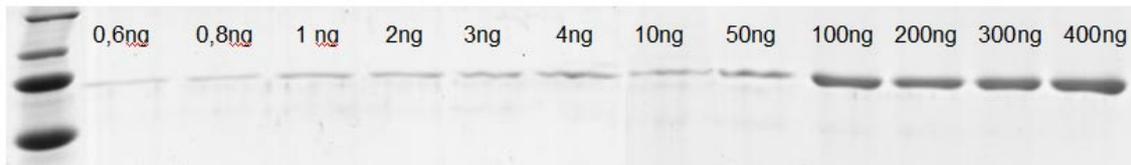


Figura 8: Géis monodimensionais de Bovine Serum Albumin (BSA) na quantidades de 0,6ng à 400ng coradas com Comassie Blue G 250.

4.5. Eletroforese Bidimensional

Após a digitalização dos géis bidimensionais, cada gel foi analisado individualmente. A detecção automática dos spots, realizada através do programa de análises de imagens, é muito sensível. Dependendo dos parâmetros utilizados na análise, ela considera toda e qualquer alteração de intensidade do gel como spot, mascarando resultados. Por este motivo, são necessárias correções manuais para garantir que os spots marcados representem somente pontos protéicos.

Para cada tratamento foram feitos quatro géis bidimensionais utilizando a amostras de quatro extrações diferentes (Figs. 9, 10 e 11). Para a análise quantitativa dos spots dos géis, foram utilizados os quatro géis nas amostras 8 meses AR com e sem MCP, já para amostra que corresponde a colheita foram utilizados apenas dois dos géis produzidos, visto que, os outros dois não se obteve a qualidade requerida para este tipo de análise. O gel que apresentou maior número de spots foi escolhido como gel de referência para comparação entre as diferentes condições. Foi realizado um cálculo do coeficiente de correlação entre os spots do gel de referência e os spots dos géis das amostras estudadas, sendo encontrada uma alta correlação com os géis das amostras 8 meses AR sem 1-MCP e 8 meses AR com 1-MCP, 0,7535 e 0,8972 respectivamente, e uma correlação moderada com a amostra colheita que apresentou valor de 0,6678.

A reprodutibilidade entre as repetições da mesma amostra e principalmente entre amostras de tratamentos diferentes possibilita a visualização de perfis protéicos diferentes e facilita a detecção dos spots. Pelo programa PDQuest foram detectados 565 spots na amostra tratada com 1-MCP, 452 spots para amostra não tratada, e 348 spots para amostra colheita

(Fig. 12). Números semelhantes foram constatados por Song et al. (2006) que detectou 500 spots em géis dois 2D de amostras de casca de maçãs armazenadas 8 dias sob temperatura de 20°C.

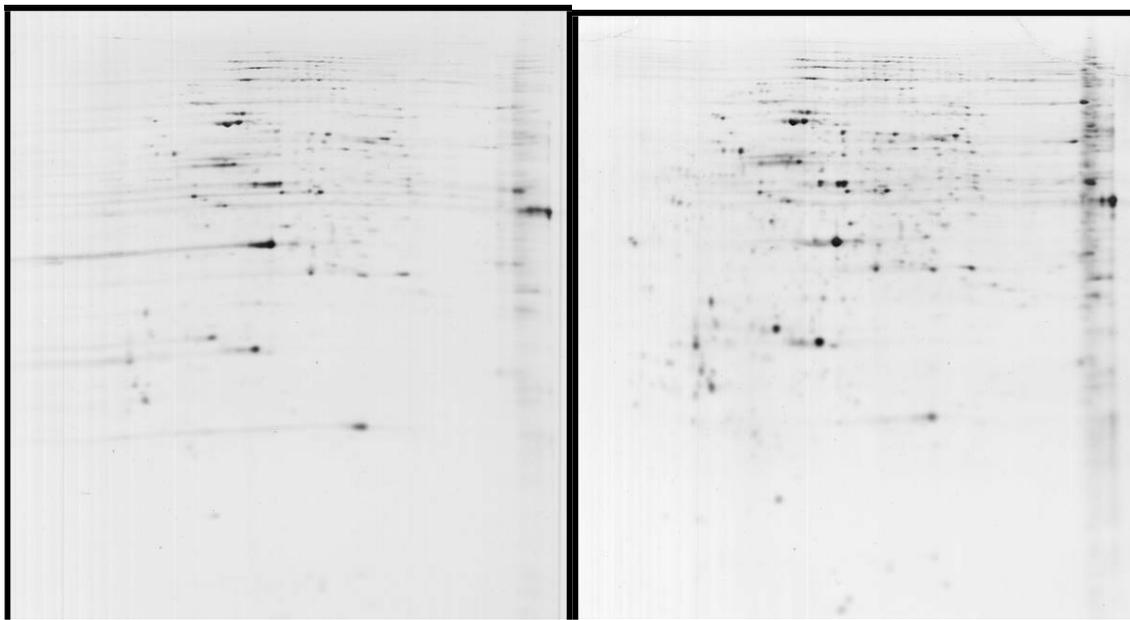


Figura 9: Géis 2D (pH 4-7) das amostras de polpa de maçã na hora da colheita corados com Nitrato de Prata.

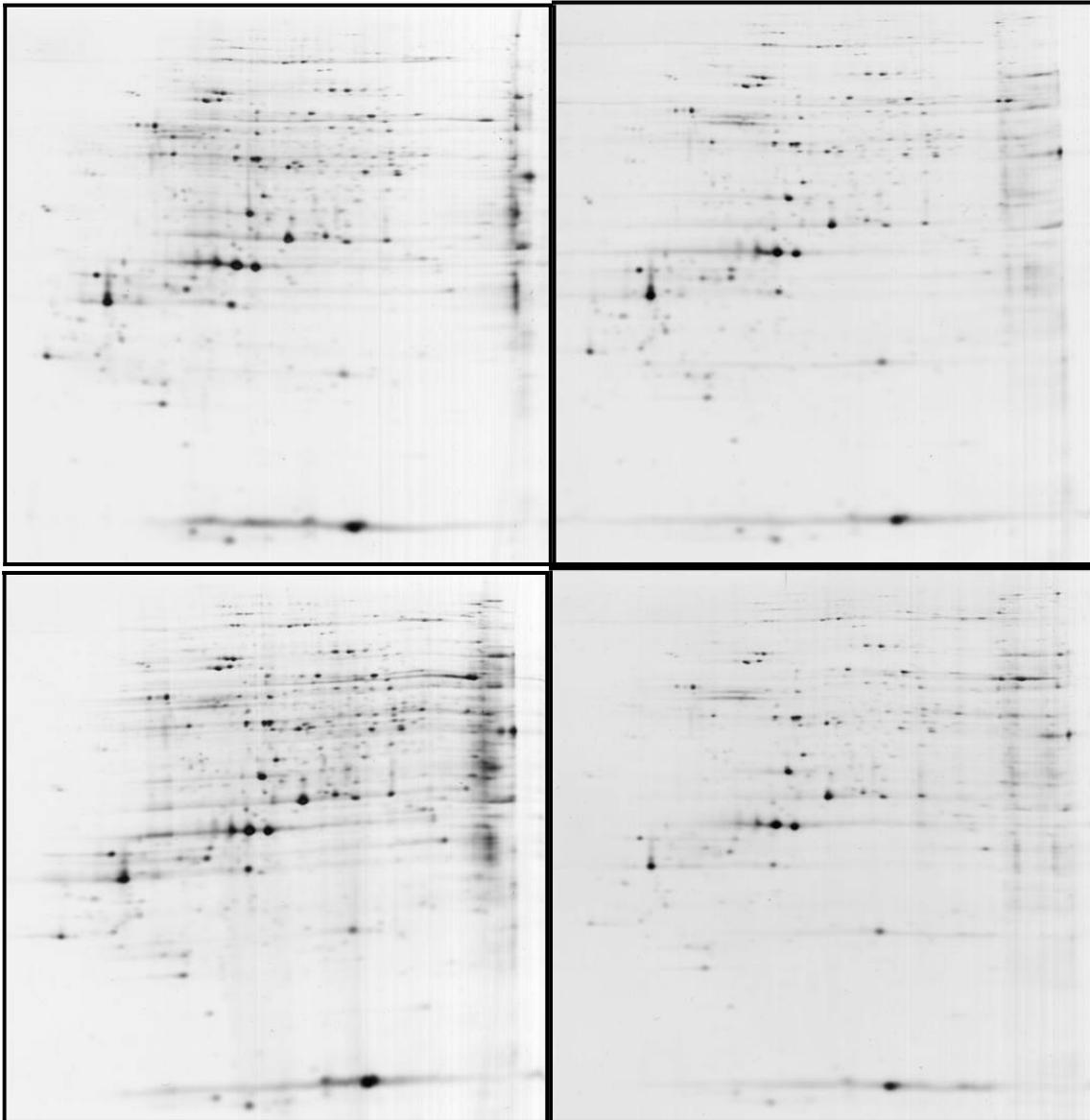


Figura 10: Géis 2D (pH 4-7) das amostras de polpa de maçãs armazenadas 8 meses em atmosfera refrigerada sem 1-MCP e corados com Nitrato de Prata.

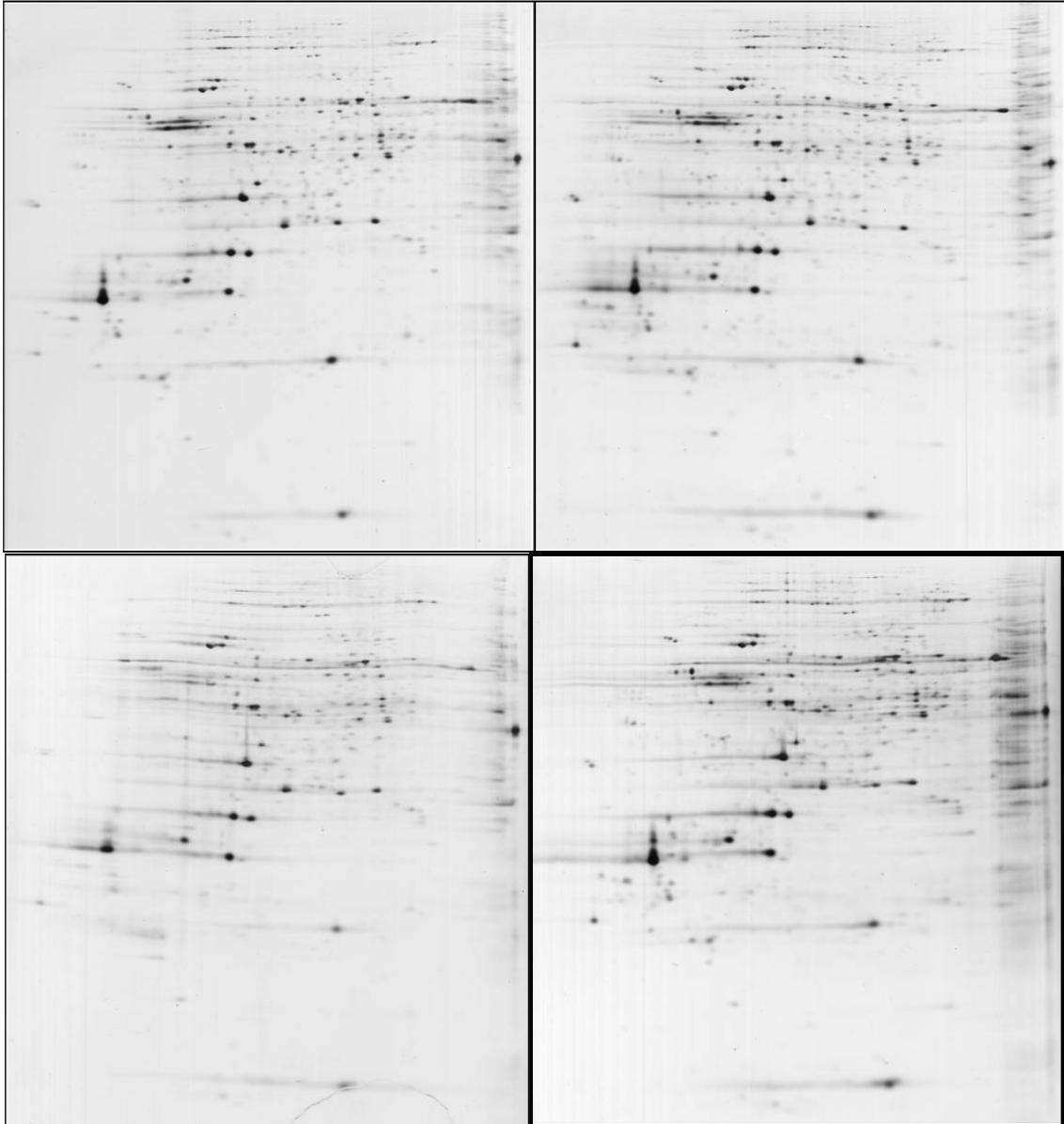


Figura 11: Géis 2D (pH 4-7) das amostras de polpa de maçãs tratadas com 1-MCP e armazenadas 8 meses em atmosfera refrigerada coradas com Nitrato de Prata.

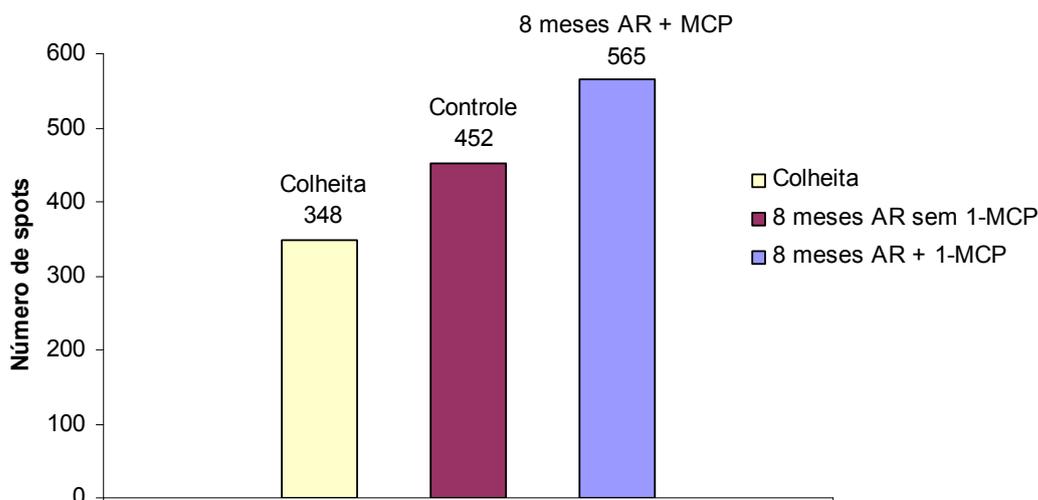


Figura 12: Número de spots detectados nos géis bidimensionais das amostras 8 meses AR sem 1-MCP, 8 meses AR com 1-MCP e Colheita.

A análise quantitativa diferencial, verificou que, ao se compararem os tratamentos com e sem 1-MCP, e se considerando apenas as proteínas presentes em ambos os tratamentos, 120 delas aumentaram ou diminuíram de intensidade (Figura 13) ou seja, houve um aumento ou uma diminuição na quantidade de proteína expressa de acordo com o tratamento. Destes, estão os spots da amostra 8 meses AR sem 1-MCP que demonstraram um valor superior à 2 vezes o volume dos mesmos spots da amostra tratada com 1-MCP, e os spots da amostra 8 meses AR sem 1-MCP que demonstraram ter volume correspondente a 50% ao volume dos spots da amostra tratada. Isto demonstra, que mesmo com o tratamento com 1-MCP estas proteínas continuaram a ser expressas, mas não com a mesma intensidade. Portanto, estes fatos sugerem que o tratamento com 1-MCP influenciou o sistema produção destas proteínas, sendo esta aumentada ou diminuída de acordo com as funções das proteínas envolvidas em possíveis rotas metabólicas que tenham relação ou que são influenciadas pelo etileno, como por exemplo rotas de respiração e degradação de compostos orgânicos (parede celular, ácidos orgânicos, amido).

Pelo mesmo programa, a um nível de significância de $P \leq 0.05\%$, se verificou-se que 62 spots foram detectados apenas nas amostras tratadas ou

nas não tratadas com 1-MCP (Figura 14), ou seja, spots que foram expressos somente nas amostras armazenadas 8 meses em AR que foram tratadas com 1-MCP, e spots expressos somente nas amostras armazenadas 8 meses em AR e não tratadas com 1-MCP ; 160 spots foram somente detectados nas amostras correspondentes à colheita ou às amostras tratadas com 1-MCP; e, 80 spots foram somente detectados nas amostras correspondentes à colheita ou às amostras não tratadas com 1-MCP. Estes resultados evidenciam que o tratamento com 1-MCP afeta fortemente a via de transdução de sinal do etileno (DAL CIN et. al. 2006). Sendo assim, estas proteínas diferencialmente expressas podem ser reguladas pelo etileno e estar diretamente envolvidas em diversas mudanças ocorridas na maturação e no armazenamento dos frutos (AISIF et. al., 2009). Estas proteínas podem ser ou ter diferentes funções, sendo responsáveis pelas principais mudanças nas características do fruto, principalmente a firmeza e a ocorrência de farinosidade. Existem numerosos estudos que mostram a diferenciação na expressão de genes que codificam por proteínas que tem funções no metabolismo de parede celular ou que estão envolvidas no sistema de transporte destas proteínas, sendo suas expressões reguladas etileno dependentes (GONZÁLEZ-AGUERO et al., 2008; LU et al., 2001; WILKISON et al., 1995; WANG et al., 2009; WEI et AL., 2010; SANTO et. al., 2009). No entanto, são necessárias mais pesquisas que envolvam a identificação e caracterização destas proteínas e das mudanças pós-traducionais ocorridas, e ainda um estudo que confirme o acúmulo ou repressão de seus transcritos.

Obenland et al. (2002) identificaram diversar proteínas diferencialmente expressas entre pêssegos que sofreram tratamento com 1-MCP e pêssegos não tratados, sendo essas relacionadas com a regulação pelo etileno e com a lanosidade. Nilo et al. (2010) verificou um total de 560 spots detectados em géis 2D de proteínas extraídas de pêssegos armazenados sob temperaturas e períodos diferentes, sendo que destas, foi possível verificar uma diferença na expressão em 43 spots.

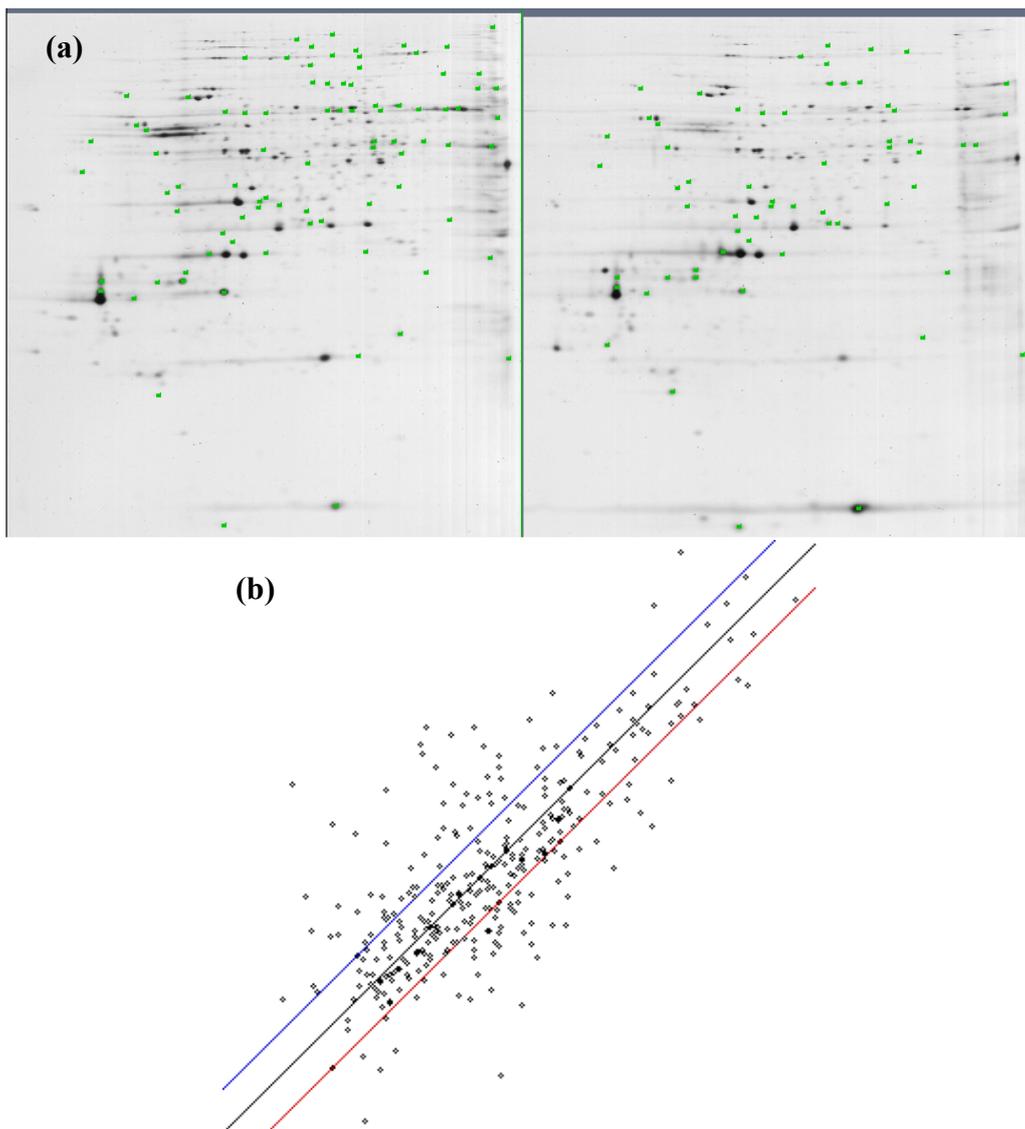


Figura 13: Em (a) (●) spots da amostra 8 meses AR sem 1-MCP (gel da direita) demonstraram ter valor superior à 2 vezes o volume dos mesmos spots da amostra tratada com 1-MCP (gel da esquerda), e os spots da amostra controle demonstraram ter volume correspondente a 50% ao volume dos spots da amostra tratada. Em (b) Curva demonstrando limiar superior (—) e limiar inferior (—), sendo o intervalo entre eles os spots que não demonstraram diferenças na quantidade entre os tratamentos

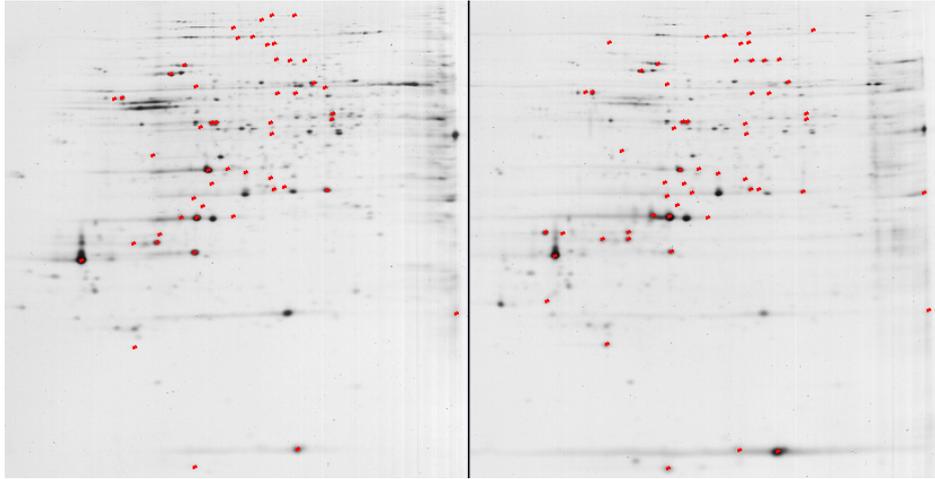


Figura 14: (●) Spots diferencialmente expressos entre as amostras tratadas com 1-MCP e armazenadas 8 meses em atmosfera refrigerada (gel da direita) e as amostras armazenadas 8 meses sem atmosfera refrigerada sem 1-MCP (gel da esquerda).

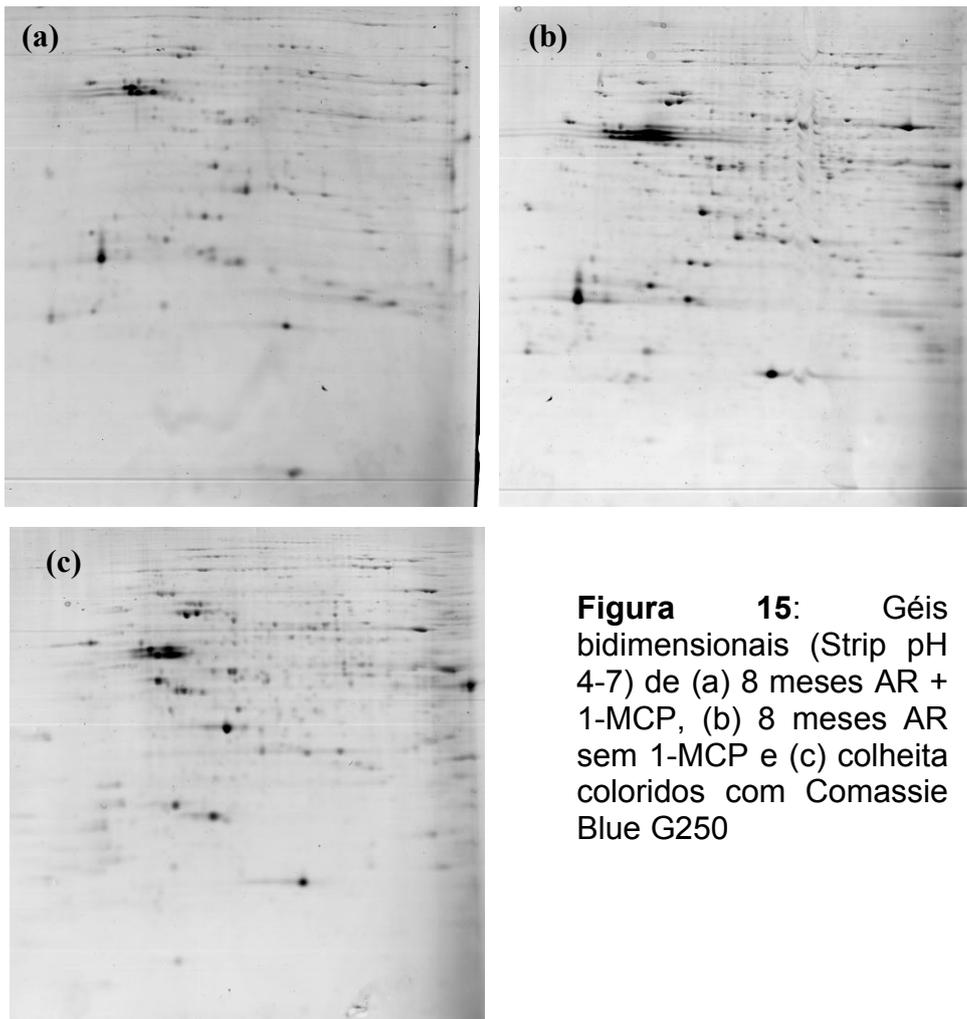


Figura 15: Géis bidimensionais (Strip pH 4-7) de (a) 8 meses AR + 1-MCP, (b) 8 meses AR sem 1-MCP e (c) colheita coloridos com Coomassie Blue G250

Na figura 15 são mostrados os géis bidimensionais coloridos com Comassie Blue G250, podendo-se observar que apesar da baixa resolução dos géis a quantificação do número de spots não foi prejudicada. A coloração com Comassie Blue G250 tem a vantagem de ser compatível com a análise de Espectrometria de Massas, visto que essa coloração não prejudica a eficiência do processo de digestão tríptica das amostras (PINK et al., 2010).

4.6. Espectrometria de massas

A partir dos resultados da análise das imagens dos géis, selecionou-se 42 spots diferencialmente expressos para identificação por espectrometria de massas, sendo que dez destes spots são mostrados na Figura 16.

Na análise de espectrometria de massas não foi possível a identificação de nenhum dos spots selecionados, visto que os espectros não apresentavam picos típicos de peptídeos trípticos. Estes resultados devem-se provavelmente a ineficiência da enzima (tripsina) utilizada no processo de digestão. Portanto são necessários estudos na padronização de um protocolo de digestão que seja ideal para a ação da enzima, visto que esta corresponde a uma das etapas mais importantes dentro da fase de identificação dos peptídeos trípticos.

Fazem-se necessários também, juntamente com a busca de um protocolo de digestão, a busca de um protocolo de purificação dos peptídeos trípticos para análise de espectrometria de massas.

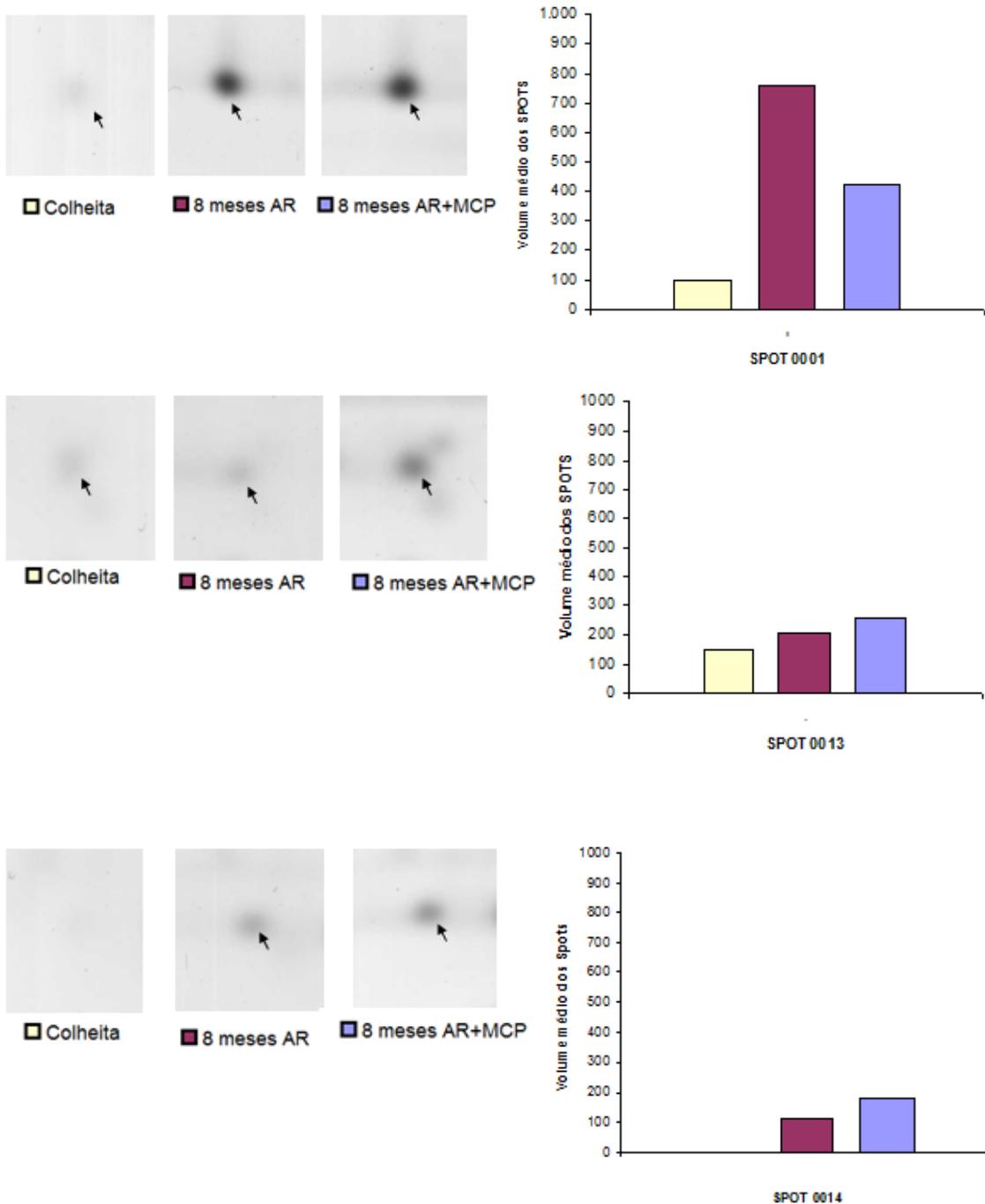
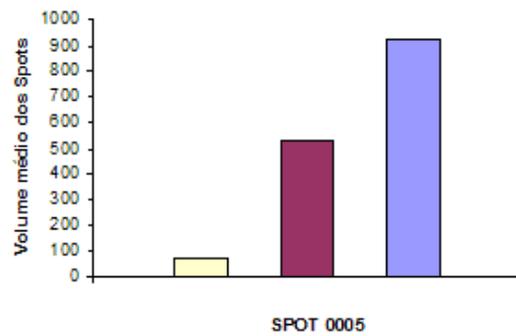
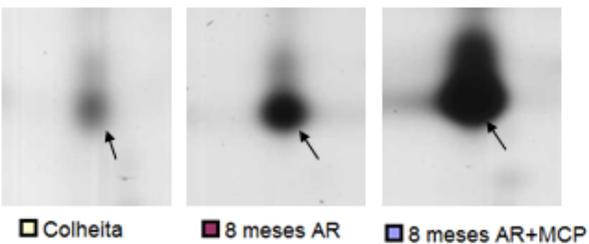
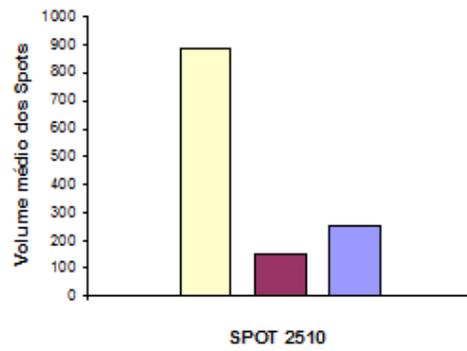
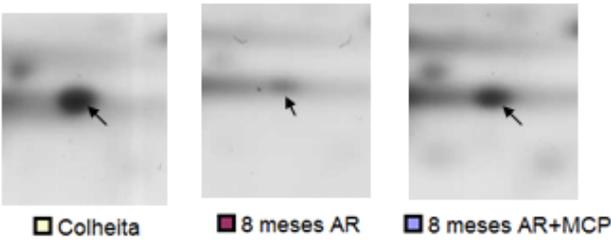
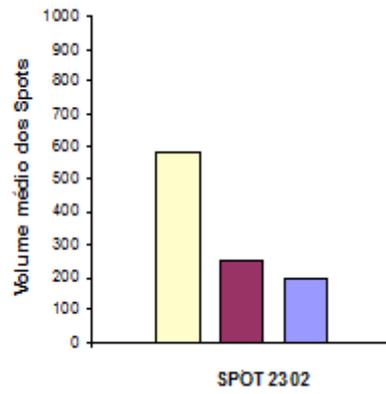
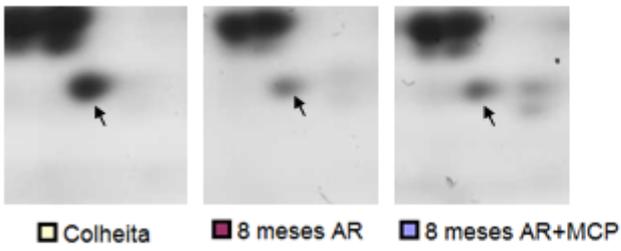
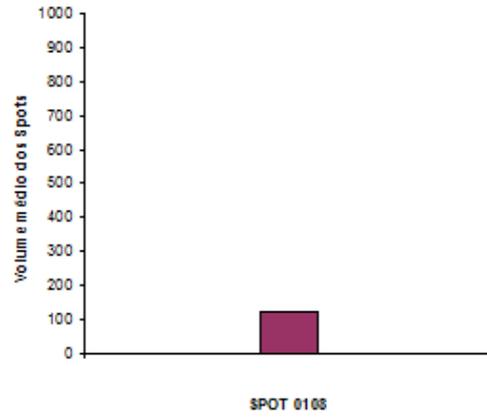
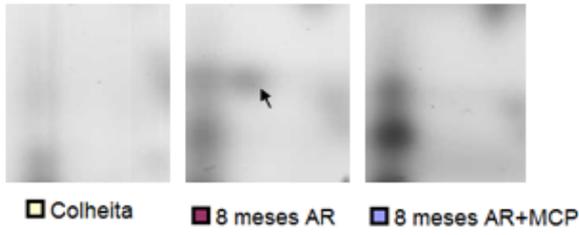
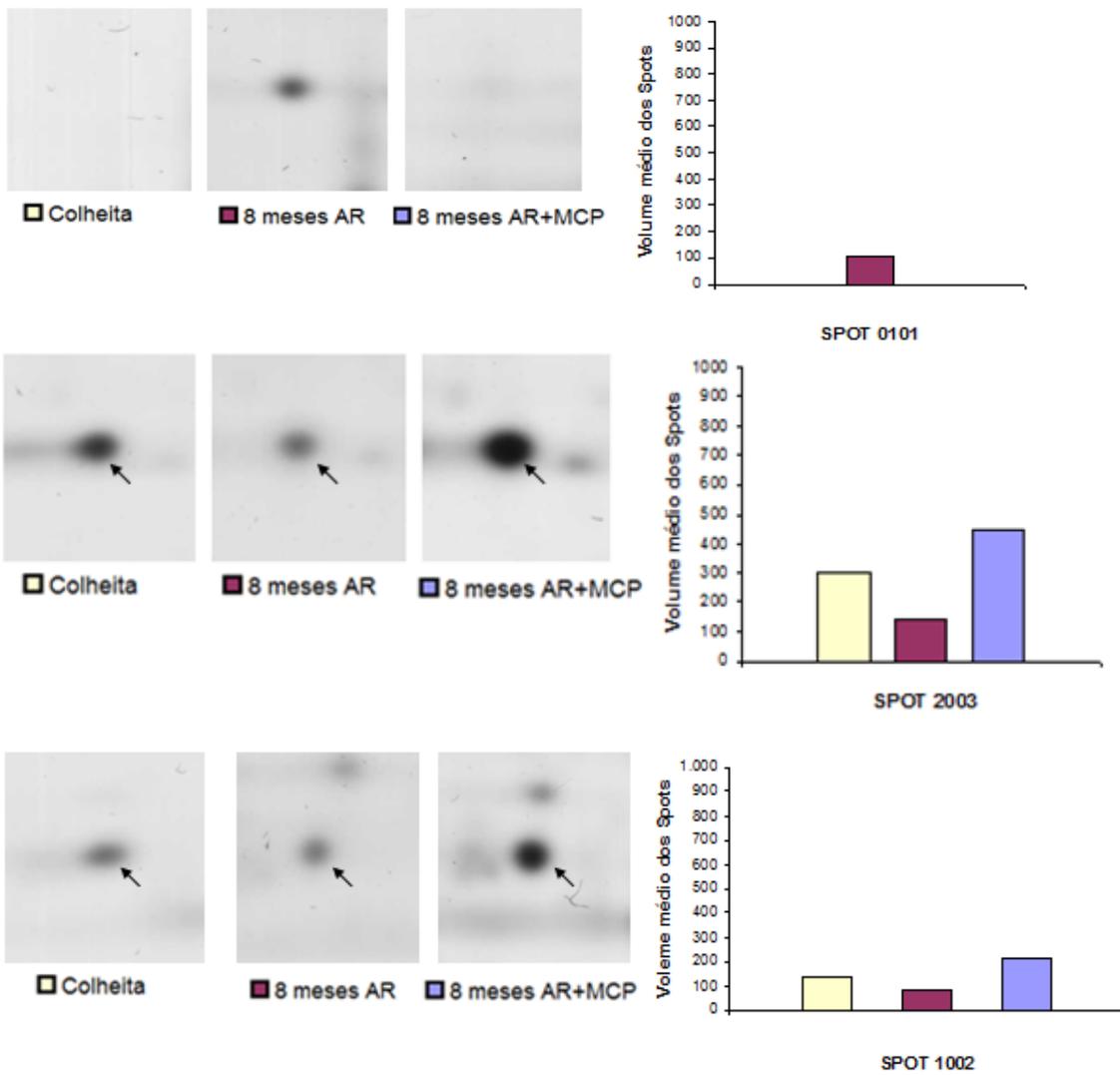


Figura 16: Spots diferencialmente expressos à um nível de significância de $P \leq 0,05\%$ entre as amostras de polpa de maçãs no momento de colheita (Colheita), maçãs armazenadas 8 meses sob atmosfera refrigerada sem MCP (8 meses AR) e maçãs armazenadas 8 meses sob atmosfera refrigerada com MCP (8 meses AR +MCP).

* Continuação da Figura 16



* Continuação da Figura 16.



5. Conclusões

Existem poucos estudos que utilizam a 2D na obtenção de perspectiva geral das mudanças que ocorrem na expressão de proteínas durante o armazenamento pós-colheita em maçãs. Podemos concluir que a proteômica constitui em uma excelente ferramenta para estudo do metabolismo de frutos durante a pós-colheita, visto que com ele detectamos um total 520 spots diferencialmente expressos entre todas as amostras testadas. Destes, 62 spots diferencialmente expressos entre a amostra tratada e a não tratada com 1-MCP. Foi possível detectar ainda em torno de 120 spots que apresentaram diferenças quantitativas, podendo estar diretamente associadas aos tratamentos das amostras com o 1-MCP. Esse bloqueador do etileno é sabidamente responsável pelo retardamento de algumas rotas metabólicas relacionadas a características sensoriais do fruto, principalmente firmeza de polpa. Isso pode ser comprovado nos resultados apresentados e discutidos.

A identificação destas proteínas diferencialmente expressas é de extrema importância, assim como a identificação das possíveis mudanças pós-traducionais ocorridas. Com estas informações, será possível fazer um estudo completo sobre muitas das modificações ocorridas na pós-colheita de frutos, sobre tudo as mudanças de firmeza e a ocorrência de farinosidade.

É necessário um estudo complementar na identificação das proteínas diferencialmente expressas para compreender quais vias estão sendo utilizadas nos frutos durante seu armazenamento pós-colheita. Estas análises podem contribuir com o entendimento dos fatores que afetam o desenvolvimento de frutos permitindo novas práticas para melhorar tanto os processos pré quanto pós-colheita.

6. Referências

ABDI, N., HOLFORD, P., McGLASSON, B. Application of two-dimensional gel electrophoresis to detect proteins associated with harvest maturity in stonefruit. **Postharvest Biology and Technology**. n°26, 1–13p. 2002.

ABPM – Brazilian Apple Growers and Exporters. Disponível em: <<http://www.brazilianappleexporters.com/>> Acesso em: 12 de set. 2010.

ALIPO, A. C. N. Estuda da expressão diferencial de proteínas em resposta a presença de cálcio na cianobactéria *Cylindrospermopsis raciborskii*. 2008. **Trabalho de conclusão de curso** (Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro – Graduação em Biomedicina), Rio de Janeiro, RJ. 2008.

ANDRADE, A. E.; FELIX, G. C.; OLIVEIRA, A. C.; NORONHA, E. F.; PEREIRA, J. L.; LIMA, L. H. C.; ROSATO, Y. B.; MELO, J. A. T.; BLOCH Jr, C.; MEHTA, A. Expressão diferencial de proteínas de *Xanthomonas campestris* *PV**Campestris* na interação com a planta hospedeira *Brassica oleracea*. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento** **93**. Embrapa. ISSN 1676 – 1340, Outubro, 2005.

ASIF, M.H.; PATHAK, N.; SOLOMOS, T.; TRIVEDI, P.K.. Effect of low oxygen, temperature and 1-methylcyclopropene on the expression of genes regulating ethylene biosynthesis and perception during ripening in apple. **South African Journal of Botany**, n° 75,137–144p., 2009.

BANDIL, G. B. Análise proteômica comparativa do fruto de café (*coffea arábica*) em dois estádios iniciais de desenvolvimento. **Tese de Doutorado**. 2008. Universidade Federal de Ponta Grossa. Ponta Grossa.

BARITELLE AL, HYDE GM, FELLMAN JK, VARITH J. Using 1-MCP to inhibit the Influence of ripening on impact properties of pear and apple tissue. **Postharvest Biology and Technology**. n°23, 153–60p., 2001.

BARREIRO, P.; CABELLO, J. R.; VALLE, M. E. F. Mealiness assessment in apples using MRI techniques. **Magnetic Resonance Imaging**, v.17, n.2, p.275-281, 1999.

BLANKENSHIP, S.M., DOLE, J.M.. 1-Methylcyclopropene: a review. **Postharvest Biology and Technology**. 28, 1–25. 2003.

BEVERIDGE, T.; WEINTRAUB, S. E. Protein extraction during production of varietally derived apple juices using a "ccmascerase" enzyme. **Food Research International**, Vol. 30, No. 314, 231-234p., 1997.

BRACKMANN, A. Produção de etileno, CO₂ e aroma de cultivares de maçã. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.14, n.1, p.103-108,1992.

BRACKMANN, A. et al. Qualidade da maçã cv. Gala tratada com 1-metilciclopropeno. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.34, n.5, 1415-1420p., 2004.

BRACKMANN, A., CERETTA, M. Efeito da redução dos níveis de etileno e de UR no armazenamento da maçã 'Gala' em atmosfera controlada. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.34, n.12, p.2169-2174, 1999.

BRACKMANN, A.; EISERMANN, A. C.; WEBER, A. R.; GIEH, F. H.; PAVANELLO, E. P.; BOTH, V. Qualidade da maçã "Gala" armazenada em atmosfera controlada associada à absorção e ao controle da síntese e da ação do etileno. **Ciência Rural**, v.38, n.8, p.2151-2156, 2008.

BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**. N°72, 248–254p., 1976.

BRADY, C.J; O'CONNELL, P.B.H. On the significance of increased protein synthesis in ripening banana fruits. **Australian Journal of Plant Physiology**. N°3, 301–310p., 1976.

CAMILO, A. P.; DENARDI, F. Cultivares: descrição e comportamento no Sul do Brasil. In: EMPRESA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA E EXTENSÃO RURAL DE SANTA CATARINA - EPAGRI. **A cultura da macieira**. Florianópolis: EPAGRI, 113-168p., cap. 5. 2006.

CARPENTIER, S.C.; WITTERS, E.; LAUKENS K., DECKERS, P., SWENNEN, R., PANIS, B., Preparation of protein extracts from recalcitrant plant tissues: an evaluation of different methods for two-dimensional gel electrophoresis analysis. **Proteomics**. n°5, 2497–2507, 2005.

CIN, V.D., DANESIN, M., BOSCHETTI, A., DORIGONI, A., RAMINA, A. Ethylene biosynthesis and perception in apple fruitlet abscission (*Malus domestica* (L.) Borkh). **Journal of Experimental Botany**, n.56, 2995–3005p., 2005.

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

DANDEKAR, A.M., TEO, G., DEFILIPPI, B.G., URATSU, S.L., PASSEY, A.J., KADE, A.A., STOW, J.R., COLGAN, R.J., JAMES, D.J. Effect of downregulation of ethylene biosynthesis on fruit flavor complex in apple fruit. **Transgenic Research**. n°13, 373–384p, 2004.

DE SMEDT, V.; PAUWELS, E.; DE BAERDEMAEKER, J. B. Nicolaï Microscopic observation of mealiness in apples: a quantitative approach. **Postharvest Biology and Technology**. v.4, n.2, 151-158p., 1998.

DELL, J.R., MURR, D.P., MURRAY, D., PORTEOUS, H., RUPASINGHE, H.P.V. Influence of temperature and duration of 1-methylcyclopropene (1-MCP) treatment on apple quality. **Postharvest Biology and Technology**, n. 24, 349–353p., 2002.

DENARDI, F.; CAMILO, A. P. Cultivares de macieira para o Sul do Brasil. **Hortisul**, Pelotas, v. 2, n. 3, p. 12-19, 1992.

DILLEY, D.R.; KUAI, J.P.; PONELEIT, L; ZHU, Y.; PEKKER, Y.; WILSON, I.D.; BURMEISTER, D.M.; GRAN, G.; BOWERS, A. Purification and characterization of ACC oxidase and its expression during ripening in apple fruit. In: J.C. Pech, A. Latché and C. Balagué, Editors, Cellular and Molecular Aspects of the Plant Hormone Ethylene Current. **Plant Science Biotechnology in Agriculture**, nº16, 46–52p., 1993.

FERREIRA, PAULA. Yes, nós temos maçã. Disponível em <http://www.finep.gov.br/imprensa/revista/edicao5/inovacao_em_pauta_5_pag43_a47_macas.pdf> Acesso em: 20 dez. 2010.

FIORAVANÇO, J. C. MAÇÃ BRASILEIRA: da importação à auto-suficiência e exportação - a tecnologia como fator determinante. **Informações Econômicas**, SP, v.39, n.3, 2009.

GIOVANNONI, J.J. Genetic regulation of fruit development and ripening, **Plant Cell**. N ou v 16, p.170–180, 2004.

GIRARDI, C. L. . Manejo pós-colheita e rastreabilidade da fruta na produção integrada Informe Agropecuário, **EPAMIG Minas Gerais**, v. 22, p. 75-78, 2001

GIRARDI, C.L; NACHTIGALL, G.R; PARUSSOLO, A. Fatores pré-colheita que interferem na qualidade da fruta. In: GIRARDI, C.L, et al. **Maçã: Pós-colheita**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho; Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 10 p., 2004.

GODOVAC-ZIMMERMANN J, BROWN LR. Perspectives for mass spectrometry and functional proteomics. **Mass Spectrometry Reviews**, nº20, 1-57 p., 2001.

GONZÁLEZ-AGÜERO; PAVEZ, M., L.; IBÁÑEZ, F; PACHECO, I; CAMPOS-VARGAS, R. L.; MEISEL, A.; ORELLANA, A.; RETAMALES, J.; SILVA, H.; GONZÁLEZ, M.; CAMBIAZO, V.. Identification of woolliness response genes in peach fruit after post-harvest treatments. **Journal of Experimental Botany**, v. 59, n. 8, p.1973-1986, 2008.

HARKER, F.R.; HALLETT, I.C. Physiological changes associated with development of mealiness of apple fruit during cool storage. **HortScience**. v. 27, n. 12, p. 1291–1294. 1992.

HERNANDEZ, L.G. Análise proteômica aplicada a ontogenia, comportamento e aprendizagem em abelhas. **Tese de doutorado**. Universidade de Brasília. Brasília. 2009.

HURKMAN, W. J. and TANAKA, C. K. Solubilization of plant membrane proteins for analysis by 2-D gel electrophoresis. **Plant Physiology**, n°81, 802–806p., 1986.

JING, X. Establishment of a two-dimensional electrophoresis map of human mitochondrial proteins. 2003. **Doctor Thesis**; Humboldt-Universität Berlin, Berlin.

JUNGBLUT, P.; WITTMANN-LIEBOLD, B. Protein analysis on a genomic scale. **Journal of Biotechnology**. Oxford, v. 41, 111-12p., 1995.

KAZMI S, KRULL IS. Proteomics and the current state of protein separations science, Part one. **Pharma Genomics**, 14-29p., 2001.

KICMAN AT, PARKIN MC, ILES RK. An introduction to mass spectrometry based proteomics-detection and characterization of gonadotropins and related molecules. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 212, n. 27, 260- 262p., 2007.

KLUGE, R. A. NACHTIGAL, J.C.; FACHINELLO, J.C.; BILHALVA, A. B. **Fisiologia e manejo pós-colheita de frutas de clima temperado**. Pelotas: Editora UFPEL, , 24p, 26p. 1997.

LANÇAS, F. M.; SILVA, J. C. R., BICUDO, R. C.; NETO, M. B. A química analítica do proteoma. **Revista Analytica**. N°6. 60-66p., 2003.

LASHBROOK, C.C., TIEMAN, D.M., KLEE, H.J., Differential regulation of the tomato ETR gene family throughout plant development. **Plant Journal**. n.15, 243–252p., 1998.

LOGRADO, D. L. Microscopia de força atômica associada à espectrometria de massa na caracterização de sistemas protéicos. 2009. 100f. **Dissertação** (Mestrado em Química) - Universidade de Brasília, Brasília - DF, 2009.

LUNARDI, R.; BRACKMANN, A.; MELLO, A. M.; FREITAS, S. T.; ZANATTA, J. F.; ROMBALDI, C. V. Suculência e solubilização de pectinas de maçãs ‘Gala’ submetidas a diferentes tempos de resfriamento e aplicação de 1-MCP. **Ciência e Agrotecnologia**. Lavras, v.28, n.4, 871-877 p., 2004 (b).

LUNARDI, R.; BRACKMANN, A.; STEFFENS, C. A.; ZANATTA, J. F.; ROMBALDI, C. V.; SILVA, J. A. Efeito da aplicação pré-colheita de aminoetoxivinilglicina (avg) na suculência de maçãs ‘gala’ armazenadas em atmosfera controlada. **Revista Brasileira de Agrociência**, v.10, n. 4, p. 493-497, 2004(a).

MERRIL, C. R., GOLDMAN, D., SEDMAN, S., EBERT, M. Ultrasensitive stain for proteins in polyacrylamide gels shows regional variation in cerebrospinal fluid proteins. **Science**, n° 211, 1437–1438p. 1980.

MIR, A.N.; CURELL, E.; KHAN, N.; WHITAKER, M.; BEAUDRY, R.M. Harvest maturity, storage temperature, and 1-MCP application frequency alter firmness retention and chlorophyll fluorescence of ‘Redchief Delicious’ apples. **Journal**

of the **American Society for Horticultural Science**, Alexandria. v.126, n.5, p.618-624, 2001.

MULLER, C. V. Produção de maçãs na Empresa Agropecuária Schio em Vacaria/RS. **Trabalho de Conclusão de curso**. 37pgs. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis/SC. 2007.

NARA, K.; KATO, Y.; MOTOMURA, Y. Involvement of terminal-arabinose and – galactose pectic compounds in mealiness of apple fruit during storage. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v.22, n.2, p.141-150, 2001.

NEILSEN, G. H., PARCHOMCHUK, P., WOLK, W. D. AND LAU, O. L. Growth and mineral composition of newly planted apple trees following fertigation with N and P. **Journal of the American Society of Horticultural Science**, n° 118, 50-53p., 1993.

NILLO, R.; SAFFIE, C., LILLEY, K.; BAEZA-YATES, R.; CAMBIAZO, V.; CAMPOS-VARGAS, R.; GONZÁLEZ, M., MEISEL, L. A.; RETAMALES, J.; SILVA, H. Proteomic analysis of peach fruit mesocarp softening and chilling injury using difference gel electrophoresis (DIGE). **BMC Genomics**, 11:43, 1471-2164 p., 2010.

O'FARRELL, P. H. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. **Journal of Biological Chemistry**, n° 250, 4007-4021p., 1975.

OBENLAND, D. M.; VENSEL, W. H.; HURKMAN, W. J. Alterations in protein expression associated with the development of mealiness in peaches. **Journal of Horticultural Science & Biotechnology**, v.83 n. 1 85–93p., 2008.

PECK, S.C., NÜHSE, T.S., HESS, D., IGLESIAS, A., MEINS, F., BOLLER, T., Directed proteomics identifies a plant-specific protein rapidly phosphorylated in response to bacterial and fungal elicitors. **Plant Cell**. n°13, 467–1475p. 2001.

PINK, M.; VERMA, N.; RETTENMEIER, A. W.; SCHMITZ-SPANKE, S. CBB staining protocol with higher sensitivity and mass spectrometric compatibility. **Electrophoresis**, n°31, 593-598p. 2010.

PRE-AYMARD, C.; WEKSLER, A.; LURIE, S. Responses of 'Anna', a rapidly ripening summer apple, to 1-methylcyclopropene. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam. V. 27, n. 2, 163-170p., 2002.

RASORI, A., RUPERTI, B., BONGHI, C., TONUTTI, P., RAMINA, A. Characterization of two putative ethylene receptor genes expressed during peach fruit development and abscission. **Journal Of Experimental Botany** 53, 2333–2339p., 2002.

ROCHA, T. L. ; COSTA, P. H. A. ; MAGALHÃES, J. C. C. ; EVARISTO, R. G.S. ; VASCONCELOS, E. A. R. ; COUTINHO, M. V. ; PAES, N. S. ; SILVA, M. C. M. ; GROSSI-DE-SÁ, M. F. **Comunicado Técnico 136: Eletroforese Bidimensional e Análise de Proteomas**. Disponível em <[HTTP://www.cernagen.embrapa.br/publica/trabalhos/cot136.pdf](http://www.cernagen.embrapa.br/publica/trabalhos/cot136.pdf)> Acesso em 12 de jul. 2010.

ROSE, J.K.C. ; SALADIÉ, M.. Proteomic Analysis and Fruit Ripening. Proceedings of the Fifth International Postharvest Symposium, Verona, Italy. **Acta Horticulture**, v. 2, n. 682, 211-224 p., 2005.

SANTONI, V., ROUQUIE, D., DOUMAS, P., MANSION, M., BOUTRY, M., DEGAND, H., DUPREE, P., PACKMAN, L., SHERRIER, J., PRIME, T.,BAUW, G., POSADA, E., ROUZE, P., DEHAIS, P., SAHNOUN, I., BARLIER, I., ROSSIGNOL, M.,. Use of a proteome strategy for tagging proteins present at the plasma membrane. **Plant Journal**,n°16, 633–641p. 1998.

SANTOS, P. M.; TEIXEIRA, M.C.; SÁ-CORREIA, I. A análise proteômica quantitativa na revelação de mecanismos de resposta a stresse químico em microrganismos. **Métodos em Biotecnologia– Proteomica Quantitativa**. 6-17p 2004.

SAQUET, A. A. Efeito das temperaturas e concentrações de CO₂ e O₂ sobre a qualidade de maçãs da cultivar Gala durante o armazenamento em atmosfera controlada., 1997. 105f. **Dissertação** (Mestrado em Agronomia- Produção Vegetal)- Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 1997.

SAQUET, A. A.; BRACKMANN, A.; STORCK, L. Armazenamento de maçã 'Gala' sob diferentes temperaturas e concentrações de oxigênio e gás carbônico . **Ciência Rural**, v.27, n.3, p.399-405, 1997.

SARAVANAN, R. S.; ROSE, J. K. C.. A critical evaluation of sample extraction techniques for enhanced proteomic analysis of recalcitrant plant tissues. **Proteomics**, n°4, 2522–2532p. 2004.

SATO-NARA, K., YUHASHI, K.I., HIGASHI, K., HOSOYA, K., KUBOTA, M., EZURA, H. Stage- and tissue-specific expression of ethylene receptor homolog genes during fruit development in muskmelon. **Plant Physiology**. N°119, 321–329p., 1999.

SHEORAN, I.S.; ROSS, A.R.S.; OLSON, D.J.H.; SAWHNEY, V.K. Compatibility of plant protein extraction methods with mass spectrometry for proteome analysis. **Plant Science**. 176, 99–104p., 2009.

SISLER, E.C.; SEREK, M. Inhibitors of ethylene response in plants at receptor level: recent development. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.100, p.577-582, 1997.

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

SOUSA, M. V.; FONTES, W.; RICART, C. A. O. Análise de proteomas: o despertar da era pós-genômica. **Biotecnologia Ciência e Tecnologia**. 12-13p., 2007.

STEFFENS, C. A.; BRACKMANN, A.; PINTO, J. A. V.; EISERMANN, A. C. Taxa respiratória de frutas de clima temperado. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v.42, n.3, p.313-321, 2007.

STREIF, J. **Ernte, Lagerung und Aufbereitung**. In: F. Winter et al. (eds.). Lucas' Anleitung zum Obstbau. Stuttgart: Eugen Ulmer. 31 Auflage, 304-337 p., 1992.

TATSUKI, M., ENDO, A., OHKAWA, H. Influence of time from harvest to 1-MCP treatment on apple fruit quality and expression of genes for ethylene biosynthesis enzymes and ethylene receptors. **Postharvest Biology and Technology**. n° 43, 28–35p., 2007.

THEOLOGIS, A. One rotten apple spoils the whole bushel: the role of ethylene in fruit ripening. **Cell**. v.70, 181-184p., 1992.

TODA FRUTA, MERCADO DE MAÇÃ: SITUAÇÃO ATUAL, AMEAÇAS, OPORTUNIDADES E ESTRATÉGIAS PARA O FUTURO, 2006.

WANG, A., TAN, D., TAKAHASHI, A., LI, T.Z., HARADA, T., MdERFs, two ethylene response factors involved in apple fruit ripening **Journal of Experimental Botany**. n,58, 3743–3748 p., 2007.

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

WATKINS, C. B.; NOCK, J. F.; WHITAKER, B. D. Responses of early, mid and late season apple cultivars to postharvest application of 1-methylcyclopropene (1-MCP) under air and controlled atmosphere storage conditions. **Postharvest Biology and Technology**. n° 19, 17–32p., 2000.

WATKINS, C.B. The use of 1-methylcyclopropene (1-MCP) on fruits and vegetables. **Biotechnology Advances**, v.24, 389-409 p., 2006.

WATKINS, C.B. Ethylene synthesis, mode of action, consequences and control. In: **Fruit Quality and its Biological Basis**. Knee, M. (ed). Sheffield Academic Press. 180-224p., 2002.

WEI, J; MA, F.; SHI, M. S.; QI, X.; ZHU, X.; YUAN, J. Changes and postharvest regulation of activity and gene expression of enzymes related to cell wall degradation in ripening apple fruit. **Postharvest Biology and Technology**. v. 56., 147-154 p., 2010.

WILKINSON, J.Q., LANAHAN, M.B., CLARK, D.G., BLEECKER, A.B., CHANG, C., MEYEROWITZ, E.M., KLEE, H.J., A dominant mutant receptor from *Arabidopsis* confers ethylene insensitivity in heterologous plants. **Nature Biotechnology**. n.15, 444–447p., 1995.

WOSIACKI, G.; NOGUEIRA, A.; SILVA, N.C.C. Brazilian apple production – a few years later. **Fruit Processing**, v. 10, n. 12, 472-475 p., 2000.

WOSIACKI, G.; NOGUEIRA, A.; SILVA, N.C.C.; DENARDI, F.; CAMILO, A.P. Apple varieties growing in subtropical areas – The situation of Santa Catarina – Brazil. **Fruit Processing**, v. 12, n. 01, 19- p. 28, 2002.

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