



Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro
Instituto de Biociências
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas
Mestrado em Biodiversidade Neotropical

Ellen Moura Lopes

Vanilla bahiana, fonte alternativa da Mata Atlântica para a produção de baunilha: uma abordagem proteômica através de *nanoLC-MS* de alta definição.

Rio de Janeiro

2018

ELLEN MOURA LOPES

Vanilla bahiana, fonte alternativa da Mata Atlântica para a produção de baunilha: uma abordagem proteômica através de *nanoLC-MS* de alta definição.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação, *Stricto sensu* em Ciências Biológicas do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

Orientadora: Profa. Dra. Andrea Furtado Macedo

Coorientadora: Profa. Dra. Maria Gabriela Bello Koblitiz

Rio de Janeiro, RJ

2018

Catálogo informatizada pelo(a) autor(a)

L864 Lopes, Ellen Moura
 Vanilla bahiana, fonte alternativa da Mata
 Atlântica para a produção de baunilha: uma abordagem
 proteômica através de nanoLC-MS de alta definição. /
 Ellen Moura Lopes. -- Rio de Janeiro, 2018.
 85

 Orientadora: Andrea Furtado Macedo.
 Coorientadora: Maria Gabriela Bello Koblitiz.
 Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do
 Estado do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação
 em Ciências Biológicas, 2018.

 1. Vanilla bahiana Hoehne. 2. compostos
 fenólicos. 3. Vanilina. 4. Dodecil sulfato de
 sódio. 5. ?-mercaptoetanol. I. Macedo, Andrea
 Furtado, orient. II. Koblitiz, Maria Gabriela Bello,
 coorient. III. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Folha de aprovação

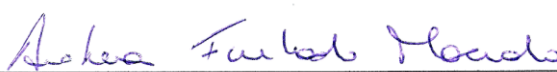
Ellen Moura Lopes

Vanilla bahiana, fonte alternativa da Mata Atlântica para a produção de baunilha: uma abordagem proteômica através de *nanoLC-MS* de alta definição

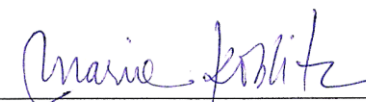
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biodiversidade Neotropical) da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro como requisito para obtenção do título de Mestre em Biodiversidade Neotropical.

Rio de Janeiro, 22 de fevereiro de 2018.

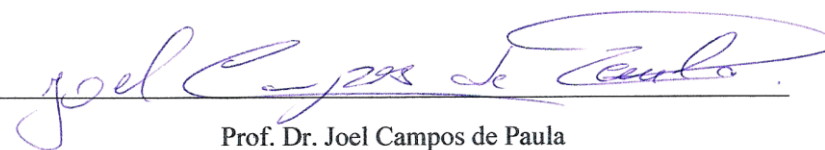
Banca Examinadora:



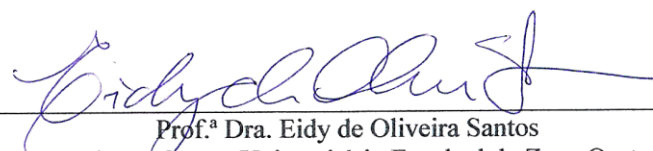
Prof.ª Dra. Andrea Furtado Macedo (Orientadora)
Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro



Prof.ª Dra. Maria Gabriela Bello Koblitz (Coorientadora)
Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro



Prof. Dr. Joel Campos de Paula
Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro



Prof.ª Dra. Eidy de Oliveira Santos
Fundação Centro Universitário Estadual da Zona Oeste

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), por financiar e tornar possível o desenvolvimento da pesquisa. Obrigada também à UNIRIO, PPGBIO e ao CNPQ, por me concederem uma bolsa de incentivo à ciência.

A minha orientadora, Professora Dr.^a Andrea Furtado Macedo, pela coordenação do projeto, pela oportunidade e apoio de anos. Agradeço a sua dedicação, paciência, competência, generosidade, revisões e sugestões, que foram fundamentais para a minha vida acadêmica e para a conclusão desta dissertação. Sou grata por todo seu carinho e todas as conversas.

A coorientação da Professora Dr.^a Maria Gabriela Bello Koblitz, pela dedicação, apoio, competência, generosidade e suas revisões e sugestões que também foram fundamentais para conclusão deste trabalho.

A todos os professores do mestrado PPGBIO que de alguma forma contribuíram positivamente para minha formação.

Aos meus colegas do mestrado pelo apoio ao longo desses anos. As minhas amigas Izabella Fontenelle e Aloma Nogueira pelas conversas e momentos de descontração.

A Unirio, seus funcionários e servidores do setor de transporte, biblioteca, segurança, limpeza e secretaria.

Aos meus amigos do Laboratório Integrado de Biologia Vegetal (LIBV) que me acompanham diariamente: Ana Carolina Pereira, Gustavo Bocayuva, Vinícius Portella e Fernanda D'Andrea, assim como outros amigos da Unirio. Em especial gostaria de agradecer as amigas Roberta Linhares e Joana Oliveira pelo apoio, conversas e risadas ao som Vanilla Ice. Não teria conseguido sem vocês ao meu lado, sempre me ajudando e compartilhando.

Aos coautores e colaboradores desse estudo.

Ao Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBIO) por conceder licenças para as coletas. A secretaria de meio ambiente pelas permissões de coleta e auxílio.

A minha família, meus pais Cristiane e Mauricio Lopes por toda a paciência, apoio de muitos anos, dedicação pela minha educação e crescimento. Ao meu irmão, Eric, por todas as nossas conversas e seu apoio. Ao Johnny por todo o companheirismo e carinho.

Gostaria de agradecer aos meus amigos, à Rayanne Luiz pelos anos de amizade, por me apoiar, ouvir e por todo o carinho. Gostaria de dedicar essa dissertação a memória de Cíntia Silva, uma amiga que estaria terminando o mestrado esse ano. “As vezes a vida é iluminada por pessoas tão especiais, que nos tornamos felizes só porque um dia fizemos parte de suas vidas”.

RESUMO

O extrato natural de baunilha tem grande importância econômica, sendo a vanilina um de seus principais componentes. A produção desse extrato é cara, laboriosa e demorada para a demanda mundial. Atualmente, existe uma grande perda de variabilidade genética das espécies de *Vanilla*. Fatores como o desmatamento, mudanças climáticas, doenças e extrativismo predatório impactam na sobrevivência das espécies de *Vanilla*. Com isso, a caracterização bioquímica dessas espécies tem se mostrado uma alternativa para a conservação, produção e desenvolvimento de indivíduos mais resistentes. Sendo assim, o objetivo desse trabalho foi caracterizar a expressão proteica dos frutos maduros de *Vanilla bahiana*, avaliando a melhor metodologia de extração. Seis soluções foram selecionadas: Vb1 -Tris-HCl; Vb2 – solução Vb1 + 0,5% de β -mercaptoetanol (β -MT); Vb3 -Vb2 + 1% de dodecil sulfato de sódio (SDS); Vb4 – Vb2 + 0,1% de SDS; Vb5 - Vb1 + 1% de SDS e Vb6 -Vb1 + 0,1% de SDS. Após a extração, as proteínas digeridas foram analisadas por cromatografia líquida acoplada a espectrômetro de massas. O software *Progenesis QI* foi utilizado resultando na identificação de 2326 proteínas, sendo 135 relacionadas à floração e frutificação e 65 à biossíntese de metabólitos ligados ao aroma e sabor de baunilha. A maior diversidade de proteínas foi obtida nas extrações com 1% de SDS. As proteínas identificadas nos frutos de *V. bahiana* confirmam o potencial enzimático dessa espécie na produção de compostos, já descritos na literatura, como responsáveis pelo aroma e sabor do extrato natural de baunilha, potencial esse validado pela quantificação de vanilina nos frutos da espécie estudada.

Palavras-chave: Vanilla bahiana Hoehne; compostos fenólicos; Bottom-up; Vanilina; Dodecil sulfato de sódio; β -mercaptoetanol

ABSTRACT

The natural extract of vanilla has great economic importance, being vanillin one of its main components. The production of this extract is expensive, laborious and time consuming for world demand. Currently there is a countless loss of genetic variability of the producer species. Factors such as deforestation, climatic changes, diseases and predatory extractivism impact the survival of *Vanilla spp.* Thus, the biochemical characterization of these species has shown to be an alternative for the conservation, production and development of more resistant individuals. Therefore, the objective of this work is to characterize the protein expression of mature fruits of *Vanilla bahiana*, evaluating the best extraction methodology. Six solutions were selected: Vb1-Tris-HCl; Vb2 - Vb1 + 0.5% β -mercaptoethanol solution (β -MT); Vb3 -Vb2 + 1% sodium dodecyl sulfate (SDS); Vb4 - Vb2 + 0.1% SDS; Vb5-Vb1 + 1% SDS and Vb6 -Vb1 + 0.1% SDS. After extraction, the digested proteins were analyzed by liquid chromatography coupled to a mass spectrometer. The Progenesis QI software was used resulting in the identification of 2326 proteins, 135 related to flowering and fruiting, and to the biosynthesis of metabolites linked to the aroma and flavor of vanilla. The highest protein diversity was obtained in extractions with 1% SDS. The proteins identified in the fruits of *V. bahiana* point to the enzymatic potential of this species in the production of compounds, already described in the literature, as responsible for the aroma and flavor of the natural extract of vanilla, potential validated by the quantification of vanillin in fruits of the studied species.

Key-words: Vanilla bahiana Hoehne; *Bottom up*; *Vanillin*; *phenolic compounds*; *sodium dodecyl sulfate*; *β -mercaptoethanol*

LISTA DE FIGURAS

Introdução

Figura 1. Estrutura química da Vanilina.....	1
Figura 2. Processo de produção e cura dos frutos de baunilha natural.....	4
Figura 3. Flor de <i>Vanilla Bahiana</i> no Monumento Natural do Pão de Açúcar e Urca, cidade do Rio de Janeiro (RJ, Brasil).....	5
Figura 4. Parte final da via de biossíntese de vanilina nos frutos de <i>V. planifolia</i> proposta por Gallage et al. (Gallage et al. 2014).....	7

Capítulo 1

Figure 1. A – Total protein in $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ (mean $\pm$ SD). The data were analyzed using Statistics software v 7.0. Was performed the ANOVA ($p < 0.05$) followed by the Tukey test, were the same letters means no statistical significance. B- Venn diagram compares the number of unique and common proteins identified in the dataset between extraction solutions. It shows the overlaps between proteins identified in each of the extraction condition.	23
Figure 2. Biological process annotated from UniProtKB for the identified protein. (A) Vb1 extraction condition. (B) Vb2 extraction condition. (C) Vb3 extraction condition. (D) Vb5 extraction condition.	25
Figure 3. Taxonomy information from UniProt annotation results from identified proteins of <i>Vanilla</i> spp.	26
Figure 4. Identification results from nanoUPLC-MS/MS analysis showing the number of proteins identified in the dataset between extraction solutions that are involved in phenols, terpenes, flowering and fruiting.	27
Figure 5. Heat map of the proteins identified, selected, with ANOVA p-value<0.05. Colors was used for classification. Blue – Phenol pathway; Yellow – Flowering; green – Fruiting and red – Terpene.	Erro! Indicador não definido.

Figure 6. Dynamic range of proteins identified in the dataset of the *V. bahiana*'s bean for Vb5 extraction condition. A- flowering; B- fruitening; C-phenolic and D- terpene pathway. The median absolute expression value of each protein revealing the typical S-shaped distribution over the mean abundance orders of dynamic range. Showing the most abundant proteins (left) and the lowest abundance (right)..... 31

Material suplementar

Supplementary Figure 1. Workflow of the protein extraction and peptide and protein identification preparation of *V. bahiana*'s fruit using bottom-up and LC-MS/MS analysis. (A) Fruit collection in the Natural Monument of Pão de Açúcar and Urca, with a transversal cut of the fruit. (B) Six different extraction solutions. (C) The proteins samples were quantified. (D) The proteins were digested using trypsin. (E) The peptides were analyzed by a nanoUPLC-HDMS^E system using a nanoUPLC-RP SYNAPT G2-S HDMS instrument (Waters, Manchester, UK). (F) The raw MS data were processed, statistical analysis and graphics with the results were created. 42

Supplementary Figure 2. Cellular component annotated from UniProtKB for the identified protein. (A) proteins from Vb1 extraction condition. (B) Vb2 extraction condition. (C) Vb3 extraction condition. (D) Vb5 extraction condition..... 43

Supplementary Figure 3. Dynamic range of proteins identified in the dataset of the *V. bahiana*'s bean for Vb1 extraction condition. A- flowering; B- fruitening; C-phenolic and D- terpene pathway. The median absolute expression value of each protein revealing the typical S-shaped distribution over the mean abundance orders of dynamic range. Proteins with higher abundance are located in the left side of the graph and the ones with the lowest abundance are located in the right side..... 45

Supplementary Figure 4. Dynamic range of proteins identified in the dataset of the *V. bahiana*'s bean for Vb2 extraction conditionA- flowering; B- fruitening; C-phenolic and D- terpene pathway. The median absolute expression value of each protein revealing the typical S-shaped distribution over the mean abundance orders of dynamic range. Proteins with higher abundance are located in the left side of the graph and the ones with the lowest abundance are located in the right side..... 47

Supplementary Figure 5. Dynamic range of proteins identified in the dataset of the <i>V. bahiana</i> 's bean for Vb3 extraction condition. A- flowering; B- fruitening; C-phenolic and D- terpene pathway. The median absolute expression value of each protein revealing the typical S-shaped distribution over the mean abundance orders of dynamic range. Proteins with higher abundance are located in the left side of the graph and the ones with the lowest abundance are located in the right side.....	49
Supplementary Figure 6. Number of proteins identified present in two of the three and three of the three technical replicates, with FDR calculated. Most of the proteins were identified in the three technical replicates.	49
Supplementary Figure 7. Mass error distribution of <i>V. bahiana</i> . The normal distribution of mass errors obeyed a normal curve.	50
Supplementary Figure 8. Missed cleavages of <i>V. bahiana</i> data. Approximately 60% of the missed cleavages were around zero.....	50
Supplementary Figure 9. Mean number of peptides/protein of <i>V. bahiana</i> data, with an average 6 peptides/ protein.....	51

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1

Table 1. Mean quantification of vanillin, p-coumaric acid and pyrogallol. 33

Table 2. Comparison of vanillin content in fruit of *Vanilla* spp. according to literature..... 33

Material suplementar

Supplementary Table 1. Proteins identified involved in Flowering. 52

Supplementary Table 2. Proteins identified involved in Fruiting..... 60

Supplementary Table 3. Proteins identified involved in phenols biosynthesis..... 63

Supplementary Table 4. Proteins identified involved in terpene biosynthesis. 70

Supplementary Table 5. Identified proteins of *V. bahiana* fruit from Vb1, Vb2, Vb3 and Vb5 samples- **not presented**..... 71

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

μ L – Microlitro

nL - Nanolitro

mM – Millimolar

μ m - Micrometro

fmol – Fentomol

spp. – Espécies

US\$ - Dolar americano

UK – Reino Unido

USA – Estados Unidos da América

IMS- *Ion mobility separation* (separação de mobilidade iônica)

MS – Espectrometria de Massas

LC-MS – Cromatografia líquida acoplado a Espectrômetro de Massas

UPLC – Cromatografia líquida de Ultra Performace

HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência

TCA – Ácido tricloroacético

PCA – Análise de componentes principais

TIC - *Total ion account* (Contagem total de ions)

GFP – *[Glu1]-Fibrinopeptide B human* (Fibrinopeptídeo B humano)

T- wave – *Traveling-wave* TOF – *Time-of-flight* (Tempo de voo)

eV- eletrón Volt

CID – *Collision-induced dissociation* (dissociação induzida por colisão)

KDa – Kilo Dalton

FDR – False Discovery Rate

CV- Coeficiente de variação

KEGG – Enciclopédia de Genes e Genoma de Kioto

SUMÁRIO

Introdução	1
Cultivo e produção de baunilha.....	1
A espécie brasileira: <i>Vanilla bahiana</i>	4
Estudos proteômicos de <i>Vanilla spp.</i>	5
Soluções de extração de proteínas.....	7
Objetivo Geral	9
Objetivos específicos.....	9
Referências Bibliográficas	9
Capítulo 1	16
Conclusões Gerais	72
Perspectivas Futuras	72

Introdução

Cultivo e produção de baunilha

A tribo Vanilleae pertence à família Orchidaceae e contém 10 gêneros, incluindo o gênero pantropical *Vanilla* Miller, popularmente conhecida como baunilha (Pansarin, Aguiar, and Ferreira 2012). As espécies de *Vanilla* são monofiléticas e representadas por aproximadamente 120 espécies, até então descritas (Ormerod and Cootes 2013). A maior diversidade dessas espécies está concentrada em regiões tropicais, principalmente nos biomas brasileiros (Chase et al. 2015; Pansarin, Aguiar, and Ferreira 2012). Muitas espécies deste gênero são consideradas raras ou ameaçadas devido ao: desmatamento de seu habitat original (tipicamente subcosmopolita), mudanças climáticas, exploração predatória e agentes patogênicos pandêmicos (Divakaran et al. 2015; Divakaran, Babu, and Peter 2006). No entanto, esse gênero é economicamente importante devido à presença de vanilina produzida nos frutos das *Vanilla spp.* (Rain and Group 2004).

A vanilina é o principal componente do sabor e aroma da baunilha, que por sua vez é um dos sabores naturais mais populares do mundo, devido à sua importância na indústria de alimentos, farmacêutica, perfumaria e cosméticos (Pansarin, Aguiar, and Ferreira 2012). Estudos vêm mostrando a eficiência da vanilina, e outros compostos derivados do extrato de baunilha, contra diversas doenças devido a suas características antioxidantes, anticancerígenas, antimutagênica, dentre outras (Anuradha, Shyamala, and Naidu 2013). A vanilina (4-hydroxy-3-methoxybenzal- dehyde) é um aldeído aromático, que pertencente ao grupo de compostos fenólicos simples (C6-C1) (Figura 1) e é encontrada em uma concentração mais elevada nos frutos maduros de *V. planifolia* (Palama 2014).

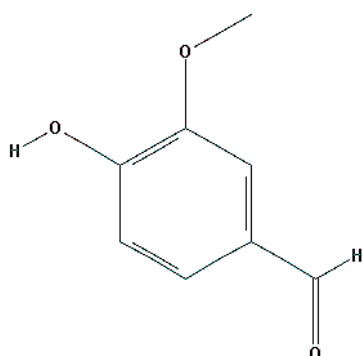


Figura 1. Estrutura química da Vanilina. Fonte: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/vanillin#section=2D-structure>

Baunilha é o condimento cultivado mais valioso e o terceiro mais caro do mundo após o açafrão e o cardamomo (Hrazdina 2006). Devido à sua alta demanda, a produção global chega a 5600 toneladas de frutos curados e o extrato natural de vanilina custa cerca de US\$ 1.200 a US\$ 4.000/kg (Rubert et al. 2016). A produção natural de baunilha é cara, laboriosa e demorada (Divakaran et al. 2015) (Figura 2). A polinização das flores de *Vanilla* é realizada à mão, onde para se obter 1 Kg de vanilina são necessários aproximadamente 500 kg do fruto, correspondente a 40.000 flores de *V. planifolia* polinizadas (Gallage and Møller 2018). O cultivo clonal é geralmente aplicado a duas espécies: *Vanilla planifolia* G. Jackson (syn. *Vanilla fragrans* Andrews) e *Vanilla tahitensis* Moore, com *V. planifolia* fornecendo 95% da produção mundial (Kahane et al. 2008). Apesar da grande importância, a produção clonal de *V. planifolia* provocou uma redução na variabilidade genética e deixou as espécies vulneráveis a doenças, que atualmente afetam negativamente a produção mundial de baunilha em 50-90% (Gallage and Møller 2018; Pinaria, Liew, and Burgess 2010). O preço do extrato natural vem sendo elevado devido à alta demanda e fontes naturais limitadas (Greule et al. 2015). Atualmente, o extrato natural de baunilha chega a custar em média US\$600/Kg, preço que vem aumentando devido ao desmatamento e às catástrofes naturais, como ciclones, que destroem milhares de hectares de cultivos de *V. planifolia* no principal país produtor, Madagascar (Strong 2017).

Uma alternativa mais barata ao extrato natural é o uso da vanilina sintética, que usa o guaiacol e a lignina como compostos de partida para a produção de vanilina sintética (Gallage and Møller 2018). Sendo mais barata, essa é usada por cerca de 50% do mercado mundial para as mais diversas finalidades, como na indústria alimentícia (Walton, Mayer, and Narbad 2003). A síntese química da vanilina tem suas desvantagens, que atualmente não se encaixam na demanda consciente do uso de recursos e preservação ambiental. A síntese química da vanilina via lignina gera 160 Kg de resíduos por 1 Kg de vanilina obtida, consequentemente provocando um impacto ambiental negativo (Hocking 1997). O extrato natural de baunilha possui uma qualidade de sabor e aroma superior ao sintético, relacionado a uma mistura de diversos compostos. Até então, 200 compostos aromáticos foram identificados nos frutos curados de *Vanilla spp.* (Medina, Rodriguez Jiménez, and García 2009). Vinte e seis compostos fenólicos, com concentrações acima de 1 mg/Kg, foram identificados como responsáveis pelo aroma e sabor característico da baunilha, dentre os quais os mais frequentemente citados pela literatura são: vanilina (4-hidroxi-3-metoxibenzaldeído), álcool de vanilina, ácido vanílico, álcool 4-hidroxibenzilo, 4-

hidroxibenzaldeído, ácido 4-hidroxibenzóico, álcool anisílico, anisaldeído e ácido anísico (Sharma et al. 2007; Pérez-Silva et al. 2006).

Os frutos fermentados, ou curados, de *V. planifolia* contêm aproximadamente 2% de vanilina, dependendo do seu local de origem: México com cerca de 1,75%, Sri Lanka 1,5% e Indonésia 2,75% (Parthasarathy, Chempakam, and Zachariah 2008). Foi possível constatar que além da espécie, outros fatores podem interferir com a qualidade do extrato de baunilha natural como: o processo de cura, estágio de maturação do fruto, os nutrientes do solo, calor, incidência luminosa, regime de chuvas, microrganismos presentes no processo de cura dos frutos, dentre outros (Palama 2014; Gu et al. 2017; Baqueiro-Peña and Guerrero-Beltrán 2016). A maior concentração de vanilina e outros compostos fenólicos ligados ao sabor e aroma de baunilha podem ser usados como indicadores de sua qualidade para fins comerciais ou até mesmo marcadores de estágio de desenvolvimento (Sharma et al. 2007; Pérez-Silva et al. 2006; Greule et al. 2015).

Frutos maduros produzem uma concentração superior de compostos fenólicos (Medina, Rodriguez Jiménez, and García 2009). O processo de verificação da maturação dos frutos de *V. planifolia* deve ser feito de duas a três vezes por semana, uma vez que os frutos imaturos e maduros apresentam praticamente a mesma coloração e não apresentam nem tamanho, nem aroma distintos (Medina, Rodriguez Jiménez, and García 2009).

Com base nos argumentos acima relacionados à difícil produção, à susceptibilidade das espécies, à alta demanda e ao aumento dos preços, existe um esforço mundial para procurar novas espécies de *Vanilla*. Essas espécies poderiam melhorar a cultura, o sabor e o aroma de baunilha, visando aumentar a produção de ingredientes ativos e ampliar os recursos genéticos (Virol et al. 2016; Anuradha, Shyamala, and Naidu 2013). Para isso, é necessária uma caracterização química dos frutos das *Vanilla spp.*

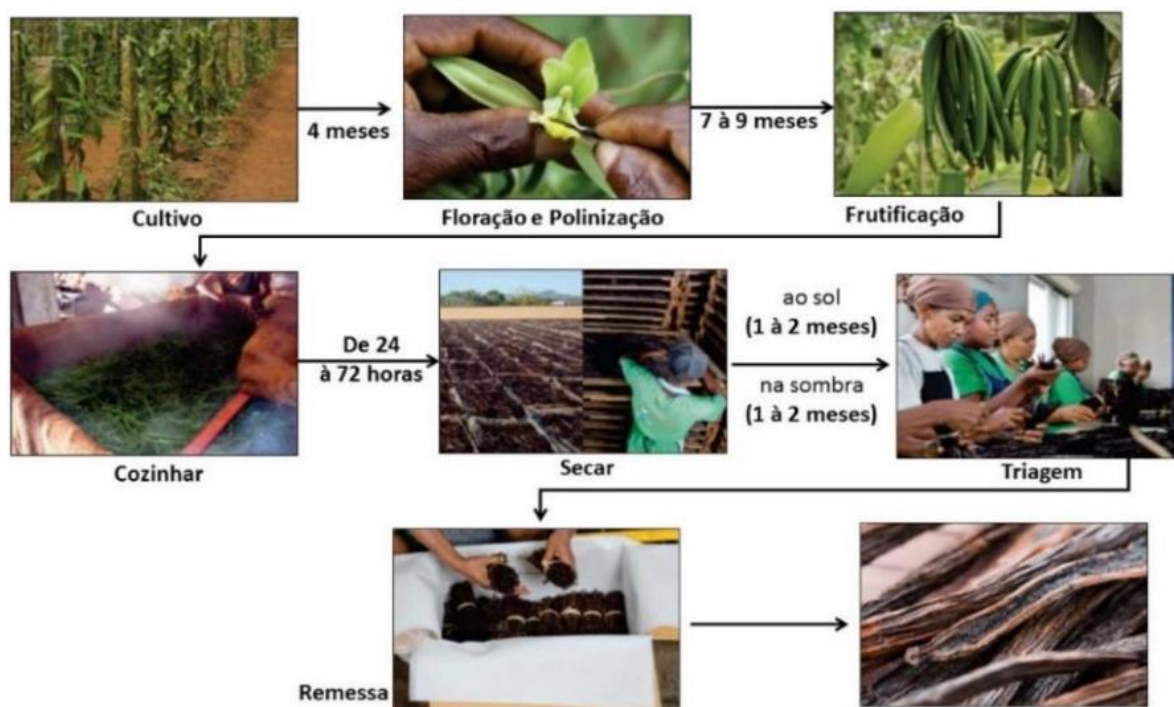


Figura 2. Processo de produção e cura dos frutos de baunilha natural. Fonte: <http://www.provagourmet.us/the-vanilla-process>

A espécie brasileira: Vanilla bahiana

Vanilla bahiana Hoehne é uma espécie endêmica da Floresta de Mata Atlântica brasileira, e ainda cientificamente e economicamente inexplorada (Figura 3). Existem poucos trabalhos publicados com *V. bahiana*, em geral estes estudos descrevem sua reprodução, filogenia e localização (de Fraga, Couto, and Pansarin 2017; Villanueva-Viramontes, Hernández-Apolinar, Fernández-Concha, et al. 2017; Sambin and Chiron 2015; Moreira, Barberena, and Lopes 2014; Odoux 2011). Esta espécie é filogeneticamente próxima a *V. planifolia* e ocorre nas regiões do Pará, Pernambuco, Bahia, Espírito Santo e Rio de Janeiro, especialmente em restingas, em áreas de caatinga, cerrado e na borda da Floresta Atlântica (Villanueva-Viramontes, Hernández-Apolinar, Carnevali Fernández-Concha, et al. 2017; Gigant et al. 2011; Bouetard et al. 2010).

A *V. bahiana* é autogâmica, como a maioria das *Vanilla spp.*, mas depende de polinizadores para a reprodução. A *V. bahiana*, assim como grande parte das *Vanilla spp.*, é hemiepífita (herbáceas). Essa apresenta flores com sépalas verdes e pétalas brancas levemente amareladas e oblanceoladas de ápice agudo (Figura 3). A floração dessa espécie

se estende por oito meses (de novembro a junho), com um pico em abril (Anjos, Barbarena, and Pigozzo 2016).

Como outras espécies do gênero, a *V. bahiana* enfrenta problemas quanto à redução da população, o que enfatiza a urgência de sua caracterização química, ainda não publicada (Moreira, Barberena, and Lopes 2014).



Figura 3. Flor e fruto de *Vanilla bahiana* no Monumento Natural do Pão de Açúcar e Urca, cidade do Rio de Janeiro (RJ, Brasil). Foto por: Ellen Lopes e Roberta Linhares.

Estudos proteômicos de Vanilla spp.

Recentes avanços em biotecnologia permitiram uma alternativa ao método de síntese química da vanilina, a bioengenharia de vanilina natural (Gallage and Møller 2015; Busconi et al. 2017; Gallage and Møller 2018; Chee et al. 2017). Embora, existam muitos esforços para estudar as *Vanilla spp.* e desenvolver a bioengenharia de vanilina, de acordo com Gallage e Møller (2018), ainda persiste a necessidade de se caracterizar e conhecer as vias de biossíntese, não apenas de vanilina, mas dos demais compostos característicos do aroma e sabor de baunilha (Gallage and Møller 2018). De acordo com o mesmo, as *Vanilla spp.* produzem em seus frutos vanilina em concentrações elevadas e até então, não existe outro organismo biológico conhecido na natureza, que consiga produzir vanilina nessa concentração (Gallage and Møller 2018, 2015).

A proteômica colabora no entendimento do funcionamento celular, permitindo a compreensão da função das proteínas nas células, fornecendo as informações das modificações pós-transducionais dos genes. O objetivo final da proteômica é identificar todas as proteínas em uma célula e determinar a função de cada uma, assim desvendando as

vias de biosíntese de compostos de interesse de um organismo em um determinado momento (Wilson and Walker 2010).

No presente trabalho, foi utilizado o método “*bottom-up*” que identifica proteínas digeridas por processo enzimático ou químico antes da análise por *LC-MS*. As proteínas foram digeridas diretamente em uma mistura complexa, e os peptídeos resultantes foram analisados (Martins Ferreira, Guest, and Martins-de-souza 2017; Bond et al. 2013).

Até então, os estudos proteômicos sobre o gênero *Vanilla* estão restritos ao desenvolvimento de calos através da cultura de tecidos, revelando o ineditismo e a importância do presente trabalho (Guerrero et al. 2011; Tan et al. 2013; Tan et al. 2014; Palama et al. 2010;). Especificamente, o estudo de Gallage et al. (2014) utilizou uma análise combinada de transcriptômica e proteômica em frutos de *V. planifolia*, com foco em algumas enzimas sugeridas pela literatura, com o intuito de propor uma via de biossíntese de vanilina mais completa (Gallage et al. 2014). De acordo com esse estudo, existe uma enzima chave, a vanilina sintase, responsável por catalisar a clivagem da dupla ligação de carbono do ácido ferúlico e de seu glicosídeo em vanilina e seu glicosídeo, respectivamente (Figura 4). A vanilina sintase, de acordo com o estudo, pertence à família de proteases de cisteínas, que são conhecidas por possuírem funções fisiológicas versáteis (Gallage et al. 2014). Apesar de trabalhos mais recentes terem sido publicados, de acordo com Kundu (2017), a via biosintética proposta por Gallage et al (2014) continua sendo a mais aceita (Kundu 2017).

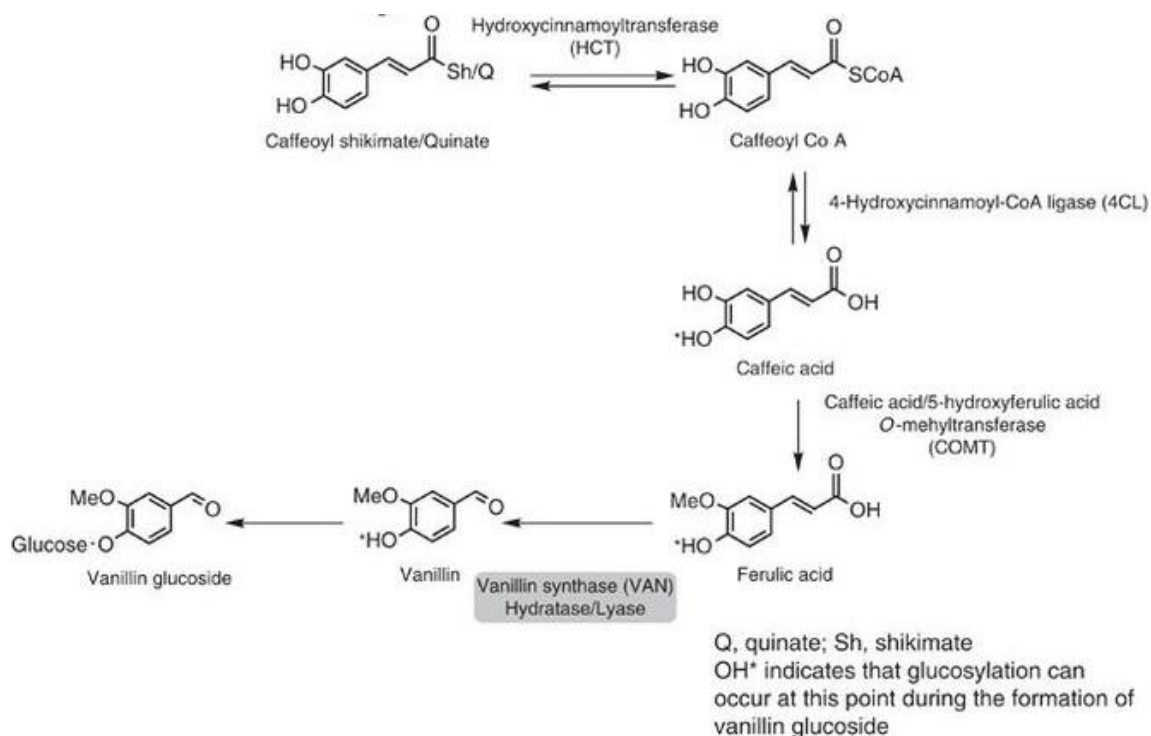


Figura 4. Parte final da via de biossíntese de vanilina nos frutos de *V. planifolia* proposta por Gallage et al. (Gallage et al. 2014).

Soluções de extração de proteínas

A necessidade de entender melhor a produção de composto do aroma e sabor dos frutos de *Vanilla spp.* é possível através do estudo das suas vias biossintéticas (Palama 2014). O perfil proteômico de uma espécie identifica os componentes reguladores que medeiam as diversas vias de biossíntese sendo assim, as proteínas podem servir como marcadores para melhorar a qualidade nutricional, sabor, resistência/tolerância à doença e a vida útil das moléculas de interesse (Kilambi et al. 2016).

Contudo, estudos do perfil proteômico tem um grande desafio, a variada amplitude dinâmica das proteínas que constituem o complexo proteico (Kilambi et al. 2016). Embora vários protocolos de extração de proteínas de tecidos de frutos estejam disponíveis como: tomate (Kilambi et al. 2016), pimenta (Choi and Hwang 2011), morango (Bianco et al. 2009), uva (Negri et al. 2015), banana (Toledo et al. 2012), maçã e pêra (Kierner and Cesareni 2007), a maioria deles não está relacionado à extração tipo *shotgun*. Atualmente, esse método é o mais indicado para análise de perfis proteômicos apresentando grande amplitude dinâmica de proteínas (Garrido et al. 2016). A extração de proteínas tão diversas em concentrações também variadas, presentes nos frutos ou em outros tecidos vegetais,

apresenta substâncias interferentes como os pigmentos, carboidratos, polifenóis, polissacarídeos e amido, que podem levar a desnaturação, inativação de proteínas e atrapalhar a extração das mesmas (Song and Braun 2008).

Entre os tampões de extração de proteína mais comuns estão: os reguladores de pH (por exemplo, o Tris), agentes redutores (por exemplo, ditioneitol - DDT, β -mercaptoetanol) e os desnaturantes (por exemplo, uréia, dodecil sulfato de sódio, CHAPS) (Song and Braun 2008). No presente estudo, foi sugerido o uso de um agente regulador de pH (Tris-HCl), um agente redutor (β -mercaptoetanol) e um detergente iônico (dodecil sulfato de sódio – SDS) com o intuito de aumentar a capacidade extratora das proteínas do fruto de *V. bahiana*. De acordo com Wilson & Walker (2010), o β -mercaptoetanol reduz as pontes de dissulfeto, que mantêm a estrutura terciária das proteínas, e o SDS se liga fortemente as proteínas auxiliando na solubilização das mesmas.

Protocolos de extração de proteínas que utilizam soluções de fenol também foram relatados como adequados para a extração de baixas concentrações de proteínas em frutas (Vincent, Wheatley, and Cramer 2006). Contudo, protocolos de extração de proteínas de membrana baseados no uso de fenol também precisam dos detergentes (como o SDS) para otimizar a extração de proteínas (Sun, Wang, and Li 2012; Lin et al. 2012; Hurkman and Tanaka 1986; Botelho et al. 2010; Wu and Wang 1984). O uso de SDS em análise de espectrometria de massas pode ser problemático, pois sua presença nas amostras pode ocasionar supressão de íons, assim reduzindo significativamente o número de proteínas identificadas. Porém alguns estudos apontam, que após a retirada do SDS das amostras, esse desnaturante pode auxiliar e melhorar a extração de proteínas (Hurkman and Tanaka 1986; Sun, Wang, and Li 2012; Liu et al. 2012; Lin et al. 2012; Botelho et al. 2010; Song and Braun 2008).

Método HDMS^E

Para as análises proteômicas de diferentes condições de extração realizadas no presente estudo, e para alcançar a confiabilidade e reprodutibilidade dos resultados, utilizamos uma abordagem 2D nano-UPLC-HDMS^E (de alta definição), livre de marcadores com Aquisição de Dados Independentes (ADI). Os formatos multiplex de alta resolução MS^E e HDMS^E são métodos recomendados para proteômica de amostras complexas. No método HDMS^E os íons são separados com base na onda de voltagem da mobilidade iônica, e são submetidos à fragmentação, onde serão analisados os íons precursores e seus íons filhos,

garantindo maior confiabilidade nas identificações (Martins Ferreira, Guest, and Martins-de-souza 2017; Bond et al. 2013).

Objetivo Geral

Segundo a nossa hipótese de que *V. bahiana* pode apresentar potencial para produzir vanilina e outros fenóis relacionados ao aroma e sabor da baunilha, o objetivo desse trabalho é caracterizar a expressão proteica dos frutos maduros de *Vanilla bahiana* da Mata Atlântica do Rio de Janeiro.

Objetivos específicos

Avaliar qual solução é capaz de extrair: A) maior conteúdo de proteínas totais; B) maior diversidade de proteínas; C) maior número de proteínas ligadas a biossíntese de vanilina e outros fenóis encontrados no extrato natural de baunilha. Identificar, de acordo com a literatura, quais proteínas estão relacionadas à floração, amadurecimento do fruto, aroma e sabor de baunilha. E, finalmente, validar os dados proteômicos quantificando três compostos de interesse: vanilina, ácido *p*-coumárico e pirogalol.

Referências Bibliográficas

- Anjos, A.M., F.F.V.A. Barbarena, and C.M. Pigozzo. 2016. “Biologia Reprodutiva de *Vanilla Bahiana* Hoehne (Orchidaceae).” *Orquidário* 30 (3–4):67–79.
- Anuradha, Krushnamurthy, Bellur Nanjundaiah Shyamala, and Madeneni Madhava Naidu. 2013. “Vanilla- Its Science of Cultivation, Curing, Chemistry, and Nutraceutical Properties.” *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 53 (12):1250–76. <https://doi.org/10.1080/10408398.2011.563879>.
- Baqueiro-Peña, Itzamná, and José Ángel Guerrero-Beltrán. 2016. “Vanilla (*Vanilla Planifolia* Andr.), Its Residues and Other Industrial by-Products for Recovering High Value Flavor Molecules: A Review.” *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*. <https://doi.org/10.1016/j.jarmap.2016.10.003>.
- Bianco, Linda, Loredana Lopez, Anna Grazia Scalone, Mariasole Di Carli, Angiola Desiderio, Eugenio Benvenuto, and Gaetano Perrotta. 2009. “Strawberry Proteome Characterization and Its Regulation during Fruit Ripening and in Different Genotypes.” *Journal of Proteomics* 72 (4). Elsevier B.V.:586–607.

- <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2008.11.019>.
- Botelho, Diane, Mark J. Wall, Douglas B. Vieira, Shayla Fitzsimmons, Fang Liu, and Alan Doucette. 2010. "Top-down and Bottom-up Proteomics of Sds-Containing Solutions Following Mass-Based Separation." *Journal of Proteome Research* 9 (6):2863–70. <https://doi.org/10.1021/pr900949p>.
- Bond, Nicholas J, Pavel V Shliaha, Kathryn S Lilley, and Laurent Gatto. 2013. "Improving Qualitative and Quantitative Performance for MS E -Based Label-Free Proteomics." *Journal of Proteome Research* 12 (6):2340–53. <https://doi.org/10.1021/pr300776t>.
- Bouetard, Anthony, Pierre Lefeuvre, Rodolphe Gigant, Séverine Bory, Marc Pignal, Pascale Besse, and Michel Grisoni. 2010. "Evidence of Transoceanic Dispersion of the Genus *Vanilla* Based on Plastid DNA Phylogenetic Analysis." *Molecular Phylogenetics and Evolution* 55 (2). Elsevier Inc.:621–30. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2010.01.021>.
- Busconi, Matteo, Luigi Lucini, Giovanna Soffritti, Jamila Bernardi, Letizia Bernardo, Christel Brunschwig, Sandra Lepers-Andrzejewski, Phila Raharivelomanana, and Jose A. Fernandez. 2017. "Phenolic Profiling for Traceability of *Vanilla ×tahitensis*." *Frontiers in Plant Science* 8 (October):1–13. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01746>.
- Chase, Mark W., Kenneth M. Cameron, John V. Freudenstein, Alec M. Pridgeon, Gerardo Salazar, Cássio van den Berg, and André Schuiteman. 2015. "An Updated Classification of Orchidaceae." *Botanical Journal of the Linnean Society* 177 (2):151–74. <https://doi.org/10.1111/boj.12234>.
- Chee, Marcus Jenn Yang, Grantley W. Lycett, Teng Jin Khoo, and Chiew Foan Chin. 2017. "Bioengineering of the Plant Culture of *Capsicum Frutescens* with Vanillin Synthase Gene for the Production of Vanillin." *Molecular Biotechnology* 59 (1). Springer US:1–8. <https://doi.org/10.1007/s12033-016-9986-2>.
- Choi, Du Seok, and Byung Kook Hwang. 2011. "Proteomics and Functional Analyses of Pepper Absciscic Acid-Responsive 1 (ABR1), Which Is Involved in Cell Death and Defense Signaling." *The Plant Cell* 23 (2):823–42. <https://doi.org/10.1105/tpc.110.082081>.
- Divakaran, Minoo, K. Nirmal Babu, and K. V. Peter. 2006. "Conservation of *Vanilla* Species, in Vitro." *Scientia Horticulturae* 110 (2):175–80. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2006.07.003>.
- Divakaran, Minoo, K Nirmal Babu, P N Ravindran, K V Peter, Asian J Plant, and Sci Res.

2015. “Biotechnology for Micropropagation and Enhancing Variations in Vanilla” 5 (2):52–62.
- Fraga, Claudio Nicoletti de, Dayvid Rodrigues Couto, and Emerson Ricardo Pansarin. 2017. “Two New Species of Vanilla (Orchidaceae) in the Brazilian Atlantic Forest.” *Phytotaxa* 296 (1):063–072. <https://doi.org/10.11646/phytotaxa.296.1.4>.
- Gallage, Nethaji J., and Birger Lindberg Møller. 2015. “Vanillin–Bioconversion and Bioengineering of the Most Popular Plant Flavor and Its De Novo Biosynthesis in the Vanilla Orchid.” *Molecular Plant* 8 (1). Elsevier Ltd:40–57. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2014.11.008>.
- Gallage, Nethaji J., and Birger Lindberg Møller. 2018. *Vanilla: The Most Popular Flavour*. https://doi.org/10.1007/978-3-319-67903-7_1.
- Gallage, Nethaji J, Esben H Hansen, Rubini Kannangara, Carl Erik Olsen, Mohammed Saddik Motawia, Kirsten Jørgensen, Inger Holme, Kim Hebelstrup, Michel Grisoni, and Birger Lindberg Møller. 2014. “Vanillin Formation from Ferulic Acid in Vanilla Planifolia Is Catalysed by a Single Enzyme.” *Nature Communications* 5 (May):4037. <https://doi.org/10.1038/ncomms5037>.
- Garrido, Bruno Carius, Gustavo H.M.F. Souza, Daniela C. Lourenço, and Maíra Fasciotti. 2016. “Proteomics in Quality Control: Whey Protein-Based Supplements.” *Journal of Proteomics* 147. Elsevier B.V.:48–55. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2016.03.044>.
- Gigant, Rodolphe, Severine Bory, Michel Grisoni, and Pascale Besse. 2011. “Biodiversity and Evolution in the Vanilla Genus.” *The Dynamical Processes of Biodiversity - Case Studies of Evolution and Spatial Distribution*, no. figure 1:1–27. <https://doi.org/10.5772/24567>.
- Greule, Markus, Armin Mosandl, John T. G. Hamilton, and Frank Keppler. 2015. “Comment on Authenticity and Traceability of Vanilla Flavors by Analysis of Stable Isotopes of Carbon and Hydrogen.” *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 63 (21):5305–6. <https://doi.org/10.1021/jf506172q>.
- Gu, Fenglin, Yonggan Chen, Yinghua Hong, Yiming Fang, and Lehe Tan. 2017. “Comparative Metabolomics in Vanilla Pod and Vanilla Bean Revealing the Biosynthesis of Vanillin during the Curing Process of Vanilla.” *AMB Express* 7 (1). Springer Berlin Heidelberg:116. <https://doi.org/10.1186/s13568-017-0413-2>.
- Guerrero, A., S.E Valdés-Rodríguez, B Durán-Sánchez, M.T González-Arnao, B Jiménez-Francisco, and C.E Lázaro-Vallejo. 2011. “Cryopreservation and Proteomic Analysis

- of Vanilla (*V. Planifolia* A .) Apices Treated with Osmoprotectants.” *Acta Horticulturae*, no. 908:67–72. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2011.908.5>.
- Hocking, Martin B. 1997. “Vanillin: Synthetic Flavoring from Spent Sulfite Liquor.” *Journal of Chemical Education* 74 (9):1055. <https://doi.org/10.1021/ed074p1055>.
- Hrazdina, G. 2006. “Aroma Production by Tissue Cultures Aroma Production by Tissue Cultures.” *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54 (February):1116–23. <https://doi.org/10.1021/jf053146w>.
- Hurkman, William J, and Charlene K Tanaka. 1986. “Solubilization of Plant Membrane Proteins for Analysis by Two-Dimensional Gel Electrophoresis.” *Plant Physiology* 81 (3):802–6. <https://doi.org/10.1104/pp.81.3.802>.
- Kahane, R, P Besse, M Grisoni, F Le Bellec, and E Odoux. 2008. “Bourbon Vanilla: Natural Flavour with a Future.” *Chronica Horticulturae* 48 (2):23–29.
- Kiemer, Lars, and Gianni Cesareni. 2007. “Comparative Interactomics: Comparing Apples and Pears?” *Trends in Biotechnology* 25 (10):448–54. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2007.08.002>.
- Kilambi, Himabindu V., Kalyani Manda, Hemalatha Sanivarapu, Vineet K. Maurya, Rameshwar Sharma, and Yellamaraju Sreelakshmi. 2016. “Shotgun Proteomics of Tomato Fruits: Evaluation, Optimization and Validation of Sample Preparation Methods and Mass Spectrometric Parameters.” *Frontiers in Plant Science* 7 (June):1–14. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00969>.
- Kundu, Anish. 2017. “Vanillin Biosynthetic Pathways in Plants.” *Planta* 245 (6). Springer Berlin Heidelberg:1069–78. <https://doi.org/10.1007/s00425-017-2684-x>.
- Lin, Yong, Huajun Jiang, Yujun Yan, Bin Peng, Jinhua Chen, Haiyan Lin, and Zhonghua Liu. 2012. “Shotgun Analysis of Membrane Proteomes by an Improved SDS-Assisted Sample Preparation Method Coupled with Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry.” *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 911. Elsevier B.V.:6–14. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2012.10.016>.
- Liu, Yi, Yong Lin, Yizhong Yan, Jianjun Li, Quanze He, Ping Chen, Xianchun Wang, and Songping Liang. 2012. “Electrophoretically Driven SDS Removal and Protein Fractionation in the Shotgun Analysis of Membrane Proteomes.” *Electrophoresis* 33 (2):316–24. <https://doi.org/10.1002/elps.201100364>.
- Medina, Javier De La Cruz, Guadalupe C. Rodriguez Jiménez, and Hugo S. García. 2009.

- “VANILLA- Post-Harvest Operations.” *Food and Agriculture Organization of the United Nations*.
- Martins Ferreira, Henrique Gustavo, Paul C Guest, and Daniel Martins-de-souza. 2017. “Multiplex Biomarker Techniques.” In *Methods in Molecular Biology*, 1546:57–73. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6730-8>.
- Moreira, Marina Muniz, FFVA Barberena, and RC Lopes. 2014. “Orchidaceae of the Grumari Restinga: Floristic and Similarity among Restingas in Rio de Janeiro State, Brazil.” *Acta Botanica Brasilica* 28 (3):321–26. <https://doi.org/10.1590/0102-33062014abb3173>.
- Negri, Alfredo S., Bhakti Prinsi, Osvaldo Failla, Attilio Scienza, and Luca Espen. 2015. “Proteomic and Metabolic Traits of Grape Exocarp to Explain Different Anthocyanin Concentrations of the Cultivars.” *Frontiers in Plant Science* 6 (August). <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00603>.
- Ormerod, Paul, and Jim Cootes. 2013. “Leafy Vanilla Species of the Philippines.” *OrchideenJournal* 1:1–19.
- Palama, Tony L. 2014. “Metabolomic Analysis of a Plant from the Indian Ocean : Vanilla Planifolia.” In *Novel Plant Bioresources: Applications in Food, Medicine and Cosmetics*, 471–78.
- Palama, Tony L, Patrice Menard, Isabelle Fock, Young H Choi, Emmanuel Bourdon, Joyce Govinden-Soulange, Muriel Bahut, Bertrand Payet, Robert Verpoorte, and Hippolyte Kodja. 2010. “Shoot Differentiation from Protocorm Callus Cultures of Vanilla Planifolia (Orchidaceae): Proteomic and Metabolic Responses at Early Stage.” *BMC Plant Biology* 10:82. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-10-82>.
- Pansarin, Emerson, João Aguiar, and Alessandro Ferreira. 2012. “A New Species of Vanilla (Orchidaceae : Vanilloideae) from São.” *The New York Botanical Garden Press* 64 (June):157–61.
- Parthasarathy, V . A., B. Chempakam, and T. J. Zachariah, eds. 2008. *Chemistry of Spices*. IV. Massachusetts: CABI. <https://doi.org/10.1079/9781845934057.0000>.
- Pérez-Silva, a., E. Odoux, P. Brat, F. Ribeyre, G. Rodriguez-Jimenes, V. Robles-Olvera, M. a. García-Alvarado, and Z. Günata. 2006. “GC-MS and GC-Olfactometry Analysis of Aroma Compounds in a Representative Organic Aroma Extract from Cured Vanilla (Vanilla Planifolia G. Jackson) Beans.” *Food Chemistry* 99 (4):728–35. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.08.050>.

- Pinaria, A. G., E. C.Y. Liew, and L. W. Burgess. 2010. "Fusarium Species Associated with Vanilla Stem Rot in Indonesia." *Australasian Plant Pathology* 39 (2):176–83. <https://doi.org/10.1071/AP09079>.
- Rain, P, and Philip Lief Group. 2004. *Vanilla: The Cultural History of the World's Most Popular Flavor and Fragrance*. Jeremy P. Tarcher/Penguin.
- Rubert, Josep, Ondrej Lacina, Milena Zachariasova, and Jana Hajslova. 2016. "Saffron Authentication Based on Liquid Chromatography High Resolution Tandem Mass Spectrometry and Multivariate Data Analysis." *Food Chemistry* 204 (2015). Elsevier Ltd:201–9. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.01.003>.
- Sambin, A, and Guy R Chiron. 2015. "Deux Nouvelles Espèces de Vanilla (Orchidaceae) de Guyane Française." *Richardiana* 15:306–16.
- Sharma, Upendra Kumar, Nandini Sharma, Ajai Prakash Gupta, Vinod Kumar, and Arun Kumar Sinha. 2007. "RP-HPTLC Densitometric Determination and Validation of Vanillin and Related Phenolic Compounds in Accelerated Solvent Extract of Vanilla Planifolia." *Journal of Separation Science* 30 (18):3174–80. <https://doi.org/10.1002/jssc.200700229>.
- Song, Jun, and Gordon Braun. 2008. "Application of Proteomic Techniques to Fruits and Vegetables." *Current Proteomics* 5 (3):191–201. <https://doi.org/10.2174/157016408785909659>.
- Strong, Andrea. 2017. "Pastry Chefs Forced to Get Creative as Vanilla Prices Soar." Eater Business Reports. 2017.
- Sun, Difei, Nan Wang, and Liang Li. 2012. "Integrated SDS Removal and Peptide Separation by Strong-Cation Exchange Liquid Chromatography for SDS-Assisted Shotgun Proteome Analysis." *Journal of Proteome Research* 11 (2):818–28. <https://doi.org/10.1021/pr200676v>.
- Tan, B. C., C. F. Chin, S. Liddell, and P. Alderson. 2014. "Protein Extraction for Callus and Node Cultures of Vanilla Planifolia Andrews." *Minerva Biotechnologica* 26 (July):115–26.
- Tan, Boon Chin, Chiew Foan Chin, Susan Liddell, and Peter Alderson. 2013. "Proteomic Analysis of Callus Development in Vanilla Planifolia Andrews." *Plant Molecular Biology Reporter* 31 (6):1220–29. <https://doi.org/10.1007/s11105-013-0590-3>.
- Toledo, Tatiana Torres, Silvia Beserra Nogueira, Beatriz Rosana Cordenunsi, Fábio César Gozzo, Eduardo Jorge Pilau, Franco Maria Lajolo, and João Roberto Oliveira Do

- Nascimento. 2012. "Proteomic Analysis of Banana Fruit Reveals Proteins That Are Differentially Accumulated during Ripening." *Postharvest Biology and Technology* 70. Elsevier B.V.:51–58. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2012.04.005>.
- Villanueva-Viramontes, Sara, Mariana Hernández-Apolinar, Germán Carnevali Fernández-Concha, Alfredo Dorantes-Euán, Gabriel R. Dzib, and Jaime Martínez-Castillo. 2017. "Wild Vanilla Planifolia and Its Relatives in the Mexican Yucatan Peninsula: Systematic Analyses with ISSR and ITS." *Botanical Sciences* 95 (2):169–87. <https://doi.org/10.17129/botsci.668>.
- Villanueva-Viramontes, Sara, Mariana Hernández-Apolinar, Germán Carnevali Fernández-Concha, Alfredo Dorantes-Euán, Gabriel R. Dzib, and Jaime Martínez Castillo. 2017. "Wild Vanilla Planifolia and Its Relatives in the Mexican Yucatan Peninsula: Systematic Analyses with ISSR and ITS." *Botanical Sciences* 95 (2):169–87.
- Vincent, Delphine, Matthew D. Wheatley, and Grant R. Cramer. 2006. "Optimization of Protein Extraction and Solubilization for Mature Grape Berry Clusters." *Electrophoresis* 27 (9):1853–65. <https://doi.org/10.1002/elps.200500698>.
- Virol, Arch, Christopher Puli, Subuhi Khan, and Wee-leong Chang Gardette. 2016. "First Complete Genome Sequence of Vanilla Mosaic Strain of Dasheen Mosaic Virus Isolated from the Cook Islands ." *Archives of Virology*. Springer Vienna. <https://doi.org/10.1007/s00705-016-3133-z>.
- Walton, Nicholas J., Melinda J. Mayer, and Arjan Narbad. 2003. "Vanillin." *Phytochemistry* 63 (5):505–15. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(03\)00149-3](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(03)00149-3).
- Wilson, Keith, and John Walker. 2010. *Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology*. <https://doi.org/10.1093/nar/gkl830>.
- Wu, Fang-Sheng, and Menq-Yun Wang. 1984. "Extraction of Proteins for Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis from Protease-Rich Plant Tissues." *Analytical Biochemistry* 139 (1):100–103. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(84\)90394-4](https://doi.org/10.1016/0003-2697(84)90394-4).

Informações de acesso a presente dissertação:

Este trabalho é confidencial e existirá registro de patente, portanto a liberação para publicação é parcial. Desse modo o capítulo 1 não será publicado.

Conclusões Gerais

- As proteínas identificadas nos frutos de *V. bahiana* confirmam o potencial enzimático dessa espécie para a produção de compostos, já descritos na literatura, como responsáveis pelo aroma e sabor do extrato natural de baunilha.
- Nos frutos de *V. bahiana* foram identificadas proteínas ligadas à floração, frutificação e amadurecimento de frutos, proteínas essas que podem servir como indicadores de amadurecimento dos frutos de *Vanilla spp.*
- Foi possível identificar proteínas relacionadas à biossíntese de fenóis de importância econômica como: ácido cafeico, ácido coumárico, ácido ferúlico e vanilina.
- O uso de SDS na concentração de 1% foi essencial para extrair mais proteínas totais com grande amplitude dinâmica nos frutos maduros.
- 1% de SDS também se mostrou eficaz na extração de uma diversidade maior de proteínas, principalmente das proteínas de interesse.
- A metodologia desenvolvida neste trabalho se mostrou eficaz e fundamental para extrair e identificar uma grande diversidade de proteínas, reduzindo a interferência de contaminantes como o SDS.
- As análises de quantificação absoluta comprovaram a presença da vanilina, pirogalol e ácido cumárico nos frutos maduros de *V. bahiana*, que já foram encontrados nos extratos de *V. planifolia* e *V. tahitian* ligados ao aroma e sabor de baunilha característico.
- Os resultados e a metodologia apresentados podem colaborar com a conservação das *Vanilla spp.* e na caracterização química de seus frutos, podendo o perfil proteico identificado servir como um marcador de origem do extrato assegurando a qualidade do produto ao consumidor.

Perspectivas Futuras

Uma vez que o extrato natural de baunilha possui uma qualidade de sabor e aroma superior ao sintético, e essa relação de qualidade está ligada a mistura complexa de metabólitos presentes no fruto, uma das perspectivas futuras desse trabalho é realizar estudo metabolômico dos frutos de *V. bahiana* coletados.

Outra perspectiva desse trabalho é continuar os estudos ômicos das espécies de *Vanilla* localizadas na cidade do Rio de Janeiro, principalmente de *V. chamoisii*, que já foi coletada. Futuras extrações de proteínas serão realizadas utilizando o SDS nas soluções, com o intuito de obter uma maior diversidade de proteínas.