

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS  
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos  
Área de Bromatologia

Análise comparativa dos proteomas das raízes tuberosas de  
mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) de variedades de mesa e  
indústria

Gabriela Justamante Händel Schmitz

Dissertação para obtenção do grau de  
MESTRE

Orientador:

Prof. Dr. João Roberto Oliveira do Nascimento

São Paulo

2013

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS  
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos  
Área de Bromatologia

Análise comparativa dos proteomas das raízes tuberosas de  
mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) de variedades de mesa e  
indústria

Versão corrigida da Dissertação conforme Resolução CoPGr 5890.  
O original encontra-se disponível no Serviço de Pós-Graduação da FCF/USP.

Gabriela Justamante Händel Schmitz

Dissertação para obtenção do grau de  
MESTRE

Orientador:

Prof. Dr. João Roberto Oliveira do Nascimento

São Paulo

2013

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

### Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

S355a Schmitz, Gabriela Justamante Händel  
Análise comparativa dos proteomas das raízes tuberosas de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) de variedades de mesa e indústria / Gabriela Justamante Händel Schmitz. -- São Paulo, 2013.  
137p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental.

Orientador: Nascimento, João Roberto Oliveira do

1. Bromatologia 2. Bioquímica dos alimentos 3. Mandioca : Ciência dos alimentos 4. Proteínas : Ciência dos alimentos I. T. II. Nascimento, João Roberto Oliveira do, orientador.

641 CDD

Gabriela Justamante Händel Schmitz

Análise comparativa dos proteomas das raízes tuberosas de  
mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) de variedades de mesa e  
indústria

Comissão Julgadora  
da  
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Prof. Dr. João Roberto Oliveira do Nascimento  
orientador/presidente

Dra. Teresa Losada Valle  
1º examinador

Prof. Dr. Carlos Alberto Labate  
2º examinador

São Paulo, 20 de dezembro de 2013.

*Aos meus pais, Cleide e Walter, pela vida, amor, carinho e dedicação. Por me guiarem sempre, apoiando-me e mostrando-me o caminho do bem e da integridade.*

*Aos meus irmãos, Rafael e Amanda, pela amizade e cumplicidade.*

*Ao meu noivo, Daniel, pelo imenso carinho, paciência, companheirismo e admiração. Por sempre me apoiar, dando-me forças para enfrentar os momentos mais difíceis desta longa caminhada.*

## **AGRADECIMENTOS**

Ao meu orientador, Prof. João Roberto Oliveira do Nascimento, por sempre me ajudar e confiar em mim. Pelas conversas sinceras e amadurecedoras, fazendo-me enxergar a realidade. Por ter me ensinado tanto, com sua imensa inteligência, durante todo o período de concretização deste trabalho.

À Pesquisadora Científica Teresa Losada Valle do Instituto Agrônomo de Campinas, pela concessão das amostras utilizadas neste trabalho.

À Profa. Regina Lúcia Baldini e aos seus alunos Gilberto Hideo Kaihama e Gianluca Gonçalves Nicastro, pelos ensinamentos e por terem permitido a utilização do Laboratório de Regulação da Expressão Gênica em Microrganismos, localizado no Departamento de Bioquímica do Instituto de Química.

Ao Prof. Carlos Labate e à sua técnica Thaís Cataldi, pela atenção e por permitirem o uso do Laboratório Max Feffer de Genética de Plantas, localizado em Piracicaba-SP.

Ao Prof. Carlos Tadeu, pela paciência, disposição e ensinamentos na área de estatística.

À Profa. Beatriz Rosana Cordenunsi, pela ajuda, amizade e carinho incomensuráveis.

Ao Prof. Eduardo Purgatto, pelas conversas encorajadoras.

Ao Prof. João Paulo Fabi, pela amizade sincera e preciosa ajuda durante as análises.

Aos colegas de trabalho, Jonathan e Virgínia, pelos ensinamentos na área de proteômica e estatística.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de bolsa durante o período de 04/2011 a 03/2013.

À Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo auxílio financeiro concedido (PROCESSO: 2012/17146-5).

À Deus, por ter me colocado neste caminho encantador e por me iluminar a cada dia.

*“Adoramos a perfeição, porque não a podemos ter; repugná-la-íamos, se a tivéssemos. O perfeito é desumano, porque o humano é imperfeito”.*

*(Fernando Pessoa)*

## Resumo

SCHMITZ, G. J. H. **Análise comparativa dos proteomas das raízes tuberosas de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) de variedades de mesa e indústria.** 2013. 137 f. Dissertação Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) é uma das principais culturas do mundo, havendo grande variabilidade genética. As variedades são classificadas com base na palatabilidade e toxicidade das raízes, em mansas ou doces e bravas ou amargas. Apesar da importância, o potencial da mandioca é pouco explorado, não sendo conhecidos, em nível molecular, os elementos determinantes para as suas características. Assim, pretendeu-se identificar, empregando a 2D-PAGE, proteínas que possam estar associadas com as diferenças físico-químicas das raízes tuberosas de variedades de mesa (IAC 576-70 e IAC 06-01), indústria (Cigana Preta, IAC 12 e IAC 90) e de uso misto (Vassourinha Paulista). Após extração de proteínas e separação por 2D-PAGE, as imagens dos géis foram analisadas no programa *Delta2D* (DECODON), sendo realizada análise estatística utilizando-se ANOVA ( $p < 0,01$ ), *Heat Map* e Análises de Componentes Principais (ACP) e de Agrupamentos. Os 146 *spots* de interesse foram removidos dos géis e suas proteínas digeridas e sequenciadas por espectrometria de massas. Algumas proteínas refletiram as características fenotípicas das variedades em estudo, especialmente entre as de mesa e indústria. Pela ACP, foram explicados 54,54% da variabilidade entre as amostras. A primeira componente separou as variedades exclusivamente de mesa de todas as demais, enquanto a segunda separou a IAC 90 de todas as outras, sendo esta caracterizada por um perfil proteico diferente das demais amostras de uso industrial. A IAC 576-70 e a IAC 12 apresentaram alta correlação positiva, assim como, a Vassourinha e a Cigana. A Análise de Agrupamentos corroborou as informações da ACP, revelando que o proteoma das raízes tuberosas refletiu diferenças fenotípicas entre as variedades.

**Palavras-chave:** Mandioca de mesa. Mandioca de indústria. 2D-PAGE.

## Abstract

SCHMITZ, G. J. H. **Comparative proteome analysis of the tuberous roots of sweet and bitter cassava (*Manihot esculenta* Crantz) varieties.** 2013. 137 f. Dissertação Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Cassava (*Manihot esculenta* Crantz) is a main crop with large genetic variability. The varieties are classified according palatability and toxicity of the roots as sweet or bitter cassavas. Despite its importance, little is known about the molecular basis of phenotypic characteristics. Therefore, this study aimed to identify proteins associated to the differences between the sweet ('IAC 576-70' e 'IAC 06-01'), bitter ('Cigana Preta', 'IAC 12' e 'IAC 90') and the mixed-use ('Vassourinha Paulista') varieties by 2D-PAGE. After the protein extraction and separation by 2D-PAGE, the gel images were analyzed through the software Delta 2D (DECODON), and the statistical analysis were performed with ANOVA ( $p < 0,01$ ), Heat Map, Principal Component Analysis (PCA) and Cluster Analysis. The 146 significant spots were removed from the gels, digested and sequenced by mass spectrometry. Some proteins were related to the physico-chemical characteristics of the varieties, especially between the sweet and the bitter. Variability of the samples was explained at the level of 54,54% by the PCA. The first component separated the sweet varieties from all others while the second one separated the 'IAC 90' from all others. This variety was characterized by a different protein profile among the bitter cassavas. The 'IAC 576-70' and the 'IAC 12' were positively correlated, as well as, 'Vassourinha' and the 'Cigana'. Cluster Analysis agreed the PCA information, revealing that the proteomes of the tuberous roots reflected phenotypic differences among the varieties.

**Keywords:** Sweet cassava. Bitter cassava. 2D-PAGE.

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1</b> - Finalidades das dez variedades de mandioca utilizadas neste trabalho.....	36
---	----

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Esquema referente à mistura dos extratos proteicos das raízes tuberosas das seis mandiocas usadas como amostras na análise DIGE (Vassourinha Paulista, Cigana Preta, IAC 12, IAC 576-70, IAC 90 e IAC 06-01) para utilização como padrão interno (*pool*). ..... 43
- Figura 2** - Imagem parcial de gel 2-D contendo vetores conectando *spots* correspondentes, antes do alinhamento (imagem à esquerda) e após o alinhamento (imagem à direita) (MANUAL *Delta2D*, 2011, com modificações). ..... 51
- Figura 3** - Imagem parcial de gel 2-D contendo as delimitações (em azul) para cada *spot* detectado pelo programa *Delta2D 4.2* (MANUAL *Delta2D*, 2011). ..... 52
- Figura 4** - Teores de amido das variedades de mandioca Vassourinha Paulista, Cigana Preta, IAC 12, Caapora, Olho Junto, IAC 576-70, IAC 13, IAC 15, IAC 90 e IAC 06-01. Os valores estão expressos em base úmida e as barras de erro correspondem ao desvio padrão. .... 62
- Figura 5** - Teores de açúcares solúveis (glicose, frutose e sacarose) das dez variedades de mandioca: Vassourinha Paulista, Cigana Preta, IAC 12, Caapora, Olho Junto, IAC 576-70, IAC 13, IAC 15, IAC 90 e IAC 06-01. Os valores estão expressos em base úmida e as barras de erro correspondem ao desvio padrão. .... 63
- Figura 6** - Eletroforese SDS-PAGE referente à aplicação de 30 µg de proteínas extraídas da variedade de mandioca não identificada (1). Os números à esquerda correspondem ao padrão de massa molecular *LMW calibration kit for SDS electrophoresis* (MM), sendo que seus marcadores estão expressos em kDa. O minigel foi corado com Azul de Coomassie coloidal. .... 65
- Figura 7** - Eletroforese SDS-PAGE referente à aplicação de 5 µg de proteínas extraídas de cada variedade estudada. Os números à esquerda correspondem ao padrão de massa molecular *LMW calibration kit for SDS electrophoresis* (MM), sendo que seus marcadores estão expressos em kDa. Os números acima correspondem às amostras: 1): IAC 06-01; 2): IAC 13; 3): IAC 576-70; 4): IAC 15; 5): Caapora; 6): IAC 12; 7): IAC 90; 8): Cigana Preta; 9): Olho Junto; 10): Vassourinha Paulista. O gel foi corado com *SYPRO® Ruby* e o tempo de exposição à luz UV em *VersaDoc MP 4000* foi de 90 s. .... 66
- Figura 8** - Eletroforese SDS-PAGE referente à aplicação de 3 µg de proteínas extraídas de cada variedade estudada. Os números à esquerda correspondem ao padrão de massa molecular *LMW calibration kit for SDS electrophoresis* (MM), sendo que seus marcadores estão expressos em kDa. Os números acima correspondem às amostras: 1): Vassourinha Paulista; 2): IAC 90; 3): IAC 12; 4): IAC 13; 5): IAC 576-70; 6): IAC 15; 7): IAC 06-01. O gel foi corado com *SYPRO® Ruby* e o tempo de exposição à luz UV em *VersaDoc MP 4000* foi de 120 s. .... 68
- Figura 9** - Eletroforese SDS-PAGE referente à aplicação de 3 µg de proteínas extraídas de cada variedade estudada. Os números à esquerda correspondem ao padrão de massa molecular *LMW calibration kit for SDS electrophoresis* (MM), sendo que seus marcadores estão expressos em kDa. Os números acima correspondem às amostras: 1): Vassourinha Paulista; 2): Cigana Preta; 3): IAC 12; 4): IAC 90; 5): IAC 576-70; 6): IAC 06-01. O gel foi corado com *SYPRO® Ruby* e o tempo de exposição à luz UV em *VersaDoc MP 4000* foi de 40 s. .... 70
- Figura 10** - Minigel 2-D corado com Azul de Coomassie coloidal, referente à aplicação de 100 µg de proteínas extraídas da variedade de mandioca não identificada. Os números acima indicam a que foi utilizada a tira de pH 3-10, 7 cm. Os números à direita correspondem ao padrão de massa molecular *LMW calibration kit for SDS electrophoresis* (MM), sendo que seus marcadores estão expressos em kDa. Foram utilizados 5 µL do padrão. .... 72
- Figura 11** - Minigel 2-D corado com *SYPRO® Ruby*, referente à aplicação de 100 µg de proteínas extraídas da variedade de mandioca não identificada. Os números acima indicam que foi utilizada a tira de pH 3-10, 7 cm. Os números à direita correspondem ao padrão de massa molecular *LMW*

*calibration kit for SDS electrophoresis* (MM), sendo que seus marcadores estão expressos em kDa. Foram utilizados 2 µL do padrão. O gel foi exposto à luz UV em *VersaDoc MP 4000* por 90 s..... 73

**Figura 12** - Minigel 2-D corado com *SYPRO® Ruby*, referente à aplicação de 100 µg de proteínas extraídas da variedade de mandioca não identificada. Os números acima indicam que foi utilizada a tira de pH 4-7, 7 cm. Os números à direita correspondem ao padrão de massa molecular *LMW calibration kit for SDS electrophoresis* (MM), sendo que seus marcadores estão expressos em kDa. Foram utilizados 2 µL do padrão. O gel foi exposto à luz UV em *VersaDoc MP 4000* por 120 s..... 74

**Figura 13** - Géis 2-D corados com *SYPRO® Ruby*, referentes à aplicação de 150 µg de proteínas das variedades Vassourinha Paulista, IAC 12 e IAC 576-70. Para todos os géis foram utilizadas tiras de pH 3-11 NL, 11 cm (acima das imagens). À esquerda das imagens, encontram-se os padrões de massa molecular *LMW calibration kit for SDS electrophoresis* (MM), sendo que seus marcadores estão expressos em kDa. Foram utilizados 2 µL do padrão. (A) Amostra referente à mandioca Vassourinha Paulista; gel exposto à luz UV em *VersaDoc MP 4000* por 90 s. (B) Amostra referente à mandioca IAC 12; gel submetido a 60 s de exposição. (C) Amostra referente à mandioca IAC 576-70; gel submetido a 60 s de exposição. .... 76

**Figura 14** - Minigel 2-D corado com *SYPRO® Ruby*, referente à aplicação de 80,77 µg de proteínas extraídas da cultivar Vassourinha Paulista. Foi utilizada a tira de pH 3-10, 7 cm (acima da imagem). Os números à esquerda correspondem ao padrão de massa molecular *LMW calibration kit for SDS electrophoresis* (MM), sendo que seus marcadores estão expressos em kDa. Foram utilizados 2 µL do padrão. O gel foi exposto à luz UV em *VersaDoc MP 4000* por 60 s. .... 78

**Figura 15** - Minigel 2-D corado com *SYPRO® Ruby*, referente à aplicação de 80,77 µg de proteínas extraídas da cultivar IAC 576-70. Foi utilizada a tira de pH 3-10, 7 cm (acima da imagem). Os números à esquerda correspondem ao padrão de massa molecular *LMW calibration kit for SDS electrophoresis* (MM), sendo que seus marcadores estão expressos em kDa. Foram utilizados 2 µL do padrão. O gel foi exposto à luz UV em *VersaDoc MP 4000* por 75 s. .... 78

**Figura 16** - Imagens representativas de 2-D DIGE referentes às aplicações de 50 µg de proteínas extraídas da raiz tuberosa da mandioca Vassourinha Paulista (amostra), juntamente a 50 µg do *pool*. Foram utilizadas tiras de pH 3-10, 7 cm. À esquerda das imagens, encontram-se os padrões de massa molecular *LMW calibration kit for SDS electrophoresis* (MM), sendo que seus marcadores estão expressos em kDa. (A-C) Amostra marcada com *Cy3* (triplicata). (D) *Pool* marcado com *Cy5*, relativo ao gel da imagem (A). (E) *Pool* marcado com *Cy5*, relativo ao gel da imagem (B). (F) *Pool* marcado com *Cy5*, relativo ao gel da imagem (C). Todos os géis foram submetidos a 30 s de exposição em *VersaDoc MP 4000*. .... 81

**Figura 17** - Imagens representativas de 2-D DIGE referentes às aplicações de 50 µg de proteínas extraídas da raiz tuberosa da mandioca Cigana Preta (amostra), juntamente a 50 µg do *pool*. Foram utilizadas tiras de pH 3-10, 7 cm. À esquerda das imagens, encontram-se os padrões de massa molecular *LMW calibration kit for SDS electrophoresis* (MM), sendo que seus marcadores estão expressos em kDa. (A-C) Amostra marcada com *Cy3* (triplicata). (D) *Pool* marcado com *Cy5*, relativo ao gel da imagem (A). (E) *Pool* marcado com *Cy5*, relativo ao gel da imagem (B). (F) *Pool* marcado com *Cy5*, relativo ao gel da imagem (C). Todos os géis foram submetidos a 30 s de exposição em *VersaDoc MP 4000*. .... 126

**Figura 18** - Imagens representativas de 2-D DIGE referentes às aplicações de 50 µg de proteínas extraídas da raiz tuberosa da mandioca IAC 12 (amostra), juntamente a 50 µg do *pool*. Foram utilizadas tiras de pH 3-10, 7 cm. À esquerda das imagens, encontram-se os padrões de massa molecular *LMW calibration kit for SDS electrophoresis* (MM), sendo que seus marcadores estão expressos em kDa. (A-C) Amostra marcada com *Cy3* (triplicata). (D) *Pool* marcado com *Cy5*, relativo ao gel da imagem (A). (E) *Pool* marcado com *Cy5*, relativo ao gel da imagem (B). (F) *Pool* marcado com *Cy5*, relativo ao gel da imagem (C). Todos os géis foram submetidos a 30 s de exposição em *VersaDoc MP 4000*. .... 127

**Figura 19** - Imagens representativas de 2-D DIGE referentes às aplicações de 50 µg de proteínas extraídas da raiz tuberosa da mandioca IAC 576-70 (amostra), juntamente a 50 µg do *pool*. Foram utilizadas tiras de pH 3-10, 7 cm. À esquerda das imagens, encontram-se os padrões de massa molecular *LMW calibration kit for SDS electrophoresis* (MM), sendo que seus marcadores estão

expressos em kDa. (A-C) Amostra marcada com *Cy3* (triplicata). (D) *Pool* marcado com *Cy5*, relativo ao gel da imagem (A). (E) *Pool* marcado com *Cy5*, relativo ao gel da imagem (B). (F) *Pool* marcado com *Cy5*, relativo ao gel da imagem (C). Todos os géis foram submetidos a 30 s de exposição em *VersaDoc MP 4000*.....128

**Figura 20** - Imagens representativas de 2-D DIGE referentes às aplicações de 50 µg de proteínas extraídas da raiz tuberosa da mandioca IAC 90 (amostra), juntamente a 50 µg do *pool*. Foram utilizadas tiras de pH 3-10, 7 cm. À esquerda das imagens, encontram-se os padrões de massa molecular *LMW calibration kit for SDS electrophoresis* (MM), sendo que seus marcadores estão expressos em kDa. (A-C) Amostra marcada com *Cy3* (triplicata). (D) *Pool* marcado com *Cy5*, relativo ao gel da imagem (A). (E) *Pool* marcado com *Cy5*, relativo ao gel da imagem (B). (F) *Pool* marcado com *Cy5*, relativo ao gel da imagem (C). Todos os géis foram submetidos a 30 s de exposição em *VersaDoc MP 4000*.....129

**Figura 21** - Imagens representativas de 2-D DIGE referentes às aplicações de 50 µg de proteínas extraídas da raiz tuberosa da mandioca IAC 06-01 (amostra), juntamente a 50 µg do *pool*. Foram utilizadas tiras de pH 3-10, 7 cm. À esquerda das imagens, encontram-se os padrões de massa molecular *LMW calibration kit for SDS electrophoresis* (MM), sendo que seus marcadores estão expressos em kDa. (A-C) Amostra marcada com *Cy3* (triplicata). (D) *Pool* marcado com *Cy5*, relativo ao gel da imagem (A). (E) *Pool* marcado com *Cy5*, relativo ao gel da imagem (B). (F) *Pool* marcado com *Cy5*, relativo ao gel da imagem (C). Todos os géis foram submetidos a 30 s de exposição em *VersaDoc MP 4000*.....130

**Figura 22** - Oito replicatas de géis 2-D corados com *SYPRO® Ruby* referentes à aplicação de 100 µg de proteínas da cultivar Vassourinha Paulista (A-H). Para todos os géis foram utilizadas tiras de pH 3-11 NL, 11 cm (acima das imagens). À esquerda das imagens, encontram-se os padrões de massa molecular *LMW calibration kit for SDS electrophoresis* (MM), sendo que seus marcadores estão expressos em kDa. Foi utilizado 1 µL do padrão (imagens recortadas).....84

**Figura 23** – Oito replicatas de géis 2-D corados com *SYPRO® Ruby* referentes à aplicação de 100 µg de proteínas da cultivar Cigana Preta (A-H). Para todos os géis foram utilizadas tiras de pH 3-11 NL, 11 cm (acima das imagens). À esquerda das imagens, encontram-se os padrões de massa molecular *LMW calibration kit for SDS electrophoresis* (MM), sendo que seus marcadores estão expressos em kDa. Foi utilizado 1 µL do padrão (imagens recortadas).....85

**Figura 24** – Seis replicatas de géis 2-D corados com *SYPRO® Ruby* referentes à aplicação de 100 µg de proteínas da cultivar IAC 12 (A-F). Para todos os géis foram utilizadas tiras de pH 3-11 NL, 11 cm (acima das imagens). À esquerda das imagens, encontram-se os padrões de massa molecular *LMW calibration kit for SDS electrophoresis* (MM), sendo que seus marcadores estão expressos em kDa. Foi utilizado 1 µL do padrão (imagens recortadas).....86

**Figura 25** – Seis replicatas de géis 2-D corados com *SYPRO® Ruby* referentes à aplicação de 100 µg de proteínas da cultivar IAC 576-70 (A-F). Para todos os géis foram utilizadas tiras de pH 3-11 NL, 11 cm (acima das imagens). À esquerda das imagens, encontram-se os padrões de massa molecular *LMW calibration kit for SDS electrophoresis* (MM), sendo que seus marcadores estão expressos em kDa. Foi utilizado 1 µL do padrão (imagens recortadas).....87

**Figura 26** – Seis replicatas de géis 2-D corados com *SYPRO® Ruby* referentes à aplicação de 100 µg de proteínas da cultivar IAC 90 (A-F). Para todos os géis foram utilizadas tiras de pH 3-11 NL, 11 cm (acima das imagens). À esquerda das imagens, encontram-se os padrões de massa molecular *LMW calibration kit for SDS electrophoresis* (MM), sendo que seus marcadores estão expressos em kDa. Foi utilizado 1 µL do padrão (imagens recortadas).....88

**Figura 27** – Oito replicatas de géis 2-D corados com *SYPRO® Ruby* referentes à aplicação de 100 µg de proteínas da variedade IAC 06-01 (A-H). Para todos os géis foram utilizadas tiras de pH 3-11 NL, 11 cm (acima das imagens). À esquerda das imagens, encontram-se os padrões de massa molecular *LMW calibration kit for SDS electrophoresis* (MM), sendo que seus marcadores estão expressos em kDa. Foi utilizado 1 µL do padrão (imagens recortadas).....89

**Figura 28** – Gel 2-D corado com *SYPRO® Ruby* referente à aplicação de 100 µg de proteínas da cultivar Cigana Preta, com indicação dos 146 *spots* com variação de abundância significativa entre as seis variedades estudadas, delimitados e numerados (em vermelho) pelo programa *Delta2D 4.2* (DECODON) Foi utilizada a tira de pH 3-11 NL, 11 cm (acima). À esquerda, encontra-se o padrão de massa molecular *LMW calibration kit for SDS electrophoresis* (MM), sendo que seus marcadores estão expressos em kDa. Foi utilizado 1 µL do padrão (imagem recortada). A imagem é referente à **Figura 23B**.....91

**Figura 29** – Gel 2-D corado com Azul de Coomassie coloidal, referente à aplicação de 750 µg de proteínas da cultivar IAC 576-70. Foi utilizada a tira de pH 3-11 NL, 24 cm (acima da imagem). À esquerda, encontra-se o padrão de massa molecular *LMW calibration kit for SDS electrophoresis* (MM), sendo que seus marcadores estão expressos em kDa. O gel encontra-se com os respectivos *spots* (circulados em amarelo e numerados em branco) coletados.....93

**Figura 30** – Gel 2-D corado com Azul de Coomassie coloidal, referente à aplicação de 750 µg de proteínas da cultivar Vassourinha Paulista. Foi utilizada a tira de pH 3-11 NL, 24 cm (acima da imagem). À esquerda, encontra-se o padrão de massa molecular *LMW calibration kit for SDS electrophoresis* (MM), sendo que seus marcadores estão expressos em kDa. O gel encontra-se com os respectivos *spots* (circulados em amarelo e numerados em branco) coletados.....135

**Figura 31** – Gel 2-D corado com Azul de Coomassie coloidal, referente à aplicação de 750 µg de proteínas da cultivar Cigana Preta. Foi utilizada a tira de pH 3-11 NL, 24 cm (acima da imagem). À esquerda, encontra-se o padrão de massa molecular *LMW calibration kit for SDS electrophoresis* (MM), sendo que seus marcadores estão expressos em kDa. O gel encontra-se com os respectivos *spots* (circulados em amarelo e numerados em branco) coletados.....135

**Figura 32** – Gel 2-D corado com Azul de Coomassie coloidal, referente à aplicação de 750 µg de proteínas da cultivar IAC 12. Foi utilizada a tira de pH 3-11 NL, 24 cm (acima da imagem). À esquerda, encontra-se o padrão de massa molecular *LMW calibration kit for SDS electrophoresis* (MM), sendo que seus marcadores estão expressos em kDa. O gel encontra-se com os respectivos *spots* (circulados em amarelo e numerados em branco) coletados.....136

**Figura 33** – Gel 2-D corado com Azul de Coomassie coloidal, referente à aplicação de 750 µg de proteínas da cultivar IAC 90. Foi utilizada a tira de pH 3-11 NL, 24 cm (acima da imagem). À esquerda, encontra-se o padrão de massa molecular *LMW calibration kit for SDS electrophoresis* (MM), sendo que seus marcadores estão expressos em kDa. O gel encontra-se com os respectivos *spots* (circulados em amarelo e numerados em branco) coletados.....136

**Figura 34** – Gel 2-D corado com Azul de Coomassie coloidal, referente à aplicação de 750 µg de proteínas da variedade IAC 06-01. Foi utilizada a tira de pH 3-11 NL, 24 cm (acima da imagem). À esquerda, encontra-se o padrão de massa molecular *LMW calibration kit for SDS electrophoresis* (MM), sendo que seus marcadores estão expressos em kDa. O gel encontra-se com os respectivos *spots* (circulados em amarelo e numerados em branco) coletados.....137

**Figura 35** – Classificação funcional das proteínas detectadas a partir da identificação dos peptídeos sequenciados dos *spots* com significativa variação de abundância entre as seis variedades de mandioca estudadas: Vassourinha Paulista, Cigana Preta, IAC 12, IAC 576-70, IAC 90 e IAC 06-01. ....101

**Figura 36** – Análise de Componentes Principais (ACP) realizada com o programa XLSTAT-MX relativa aos valores das intensidades dos 146 *spots* de proteínas com significativa variação de abundância entre as seis variedades de mandioca estudadas (Vassourinha Paulista, Cigana Preta, IAC 12, IAC 576-70, IAC 90 e IAC 06-01). CP1 e CP2 são, respectivamente, a primeira e segunda componentes principais, sendo as porcentagens entre parênteses as explicações da variabilidade entre as seis amostras dadas por estas componentes. As quatro replicatas de géis analíticos de cada amostra estão representadas por pontos coloridos, circundados por linhas de mesma cor.....107

**Figura 37** – Análise de Componentes Principais BILOT realizada com o programa XLSTAT-MX referente aos valores das intensidades médias dos 146 *spots* de proteínas com significativa variação de abundância entre as seis variedades de mandioca estudadas (Vassourinha Paulista, Cigana Preta,

IAC 12, IAC 576-70, IAC 90 e IAC 06-01). CP1 e CP2 são, respectivamente, a primeira e segunda componentes principais, sendo as porcentagens entre parênteses as explicações da variabilidade entre as seis amostras dadas por estas componentes. As seis amostras estão representadas por pontos grandes coloridos, enquanto que os *spots* estão representados por pontos pretos, sendo que seus respectivos números estão em vermelho.....108

**Figura 38** – Dendrograma gerado pelo método de Ward com o auxílio do programa SAS 9.3, referente às intensidades (quadruplicatas) dos 146 *spots* de proteínas com significativa variação de abundância entre as seis variedades de mandioca estudadas (Vassourinha Paulista, Cigana Preta, IAC 12, IAC 576-70, IAC 90 e IAC 06-01). O eixo y indica a variabilidade entre os grupos, já o eixo x mostra as replicatas de géis de cada uma das seis amostras.....114

**Figura 39** – *Heat Map* com *Hierarchical Clustering* obtido utilizando-se a distância euclidiana e gerado pelo programa *Delta2D*, referente às intensidades (quadruplicatas) dos 146 *spots* de proteínas com significativa variação de abundância entre as seis variedades de mandioca estudadas (Vassourinha Paulista, Cigana Preta, IAC 12, IAC 576-70, IAC 90 e IAC 06-01). Acima da figura, encontram-se cada uma das seis amostras, sendo Cig, Cigana Preta e Vass, Vassourinha Paulista. À direita, encontram-se os números referentes aos 146 *spots*, e à esquerda, o *Hierarchical Clustering*. Os principais grupos estão numerados de I à VII, sendo o último referente a dois *clusters* (indicados pelas setas em vermelho).....115

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Características agronômicas, físico-químicas, nutricionais e distribuição de algumas variedades de mandioca. ....	60
<b>Tabela 2</b> - Concentração de proteína e rendimento (em ordem decrescente) referentes à mandioca não identificada e às primeiras extrações de proteínas das dez variedades. ....	64
<b>Tabela 3</b> - Concentração de proteína e rendimento (em ordem decrescente) referentes à extração de proteínas destinada à técnica 2-D DIGE.....	67
<b>Tabela 4</b> - Concentração de proteína e rendimentos (em ordem decrescente) referentes à terceira extração de proteínas, destinada aos géis analíticos. ....	69
<b>Tabela 5</b> - Concentração de proteína e rendimento (em ordem decrescente) referentes à quarta extração de proteínas, destinada aos géis preparativos. ....	71
<b>Tabela 6 (Continua)</b> - Intensidade média dos 146 <i>spots</i> com significativa variação de abundância entre as seis variedades estudadas (Vassourinha Paulista, Cigana Preta, IAC 12, IAC 576-70, IAC 90 e IAC 06-01). ....	131
<b>Tabela 7 (Continua)</b> - Proteínas com significativa variação de abundância entre as seis variedades de mandioca estudadas.. ....	95
<b>Tabela 8</b> – Variedades onde os <i>spots</i> de cada um dos sete grupos encontraram-se com maior intensidade.....	114

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>21</b>
<b>1.1 A mandioca .....</b>	<b>21</b>
<b>1.2 Proteômica .....</b>	<b>29</b>
<b>1.2.1 Proteômica na área vegetal.....</b>	<b>31</b>
<b>1.2.2 Proteômica no estudo de variedades de mandioca .....</b>	<b>32</b>
<b>2 OBJETIVO.....</b>	<b>35</b>
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>36</b>
<b>3.1 Material .....</b>	<b>36</b>
<b>3.2 Métodos .....</b>	<b>36</b>
<b>3.2.1 Extração e determinação dos teores de amido.....</b>	<b>37</b>
<b>3.2.2 Extração e determinação dos teores de açúcares solúveis .....</b>	<b>37</b>
<b>3.2.3 Extração de proteínas .....</b>	<b>38</b>
<b>3.2.4 Quantificação de proteínas.....</b>	<b>39</b>
<b>3.2.5 Eletroforese em condições desnaturantes (SDS-PAGE) .....</b>	<b>39</b>
<b>3.2.6 Purificação dos extratos proteicos .....</b>	<b>40</b>
<b>3.2.7 Eletroforese bidimensional.....</b>	<b>41</b>
<b>3.2.7.1 Marcação mínima da amostra proteica com cianidinas fluorescentes para a técnica 2-D DIGE.....</b>	<b>42</b>
<b>3.2.7.2 Reidratação das tiras de gradiente de pH imobilizado (<i>Immobiline<sup>TM</sup> DryStrip Gels</i> – GE Healthcare) .....</b>	<b>44</b>
<b>3.2.7.2.1 Reidratação das tiras para a técnica 2-D DIGE .....</b>	<b>44</b>
<b>3.2.7.2.2 Reidratação das tiras para géis corados com Azul de Coomassie coloidal ou SYPRO® Ruby.....</b>	<b>45</b>
<b>3.2.7.3 Focalização isoeétrica (IEF) – Primeira dimensão .....</b>	<b>45</b>
<b>3.2.7.4 SDS-PAGE – Segunda dimensão.....</b>	<b>46</b>
<b>3.2.8 Coloração dos géis.....</b>	<b>48</b>

3.2.8.1 Coloração com Azul de Coomassie coloidal .....	48
3.2.8.2 Coloração com <i>SYPRO® Ruby</i> .....	48
3.2.9 Aquisição das imagens dos géis.....	49
3.2.10 Edição das imagens dos géis .....	49
3.2.11 Análise das imagens dos géis: detecção e validação dos <i>spots</i> ...	50
3.2.12 Métodos estatísticos multivariados .....	53
3.2.13 Excisão dos <i>spots</i> de interesse.....	53
3.2.14 Digestão com tripsina .....	54
3.2.15 Purificação dos extratos contendo os peptídeos obtidos através da digestão .....	56
3.2.16 Sequenciamento dos peptídeos por espectrometria de massas ...	57
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>59</b>
4.1 Caracterização das amostras .....	59
4.1.1 Determinação dos teores de amido e açúcares solúveis .....	61
4.2 Extração de proteínas e eletroforese em condições desnaturantes (SDS-PAGE).....	63
4.2.1 Otimização da extração de proteínas e avaliação da qualidade dos extratos proteicos .....	63
4.2.2 Extração de proteínas e avaliação da qualidade dos extratos proteicos para a técnica 2-D DIGE .....	67
4.2.3 Extração de proteínas e avaliação dos extratos proteicos para a realização dos géis analíticos .....	69
4.2.4 Extração de proteínas e avaliação dos extratos proteicos destinadas aos géis preparativos .....	70
4.3 Eletroforese bidimensional.....	71
4.3.1 Otimização dos géis bidimensionais .....	71
4.3.1.1 Teste de tiras de gradiente de pH imobilizado e corantes .....	71
4.3.1.2 Teste de purificação dos extratos proteicos .....	76

<b>4.3.2 Avaliação da técnica <i>2-D Fluorescence Difference Gel Electrophoresis</i> (2-D DIGE) no estudo dos perfis de proteínas de mandioca .....</b>	<b>79</b>
<b>4.3.3 Géis analíticos corados com <i>SYPRO® Ruby</i>.....</b>	<b>82</b>
<b>4.3.3.1 Análise das imagens: detecção e validação dos <i>spots</i>.....</b>	<b>90</b>
<b>4.3.4 Géis preparativos corados com Azul de Coomassie coloidal.....</b>	<b>92</b>
<b>4.3.4.1 Excisão dos <i>spots</i> de interesse.....</b>	<b>92</b>
<b>4.4 Sequenciamento dos peptídeos por espectrometria de massas .....</b>	<b>94</b>
<b>4.5 Métodos estatísticos multivariados.....</b>	<b>105</b>
<b>4.5.1 Análise de Componentes Principais (ACP) .....</b>	<b>105</b>
<b>4.5.2 Análise de Agrupamentos.....</b>	<b>112</b>
<b>4.5.3 <i>Heat Map</i> com <i>Hierarchical Clustering</i> .....</b>	<b>113</b>
<b>5 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>116</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>117</b>
<b>ANEXO A – Imagens de géis 2-D referentes à técnica 2-D DIGE.....</b>	<b>126</b>
<b>ANEXO B – Intensidade média dos 146 <i>spots</i> com significativa variação de abundância.....</b>	<b>131</b>
<b>ANEXO C – Imagens dos géis preparativos com os <i>spots</i> coletados ...</b>	<b>135</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 A mandioca

A mandioca, pertencente à ordem *Malpighiales*, família *Euphorbiaceae*, gênero e espécie *Manihot esculenta* Crantz, é uma planta heliófila, perene, arbustiva e sua propagação é geralmente feita por estacas (manivas) (ALVES; JAIGOBIND; JASINGH, 2007; EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA, 2012; FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION, 2000; LI et al., 2010).

Esta planta é originária do Brasil e foi domesticada provavelmente na região de transição entre o Cerrado e a Amazônia, sendo disseminada pelos portugueses durante os séculos XVI e XVII para áreas tropicais e subtropicais da África, Ásia e Caribe (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION, 2001; MÜHLEN; MARTINS; ANDO, 2000; OLSEN; SCHAAL, 1999; VIEIRA et al., 2011; VILPOUX, 2011). Devido à ampla adaptabilidade às condições ambientais (tolerância à seca e à baixa fertilidade do solo), à capacidade produtiva (facilidade de propagação, baixa exigência em insumos modernos, resistência ou tolerância a pragas e doenças) e às suas raízes tuberosas ricas em amido (20 a 40% em raízes frescas), tornou-se alimento básico para muitas populações (BROCHADO, 1977; DIAS; LOMGHI; LORENZI, 1997; LORENZI et al., 1978; SOUZA et al., 2006; VIEIRA et al., 2011). É uma das principais culturas do mundo, sendo a principal fonte de carboidratos para as populações de regiões tropicais e subtropicais e importante matéria-prima para a extração de amido, tornando-se a base da alimentação para cerca de 700 milhões de pessoas, especialmente nos países em desenvolvimento da América do Sul, Ásia e África (BUTARELO et al., 2004; LI et al., 2010; MÜHLEN; MARTINS; ANDO, 2000; SHEFFIELD et al., 2006; VALLE et al., 2004; VENDRAMINI et al., 2011).

A mandioca é base de múltiplos produtos, como farinha, ração para animais, alimentos preparados, doces, álcool, amido para colar papéis e tecidos, e produtos biodegradáveis. Tem se tornado importante fonte de emprego e renda para agricultores e indústrias locais em mais de 180 países (CARDOSO, 2003;

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION, 2001, 2008). As raízes de mandioca são comercializadas como vegetal fresco, minimamente processadas, refrigeradas, congeladas ou ainda na forma pré-cozida, facilitando o preparo e o consumo. São utilizadas na culinária nas formas cozida, assada e frita, ou integrando pratos mais complexos (OLIVEIRA et al., 2005). Suas raízes tuberosas são importantes fontes de energia (amido), de algumas vitaminas, minerais e fibras para a alimentação humana, já a parte aérea, utilizada na alimentação animal, enriquece a dieta rural, pois possui elevado teor proteico, vitaminas e minerais (LI et al., 2010).

O Brasil é o terceiro maior produtor de mandioca do mundo, com uma produção de 23,41 milhões de toneladas em 2012, equivalendo a quase 10% da produção mundial, enquanto a Nigéria é o maior produtor (54,00 milhões de toneladas em 2012), seguido pela Indonésia (23,92 milhões de toneladas em 2012) (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION, 2012). A mandioca é o quarto produto agrícola mais produzido no país, sendo a cana-de-açúcar o primeiro, seguido da soja e do milho (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2013). Esta raiz é cultivada em todo o território nacional nas mais diversas condições edafoclimáticas, embora alguns estados concentrem a maioria da produção (ALBUQUERQUE et al., 2012; VILPOUX, 2011). Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2013), as regiões que mais produzem mandioca são o Norte (7,44 milhões de toneladas), seguido do Sul (5,51 milhões de toneladas) e do Nordeste (4,74 milhões de toneladas). Os estados que detêm as maiores produções são: o Pará (4,68 milhões de toneladas), seguido do Paraná (3,84 milhões de toneladas) e do Maranhão (1,33 milhões de toneladas).

A mandioca apresenta ampla variabilidade genética, pois é estimado em cerca de 7 mil o número de variedades encontradas em todo o mundo, em sua maioria etnovariedades, mantidas por agricultores tradicionais (MÜHLEN; MARTINS; ANDO, 2000). No Brasil estão catalogadas mais de 4 mil variedades, sendo o principal centro de diversidade desse vegetal, o qual possui elevada importância social e econômica, por ser a principal fonte de carboidratos e de subsistência para as populações mais carentes, sendo também base para a alimentação animal e para a produção de fécula (amido), de amplo uso industrial (AMARAL; JAIGOBING; JASINGH, 2007; OLIVEIRA et al., 2012; ROGERS;

APPAN, 1973). A produção de fécula, derivado de mandioca com maior potencial de comercialização no mercado nacional e internacional, está concentrada nos estados do Paraná, Mato Grosso do Sul e São Paulo, e é realizada tanto artesanal quanto industrialmente (SOUZA et al., 2006; VIEIRA et al., 2010; VILPOUX, 2008).

Devido à grande valorização da mandioca, pelas suas inúmeras aplicações, que vão da culinária até o uso industrial, sua produção tem sido dirigida tanto para o consumo direto (*in natura*), quanto para a indústria de transformação, onde é utilizada na elaboração de diversos produtos como, fécula, raspas, farinha de raspas e polvilho azedo (LADEIRA; PENA, 2011). Aproximadamente 85% da produção de mandioca é destinada à farinha e fécula. O restante é destinado ao consumo *in natura* (cozida, assada ou frita), indústria de congelados e alimentação animal (parte aérea e/ou raízes). A cultura também é utilizada na indústria química, metalúrgica, têxtil, farmacêutica, plástica, entre outras (ARCHANGELO et al., 2007; VENDRAMINI et al., 2011; VIEIRA et al., 2010). O Brasil é o principal consumidor da farinha de mandioca, que é consumida em todo o território nacional, principalmente pela população de baixa renda das regiões Norte e Nordeste (ARCHANGELO et al., 2007; DIAS; LEONEL, 2006; VENDRAMINI et al., 2011; VIEIRA et al., 2010).

A taxonomia popular, desde as culturas pré-colombianas, classifica as variedades de mandioca em dois grupos: mansas ou doces e bravas ou amargas. As bravas têm sabor amargo, sendo este associado à capacidade de liberação de ácido cianídrico (HCN), que é uma substância extremamente tóxica decorrente da ação da enzima linamarase, através da hidrólise de glicosídeos cianogênicos (linamarina e lotaustralina) presentes no tecido da planta (CONN, 1969; PEREIRA; NERY; IGUE, 1965; PEREIRA; PINTO, 1962). O teor de glicosídeos cianogênicos varia em razão da variedade, condições de cultivo, época de colheita e condições ambientais (BORGES; FUKUDA, 1989; BORGES; FUKUDA; CALDAS, 1993; FUKUDA; BORGES, 1988, 1990; SANTAMARIA HERNANDEZ; CONTRERAS GUILLEN, 1984). No entanto, é importante destacar que não há entre os grupos qualquer característica morfológica da planta que permita distingui-los (VALLE et al., 2004).

Esta classificação das variedades de mandioca teve como critério a palatabilidade e toxicidade das raízes (PEREIRA; NERY, IGUE, 1965; PEREIRA;

PINTO, 1962;), já que a mandioca mansa *in natura* caracteriza-se por apresentar baixo teor de HCN (menos de 50 mg/kg de polpa de raízes frescas). Por outro lado, em mandiocas bravas são encontrados níveis superiores a 100 mg/kg, existindo ainda um terceiro grupo classificado como intermediário, em que os teores de HCN estão entre 50 e 100 mg/kg, sendo muito pouco ou levemente tóxicas (BOLHUIS, 1954).

A mandioca mansa ou doce, também conhecida como mandioca de mesa, aipim ou macaxeira (CONCEIÇÃO, 1983), é destinada ao consumo a fresco, sendo bastante consumida pelos brasileiros, principalmente nas regiões Centro-Oeste, Sudeste e Nordeste (BORGES; FUKUDA; ROSSETTI, 2002). Apesar deste consumo elevado, não existem dados estatísticos referentes à sua produção real, pois grande parte desta mandioca é produzida em culturas do tipo “fundo de quintal”, cuja produção não passa por um processo organizado de comercialização (CARVALHO et al., 1995; PEREIRA; LORENZI; VALLE, 1985).

Além de baixo potencial cianogênico, para que não ofereça sabor amargo ou risco de intoxicação aos consumidores, há algumas outras características importantes para que a mandioca de mesa seja definida como de qualidade, tais como: facilidade de descascamento e tempo de cozimento das raízes, ausência de fibras na massa cozida, resistência à deterioração pós-colheita, raízes bem conformadas, entre outras (EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA, 2003; VALLE et al., 2004). É importante salientar que a linamarina presente na polpa das raízes é parcialmente eliminada na água de cocção durante o preparo de produtos derivados da mandioca de mesa (mandioca frita, cozida, assada, purê, bolo, suflê) restando apenas em níveis baixíssimos, tornando-os inócuos (BORGES; FUKUDA; ROSSETTI, 2002; BUTARELO et al., 2004; VALLE et al., 2004). Segundo Carvalho et al. (1995), as mandiocas mansas não são utilizadas para a fabricação de farinha, já que originam um produto com sabor adocicado, de pouca aceitação no mercado.

Algumas das variedades de mesa encontradas no Brasil são: Mantiqueira (IAC 24-2), Verdinha (IAC 14-18), Preta (IAC 59-210), Pioneira, Paraná, Gema de ovo, IAC 576-70, Jaçanã (IACX – 352-7), BRS Rosada, BRS Jari, BRS Dourada, dentre outras (EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA, 2003, 2011). Em relação à IAC 576-70, é importante destacar que esta consiste na

variedade de mesa que responde por quase 100% da mandioca comercializada no estado de São Paulo.

As mandiocas bravas ou amargas, também chamadas de venenosas (BOLHUIS, 1954), são impróprias para o consumo a fresco, portanto, são destinadas à indústria, onde a toxicidade da raiz é reduzida durante o processamento, e utilizadas como matéria-prima na produção de farinha e fécula, também chamada de amido, goma ou tapioca (BORGES; FUKUDA; ROSSETTI, 2002; CARVALHO et al., 1995; EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA, 2003; MENDONÇA; MOURA; CUNHA, 2003; PEREIRA; LORENZI; VALLE, 1985; VALLE et al., 2004).

Em razão do uso para processamento, as cultivares utilizadas na indústria devem possuir raízes com polpa de coloração branca ou amarela, córtex branco e com ausência de cintas. Ainda estas raízes devem ser grossas, bem conformadas e com película fina, facilitando o descascamento e garantindo a qualidade do produto final (EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA, 2003). Algumas das variedades utilizadas em indústrias no Brasil são: Branca de Santa Catarina, Cigana Preta, Fibra, IAC 12, IAC 13, IAC 14, IAC 15, IAC 90, Fécula branca, Espeto, Roxinha, Anará, Camarão, Antinha, Turuna, Ourinho, entre outras (EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA, 2003; MÜHLEN; MARTINS; ANDO, 2000).

A cultura da mandioca é conduzida basicamente em sistemas convencionais de preparo do solo, e normalmente este cultivo se encontra em roças de agricultura autóctone, um sistema agrícola cujas bases técnicas remetem ao Brasil pré-colonial (FARALDO et al., 2000). Isto ocorre por ser facilmente cultivada e não apresentar grandes exigências de manejo (ALBUQUERQUE et al., 2012; SILVA et al., 2009). No entanto, devido a isso, a produção de mandioca enfrenta uma série de restrições importantes, incluindo perda de rendimento devido ao estresse biótico e abiótico, perda na qualidade nutricional e rápida deterioração das raízes colhidas (SHEFFIELD et al., 2006). Segundo Beeching et al. (1998), o processo de deterioração fisiológica das raízes tuberosas de mandioca se inicia dentro de 24 a 48 horas após a colheita, seguido por uma fase de deterioração microbiana, a qual ocorre após 5 a 7 dias. A deterioração pós-colheita promove o aparecimento de pontos escuros azulados nas raízes, devido ao acúmulo inicial de hidroxicumarinas em seus tecidos

vasculares, e posterior processo de oxidação pelas peroxidases nos tecidos parenquimáticos, com o conseqüente surgimento de manchas marrons. Estes processos tornam a mandioca não palatável para o consumo e inutilizável pela indústria (BUSCHMANN et al., 2000).

Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2013), a produtividade média nacional de mandioca em julho de 2013 foi de 14,03 t/ha, sendo que está muito aquém do potencial produtivo da espécie, o qual se situa em torno de 30 a 60 t/ha (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION, 2007). A rápida deterioração pós-colheita (fator principal da baixa produtividade) é resultante de danos mecânicos, fisiológicos e microbiológicos, manifestando-se com a perda de qualidade e quantidade das raízes. A resistência à deterioração pós-colheita pode ser controlada geneticamente, através da seleção de variedades mais resistentes, permitindo ampliar o tempo de conservação das raízes (BOOTH, 1974; FUKUDA; SILVA; BORGES, 1988; MONTALDO, 1973; VIDIGAL FILHO et al., 2000). Outro fator severo que limita a produtividade é a bacteriose, doença causada pelo micro-organismo *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis*, que faz com que as folhas murchem, sequem e caiam, culminando na morte da planta (VIDIGAL FILHO et al., 2000). Nesse sentido, os programas de melhoramento da mandioca são de fundamental importância para detectar a resistência de clones, linhagens ou cultivares a pragas e doenças, aumentando a produtividade (SANTOS et al., 2004).

O desconhecimento do ciclo da mandioca pode acarretar prejuízo aos produtores, pois se esta for colhida cedo, ocorre perda da produtividade por ainda não ter atingido o máximo de acúmulo de matéria seca. Por outro lado, se for colhida tarde, o índice de podridão radicular aumenta, além de manter a área ocupada por tempo superior ao necessário. Portanto, a determinação da época de colheita é um fator essencial no rendimento das cultivares (MOURA, 1998).

Outro ponto que causa perda na produção da mandioca é o fato de esta ser uma cultura que explora o solo com grande intensidade, considerada uma das mais erosivas quando comparada a outras como sorgo, milho e amendoim (PUTTHACHAROEN et al., 1998). Desta forma, sempre que possível, deve ser plantada em consórcio com outras espécies (sobretudo as leguminosas, as quais podem incrementar o teor de matéria orgânica no solo). Assim, o

aperfeiçoamento do sistema de produção e a utilização de novas tecnologias podem melhorar o desempenho dos sistemas produtivos (SILVA et. al., 2009).

Outro problema que atinge a mandioca produzida no Brasil é que dependendo da época do ano, produtores e consumidores têm incerteza em relação à qualidade culinária do produto que estão produzindo e comprando, respectivamente. Em relação ao cozimento, as variáveis mais importantes são: a textura, a plasticidade e a pegajosidade da massa, as quais interferem diretamente na maioria das receitas realizadas com a mandioca. Este problema ocorre devido à qualidade das raízes ser pouco estudada e as causas de sua variabilidade e instabilidade serem pouco conhecidas (OLIVEIRA; MORAES, 2009; PEREIRA; LORENZI; VALLE, 1985).

Como dito anteriormente, a farinha é o principal derivado da mandioca para a alimentação humana no Brasil, e apesar de constituir a forma mais ampla de aproveitamento industrial desta cultura não é um produto muito valorizado, devido à elevada variabilidade de tipos de farinha, dificultando a comercialização. Essas diferenças na farinha são decorrentes de vários fatores, como cultivar, solo, ponto de colheita, variabilidade genética, matéria-prima, método de processamento, entre outros (SOUZA et al., 2008). A heterogeneidade deste produto é devida, principalmente, à fabricação por pequenos produtores para seu próprio uso em unidades artesanais de processamento existentes em todo o Brasil (DIAS; LEONEL, 2006; LIMA, 1982). Nestes estabelecimentos, cada produtor segue um processo próprio de fabricação, provocando falta de uniformidade na farinha e tornando quase impossível a proposta de um padrão nacional de qualidade (SOUZA et al., 2008).

Além de fonte de calorias para as populações mais carentes do mundo, existe a possibilidade de a mandioca prover outros nutrientes importantes, já que esta apresenta potencial genético para ser fonte de carotenoides e licopeno para a alimentação humana. Os carotenoides, especialmente o  $\beta$ -caroteno, por ser precursor de vitamina A, estão presentes nas raízes com coloração de polpa amarela, enquanto o licopeno, importante por sua ação como antioxidante, está presente em polpa de raízes rosadas. Desta forma, existe a perspectiva de melhorar variedades destinadas ao consumo humano e a nutrição dos habitantes dos países em desenvolvimento (IGLESIAS et al., 1997; MEZZETE et al., 2009; NASSAR et al., 2007; VIEIRA et al., 2011).

Outras variedades de mandioca que vêm recebendo amplo destaque entre os produtores e pesquisadores de todo o mundo, em razão de seu potencial de uso alimentar ou industrial são as mandiocabas ou mandiocas açucaradas. Além de armazenar amido, estas mandiocas armazenam açúcares livres em suas raízes de reserva, apresentando novas possibilidades de utilização na indústria: produção de glicose sem hidrólise do amido, produção de amido com variabilidade na proporção amido/amilopectina, produção de amido do tipo glicogênio, produção de álcool (combustível e para a indústria de cosméticos), na siderurgia, entre outros. Entretanto, estes acessos ainda não foram suficientemente estudados quanto a sua variabilidade genética, a qual é uma etapa fundamental no melhoramento genético visando à produção em escala industrial (CARVALHO, 2004; CARVALHO; CABRAL; CAMPOS, 2000).

Como apresentado acima, existem diferenças importantes entre as variedades de mandioca de mesa e de indústria, e dentro de cada categoria existem aquelas com características mais ou menos desejáveis. Essa grande variabilidade e a exigência constante de produtos de melhor qualidade e do aumento de produtividade resultam no permanente aprimoramento das variedades disponíveis. Contudo, o conhecimento disponível acerca dos elementos determinantes para a manifestação das características de interesse da mandioca, seja de indústria ou de mesa, é bastante limitado.

Uma contribuição para esse campo poderia ser trazida pelo estudo detalhado da composição química das raízes tuberosas da mandioca, com ênfase nas proteínas, pois a despeito do valor nutricional dessas moléculas, são os produtos diretos da expressão gênica e, portanto, podem ser considerados os elementos determinantes para a manifestação das características agrônômicas, físico-químicas e nutricionais de interesse. Desse modo, a investigação das proteínas presentes nas raízes tuberosas da mandioca, e a eventual elucidação de seu papel biológico, podem contribuir para ampliar esse entendimento.

## 1.2 Proteômica

Nos últimos anos, o sequenciamento do código genético de vários organismos tem sido concluído. No entanto, a obtenção do genoma de um organismo representa a ação mais simples dentro da compreensão da regulação da expressão gênica (BALBUENA et al., 2011), já que a função de um gene não pode ser deduzida com base apenas em sua sequência (genômica) (WILKINS, 1996).

Sob a visão molecular, o fenótipo pode ser descrito em termos de RNAm e proteínas, associados ao genoma e influenciados pelo ambiente, tornando a relação fenótipo e genótipo bastante complexa (MATTICK, 2003). A transcriptômica, a qual se baseia na análise de transcritos de RNAm, somente fornece um pouco mais de informação, pois gera dados sobre um organismo em um determinado estado, não refletindo diretamente a expressão da proteína deste organismo, portanto, não elucidando muitos dos processos biológicos (CHEN; HARMON, 2006; WILKINS, 1996). Desta forma, o estudo das proteínas visa à compreensão mais completa da regulação gênica, já que a atividade e função destas moléculas estão associadas de forma muito mais próximas à função do gene, sendo os produtos finais da regulação gênica e as maiores responsáveis pelos fenótipos de células (WILKINS, 1996; BALBUENA et al., 2011).

É importante esclarecer que, na maioria dos casos, a proteína não atua sozinha, uma vez que pode interagir com outras proteínas (GAZZANA, BORLAK, 2007). Desta forma, o estudo do conjunto destas moléculas pode prover mais resultados em relação ao estudo de uma única proteína isoladamente. Assim, a descoberta de inúmeras proteínas que interagem entre si pode revelar diferentes complexos proteicos relacionados com atividades específicas, fazendo com que o entendimento do metabolismo celular de um determinado organismo torne-se mais claro. Desta maneira, a proteômica, a qual visa caracterizar de forma global, em uma determinada condição, o conjunto de proteínas expressas por um genoma numa célula ou tecido (proteoma), tem se tornado essencial para a investigação dos papéis que as proteínas têm no metabolismo celular (BALBUENA et al., 2011; SILVA, CORRÊA, REIS, 2007; WILKINS, 1996).

O termo proteoma foi definido por Mark Wilkins em 1994 na primeira reunião referente à eletroforese bidimensional (2-D), em Siena, na Itália. Devido ao proteoma se alterar frente a diferentes estímulos e condições, ao contrário do genoma, seu estudo pode trazer informações sobre as funções das proteínas e processos metabólicos em seres vivos, visando à elucidação do funcionamento e regulação de uma célula ou tecido em nível molecular. Assim, a proteômica, complementa os estudos referentes ao genoma, tornando-se a ponte entre o fenótipo e o genótipo (SILVA; CORRÊA; REIS, 2007; WASINGER et al., 1995).

Na era pós-genômica, a análise proteômica está relacionada à necessidade de se investigar o controle da expressão gênica, fornecendo elementos necessários para o estudo das propriedades das proteínas, tais como: quais proteínas são expressas, seus níveis e momentos de expressão, modificações pós-traducionais, interações entre proteínas, entre outros. E também para a avaliação da expressão da proteína em tecidos expostos a diferentes situações fisiológicas: patológico ou saudável, tratado ou não tratado, resistente ou suscetível, etc. (SILVA; CORRÊA; REIS, 2007; WASINGER et al., 1995).

O avanço na tecnologia de sequenciamento de proteínas através da espectrometria de massas (MS) foi o que possibilitou o surgimento e desenvolvimento da proteômica, sendo que este processo juntamente com a (2-D), compõe uma poderosa técnica para a análise proteômica (BALBUENA et al., 2011; HURKMAN; TANAKA, 2007; TYERS; MANN, 2003). Normalmente, seguem-se as seguintes etapas durante a análise proteômica: extração de proteínas, separação, quantificação da expressão e, por último, sua identificação (BALBUENA et al., 2011; SALVATO; CARVALHO, 2010). No entanto, é necessária a junção dos dados provenientes da genômica, transcriptômica, proteômica e metabolômica (estudo do conjunto dos metabólitos) para a compreensão da regulação da expressão gênica. Esta integração deverá ser baseada em parâmetros normalizadores, controle experimental rígido e visão ampla para que haja a coerente associação dos resultados estatísticos aos mecanismos moleculares da atividade celular. Desta maneira, os avanços referentes à análise proteômica dependerão do desenvolvimento das ferramentas de bioinformática e estatística (SALVATO; CARVALHO, 2010).

### 1.2.1 Proteômica na área vegetal

A proteômica oferece novas perspectivas na área vegetal com ênfase em estudos referentes à variabilidade genética, estresses fisiológicos e desenvolvimento, podendo futuramente gerar impactos econômicos. Como exemplos, é possível destacar estudos relacionados a doenças vegetais importantes (GIRIBALDI et al., 2011; SGHAIER-HAMMAMI et al., 2012), bem como aqueles relativos às respostas dos vegetais a condições de estresse abiótico (PANDEY et al., 2008; SANCHEZ-BEL et al., 2012; ZHANG et al., 2011), ou ainda estudos referentes ao amadurecimento de frutos (ANDRADE et al., 2012; NOGUEIRA et al., 2012; TOLEDO et al., 2012). Outras aplicações interessantes da análise proteômica encontram-se em pesquisas relativas aos efeitos dos métodos de cultivo orgânico e convencional sobre os produtos vegetais (NAWROCKI, et al., 2011), à germinação de sementes (YANG et al., 2007), à produção de eucalipto (CELEDON et al., 2007) e de fibras de linho (HOTTE; DEYHOLOS, 2008), ao desenvolvimento de sementes de pinheiro (ZHEN et al., 2012) e do embrião de arroz (XU et al., 2012), entre outros.

Análises comparativas de perfis de proteínas de variedades de um vegetal também constituem uma possibilidade de estudo interessante, em que podem ser apontadas as proteínas potencialmente associadas com as diferenças de produtividade, resistência a doenças, características físico-químicas, nutricionais, anti-nutricionais, tóxicas e filogenéticas observadas entre as variedades. Como exemplo, a comparação dos proteomas dos embriões referentes a seis variedades de arroz (*Oryza sativa* L.) relacionadas a estresses abióticos, sendo duas relativas ao estresse hídrico (sensível e tolerante), duas ao frio (sensível e tolerante) e duas ao estresse salino (sensível e tolerante), mostraram a identificação de proteínas relacionadas à tolerância ao estresse, à reserva de nutrientes, e algumas outras proteínas relativas à respostas ao estresse. A pesquisa revelou estreita relação entre as variedades sensíveis ao estresse abiótico, porém as variedades tolerantes não apresentaram tanta proximidade (FARINHA et al., 2011).

Nilo, Campos-Vargas e Orellana (2012) avaliaram globalmente o proteoma do mesocarpo de cinco variedades de pêssigo (*Prunus persica*),

comparando frutos firmes e macios através da análise por 2D-PAGE, objetivando identificar padrões comuns do acúmulo de proteínas que podem fornecer informações sobre os processos bioquímicos que são relevantes para o amolecimento do fruto. Observou-se que o proteoma foi conservado entre as variedades e também durante a transição do fruto firme para o macio. Apenas dois *spots* apresentaram uma mudança qualitativa em todas as condições avaliadas. Desta forma, estes resultados estão de acordo com a ideia de que variedades comerciais de pêsego possuem um *background* genético estreito.

Guo et al. (2012) compararam os proteomas das raízes de mudas de duas variedades de trigo, uma sensível e outra tolerante ao sal. Aproximadamente duzentos *spots* diferencialmente expressos foram localizados, sendo que as proteínas encontradas estavam relacionadas primeiramente ao metabolismo de carbono, seguidas por proteínas relativas à desintoxicação e defesa, chaperonas e referentes ao sinal de transdução.

Os estudos proteômicos têm-se voltado principalmente para culturas economicamente importantes, como arroz e trigo e para plantas modelo, como *Arabidopsis*. Sendo que as espécies tropicais correspondem a dois terços do total de plantas no mundo, os estudos referentes a estas deveriam existir em maior quantidade, já que possuem alto potencial farmacêutico, agrônômico, entre outros, porém são extremamente escassos. A mandioca, a qual é uma planta tropical, encontra-se dentro deste quadro de escassez de estudos genômicos e proteômicos (BALBUENA et al., 2011) e, portanto, constitui um organismo promissor para ser explorado com essas ferramentas, as quais podem render informações com grande potencial de aplicação no melhoramento genético.

### **1.2.2 Proteômica no estudo de variedades de mandioca**

Estudos sobre a expressão de genes em raízes de mandioca têm sido realizados com o objetivo de encontrar características de importância biológica, nutricional e agrônômica para fins de melhoramento genético e da engenharia genética. Sendo as proteínas os produtos finais da regulação gênica, a caracterização do proteoma dessa planta poderia contribuir para elucidar muitos

dos processos biológicos de relevância econômica ou nutricional, justificando, assim, a realização de alguns trabalhos dessa natureza. Cabral e Carvalho (2001) aplicaram essa ferramenta para o estudo da formação da raiz tuberosa, assim como Sheffield et al. (2006) estudaram os proteomas das raízes fibrosas e tuberosas e procederam à análise diferencial, para identificação das proteínas associadas com cada um dos dois tipos de raízes. Baba et al. (2008) estudaram as proteínas durante o desenvolvimento embrionário somático secundário da mandioca, a partir de culturas de tecidos *in vitro*. Posteriormente, Li et al. (2010) fizeram um estudo proteômico mais abrangente, voltado para a caracterização de embriões somáticos, plântulas e raízes tuberosas. Mais recentemente, Mitprasat et al. (2011) analisaram o proteoma da folha de mandioca durante o desenvolvimento da planta, desde seu plantio até a formação de raízes tuberosas, tentando elucidar como os processos bioquímicos em folhas de mandioca podem estar envolvidos com o desenvolvimento da raiz tuberosa.

De acordo com os dados disponíveis na literatura mencionados acima, os estudos referentes à mandioca empregando-se a análise proteômica são poucos e ainda não contemplaram a identificação das diferenças existentes entre cultivares desse vegetal. Como foi comentado anteriormente, é bastante provável que os perfis de proteínas das raízes tuberosas de mandioca reflitam as diferenças observadas entre as variedades no que diz respeito ao uso de mesa ou indústria, ou, ainda, em relação a características agrônomicas, como a resistência a doenças. Diante da relevância econômica e social dessa cultura, da diversidade existente, do potencial de desenvolvimento, e da necessidade permanente de aprimoramento do manejo pós-colheita, do aumento da produtividade, da melhora da qualidade culinária, nutricional e dos produtos industrializados, fica clara a importância de ampliar o conhecimento acerca dos aspectos moleculares que podem ser determinantes para a qualidade desse vegetal. Nesse sentido, estabelecer a correlação entre a expressão de determinadas proteínas e as variedades de mandioca pode contribuir para a identificação dos fatores que explicam as diferenças existentes, tanto entre as variedades de mesa e indústria, como entre aquelas de mesmo tipo de aplicação ou uso alimentar. À semelhança do que vem sendo feito para outros vegetais, é possível considerar que as informações geradas nesse tipo de estudo podem servir de base para o desenvolvimento tecnológico visando à manutenção da

qualidade, tanto pelo melhoramento genético convencional quanto por engenharia genética. Podem ainda permitir a manipulação de vias metabólicas para modificar o valor nutricional ou outras características de interesse.

## **2 OBJETIVO**

Identificar, através da análise diferencial dos perfis de proteínas das raízes tuberosas de mandiocas de mesa e de uso industrial, proteínas com diferenças significativas de abundância entre as variedades estudadas, e avaliar a potencial contribuição das diferenças observadas nos perfis proteicos para as características das raízes.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Material

Neste trabalho foram utilizadas raízes tuberosas de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) de variedades de uso industrial, mesa e de uso misto (**Quadro 1**) provenientes do banco de germoplasma de mandioca do Instituto Agronômico (IAC), localizado no município de Pindorama-SP. As amostras foram cultivadas sob as mesmas condições edafoclimáticas e colhidas na mesma data (outubro de 2010), sendo que para cada variedade foram colhidas raízes de 5-10 plantas.

Variedade	Uso
IAC 12 (Clone IAC 12-829)	Indústria
Caapora (IAC 105-66)	
IAC 13 (Clone 44-82)	
IAC 15	
IAC 90	
Olho Junto	
Cigana Preta (SRT 1116)	
IAC 576-70 (Amarelinha)	Mesa
IAC 06-01	
Vassourinha Paulista	Misto (mesa e indústria)

**Quadro 1** - Finalidades das dez variedades de mandioca utilizadas neste trabalho.

As raízes tuberosas das variedades de mandioca estudadas foram previamente descascadas, cortadas em pedaços, congeladas em nitrogênio líquido e mantidas a -80 °C para as análises posteriores. Pequenas quantidades de cada amostra foram trituradas em nitrogênio líquido e também mantidas a mesma temperatura. Foram escolhidas, de uma mesma variedade, partes diversas de diferentes raízes tuberosas para a realização da trituração.

## **3.2 Métodos**

### **3.2.1 Extração e determinação dos teores de amido**

O amido foi determinado enzimaticamente por método adaptado por Arêas e Lajolo (1981). Aproximadamente 0,5 g de mandioca previamente triturada foram homogeneizados em 5 mL de NaOH 0,5 N em homogeneizador tipo Potter por 5 min. Para a neutralização foram adicionados 5 mL de ácido acético 0,5 N. Esta solução foi transferida para balão volumétrico (25 mL), completando-se o volume com água desionizada. Uma alíquota de 1 mL foi transferida para tubo de centrífuga (15 mL), adicionada de 4 mL de etanol absoluto e centrifugada a 10.000 rpm por 10 min. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado por duas vezes com o auxílio de 4 mL de etanol 80% e centrifugação, como já descrito. Após o descarte do sobrenadante e evaporação do etanol, foi adicionado ao precipitado 1 mL de amiloglicosidase (14 U/mL, pH 4,8), seguido por incubação a 37 °C por 2 h. A reação foi interrompida por 100 µL de ácido perclórico 0,6 N. A glicose resultante foi quantificada através do método de glicose/peroxidase/ABTS, segundo Bergmeyer (1974), utilizando-se curva-padrão de glicose.

### **3.2.2 Extração e determinação dos teores de açúcares solúveis**

Os açúcares solúveis presentes em, aproximadamente, 1 g de amostra triturada em gral em presença de nitrogênio líquido, foram extraídos com 5 mL de etanol 80% e aquecimento (80 °C), sob agitação constante. Após 15 min, o homogenato foi centrifugado por 15 min a 10.000 rpm e o sobrenadante foi recolhido em balão volumétrico (25 mL). Esta operação foi repetida mais duas vezes, sendo os sobrenadantes combinados e o volume do balão ajustado com etanol 80%. Uma alíquota de 1 mL teve o etanol evaporado em concentrador *SpeedVac*® (Savant), sendo o precipitado reconstituído com água desionizada. As análises de glicose, frutose e sacarose foram feitas por Cromatografia Líquida

de Alta Eficiência (HPLC - *Dionex DX 500*) acoplada a um detector de pulso amperométrico (DPA) e coluna CarboPac PA1 (4x250 mm), em corrida isocrática com fluxo de 1 mL/min de 18 mM NaOH.

### 3.2.3 Extração de proteínas

A extração de proteínas das amostras foi feita com base no protocolo descrito por Carpentier et al. (2005), utilizando-se fenol tamponado com Tris (pH 8,0) para extração das proteínas seguido de precipitação com acetato de amônio em metanol, com algumas modificações. Aproximadamente 1 g de amostra previamente triturada com o auxílio de nitrogênio líquido foi pesado em tubo de centrifuga e ressuspenso em 5 mL de tampão de extração (50 mM Tris-HCl, pH 8,5, 5 mM ácido etilenodiaminatetraacético (EDTA), 100 mM KCl, 1% ditioneitol (DTT) e 30% sacarose) a 4 °C e agitado em vortex por 30 s. Após, foram adicionados 5 mL de fenol tamponado com Tris (pH 8,0) a 4 °C, seguido de agitação em vortex por 15 min a 4 °C. Em seguida, centrifugou-se a mistura por 20 min a 6.000 x g a 4 °C, coletou-se a fase orgânica (fenol) passando-a para um novo tubo de centrifuga, adicionando-se mais uma vez 5 mL de tampão de extração para a reextração da fase orgânica. Foram utilizados o vortex e centrifuga nas mesmas condições anteriores para que novamente a fase fenólica fosse coletada. Assim, as proteínas foram precipitadas adicionando-se 25 mL de 100 mM acetato de amônio em metanol a 20 °C, seguido de incubação a mesma temperatura, por no mínimo 16 h. Após a precipitação, a mistura foi centrifugada por 40 min a 16.000 x g a 4 °C, seguido do descarte do sobrenadante. O precipitado foi lavado com 3 mL de solução de acetona a -20 °C contendo 0,2% de DTT, seco ao ar em capela por 30 min e ressuspenso em 1 mL de tampão de ressuspensão (7 M ureia, 2 M tiourea, 4% CHAPS e 1% DTT), para géis corados com os reagentes Azul de Coomassie coloidal ou *SYPRO® Ruby Protein Gel Stain* (Sigma), ou ressuspenso em 1 mL de tampão de lise (7 M ureia, 2 M tiourea, 4% CHAPS e 30 mM Tris, pH 8,5) para análise *2-D Fluorescence Difference Gel Electrophoresis* (2-D DIGE). A suspensão do precipitado foi agitada em vortex por 1 h a temperatura ambiente, transferida para

um microtubo e centrifugada por 30 min a  $8.609 \times g$  à mesma temperatura. O sobrenadante desta etapa, consistindo no extrato proteico solubilizado, foi recolhido e armazenado a  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ .

As extrações de proteínas referentes à técnica 2-D DIGE e aos géis analíticos (corados com *SYPRO® Ruby*), foram realizadas paralelamente em triplicata, ou seja, utilizaram-se 3 g de material triturado referente a cada amostra, produzindo-se três microtubos contendo 1 mL de extrato cada um. Ao final, os três extratos proteicos de cada variedade foram reunidos, formando-se um único extrato contendo 3 mL. Já a extração de proteínas referente aos géis preparativos, corados com Azul de Coomassie coloidal, foi realizada paralelamente em sextuplicata, utilizando-se, portanto, 6 g de material triturado referente a cada amostra.

### **3.2.4 Quantificação de proteínas**

As proteínas foram quantificadas com o auxílio do *2-D Quant Kit* (GE Healthcare), baseado nas instruções do fabricante. Neste processo ocorreu ligação específica de íons cobre às proteínas do extrato, de modo que o cobre não ligado foi medido através de um agente colorimétrico (*Working Color Reagent*) por leitura em espectrofotômetro a 480 nm. A concentração das amostras foi estimada através da comparação dos valores lidos com a curva padrão de albumina de soro bovino (BSA). A absorbância lida no espectrofotômetro foi, portanto, inversamente proporcional à concentração da amostra.

### **3.2.5 Eletroforese em condições desnaturantes (SDS-PAGE)**

Para a realização da eletroforese em condições desnaturantes foram confeccionados minigéis de poliacrilamida em presença de dodecil sulfato de sódio (SDS). Os minigéis utilizados apresentaram as seguintes dimensões: 0,75 mm de espessura, 8,2 cm de largura e 7,2 cm de altura. Cada minigel foi

constituído por um gel de separação (12,5% de acrilamida e 5,2 cm de altura) e um gel de empilhamento ou concentração (3,75% de acrilamida e altura mínima a partir da base dos poços de 1 cm). O gel de separação foi composto por: 12,5% acrilamida, 0,374 M Tris-HCl, pH 8,8, 0,1% SDS, 0,2% tetrametiletilenodiamina (TEMED) e 0,075% persulfato de amônio. O gel de empilhamento consistiu de: 3,75% acrilamida, 0,125 M Tris-HCl, pH 6,8, 0,1% SDS, 0,1% TEMED e 0,075% persulfato de amônio. Após a polimerização dos géis, as amostras foram adicionadas de tampão de amostra três vezes concentrado de modo a alcançar as seguintes concentrações finais: 0,0625 M Tris-HCl, pH 6,8, 10% glicerol, 2% SDS, 0,05% azul de bromofenol e 1% de DTT (LAEMMLI, 1970, com modificações). Após essa adição, aguardaram-se 15 min em repouso a temperatura ambiente para que o DTT, agente redutor, pudesse agir.

Em seguida, as amostras e o padrão de massa molecular *LMW calibration kit for SDS electrophoresis* (GE Healthcare) contendo fosforilase b (músculo de coelho) - 97 kDa, albumina (soro bovino) - 66 kDa, ovalbumina (ovo branco de galinha) - 45 kDa, anidrase carbônica (eritrócito bovino) - 30 kDa, inibidor de tripsina (soja) - 20,1 kDa e  $\alpha$ -lactalbumina (leite bovino) - 14,4 kDa foram aplicados nos géis. A cuba foi preenchida com tampão de corrida (0,025 M Tris, 0,192 M glicina e 0,1% SDS, pH 8,3) e os minigéis foram submetidos a tensão fixa de 200 V por 45 min a 4 °C.

### **3.2.6 Purificação dos extratos proteicos**

Na purificação dos extratos proteicos foi utilizado o *2-D Clean-up Kit* (GE Healthcare). Todas as etapas foram realizadas em banho de gelo, a não ser se especificado. Primeiramente, transferiu-se a amostra contendo 100  $\mu$ g de proteínas para um microtubo de 1,5 mL, seguido da verificação do pH da mesma, que deveria estar entre 8,0 e 8,5. Assim, adicionaram-se à amostra 300  $\mu$ L de precipitante e agitou-se em vortex por 20 s, seguido de incubação em banho de gelo por 15 min, adição de 300  $\mu$ L de coprecipitante e breve agitação em vortex. A amostra foi centrifugada por 5 min a 16.595 x g a 4 °C e imediatamente o sobrenadante foi removido com o auxílio de um pipetador, seguido de um breve

pulso em microcentrífuga. Todo o sobrenadante restante foi removido e sobre o precipitado foram adicionados 40  $\mu$ L de coprecipitante, deixando o microtubo em banho de gelo por 5 min. Novamente a amostra foi centrifugada nas mesmas condições anteriores, descartando-se o sobrenadante e adicionando-se 25  $\mu$ L de água desionizada sobre o precipitado. A mistura foi agitada em vortex por 5 a 10 s, seguido da adição de 1 mL de *Wash Buffer* a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  e 5  $\mu$ L de *Wash Additive*, e novamente agitada em vortex até que o precipitado fosse completamente dispersado. Em seguida, a mistura foi incubada a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 30 min, sendo que durante este período foi agitada em vortex por 20 a 30 s a cada 10 min. Após a agitação, a mistura foi novamente centrifugada nas mesmas condições, removendo-se e descartando-se o sobrenadante, sendo o precipitado seco ao ar por até 5 min e solubilizado em 50  $\mu$ L de tampão de ressuspensão (7 M ureia, 2 M tioureia, 4% CHAPS e 1% DTT), quando o gel foi corado com *SYPRO® Ruby*, ou solubilizado em 30  $\mu$ L de tampão de lise (7 M ureia, 2 M tioureia, 4% CHAPS e 30 mM Tris, pH 8,5), quando o gel destinado à análise DIGE, seguido de agitação em vortex por pelo menos 30 s. Posteriormente, centrifugou-se novamente para remoção de materiais insolúveis e diminuição de espuma. Os sobrenadantes foram recolhidos para um novo tubo, sendo verificado o pH, que deveria estar novamente entre 8,0 e 8,5 e, por fim, a amostra foi armazenada a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  até que sua concentração de proteínas fosse novamente determinada como descrito no item **3.2.4**.

### **3.2.7 Eletroforese bidimensional**

Os extratos proteicos referentes às amostras foram submetidos à eletroforese bidimensional, combinando focalização isoeletrica (IEF) (primeira dimensão), que se baseia no ponto isoeletrico (pI) das proteínas, com SDS-PAGE (segunda dimensão), no qual as proteínas são separadas por peso molecular.

Foram realizadas separações em minigéis utilizando-se o sistema *Mini-PROTEAN 2-D Cell* (Bio-Rad) e géis de maiores dimensões confeccionados para o *Ettan DALTsix Electrophoresis System* (GE Healthcare), sendo que os géis

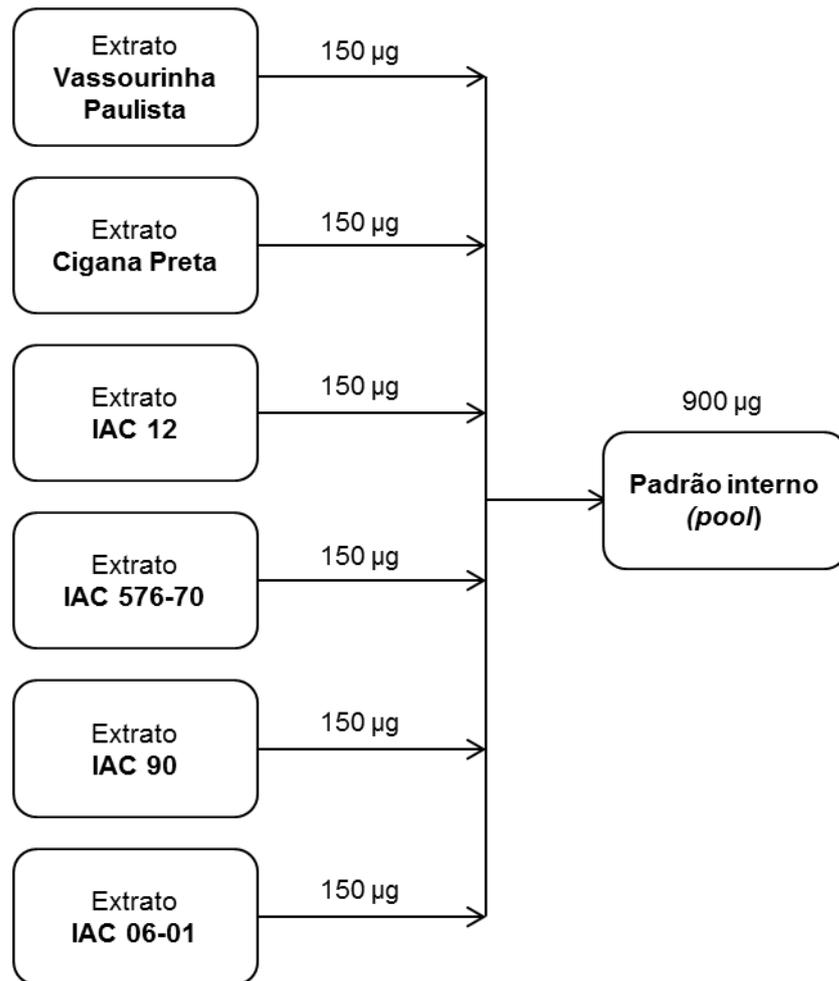
utilizados para ensaios preliminares foram corados com Azul de Coomassie coloidal ou *SYPRO® Ruby*, ou ainda utilizando-se a técnica 2-D DIGE. Todos os géis analíticos foram corados com *SYPRO® Ruby* e os preparativos com Azul de Coomassie coloidal.

### **3.2.7.1 Marcação mínima da amostra proteica com cianidinas fluorescentes para a técnica 2-D DIGE**

A reação de marcação das proteínas foi realizada com o uso do sistema fluorescente de marcação mínima (*Amersham CyDye DIGE Fluors – minimal dyes – for Ettan DIGE*, GE Healthcare).

Após a purificação dos extratos proteicos, foi realizada a reconstituição dos dois tipos de fluoróforos utilizados neste trabalho: cianidinas 3 e 5 (*Cy3* e *Cy5*, respectivamente). Todo o processo de reconstituição foi realizado ao abrigo da luz e segundo as normas do fabricante. Removeram-se os fluoróforos *Cy3* e *Cy5* do *freezer* (-20 °C) e aguardaram-se 5 min a temperatura ambiente. Em seguida, foram adicionados 5 µL de dimetilformamida (DMF) em cada tubo contendo 5 nmol de fluoróforo, resultando em soluções estoque de 1 mM. As soluções foram agitadas vigorosamente em vortex por 30 s, centrifugadas a 12.000 x g por 30 s em microcentrífuga e armazenadas a -20 °C protegidas da luz para posterior marcação das proteínas.

Para a marcação de proteínas, iguais volumes equivalentes a 50 µg de proteínas de cada uma das seis amostras foram colocados separadamente em três microtubos (1,5 mL), totalizando dezoito microtubos. Paralelamente, em um mesmo microtubo misturaram-se volumes equivalentes a 150 µg de proteínas de cada uma das seis amostras, totalizando 900 µg, formando uma mistura de partes iguais de todas as amostras, doravante denominado *pool* (**Figura 1**).



**Figura 1** - Esquema referente à mistura dos extratos proteicos das raízes tuberosas das seis mandiocas usadas como amostras na análise DIGE (Vassourinha Paulista, Cigana Preta, IAC 12, IAC 576-70, IAC 90 e IAC 06-01) para utilização como padrão interno (*pool*).

As etapas de marcação das amostras proteicas também foram realizadas ao abrigo da luz e de acordo com o fabricante. Uma parte de cada solução estoque foi diluída em uma parte e meia de DMF, formando a *CyDye Working Solution*, sendo que 1 µL desta solução correspondeu a 400 pmol de fluoróforo, necessários para marcar 50 µg de proteínas. Desta forma, adicionaram-se 18 µL de *Cy5 Working Solution* ao *pool* e 1 µL de *Cy3 Working Solution* a cada microtubo contendo 50 µg de proteínas da amostra e deixou-se em banho de gelo por 30 min. Em seguida, com o intuito de interromper a reação, adicionou-se 1 µL de 10 mM lisina para cada 50 µg de proteínas, sendo 18 µL ao *pool* e 1 µL a amostra. Após incubação em banho de gelo por 10 min, os microtubos contendo as amostras e o *pool* foram armazenados a -80 °C protegidos da luz.

### **3.2.7.2 Reidratação das tiras de gradiente de pH imobilizado (*Immobiline™ DryStrip Gels* – GE Healthcare)**

A reidratação das tiras de gradiente de pH imobilizado foi realizada de forma passiva utilizando-se o suporte específico para este fim (*Immobiline® DryStrip Reswelling Tray*, Pharmacia Biotech). No decorrer do trabalho foram utilizadas tiras de pH 3-10 e pH 4-7, ambas de 7 cm e tiras de pH 3-11 NL (não linear) de 11 e 24 cm. Como especificado pelo fabricante, o volume final máximo aplicado a ambas às tiras de 7 cm foi de 125  $\mu\text{L}$ , enquanto o volume final aplicado às tiras de 11 e 24 cm foi de 200  $\mu\text{L}$  e 450  $\mu\text{L}$ , respectivamente.

#### **3.2.7.2.1 Reidratação das tiras para a técnica 2-D DIGE**

O preparo das soluções de reidratação destinadas à análise DIGE foi realizado de acordo com as instruções do fabricante. A cada um dos dezoito microtubos contendo o volume equivalente a 50  $\mu\text{g}$  de proteínas das amostras marcadas com *Cy3 Working Solution* ( $V_{\text{amostra}}$ ) foram adicionados volumes correspondentes a 50  $\mu\text{g}$  de proteínas do *pool* marcadas com *Cy5 Working Solution* ( $V_{\text{pool}}$ ). A cada uma dessas misturas foi adicionado igual volume de tampão de lise (7 M ureia, 2 M tiourea, 4% CHAPS, 1% DTT e 0,5% IPG Buffer pH 3-10) e deixadas em repouso em banho de gelo por 10 min. Em seguida, completou-se o volume das misturas adicionadas de tampão de lise para 125  $\mu\text{L}$ , que corresponde ao volume de reidratação estabelecido pela GE Healthcare para a tira de pH 3-10 de 7cm, a qual foi utilizada para esta análise.

Após, a solução de reidratação foi aplicada na fenda do suporte específico para essa etapa, retirou-se a proteção da tira, e esta foi posta, com o auxílio de pinça e espátula, com o seu respectivo gel voltado para baixo, ou seja, em contato com a solução de reidratação. A fenda do suporte contendo a tira foi coberta com aproximadamente 5 mL de óleo mineral (*Dry strip cover fluid* – GE Healthcare), evitando evaporação e formação de cristais de ureia. As reidratações das tiras foram realizadas por período de 18 h. Todas as etapas desta técnica foram executadas ao abrigo da luz.

### **3.2.7.2.2 Reidratação das tiras para géis corados com Azul de Coomassie coloidal ou SYPRO® Ruby**

Para a confecção dos géis corados com Azul de Coomassie coloidal ou SYPRO® Ruby utilizaram-se tiras de pH 3-10 e pH 4-7, 7 cm e tiras de pH 3-11 NL de 11 e 24 cm. O preparo das soluções de reidratação destinadas a estes géis foi realizado da seguinte maneira: colocou-se em um microtubo o volume de extrato proteico contendo a quantidade de proteína adequada a cada tipo de tira de pH, seguido de tampão de lise (7 M ureia, 2 M tioureia, 4% CHAPS e 1% DTT) na quantidade suficiente para totalizar o volume final a ser aplicado à tira, 0,5% de IPG Buffer (de acordo com o pH da tira e com o volume final) e traços de azul de bromofenol. Em seguida, foram realizadas as aplicações da solução de reidratação e da tira em suporte específico, conforme descrito no item **3.2.7.2.1**. As reidratações das tiras foram realizadas por períodos entre 17 e 24 h, sendo que as destinadas aos géis de maiores dimensões, incluindo os géis analíticos e preparativos, foram reidratadas por um período de 18 h.

### **3.2.7.3 Focalização isoeétrica (IEF) – Primeira dimensão**

O aparelho *Ettan IPGphor II* (Amersham Biosciences®) foi utilizado para a focalização das proteínas das amostras. Após a reidratação das tiras, espalharam-se aproximadamente 10 mL de óleo mineral por todo o canal de *Manifold*, encaixaram-se as tiras, com o auxílio da pinça e espátula, com as faces contendo os respectivos géis voltadas para cima. Em seguida, em ambas as pontas das tiras foram colocados papéis de contato (*electrode wicks*) contendo 150 µL de água desionizada, e os dois conjuntos de eletrodos foram fixados e travados. A seguir, foi realizada a programação referente à focalização, que para as tiras de pH 3-10, 7 cm, foi de: 1) 300 V por 4 h, 2) aumento gradativo até 1.000 V por 30 min, 3) aumento gradativo até 5.000 V por 1 h e 20 min e, por fim, 4) mantendo a 5.000 V por 25 min, totalizando 6 h e 15 min. No caso das tiras de pH 4-7, 7 cm, a programação utilizada foi de: 1) 300 V por 4 h, 2) aumento gradativo até 1.000 V por 30 min, 3) aumento gradativo até 5.000 V por 1 h e 30 min e, por fim, 4) mantendo a 5.000 V por 36 minutos, totalizando 6 h e 36 min.

Em relação às tiras de pH 3-11 NL, 11 cm, a programação utilizada foi de: 1) 500 V por 6 h, 2) aumento gradativo até 1.000 V por 1 h, 3) aumento gradativo até 6.000 V por 2 h e, por fim, 4) mantendo a 6.000 V por 10 min, totalizando 9 h e 10 min. Já para as tiras de pH 3-11 NL, 24 cm, a programação utilizada foi de: 1) 500 V por 8 h, 2) aumento gradativo até 1.000 V por 1 h, 3) aumento gradativo até 8.000 V por 3 h e, por fim, 4) mantendo a 8.000 V por 3 h e 18 min, totalizando 15 h e 18 min. Para as focalizações referentes aos géis analíticos e preparativos foram utilizados 48  $\mu$ A por tira de gradiente de pH imobilizado e temperatura de 20 °C, já para todas as outras foram utilizados 50  $\mu$ A por tira e mesma temperatura.

Após este processo, as tiras foram armazenadas em ultrafreezer a -80 °C até o momento da separação na segunda dimensão. As tiras destinadas aos géis separados por 2-D DIGE foram mantidas ao abrigo da luz durante a focalização e armazenamento.

#### **3.2.7.4 SDS-PAGE – Segunda dimensão**

Como apresentado anteriormente, foram confeccionados géis 2-D de diferentes tamanhos (minigéis e géis de maiores dimensões), ambos constituídos por apenas gel de separação contendo 12,5% de acrilamida. Os minigéis com dimensões de 8,2 cm x 7,2 cm e espessura 0,75 mm, foram compostos por: 12,5% acrilamida, 0,374 M Tris-HCl, pH 8,8, 0,1% SDS, 0,2% TEMED e 0,075% persulfato de amônio. Já os géis de maiores dimensões (25,5 cm x 20,5 cm e espessura 1,5 mm, se corados com *SYPRO® Ruby* ou Azul de Coomassie coloidal, ou 1,0 mm se destinados à 2-D DIGE), consistiram de: 12,5% acrilamida, 0,375 M Tris-HCl, pH 8,8, 0,1% SDS, 0,1% TEMED e 0,1% persulfato de amônio.

Após a polimerização dos géis, as tiras de gradiente de pH imobilizado foram retiradas do armazenamento a -80 °C e imediatamente equilibradas por 15 min em solução de equilíbrio (6 M ureia, 0,75 M Tris-HCl, pH 8,8, 30% glicerol, 2% SDS e 0,002% azul de bromofenol) contendo 1% de DTT e logo após, incubadas por mais 15 min em solução de equilíbrio contendo 2,5% de iodoacetamida (IAA). A etapa de equilíbrio das tiras destinadas à separação 2-D

DIGE foi realizada ao abrigo da luz e sua solução de equilíbrio não foi adicionada de azul de bromofenol.

Após o equilíbrio, as tiras foram posicionadas na parte superior de cada gel sendo aplicado também o padrão de massa molecular *LMW calibration kit for SDS electrophoresis*, por meio de um fragmento de papel para *blotting* (Whatman) de dimensão 0,5 mm x 0,5 mm previamente embebido com uma alíquota (1-5 µL) dessa solução. Em seguida, as tiras de gel e os fragmentos de papel contendo o padrão de peso molecular foram fixados nos géis utilizando solução de agarose (0,5% agarose e 0,002% azul de bromofenol em tampão de corrida: 0,025 M Tris, 0,192 M glicina e 0,1% SDS, pH 8,3).

Após polimerização da agarose, preparou-se a cuba e adicionou-se tampão de corrida (0,025 M Tris, 0,192 M glicina e 0,1% SDS, pH 8,3) em quantidade suficiente para preenchimento. A eletroforese referente aos géis de maior escala ocorreu a 25 °C, inicialmente com potência máxima de 5 W por gel durante 30 min e, após esse período, com potência de 17 W por gel até o término da corrida, arbitrariamente definida como sendo até que a frente de corrida indicada pelo azul de bromofenol percorresse aproximadamente 11-11,5 cm para os géis corados com *SYPRO® Ruby*, 10 cm para os géis 2-D DIGE, e no caso dos géis preparativos, a altura total do gel (20,5 cm). As eletroforeses referentes aos minigéis ocorreram fixando-se tensão máxima de 200 V e a temperatura ambiente.

Os géis destinados à técnica 2-D DIGE foram realizados em triplicata, referentes às amostras: Vassourinha Paulista, Cigana Preta, IAC 12, IAC 576-70, IAC 90 e IAC 06-01. Em relação aos géis analíticos, foram realizadas seis replicatas de géis referentes às cultivares IAC 12, IAC 576-70 e IAC 90, e oito das variedades Vassourinha Paulista, Cigana Preta e IAC 06-01. Já os géis preparativos foram confeccionados em duplicata, utilizando-se as mesmas seis amostras descritas acima para os géis analíticos.

Todo o preparo para a corrida 2-D DIGE e a corrida em si foram realizados ao abrigo da luz. Não foi aplicado padrão de massa molecular no preparo dos géis 2D-DIGE e dos géis preparativos.

### 3.2.8 Coloração dos géis

#### 3.2.8.1 Coloração com Azul de Coomassie coloidal

Os géis foram corados com Azul de Coomassie coloidal de acordo com o protocolo descrito por Neuhoff et al. (1988) e Neuhoff, Stamm e Eibl (1985), com pequenas modificações. Após a eletroforese, os géis foram lavados brevemente com água desionizada e incubados em solução corante (19,6% etanol, 7,84% sulfato de amônio, 1,57% ácido fosfórico e 0,1% *Coomassie Brilliant Blue G250* - Sigma) por no mínimo 16 h sob agitação constante. Após esse período, os géis foram transferidos para solução tampão de neutralização (0,1 M Tris, pH 6,5 ajustado com ácido fosfórico) por 2 min. Em seguida, os géis foram descorados com 50% etanol (por 30 s) e, após, transferidos para a solução fixadora (20% sulfato de amônio) por no mínimo 16 h sob agitação. Todo o processo (coloração, neutralização, descoloração e fixação) foi repetido e, em seguida, os géis foram armazenados a 4 °C.

#### 3.2.8.2 Coloração com *SYPRO® Ruby*

Os géis corados com *SYPRO® Ruby Protein Gel Stain* foram submetidos às etapas de: fixação, coloração e lavagem, de acordo as instruções do fabricante (Sigma). Após a eletroforese, os géis foram lavados com água desionizada e incubados em solução fixadora contendo 50% de etanol e 3% de ácido acético por 30 min sob agitação constante. Em seguida, foram colocados em um recipiente de polipropileno contendo o corante *SYPRO® Ruby*, e mantidos ao abrigo da luz por no mínimo 16 h a temperatura ambiente sob agitação constante. Posteriormente, ainda protegidos da luz, os géis foram lavados em solução contendo 10% de etanol e 7% de ácido acético por 30 min.

### 3.2.9 Aquisição das imagens dos géis

Com exceção das imagens dos minigéis corados com Azul de Coomassie coloidal, que foram adquiridas através de câmara fotográfica *EOS Rebel XSi 450D* (Canon), todas as outras imagens dos géis foram obtidas em sistema de fotodocumentação *VersaDoc MP 4000* (Bio-Rad) através do programa *Quantity One* (Bio-Rad). As imagens dos géis corados com Azul de Coomassie Coloidal foram adquiridas utilizando-se fonte de luz branca, sem filtros. As imagens dos géis corados com *SYPRO® Ruby* foram adquiridas utilizando-se fonte de luz UV e filtro de emissão  $605\pm 35$  nm BP (*Band Pass*). Já as imagens dos géis 2-D DIGE foram adquiridas por excitação com luz de LED verde ( $553\pm 3$  nm) e filtro de emissão  $605\pm 35$  nm BP para as proteínas marcadas com *Cy3* e LED vermelho ( $648\pm 3$  nm) e filtro de emissão  $695\pm 55$  nm BP para as marcadas com *Cy5*.

O tempo de exposição dos géis referentes à técnica 2-D DIGE à luz foi de 30 s. Já os géis analíticos foram expostos à luz UV por no mínimo 10 s e no máximo 60 s, sendo que as melhores imagens referentes às replicatas de cada variedade foram selecionadas através de comparação entre todas as imagens adquiridas, baseada em intensidades semelhantes dos *spots*. Desta maneira, as imagens com maior semelhança tiveram tempos de exposição de no mínimo 13 e no máximo 40 s.

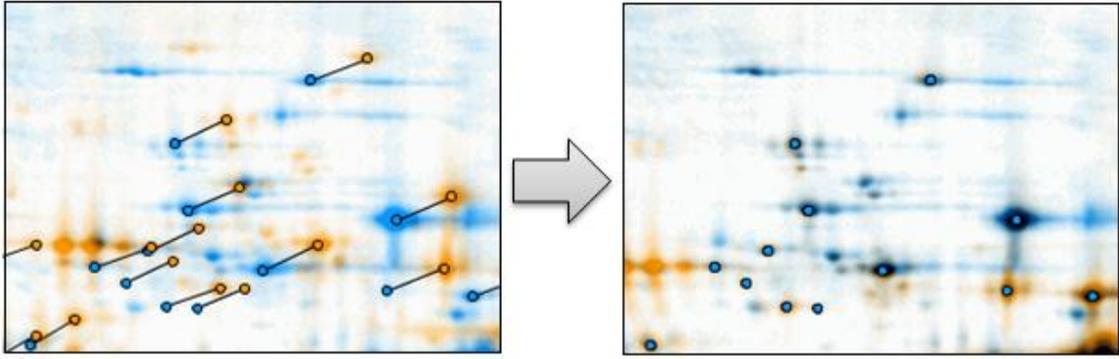
### 3.2.10 Edição das imagens dos géis

A edição foi realizada apenas para as imagens referentes aos géis analíticos. A fim de manter as mesmas dimensões para todas as imagens, minimizar distorções e facilitar o processo de análise, a função de recorte do programa *Quantity One* foi utilizada. As dimensões referentes ao retângulo utilizado como recorte foram salvas e aplicadas em todas as imagens, sendo que as posições das imagens relacionadas ao recorte foram mantidas. Nenhuma edição relativa a brilho e contraste foi realizada para que não influenciasse nos resultados, já que poderia alterar a intensidade dos *spots* detectados.

### 3.2.11 Análise das imagens dos géis: detecção e validação dos *spots*

Para esta etapa do trabalho, foram seleccionadas quatro replicatas dos géis analíticos de cada uma das seis variedades de mandioca: Vassourinha Paulista, Cigana Preta, IAC 12, IAC 576-70, IAC 90 e IAC 06-01. As imagens dos géis foram analisadas através do programa *Delta2D 4.2* (DECODON), em quatro passos: 1) 'Projeto', 2) 'Alinhamento (*warping*) das imagens', 3) 'Detecção e quantificação de *spots*' e 4) 'Análise dos perfis de expressão'. Primeiramente, na etapa de 'Projeto', as imagens foram copiadas e as replicatas ordenadas em seis grupos: Vassourinha Paulista, Cigana Preta, IAC 12, IAC 576-70, IAC 90 e IAC 06-01. Em seguida, partiu-se para os preparativos referentes ao alinhamento das imagens. Assim, dentre as vinte e quatro imagens de géis existentes foi escolhida a que possuía os *spots* melhor definidos e resolvidos. Após, foi seleccionada a melhor imagem de cada um dos grupos e, assim, todas foram conectadas à primeira imagem escolhida, estabelecendo correspondência entre os *spots* de cada par de imagens. Em seguida, as imagens restantes foram ligadas às imagens secundariamente conectadas ao sistema, sendo que cada uma foi ligada à imagem de seu respectivo grupo (amostra), até que todas as imagens estivessem conectadas, formando o *Gráfico de distorção*.

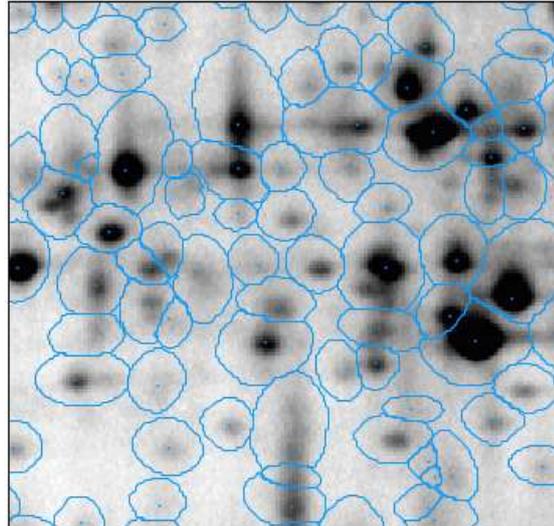
Após a conexão das imagens dos géis, foi realizado o alinhamento de cada par (ligação) de imagens formado, para que as distorções existentes nos diferentes géis fossem corrigidas. Foi feito o alinhamento de vinte e três pares, já que havia quatro géis de cada uma das seis variedades de mandioca. Cada par de géis foi sobreposto automaticamente pelo programa, sendo atribuídas cores distintas ao conjunto de *spots* de cada um dos géis. O alinhamento foi feito através da criação de vetores, os quais conectaram *spots* correspondentes entre os géis (**Figura 2**).



**Figura 2** - Imagem parcial de gel 2-D contendo vetores conectando *spots* correspondentes, antes do alinhamento (imagem à esquerda) e após o alinhamento (imagem à direita) (MANUAL *Delta2D*, 2011, com modificações).

Após todos os pares de imagens formados terem sido alinhados, foi criada a *Imagem fusionada*, a qual continha todos os *spots* do experimento (**Figura 3**). A detecção de *spots* foi realizada através de três parâmetros: a) região de fundo local, a qual refere-se ao raio em *pixels* da região utilizada para a determinação do fundo local na etapa de quantificação, controlando, portanto, o cálculo dos valores de fundo das imagens (Valor utilizado: 32 *pixels*); b) tamanho médio do *spot*, o qual se refere ao raio de um *spot* médio em *pixels*, o que auxilia na separação dos *spots* muito próximos, distingue os *spots* do fundo de imagem e facilita a detecção de *spots* muito pequenos (Valor utilizado: 10 *pixels*); e c) sensibilidade, que auxilia na discriminação entre *spots* e pequenos sinais de imagem, ajudando a detectar *spots* muito fracos (Valor utilizado: 20%).

Não sendo todos os *spots* considerados verdadeiros, já que pequenas manchas e algumas estrias foram detectadas como *spots* erroneamente, fez-se uma revisão, observando-se *spot* por *spot*. Aqueles pouco definidos e resolvidos e os falsos foram excluídos. Simultaneamente, foi verificado se o programa deixou de detectar algum *spot*, ou então se havia dois ou mais contados como único, e que, portanto, deveria ser dividido. Para esta revisão, não só a *Imagem fusionada* foi observada, mas todas as imagens originais importadas para o programa, chegando-se a um consenso. Quando algum *spot* foi excluído, adicionado ou dividido na *Imagem fusionada*, estas mudanças foram transportadas para todas as imagens de géis originais.



**Figura 3** - Imagem parcial de gel 2-D contendo as delimitações (em azul) para cada *spot* detectado pelo programa *Delta2D 4.2* (MANUAL *Delta2D*, 2011).

Após exclusões, divisões e adições, restaram somente os *spots* válidos, permitindo que o programa realizasse a quantificação destes, a qual foi dada em volume, que é a soma dos valores dos *pixels* de cada *spot*, incluindo a subtração do fundo (*background*) das imagens. Para a quantificação dos *spots*, as curvas de calibração foram adaptadas. A curva de calibração é descrita por um conjunto de pontos de amostragem, onde  $x$  é o valor do *pixel* encontrado no arquivo de imagem, e  $y$  a intensidade medida. Entre os pontos de amostragem, a calibração é definida como uma interpolação linear.

Posteriormente, os *spots* foram normalizados de acordo com a seguinte fórmula:

$$\%V(\text{spot } X \text{ da amostra } A) = \text{rel } V(\text{spot } X \text{ da amostra } A),$$

onde  $\%V$  é o volume normalizado,  $V$  é o volume absoluto do *spot* e  $\text{rel } V$  é o valor de  $V$  dividido pelo volume absoluto acumulado de todos os *spots* existentes na mesma imagem pertencente ao *spot* analisado.

Após o passo de ‘Detecção e quantificação de *spots*’, realizou-se a quarta e última etapa: ‘Análise dos perfis de expressão’. Assim, aplicou-se aos *spots* válidos a Análise de Variância simples (*One-way ANOVA*,  $p < 0,05$  e  $p < 0,01$ ), comparando-se as variedades par a par. Após análise dos resultados, decidiu-se aplicar a ANOVA ( $p < 0,01$ ), na qual foram obtidos os *spots* com significativa variação de abundância. Fez-se uma última revisão, observando-se *spot* por *spot*, assim, alguns foram considerados ambíguos, incoerentes entre as

variedades de mandioca e, portanto, excluídos. Após a exclusão, restaram os *spots* de interesse e, assim, com os resultados referentes às suas intensidades (volumes normalizados), foram realizados a Análise de Componentes Principais (ACP) e o *Heat Map* com *Hierarchical Clustering*, obtido utilizando-se a distância euclidiana. Para estas análises, a padronização dos dados foi realizada automaticamente, para que as variáveis passassem a ter média zero e variância unitária.

### **3.2.12 Métodos estatísticos multivariados**

Além dos dados referentes às intensidades dos *spots* de interesse serem submetidos à Análise Multivariada por meio do método Análise de Componentes Principais (ACP) com o auxílio do programa *Delta 2D*, também foram submetidos à mesma análise pelos programas XLSTAT-MX (XLSTAT) e SAS 9.3 (SAS), para comparação de resultados. Objetivando-se a melhor visualização dos resultados, foi realizada a ACP BILOT (coordenadas referentes às amostras e *spots* em um mesmo gráfico) através do programa XLSTAT-MX. O mesmo resultado também foi submetido à Análise Multivariada por meio da Análise de Agrupamentos pelo método de Ward (Mínima Variância) com o auxílio do SAS 9.3.

Em ambos os programas foram utilizadas a matriz de correlação e a padronização dos dados foi realizada automaticamente.

### **3.2.13 Excisão dos *spots* de interesse**

Para a excisão dos *spots* de interesse foram confeccionados géis preparativos em duplicata, para cada uma das variedades: Vassourinha Paulista, Cigana Preta, IAC 12, IAC 576-70, IAC 90 e IAC 06-01. Cada um dos *spots* foi coletado apenas da variedade onde se apresentou com maior intensidade, a fim de se obter maior quantidade de proteínas para a etapa do sequenciamento. Como foram confeccionados dois géis de cada uma das seis amostras, os *spots* foram coletados em duplicata. Para isto, os géis foram posicionados sobre um

transiluminador e a excisão foi realizada com o auxílio de ponteiros de 1 mL, cortadas com a ajuda de uma lâmina de bisturi em diversos diâmetros de acordo com os tamanhos dos *spots*, simulando uma punção. No caso de *spots* não arredondados, utilizou-se lâmina de bisturi diretamente. Cada *spot* coletado dos géis foi transferido para microtubo de 1,5 mL e armazenado a 4 °C. Após todos os *spots* serem coletados, foram mantidos a -80 °C para procedimentos posteriores (digestão, purificação e identificação das proteínas por espectrometria de massas). Cada duplicata de *spots* foi reunida em um mesmo microtubo.

### 3.2.14 Digestão com tripsina

A digestão das proteínas contidas nos *spots* de gel foi realizada com base no protocolo descrito por Shevchenko et al. (2007), com modificações. As vidrarias utilizadas foram enxaguadas previamente com metanol para remoção de detergentes e toda a manipulação foi feita com luvas de nitrila, para que não houvesse contaminação da amostra por outras proteínas. Para evitar contaminação por polímeros, foram utilizadas ponteiros e microtubos novos e não siliconizados.

Primeiramente, os *spots* isolados foram descongelados e fragmentados sobre placa de *Petri* de vidro com o auxílio de lâmina de bisturi, em partes de aproximadamente 1 mm<sup>3</sup>, e transferidos para microtubos de centrífuga (1,5 mL) com a assistência de pipeta *Pasteur* de vidro e água desionizada. Em seguida, os fragmentos de gel foram lavados três vezes ou mais até completa remoção do corante, com aproximadamente 200 µL/*spot* de solução de descoloração (50% acetonitrila e 25 mM bicarbonato de amônio). Logo após, a mistura foi agitada em vortex, sendo que a cada lavagem houve intervalo de 5 a 10 min. A solução de descoloração foi removida através de uma pipeta *Pasteur* de vidro e os fragmentos de gel foram desidratados com 100% acetonitrila (aproximadamente 200 µL/*spot*) por 10 min. Em seguida, a mistura foi centrifugada a 15.000 x g à temperatura ambiente até completa volatilização da acetonitrila. A etapa de desidratação foi repetida e, ao final, a acetonitrila restante foi evaporada à

temperatura ambiente em capela de exaustão por 15 a 20 min. Na sequência, partiu-se para a etapa de redução, sendo os fragmentos de gel reidratados pela adição de aproximadamente 40  $\mu\text{L}/\text{spot}$  de solução de redução (20 mM DTT e 50 mM bicarbonato de amônio) e, após, mantidos a 56 °C por 40 min. Em seguida, os fragmentos foram centrifugados a 15.000 x g à temperatura ambiente por 15 a 20 min, para a remoção completa da solução de redução.

Para a etapa de alquilação, foram adicionados aos fragmentos aproximadamente 40  $\mu\text{L}/\text{spot}$  de solução de alquilação (55 mM IAA e 50 mM bicarbonato de amônio), cobrindo-os totalmente. Em seguida, as amostras foram incubadas ao abrigo da luz e à temperatura ambiente por 30 min. Após, os fragmentos foram centrifugados a 15.000 x g à temperatura ambiente por 15 a 20 min e o sobrenadante foi descartado. Assim, adicionaram-se aos fragmentos aproximadamente 200  $\mu\text{L}/\text{spot}$  de 25 mM bicarbonato de amônio (solução de lavagem), sendo a mistura agitada em vortex. A solução de lavagem foi removida com pipeta *Pasteur*, e em seguida repetiu-se por mais duas vezes a etapa de desidratação, sendo que ao final o resíduo restante foi seco à temperatura ambiente em capela de exaustão por 15 a 20 min. Neste ponto, as amostras foram mantidas a -20 °C até que se prosseguisse com a digestão.

Para a etapa de digestão, alíquotas de solução de tripsina (100 ng/ $\mu\text{L}$ ) (Promega) foram adicionadas de 50 mM bicarbonato de amônio a 4 °C, sendo que ao final obteve-se uma solução de concentração 20 ng/ $\mu\text{L}$  de enzima. Em seguida, aos fragmentos de gel desidratados e descongelados foram adicionados pelo menos de 15  $\mu\text{L}$  (quantidade suficiente para cobri-los) de solução de tripsina (20 ng/ $\mu\text{L}$ ). Após 15 min a 4 °C para que a tripsina penetrasse nos fragmentos, foram adicionados 50 mM de bicarbonato de amônio até cobertura completa da amostra (aproximadamente 40  $\mu\text{L}$ ), sendo feita incubação por 14 h a 37 °C.

Para a etapa de eluição dos peptídeos, a ação da tripsina foi interrompida por adição de 15  $\mu\text{L}$  de solução bloqueadora (5% ácido fórmico e 60% acetonitrila). O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo e, em seguida, foi adicionado aos fragmentos de gel remanescentes volume de solução de eluição I (1% ácido fórmico e 60% metanol) suficiente para cobri-los (aproximadamente 40  $\mu\text{L}$ ). Assim, os fragmentos foram incubados por 15 min a 40 °C (com agitação em vortex a cada 5 min) e, após, o sobrenadante foi recuperado para o mesmo microtubo contendo o sobrenadante da digestão e a

solução bloqueadora. Este passo foi repetido e novamente o sobrenadante foi recolhido.

A seguir, adicionou-se volume suficiente (aproximadamente 40  $\mu\text{L}$ ) de solução de eluição II (1% ácido fórmico e 50% acetonitrila) para cobrir os fragmentos de gel e os mesmos passos seguidos para a etapa da eluição I foram realizados, recolhendo-se os sobrenadantes para o mesmo microtubo contendo a eluição I. Para a eluição III, foram adicionados sobre os fragmentos de gel aproximadamente 40  $\mu\text{L}$  (volume suficiente para cobri-los) de acetonitrila 100%, sendo a amostra agitada em vortex até completa desidratação do gel, indicada pelo fato de que os fragmentos se soltaram da parede do microtubo. O sobrenadante foi recuperado e transferido para o mesmo microtubo contendo os sobrenadantes das eluições I e II. A solução final, contendo os peptídeos eluídos do gel, foi concentrada em concentrador à vácuo *CentriVap* (LABCONCO) à temperatura ambiente até 1  $\mu\text{L}$ . As amostras foram armazenadas a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  até a realização da etapa de purificação.

### **3.2.15 Purificação dos extratos contendo os peptídeos obtidos através da digestão**

A purificação dos extratos contendo os peptídeos foi baseada no protocolo descrito no MANUAL DO USUÁRIO DO 'REVERSED-PHASE ZIPTIP®', 2007, com modificações. Foi utilizado o *ZipTipC<sub>18</sub>, P-10* (Millipore), o qual é uma ponteira de 10 mL contendo uma coluna de purificação em sua extremidade. É importante salientar que os mesmos cuidados da etapa de digestão, relativos à contaminação, foram seguidos.

Primeiramente, as amostras contendo os peptídeos, armazenadas a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  foram homogeneizadas em vortex a temperatura ambiente. Em seguida, para o preparo das amostras, adicionaram-se às mesmas 10  $\mu\text{L}$  de solução contendo 0,1% ácido trifluoroacético (TFA), obtendo-se pH menor que 4,0. O equilíbrio do *ZipTipC<sub>18</sub>, P-10*, foi realizado em três etapas. Para a etapa I de equilíbrio, ajustou-se o *ZipTip* em um pipetador (10  $\mu\text{L}$ ) e aspiraram-se 10  $\mu\text{L}$  de solução de 0,1% TFA e 99,9% de acetonitrila, descartando-a. Para a etapa II de equilíbrio do

*ZipTip*, aspiraram-se 10  $\mu\text{L}$  de solução contendo 0,1% TFA e 50% acetonitrila, descartando-a. Após, para a etapa III, 10  $\mu\text{L}$  de solução contendo 0,1% TFA foram aspirados e descartados. Em seguida, partiu-se para a etapa de ligação da amostra à coluna. Para isto, 10  $\mu\text{L}$  da amostra de peptídeos preparada inicialmente foram repipetados de sete a dez vezes, garantindo a fixação da mesma à coluna. Para a lavagem, 10  $\mu\text{L}$  de solução contendo 0,1% TFA e 5% metanol foram repipetados por três vezes. Para a eluição dos peptídeos, repipetaram-se em um *Total Recovery vial* de 1mL (Waters) 10  $\mu\text{L}$  de solução de 0,1% TFA e 50% acetonitrila por sete a dez vezes. Após, a solução foi totalmente seca em concentrador à vácuo *CentriVap*, e os peptídeos foram armazenados a -80 °C até a etapa de sequenciamento.

### **3.2.16 Sequenciamento dos peptídeos por espectrometria de massas**

Os peptídeos foram sequenciados por espectrometria de massas no Laboratório Max Feffer de Genética de Plantas, localizado no Departamento de Genética da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ) da Universidade de São Paulo, em Piracicaba – SP.

Os peptídeos de cada *vial* foram ressuspensos em 2  $\mu\text{L}$  de solução de acetonitrila 50%, sendo aplicados na placa apenas 1  $\mu\text{L}$  desta solução juntamente a 1  $\mu\text{L}$  da matriz ácido  $\alpha$ -cyano-4-hidroxicinâmico, para posterior avaliação no espectrômetro de massas MALDI TOF/TOF™ 5800 (AB Sciex). O modo de análise utilizado foi o refletor positivo, sendo que nos modos MS e MS/MS foram utilizados 400 Hz e 1.000 Hz, respectivamente. A voltagem da fonte de ionização foi de 3.400 kV para o modo MS e 4.700 kV para o MS/MS, sendo aplicados 1.000 *shots/spectrum* no primeiro modo, e 2.500 *shots/spectrum* no segundo. A análise foi realizada no modo automático e a calibração foi feita com o padrão interno CAL Mix 1 (AB Sciex). Como método para o experimento de MS/MS, foi utilizado o CID (*Collision Induced Dissociation*). Utilizou-se o AB Sciex MALDI TOF/TOF series Explorer version 4.1.0 para a obtenção dos resultados da espectrometria de massas, e para a realização das análises dos conjuntos de dados foram utilizados os programas *Protein Pilot 4.0* e o MASCOT

([www.matrixscience.com](http://www.matrixscience.com)). As sequências de peptídeos obtidas foram comparadas com o banco de dados de *Manihot esculenta* (cassava) depositado no *Phytozome v9.1* ([www.phytozome.net/cassava.php](http://www.phytozome.net/cassava.php)), o qual contém 34.151 sequências e 13.303.981 resíduos. Para o projeto de sequenciamento do genoma da mandioca, foi utilizada a cultivar parcialmente inata, AM560-2, desenvolvida pelo *International Center for Tropical Agriculture* (CIAT), localizado na Colômbia, sendo que 69% do genoma previsto para esta planta foram sequenciados e o restante do sequenciamento encontra-se em andamento (PROCHNIK et al., 2012).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Caracterização das amostras

As variedades de mandioca utilizadas neste trabalho foram selecionadas com o objetivo de se cobrir certa diversidade em relação à distribuição pelo Brasil e às características agronômicas, físico-químicas, nutricionais, entre outras. Desta maneira, obtiveram-se amostras de mesa e/ou indústria, bastante distintas, esperando-se que o perfil de proteínas destas refletisse suas características fenotípicas. Na **Tabela 1**, encontram-se algumas das informações referentes às variedades de mandioca estudadas: Vassourinha Paulista, Cigana Preta, IAC 12, Caapora, Olho Junto, IAC 576-70, IAC 13, IAC 15, IAC 90 e IAC 06-01.

As cultivares Vassourinha Paulista e Cigana Preta são as mais antigas entre elas, ambas são suscetíveis à bacteriose e autóctones, sendo a cultivar Cigana, nativa da Bahia (informação pessoal de VALLE)<sup>1</sup>, e a Vassourinha, nativa de São Paulo (EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA, 2003). São destinadas à fabricação de farinha, sendo a Vassourinha também utilizada como mandioca de mesa.

A IAC 12 é a primeira cultivar não autóctone (INSTITUTO AGRONÔMICO, 2013), muito cultivada em todo o Cerrado brasileiro, sendo utilizada na indústria para a fabricação de fécula. A IAC 90 é destinada à indústria para a fabricação de farinha e fécula, possui película clara e é amplamente cultivada em São Paulo, Paraná e Mato Grosso do Sul.

As variedades IAC 576-70 e IAC 06-01 são exclusivamente de mesa, possuindo polpa creme/amarela devido ao seu alto teor de carotenoides. Ambas são resistentes à bacteriose e medianamente resistentes ao superalongamento, algumas das doenças mais importantes da cultura de mandioca (EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA, 2003). A IAC 576-70 (Amarelinha) é aproximadamente 100% da mandioca de mesa comercializada em São Paulo, já a IAC 06-01, é a mais nova entre as variedades e ainda não foi

---

<sup>1</sup> VALLE T. L. **Projeto mandioca**. Mensagem recebida por teresalv@iac.sp.gov.br em 18 ago. 2013

**Tabela 1** - Características agrônômicas, físico-químicas, nutricionais e distribuição de algumas variedades de mandioca.

Característica	Variedade									
	Vassourinha Paulista	Cigana Preta	IAC 12	Caapora	Olho Junto	IAC 576-70	IAC 13	IAC 15	IAC 90	IAC 06-01
<b>Finalidade</b>	Mesa/ Indústria	Indústria	Indústria	Indústria	Indústria	Mesa	Indústria	Indústria	Indústria	Mesa
<b>Ano de lançamento</b>	(1)	(1)	1963	1976	1980	1984	1996	2000	2000	(2)
<b>Cor da película</b>	Escura	Escura	Escura	Clara	Escura	Escura	Clara	Clara	Clara	Escura
<b>Cor da polpa</b>	Branca	Branca	Branca	Branca	Branca	Creme (crua)/ Amarela (cozida)	Branca	Branca	Branca	Creme (crua)/ Amarela (cozida)
<b>Teor de carotenoides</b>	±20 mg/kg	±20 mg/kg	±20 mg/kg	±20 mg/kg	±20 mg/kg	400 mg/kg	±20 mg/kg	±20 mg/kg	±20 mg/kg	1.200 mg/kg
<b>Potencial cianogênico</b>	Baixo	nd	Baixo	Alto	Alto	Baixo	Baixo	Baixo	Baixo	Baixo
<b>Suscetibilidade à bacteriose</b>	Suscetível	Suscetível	Resistente	Resistente	Suscetível	Resistente	Medianamente Resistente	Resistente	Resistente	Resistente
<b>Resistência ao superalongamento</b>	nd	nd	nd	Medianamente resistente	nd	Medianamente resistente	Altamente Suscetível	Resistente	Medianamente resistente	Medianamente resistente
<b>Uso ou aplicação</b>	Farinha e mesa	Farinha	Fécula	Farinha e fécula	Farinha e fécula	Mesa	Farinha e Fécula	Farinha e fécula	Farinha e fécula	Mesa
<b>Distribuição</b>	Muito cultivada até 1940 em SP. Ainda cultivada em pequenas áreas.	Cultivada no Recôncavo Baiano (BA).	Muito cultivada em todo o Cerrado brasileiro.	Cultivada em SP.	Cultivada no PR.	±100% da mandioca de mesa comercializada em SP.	Cultivada em SP em áreas não sujeitas ao superalongamento.	Cultivada em SP para farinha de alta qualidade.	Amplamente cultivada em SP, PR e MS.	Plantada em áreas do estado de SP para realização de testes.

(1): Muito antiga, sem data conhecida; (2): Em fase de pesquisa (Ainda não lançada no mercado); nd: Informação não disponível

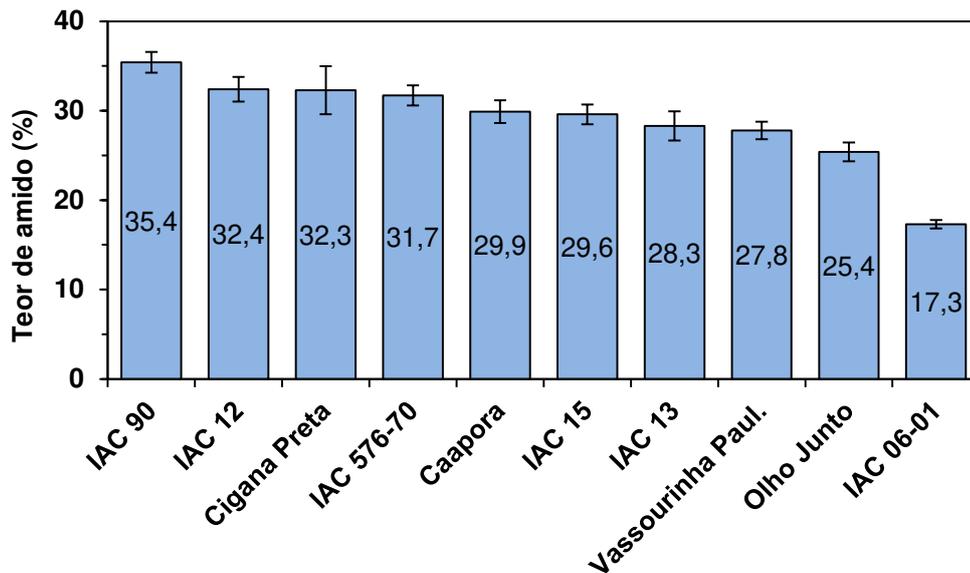
lançada no mercado, sendo plantada em áreas do estado de São Paulo para a realização de testes, possuindo teor de carotenoides três vezes mais que o da Amarelinha.

#### **4.1.1 Determinação dos teores de amido e açúcares solúveis**

Sendo as raízes tuberosas de mandioca importantes fontes de energia devido ao alto teor de amido (fécula) e sendo este, de amplo uso industrial, decidiu-se realizar a extração e determinação de amido das variedades em estudo. Foi realizada também a determinação do teor de açúcares, já que esta é uma característica importante para as mandiocas de mesa, também chamadas de mansas ou doces.

A determinação dos teores de amido foi realizada para dez variedades: Vassourinha Paulista, Cigana Preta, IAC 12, Caapora, Olho Junto, IAC 576-70, IAC 13, IAC 15, IAC 90 e IAC 06-01. Na **Figura 4** estão os teores de amido das diferentes amostras, indicando que apesar da cultivar IAC 90 ter apresentado o maior teor de amido (35,4%), estes valores foram bastante semelhantes entre as amostras analisadas, com exceção da variedade IAC 06-01, que apresentou teor de amido bastante inferior às demais (17,3%). Não houve correlação entre os teores de amido e a finalidade das variedades (mesa ou indústria).

As cultivares IAC 90, IAC 12, Caapora, IAC 15, IAC 13 e Olho Junto são destinadas à indústria para a produção de fécula, porém é importante salientar que apesar da quantidade de amido existente em determinada variedade estar altamente correlacionada com o seu potencial industrial para a produção de fécula, algumas outras características são importantes, tais como: o grau de facilidade de extração do amido, a cor da polpa e do córtex, a espessura da película e das raízes e a ausência de cintas.



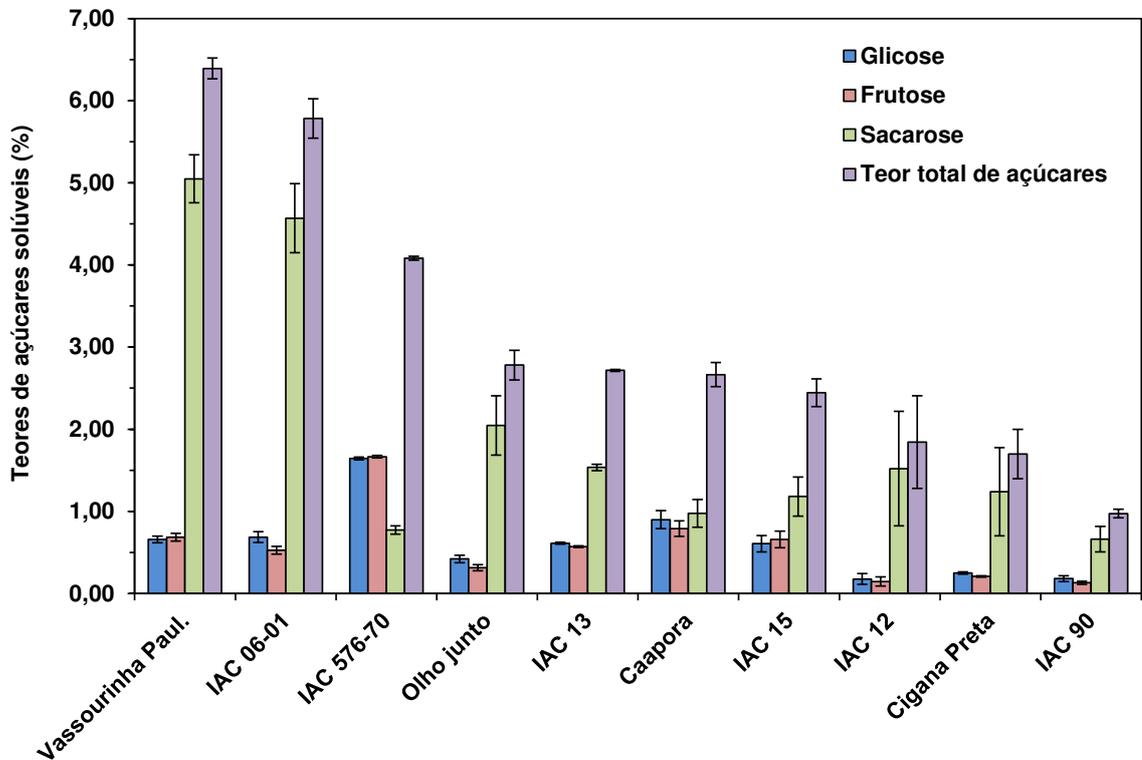
**Figura 4** - Teores de amido das variedades de mandioca Vassourinha Paulista, Cigana Preta, IAC 12, Caapora, Olho Junto, IAC 576-70, IAC 13, IAC 15, IAC 90 e IAC 06-01. Os valores estão expressos em base úmida e as barras de erro correspondem ao desvio padrão.

A determinação dos teores de açúcares solúveis também foi realizada com essas dez variedades de mandioca. A **Figura 5** mostra os resultados, indicando que dentre os açúcares solúveis, glicose, frutose e sacarose, a sacarose é a mais abundante entre as variedades estudadas, com exceção da variedade IAC 576-70, que apresenta glicose e frutose como açúcares predominantes.

Como se pode observar na **Figura 5**, a maior quantidade de açúcares totais foi encontrada na cultivar Vassourinha Paulista (6,48%), já a menor quantidade foi encontrada na IAC 90 (1,03%), que possuiu um maior teor de amido (**Figura 4**). Como seria de se esperar, os maiores teores de açúcares totais foram encontrados nas variedades utilizadas para consumo de mesa (mais doces): Vassourinha Paulista, IAC 06-01 (5,90%) e IAC 576-70 (4,11%), enquanto os menores teores foram encontrados nas cultivares utilizadas exclusivamente na indústria.

O fato das mandiocas exclusivamente de indústria possuírem baixo teor de açúcares pode ser considerado uma vantagem, explicada por estas serem destinadas à fabricação de farinha e/ou fécula, as quais não devem ser adocicadas, já que gerariam pouca aceitação pelos consumidores. Além disso,

quanto menor o teor de açúcares, menor a massa lixiviada, portanto, maior o rendimento de amido e, por consequência, maior renda gerada pela indústria.



**Figura 5** - Teores de açúcares solúveis (glicose, frutose e sacarose) das dez variedades de mandioca: Vassourinha Paulista, Cigana Preta, IAC 12, Caapora, Olho Junto, IAC 576-70, IAC 13, IAC 15, IAC 90 e IAC 06-01. Os valores estão expressos em base úmida e as barras de erro correspondem ao desvio padrão.

## 4.2 Extração de proteínas e eletroforese em condições desnaturantes (SDS-PAGE)

### 4.2.1 Otimização da extração de proteínas e avaliação da qualidade dos extratos proteicos

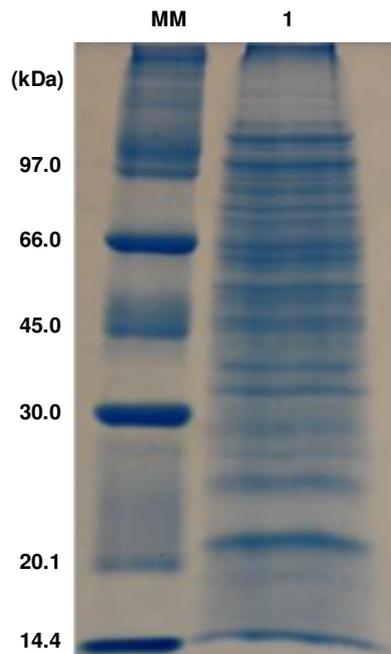
Esta etapa do trabalho foi referente à otimização da extração de proteínas e avaliação da qualidade dos extratos proteicos das diversas variedades, com o propósito de avaliar preliminarmente os perfis de proteínas dos extratos,

analisando se estes apresentavam qualidade suficiente para a continuação das análises.

Primeiramente, realizou-se a extração de proteínas utilizando-se uma variedade de mandioca não identificada, a qual também foi fornecida pelo IAC. De acordo com a **Tabela 2**, a concentração de proteínas referente a esta amostra foi de 1,176  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , sendo que seu rendimento (quantidade de proteína total extraída/quantidade de raiz pesada) foi de 1,175 mg/g. Após estes resultados, decidiu-se avaliar a qualidade do extrato proteico realizando-se a eletroforese em condições desnaturantes (SDS-PAGE), onde foram aplicados 30  $\mu\text{g}$  de proteínas referentes a esta amostra (**Figura 6**). Após corar o gel com Azul de Coomassie coloidal, observaram-se bandas bem definidas, visíveis por toda extensão do gel, mostrando a extração de proteínas de diversos tamanhos. Não foram observadas estrias verticais indesejáveis, que poderiam ser indicadoras de contaminação da amostra. Portanto, o extrato obtido mostrou-se adequado para as análises posteriores, apresentando bom perfil de proteínas.

**Tabela 2** - Concentração de proteína e rendimento (em ordem decrescente) referentes à mandioca não identificada e às primeiras extrações de proteínas das dez variedades.

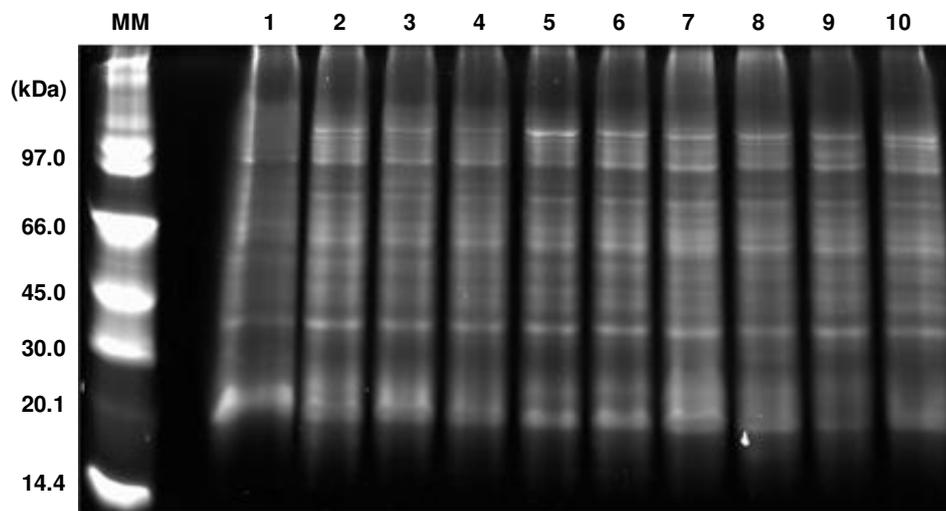
<b>Variedade</b>	<b>Concentração de proteínas (<math>\mu\text{g}/\mu\text{L}</math>)</b>	<b>Rendimento (mg/g)</b>
Vassourinha Paulista	1,288	1,198
Olho junto	1,232	1,191
Não identificada	1,176	1,175
Cigana Preta	1,006	1,005
IAC 90	1,006	0,980
IAC 12	0,892	0,857
IAC 15	0,816	0,811
Caapora	0,840	0,808
IAC 576-70	0,785	0,759
IAC 13	0,700	0,686
IAC 06-01	0,479	0,450
<b>Média</b>	<b>0,929</b>	<b>0,901</b>



**Figura 6** - Eletroforese SDS-PAGE referente à aplicação de 30  $\mu\text{g}$  de proteínas extraídas da variedade de mandioca não identificada (1). Os números à esquerda correspondem ao padrão de massa molecular *LMW calibration kit for SDS electrophoresis* (MM), sendo que seus marcadores estão expressos em kDa. O minigel foi corado com Azul de Coomassie coloidal.

Uma vez que as condições encontradas para a separação das proteínas, observadas a partir da amostra não identificada, foram satisfatórias, passou-se à outra etapa, analisando-se as demais amostras. Desta maneira, seguiu-se para a extração de proteínas das variedades Vassourinha Paulista, Cigana Preta, IAC 12, Caapora, Olho Junto, IAC 576-70, IAC 13, IAC 15, IAC 90 e IAC 06-01. Observa-se na **Tabela 2** que as concentrações de proteína em  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  foram similares entre as variedades, com exceção da IAC 06-01 (concentração de proteínas = 0,479  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ), a qual teve concentração muito menor em relação às outras amostras. Os rendimentos também foram calculados, mostrando resultados próximos, com exceção novamente da variedade IAC 06-01 (rendimento = 0,450 mg/g). Além do menor rendimento em relação às proteínas, esta amostra foi a que apresentou menor teor de amido entre as dez variedades (**Figura 4**). Assim, o rendimento médio encontrado, incluindo a variedade não identificada, foi de 0,901 mg de proteínas extraídas para cada 1 g de amostra triturada, indicando que quantidades suficientes para a continuidade do trabalho poderiam ser obtidas sem o uso de grandes quantidades de amostras.

Para atestar a qualidade dos extratos proteicos das dez variedades, verificando-se o perfil de separação das proteínas, realizou-se outra SDS-PAGE, na qual foram aplicados 5 µg de proteínas extraídas de cada uma das dez amostras (Vassourinha Paulista, Cigana Preta, IAC 12, Caapora, Olho Junto, IAC 576-70, IAC 13, IAC 15, IAC 90 e IAC 06-01). De acordo com a **Figura 7**, os perfis proteicos das amostras envolvidas são muito semelhantes, não havendo diferenças significativas quanto às principais bandas proteicas e suas respectivas mobilidades. As intensidades das diferentes amostras são similares, confirmando que foram carregadas quantidades iguais (5 µg) de cada uma delas.



**Figura 7** – Eletroforese SDS-PAGE referente à aplicação de 5 µg de proteínas extraídas de cada variedade estudada. Os números à esquerda correspondem ao padrão de massa molecular *LMW calibration kit for SDS electrophoresis* (MM), sendo que seus marcadores estão expressos em kDa. Os números acima correspondem às amostras: 1): IAC 06-01; 2): IAC 13; 3): IAC 576-70; 4): IAC 15; 5): Caapora; 6): IAC 12; 7): IAC 90; 8): Cigana Preta; 9): Olho Junto; 10): Vassourinha Paulista. O gel foi corado com *SYPRO® Ruby* e o tempo de exposição à luz UV em *VersaDoc MP 4000* foi de 90 s.

Após essa avaliação preliminar da extração de proteínas das amostras de raízes de mandioca, decidiu-se pela exclusão das variedades Cigana Preta, Caapora e Olho Junto, devido à escassez de informações importantes referentes a estas cultivares na literatura, tais como: o ano de lançamento, o(s) estado(s) em que são cultivadas, suas origens, finalidades de uso, teores de matéria seca, produtividade, resistência à bacteriose e ao superalongamento, os rendimentos agrônomo e industrial, facilidade de colheita, cores da polpa e película, teor de ácido cianídrico, entre outras.

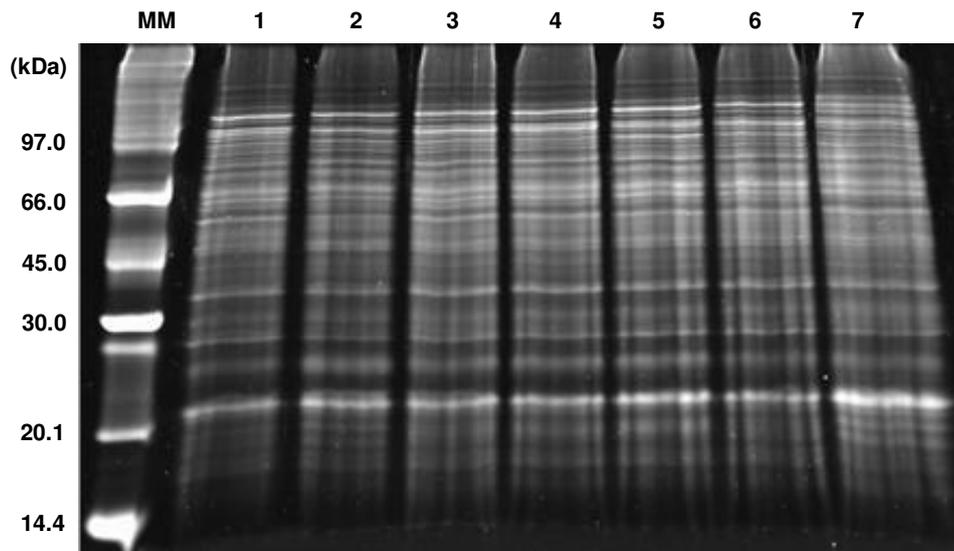
#### 4.2.2 Extração de proteínas e avaliação da qualidade dos extratos proteicos para a técnica 2-D DIGE

Para a confecção dos géis referentes à análise 2-D DIGE, novas extrações de proteínas foram realizadas com o objetivo de se obter quantidade de proteínas suficiente para esta técnica. De acordo com a **Tabela 3**, no geral, os rendimentos de proteínas foram similares entre as amostras, porém, a cultivar Vassourinha foi um pouco discrepante em relação às outras, mostrando rendimento maior (0,956 mg/g). Já a IAC 06-01, novamente apresentou um rendimento muito menor (0,230 mg/g) em relação às outras variedades. Assim, o rendimento médio encontrado foi de 0,550 mg/g, indicando que haveria quantidades suficientes de proteínas para a realização da técnica 2-D DIGE.

**Tabela 3** - Concentração de proteína e rendimento (em ordem decrescente) referentes à extração de proteínas destinada à técnica 2-D DIGE.

<b>Variedade</b>	<b>Concentração de proteínas (µg/µL)</b>	<b>Rendimento (mg/g)</b>
Vassourinha Paulista	0,983	0,956
IAC 90	0,740	0,642
IAC 13	0,646	0,638
IAC 12	0,679	0,589
IAC 576-70	0,482	0,399
IAC 15	0,416	0,399
IAC 06-01	0,215	0,230
<b>Média</b>	<b>0,594</b>	<b>0,550</b>

Para avaliação desses extratos proteicos, realizou-se nova SDS-PAGE. Portanto, em outro gel foram aplicados 3 µg de proteínas extraídas de cada uma das sete variedades (Vassourinha Paulista, IAC 12, IAC 576-70, IAC 13, IAC 15, IAC 90 e IAC 06-01) (**Figura 8**). Na **Figura 8** é possível observar que os extratos mostraram-se promissores para as análises posteriores por 2D-DIGE, já que apresentaram bom perfil de separação de proteínas (Item **4.2.1**).



**Figura 8** - Eletroforese SDS-PAGE referente à aplicação de 3  $\mu\text{g}$  de proteínas extraídas de cada variedade estudada. Os números à esquerda correspondem ao padrão de massa molecular *LMW calibration kit for SDS electrophoresis* (MM), sendo que seus marcadores estão expressos em kDa. Os números acima correspondem às amostras: 1): Vassourinha Paulista; 2): IAC 90; 3): IAC 12; 4): IAC 13; 5): IAC 576-70; 6): IAC 15; 7): IAC 06-01. O gel foi corado com *SYPRO® Ruby* e o tempo de exposição à luz UV em *VersaDoc MP 4000* foi de 120 s.

Apesar de terem sido extraídas proteínas das variedades Vassourinha Paulista, IAC 12, IAC 576-70, IAC 13, IAC 15, IAC 90 e IAC 06-01, a partir deste ponto do trabalho optou-se por excluir as cultivares IAC 13 e IAC 15, pelo fato destas serem pouco cultivadas e a primeira ser aparentada com duas das cultivares utilizadas neste trabalho (Vassourinha Paulista e IAC 12) (INSTITUTO AGRONÔMICO, 2013; Informação pessoal de VALLE<sup>2</sup>). Decidiu-se também, reincluir a variedade Cigana Preta (realizando-se nova extração de proteínas referente a esta cultivar – concentração: 1,147  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  e rendimento: 1,113 mg/g), já que esta é, há bastante tempo, muito cultivada no Recôncavo Baiano (BA) para a fabricação de farinha (informação pessoal de VALLE<sup>2</sup>), fazendo com que mais informações de biodiversidade fossem incluídas no trabalho. Ao final, foram selecionadas para a continuidade do trabalho seis variedades: Vassourinha Paulista, Cigana Preta, IAC 12, IAC 576-70, IAC 90 e IAC 06-01, dentre as dez fornecidas pelo IAC.

<sup>2</sup> VALLE T. L. **Informações variedades de mandioca.** Mensagem recebida por teresalv@iac.sp.gov.br em 16 mar. 2012.

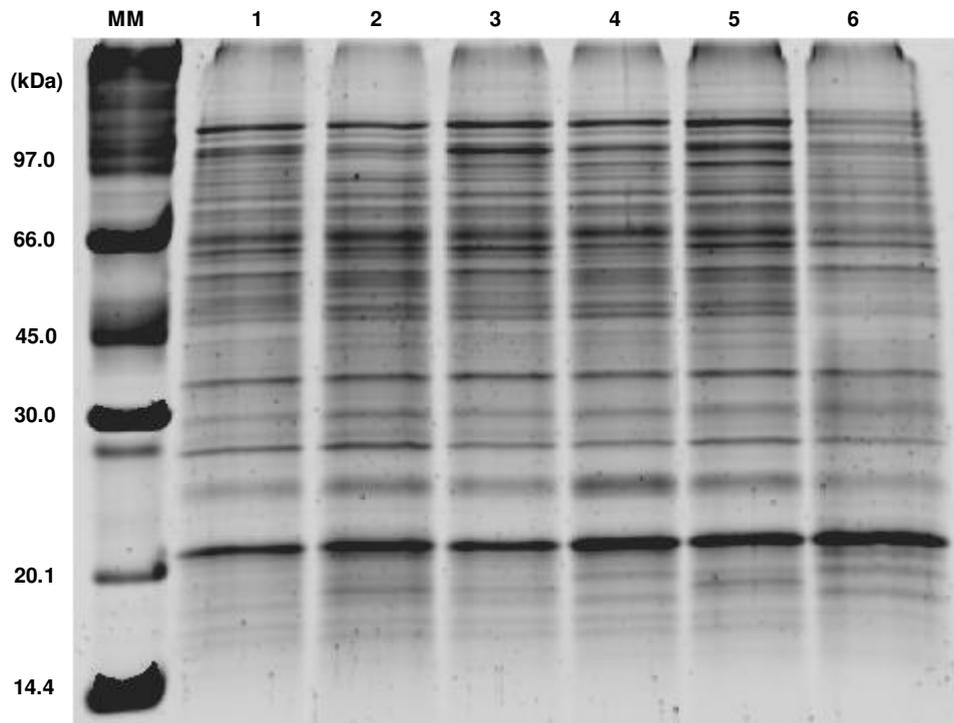
### 4.2.3 Extração de proteínas e avaliação dos extratos proteicos para a realização dos géis analíticos

Após realização da 2-D DIGE, foi feita uma terceira extração (**Tabela 4**) para que houvesse quantidade de proteínas suficiente para a confecção dos géis analíticos. Observa-se na **Tabela 4**, que as cultivares Vassourinha e Cigana apresentaram rendimentos de proteínas superiores em relação às demais (0,957 mg/g e 0,808 mg/g, respectivamente) e que a IAC 06-01 mostrou um rendimento menor (0,464 mg/g), corroborando os dados da **Tabela 3**.

**Tabela 4** - Concentração de proteína e rendimentos (em ordem decrescente) referentes à terceira extração de proteínas, destinada aos géis analíticos.

<b>Variedade</b>	<b>Concentração de proteínas (<math>\mu\text{g}/\mu\text{L}</math>)</b>	<b>Rendimento (mg/g)</b>
Vassourinha Paulista	0,966	0,957
Cigana Preta	0,814	0,808
IAC 12	0,774	0,765
IAC 90	0,647	0,642
IAC 576-70	0,608	0,602
IAC 06-01	0,470	0,464
<b>Média</b>	<b>0,713</b>	<b>0,706</b>

Em seguida, realizou-se nova SDS-PAGE, na qual foram aplicados 3  $\mu\text{g}$  de proteínas extraídas de cada uma das seis variedades (Vassourinha Paulista, Cigana Preta, IAC 12, IAC 576-70, IAC 90 e IAC 06-01) (**Figura 9**). De acordo com a **Figura 9**, os extratos mostraram-se adequados para as análises posteriores por 2D-PAGE.



**Figura 9** - Eletroforese SDS-PAGE referente à aplicação de 3  $\mu\text{g}$  de proteínas extraídas de cada variedade estudada. Os números à esquerda correspondem ao padrão de massa molecular *LMW calibration kit for SDS electrophoresis* (MM), sendo que seus marcadores estão expressos em kDa. Os números acima correspondem às amostras: 1): Vassourinha Paulista; 2): Cigana Preta; 3): IAC 12; 4): IAC 90; 5): IAC 576-70; 6): IAC 06-01. O gel foi corado com *SYPRO® Ruby* e o tempo de exposição à luz UV em *VersaDoc MP 4000* foi de 40 s.

#### 4.2.4 Extração de proteínas e avaliação dos extratos proteicos destinadas aos géis preparativos

Uma quarta extração (**Tabela 5**) foi feita para ser destinada à confecção dos géis preparativos. Na **Tabela 5**, como já visto, é possível observar que as amostras Vassourinha, Cigana e IAC 06-01, apresentaram-se um pouco discrepantes em relação às demais. A média de rendimentos foi de 0,672 mg/g, indicando que os extratos seriam suficientes para esta etapa do trabalho.

**Tabela 5** - Concentração de proteína e rendimento (em ordem decrescente) referentes à quarta extração de proteínas, destinada aos géis preparativos.

<b>Variedade</b>	<b>Concentração de proteínas (µg/µL)</b>	<b>Rendimento (mg/g)</b>
Vassourinha Paulista	1,023	0,972
Cigana Preta	0,966	0,916
IAC 12	0,711	0,673
IAC 90	0,667	0,627
IAC 576-70	0,579	0,545
IAC 06-01	0,320	0,302
<b>Média</b>	<b>0,711</b>	<b>0,672</b>

Concluiu-se, portanto, que o protocolo de extração de proteínas foi adequado, já que foram obtidos quantidades suficientes de proteínas e bons perfis de separação para a realização da eletroforese bidimensional.

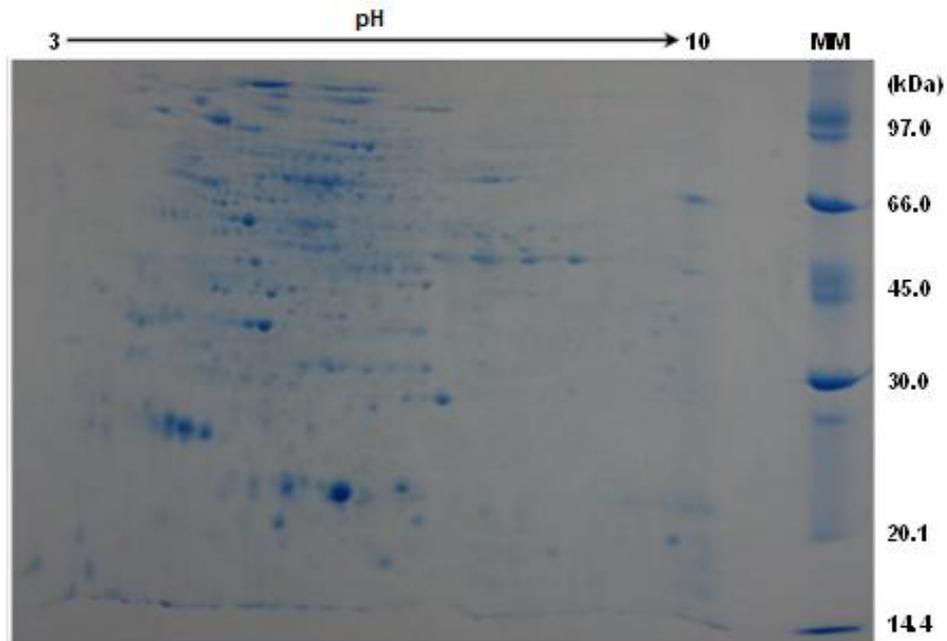
### 4.3 Eletroforese bidimensional

#### 4.3.1 Otimização dos géis bidimensionais

##### 4.3.1.1 Teste de tiras de gradiente de pH imobilizado e corantes

Após extração de proteínas e avaliação da qualidade dos extratos proteicos, resolveu-se testar o perfil após separação bidimensional. Para isto, confeccionou-se um gel 2-D utilizando-se 100 µg de proteínas referentes à variedade não identificada, usando-se a tira de pH 3-10 de 7 cm e o corante Azul de Coomassie coloidal para revelação das proteínas (**Figura 10**). De acordo com a **Figura 10**, o gel não apresentou estrias verticais ou horizontais indesejáveis e os *spots* gerados estavam bem definidos, mostrando a ausência de interferentes que pudessem perturbar a focalização das proteínas ou a separação na segunda dimensão. Em contrapartida, os *spots* apresentaram-se não tão bem distribuídos

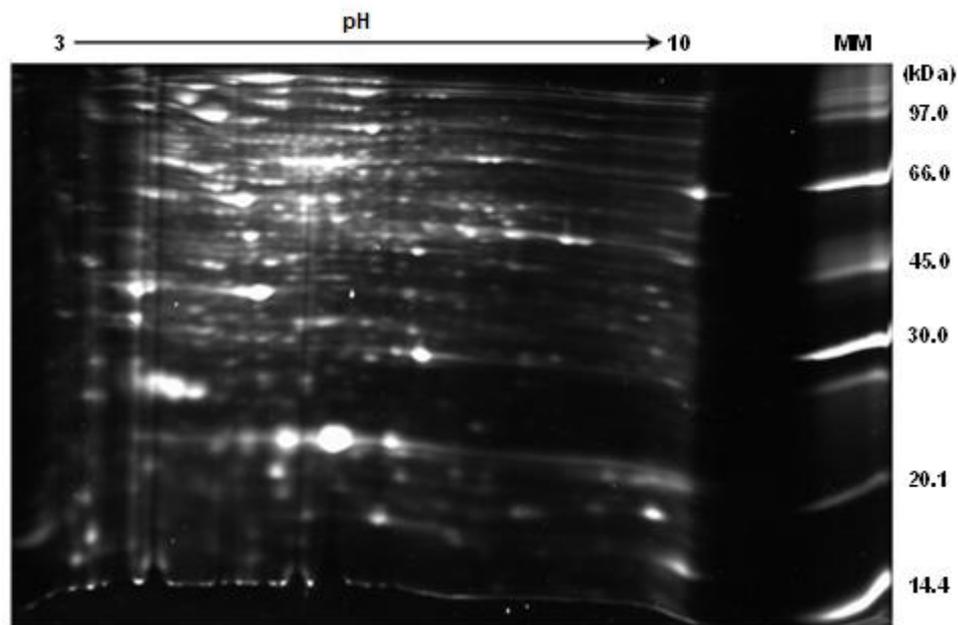
por uma ampla faixa do gel e com baixa resolução, parecendo estar concentrados na faixa de pH intermediária.



**Figura 10** - Minigel 2-D corado com Azul de Coomassie coloidal, referente à aplicação de 100  $\mu\text{g}$  de proteínas extraídas da variedade de mandioca não identificada. Os números acima indicam a que foi utilizada a tira de pH 3-10, 7 cm. Os números à direita correspondem ao padrão de massa molecular *LMW calibration kit for SDS electrophoresis* (MM), sendo que seus marcadores estão expressos em kDa. Foram utilizados 5  $\mu\text{L}$  do padrão.

Além da concentração das proteínas numa faixa de pH, a separação realizada mostrou que uma parcela significativa das proteínas foi muito pouco visível, o que dificultaria bastante a comparação dos perfis de proteínas entre as variedades, principalmente porque diferenças importantes podem não se limitar às proteínas mais abundantes e, por consequência, mais visíveis. Desta maneira, com o objetivo de aprimorar a separação observada no gel anterior, resolveu-se utilizar o corante *SYPRO® Ruby*, que é mais sensível em relação ao Coomassie e, portanto, poderia melhorar a visualização dos *spots*. Para isto, produziu-se outro gel 2-D utilizando-se novamente tiras de pH 3-10, 7 cm e 100  $\mu\text{g}$  de proteínas referentes à variedade não identificada. Como mostra a **Figura 11**, o novo gel apresentou algumas estrias verticais e horizontais indesejáveis. No entanto, os *spots* apresentaram-se bem definidos em sua grande maioria, ainda que não tão bem distribuídos por uma faixa ampla do gel, assim como já fora observado antes. O perfil de separação de proteínas foi similar ao do gel corado

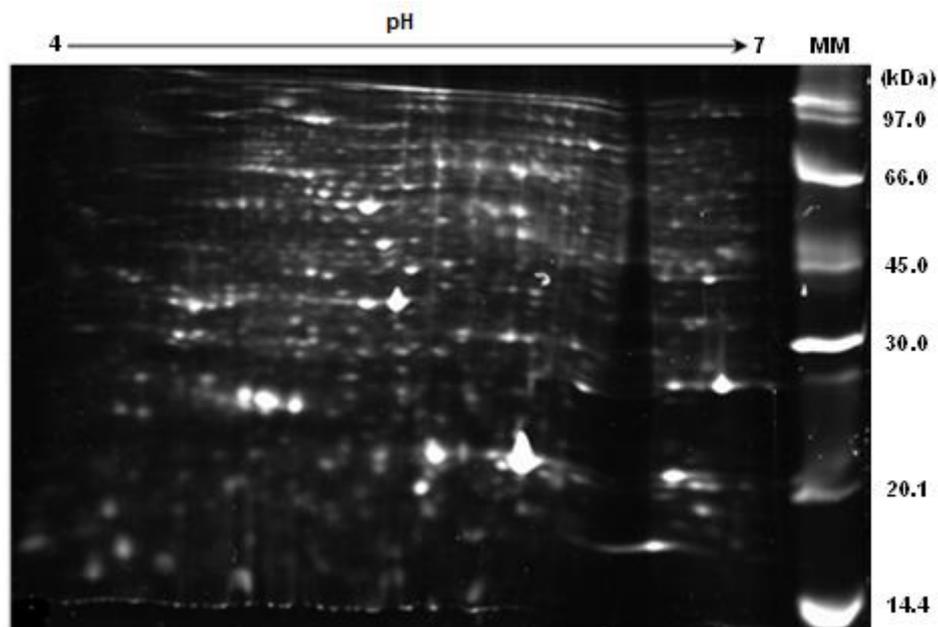
com Coomassie, porém foi possível visualizar um maior número de *spots*, e perceber que estes se apresentaram mais intensamente corados, comprovando a maior sensibilidade do corante *SYPRO® Ruby* em relação ao Azul de Coomassie coloidal.



**Figura 11** - Minigel 2-D corado com *SYPRO® Ruby*, referente à aplicação de 100 µg de proteínas extraídas da variedade de mandioca não identificada. Os números acima indicam que foi utilizada a tira de pH 3-10, 7 cm. Os números à direita correspondem ao padrão de massa molecular *LMW calibration kit for SDS electrophoresis* (MM), sendo que seus marcadores estão expressos em kDa. Foram utilizados 2 µL do padrão. O gel foi exposto à luz UV em *VersaDoc MP 4000* por 90 s.

Como mostrado nas **Figuras 10 e 11**, quando utilizada a tira de pH 3-10, 7 cm, os *spots* apresentaram-se não tão bem distribuídos por uma ampla faixa do gel e muito unidos. Desta maneira, resolveu-se avaliar a separação das proteínas em outra faixa de pH, verificando-se se haveria melhores resultados. Para isto, realizou-se novo teste 2-D novamente utilizando-se 100 µg de proteína da mandioca não identificada e o corante *SYPRO® Ruby*, mas com a tira de pH 4-7, 7 cm (**Figura 12**). Como observado na **Figura 12**, esse gel também apresentou algumas estrias verticais indesejáveis, mas os *spots* apresentaram-se mais bem definidos em sua grande maioria e bem distribuídos ao longo de toda a faixa de pH empregada, quando comparados com os da **Figura 11**. Em contrapartida, observou-se que com o emprego da tira de pH 4-7, alguns *spots* foram perdidos, principalmente na lateral direita do gel, correspondente à zona alcalina do

gradiente de separação. Portanto, concluiu-se que a qualidade de separação de proteínas quando utilizada a tira de pH 4-7 é melhor em relação à separação com a tira de pH 3-10, porém ainda não é ideal, devido a perda de alguns *spots*. Sobre as estrias verticais observadas nesse gel e no anterior, é possível que elas se devam ao excesso de algumas proteínas frente à sensibilidade do corante, permitindo notar o eventual arraste deixado durante a migração.



**Figura 12** - Minigel 2-D corado com *SYPRO® Ruby*, referente à aplicação de 100 µg de proteínas extraídas da variedade de mandioca não identificada. Os números acima indicam que foi utilizada a tira de pH 4-7, 7 cm. Os números à direita correspondem ao padrão de massa molecular *LMW calibration kit for SDS electrophoresis* (MM), sendo que seus marcadores estão expressos em kDa. Foram utilizados 2 µL do padrão. O gel foi exposto à luz UV em *VersaDoc MP 4000* por 120 s.

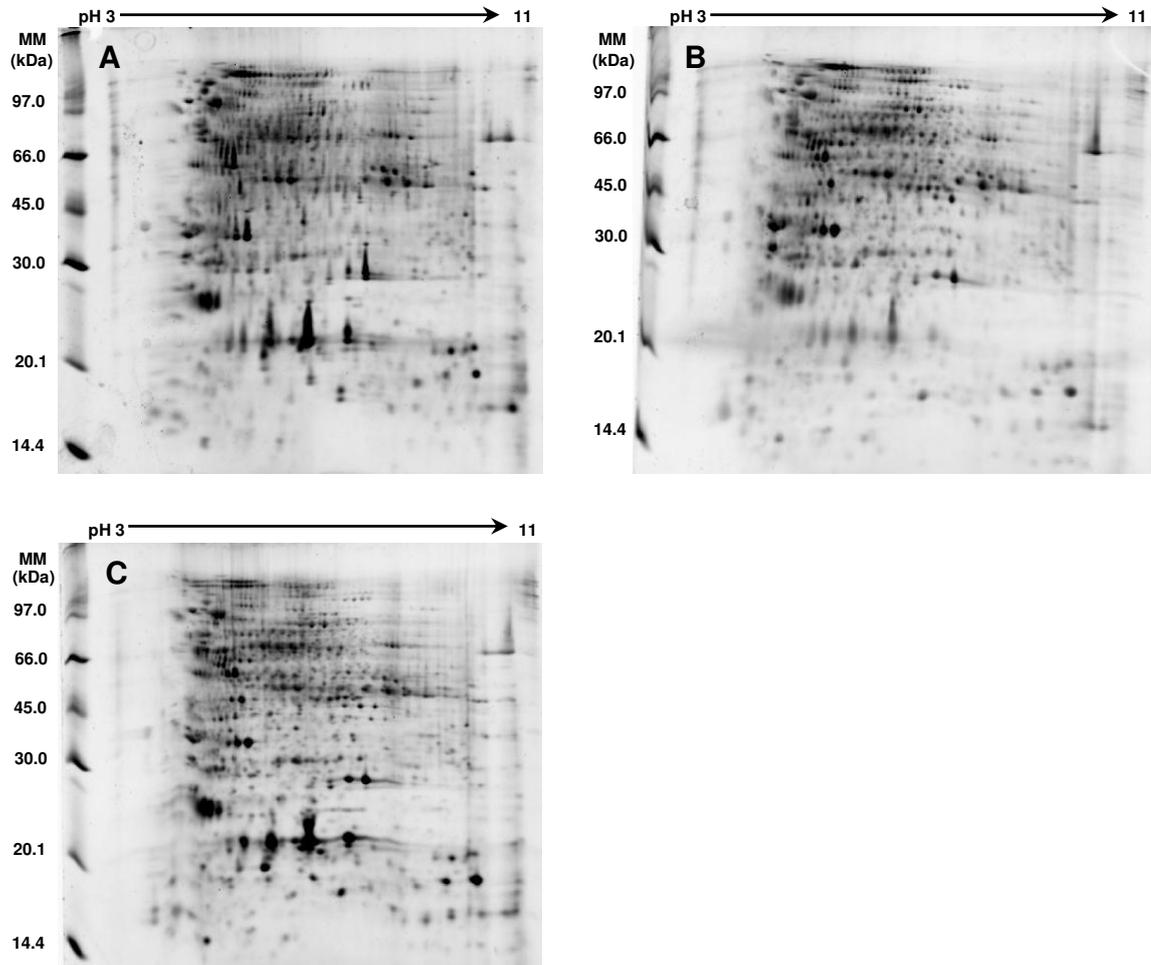
Através de comparação entre as **Figuras 10, 11 e 12**, percebeu-se que quando utilizado o corante *SYPRO® Ruby*, os *spots* apareceram mais bem definidos, e mais intensamente corados em relação ao gel corado com Azul de Coomassie coloidal. Desta forma, decidiu-se por utilizar o *SYPRO® Ruby* nas análises seguintes. Também foi observado que na utilização da tira de pH 3-10, alguns *spots* ficaram com pouca separação, dificultando a visualização individualizada destes. Já com o uso da tira de pH 4-7, alguns *spots* foram perdidos pelo fato da faixa de pH ser mais estreita. Portanto, testou-se a utilização de tiras com faixa de distribuição do pH não linear nas próximas

etapas, como modo de favorecer a visualização dos *spots*. Esse tipo de tira de gradiente de pH apresenta uma distribuição não uniforme do pH, geralmente com a compressão nas extremidades e expansão na faixa intermediária, justamente aquela em que a maioria dos *spots* da mandioca parecem se localizar. Desta forma, optou-se por utilizar tiras de pH 3-11 NL, 11 cm, com o intuito de melhorar a separação dos *spots* na faixa de pH 5-7 e ao mesmo tempo preservar o maior número destes. Assim, foram confeccionados géis 2-D de maiores dimensões através do *Ettan DALTsix Electrophoresis System*.

Para esta etapa foram utilizados os extratos proteicos (**Tabela 2**) de sete variedades (IAC 90, IAC 576-70, IAC 13, IAC 12, IAC 06-01, IAC 15 e Vassourinha Paulista), sendo que, como dito anteriormente, as cultivares Cigana Preta, Caapora e Olho Junto foram excluídas do trabalho devido ao fato de haverem poucas informações descritas na literatura.

A **Figura 13** mostra as imagens referentes aos géis das cultivares Vassourinha Paulista, IAC 12 e IAC 576-70, utilizando-se 150 µg de proteínas de cada cultivar. Observou-se, em geral, que a tira de pH utilizada gerou pouca separação dos *spots* em ambas as laterais do gel (conforme o esperado), dificultando um pouco a visualização individualizada destes, apesar de ter permitido a separação dos *spots* na faixa de pH de 5 a 7. Apesar disso, neste momento do trabalho, acreditou-se que a separação observada nessa faixa não foi substancialmente melhor do que aquela observada com pH 3-10.

O gel referente à mandioca Vassourinha (**Figura 13A**) apresentou a maioria dos *spots* em formato de gota, o que poderia ser um problema decorrente das etapas de reidratação ou de equilíbrio das tiras, ou ainda impurezas e interferentes encontrados no extrato proteico. As estrias verticais encontradas nas laterais direitas dos três géis (**Figuras 13A-C**), segundo Görg (2004), são devidas às microbolhas de ar presentes entre a tira e o gel, as quais surgiram no momento do posicionamento da tira. Nos géis referentes às mandiocas IAC 12 (**Figura 13B**) e IAC 576-70 (**Figura 13C**), os *spots* encontraram-se melhor definidos em relação ao gel referente à Vassourinha (**Figura 13A**).



**Figura 13** - Géis 2-D corados com *SYPRO® Ruby*, referentes à aplicação de 150 µg de proteínas das variedades Vassourinha Paulista, IAC 12 e IAC 576-70. Para todos os géis foram utilizadas tiras de pH 3-11 NL, 11 cm (acima das imagens). À esquerda das imagens, encontram-se os padrões de massa molecular *LMW calibration kit for SDS electrophoresis* (MM), sendo que seus marcadores estão expressos em kDa. Foram utilizados 2 µL do padrão. (A) Amostra referente à mandioca Vassourinha Paulista; gel exposto à luz UV em *VersaDoc MP 4000* por 90 s. (B) Amostra referente à mandioca IAC 12; gel submetido a 60 s de exposição. (C) Amostra referente à mandioca IAC 576-70; gel submetido a 60 s de exposição.

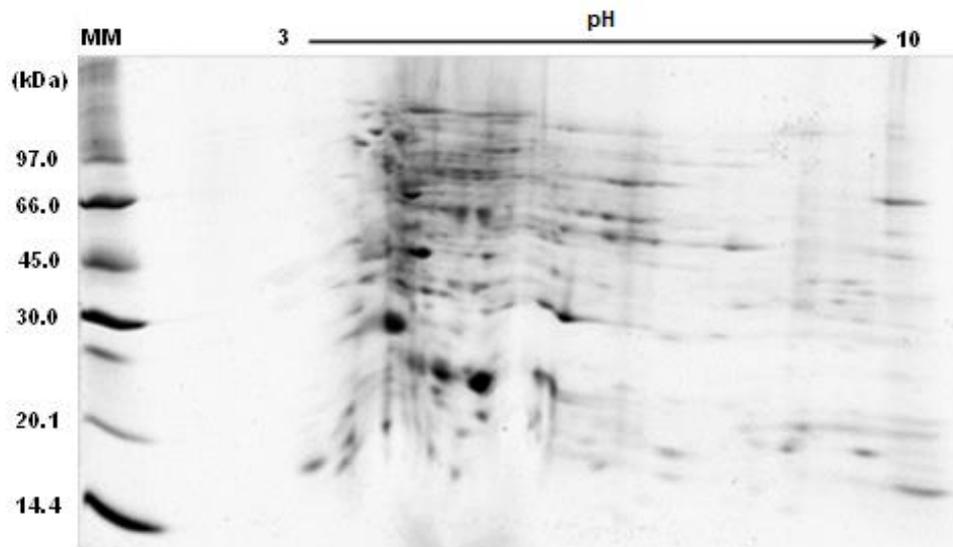
#### 4.3.1.2 Teste de purificação dos extratos proteicos

Após os resultados referentes aos géis de maior escala utilizando-se as tiras de pH 3-11 NL, 11 cm, decidiu-se realizar um teste de purificação dos extratos proteicos através do kit *2-D Clean-up*, acreditando-se que esta purificação melhoraria a qualidade dos géis através da diminuição de efeitos negativos causados por eventuais contaminantes das amostras. Para isto, foram confeccionados dois minigéis utilizando-se cerca de 80 µg de proteínas dos

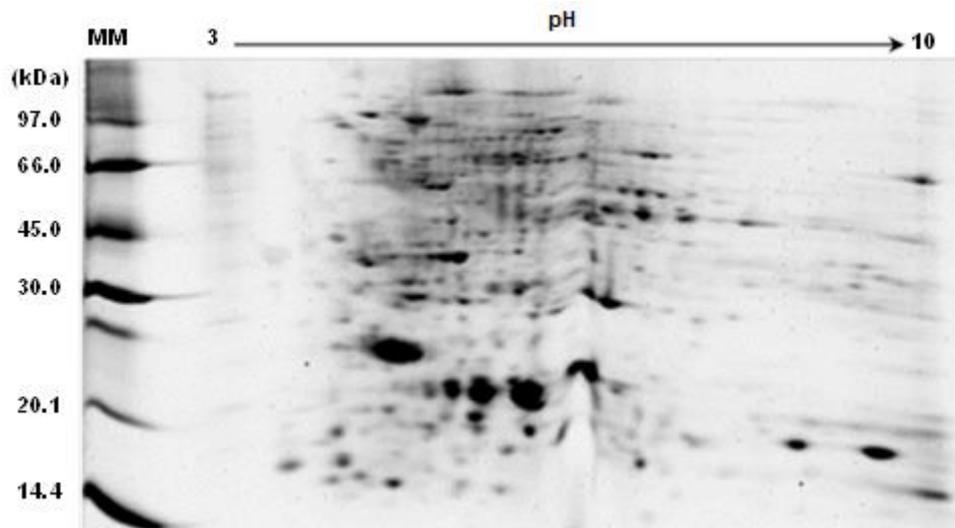
extratos purificados referentes às amostras Vassourinha Paulista e IAC 576-70. Escolheram-se estas cultivares para o teste, pois o gel referente à Vassourinha (**Figura 13A**) foi considerado o de pior qualidade devido aos *spots* em forma de gotas, e o referente à IAC 576-70 (**Figura 13C**) o de melhor qualidade devido à boa resolução e definição dos *spots*.

Como informado anteriormente, nesta etapa do trabalho, considerou-se que a separação proporcionada através da utilização da tira de pH 3-11 NL, 11 cm não foi substancialmente melhor que a separação referente à tira de pH 3-10, 7 cm linear, assim, decidiu-se continuar com a utilização desta última nas próximas análises.

A **Figura 14** mostra que os *spots* em forma de gota não apareceram neste novo teste utilizando-se a amostra Vassourinha, o que pode ser explicado pela purificação do extrato proteico. Já na **Figura 15**, a qual mostra o minigel referente à IAC 576-70, não foram notadas diferenças em relação à definição e resolução dos *spots* após a purificação do extrato. Apesar de ambos os géis apresentarem baixa qualidade, com distorções significativas nos perfis de proteínas, isso se deveu à confecção destes, mas provavelmente não à qualidade dos extratos. Desse modo, com base na melhora no formato dos *spots*, considerou-se que para realizar novas análises seria empregado material purificado com o kit *2-D Clean-up* (GE Healthcare), para a remoção dos interferentes.



**Figura 14** - Minigel 2-D corado com *SYPRO® Ruby*, referente à aplicação de 80,77 µg de proteínas extraídas da cultivar Vassourinha Paulista. Foi utilizada a tira de pH 3-10, 7 cm (acima da imagem). Os números à esquerda correspondem ao padrão de massa molecular *LMW calibration kit for SDS electrophoresis* (MM), sendo que seus marcadores estão expressos em kDa. Foram utilizados 2 µL do padrão. O gel foi exposto à luz UV em *VersaDoc MP 4000* por 60 s.



**Figura 15** - Minigel 2-D corado com *SYPRO® Ruby*, referente à aplicação de 80,77 µg de proteínas extraídas da cultivar IAC 576-70. Foi utilizada a tira de pH 3-10, 7 cm (acima da imagem). Os números à esquerda correspondem ao padrão de massa molecular *LMW calibration kit for SDS electrophoresis* (MM), sendo que seus marcadores estão expressos em kDa. Foram utilizados 2 µL do padrão. O gel foi exposto à luz UV em *VersaDoc MP 4000* por 75 s.

#### **4.3.2 Avaliação da técnica 2-D Fluorescence Difference Gel Electrophoresis (2-D DIGE) no estudo dos perfis de proteínas de mandioca**

Após os testes realizados, e com a melhor sensibilidade conseguida com a utilização do corante *SYPRO® Ruby*, avaliou-se a possibilidade de utilizar a *2-D Fluorescence Difference Gel Electrophoresis* (2-D DIGE), que oferece vantagens para a comparação entre os perfis de *spots* de proteínas.

A 2-D DIGE é um método realizado com amostras proteicas pré-marcadas com fluoróforos para posterior eletroforese bidimensional e análise diferencial. Este método permite a incorporação do mesmo padrão interno (*pool*) em cada gel 2-D e a multiplexação de até três misturas de proteínas separadas no mesmo gel. Nenhum outro sistema permite a utilização de um padrão interno. O *pool* é comparado com o padrão de proteínas das amostras, evitando o problema de intervariação comumente encontrado nos ensaios 2-D e permitindo a análise precisa de diferenças entre as amostras. Além destas vantagens, esta análise não necessita de uma posterior coloração dos géis, tornando o procedimento muito menos trabalhoso e conseqüentemente menos demorado. Como desvantagem evidente está o custo de aquisição das cianidinas fluorescentes. Assim, optou-se por avaliar este método no estudo dos perfis de proteínas de mandioca na etapa seguinte do projeto.

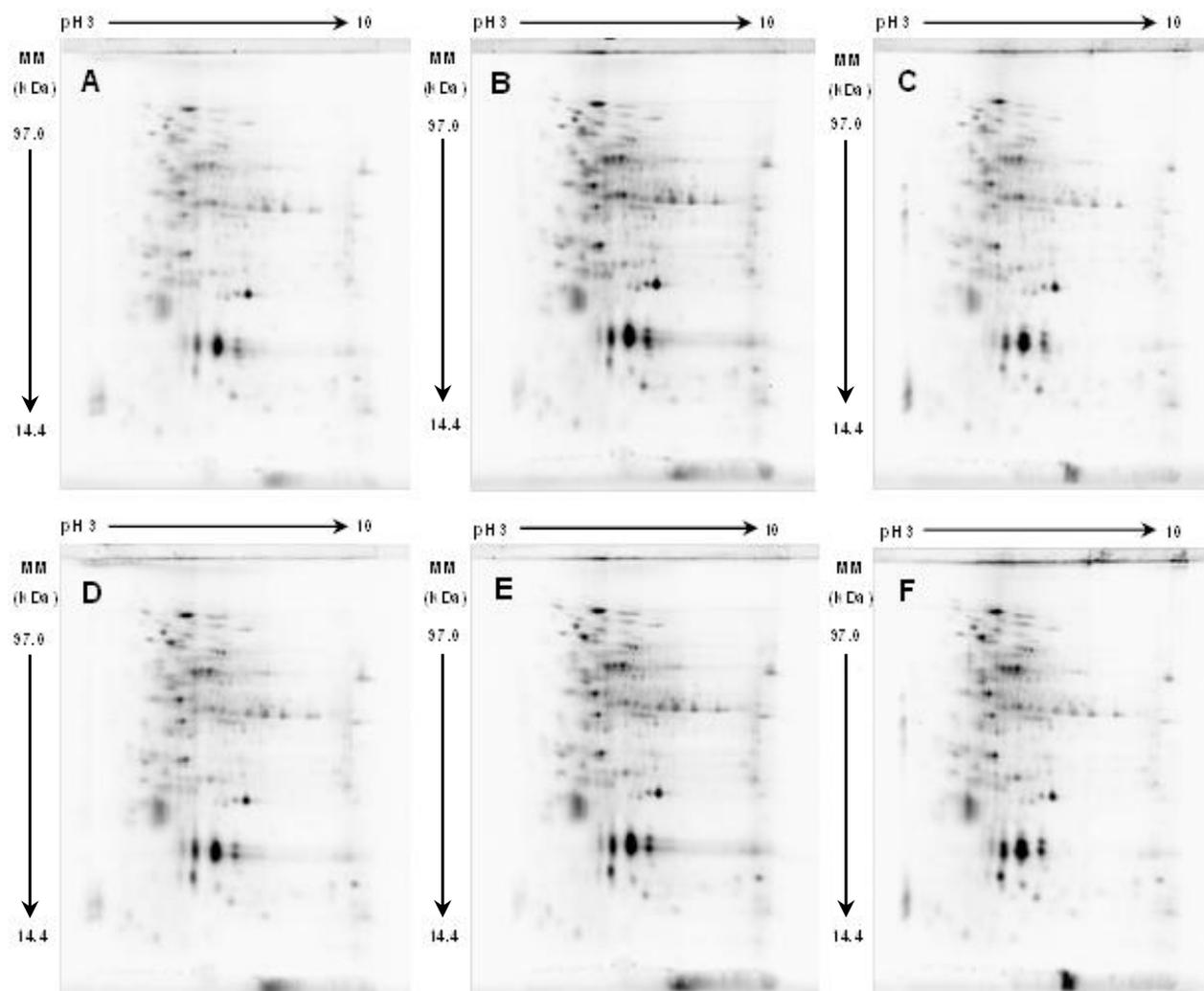
A partir deste ponto do trabalho, novas extrações de proteínas foram realizadas (**Tabela 3**), como descrito no item **4.2**. Conforme já informado (Item **4.2**), optou-se por excluir as cultivares IAC 13 e IAC 15 e reincluir a variedade Cigana Preta, selecionando-se para a continuidade do trabalho apenas seis variedades: Vassourinha Paulista, Cigana Preta, IAC 12, IAC 576-70, IAC 90 e IAC 06-01.

Para aumentar a confiabilidade das análises estatísticas da 2-D DIGE, além de terem sido realizadas replicatas biológicas (para cada variedade colheram-se raízes tuberosas de cinco plantas, utilizando-se partes diversas destas raízes para a realização da trituração), as extrações proteicas foram realizadas em triplicata (Item **3.2.3**) e, por final, foram realizadas três replicatas técnicas. Para isto, foram preparados seis géis de maiores dimensões, sendo

que três tiras de pH 3-10, 7 cm referentes a cada variedade (Vassourinha Paulista, Cigana Preta, IAC 12, IAC 576-70, IAC 90 e IAC 06-01) foram posicionadas na parte superior de cada gel (totalizando dezoito tiras), separando-se as triplicatas no mesmo SDS-PAGE, evitando-se, assim, a variação de gel para gel. Cada tira foi reidratada com 50 µg de proteínas da amostra marcadas com Cy3, juntamente com 50 µg de proteínas do *pool* marcadas com Cy5. Portanto, ao final obtiveram-se trinta e seis imagens, sendo dezoito relativas às amostras e dezoito relativas ao *pool*. O tempo de exposição à luz UV em *VersaDoc MP 4000*, para obtenção de cada imagem, foi de 30 s.

Na **Figura 16**, como exemplo, encontram-se as imagens dos géis realizados em triplicata referentes à corrida 2-D DIGE da amostra Vassourinha Paulista, juntamente com seus respectivos *pools*. No **ANEXO A**, podem ser visualizadas as imagens dos géis das amostras Cigana Preta, IAC 12, IAC 576-70, IC 90 e IAC 06-01 e seus *pools* (**Figuras 17, 18, 19, 20 e 21**, respectivamente). Observa-se que os perfis referentes às seis amostras são bastante similares. Além disso, as separações parecem ter ocorrido de forma adequada, pois não são notadas estrias verticais ou horizontais visíveis. No entanto, com o tempo de exposição empregado para a obtenção das imagens fluorescentes não foi possível notar os *spots* menos intensos. Isso se deve ao fato de que, apesar de utilizar um total de 100 µg de proteína por tira de pH, as imagens efetivamente correspondem ao perfil de 50 µg de proteína do *pool* ou da amostra. De acordo com experiência anterior do laboratório, o aumento do tempo de exposição para melhorar a intensidade do sinal não resultaria em benefício em termos de sensibilidade, uma vez que a coloração de fundo ou ruído do sinal também aumentaria bastante. Portanto, a sensibilidade do ensaio poderia vir a ser um problema, desta maneira, as imagens contendo os mapas proteicos referentes às seis amostras selecionadas não foram analisados.

É importante salientar que a realização de géis com maior quantidade de proteínas implicaria na utilização de maior quantidade de cianidinas, o que seria economicamente inviável.



**Figura 16** - Imagens representativas de 2-D DIGE referentes às aplicações de 50 µg de proteínas extraídas da raiz tuberosa da mandioca Vassourinha Paulista (amostra), juntamente a 50 µg do *pool*. Foram utilizadas tiras de pH 3-10, 7 cm. À esquerda das imagens, encontram-se os padrões de massa molecular *LMW calibration kit for SDS electrophoresis* (MM), sendo que seus marcadores estão expressos em kDa. (A-C) Amostra marcada com *Cy3* (triplicata). (D) *Pool* marcado com *Cy5*, relativo ao gel da imagem (A). (E) *Pool* marcado com *Cy5*, relativo ao gel da imagem (B). (F) *Pool* marcado com *Cy5*, relativo ao gel da imagem (C). Todos os géis foram submetidos a 30 s de exposição em *VersaDoc MP 4000*.

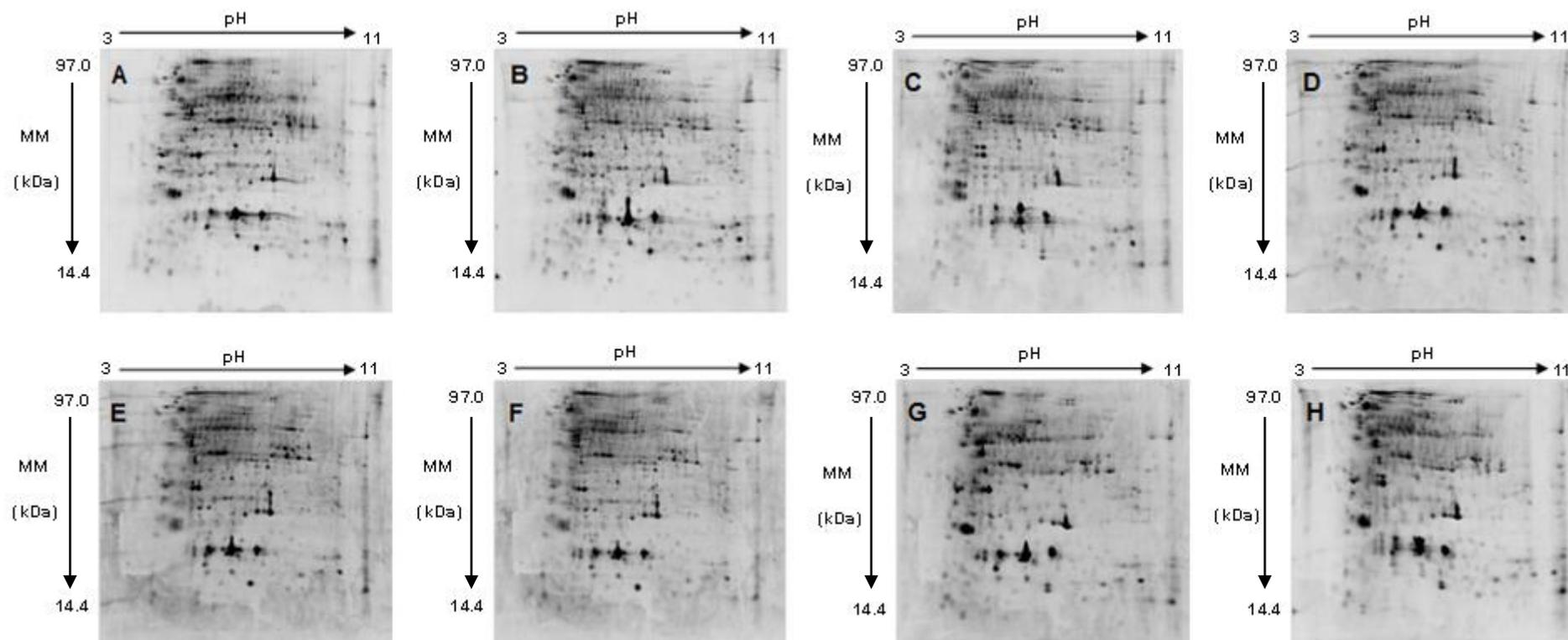
### 4.3.3 Géis analíticos corados com *SYPRO® Ruby*

Conforme descrito anteriormente, a sensibilidade do ensaio 2-D DIGE não foi adequada, já que não foi possível notar os *spots* menos intensos. Desta maneira, para a confecção dos géis analíticos, foi feita uma reavaliação em relação a qual técnica seria utilizada para a revelação dos *spots* de proteínas e qual faixa de pH seria utilizada. Apesar do grande número de géis a serem confeccionados, optou-se pelo corante *SYPRO® Ruby* para a continuidade do trabalho, já que foi possível verificar que dentre as três técnicas utilizadas até a ocasião (coloração por Azul de Coomassie coloidal, *SYPRO® Ruby* e 2-D DIGE), esta foi a que possibilitou a melhor visualização dos *spots* menos abundantes. Considerando as vantagens e desvantagens das tiras de pH testadas (pH 4-7 e pH 3-10, ambas de 7 cm e lineares; e pH 3-11 NL, contendo 11 cm), optou-se pela tira de pH 3-11 NL, já que foi a que forneceu um melhor perfil de proteínas, melhorando a separação dos *spots* na faixa de pH 5-7, onde a maioria dos *spots* da mandioca parecem se localizar, e simultaneamente preservando o maior número destes.

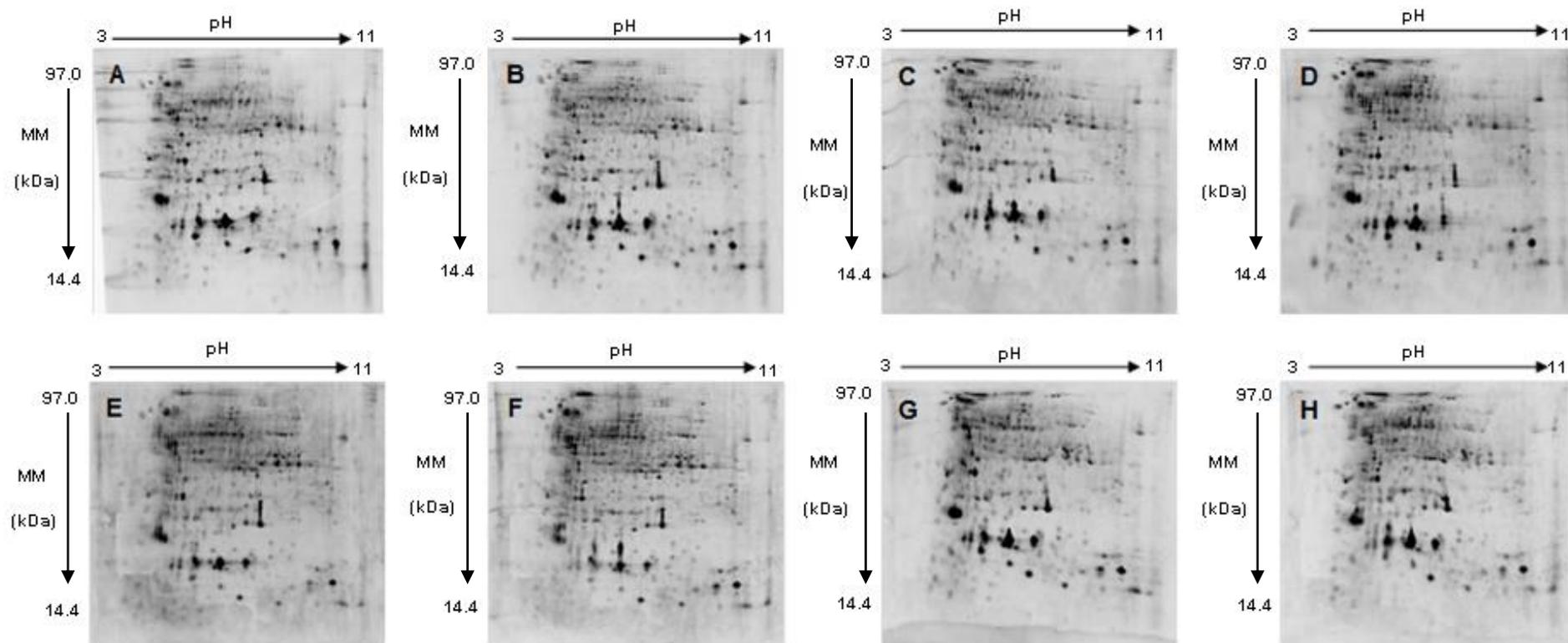
Assim, partiu-se para a confecção dos géis analíticos, sendo que nova extração de proteínas foi realizada (**Tabela 4**). Para aumentar a confiabilidade referente às análises estatísticas da eletroforese bidimensional, além de terem sido realizadas replicatas biológicas (para cada variedade colheram-se raízes tuberosas de cinco plantas, utilizando-se partes diversas destas raízes para a realização da trituração), as extrações proteicas foram realizadas paralelamente em triplicata (Item **3.2.3**), e, por fim, foram realizadas seis replicatas de géis de cada uma das cultivares IAC 12, IAC 576-70 e IAC 90, e oito de cada uma das variedades Vassourinha Paulista, Cigana Preta e IAC 06-01. Para isto foram preparados vinte e um géis de maiores dimensões, sendo que duas tiras de pH 3-11 NL e 11 cm foram posicionadas na parte superior de cada gel (totalizando quarenta e duas tiras). Para cada uma das cultivares de mandioca IAC 12, IAC 576-70 e IAC 90 foram utilizadas seis tiras e para cada uma das variedades Vassourinha Paulista, Cigana Preta e IAC 06-01 foram utilizadas oito tiras. Portanto, ao final obtiveram-se quarenta e duas imagens. É importante salientar

que em um mesmo gel foram posicionadas tiras contendo a mesma amostra, evitando-se a variação de gel para gel.

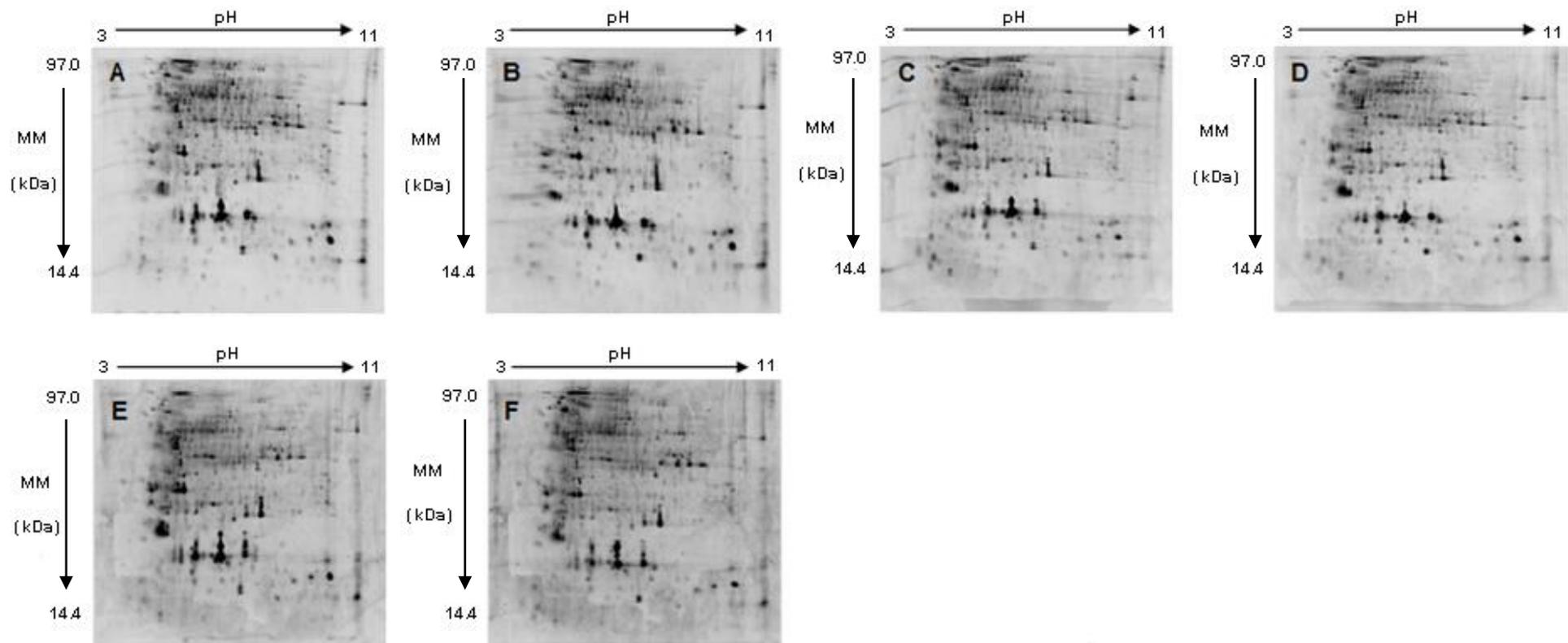
Nas **Figuras 22, 23, 24, 25, 26 e 27** encontram-se as imagens referentes às replicatas de géis das variedades Vassourinha Paulista, Cigana Preta, IAC 12, IAC 576-70, IAC 90 e IAC 06-01, respectivamente. Observando-se as figuras contendo os mapas proteicos referentes às seis amostras estudadas é possível notar que, no geral, os perfis são bastante similares. Além disso, as separações parecem ter ocorrido de forma adequada, pois não foram notadas estrias verticais ou horizontais (as estrias horizontais que existem ao lado esquerdo das imagens foram devidas à corrida do padrão de massa molecular). Em comparação com a análise 2D-DIGE (realizada anteriormente), neste novo ensaio realizado com o corante *SYPRO® Ruby* foi possível notar os *spots* menos intensos, resultando em géis com boa visualização de proteínas menos abundantes, facilitando a posterior análise diferencial dos perfis de proteínas. Notou-se também que a utilização de tiras de pH 3-11 NL de 11 cm, realmente forneceu o melhor perfil de proteínas, já que a faixa de distribuição do pH não linear favoreceu a resolução dos *spots* na faixa de pH de 5-7.



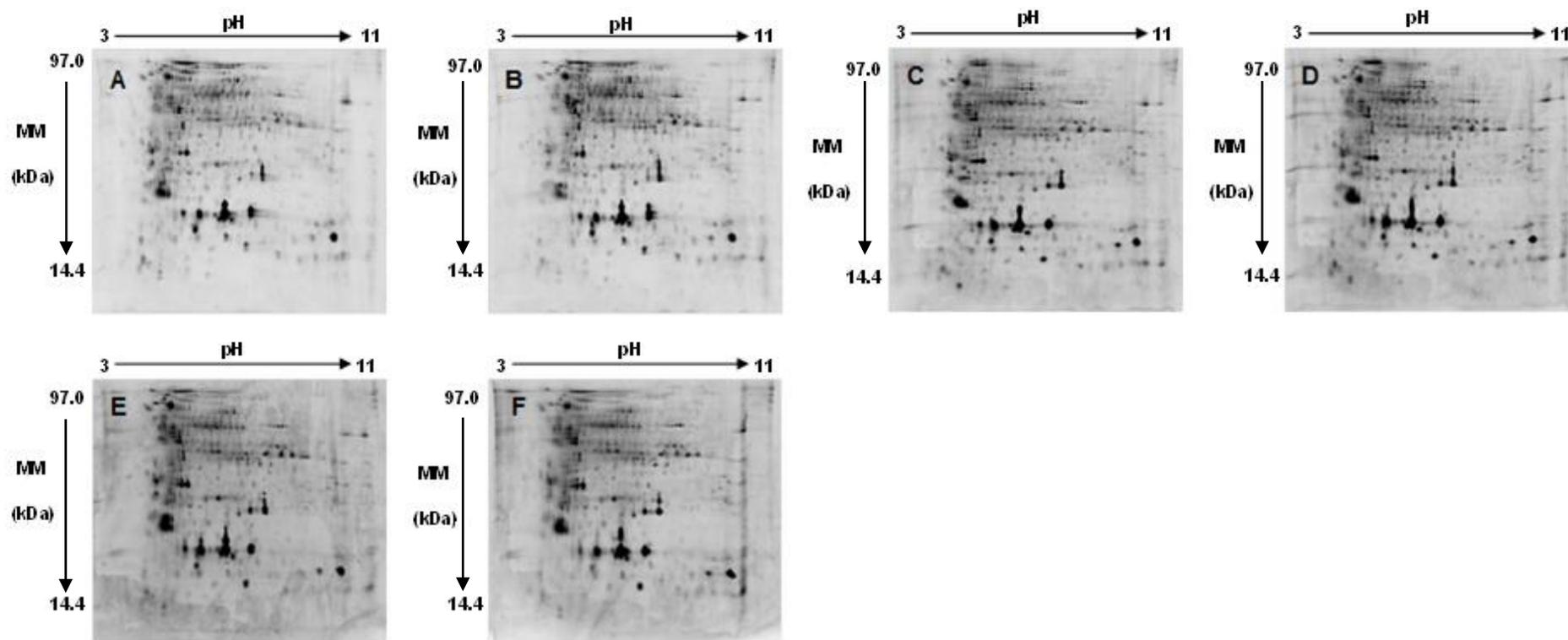
**Figura 22** - Oito replicatas de géis 2-D corados com *SYPRO® Ruby* referentes à aplicação de 100 µg de proteínas da cultivar Vassourinha Paulista (**A-H**). Para todos os géis foram utilizadas tiras de pH 3-11 NL, 11 cm (acima das imagens). À esquerda das imagens, encontram-se os padrões de massa molecular *LMW calibration kit for SDS electrophoresis* (MM), sendo que seus marcadores estão expressos em kDa. Foi utilizado 1 µL do padrão (imagens recortadas).



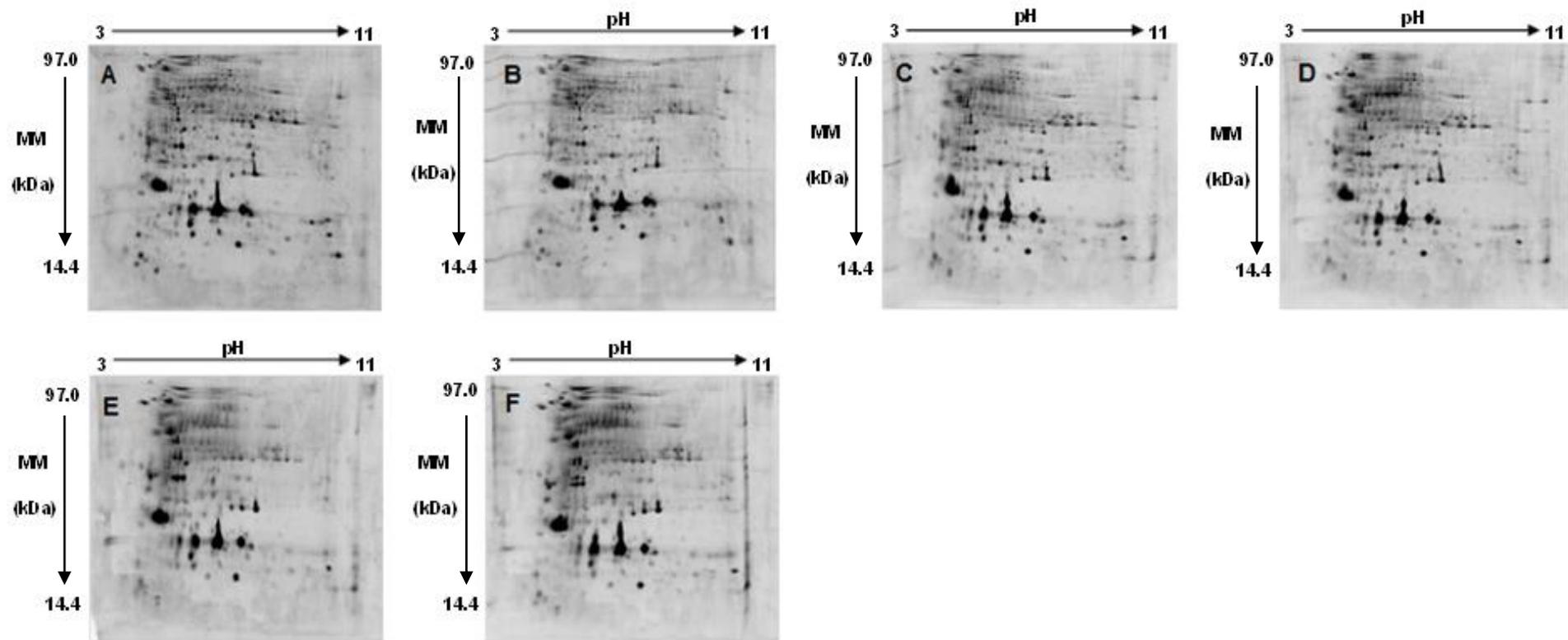
**Figura 23** – Oito replicatas de géis 2-D corados com *SYPRO® Ruby* referentes à aplicação de 100 µg de proteínas da cultivar Cigana Preta (**A-H**). Para todos os géis foram utilizadas tiras de pH 3-11 NL, 11 cm (acima das imagens). À esquerda das imagens, encontram-se os padrões de massa molecular *LMW calibration kit for SDS electrophoresis* (MM), sendo que seus marcadores estão expressos em kDa. Foi utilizado 1 µL do padrão (imagens recortadas).



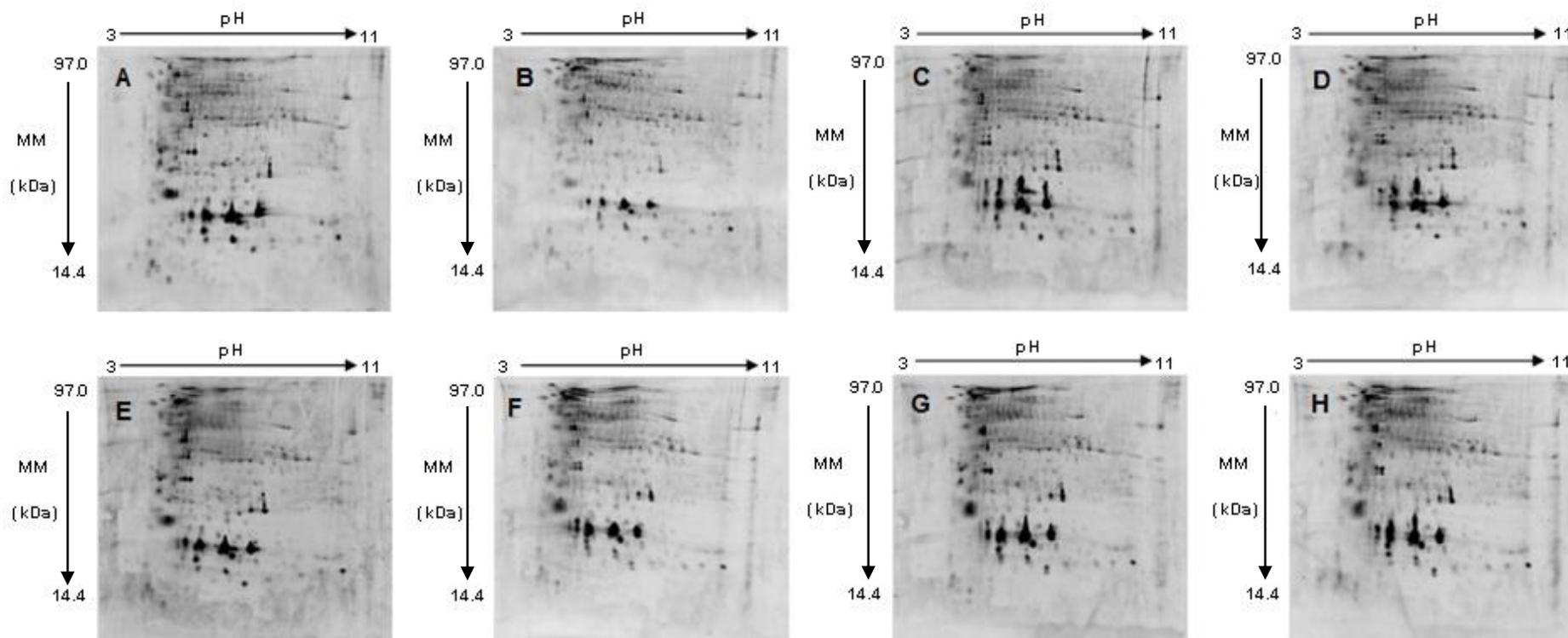
**Figura 24** – Seis replicatas de géis 2-D corados com *SYPRO® Ruby* referentes à aplicação de 100 µg de proteínas da cultivar IAC 12 (**A-F**). Para todos os géis foram utilizadas tiras de pH 3-11 NL, 11 cm (acima das imagens). À esquerda das imagens, encontram-se os padrões de massa molecular *LMW calibration kit for SDS electrophoresis* (MM), sendo que seus marcadores estão expressos em kDa. Foi utilizado 1 µL do padrão (imagens recortadas).



**Figura 25** – Seis replicatas de géis 2-D corados com *SYPRO® Ruby* referentes à aplicação de 100 µg de proteínas da cultivar IAC 576-70 (**A-F**). Para todos os géis foram utilizadas tiras de pH 3-11 NL, 11 cm (acima das imagens). À esquerda das imagens, encontram-se os padrões de massa molecular *LMW calibration kit for SDS electrophoresis* (MM), sendo que seus marcadores estão expressos em kDa. Foi utilizado 1 µL do padrão (imagens recortadas).



**Figura 26** – Seis replicatas de géis 2-D corados com *SYPRO® Ruby* referentes à aplicação de 100 µg de proteínas da cultivar IAC 90 (A-F). Para todos os géis foram utilizadas tiras de pH 3-11 NL, 11 cm (acima das imagens). À esquerda das imagens, encontram-se os padrões de massa molecular *LMW calibration kit for SDS electrophoresis* (MM), sendo que seus marcadores estão expressos em kDa. Foi utilizado 1 µL do padrão (imagens recortadas).

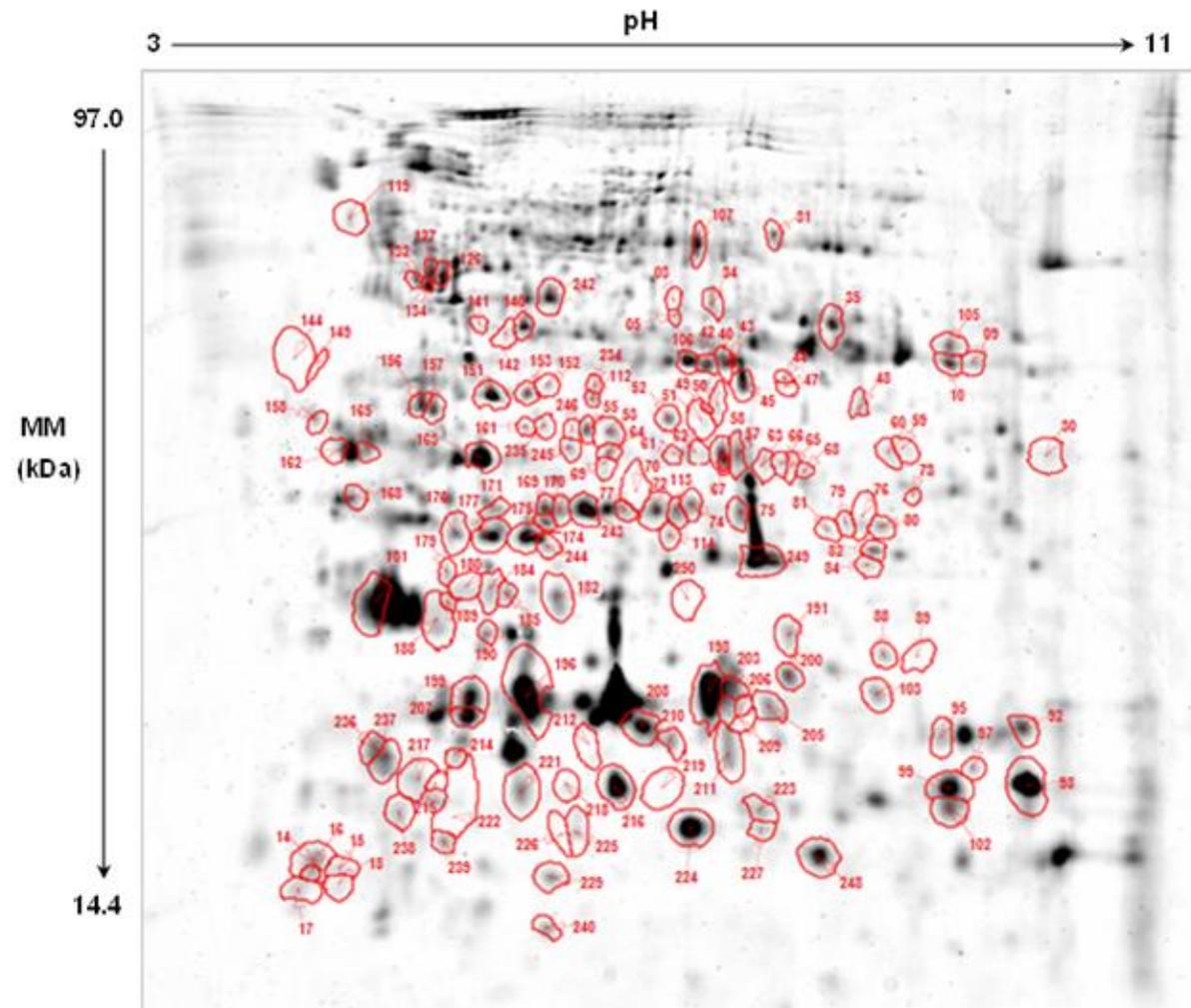


**Figura 27** – Oito replicatas de géis 2-D corados com *SYPRO® Ruby* referentes à aplicação de 100 µg de proteínas da variedade IAC 06-01 (A-H). Para todos os géis foram utilizadas tiras de pH 3-11 NL, 11 cm (acima das imagens). À esquerda das imagens, encontram-se os padrões de massa molecular *LMW calibration kit for SDS electrophoresis* (MM), sendo que seus marcadores estão expressos em kDa. Foi utilizado 1 µL do padrão (imagens recortadas).

#### 4.3.3.1 Análise das imagens: detecção e validação dos *spots*

Como mencionado em “Métodos”, as quarenta e duas imagens foram editadas (Item **3.2.10**), sendo recortadas no mesmo tamanho e posição, excluindo-se o padrão de massa molecular (**Figuras 22, 23, 24, 25, 26 e 27**). Dentre as quarenta e duas imagens, foram escolhidas apenas quatro referentes a cada uma das seis variedades. Esta seleção foi realizada com base nos géis com maiores semelhanças dentro de um mesmo grupo de variedade, considerando-se a posição e intensidade dos *spots* presentes. Desta maneira, as imagens escolhidas para esta análise foram as apresentadas nas seguintes figuras: **22A, 22B, 22D e 22E** (Vassourinha Paulista); **23A, 23B, 23C e 23E** (Cigana Preta); **24A, 24C, 24D e 24E** (IAC 12); **25B, 25C, 25D e 25E** (IAC 576-70); **26A, 26B, 26C e 26D** (IAC 90) e **27A, 27B, 27C e 27D** (IAC 06-01).

Para a formação do *Gráfico de Distorção* no programa *Delta2D* (Item **3.2.11**), foi escolhida a melhor imagem dentre as vinte e quatro, ou seja, a que possuía os *spots* melhor definidos e resolvidos: imagem apresentada na **Figura 23B** (Cigana Preta). Após, foi selecionada a melhor imagem de cada um dos grupos de variedades: imagens apresentadas nas figuras **22B, 24D, 25C, 26A e 27A**. Em seguida ao ‘Projeto’ e ‘Alinhamento das imagens’ (Item **3.2.11**), o total de *spots* detectado pelo programa foi de mil e oito (1.008). Após exclusões, divisões e adições de *spots*, restaram-se quatrocentos e trinta e seis (436) *spots* válidos. Em seguida, aplicou-se a *One-way ANOVA* ( $p < 0,05$ ), resultando em duzentos e cinquenta (250) *spots* significativos (estatisticamente válidos). Para comparação de resultados, aplicou-se aos mesmos 436 *spots*, a *One-way ANOVA* ( $p < 0,01$ ), resultando em cento e sessenta e sete (167) *spots* com significativa variação de abundância entre as variedades estudadas. Resolveu-se trabalhar com o resultado da ANOVA ( $p < 0,01$ ), já que mostrou um número de *spots* menor em relação à ANOVA ( $p < 0,05$ ), porém ainda alto e aceitável para a continuação das análises. Após última revisão, observando-se *spot* por *spot*, vinte e um (21) foram considerados ambíguos, inconsistentes entre as variedades de mandioca e, portanto, foram excluídos, restando cento e quarenta e seis (146) *spots* de interesse (**Figura 28 e Tabela 6 – ANEXO B**). Na **Figura 28** observam-se os 146 *spots* de interesse delimitados e numerados pelo



**Figura 28** – Gel 2-D corado com *SYPRO® Ruby* referente à aplicação de 100 µg de proteínas da cultivar Cigana Preta, com indicação dos 146 *spots* com variação de abundância significativa entre as seis variedades estudadas, delimitados e numerados (em vermelho) pelo programa *Delta2D 4.2* (DECODON). Foi utilizada a tira de pH 3-11 NL, 11 cm (acima). À esquerda, encontra-se o padrão de massa molecular *LMW calibration kit for SDS electrophoresis* (MM), sendo que seus marcadores estão expressos em kDa. Foi utilizado 1 µL do padrão (imagem recortada). A imagem é referente à **Figura 23B**.

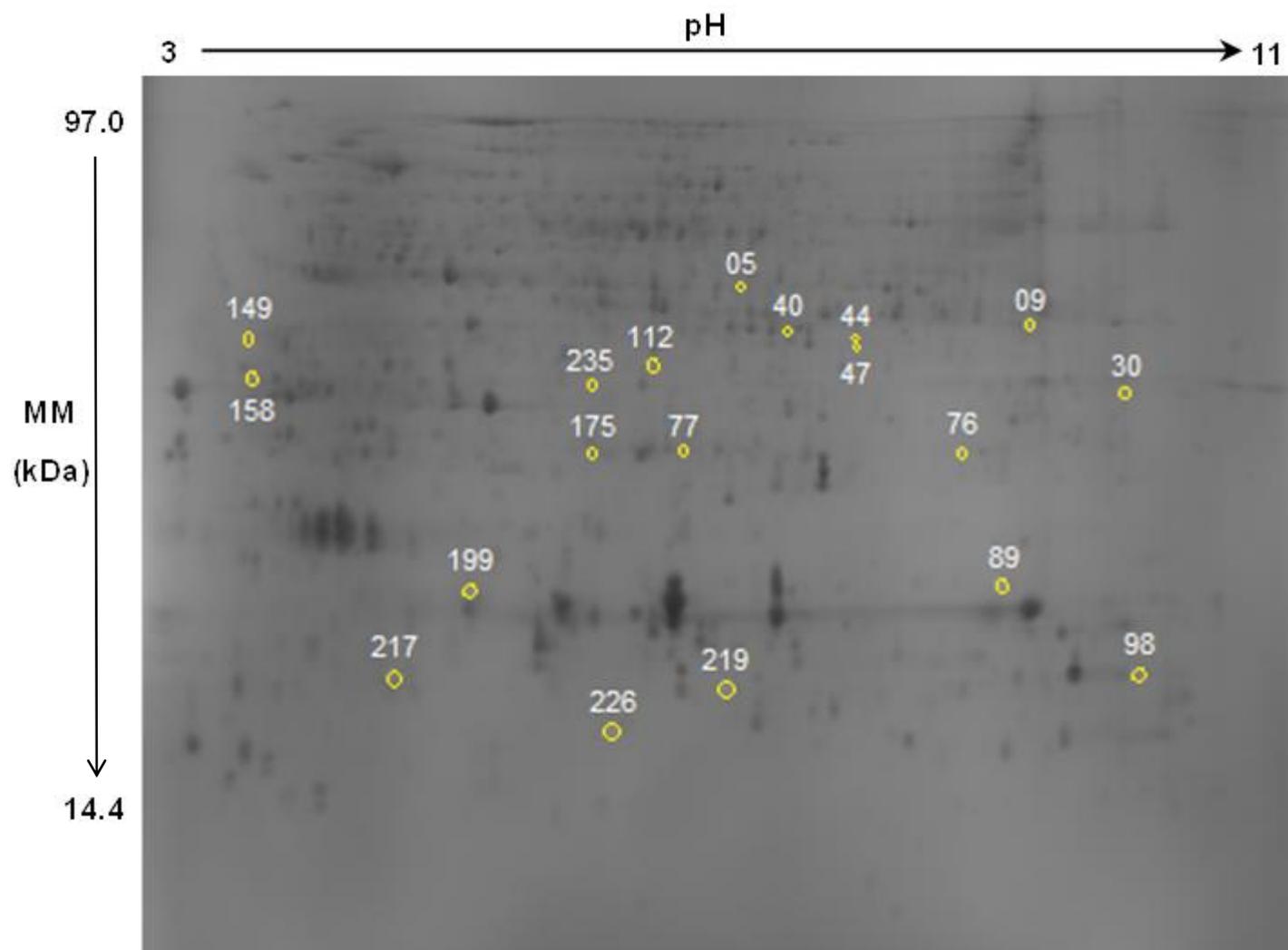
programa *Delta2D*. Os 146 *spots* foram circundados nas imagens referentes às seis variedades, porém a **Figura 28** mostra a imagem referente à cultivar Cigana Preta, como exemplo. Na **Tabela 6 (ANEXO B)**, encontram-se as intensidades médias de cada um dos 146 *spots* com variação de abundância significativa entre as variedades estudadas.

#### 4.3.4 Géis preparativos corados com Azul de Coomassie coloidal

Com o objetivo de se obter grande quantidade de proteínas, suficiente para a confecção dos géis preparativos (utilizados para a excisão dos 146 *spots* de interesse), realizaram-se novas extrações de proteínas (**Tabela 5**), a qual foi feita paralelamente em sextuplicata (Item **3.2.3**). Os géis foram confeccionados em maiores dimensões e em duplicata para cada uma das seis variedades (Vassourinha Paulista, Cigana Preta, IAC 12, IAC 576-70, IAC 90 e IAC 06-01). Como os géis seriam corados com Azul de Coomassie coloidal para a devida visualização dos *spots* no momento de suas excisões, foram utilizadas tiras de pH 3-11 NL de 24 cm, sendo que cada tira, reidratada com 750 µg de proteínas, foi posicionada na parte superior de cada gel.

##### 4.3.4.1 Excisão dos *spots* de interesse

Os 146 *spots* foram coletados em duplicata (Item **3.2.13**), sendo que cada um foi recortado dos géis referentes à variedade de mandioca onde se apresentou com maior intensidade, obtendo-se maior quantidade de proteína. Para isto foi utilizada a **Tabela 6 (ANEXO B)**, sendo que as intensidades médias de cada um dos *spots* foram comparadas entre as seis variedades, selecionando-se para a coleta a variedade onde o número referente à intensidade média apresentou-se maior. Apenas dois *spots* não foram coletados de variedades onde os valores médios de intensidade se apresentaram maiores: *spots* 81 e 206. Na **Figura 29**, encontram-se os *spots* recortados do gel referente à cultivar IAC 576-70, como exemplo. Nas **Figuras 30, 31, 32, 33 e 34 (ANEXO C)**, encontram-se



**Figura 29** – Gel 2-D corado com Azul de Coomassie coloidal, referente à aplicação de 750 µg de proteínas da cultivar IAC 576-70. Foi utilizada a tira de pH 3-11 NL, 24 cm (acima da imagem). À esquerda, encontra-se o padrão de massa molecular *LMW calibration kit for SDS electrophoresis* (MM), sendo que seus marcadores estão expressos em kDa. O gel encontra-se com os respectivos *spots* (circulados em amarelo e numerados em branco) coletados.

os *spots* coletados dos géis de cada uma das variedades: Vassourinha Paulista, Cigana Preta, IAC 12, IAC 90 e IAC 06-01, respectivamente.

Após a coleta dos *spots*, as proteínas contidas nestes sofreram digestão e, em seguida, foi realizada a purificação dos extratos contendo os peptídeos obtidos através da digestão. Os peptídeos foram sequenciados por espectrometria de massas (Item **3.2.16**).

#### **4.4 Sequenciamento dos peptídeos por espectrometria de massas**

Os espectros resultantes do sequenciamento dos 146 *spots* de proteínas foram analisados, sendo detectados peptídeos em 118 destes. Dentre os 118, as prováveis proteínas não foram identificadas em 16, mostrados na **Tabela 7** apenas pelo código de identificação do fragmento genômico contido no vetor portador da sequência em questão (P1-derived Artificial Chromosome - PACid). Portanto, foram identificadas proteínas em 102 *spots*, sendo inferidas 107 proteínas diferentes, já que em 5 *spots* foram encontradas mais de 1 proteína. Um total de 20 proteínas similares foi encontrado em diferentes variedades, sendo que 8 proteínas semelhantes foram encontradas em diferentes *spots* de uma mesma variedade. Na **Tabela 7**, estão relacionados: a identidade provável da proteína, sua classificação funcional, seu código de acesso, a pontuação (*score*) do MASCOT e a variedade onde esta se encontrou com maior abundância.

As proteínas identificadas foram classificadas de acordo com suas principais funções biológicas, a partir de informações disponíveis nas seguintes bases de dados: *Phytozome v9.1*, *Nacional Center for Biotechnology Information* (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), *The Arabidopsis Information Resource* (TAIR) (<http://www.arabidopsis.org>) e *Universal Protein Resource* (UNIPROT) (<http://www.uniprot.org>). Observa-se na **Figura 35**, que a maior parte das proteínas detectadas participa do Metabolismo (34,75%), Armazenamento e processamento de informações (13,56%) e Sinalização e processos celulares (13,56%).

**Tabela 7 (Continua)** - Proteínas com significativa variação de abundância entre as seis variedades de mandioca estudadas.

Spot	Identidade provável	Classificação funcional	Código de acesso	MASCOT Score	Variedade mais abundante
3	Protein kinase family protein	Sinalização e processos celulares	cassava4.1_006113m	34	IAC 06-01
5	Phosphoserine aminotransferase	Metabolismo	cassava4.1_027198m	53	IAC 576-70
9	KH domain- containing protein / Zinc finger (CCCH type) family protein	Sinalização e processos celulares	cassava4.1_012954m	38	IAC 576-70
10	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase C2	Metabolismo	cassava4.1_013196m	88	Cigana Preta
14	Profilin 3	Estrutura celular	cassava4.1_020010m	49	IAC 06-01
16	Profilin 3	Estrutura celular	cassava4.1_020010m	41	IAC 90
17	Profilin 3	Estrutura celular	cassava4.1_020010m	44	IAC 90
18	C-terminal cysteine residue is changed to a serine 1	Metabolismo	cassava4.1_019244m	111	IAC 06-01
30	Cytochrome P450 superfamily protein	Metabolismo	cassava4.1_031125m	53	IAC 576-70
31	U5 small nuclear ribonucleoprotein helicase, putative	Armazenamento e processamento de informações	cassava4.1_000124m	45	Vassourinha Paulista
34	RAB GTPase homolog A5E	Transporte	cassava4.1_014265m	30	IAC 06-01
35	Protein phosphatase X 2	Sinalização e processos celulares	cassava4.1_012540m	52	Vassourinha Paulista
42	Protein kinase family protein with leucine-rich repeat domain	Sinalização e processos celulares	cassava4.1_027666m	38	IAC 06-01
43	Lactate/malate dehydrogenase family protein	Metabolismo	cassava4.1_010105m	93	Cigana Preta
44	Annexin 1	Sinalização e processos celulares	cassava4.1_021183m	116	IAC 576-70
45	Annexin 1	Sinalização e processos celulares	cassava4.1_021183m	84	Vassourinha Paulista
47	Xylulose kinase-2	Metabolismo	cassava4.1_004778m	33	IAC 576-70
48	PACid:17969892	Proteína não identificada	cassava4.1_024324m	37	Vassourinha Paulista
49	PACid:17978798	Proteína não identificada	cassava4.1_025189m	35	Vassourinha Paulista
51	PACid:17970217	Proteína não identificada	cassava4.1_022280m	36	IAC 06-01

**Tabela 7 (Continuação)** – Proteínas com significativa variação de abundância entre as seis variedades de mandioca estudadas.

Spot	Identidade provável	Classificação funcional	Código de acesso	MASCOT Score	Variedade mais abundante
52	Alpha/beta-Hydrolases superfamily protein	Metabolismo	cassava4.1_011947m	57	Cigana Preta
53	Thiazole biosynthetic enzyme, chloroplast (ARA6) (THI1) (THI4)	Biossíntese	cassava4.1_010960m	66	Vassourinha Paulista
55	Pyrophosphorylase 6	Defesa	cassava4.1_012745m	36	Cigana Preta
57	Thiazole biosynthetic enzyme, chloroplast (ARA6) (THI1) (THI4)	Biossíntese	cassava4.1_010960m	109	IAC 90
58	2-oxoglutarate (2OG) and Fe(II)-dependent oxygenase superfamily protein	Metabolismo	cassava4.1_009922m	34	Cigana Preta
59	PACid:17974061	Proteína não identificada	cassava4.1_033238m	42	IAC 06-01
60	PACid:17962071	Proteína não identificada	cassava4.1_024476m	39	IAC 06-01
62	Protein of unknown function, DUF584	Função não conhecida	cassava4.1_032242m	42	IAC 90
63	Sulfate transporter 91	Transporte	cassava4.1_003293m	48	IAC 90
64	Oleosin 1	Estrutura celular	cassava4.1_031735m	57	Vassourinha Paulista
65	Ubiquitin-like superfamily protein	Sinalização e processos celulares	cassava4.1_019211m	41	Cigana Preta
67	AP2/B3-like transcriptional factor family protein	Armazenamento e processamento de informações	cassava4.1_006650m	34	Cigana Preta
68	Cytochrome P450 superfamily protein	Metabolismo	cassava4.1_026799m	36	Cigana Preta
69	Eukaryotic aspartyl protease family protein	Sinalização e processos celulares	cassava4.1_023312m	39	Vassourinha Paulista
70	Ascorbate peroxidase 2	Metabolismo	cassava4.1_024509m	47	IAC 06-01
72	NB-ARC domain-containing disease resistance protein	Defesa	cassava4.1_025649m	55	IAC 90
73	PACid:17972248	Proteína não identificada	cassava4.1_025165m	34	Vassourinha Paulista
74	5'-3' exonuclease family protein	Armazenamento e processamento de informações	cassava4.1_026774m	34	Vassourinha Paulista
75	RAN GTPase 3	Divisão celular	cassava4.1_015738m	95	IAC 12
77	Target of Myb protein 1	Transporte	cassava4.1_024207m	32	IAC 576-70
80	Protein of unknown function (DUF1336)	Função não conhecida	cassava4.1_018331m	33	Cigana Preta

**Tabela 7 (Continuação)** – Proteínas com significativa variação de abundância entre as seis variedades de mandioca estudadas.

Spot	Identidade provável	Classificação funcional	Código de acesso	MASCOT Score	Variedade mais abundante
82	N-terminal nucleophile aminohydrolases (Ntn hydrolases) superfamily protein	Metabolismo	cassava4.1_011091m	66	Cigana Preta
84	Adenine phosphoribosyl transferase 1	Metabolismo	cassava4.1_018280m	68	Vassourinha Paulista
88	YELLOW STRIPE like 7	Transporte	cassava4.1_002751m	31	Cigana Preta
92	Rotamase CYP 3	Sinalização e processos celulares	cassava4.1_015621m	147	IAC 12
95	Rotamase CYP 1	Sinalização e processos celulares	cassava4.1_017662m	66	IAC 90
97	PACid:17963450	Proteína não identificada	cassava4.1_020732m	21	Cigana Preta
98	Matrixin family protein	Metabolismo	cassava4.1_027526m	49	IAC 576-70
99	Matrixin family protein	Metabolismo	cassava4.1_027526m	58	Cigana Preta
102	PACid:17976709	Proteína não identificada	cassava4.1_020782m	51	Cigana Preta
103	SAUR-like auxin-responsive protein family	Sem classificação	cassava4.1_020173m	39	Cigana Preta
105	Target of Myb protein 1	Transporte	cassava4.1_024207m	32	Cigana Preta
106	Lactate/malate dehydrogenase family protein	Metabolismo	cassava4.1_010105m	75	Cigana Preta
107	Helicase domain-containing protein / IBR domain-containing protein / Zinc finger protein-related	Sinalização e processos celulares	cassava4.1_000127m	39	Cigana Preta
112	PACid:17973405	Proteína não identificada	cassava4.1_027870m	38	IAC 576-70
113	Ascorbate peroxidase 2	Metabolismo	cassava4.1_024509m	52	Cigana Preta
114	60S acidic ribosomal protein family	Armazenamento e processamento de informações	cassava4.1_018344m	36	Cigana Preta
119	NAC domain containing protein 74	Armazenamento e processamento de informações	cassava4.1_030482m	28	IAC 06-01
126	PACid:17971499	Proteína não identificada	cassava4.1_032654m	35	Vassourinha Paulista
127	Glycosyl transferase, family 35	Metabolismo	cassava4.1_001096m	58	IAC 12
132	PACid:17986548	Proteína não identificada	cassava4.1_031635m	43	IAC 90

**Tabela 7 (Continuação)** – Proteínas com significativa variação de abundância entre as seis variedades de mandioca estudadas.

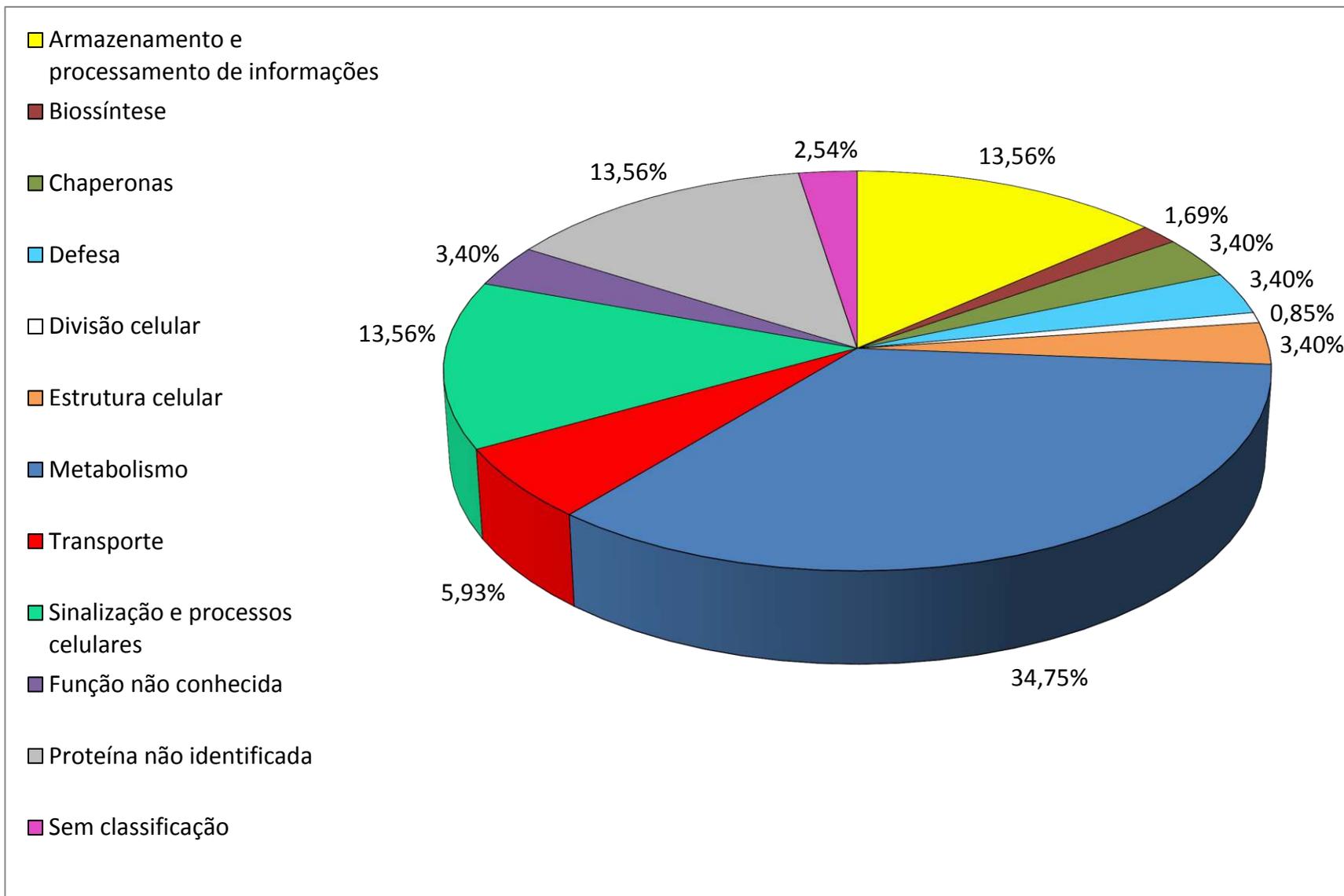
Spot	Identidade provável	Classificação funcional	Código de acesso	MASCOT Score	Variedade mais abundante
134	Alpha-glucan phosphorylase 2	Metabolismo	cassava4.1_002466m	67	IAC 90
140	S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferases superfamily protein	Metabolismo	cassava4.1_011102m	71	Vassourinha Paulista
141	S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferases superfamily protein	Metabolismo	cassava4.1_011102m	56	IAC 06-01
142	Zinc-binding dehydrogenase family protein	Metabolismo	cassava4.1_012256m	38	Vassourinha Paulista
144	Transducin/WD40 repeat-like superfamily protein	Armazenamento e processamento de informações	cassava4.1_007581m	32	IAC 06-01
149	Glycosyl hydrolase family protein with chitinase insertion domain	Metabolismo	cassava4.1_010113m	35	IAC 576-70
151	NmrA-like negative transcriptional regulator family protein	Armazenamento e processamento de informações	cassava4.1_029504m	103	IAC 90
152	Ankyrin repeat family protein	Sinalização e processos celulares	cassava4.1_004910m	38	IAC 90
153	O-acetylserine (thiol) lyase (OAS-TL) isoform A1	Metabolismo	cassava4.1_011826m	70	IAC 06-01
156	Glyoxalase I homolog	Metabolismo	cassava4.1_013158m	57	Cigana Preta
157	Glyoxalase I homolog	Metabolismo	cassava4.1_014447m	42	Cigana Preta
158	Alpha/beta-Hydrolases superfamily protein	Metabolismo	cassava4.1_008534m	32	IAC 576-70
162	General regulatory factor 2	Metabolismo	cassava4.1_014223m	67	Vassourinha Paulista
163	Polynucleotidyl transferase, ribonuclease H-like	Armazenamento e processamento de informações	cassava4.1_027700m	38	IAC 12
165	General regulatory factor 7	Metabolismo	cassava4.1_013801m	78	IAC 12
168	General regulatory factor 8	Metabolismo	cassava4.1_014519m	178	IAC 12
169	Oxidoreductase, 2OG-Fe(II) oxygenase family protein	Metabolismo	cassava4.1_004853m	41	IAC 12
171	Glutathione S-transferase TAU 19	Metabolismo	cassava4.1_015854m	47	Vassourinha Paulista
174	O-fucosyltransferase family protein	Metabolismo	cassava4.1_014689m	41	Cigana Preta
175	N-terminal nucleophile aminohydrolases (Ntn hydrolases) superfamily protein	Metabolismo	cassava4.1_015183m	39	IAC 576-70

**Tabela 7 (Continuação)** – Proteínas com significativa variação de abundância entre as seis variedades de mandioca estudadas.

Spot	Identidade provável	Classificação funcional	Código de acesso	MASCOT Score	Variedade mais abundante
177	Ovate family protein 7	Armazenamento e processamento de informações	cassava4.1_031937m	53	Cigana Preta
179	Proteasome beta subunit C1	Metabolismo	cassava4.1_016465m	83	Vassourinha Paulista
181	Heat shock protein 21	Defesa	cassava4.1_015256m	92	IAC 12
182	RNA-binding (RRM/RBD/RNP motifs) family protein	Armazenamento e processamento de informações	cassava4.1_009071m	39	IAC 90
184	Allene oxide cyclase 3	Metabolismo	cassava4.1_026961m	47	IAC 90
188	PACid:17985652	Proteína não identificada	cassava4.1_023116m	39	IAC 90
190	Methyl-CPG-binding domain 10	Armazenamento e processamento de informações	cassava4.1_011579m	39	IAC 90
196	HSP20-like chaperones	Chaperonas	cassava4.1_017871m	39	IAC 06-01
198	MuDR family transposase	Armazenamento e processamento de informações	cassava4.1_004319m	37	IAC 06-01
199	PACid:17970217	Proteína não identificada	cassava4.1_022280m	51	IAC 576-70
200	Ribosomal protein L7Ae/L30e/S12e/Gadd45 family protein	Armazenamento e processamento de informações	cassava4.1_018128m	32	Cigana Preta
203	Protein kinase superfamily protein	Sinalização e processos celulares	cassava4.1_003197m	39	IAC 90
205	NPK1-related protein kinase 1	Sinalização e processos celulares	cassava4.1_030718m	35	IAC 06-01
206	Origin recognition complex subunit 3	Armazenamento e processamento de informações	cassava4.1_018067m	34	IAC 06-01
207	HSP20-like chaperones superfamily protein	Chaperonas	cassava4.1_018131m	74	IAC 06-01
208	HSP20-like chaperones superfamily protein	Chaperonas	cassava4.1_018093m	63	IAC 06-01
209	Acyl-CoA N-acyltransferases (NAT) superfamily protein	Metabolismo	cassava4.1_025017m	33	IAC 12
210	Dormancy/auxin associated family protein	Sem classificação	cassava4.1_019121m	31	IAC 06-01
211	Early nodulin-like protein 6	Transporte	cassava4.1_025460m	38	IAC 06-01
215	PACid:17966736	Proteína não identificada	cassava4.1_033106m	21	IAC 06-01

**Tabela 7 (Conclusão)** – Proteínas com significativa variação de abundância entre as seis variedades de mandioca estudadas.

Spot	Identidade provável	Classificação funcional	Código de acesso	MASCOT Score	Variedade mais abundante
216	Cyclin B1;4	Sinalização e processos celulares	cassava4.1_008780m	38	IAC 06-01
217	Cytochrome P450, family 71, subfamily B, polypeptide 37	Metabolismo	cassava4.1_031263m	39	IAC 576-70
224	Nucleoside diphosphate kinase family protein	Metabolismo	cassava4.1_019475m	80	IAC 90
225	Nucleoside diphosphate kinase family protein NAD(P)-linked	Metabolismo	cassava4.1_019475m	85	IAC 90
226	oxidoreductase superfamily protein	Metabolismo	cassava4.1_025858m	41	IAC 576-70
227	Protein kinase superfamily protein	Sinalização e processos celulares	cassava4.1_003197m	36	IAC 06-01
234	NmrA-like negative transcriptional regulator family protein	Armazenamento e processamento de informações	cassava4.1_034037m	41	IAC 06-01
236	HSP20-like chaperones superfamily protein	Chaperonas	cassava4.1_018038m	43	Cigana Preta
237	ROTUNDIFOLIA like 16	Sem classificação	cassava4.1_024573m	32	Cigana Preta
240	PACid:17987892	Proteína não identificada	cassava4.1_025160m	43	IAC 12
242	PLATZ transcription fator family protein	Função não conhecida	cassava4.1_033543m	33	Cigana Preta
243	Arabidopsis thaliana protein of unknown function (DUF794)	Função não conhecida	cassava4.1_008479m	33	IAC 90
244	PACid:17967043	Proteína não identificada	cassava4.1_021547m	33	Cigana Preta
245	Transmembrane amino acid transporter family protein	Transporte	cassava4.1_028081m	38	IAC 12
246	Ribosomal L18p/L5e family protein	Armazenamento e processamento de informações	cassava4.1_014224m	37	Vassourinha Paulista
248	Ribulose bisphosphate carboxylase (small chain) family protein	Metabolismo	cassava4.1_017647m	141	Cigana Preta
249	Glutathione S-transferase PHI 9	Defesa	cassava4.1_016175m	214	Cigana Preta



**Figura 35** – Classificação funcional das proteínas detectadas a partir da identificação dos peptídeos sequenciados dos *spots* com significativa variação de abundância entre as seis variedades de mandioca estudadas: Vassourinha Paulista, Cigana Preta, IAC 12, IAC 576-70, IAC 90 e IAC 06-01.

Dentre as proteínas identificadas neste trabalho, apenas as seguintes foram encontradas em outros estudos sobre a mandioca: ribulose bifsosfato carboxilase (*spot* 248), nucleosídeo difosfato quinase (*spots* 224 e 225), proteína referente ao citocromo P450 (*spots* 30, 68 e 217) (BABA et al., 2008), anexina 1 (*spots* 44 e 45) (SHEFFIELD et al., 2006), S-adenosil-L-metionina (*spots* 140 e 141) (LI et al., 2010), enzima de biossíntese de tiamina (*spots* 53 e 57), proteína relacionada ao *heat shock* (*spot* 181) (BABA et al., 2008; SHEFFIELD et al., 2006), ascorbato peroxidase (*spots* 70 e 113) (LI et al., 2010; SHEFFIELD et al., 2006), malato desidrogenase (*spots* 43 e 106) (LI et al., 2010; MITPRASAT et al., 2011; SHEFFIELD et al., 2006), proteína ribossomal (*spots* 114, 200 e 246) (BABA et al., 2008; LI et al., 2010; MITPRASAT et al., 2011) e gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*spot* 10) (BABA et al., 2008; LI et al., 2010; MITPRASAT et al., 2011; SHEFFIELD et al., 2006). Desta maneira, é importante salientar que este trabalho, se comparado aos outros estudos referentes à mandioca com a utilização de 2D-PAGE, mostrou novas informações referentes às proteínas desta planta.

Segundo o programa MASCOT, para que a identidade da proteína seja confiável, seu *score* deve estar acima de 58. No entanto, 90 proteínas apresentaram valor menor, o que confere menos segurança quanto à sua provável identidade. Assim, os resultados de sequenciamento dessas proteínas de *score* mais baixo podem ser considerados apenas preliminares, demandando novas análises para a confirmação de suas identidades. Apesar disso, dentre as 107 identificações realizadas, algumas merecem atenção especial, e podem ser feitas correlações com algumas das características das variedades de mandioca estudadas.

A xilulose quinase-2, proteína identificada no *spot* 47, está localizada no citoplasma e parece estar envolvida na via de formação de açúcares (glicose e frutose), através da conversão da xilose, como mostrado para *Arabidopsis* (PLANT PATCHWAY DATABASE, 2013). Esta enzima foi encontrada mais abundantemente na cultivar de mesa, IAC 576-70, a qual mostrou teor de açúcares elevado juntamente com as outras variedades utilizadas para consumo doméstico: Vassourinha Paulista e IAC 06-01. É importante salientar, que a IAC 576-70 foi a única variedade que apresentou os açúcares glicose e frutose como

predominantes, já que todas as outras envolvidas neste trabalho apresentaram a sacarose como açúcar predominante (**Figura 5**).

A proteína da família das glicosil hidrolases contendo o domínio de inserção de quitinase, encontrada no *spot* 149, atua clivando de forma específica as ligações glicosídicas da quitina, um homopolissacarídeo linear formado por unidades de 2-acetamida-2-desoxi-D-glicose (N-acetil-D-glucosamina) unidas por ligações do tipo  $\beta$ -[1-4], presente em fungos e artrópodes. Desta forma, as quitinases são capazes de induzir resistência, local ou sistêmica, ao ataque de fungos, já que a parede celular destes fitopatógenos é composta por quitina (GOMES et al., 2010; KERN, 2003; THE ARABIDOPSIS INFORMATION RESOURCE, 2013). Esta proteína foi encontrada em maior quantidade na cultivar de mesa, IAC 576-70, a qual possui alto teor de açúcares. Esta quantidade alta de açúcares faz com que esta cultivar fique mais sujeita ao ataque de fungos, já que estes patógenos utilizam os açúcares da planta para a produção de energia. Assim, a presença desta proteína na cultivar IAC 576-70 torna-se bastante importante, pois pode contribuir para a maior proteção de um tecido mais exposto ao ataque fitopatogênico.

A proteína oxigenase dependente de 2-oxoglutarato (2OG) e de Fe II (*spot* 58) foi encontrada em maior quantidade na cultivar Cigana Preta, que é destinada à indústria para a produção de farinha. Essa proteína parece estar relacionada ao processo de deterioração pós-colheita da raiz tuberosa, já que está envolvida no processo de biossíntese de cumarinas (responsáveis pelo aparecimento de pontos escuros azulados na raiz tuberosa), morte celular programada, resposta à ferimentos, processo de oxirredução e processos catabólico de toxinas e de resposta à ferimentos (THE ARABIDOPSIS INFORMATION RESOURCE, 2013).

No *spot* 127 foi detectada a proteína glicosiltransferase, pertencente à família 35, a qual parece estar ligada à biossíntese de amido. Esta proteína mostrou-se mais abundante em uma cultivar destinada à indústria para a fabricação de amido, a IAC 12. Além disso, esta proteína parece estar envolvida na resposta de defesa às bactérias, resposta ao frio, ao estímulo de temperatura e à falta de água, sendo a IAC 12 resistente à bacteriose, muito cultivada em todo o Cerrado brasileiro, no qual o clima predominante é bastante seco, e a primeira cultivar não autóctone, mostrando que, talvez, o melhoramento genético

realizado promoveu a resistência desta cultivar (INSTITUTO AGRONÔMICO, 2013; THE ARABIDOPSIS INFORMATION RESOURCE, 2013). Desta maneira, pode ser que a maior expressão desta proteína tenha um papel no elevado teor de amido e na maior resistência encontrados nesta cultivar.

A enzima alfa-glucano fosforilase 2, localizada no *spot* 134, parece estar envolvida na biossíntese de amido e ocorreu em maior quantidade na variedade IAC 90, a qual é destinada à indústria para a fabricação de farinha e fécula, sendo a variedade que apresentou maior teor de amido (**Figura 4**) (THE ARABIDOPSIS INFORMATION RESOURCE, 2013). Desta maneira, é possível que a maior expressão desta proteína esteja vinculada ao maior teor de amido encontrado nesta cultivar.

O polipeptídeo 37 do citocromo P450 da família 71, subfamília B foi encontrado no *spot* 217, e parece estar relacionado à biossíntese de carotenoides (PHYTOZOME, 2013). Este citocromo apareceu em maior quantidade na cultivar IAC 576-70, a qual possui polpa creme quando crua e amarela quando cozida, devido à quantidade de carotenoides presente. Em relação ao consumidor, é importante salientar que os carotenoides são precursores da vitamina A, relacionada às funções visuais, integridade epitelial e ao funcionamento do sistema imunológico (QUEIROZ et al., 2013). Portanto, variedades ricas em carotenoides tornam-se mais valorizadas para o uso de mesa.

Em relação às proteínas de biossíntese, merece destaque a enzima de biossíntese de tiazol, localizada nos cloroplastos, a qual foi detectada nos *spots* 53 e 57 e em maior abundância nas variedades Vassourinha Paulista e IAC 90. Esta proteína parece estar envolvida na biossíntese de tiamina, agindo na tolerância ao dano do DNA mitocondrial, o qual pode gerar a apoptose celular (THE ARABIDOPSIS INFORMATION RESOURCE, 2013). Além disso, a vitamina B1 (tiamina), a qual é utilizada na prevenção do Beribéri, doença que envolve principalmente deficiências nos sistemas nervoso e vascular, pode ser encontrada na mandioca cozida, frita, no polvilho e na farinha (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2013; SEAGRI, 2013). Desta maneira, a farinha produzida a partir de ambas as variedades em questão e a mandioca Vassourinha cozida ou frita, tornam-se mais valorizadas para o consumo.

A proteína estrutural oleosina 1 mostrou-se mais abundante na cultivar Vassourinha Paulista, sendo detectada no *spot* 64. Esta proteína é responsável pelo armazenamento de lipídeos, sendo encontrada em partes da planta com elevado teor de óleo, servindo de proteção para a dessecação extrema (SANGER INSTITUTE, 2103; THE ARABIDOPSIS INFORMATION RESOURCE, 2013). Desta forma, talvez, esta variedade de mandioca, que é autóctone, seja mais bem adaptada à seca.

Em relação às proteínas de defesa, a proteína de resistência a doenças contendo o domínio NB-ARC, detectada no *spot* 72, parece estar relacionada à resposta de defesa e à morte celular programada (THE ARABIDOPSIS INFORMATION RESOURCE, 2013) e foi encontrada em maior quantidade na cultivar IAC 90, que é resistente à bacteriose e medianamente resistente ao superalongamento, doença causada pelo fungo *Sphaceloma manihoticola*. A presença desta proteína pode não ser o único fator de resistência a estas doenças citadas, porém, pode ajudar a explicar em parte esta característica da IAC 90.

Observou-se, portanto, que algumas proteínas de interesse refletiram as características fenotípicas das variedades em estudo, como características agrônômicas, físico-químicas e nutricionais, salientando diferenças importantes entre as variedades de mesa e indústria, conforme o esperado. Em relação às proteínas que não foram comentadas, será possível discutir seus papéis nas características fenotípicas das variedades estudadas à medida que novas informações sobre a função destas forem surgindo.

## **4.5 Métodos estatísticos multivariados**

### **4.5.1 Análise de Componentes Principais (ACP)**

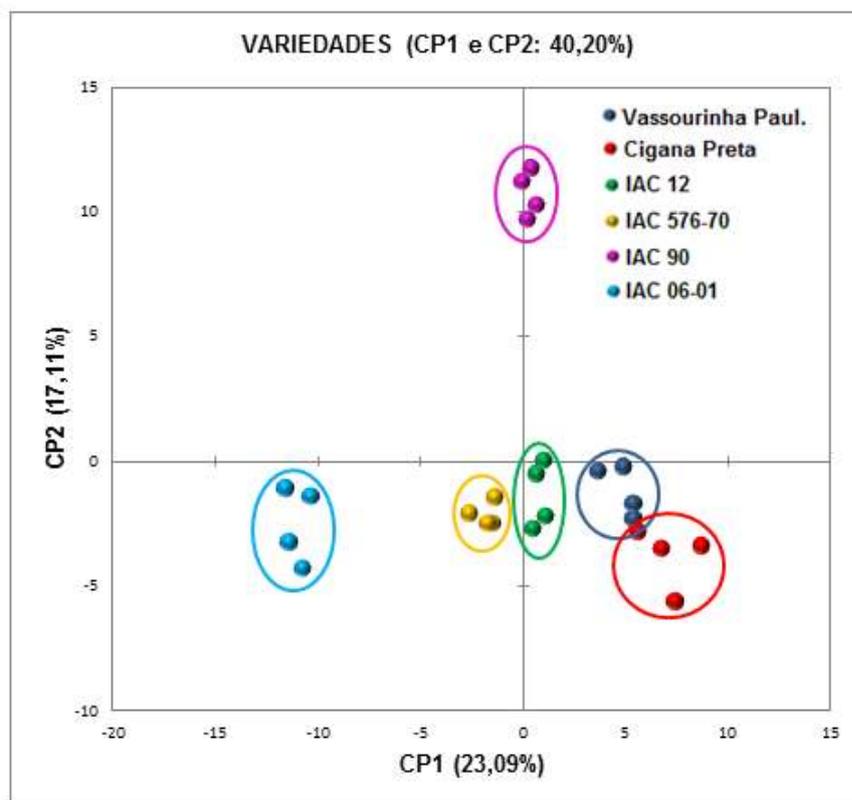
Como mencionado anteriormente (Item **3.2.12**), a Análise de Componentes Principais (ACP) referente aos 146 *spots* com significativa variação de abundância entre as seis variedades de mandioca estudadas (Vassourinha

Paulista, Cigana Preta, IAC 12, IAC 576-70, IAC 90 e IAC 06-01) foi realizada com o auxílio dos programas *Delta 2D*, SAS e XLSTAT. Para isto, foram utilizados os valores das intensidades referentes às quadruplicatas (Dados não mostrados) e também os valores das intensidades médias dos 146 *spots* (**Tabela 6 – ANEXO B**). A ACP relacionada às replicatas foi realizada utilizando-se os três programas citados, sendo que os três gráficos gerados foram idênticos quanto às posições (coordenadas) das variedades. Já as explicações da variabilidade entre as seis amostras pela primeira e segunda componentes (CP1 e CP2, respectivamente), foram visualizadas apenas pelo SAS e XLSTAT, sendo exatamente as mesmas em ambos, respectivamente, 17,11% e 23,09%. Juntas, estas duas componentes explicaram 40,20% da variabilidade. Desta maneira, para a apresentação dos resultados referentes à ACP relacionada às replicatas, foi selecionado o gráfico do XLSTAT (**Figura 36**), devido à melhor qualidade gráfica. Observa-se na **Figura 36**, que os quatro pontos referentes às quatro replicatas de géis de cada uma das seis variedades de mandioca encontraram-se bastante próximos no gráfico (cada quadruplicata foi circulada), não havendo pontos discrepantes. Esse resultado confirma que as replicatas são bastante similares, mostrando, portanto, que a reprodutibilidade do experimento foi adequada.

A ACP realizada com os valores das intensidades médias dos 146 *spots* de interesse gerada com os programas SAS e XLSTAT resultou idêntica quanto às posições (coordenadas) das variedades e *spots* nos gráficos, e em relação à porcentagem da explicação da variabilidade entre as amostras pela primeira e segunda componentes. Também nesse caso, para a apresentação dos resultados referentes à ACP relacionada às médias das intensidades, selecionou-se o gráfico do programa XLSTAT (**Figura 37**). Na **Figura 37** é apresentado o ACP BILOT, ou seja, as coordenadas referentes às amostras e *spots* em um mesmo gráfico. Observa-se que foram explicadas pela primeira e segunda componentes, respectivamente, 22,99% e 31,55% da variabilidade entre as seis amostras. Unidas, estas duas componentes explicaram 54,54% da variabilidade.

Pela análise da **Figura 37**, percebeu-se que a primeira componente separou as amostras IAC 06-01 e IAC 576-70 de todas as outras, sendo estas duas as únicas exclusivamente de mesa dentre as seis. De fato a variedade IAC 06-01 foi desenvolvida a partir do cruzamento da própria IAC 576-70, que sofreu

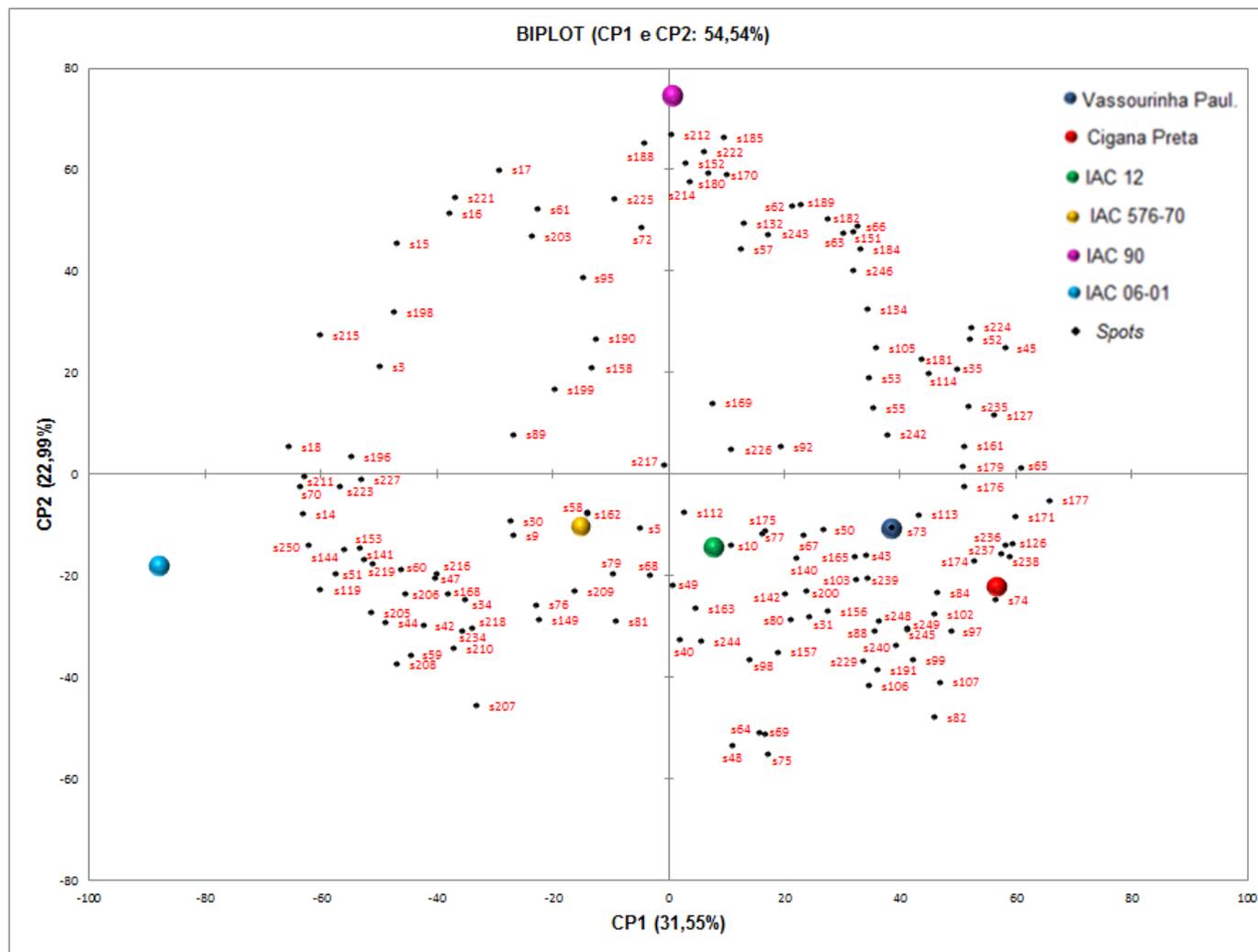
melhoramento genético, com outra cultivar de mesa, a SRT 1221 ou Vassourinha Amarela, que é uma variedade autóctone (SIQUEIRA et al., 2011; SILVEIRA, 2012), havendo, portanto, semelhanças entre as duas variedades de mesa em questão.



**Figura 36** – Análise de Componentes Principais (ACP) realizada com o programa XLSTAT-MX relativa aos valores das intensidades dos 146 *spots* de proteínas com significativa variação de abundância entre as seis variedades de mandioca estudadas (Vassourinha Paulista, Cigana Preta, IAC 12, IAC 576-70, IAC 90 e IAC 06-01). CP1 e CP2 são, respectivamente, a primeira e segunda componentes principais, sendo as porcentagens entre parênteses as explicações da variabilidade entre as seis amostras dadas por estas componentes. As quatro replicatas de géis analíticos de cada amostra estão representadas por pontos coloridos, circundados por linhas de mesma cor.

Para se observar a correlação entre *spots* e variedades, deve-se imaginar vetores ligando cada *spot* à origem do gráfico (onde os zeros se cruzam). Quanto menor o ângulo, ou mais próximos os vetores relacionados aos *spots* estiverem em relação às amostras, maior correlação haverá entre estes dois. Desta maneira, os *spots* localizados no quadrante inferior esquerdo estão mais bem correlacionados com as variedades IAC 06-01 e IAC 576-70, principalmente aqueles que se encontram bem próximos aos pontos referentes às amostras.

Ainda em relação à **Figura 37**, a IAC 06-01 situou-se um pouco distante das outras amostras dos quadrantes inferiores, indicando que apesar de ter sido



**Figura 37** – Análise de Componentes Principais BIPLLOT realizada com o programa XLSTAT-MX referente aos valores das intensidades médias dos 146 spots de proteínas com significativa variação de abundância entre as seis variedades de mandioca estudadas (Vassourinha Paulista, Cigana Preta, IAC 12, IAC 576-70, IAC 90 e IAC 06-01). CP1 e CP2 são, respectivamente, a primeira e segunda componentes principais, sendo as porcentagens entre parênteses as explicações da variabilidade entre as seis amostras dadas por estas componentes. As seis amostras estão representadas por pontos grandes coloridos, enquanto que os spots estão representados por pontos pretos, sendo que seus respectivos números estão em vermelho.

discriminada pela primeira componente, a qual explicou 31,55% da variabilidade entre as amostras, apresenta características que a diferencia das outras amostras localizadas nestes quadrantes (IAC 576-70, IAC 12, Vassourinha Paulista e Cigana Preta). Os *spots* de proteínas mais próximos desta amostra, considerando-se a formação de vetores explicada acima, são os de números 14, 144, 153 e 250, sendo que estes devem ser responsáveis pelas maiores diferenças dessa amostra em relação às demais. A proteína detectada no *spot* 14 foi a profilina 3, cuja função é a organização do citoesqueleto de actina (PHYTOZOME, 2013). A proteína encontrada no *spot* 144 foi a transducina/WD40 repeat-like, envolvida na replicação de DNA (THE ARABIDOPSIS INFORMATION RESOURCE, 2013). No *spot* 153 foi encontrada a proteína O-acetilserina (tiol) liase isoforma A1, a qual parece estar envolvida na síntese do aminoácido cisteína (THE ARABIDOPSIS INFORMATION RESOURCE, 2013). Já no *spot* 250, não foi detectada proteína.

A segunda componente, responsável pela explicação de 22,99% da variabilidade entre as amostras, separou a IAC 90, cultivar destinada à indústria para a fabricação de farinha e fécula, de todas as outras variedades. Neste contexto, esta é uma das variedades de maior discriminação, estando diferenciada nos quadrantes superiores. Assim, a maioria dos *spots* localizados nos quadrantes superiores estão mais bem correlacionados com a IAC 90, sendo que os *spots* mais próximos a esta (*Spots* 72, 152, 180, 188, 212, 214 e 222), devem ser os maiores responsáveis pela diferença desta variedade em relação a todas as outras. Foi encontrada no *spot* 72, a proteína de resistência à doenças contendo o domínio NB-ARC, envolvida na resposta de defesa à doenças, a qual já foi comentada anteriormente (THE ARABIDOPSIS INFORMATION RESOURCE, 2013). A repetição de anquirina foi detectada no *spot* 152, e parece ser responsável pela sinalização de proteínas (SANGER INSTITUTE, 2103). Não foram detectadas as proteínas dos *spots* 180, 212, 214 e 222, provavelmente em razão das pequenas quantidades presentes, enquanto a proteína do *spot* 188 não foi identificada.

Notou-se ainda na **Figura 37** que com relação à combinação da primeira e segunda componentes, que somam quase 55% da variabilidade total entre as

amostras, as cultivares IAC 576-70 e IAC 12 apresentaram muita similaridade (poucas diferenças) em relação ao perfil proteico, já que se encontraram bastante próximas no gráfico, apesar da primeira ser de mesa e a segunda de indústria (produção de fécula) (**Tabela 1**). Os *spots* 10, 58, 112 e 162, que são aqueles que realmente as caracterizam, estão localizados no centro do gráfico, nos quadrantes inferiores. A proteína gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase C2 (*spot* 10) (mais próximo da cultivar IAC 12), está envolvida na resposta ao estresse oxidativo, resposta ao íon cádmio, resposta de defesa à bactéria, gliconeogênese e glicólise (THE ARABIDOPSIS INFORMATION RESOURCE, 2013), sendo ambas as cultivares em questão resistentes à bacteriose. A proteína oxigenase dependente de 2-oxoglutarato (2OG) e de Fe II foi encontrada no *spot* 58 (mais próximo da IAC 576-70), e, como dito anteriormente, parece estar relacionada ao processo de deterioração pós-colheita da mandioca (THE ARABIDOPSIS INFORMATION RESOURCE, 2013). No *spot* 162 foi identificado o Fator 2 de regulação geral, que parece estar envolvido na via de sinalização mediada por brassinoesteroides, fitormônios que regulam o crescimento do vegetal, incluindo a estimulação do crescimento longitudinal, do alongamento e da divisão de células jovens, além disso, estimulam a diferenciação vascular (BAJGUZ; TRETYN, 2003; CLOUSE, 2002; HU; BAO; LI, 2000; THE ARABIDOPSIS INFORMATION RESOURCE, 2013). Por outro lado, nenhuma proteína foi identificada no *spot* 112.

As cultivares Vassourinha e Cigana, com relação à combinação da primeira e segunda componentes, também se apresentaram muito próximas no gráfico (alta correlação positiva), mostrando que possuem muitas semelhanças em relação ao perfil proteico. É importante salientar que na **Figura 36** estas amostras apareceram sobrepostas, indicando a grande proximidade existente entre elas, sendo, portanto, as variedades mais semelhantes no estudo. Estas cultivares são as mais antigas dentre as seis, não possuem datas conhecidas de surgimento, ambas são suscetíveis à bacteriose (todas as outras variedades em estudo são resistentes a esta doença) e destinadas à indústria para a fabricação de farinha (sendo que a Vassourinha também é utilizada como mandioca de mesa) (**Tabela 1**). Ambas são autóctones e não resultantes de melhoramento

genético (EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA, 2003; informação pessoal de VALLE<sup>3</sup>).

Muitos *spots* do quadrante inferior direito estão mais bem correlacionados com as amostras Vassourinha e Cigana, sendo os mais próximos a estas os que realmente as caracterizam: *spots* 43, 50, 73, 74, 84, 113, 126, 174, 236, 237 e 238. A proteína lactato/malato desidrogenase (*spot* 43), está envolvida no metabolismo energético (THE ARABIDOPSIS INFORMATION RESOURCE, 2013), enquanto a proteína 5'-3' exonuclease está envolvida no reparo de DNA, e foi identificada no *spot* 74 (THE ARABIDOPSIS INFORMATION RESOURCE, 2013). No *spot* 84, foi encontrada a proteína adenina fosforribosil transferase, envolvida no metabolismo de nucleotídeos (PHYTOZOME, 2013). A proteína ascorbato peroxidase 2 (*spot* 113) está envolvida nos processos de oxirredução, enovelamento de proteína e respostas ao calor, à alta intensidade de luz, ao peróxido de hidrogênio e ao estresse oxidativo (THE ARABIDOPSIS INFORMATION RESOURCE, 2013). A proteína O-fucosiltransferase (*spot* 174), parece participar da biossíntese de glicanos (THE ARABIDOPSIS INFORMATION RESOURCE, 2013). No *spot* 236, encontrou-se a proteína HSP20-like chaperonas, que está envolvida nas respostas ao calor, à alta intensidade de luz e ao peróxido de hidrogênio (THE ARABIDOPSIS INFORMATION RESOURCE, 2013). A proteína ROTUNDIFOLIA like 16 (*spot* 237) parece participar do desenvolvimento do broto da mandioca (THE ARABIDOPSIS INFORMATION RESOURCE, 2013). Por outro lado, as proteínas dos *spots* 73 e 126 não foram identificadas e não foram detectadas aquelas dos *spots* 50 e 238.

Desta forma, em relação às diferenças existentes referentes ao perfil proteico, as amostras IAC 06-01 e IAC 90 merecem atenção especial, já que por estarem mais distantes das outras amostras no gráfico (**Figura 37**), são as mais distintas. Como a IAC 06-01 foi discriminada das outras pela primeira componente, que explicou 31,55% da variabilidade entre as amostras e a IAC 90 foi separada das demais pela segunda componente, que explicou 22,29% entre

---

<sup>3</sup> VALLE T. L. **Projeto mandioca**. Mensagem recebida por teresalv@iac.sp.gov.br em 18 ago. 2013.

as variedades, concluiu-se que a IAC 06-01 é a variedade mais diferente de todas em relação ao perfil proteico, já que foi discriminada pela componente que explicou maior variabilidade. Assim, os *spots* de proteínas mais próximos destas amostras se tornam os mais importantes, explicando grande parte das diferenças entre as seis variedades. Já que grande parte dos *spots* mostrados pela ACP e destacados acima não tiveram suas proteínas detectadas ou identificadas, torna-se importante a realização de novas análises para a descoberta de suas identidades, ajudando a explicar melhor as diferenças e semelhanças entre as variedades em estudo.

#### 4.5.2 Análise de Agrupamentos

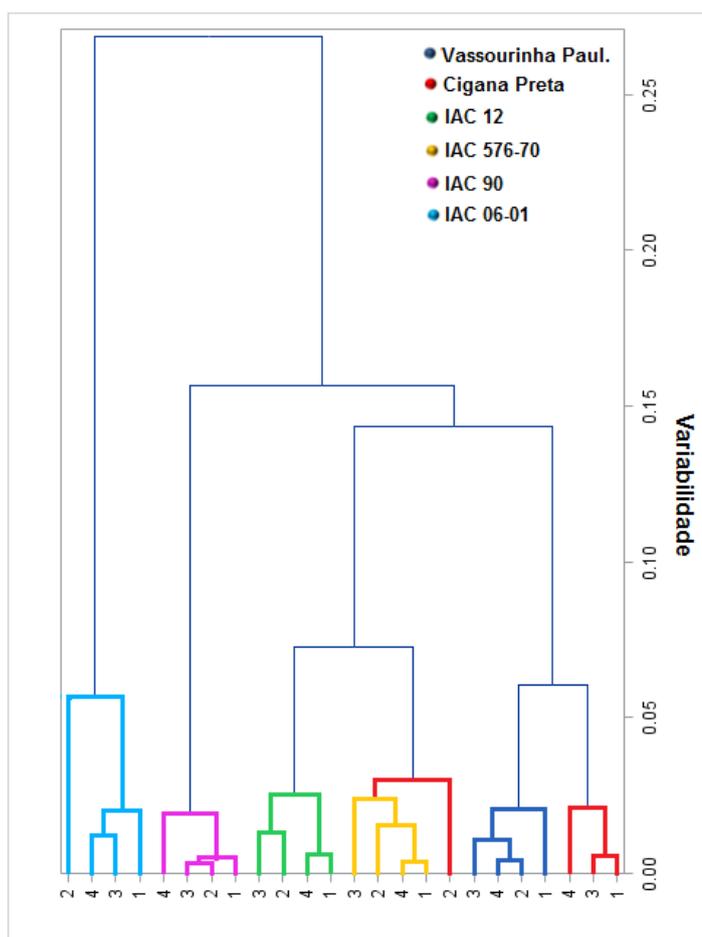
Para a Análise Multivariada por meio do método Análise de Agrupamentos, realizado com o auxílio do programa SAS, foram utilizados os valores das intensidades referentes às quadruplicatas dos 146 *spots* (Dados não mostrados) e o método de Ward (Mínima Variância), que é baseado na variabilidade entre as amostras. O dendrograma (**Figura 38**) mostra a formação de quatro grupos gerados a partir das quatro replicatas referentes a cada uma das seis variedades. Os resultados obtidos corroboram as informações resultantes da ACP (**Figuras 36 e 37**). Na **Figura 38**, observa-se que as cultivares Vassourinha Paulista e Cigana Preta ficaram próximas, gerando um único grupo formado pela maioria das replicatas de cada uma das amostras (*Cluster 1*). Uma única replicata referente à amostra Cigana Preta apareceu ligada ao grupo da IAC 576-70, sendo considerada discrepante. Um segundo grupo formado uniu as amostras IAC 576-70 e IAC 12 (*Cluster 2*). As replicatas relacionadas à cultivar IAC 90, formaram um único grupo (*Cluster 3*), ligando-se ao grupo formado pelos *Clusters 1 e 2*. Assim, um último grupo foi formado pela quadruplicata referente à variedade IAC 06-01 (*Cluster 4*), o qual se uniu aos outros três *clusters*. Desta forma, pode-se inferir que o *Cluster 1*, formado pelas cultivares Vassourinha e Cigana, contém as variedades mais semelhantes, já que elas se unem em um nível de menor variabilidade. Pode-se dizer também que as

cultivares IAC 12 e IAC 576-70 possuem poucas diferenças, apresentando variabilidade também pequena. Já os grupos formados pelas replicatas referentes à IAC 06-01 e IAC 90 são os mais diferentes, apresentando maior variabilidade em relação ao *Cluster 1*, sendo a IAC 06-01 a variedade menos semelhante dentre as seis estudadas, unindo-se aos outros grupos em um maior nível de variabilidade, concordando com os dados da ACP.

Siqueira (2008) avaliou a similaridade genética de vinte genótipos de mandioca, dentre eles: IAC 12, IAC 576-70, IAC 90 e IAC 06-01. Através de um dendrograma foi mostrada a similaridade de Jaccard incluindo estas quatro variedades. O resultado evidenciou que as similaridades em ordem decrescente entre estas variedades foram: IAC 12, IAC 576-70, IAC 90 e IAC 06-01, sendo que dentre os vinte genótipos mostrados, as amostras IAC 90 e IAC 06-01 foram as mais diferentes, concordando com os resultados da **Figura 38**.

#### **4.5.3 Heat Map com Hierarchical Clustering**

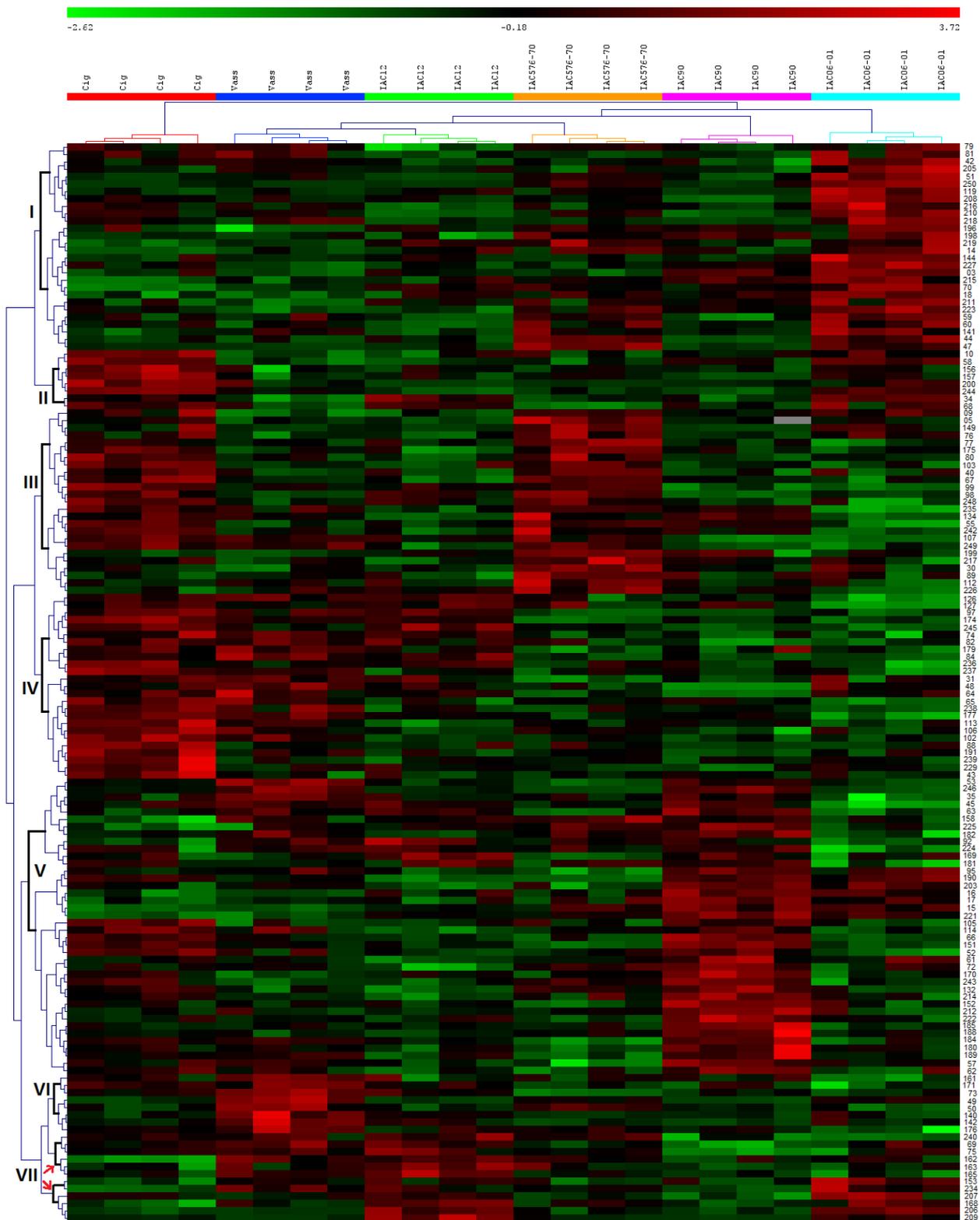
Para a confecção do *Heat Map* com *Hierarchical Clustering*, realizado com o auxílio do programa *Delta2D*, foram utilizados os valores das intensidades referentes às quadruplicatas dos 146 *spots* (Dados não mostrados). Observa-se na **Figura 39**, que foram encontrados sete principais grupos referentes às intensidades dos *spots*, identificados com números romanos (I a VII), sendo as cores verde e vermelho, menor e maior intensidades, respectivamente. Na **Tabela 8**, observam-se as variedades onde os *spots* de cada um dos sete grupos encontraram-se com maior intensidade, através da observação geral da **Figura 39**.



**Figura 38** – Dendrograma gerado pelo método de Ward com o auxílio do programa SAS 9.3, referente às intensidades (quadruplicatas) dos 146 *spots* de proteínas com significativa variação de abundância entre as seis variedades de mandioca estudadas (Vassourinha Paulista, Cigana Preta, IAC 12, IAC 576-70, IAC 90 e IAC 06-01). O eixo y indica a variabilidade entre os grupos, já o eixo x mostra as replicatas de géis de cada uma das seis amostras.

**Tabela 8** – Variedades onde os *spots* de cada um dos sete grupos encontraram-se com maior intensidade.

Grupo	Variedade (s) onde os <i>spots</i> de cada grupo encontraram-se com maior intensidade
I	IAC 06-01
II	Cigana Preta
III	IAC 576-70
IV	Cigana Preta
V	IAC 90
VI	Vassourinha Paulista
VII	IAC 12



**Figura 39** – Heat Map com Hierarchical Clustering obtido utilizando-se a distância euclidiana e gerado pelo programa *Delta2D*, referente às intensidades (quadruplicatas) dos 146 spots de proteínas com significativa variação de abundância entre as seis variedades de mandioca estudadas. Acima da figura, encontram-se cada uma das seis amostras, sendo C1g, Cigana Preta e Vass, Vassourinha Paulista. À direita, encontram-se os números referentes aos 146 spots, e à esquerda, o Hierarchical Clustering. Os principais grupos estão numerados de I à VII, sendo o último referente a dois clusters (indicados pelas setas em vermelho).

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho mostrou novas informações referentes às proteínas da mandioca, sendo que algumas proteínas identificadas refletiram as características fenotípicas das variedades em estudo (Vassourinha Paulista, Cigana Preta, IAC 12, IAC 576-70, IAC 90 e IAC 06-01), sejam agrônômicas, físico-químicas ou nutricionais, destacando diferenças importantes entre as variedades de mesa e indústria, conforme o esperado.

A Análise de Agrupamentos corroborou as informações da ACP, revelando que o proteoma das raízes tuberosas refletiu algumas diferenças e semelhanças fenotípicas entre as variedades. Apesar disso, através do sequenciamento dos peptídeos contidos nos 146 *spots* com diferença significativa de abundância entre as seis variedades de mandioca, observou-se que algumas proteínas não foram identificadas ou não foram detectados peptídeos em alguns *spots*, dificultando a discussão referente à ACP. Além disso, 90 proteínas apresentaram *score* abaixo de 59, conferindo menor segurança quanto à sua provável identidade. Em uma segunda etapa do trabalho, pretende-se realizar a PCR quantitativa em tempo real (RT-PCR), para que as diferenças observadas entre as seis variedades através dos ensaios de eletroforese bidimensional sejam validadas. Desta maneira, para que os resultados deste trabalho possam ser mais bem explorados, novas análises deverão ser feitas, investigando-se mais profundamente as proteínas identificadas e validando os resultados, de modo a identificar suas funções e as vias metabólicas de que fazem parte.

## REFERÊNCIAS

- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Informe técnico: **Ações para combate à Beribéri no Maranhão**: 2013. Disponível em: <[http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/1fe9c5804bd8284fbb7fbbc0f9d5b29/Informe\\_tecnico\\_beriberi\\_21.pdf?MOD=AJPERES](http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/1fe9c5804bd8284fbb7fbbc0f9d5b29/Informe_tecnico_beriberi_21.pdf?MOD=AJPERES)>. Acesso em: 19 set. 2013.
- ALBUQUERQUE, J. de A.A. de; SEDIYAMA, T.; ALVES, J.M.A; SILVA, A.A da; UCHÔA, S.C.P.. Cultivo de mandioca e feijão em sistemas consorciados realizado em Coimbra, Minas Gerais, Brasil. **Revista Ciência Agronômica**, v. 43, n.3, p. 532-538, 2012.
- ALVES, J.M.A.; JAIGOBIND, A.G.A.; JAISINGH, S. Caracterização de dois clones de mandioca de mesa cultivados no cerrado de Boa Vista em Roraima. **Revista Raízes e Amidos Tropicais**, v. 03, 2007.
- AMARAL, L.; JAIGOBIND, A.G.A.; JAISINGH, S. **Dossiê técnico**: processamento de mandioca. Curitiba: TECPAR, 2007. 47p.
- ANDRADE, J. DE M.; TOLEDO, T. T.; NOGUEIRA, S. B.; CORDENUNSI, B. R.; LAJOLO, F. M., NASCIMENTO, J. R. O. do. 2D-DIGE analysis of mango (*Mangifera indica* L.) fruit reveals major proteomic changes associated with ripening. **Journal of Proteomics**, v. 75, n. 11, p. 3331-3341, 2012.
- ARCHANGELO, E.R.; COIMBRA, R.R; JUCÁ, J.V.; KOSY, L.N.; FERNANDES, C.S.; ALMEIDA, I.W.; SILVA FILHO, V. R. da. Caracterização morfológica de acessos de mandioca nas condições edafoclimáticas de Palmas-TO. **Revista Raízes e Amidos Tropicais**, v. 03, 2007.
- ARÊAS, J.A.G.; LAJOLO, F.M. Starch transformation during banana ripening: I – the phosphorylase and phosphatase behavior in *Musa acuminata*. **Journal of Food Biochemistry**, v.5, p.19-37, 1981.
- BABA, A.I.; NOGUEIRA, F.C.S.; PINHEIRO, C.B.; BRASIL, J.N.; JEREISSATI, E.S.; JUÇA, T.L.; SOARES, A.A.; SANTOS, M.F.; DOMONT, G.B.; CAMPOS, F.A.P. Proteome analysis of secondary somatic embryogenesis in cassava (*Manihot esculenta*). **Plant Science**, v.175, n. 5, p. 717-723, 2008.
- BAJGUZ, A.; TRETYN, A. The chemical characteristic and distribution of brassinosteroids in plants. **Phytochem**, v. 62, p. 1027-1046, 2003.
- BALBUENA, T.S.; DIAS, L.L. C.; MARTINS, M.L.B.; CHIQUIERI, T.B; SANTA-CATARINA, C.; FLOH, E.I.S.; SILVEIRA, V.. Challenges in proteome analyses of tropical plants. **Brazilian Society of Plant Physiology**, v. 23., n. 2, p. 91-104, 2011.
- BEECHING, J.R.; HAN, Y.; GÓMEZ-VÁSQUEZ, R.; DAY, R.C.; COOPER, R.M. Wound and defense responses in cassava as related to post-harvest physiological deterioration. **Recent Advances in Phytochemistry**, v. 32, p.231-248, 1998.
- BERGMAYER, H.U. ed. **Methods of enzymatic analysis**. 2 ed. New York: Academic Press, 1974, v.3, p.1212-1215.
- BOLHUIS, G.G. The toxicity of cassava roots. **Netherlands Journal of Agricultural Science**, v. 2, n. 3, p. 176-185, 1954.
- BOOTH, R. H. Post-harvest deterioration of tropical root crops: losses and their control. **Tropical Science**, v. 16, n. 2, p. 49-63, 1974.
- BORGES, M. de F.; FUKUDA, W.M.G. Teor de cianeto em raízes frescas e processadas de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) de mesa. **Revista Brasileira de Mandioca**, v. 8, n. 2, p. 71-76, 1989.

- BORGES, M. de F.; FUKUDA, W. M. G.; CALDAS, R. C. Avaliação de três métodos para determinação de cianeto em mandioca. **Revista Brasileira de Mandioca**, v. 12, n. 1/2, p. 75-83, 1993.
- BORGES, M. de F.; FUKUDA, W. M. G.; ROSSETTI, A. G.. Avaliação de variedades de mandioca para consumo humano. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 37, n. 11, p. 1559-1565, 2002.
- BROCHADO, J.P. **Alimentação na floresta tropical**. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1977, 103p. (caderno n. 2)
- BUSCHMANN, H.; RODRIGUEZ M.X.; TOHME, J.; BEECHING, J.R. Accumulation of Hydroxycoumarins During Post-harvest deterioration of Tuberous Roots of Cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **Annals of Botany**, v.86, p.1153-1160, 2000.
- BUTARELO, S.S.; BELEIA, A.; FONSECA, I.C. de B.; ITO, K.C.. Hidratação de tecidos de raízes de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz.) e gelatinização do amido durante a cocção. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.24, n.3, p. 311-315, 2004.
- CABRAL, G.B.; CARVALHO, L.J.C.B.. Analysis of proteins associated with storage root formation in cassava using two-dimensional gel electrophoresis. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.13, n.1, p. 41-48, 2001.
- CARDOSO, C.E.L. **Competitividade e inovação tecnológica na cadeia agroindustrial de fécula de mandioca no Brasil**. 2003. 188 f. Tese (Doutorado em Economia Aplicada) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.
- CARPENTIER, S.C.; WITTERS, E.; LAUKENS, K.; DECKERS, P.; SWENNEN, R.; PANIS, B. Preparation of protein extracts from recalcitrant plant tissues: an evaluation of different methods for two-dimensional gel electrophoresis analysis. **Proteomics**, v. 5, n. 10, p. 2497-2507, 2005.
- CARVALHO, L.J.C.B.; CABRAL, G.B.; CAMPOS, L.. **Raiz de reserva de mandioca: um sistema biológico de múltipla utilidade**. Brasília: CENARGEN, 2000. 16p.
- CARVALHO, L.J.C.B.; SOUZA, C.R.B.; CASCARDO, J.C.M.; CAMPOS, L. Identification and characterization of novel cassava (*Manihot esculenta* Crantz) clone with high free sugar content and novel starch. **Plant Molecular Biology**, v.56, n.4, p.643-659, 2004.
- CARVALHO, P.C.L. de; FUKUDA, W.M.G.; CRUZ, P.J.; COSTA, J.A.. Avaliação agrônômica e tecnológica de cultivares de mandioca para consumo "in natura". **Revista Brasileira de Mandioca**, v. 14, n. 1/2, p. 7-15, 1995.
- CELEDON, P.A.F.; ANDRADE, A.; MEIRELES, K.G.X.; CARVALHO, M.C.C.G.; CALDAS, D.G.G.; MOON, D.H.; CARNEIRO, R.T.; FRANCESCHINI, L.M.; ODA, S.; LABATE, C.A.. Proteomic analysis of the cambial region in juvenile *Eucalyptus grandis* at three ages. **Proteomics**, v.7,, n.13, p. 2258-2274, 2007.
- CHEN, S.; HARMON, A.C.. Advances in plant proteomics. **Proteomics**, v. 6, n. 20, p. 5504-5516, 2006.
- CLOUSE, S. D. Brassinosteroids: plant counterparts to animal steroid hormones?. *Vitam. Horm.*, v. 65, p. 195-223, 2002.
- CONCEIÇÃO, A.J. da. **A mandioca**. Cruz das Almas: UFBA/Embrapa-CNPMP/BNB/Brascan Nordeste, 1983. 823 p.
- CONN, E.E. Cyanogenic glucosides. **Journal of Food Chemistry**, v. 17, n. 1, p. 519-526, 1969.
- DIAS, C.A.C.; LOMGHI, A.A.; LORENZI, J.O. Mandioca. In: Coordenadoria de Assistência Técnica Integral. **Manual técnico das culturas: cereais, fibrosas, leguminosas, oleaginosas, raízes e tubérculos, plantas tropicais, sacarinas**. 2. ed. Campinas: CATI/SAA, 1997. p. 369-398.

- DIAS, L.T.; LEONEL, M.. Caracterização físico-química de farinhas de mandioca de diferentes localidades do Brasil. **Ciência Agrotécnica**, v. 30 , n. 4 , p. 692-700, 2006.
- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Embrapa Mandioca e Fruticultura. **Cultivo da Mandioca na região centro sul do Brasil**. Sistemas de Produção (7): janeiro 2003. Disponível em: <[http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Mandioca/mandioca\\_centrosul/cultivares.htm](http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Mandioca/mandioca_centrosul/cultivares.htm)>. Acesso em: 22 mar. 2011.
- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Embrapa Mandioca e Fruticultura. **Cultivo da Mandioca para a Região dos Tabuleiros Costeiros**. Sistemas de Produção (11): janeiro 2003. Disponível em: <[http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Mandioca/mandioca\\_tabcosteiros/doencas.htm](http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Mandioca/mandioca_tabcosteiros/doencas.htm)>. Acesso em: 06 ago. 2013.
- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Embrapa Mandioca e Fruticultura. **Mandioca**. Culturas pesquisadas: março 2011. Disponível em: <[http://www.cnpmf.embrapa.br/index.php?p=pesquisa-culturas\\_pesquisadas-mandioca.php&menu=2](http://www.cnpmf.embrapa.br/index.php?p=pesquisa-culturas_pesquisadas-mandioca.php&menu=2)>. Acesso em: 21 mar. 2011.
- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Embrapa Mandioca e Fruticultura. **Mandioca**. Culturas pesquisadas: março 2012. Disponível em: <[http://www.cnpmf.embrapa.br/index.php?p=pesquisa-culturas\\_pesquisadas-mandioca.php&menu=2](http://www.cnpmf.embrapa.br/index.php?p=pesquisa-culturas_pesquisadas-mandioca.php&menu=2)>. Acesso em: 10 fev. 2012.
- FARALDO, M.I.F.; SILVA, R.M. da; ANDO, A.; MARTINS, P.S.. Variabilidade genética de etnovarietades de mandioca em regiões geográficas do Brasil. **Scientia Agricola**, v.57, n.3, p.499-505, 2000.
- FARINHA, A.P.; IRAR, S.; OLIVEIRA, E. de; OLIVEIRA, M.M.; PAGÈS, M.. Novel clues on abiotic stress tolerance emerge from embryo proteome analyses of rice varieties with contrasting stress adaptation. **Proteomics**, v. 11, n. 12, p. 2389-2405, 2011.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO). **A new strategy for cassava**: 2000. Disponível em: <<http://www.fao.org/ag/magazine/0006sp1.htm>>. Acesso em: 20 abr. 2012.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO). **Food and Agriculture Organization of the United Nations**. 2007. Disponível em: <<http://www.faostat.fao.org>>. Acesso em: 11 jan. 2012.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO). **Food and Agriculture Organization of The United Nations**. 2008. Statistical Databases – FAO STAT. Disponível em: <<http://faostat.fao.org>>. Acesso em: 10 fev. 2012.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO). **Food and Agriculture Organization of the United Nations**. 2012. Statistical Databases – FAO STAT. Disponível em: < <http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/download/Q/QC/E> >. Acesso em: 11 ago. 2013.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO). **The global cassava development strategy and implementation plan**, v.1, p. 70, 2001.
- FUKUDA, W.M.G.; BORGES, M. de F. Avaliação qualitativa de cultivares de mandioca de mesa. **Revista Brasileira de Mandioca**, v. 7, n. 1, p. 63-71, 1988.
- FUKUDA, W.M.G.; BORGES, M. de F. Influência da idade de colheita sobre a qualidade de raízes em diferentes cultivares de mandioca de mesa. **Revista Brasileira de Mandioca**, v. 9, n. 1/2, p. 7-19, 1990.
- FUKUDA, W.M.G.; SILVA, R. de A.; BORGES, M. de F. Seleção de variedade de mandioca para o consumo *in natura*. **Revista Brasileira de Mandioca**, v. 7, n. 2, p. 7-18, 1988.
- GAZZANA, G.; BORLAK, J.. Improved methods for proteome mapping of the Liver by 2-DE MALDI-TOF MS. **Journal of Proteome Research**, v. 6, n. 8, p. 3143-3151, 2007.

- GIRIBALDI, M.; PURROTTI, M.; PACIFICO, D.; SANTINI, D.; MANNINI, F.; CACIAGLI, P.; ROLLE, L.; CAVALLARIN, L.; GIUFFRIDA, M.G.; MARZACHI, C.. A multidisciplinary study on the effects of phloem-limited viruses on the agronomical performance and berry quality of *Vitis vinifera* cv. Nebbiolo. **Journal of Proteomics**, v. 75, n. 1, p. 306-315, 2011.
- GOMES, L. P.; OLIVEIRA, C. I. R. de; SILVA, M. C. da; ANDRADE, C. T.; AGUILA, E. M. D.; SILVA, J. T.; PASCHOALIN, V. M. F. Purificação e caracterização da quitinase de uva (*Vitis vinifera* L. CV RED GLOBE) para a produção de quitosana a partir de quitina de camarão. **Química Nova**, v. 33, n. 9, p. 1882-1886, 2010.
- GÖRG, A. **2-D Electrophoresis: Principles and Methods**. GE Healthcare Handbooks. Germany: Technical University of Munich, 2004. 162 p.
- GUO, G.; GE, P.; MA, C.; LI, X.; LV, D.; WANG, S.; MA, W.; YAN, Y. **Comparative proteomic analysis of salt response proteins in seedling roots of two wheat varieties**, v. 75, n. 6, p. 11867-1885, 2012.
- HOTTE, N.S.C.; DEYHOLOS, M.K.. A flax fibre proteome: identification of proteins enriched in bast fibres. **BMC Plant Biology**, v.8, n.52, p. 1-13, 2008.
- HU, Y.; BAO, F.; LI, J.; Promotive effect of brassinosteroids on cell division involves a distinct CycD3-induction pathway in Arabidopsis. **Plant Journal**, v. 24, p. 693–701, 2000.
- HURKMAN, W.J.; TANAKA, C.K.. Extraction of wheat endosperm proteins for proteome analysis. **Journal of Chromatography**, v. 849, n. 1-2, p. 344-350, 2007.
- IGLESIAS, C.; MAYER, J.; CHAVEZ, L; CALLE, F.. Genetic potential and stability of carotene content in cassava roots. **Euphytica**, v. 94, n. 3, p. 367-373, 1997.
- INSTITUTO AGRONÔMICO (IAC). Cultivares. **Mandioca IAC 13**. Disponível em: <<http://www.iac.sp.gov.br/cultivares/inicio/Folders%5CMandioca%5CIAC13.htm>>. Acesso 27 ago. 2013.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Indicadores IBGE. **Estatística da Produção Agrícola**: agosto 2013. Disponível em: <[http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/estProdAgr\\_201308.pdf](http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/estProdAgr_201308.pdf)>. Acesso em: 04 ago. 2013.
- KERN, M. F. **Expressão de uma quitinase de *Metarhizium anisopliae* EM *Nicotiana tabacum*: Obtenção de plantas transgênicas resistentes à doenças fúngicas**. 2003. 83 f. Dissertação de Mestrado – Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2003.
- LADEIRA, T.M.S; PENA R. da S.. Propriedades físico-químicas e tecnológicas dos polvilhos azedos de três cultivares de mandioca. **Alimentos e Nutrição**, v. 22, n. 4, p. 631-640, 2011.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.
- LI, K.; ZHU, W.; ZENG, K.; ZHANG, Z.; YE, J.; OU, W.; REHMAN, S.; HEUER, B.; CHEN, S.. Proteome characterization of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) somatic embryos, plantlets and tuberous roots. **Proteome Science**, v. 8, n. 10, p. 1-12, 2010.
- LIMA, U.A. **Manual técnico de beneficiamento e industrialização da mandioca**. São Paulo: Secretaria de Ciência e Tecnologia, 1982. 56 p. (Programa Adequação).
- LORENZI, J.O.; GUTIERREZ, L.E.; NORMANHA E.S.; CIONE, J.. Variação de carboidratos e ácido cianídrico em raízes de mandioca, após a poda da parte aérea. **Bragantia**, v. 37, n. 16, p. 139-144, 1978.
- MANUAL *Delta2D*: analyzing 2D gels as easy as point and click. Greifswald, 2011. 182 p.

- MANUAL DO USUÁRIO DO 'REVERSED-PHASE ZIPTIP®': Pipette Tips for Sample Preparation. Millipore, 2007.17 p.
- MATTICK, J.S. Challenging the dogma: the hidden layer of non-protein-coding RNAs in complex organisms. **BioEssays**, v.25, n. 10, p.930-939, 2003.
- MENDONÇA, H.A. de; MOURA, G. de M.; CUNHA, E.T.. Avaliação de genótipos de mandioca em diferentes épocas de colheita no Estado do Acre. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 38, n. 6, p. 761-769, 2003.
- MEZZETE, T.F.; CARVALHO, C.R.L.; MORGANO, M.A.; SILVA, M.G. da; PARRA, E.S.B.; GALERA, J.M.S.V.; VALLE, T. L.. Seleção de clones-elite de mandioca de mesa visando a características agronômicas, tecnológicas e químicas. **Bragantia**, v. 68, n. 3, p. 601-609, 2009.
- MITPRASAT, M.; ROYTRAKUL, S.; JIEMSUP, S.; BOONSENG, O.; Yokthongwattana, K. Leaf proteomic analysis in cassava (*Manihot esculenta*, Crantz) during plant development, from planting of stem cutting to storage root formation. **Planta**, v. 233, p. 1209-1221, 2011.
- MONTALDO, A. Vascular streaking of cassava root tuber. **Tropical Science**, v. 15, n. 1, p. 39-46, 1973.
- MOURA, G. de M. Avaliação de cultivares de mandioca em diferentes épocas de colheita, no Estado do Acre. **Revista Brasileira de Mandioca**, v. 17, n. 1/2, p. 13-23, 1998.
- MÜHLEN, G.S.; MARTINS, P.S.; ANDO, A.. Variabilidade genética de etnovarietades de mandioca, avaliada por marcadores e DNA. **Scientia Agricola**, v.57, n.2, p.319-328, 2000.
- NASSAR, N.; VIZZOTTO, C.S.; SCHWARTZ, C.A.; PIRES JÚNIOR, O.R.. Cassava Diversity in Brazil: the case of carotenoid-rich landraces. **Genetics and Molecular Research**, v. 06, n. 1, p. 116-121, 2007.
- NAWROCKI, A.; THORUP-KRISTENSEN, K.; JENSEN, O.N.. Quantitative proteomics by 2DE and MALDI MS/MS uncover the effects of organic and conventional cropping methods on vegetable products. **Journal of Proteomics**, v. 74, n. 12, p. 2810-2825, 2011.
- NEUHOFF, V.; AROLD, N.; TAUBE, D.; EHRHARDT, W.. Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. **Electrophoresis**, v. 9, p. 255-262, 1988.
- NEUHOFF, V.; STAMM, R.; EIBL, H.. Clear background and highly sensitive protein staining with Coomassie Blue dyes in polyacrylamide gels: A systematic analysis. **Electrophoresis**, 1985, v. 6, p. 427-448, 1985.
- NILO P.R.; CAMPOS-VARGAS, R.; ORELLANA, A. Assessment of *Prunus persica* fruit softening using a proteomics approach. **Journal of Proteomics**, v. 75, n. 5, p. 1618-1638, 2012.
- NOGUEIRA, S. B; LABATE, C. A.; GOZZO, F. C.; PILAU, E. J.; LAJOLO, F. M.; NASCIMENTO, J. R. O. do. Proteomic analysis of papaya fruit ripening using 2DE-DIGE. **Journal of Proteomics**, v. 75, n. 4, p. 1428-1439, 2012.
- OLIVEIRA, M.A. de; LEONEL, M.; CABELLO, C.; CEREDA, M.P.; JANES, D.A. Metodologia para avaliação do tempo de cozimento e características tecnológicas associadas em diferentes cultivares de mandioca. **Ciência e Agrotecnologia**, v.29, n.1, p.126-133, 2005.
- OLIVEIRA, M.A. de; MORAES, P.S.B. de. Características físico-químicas, cozimento e produtividade de mandioca cultivar IAC 576-70 em diferentes épocas de colheita. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 33, n. 3, p. 837-843, 2009.
- OLIVEIRA, M.V.C.; BALIZA, D.P.; SOUZA, G.A.; CARVALHO, S.P.; ASSIS, L; H.B.. Caracterização de clones de mandioca utilizando marcadores microssatélites. **Revista Ciência Agronômica**, v. 43, n.1, p. 170-176, 2012.

- OLSEN, K.M.; SCHAAL, B.A. Evidence on the origin of cassava: Phylogeography of *Manihot esculenta*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, n. 10, p. 5586-5591, 1999.
- PANDEY, A.; CHAKRABORTY, S.; DATTA, A.; CHAKRABORTY, N.. Proteomics Approach to Identify Dehydration Responsive Nuclear Proteins from Chickpea (*Cicer arietinum* L.). **Proteomics**, v.7, p. 88-107, 2008.
- PEREIRA, A.S.; LORENZI, J.O.; VALLE, T.L. Avaliação do tempo para cozimento e padrão de massa cozida em mandioca de mesa. **Revista Brasileira de Mandioca**, v.47, n.1, p.27-32, 1985.
- PEREIRA, A.S.; NERY, J.P.; IGUE, T.. Seleção de novos clones de mandioca para mesa, pela toxicidade e paladar de suas raízes "in natura". **Bragantia**, v.24, n.10, p. LV-LVIII, 1965.
- PEREIRA, A.S.; PINTO, M.G. Determinação da toxicidade da mandioca pelo paladar das raízes "in natura". **Bragantia**, v.21, n.25, p.CXLV-CL, 1962.
- PHYTOZOME. **Adenine phosphoribosyltransferase**: 2013. Disponível em: <[http://phytozome.com/show\\_cluster.php?method=3432&search=1&searchText=clusterid%3A37807396&detail=1](http://phytozome.com/show_cluster.php?method=3432&search=1&searchText=clusterid%3A37807396&detail=1)>. Acesso em: 21 set. 2013.
- PHYTOZOME. **Cytochrome P450, family 71, subfamily B, polypeptide 37**: 2013. Disponível em: <[http://phytozome.net/show\\_cluster.php?method=3428&search=1&searchText=clusterid%3A37467069&detail=1](http://phytozome.net/show_cluster.php?method=3428&search=1&searchText=clusterid%3A37467069&detail=1)>. Acesso em: 21 set. 2013.
- PHYTOZOME. **Profilin**: 2013. Disponível em: <<http://www.phytozome.net/genePage.php?search=1&detail=1&crown&method=0&searchText=locusname:Glyma01g00920>>. Acesso em: 21 set. 2013.
- PLANT PATCHWAY DATABASE. Patchways. **AT5G49650 / xylulose kinase-2**: 2013. Disponível em: <[http://metnetonline.org/browse\\_entity2.php?entID=6898](http://metnetonline.org/browse_entity2.php?entID=6898)>. Acesso em: 20 set. 2013.
- PROCHNIK, S.; MARRI, P. R.; DESANY, B.; RABINOWICZ, P. D.; KODIRA, C.; MOHIUDDIN, M.; RODRIGUEZ, F.; FAUQUET, C.; TOHME, J.; HARKINS, T.; ROKHSAR, D. S.; ROUNSLEY, S. The Cassava Genome: Current Progress, Future Directions. **Tropical Plant Biology**, v. 5, p. 88-94, 2012.
- PUTTHACHAROEN, S.; HOWLER, R. H.; JANTARWAT, S.; VICHUKIT, V. Nutrient uptake and soil erosion losses in cassava and six other crops in a Psament in eastern Thailand. **Field Crops Research**, v.57, p.113-126, 1998.
- QUEIROZ, de D.; PAIVA, A. de A.; PEDRAZA, D. F.; CUNHA, M. A. L. da; ESTEVES, G. H.; LUNA, J. G. de; DINIZ, A. da S. Deficiência de vitamina A e fatores associados em crianças de áreas urbanas. **Revista de Saúde pública**, v. 47, n. 2, p. 248-256, 2013.
- ROGERS, D.J.; APPAN, S.G. **Manihot and Manihotoides (Euforbiaceae): a computer-assisted study**: flora neotropica. New York: Hafner, 1973. 272p.
- SALVATO, F.; CARVALHO, M.C da C.G. de. Métodos e estratégias em proteômica e suas aplicações na área vegetal. **Ciência Rural**, v. 40 , n. 3, p. 727-734, 2010.
- SANCHEZ-BEL, P.; EGEEA, I.; SANCHEZ-BALLESTA, M.T.; SEVILLANO, L.; BOLARIN, M. del C.; FLORES, F.B.. Proteome Changes in Tomato Fruits Prior to Visible Symptoms of Chilling Injury are Linked to Defensive Mechanisms, Uncoupling, of Photosynthetic Processes and Protein Degradation Machinery. **Plant Cell Physiology**, v. 53, n. 2, p. 470-484, 2012.
- SANGER INSTITUTE. Pfam. **Family Ank: PF00023**: 2013. Disponível em: <<http://pfam.sanger.ac.uk/family/PF00023?type=Family>>. Acesso em: 23 set. 2013.

- SANGER INSTITUTE. Pfam. **Family Oleosin: PF01277:** 2013. Disponível em: <<http://pfam.sanger.ac.uk/family/PF01277?type=Family>>. Acesso em: 21 set. 2013.
- SANTAMARIA HERNANDEZ, E.; CONTRERAS GUILLEN, J. Composición química de seis variedades de yuca (*Manihot esculenta*, Crantz) en distintas etapas do desarrollo. **Agricultura Técnica en México**, v. 10, n. 1, p. 316-321, 1984.
- SANTOS, R.P., CARMO, M.G.F. do; PARRAGA, M.S.; MACAGNAN, D.; LOPES, C.A.. Avaliação de cultivares de mandioca, para consumo *in natura*, quanto à resistência à mancha parda da folha. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 22, n. 2, p. 232-237, 2004.
- SEAGRI. **Cultura da mandioca:** 2013. Disponível em:< <http://www.seagri.ba.gov.br/mandioc1.htm>>. Acesso em: 25 set. 2013.
- SGHAIER-HAMMAMI, B.; REDONDO-LÓPEZ, I.; MALDONADO-ALCONADA, A.M.; ECHEVARRÍA-ZOMEÑO, S.; JORRÍN-NOVO, J.V.. A proteomic approach analysing the *Arabidopsis thaliana* response to virulent and avirulent *Pseudomonas syringae* strains. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 34, n. 3 p. 905-922, 2012.
- SHEFFIELD, J.; TAYLOR, N.; FAUQUET, C.; CHEN, S.. The cassava (*Manihot esculenta* Crantz) root proteome: Protein identification and differential expression. **Proteomics**, v.6, n. 5, p. 1588-1598, 2006.
- SHEVCHENKO, A.; THOMAS, H.; HAVLI, J.; OLSEN, J. V.; MANN, M. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. **Nature Protocols**, v. 1, p. 2856-2860, 2007. doi:10.1038/nprot.2006.468.
- SILVA, A.F.; SANTANA, L.M. de; FRANÇA, C.R.R.S.; MAGALHÃES, C.A. de S.; ARAÚJO, C.R. de; AEVEDO, S.G. de. Produção de diferentes variedades de mandioca em sistema agroecológico. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 13, n.1, p. 33-38, 2009.
- SILVA, A.M. da S.; CORRÊA, G.C.; REIS, E.M.. Proteômica – Uma abordagem funcional do estudo do genoma. **Saúde e Ambiente em revista**, v. 2, n. 2, p. 01-10, 2007.
- SILVEIRA, E. da. Mandioca vitaminada: tubérculo e feijão mais nutritivos estão disponíveis para a alimentação dos brasileiros. **Pesquisa FAPESP**, ed. 200, p. 100-103, 2012.
- SIQUEIRA, M. V. B. M. **Diversidade genética de etnovarietades de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) em áreas de Cerrado no Estado do Mato Grosso do Sul e de variedades comerciais por meio de marcadores microsatélites.** 2008. 88 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia Aplicada) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.
- SIQUEIRA, M. V. B. M.; BORGES, A.; VALLE, T. L.; VEASEY, E. A. A comparative genetic diversity assessment of industrial and household Brazilian cassava varieties using SSR markers. **Bragantia**, v. 70, n. 4, p. 745-752, 2011.
- SOUZA, J.M. de; NEGREIROS, J.R. da S.; ÁLVARES, V. de S.; LEITE, F.M.N.; SOUZA, M.L. de; REIS, F.S.; FELISBERTO, F.A.V.. Variabilidade físico-química da farinha de mandioca. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.28, n.4, p. 907-912, 2008.
- SOUZA, L. da S.; FARIAS, A.R.N.; MATTOS, P.L.P. de; FUKUDA, W.M.G.. **Aspectos socioeconômicos e agrônômicos da mandioca.** Cruz Das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2006. 817 p.
- THE ARABIDOPSIS INFORMATION RESOURCE (TAIR). Gene Model: AT4G14880.1. **O-acetylserine(thiol)lyase:** 2013. Disponível em: < <http://arabidopsis.org/servlets/TairObject?type=gene&name=AT4G14880.1>>. Acesso em: 19 set. 2013.
- THE ARABIDOPSIS INFORMATION RESOURCE (TAIR). Gene Model: AT4G19820.1. **Glycosyl hydrolase family protein with chitinase insertion domain:** 2013. Disponível em: <<http://www.arabidopsis.org/servlets/TairObject?type=gene&name=At4g19820.1>>. Acesso em: 20 set. 2013.

THE ARABIDOPSIS INFORMATION RESOURCE (TAIR). **Gene Model: AT5G54770.1**: 2013. Disponível em: <<http://arabidopsis.org/servlets/TairObject?type=gene&name=AT5G54770.1>>. Acesso em: 20 set. 2013.

THE ARABIDOPSIS INFORMATION RESOURCE (TAIR). Gene Model: AT1G53770.2. **O-fucosyltransferase family protein**: 2013. Disponível em: <<http://arabidopsis.org/servlets/TairObject?type=gene&name=AT1G53770.2>>. Acesso em: 23 set. 2013.

THE ARABIDOPSIS INFORMATION RESOURCE (TAIR). **Glicosyltransferase Gene Families**: 2013. Disponível em: <<http://www.arabidopsis.org/browse/genefamily/Glycosyltransferase.jsp>>. Acesso em: 20 set. 2013.

THE ARABIDOPSIS INFORMATION RESOURCE (TAIR). Locus: AT1G01880. **5'-3' exonuclease family protein**: 2013. Disponível em: <<http://www.arabidopsis.org/servlets/TairObject?type=locus&id=29136>>. Acesso em: 21 set. 2013.

THE ARABIDOPSIS INFORMATION RESOURCE (TAIR). Locus: AT1G13440. **Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase C2**: 2013. Disponível em: <<http://arabidopsis.org/servlets/TairObject?type=locus&name=At1g13440>>. Acesso em: 21 set. 2013.

THE ARABIDOPSIS INFORMATION RESOURCE (TAIR). Locus: AT1G20870. **HSP20-like chaperones superfamily protein**: 2013. Disponível em: <<http://arabidopsis.org/servlets/TairObject?type=locus&name=At1g20870>>. Acesso em: 21 set. 2013.

THE ARABIDOPSIS INFORMATION RESOURCE (TAIR). Locus: AT1G50180. **NB-ARC domain-containing disease resistance protein**: 2013. Disponível em: <<http://www.arabidopsis.org/servlets/TairObject?name=AT1G50180&type=locus>>. Acesso em: 21 set. 2013.

THE ARABIDOPSIS INFORMATION RESOURCE (TAIR). Locus: AT1G78300. **General regulatory fator 2**: 2013. Disponível em: <<http://www.arabidopsis.org/servlets/TairObject?accession=locus:2032060>>. Acesso em: 21 set. 2013.

THE ARABIDOPSIS INFORMATION RESOURCE (TAIR). Locus: AT3G09640. **Ascorbate peroxidase 2**: 2013. Disponível em: <<http://arabidopsis.org/servlets/TairObject?type=locus&name=At3g09640>>. Acesso em: 20 set. 2013.

THE ARABIDOPSIS INFORMATION RESOURCE (TAIR). Locus: AT3G13610. **2-oxoglutarate (2OG) and Fe(II)-dependent oxygenase superfamily protein**: 2013. Disponível em: <<http://www.arabidopsis.org/servlets/TairObject?name=at3g13610&type=locus>>. Acesso em: 20 set. 2013.

THE ARABIDOPSIS INFORMATION RESOURCE (TAIR). Locus: AT3G15020. **Lactate/malate dehydrogenase family protein**: 2013. Disponível em: <<http://arabidopsis.org/servlets/TairObject?type=gene&name=AT3G15020.1>>. Acesso em: 20 set. 2013.

THE ARABIDOPSIS INFORMATION RESOURCE (TAIR). Locus: AT3G25717. **ROTUNDIFOLIA like 16**: 2013. Disponível em: <<http://arabidopsis.org/servlets/TairObject?type=locus&name=AT3G25717>>. Acesso em: 21 set. 2013.

THE ARABIDOPSIS INFORMATION RESOURCE (TAIR). Locus: AT3G27640. **Transducin/WD40 repeat-like superfamily protein**: 2013. Disponível em: <<http://www.arabidopsis.org/servlets/TairObject?type=locus&name=At3g27640>>. Acesso em: 21 set. 2013.

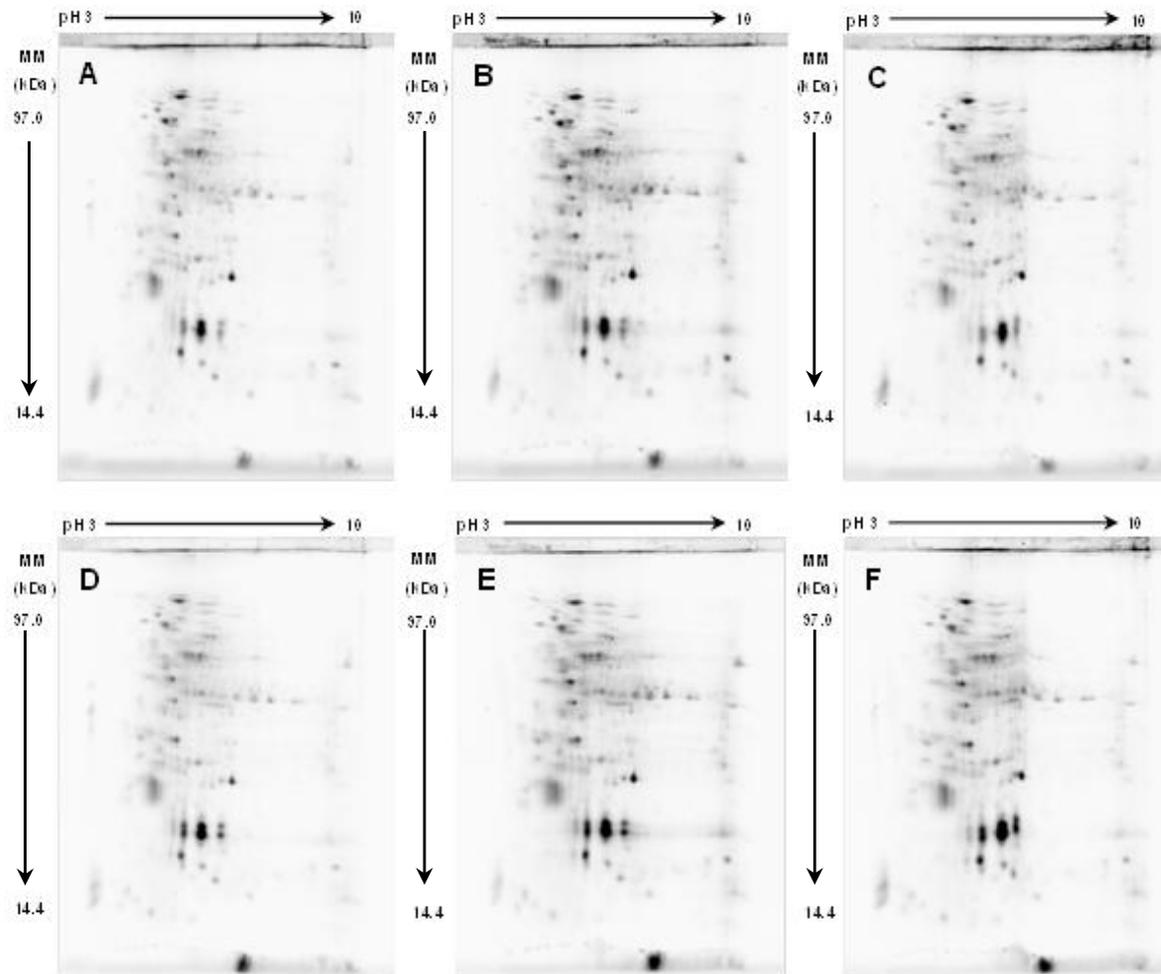
THE ARABIDOPSIS INFORMATION RESOURCE (TAIR). Locus: AT3G46970. **Alpha-glucan phosphorylase 2**: 2013. Disponível em: <<http://www.arabidopsis.org/servlets/TairObject?type=locus&id=35813>>. Acesso em: 20 set. 2013.

TOLEDO, T.T.; NOGUEIRA, S.B.; CORDENUNSI, B.R.; GOZZO, F.C.; PILAU, E.J.; LAJOLO, F.M.; NASCIMENTO, J.R.O. do. Proteomic analysis of banana fruit reveals proteins that are differentially accumulated during ripening. **Postharvest Biology and Technology**, v. 70, p. 51-58, 2012.

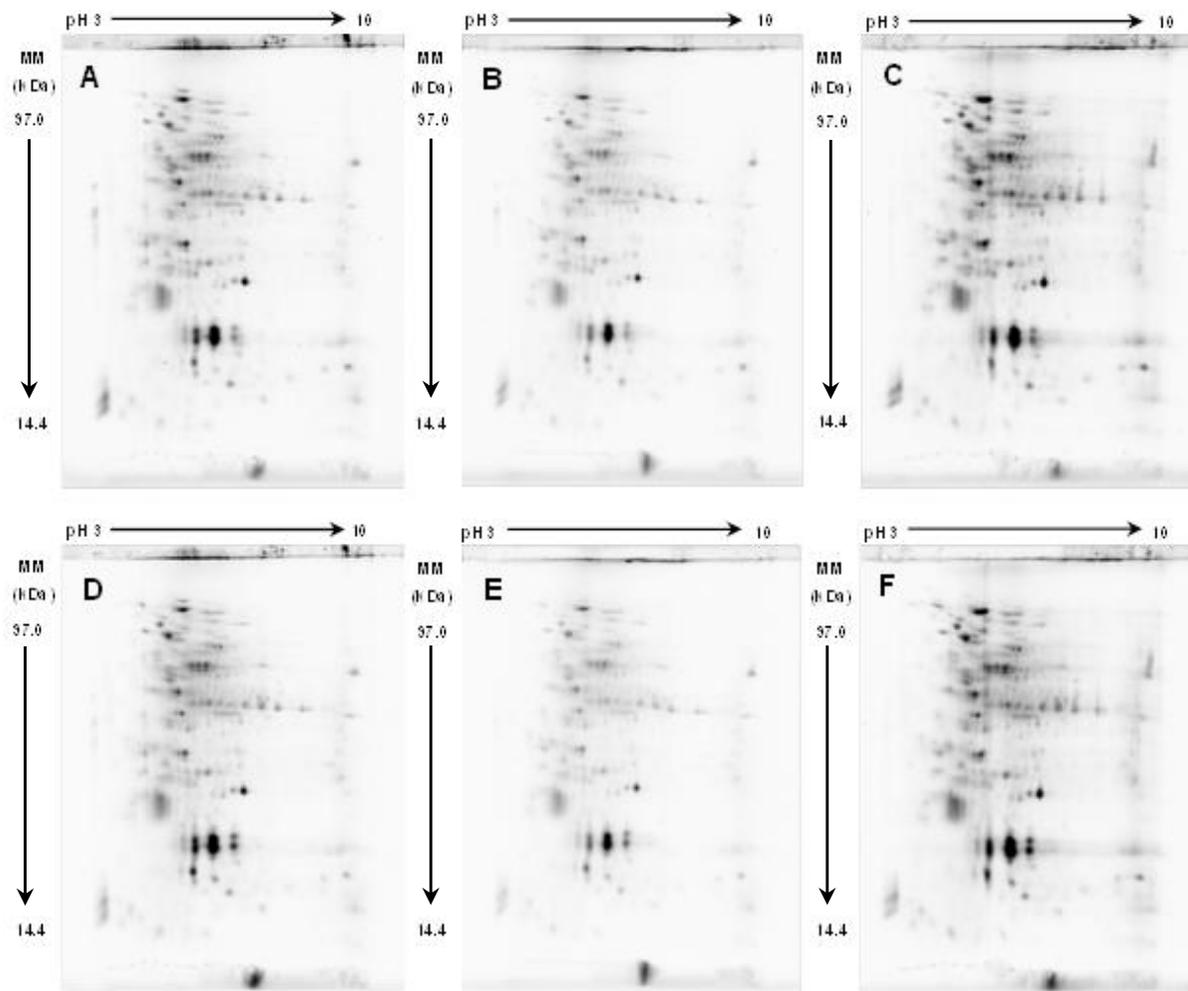
TYERS, M.; MANN, M. From genomics to proteomics. **Nature**, v.422, n.6928, p.193-197, 2003.

- VALLE, T. L. **Informações variedades de mandioca** [mensagem pessoal]. Mensagem recebida por <teresalv@iac.sp.gov.br > em 16 mar. 2012.
- VALLE, T. L. **Projeto mandioca** [mensagem pessoal]. Mensagem recebida por <teresalv@iac.sp.gov.br > em 18 ago. 2013.
- VALLE, T.L.; CARVALHO, C.R.L.; RAMOS, M.T.B.; MÜHLEN, G.S.; VILLELA, O.V. Conteúdo cianogênico em progênies de mandiocas originadas do cruzamento de variedades mansas e bravas. **Bragantia**, v. 63, n. 2, p. 221-226, 2004.
- VENDRAMINI, J.M.; NEVES, L.G.; BARELLI, M.A.A.; ELIAS, J.C. F; LUZ, P.B. da. Otimização do uso dos descritores morfo-agronômicos de mandioca em análise multivariada. **Revista Ciência Agronômica**, v.42, n.4, p.906-913, 2011.
- VIDIGAL FILHO, P.S.; PEQUENO, M.G.; SCAPIM, C.A.; VIDIGALI, M.C.G.; MAIA, R.R.; SAGRILO, E.; SIMON, G.A.; LIMAR, R.S. 2000. Avaliação de cultivares de mandioca na região noroeste do Paraná. **Bragantia** **59**: 69-75.
- VIEIRA, E.A.; FIALHO, J. de F.; FALEIRO, F.G.; BELLON, G.; FONSECA, K.G. da; CARVALHO, L.J.C.B.; SILVA, M.S.. Caracterização molecular e variabilidade genética de acessos elite de mandioca para fins industriais. **Ciência Rural**, v.40, n.12, p. 2467-2471, 2010.
- VIEIRA, E.A.; FIALHO, J. de F; FALEIRO, F.G.; BELLON, G.; SILVA, M.S.. Caracterização molecular de acessos de mandioca biofortificados com potencial de uso no melhoramento genético. **Revista Ciência Agronômica**, v. 42, n. 2, p. 457-463, 2011.
- VILPOUX, O. Desempenho dos arranjos institucionais e minimização dos custos de transação: transações entre produtores e fecculárias de mandioca. **Revista de Economia e Sociologia Rural**, v.49, n.2, p.271-294, 2011.
- VILPOUX, O.F. Competitividade da mandioca no Brasil, como matéria prima para amido. **Informações Econômicas**, v.38, p.27-38, 2008.
- WASINGER, V.C.; CORDWELL, S.J.; CERPA-POLIAK, A.; YAN, J.X.; GOOLEY, A.A.; WILKINS, M.R.; DUNCAN, M.W.; HARRIS, R.; WILLIAMS, K.L.; HUMPHERY-SMITH, I.. Progress with gene product mapping of the Mollicutes: *Mycoplasma genitalium*. **Electrophoresis**, v.16, n. 1, p. 1090-1094, 1995.
- WILKINS, M.R.; JEAN-CHARLES, S.; WILLIAMS, K.L.; HOCHSTRASSER, D.F.. Current challenges and future applications for protein maps and posttranslational vector maps in proteome projects. **Electrophoresis**, v.17, n. 5, p.830-838, 1996.
- XU, H.; ZHANG, W.; GAO, Y.; ZHAO, Y.; GUO, L.; WANG, J.. Proteomic analysis of embryo development in rice (*Oryza sativa*). **Planta**, v. 235, n. 4, p. 687-701, 2012.
- YANG, P.; LI, X.; WANG, X.; CHEN, H.; CHEN, F.; SHEN, S.. Proteomic analysis of rice (*Oryza sativa*) seeds during germination. **Proteomics**, v.7, n. 18, p. 3358-3368, 2007.
- ZHANG, L.; YU, Z.; JIANG, L.; JIANG, J.; LUO, H.; FU, L.. Effect of post-harvest heat treatment on proteome change of peach fruit during ripening. **Journal of Proteomics**, v. 74., n. 7, p. 1135-1149, 2011.
- ZHEN, Y.; ZHAO, Z-Z.; ZHENG R-H.; SHI, J.. Proteomic analysis of early seed development in *Pinus massoniana* L. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 54, p. 97-104, 2012.

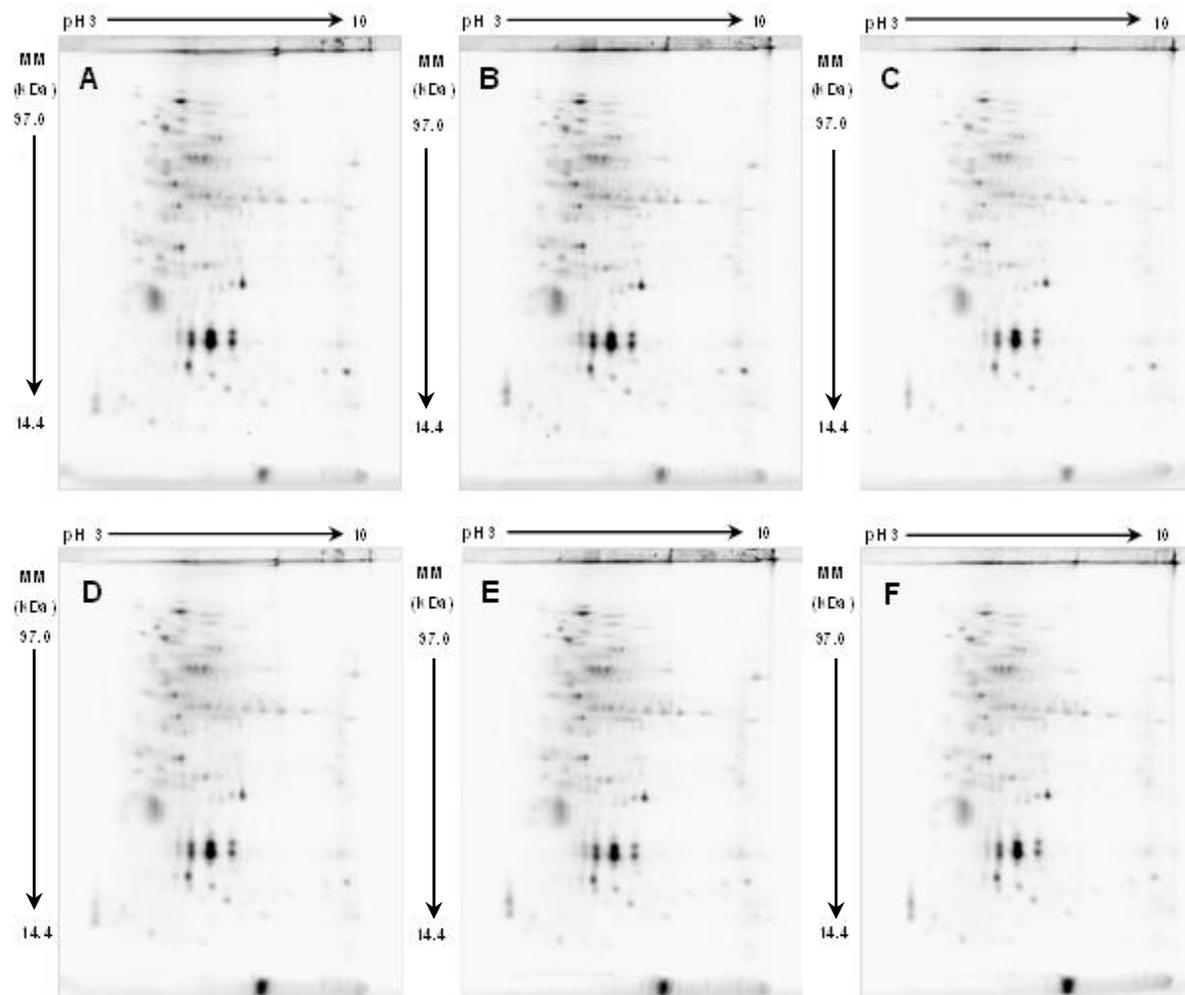
## ANEXO A – Imagens de géis 2-D referentes à técnica 2-D DIGE



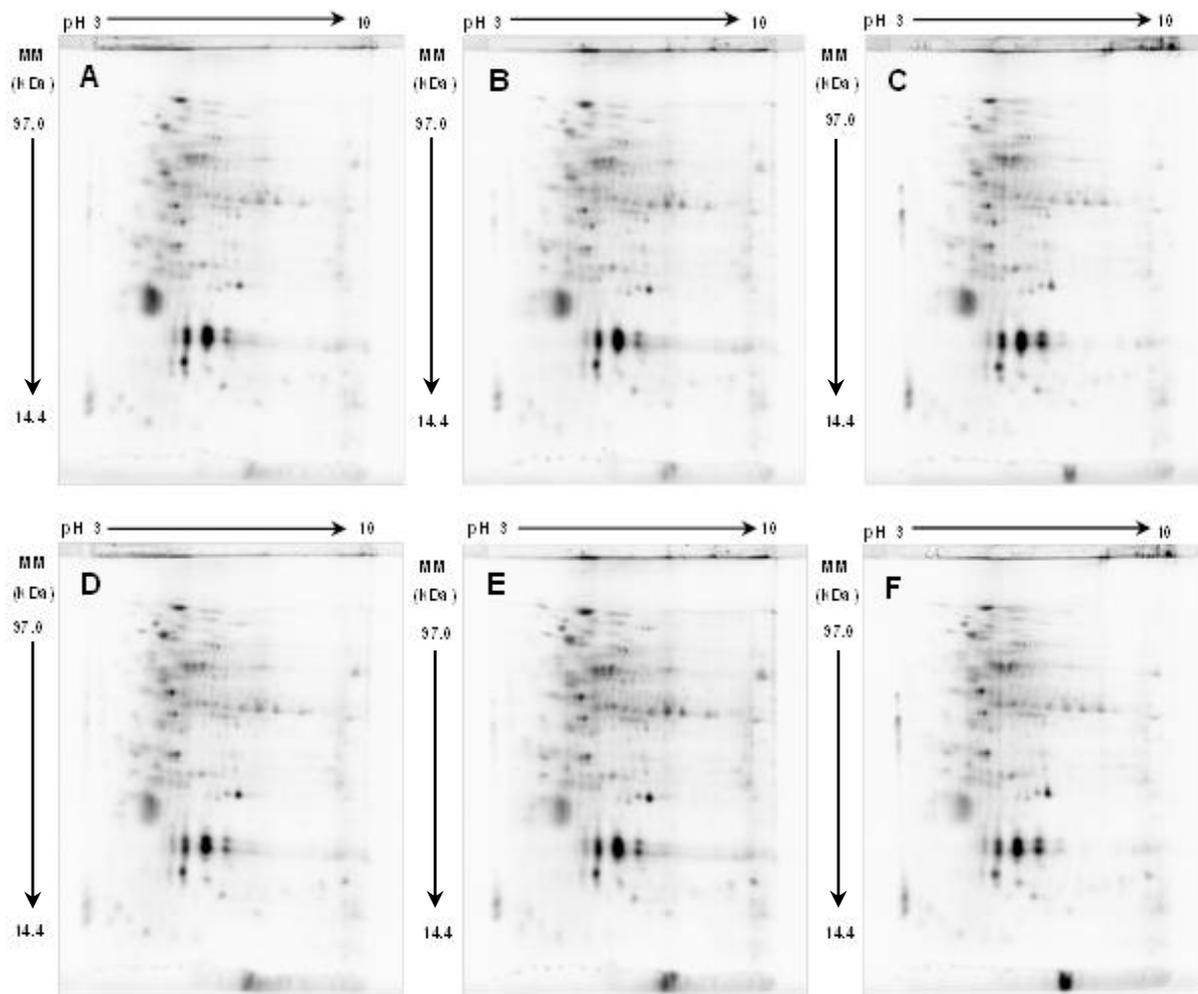
**Figura 17** - Imagens representativas de 2-D DIGE referentes às aplicações de 50 µg de proteínas extraídas da raiz tuberosa da mandioca Cigana Preta (amostra), juntamente a 50 µg do pool. Foram utilizadas tiras de pH 3-10, 7 cm. À esquerda das imagens, encontram-se os padrões de massa molecular *LMW calibration kit for SDS electrophoresis* (MM), sendo que seus marcadores estão expressos em kDa. **(A-C)** Amostra marcada com Cy3 (triplicata). **(D)** Pool marcado com Cy5, relativo ao gel da imagem **(A)**. **(E)** Pool marcado com Cy5, relativo ao gel da imagem **(B)**. **(F)** Pool marcado com Cy5, relativo ao gel da imagem **(C)**. Todos os géis foram submetidos a 30 s de exposição em *VersaDoc MP 4000*.



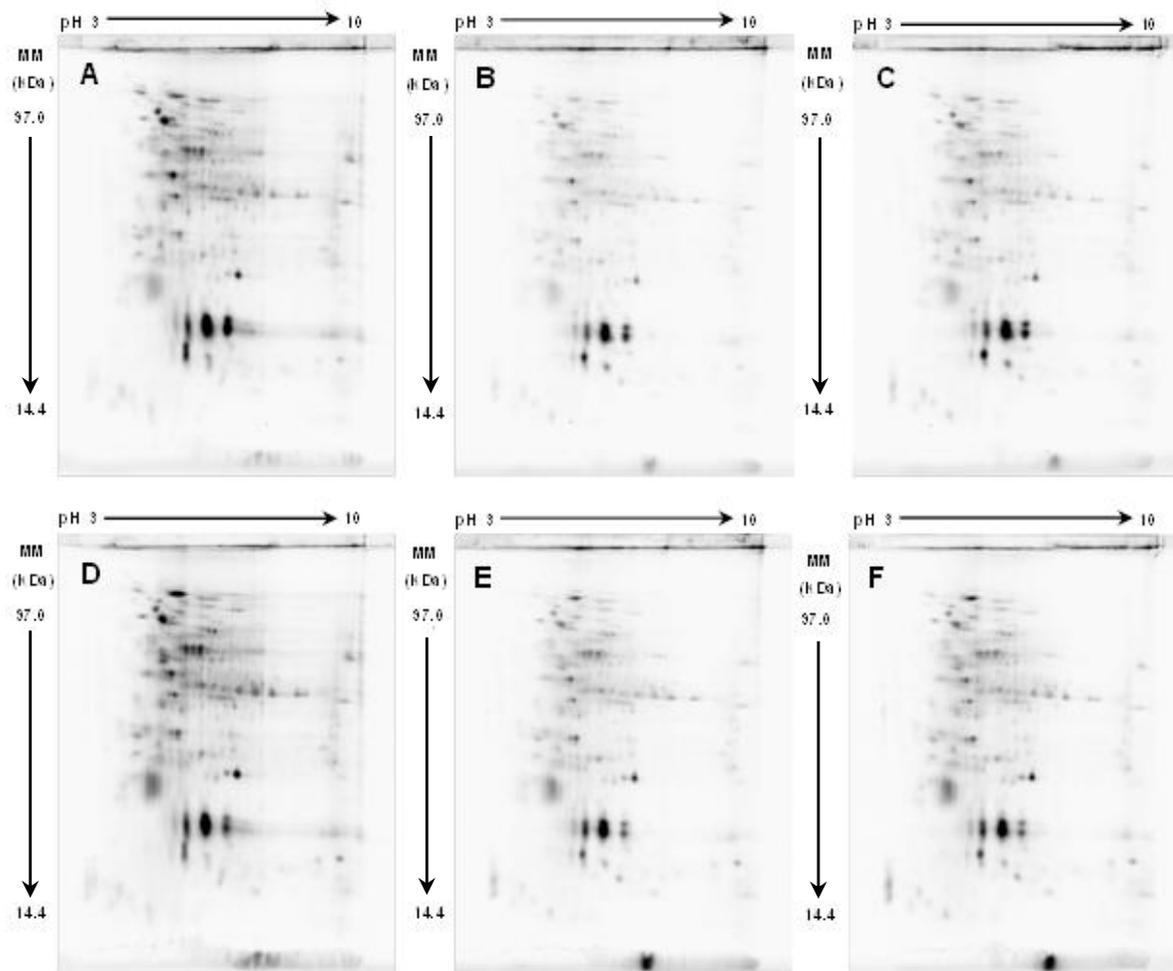
**Figura 18** - Imagens representativas de 2-D DIGE referentes às aplicações de 50 µg de proteínas extraídas da raiz tuberosa da mandioca IAC 12 (amostra), juntamente a 50 µg do *pool*. Foram utilizadas tiras de pH 3-10, 7 cm. À esquerda das imagens, encontram-se os padrões de massa molecular *LMW calibration kit for SDS electrophoresis* (MM), sendo que seus marcadores estão expressos em kDa. (A-C) Amostra marcada com *Cy3* (triplicata). (D) *Pool* marcado com *Cy5*, relativo ao gel da imagem (A). (E) *Pool* marcado com *Cy5*, relativo ao gel da imagem (B). (F) *Pool* marcado com *Cy5*, relativo ao gel da imagem (C). Todos os géis foram submetidos a 30 s de exposição em *VersaDoc MP 4000*.



**Figura 19** - Imagens representativas de 2-D DIGE referentes às aplicações de 50 µg de proteínas extraídas da raiz tuberosa da mandioca IAC 576-70 (amostra), juntamente a 50 µg do *pool*. Foram utilizadas tiras de pH 3-10, 7 cm. À esquerda das imagens, encontram-se os padrões de massa molecular *LMW calibration kit for SDS electrophoresis* (MM), sendo que seus marcadores estão expressos em kDa. (A-C) Amostra marcada com Cy3 (triplicata). (D) *Pool* marcado com Cy5, relativo ao gel da imagem (A). (E) *Pool* marcado com Cy5, relativo ao gel da imagem (B). (F) *Pool* marcado com Cy5, relativo ao gel da imagem (C). Todos os géis foram submetidos a 30 s de exposição em *VersaDoc MP 4000*.



**Figura 20** - Imagens representativas de 2-D DIGE referentes às aplicações de 50 µg de proteínas extraídas da raiz tuberosa da mandioca IAC 90 (amostra), juntamente a 50 µg do *pool*. Foram utilizadas tiras de pH 3-10, 7 cm. À esquerda das imagens, encontram-se os padrões de massa molecular *LMW calibration kit for SDS electrophoresis* (MM), sendo que seus marcadores estão expressos em kDa. (A-C) Amostra marcada com *Cy3* (triplicata). (D) *Pool* marcado com *Cy5*, relativo ao gel da imagem (A). (E) *Pool* marcado com *Cy5*, relativo ao gel da imagem (B). (F) *Pool* marcado com *Cy5*, relativo ao gel da imagem (C). Todos os géis foram submetidos a 30 s de exposição em *VersaDoc MP 4000*.



**Figura 21** - Imagens representativas de 2-D DIGE referentes às aplicações de 50 µg de proteínas extraídas da raiz tuberosa da mandioca IAC 06-01 (amostra), juntamente a 50 µg do *pool*. Foram utilizadas tiras de pH 3-10, 7 cm. À esquerda das imagens, encontram-se os padrões de massa molecular *LMW calibration kit for SDS electrophoresis* (MM), sendo que seus marcadores estão expressos em kDa. (A-C) Amostra marcada com *Cy3* (triplicata). (D) *Pool* marcado com *Cy5*, relativo ao gel da imagem (A). (E) *Pool* marcado com *Cy5*, relativo ao gel da imagem (B). (F) *Pool* marcado com *Cy5*, relativo ao gel da imagem (C). Todos os géis foram submetidos a 30 s de exposição em *VersaDoc MP 4000*.

## ANEXO B – Intensidade média dos 146 *spots* com significativa variação de abundância

**Tabela 6 (Continua)** - Intensidade média dos 146 *spots* com significativa variação de abundância entre as seis variedades estudadas (Vassourinha Paulista, Cigana Preta, IAC 12, IAC 576-70, IAC 90 e IAC 06-01).

Spots	Variedades					
	Vassourinha	Cigana	IAC 12	IAC 576-70	IAC 90	IAC 06-01
S3	0,01038	0,02526	0,02977	0,01365	0,05341	0,07444
S5	0,02708	0,04801	0,02382	0,09066	0,03327	0,03455
S9	0,06698	0,16193	0,08528	0,16553	0,11509	0,16309
S10	0,09965	0,28110	0,13895	0,14627	0,15461	0,18384
S14	0,34881	0,27417	0,47266	0,59927	0,41957	0,68131
S15	0,11847	0,10299	0,17228	0,23555	0,31296	0,26145
S16	0,10397	0,09340	0,16222	0,13072	0,24588	0,19241
S17	0,21116	0,16549	0,20956	0,26880	0,44940	0,29997
S18	0,06065	0,06562	0,11484	0,12511	0,12266	0,19475
S30	0,07118	0,09949	0,08253	0,25286	0,09900	0,13770
S31	0,16328	0,15148	0,14055	0,06690	0,09763	0,13237
S34	0,07606	0,14140	0,18607	0,10374	0,10439	0,19620
S35	0,62437	0,43988	0,44111	0,44392	0,51551	0,28261
S40	0,27113	0,35643	0,27199	0,38054	0,25826	0,30316
S42	0,29977	0,28504	0,23951	0,26624	0,23748	0,39875
S43	0,05409	0,11861	0,05931	0,05589	0,06099	0,05967
S44	0,02079	0,02931	0,03837	0,12417	0,00905	0,11458
S45	0,36467	0,32190	0,34566	0,25984	0,36242	0,11943
S47	0,00492	0,01132	0,01388	0,10311	0,00493	0,06273
S48	0,16098	0,11659	0,10766	0,08515	0,03598	0,12066
S49	0,03414	0,00330	0,00238	0,01178	0,00152	0,01484
S50	0,10035	0,04945	0,04707	0,08100	0,04821	0,03849
S51	0,06004	0,03663	0,02546	0,08564	0,03722	0,16743
S52	0,09475	0,13750	0,07277	0,08590	0,12282	0,05150
S53	0,45800	0,16657	0,14830	0,06513	0,27570	0,09712
S55	0,06807	0,13508	0,08314	0,13256	0,11146	0,04756
S57	0,26133	0,24695	0,18399	0,11719	0,33743	0,23120
S58	0,08102	0,19763	0,09048	0,09410	0,12946	0,18580
S59	0,06326	0,05759	0,03605	0,07994	0,03208	0,10877
S60	0,07248	0,07988	0,05049	0,10426	0,06862	0,12000
S61	0,05296	0,05928	0,03180	0,05561	0,11023	0,08144
S62	0,09005	0,10420	0,07112	0,06937	0,13124	0,08000
S63	0,13299	0,08196	0,14448	0,05366	0,18725	0,04256
S64	0,10971	0,09413	0,08592	0,05098	0,03399	0,08817
S65	0,03704	0,04322	0,01972	0,02539	0,02849	0,01189
S66	0,02220	0,04706	0,01311	0,01117	0,06369	0,00801
S67	0,08832	0,16047	0,07037	0,15426	0,09705	0,08361

**Tabela 6 (Continuação)** – Intensidade média dos 146 spots com significativa variação de abundância entre as seis variedades estudadas (Vassourinha Paulista, Cigana Preta, IAC 12, IAC 576-70, IAC 90 e IAC 06-01).

Spots	Variedades					
	Vassourinha	Cigana	IAC 12	IAC 576-70	IAC 90	IAC 06-01
S68	0,02627	0,04485	0,04238	0,01699	0,02924	0,04292
S69	0,07901	0,05319	0,07392	0,03865	0,01335	0,05166
S70	0,09630	0,04768	0,16467	0,14784	0,13003	0,23811
S72	0,40670	0,41107	0,31261	0,46201	0,52137	0,40673
S73	0,08530	0,04976	0,05375	0,01901	0,03900	0,03390
S74	0,24082	0,23760	0,22965	0,16280	0,16570	0,14682
S75	0,29512	0,27073	0,33711	0,25208	0,15207	0,24481
S76	0,04995	0,08094	0,05021	0,10333	0,05299	0,08238
S77	0,12231	0,14780	0,13132	0,19978	0,12285	0,10290
S79	0,05132	0,04840	0,01961	0,04829	0,03504	0,05248
S80	0,05694	0,10238	0,04383	0,10112	0,04351	0,05240
S81	0,06278	0,05579	0,01828	0,02015	0,02316	0,07101
S82	0,12711	0,13106	0,12069	0,10343	0,07053	0,08478
S84	0,11142	0,07285	0,08820	0,03643	0,03884	0,03278
S88	0,01512	0,09334	0,02235	0,02630	0,00427	0,01516
S89	0,01758	0,01255	0,01260	0,03880	0,02175	0,02145
S92	0,54009	0,34251	0,63763	0,47560	0,46657	0,33749
S95	0,18982	0,14975	0,13218	0,09009	0,23553	0,21116
S97	0,09011	0,10842	0,09759	0,03494	0,04070	0,04327
S98	1,01377	1,90144	1,64455	2,24547	0,81283	1,08632
S99	0,50527	0,86737	0,57180	0,72962	0,27560	0,27044
S102	0,39225	0,57902	0,16427	0,22489	0,16638	0,19497
S103	0,05674	0,18160	0,06738	0,15275	0,05947	0,04015
S105	0,10329	0,25232	0,11692	0,13283	0,21059	0,09851
S106	0,32513	0,40786	0,25041	0,30940	0,22132	0,27694
S107	0,35804	0,39170	0,30203	0,36307	0,14322	0,15302
S112	0,06826	0,05489	0,06039	0,12111	0,05735	0,04695
S113	0,16100	0,23289	0,07051	0,12343	0,12966	0,10268
S114	0,11113	0,13160	0,06515	0,09143	0,11583	0,07468
S119	0,10346	0,07587	0,19728	0,15594	0,07811	0,51680
S126	0,29308	0,26844	0,29254	0,19555	0,19223	0,10866
S127	0,17622	0,22407	0,22844	0,18770	0,20173	0,07524
S132	0,08578	0,15842	0,04715	0,14853	0,22585	0,08335
S134	0,17189	0,20807	0,05812	0,22554	0,23991	0,05424
S140	0,54615	0,22715	0,30137	0,20249	0,21057	0,25438
S141	0,08739	0,03483	0,03142	0,09794	0,04946	0,14921
S142	0,21737	0,06146	0,10005	0,04040	0,03349	0,07834
S144	0,05262	0,07322	0,09531	0,05025	0,07328	0,29579
S149	0,00303	0,01465	0,00304	0,03346	0,00076	0,01729
S151	0,27906	0,50554	0,25043	0,10523	0,66501	0,16471
S152	0,03477	0,03882	0,03570	0,01375	0,09978	0,03817

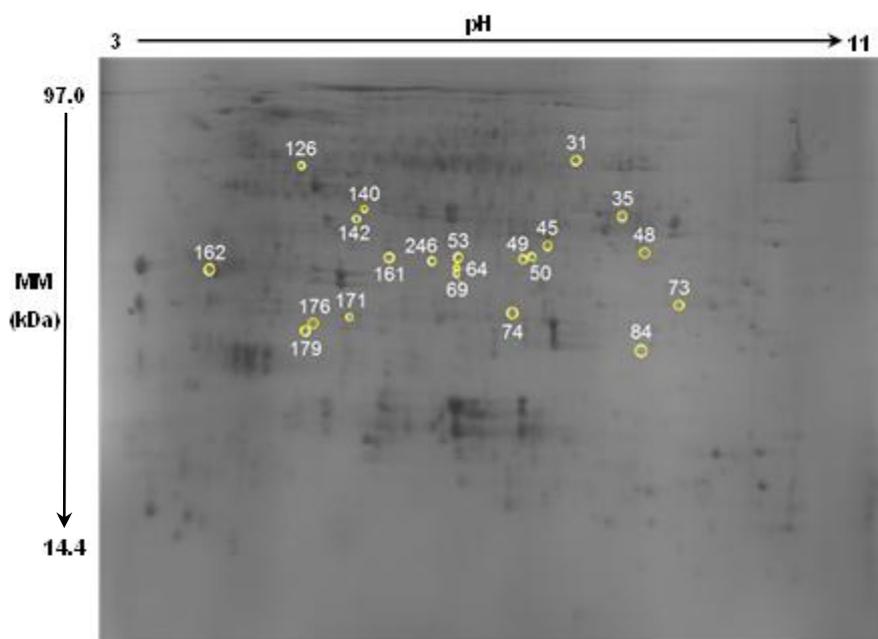
**Tabela 6 (Continuação)** – Intensidade média dos 146 *spots* com significativa variação de abundância entre as seis variedades estudadas (Vassourinha Paulista, Cigana Preta, IAC 12, IAC 576-70, IAC 90 e IAC 06-01).

Spots	Variedades					
	Vassourinha	Cigana	IAC 12	IAC 576-70	IAC 90	IAC 06-01
S153	0,19944	0,13948	0,22328	0,16119	0,17483	0,30120
S156	0,14444	0,31687	0,16981	0,15847	0,14454	0,17797
S157	0,08376	0,28324	0,11849	0,12901	0,07169	0,14595
S158	0,12687	0,06294	0,12248	0,16260	0,13128	0,09843
S161	0,07220	0,04016	0,03502	0,03954	0,04092	0,01180
S162	0,29546	0,11538	0,29380	0,25058	0,20074	0,22767
S163	1,19521	0,98251	1,46766	1,15706	0,96256	1,05180
S165	0,26875	0,18762	0,34619	0,19194	0,16874	0,12831
S168	0,22972	0,12135	0,40546	0,25382	0,16992	0,34408
S169	0,18296	0,20196	0,28883	0,15459	0,23154	0,19502
S170	0,15394	0,22887	0,21093	0,19399	0,33961	0,17318
S171	0,18089	0,15512	0,13569	0,10508	0,12084	0,08399
S174	0,39690	0,61181	0,40617	0,15636	0,27813	0,20329
S175	0,15930	0,22867	0,13694	0,24259	0,16859	0,15726
S176	0,44559	0,30312	0,29806	0,31818	0,28624	0,17448
S177	0,59004	0,61672	0,45375	0,39071	0,43971	0,25353
S179	0,08726	0,07145	0,05797	0,02504	0,05757	0,03571
S180	0,10593	0,10865	0,08454	0,05404	0,20779	0,10048
S181	1,26296	1,54619	1,72017	1,54330	1,64191	0,81057
S182	0,42085	0,33300	0,30145	0,39884	0,48564	0,26027
S184	0,21323	0,20075	0,15490	0,08029	0,27061	0,12821
S185	0,11990	0,11715	0,11593	0,11709	0,22832	0,09991
S188	0,23397	0,26893	0,20374	0,32177	0,72972	0,27689
S189	0,09036	0,07365	0,06069	0,03405	0,12706	0,05591
S190	0,07274	0,12357	0,02778	0,02934	0,14039	0,13771
S191	0,05886	0,12506	0,02680	0,03977	0,00714	0,03894
S196	2,77861	3,71041	3,87508	4,25893	4,02385	4,78974
S198	2,51441	2,46805	2,26433	2,85296	3,03222	3,09064
S199	0,64862	0,69081	0,82040	1,21704	0,92532	0,76892
S200	0,05846	0,19925	0,00446	0,01485	0,02805	0,07876
S203	0,51613	0,44259	0,27419	0,36898	0,81338	0,67838
S205	0,25551	0,18250	0,20805	0,19922	0,15735	0,44417
S206	0,07151	0,05679	0,30250	0,10140	0,06729	0,31410
S207	0,56836	0,65711	0,76193	0,49296	0,36760	0,94366
S208	0,99499	1,17169	0,96572	1,04187	0,60699	2,13306
S209	0,01134	0,03187	0,30925	0,03727	0,00570	0,12812
S210	0,14131	0,15877	0,05145	0,14995	0,06215	0,26725
S211	0,22101	0,28656	0,33633	0,36373	0,34497	0,49539
S212	0,07577	0,05441	0,05819	0,07975	0,24394	0,05988
S214	0,07291	0,10441	0,05082	0,09683	0,16877	0,08144
S215	0,04193	0,01570	0,06367	0,06686	0,10230	0,12637

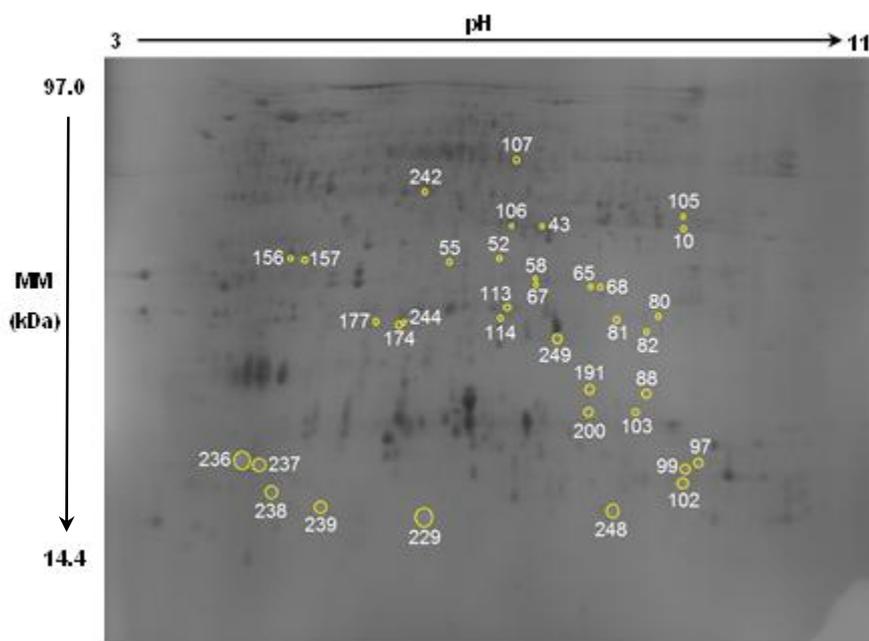
**Tabela 6 (Conclusão)** – Intensidade média dos 146 *spots* com significativa variação de abundância entre as seis variedades estudadas (Vassourinha Paulista, Cigana Preta, IAC 12, IAC 576-70, IAC 90 e IAC 06-01).

Spots	Variedades					
	Vassourinha	Cigana	IAC 12	IAC 576-70	IAC 90	IAC 06-01
S216	0,76812	0,82186	0,34041	0,65202	0,58279	1,39062
S217	0,17841	0,21820	0,14038	0,34214	0,20867	0,17525
S218	0,05056	0,03672	0,01328	0,01916	0,01192	0,08450
S219	0,03930	0,02360	0,09351	0,11945	0,04593	0,10840
S221	0,41677	0,38002	0,63221	0,67591	1,08011	0,77600
S222	0,12700	0,14209	0,15621	0,07426	0,38758	0,12181
S223	0,08374	0,16841	0,10424	0,24184	0,18884	0,34980
S224	1,26200	1,17235	1,24664	1,17788	1,28193	0,92240
S225	0,13794	0,09992	0,15356	0,18071	0,21330	0,12458
S226	0,04380	0,02442	0,04947	0,09070	0,04263	0,01123
S227	0,03973	0,09138	0,06071	0,06382	0,09831	0,20171
S229	0,09743	0,23663	0,11199	0,06042	0,04295	0,09625
S234	0,11384	0,05493	0,09758	0,08594	0,06055	0,12045
S235	0,04391	0,04875	0,02813	0,04949	0,04271	0,01308
S236	0,15624	0,25794	0,20896	0,14690	0,13885	0,06359
S237	0,28827	0,41443	0,16542	0,18040	0,17919	0,10341
S238	0,16437	0,18334	0,06468	0,06589	0,06655	0,02512
S239	0,04376	0,14449	0,04452	0,05400	0,04586	0,04842
S240	0,14055	0,12947	0,17244	0,14793	0,06509	0,05506
S242	0,28961	0,51713	0,23727	0,45713	0,38401	0,19940
S243	0,63443	0,85556	0,66517	0,82574	0,97753	0,64535
S244	0,09969	0,23787	0,03900	0,06819	0,04610	0,16979
S245	0,06121	0,09849	0,10491	0,06135	0,04588	0,04232
S246	0,09620	0,03207	0,02477	0,01161	0,08892	0,01115
S248	0,33544	0,61616	0,45465	0,54546	0,30480	0,27331
S249	1,88253	1,97428	1,30577	1,92693	1,24291	1,23236
S250	0,00690	0,00434	0,00443	0,05883	0,01607	0,12341

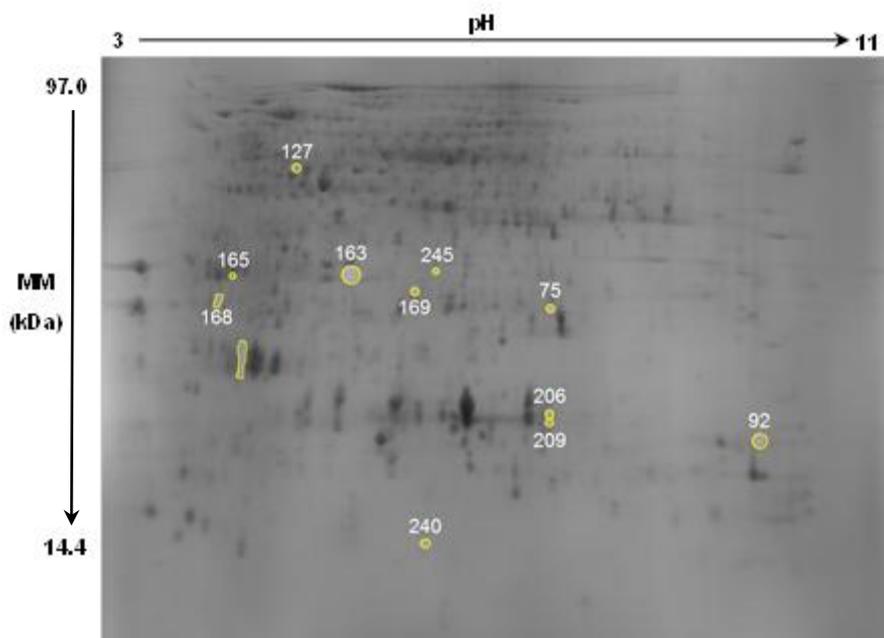
## ANEXO C – Imagens dos géis preparativos com os *spots* coletados



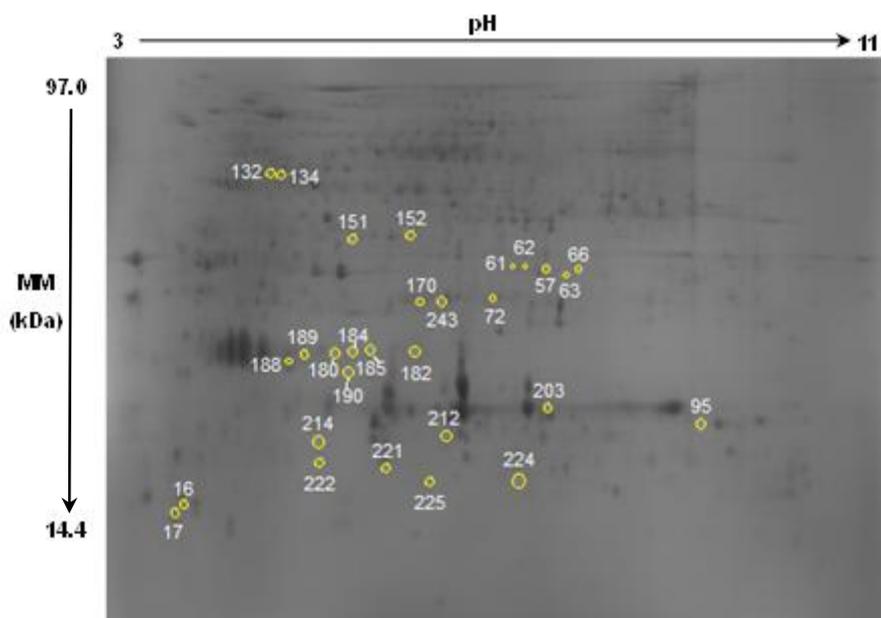
**Figura 30** – Gel 2-D corado com Azul de Coomassie coloidal, referente à aplicação de 750 µg de proteínas da cultivar Vassourinha Paulista. Foi utilizada a tira de pH 3-11 NL, 24 cm (acima da imagem). À esquerda, encontra-se o padrão de massa molecular *LMW calibration kit for SDS electrophoresis* (MM), sendo que seus marcadores estão expressos em kDa. O gel encontra-se com os respectivos *spots* (circulados em amarelo e numerados em branco) coletados.



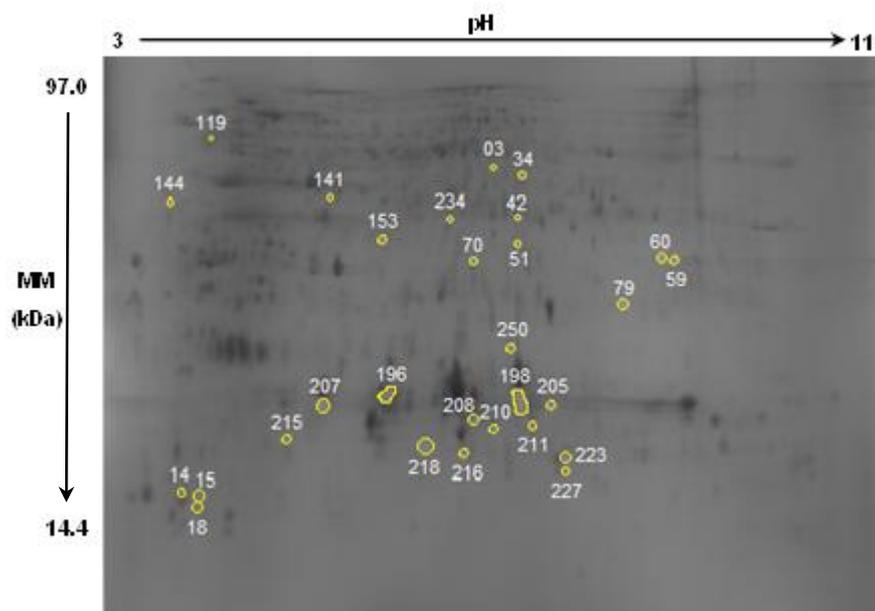
**Figura 31** – Gel 2-D corado com Azul de Coomassie coloidal, referente à aplicação de 750 µg de proteínas da cultivar Cigana Preta. Foi utilizada a tira de pH 3-11 NL, 24 cm (acima da imagem). À esquerda, encontra-se o padrão de massa molecular *LMW calibration kit for SDS electrophoresis* (MM), sendo que seus marcadores estão expressos em kDa. O gel encontra-se com os respectivos *spots* (circulados em amarelo e numerados em branco) coletados.



**Figura 32** – Gel 2-D corado com Azul de Coomassie coloidal, referente à aplicação de 750 µg de proteínas da cultivar IAC 12. Foi utilizada a tira de pH 3-11 NL, 24 cm (acima da imagem). À esquerda, encontra-se o padrão de massa molecular *LMW calibration kit for SDS electrophoresis* (MM), sendo que seus marcadores estão expressos em kDa. O gel encontra-se com os respectivos spots (circulados em amarelo e numerados em branco) coletados.



**Figura 33** – Gel 2-D corado com Azul de Coomassie coloidal, referente à aplicação de 750 µg de proteínas da cultivar IAC 90. Foi utilizada a tira de pH 3-11 NL, 24 cm (acima da imagem). À esquerda, encontra-se o padrão de massa molecular *LMW calibration kit for SDS electrophoresis* (MM), sendo que seus marcadores estão expressos em kDa. O gel encontra-se com os respectivos spots (circulados em amarelo e numerados em branco) coletados.



**Figura 34** – Gel 2-D corado com Azul de Coomassie coloidal, referente à aplicação de 750 µg de proteínas da variedade IAC 06-01. Foi utilizada a tira de pH 3-11 NL, 24 cm (acima da imagem). À esquerda, encontra-se o padrão de massa molecular *LMW calibration kit for SDS electrophoresis* (MM), sendo que seus marcadores estão expressos em kDa. O gel encontra-se com os respectivos spots (circulados em amarelo e numerados em branco) coletados.