



KALYNKA GABRIELLA DO LIVRAMENTO

**PROTEÔMICA COMPARATIVA DA
INTERAÇÃO GENÓTIPO, AMBIENTE E
PROCESSAMENTO DE GRÃOS DE CAFÉ
ARÁBICA.**

**LAVRAS – MG
2014**

KALYNKA GABRIELLA DO LIVRAMENTO

**PROTEÔMICA COMPARATIVA DA INTERAÇÃO GENÓTIPO,
AMBIENTE E PROCESSAMENTO DE GRÃOS DE CAFÉ ARÁBICA.**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu Biotecnologia Vegetal, para a obtenção do título de “Doutor”.

Orientador

Prof. Dr. Luciano Vilela Paiva

LAVRAS –MG

2014

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Coordenadoria de Produtos e
Serviços da Biblioteca Universitária da UFLA**

Livramento, Kalynka Gabriella do.

Proteômica comparativa da interação genótipo, ambiente e processamento de grãos de café arábica / Kalynka Gabriella do Livramento. – Lavras : UFLA, 2014.

97 p. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2014.

Orientador: Luciano Vilela Paiva.

Bibliografia.

1. Café. 2. Eletroforese bidimensional. 3. Espectrometria de massa. 4. Proteoma. 5. Bebidas – Qualidade. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 663.93

KALYNKA GABRIELLA DO LIVRAMENTO

**PROTEÔMICA COMPARATIVA DA INTERAÇÃO GENÓTIPO,
AMBIENTE E PROCESSAMENTO DE GRÃOS DE CAFÉ ARÁBICA.**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação “Stricto Sensu” em Biotecnologia Vegetal, para a obtenção do título de “Doutor”.

APROVADA em 16 de abril de 2014.

Prof. Dr Luciano Vilela Paiva	UFLA
Prof. Dr Flávio Meira Borém	UFLA
Prof. Dr. Anderson Cleiton José	UFLA
Prof. Dr. Paulo Augusto Almeida Santos	Pesquisador
Dr. José Henrique da Silva Taveira	Pesquisador

Prof. Dr. Luciano Vilela Paiva
UFLA
(Orientador)

LAVRAS - MG
2014

*Ao meu pequeno filho Vinícius que me ensinou
"o superpoder" de se fazer muitas coisas em apenas uma hora!*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter-me proporcionado saúde e tantos acontecimentos felizes no decorrer desses últimos anos.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal, pela oportunidade e pela contribuição para a conclusão do curso de doutorado.

À Fapemig pela concessão das bolsas durante o doutorado.

Agradeço a banca de qualificação e defesa pelas considerações e sugestões da presente tese.

Ao professor Flávio Meira Borém, por mais uma vez permitir a minha integração à sua apaixonante linha de pesquisa que busca entender a magia do café.

A todos os professores do grupo, pelo bom convívio e ensinamentos.

À FAPEMIG pela concessão de bolsa de estudos durante o doutorado.

Aos colegas do Laboratório Central de Biologia Molecular (LCBM). Em especial, a Luana Ferreira Torres pela amizade e ajuda nos experimentos.

Ao Fabrício Lelis, pela disponibilidade e ajuda essencial com a espectrometria.

Ao Luciano, pelo incentivo e pelas broncas dadas com ou sem razão (rs). Seu amor e companheirismo tornam meu dia a dia mais feliz. Amo você!

Aos meus pais, meus maiores incentivadores, agradeço pelo amor sem fim e paciência. E, principalmente pelo apoio tão fundamental na reta final deste trabalho: o serviço de babá de vocês é excelente!

À família do meu irmão, em especial ao Rafa, pelo amor recebido de vocês em cada reencontro.

À D. Clymar pelas fortes orações e pelo almoço de cada dia. Psicologia nota 10!

RESUMO GERAL

Embora o cultivo do café arábica em alta altitude seja conhecido por afetar positivamente a qualidade final da bebida, os dados quantitativos que descrevem a influência das condições climáticas sobre a composição química dos grãos ainda são escassos. Da mesma forma, os tratamentos pós-colheita dos grãos são conhecidos por afetar a geração de sabor, mas as transformações químicas que ocorrem durante o processamento são mal compreendidas. Para melhor caracterizar os efeitos da altitude, processamento via seca e via úmida e suas possíveis interações, quantificamos as mudanças em um dos principais componentes químicos dos grãos, as proteínas. O presente trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar a composição protéica de grãos de *Coffea arabica* cultivares Bourbon amarelo e Acaiá, submetidos ao processamento via seca e via úmida e cultivados em duas diferentes faixas de altitudes, abaixo de 1000m e acima de 1200m. O método de avaliação utilizado foi a comparação do perfil proteômico, obtido por eletroforese bidimensional e os peptídeos gerados foram identificados por espectrometria de massa com ionização por eletrospray (ESI-MS/MS), com auxílio do programa MASCOT para a busca de homologia com proteínas descritas em diferentes bancos de dados. A diferença no perfil protéico provenientes dos grãos estudados pode fornecer subsídios para novas investigações dos processos bioquímicos e o papel das proteínas no metabolismo que envolve o sabor e aroma da bebida do café, permitindo integrar informações sobre o cultivo e tratamentos pós-colheita com a formação de compostos bioquímicos nas células.

Palavras-chave: *Coffea arabica*; Eletroforese bidimensional; Espectrometria de massa; Proteômica; Qualidade da bebida.

GENERAL ABSTRACT

Although the cultivation of arabica coffee in high altitudes is known for positively affecting the final quality of the beverage, the quantitative data which describe the influence of the climatic conditions over the chemical composition of the grains are still scarce. In the same way, the post-harvest treatments of the grains are known for affecting the generation of flavor, but the chemical transformations which occur during processing are poorly understood. To better characterize the effects of altitude, dry and wet post-harvesting methods and its possible interactions, we quantified the changes in one of the main chemical components of the grains, the proteins. The present work was performed with the objective of evaluating the protein composition of *Coffea arabica* grains cultivars yellow Bourbon and Acaiá, submitted to dry and wet methods and cultivated in two different altitudes, below 1000 m and above 1200 m. The evaluation method used was the comparison of the proteomic profile, obtained by bidimensional electrophoresis and the peptides generated were identified by electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS/MS), with the aid of the MASCOT program seeking homology with proteins described in different databases. The difference in the protein profile derived from the studied grains may provide subsidies for new investigations of the biochemical processes and the role of the proteins in the metabolism which involves the flavor and aroma of the coffee beverage, allowing the integration of information on the cultivation and post-harvest treatments with the formation of biochemical compounds in the cells.

Keywords: *Coffea arabica*; bidimensional electrophoresis; mass spectrometry; proteomics; beverage quality.

SUMÁRIO

1 PRIMEIRA PARTE.....	09
INTRODUÇÃO GERAL.....	10
2 REFERENCIAL TEÓRICO	13
2.1 Importância econômica do café.....	13
2.2 Café Bourbon e café Acaiá.....	14
2.3 Qualidade da bebida do café.....	15
2.4 Proteínas dos grãos de café	19
REFERÊNCIAS	22
SEGUNDA PARTE.....	27
ARTIGO 01 - Efeito da altitude no proteoma de grãos de café (<i>Coffea arabica L.</i>).....	28
RESUMO.....	29
INTRODUÇÃO.....	30
MATERIAL E METODOS.....	31
RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
CONCLUSÃO.....	47
REFERÊNCIAS.....	48
ARTIGO 02 - Análise comparativa do proteoma de grãos de café processados por via seca e via úmida.....	53
RESUMO.....	54
INTRODUÇÃO.....	55
MATERIAL E MÉTODOS.....	56
RESULTADOS	63
DISCUSSÃO	71

CONCLUSÃO.....	79
REFERÊNCIAS	80
ARTIGO 03 - Análise do perfil proteômico de grãos de café natural e desmucilados cultivados em diferentes regiões da Serra da Mantiqueira.....	86
RESUMO.....	87
INTRODUÇÃO.....	88
MATERIAL E METODOS.....	90
RESULTADOS.....	96
DISCUSSÃO	108
CONCLUSÃO.....	112
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	113

PRIMEIRA PARTE

Introdução Geral

INTRODUÇÃO GERAL

O agronegócio do café é uma das atividades que tem se destacado historicamente na balança comercial brasileira. Para a nova safra (2014), de ciclo de alta bienalidade, estima-se que sejam colhidas aproximadamente 48 milhões de sacas (60kg), sendo essa correspondente a cerca de um terço da produção mundial, o que faz do Brasil o maior produtor e exportador. O País é também o segundo maior consumidor, após os Estados Unidos da América (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB, 2014).

A região Sul de Minas é a maior produtora de café do estado e do Brasil, correspondendo a 53,6% da produção mineira e 25,2% da produção nacional. Seu parque cafeeiro abrange 37.000 propriedades, em uma área cultivada estimada em 629 mil hectares, com uma produção média de 14 milhões de sacas de café beneficiado (CONAB, 2014). Essa região também é marcada por grandes variações edafoclimáticas, fazendo com que a qualidade do café expresse-se de maneiras distintas. Nessa região, destaca-se, pela elevada qualidade sensorial dos cafés produzidos, a microrregião da Serra da Mantiqueira, considerada uma das mais importantes regiões produtoras de café especiais do Brasil.

As características singulares dos cafés da “Serra da Mantiqueira” e a consistência apresentada nos resultados dos principais concursos de qualidade realizados no Brasil comprovam a vocação dessa região para a produção de cafés especiais. Em decorrência dessas características, os cafés produzidos na “Serra da Mantiqueira” vêm obtendo crescente reconhecimento pelo mercado internacional, sendo classificados entre os melhores cafés do mundo.

Por ser uma das bebidas mais consumidas no mundo e com grande tendência de crescimento, em razão da abertura comercial e oportunidade de investimento concedidos pelos países asiáticos (INTERNATIONAL COFFEE

ORGANIZATION - IOC, 2014), os produtores não têm medido esforços para aumentar o desempenho produtivo e a qualidade dos grãos.

Aliados a essa ideia, dezenas de instituições de pesquisa estão reunidas em prol de atender à crescente demanda mundial, inclusive por cafés especiais (também conhecidos como *Gourmet*, que são cafés que produzem uma bebida de sabor e aroma diferenciados). Dentre as pesquisas realizadas, algumas têm a finalidade de determinar o conteúdo bioquímico dos grãos e associá-lo à condições ambientais, métodos de processamento pós-colheita, genótipo entre outros fatores que podem influenciar a qualidade da bebida.

Provavelmente, muitos compostos químicos, como, por exemplo as proteínas, contribuem significativamente na qualidade de bebida. Por isso, desvendar suas interações e funções se torna tão importante, uma vez que essas informações poderão ser utilizadas em outras pesquisas com melhoramento genético ou como marcadores moleculares de qualidade.

As proteínas contribuem significativamente na qualidade da bebida durante a torração, interações entre açúcares redutores e o grupamento amino dos aminoácidos durante a reação de Maillard, são tidas como essenciais nos processos envolvidos no desenvolvimento do sabor e do aroma (REINECCIUS, 1995). Provavelmente, as proteínas enzimáticas também contribuem na qualidade da bebida do café, desencadeando transformações cruciais nos grãos (AMORIM, 1978).

Uma das maneiras de avaliar a composição proteica dos grãos é por análise do perfil proteômico. A proteoma é uma área de pesquisa promissora, que permite a avaliação do conjunto de proteínas expressas num organismo, tecido ou células, num determinado momento fisiológico ou sob condições induzidas.

Existem várias formas de se analisar um perfil proteômico. A abordagem clássica é o estudo da expressão protéica global (*expression*

proteomics), que envolve a criação de mapas quantitativos das proteínas expressas de extratos de células ou tecidos e, para tal, dois princípios são utilizados: o de separação e o de identificação (JOCELYN; ILANG, 2002). As duas técnicas de separação mais utilizadas são a eletroforese bidimensional e a cromatografia líquida multidimensional (ABBOT, 1999; CAGNEY et al, 2003). A espectrometria de massa permite a identificação de proteínas em pequenas concentrações (MO; KARGER, 2002) e os dados gerados são, então, comparados com os obtidos nos bancos genômicos, que favorecem a análise do proteoma, aliando espectrometria de massa com análise *in silico* do proteoma (CAGNEY et al., 2003).

O presente trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar a composição protéica de grãos de *Coffea arabica* cultivares Bourbon amarelo e Acaiá, submetidos ao processamento via seca e via úmida, cultivados em duas diferentes faixas de altitudes, abaixo de 1000m e acima de 1200m. O método de avaliação utilizado foi a comparação do perfil proteômico, obtido por eletroforese bidimensional.

Espera-se que esta pesquisa gere subsídios para posteriores investigações dos processos bioquímicos e das funções das proteínas no metabolismo que envolve o sabor e aroma da bebida do café, fornecendo informações para o cultivo e controle das tecnologias empregadas nos tratamentos pós-colheita, minimizando a formação de potenciais componentes químicos prejudiciais à qualidade de bebida.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Importância econômica do café

Desde o período imperial até os dias atuais, o café é um dos principais itens de exportação. No Brasil, por sua rápida adaptação ao clima e solo, o café destaca-se econômica e socialmente, desde a chegada das primeiras mudas vindas da Guiana Francesa, em meados do século XVIII. Atualmente, são 15 Estados produtores, com destaque para Minas Gerais, Espírito Santo, São Paulo, Bahia, Paraná e Rondônia, responsáveis por uma produção de aproximadamente 50 milhões de sacas (60kg) no ano de 2013 (CONAB, 2014)

Por ser cultivado em diferentes regiões, o Brasil produz variedades do produto, o que possibilita atender às diferentes demandas mundiais, referentes ao paladar e até aos preços, tornando-o o maior exportador de café do mundo. Essa diversidade também permite o desenvolvimento dos mais variados *blends*, tendo como base o café de terreiro ou natural, o despoldado, o descascado, o de bebida suave, os ácidos, os encorpados, além de cafés aromáticos, especiais e de outras características (BRASIL, 2014).

O consumo do café vem atingindo recordes de crescimento no Brasil e no mundo. No período compreendido entre maio/2011 e abril/2012, foi registrado no Brasil um consumo de 19,975 milhões de sacas, isso representando um acréscimo de 3,05% em relação ao período anterior correspondente (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE CAFÉ - ABIC, 2012).

Recentemente, alguns produtores decidiram mudar de estratégia na produção do café, de forma a acompanhar um mercado consumidor mais seletivo, passando a dar mais importância à questão de sustentabilidade na produção e qualidade da bebida (LEÃO; PAULA, 2010). Com isso, foi possível também agregar valor ao produto, o que aconteceu com a disponibilidade de

cafés de melhor qualidade, diferenciados e certificados. Assim, em decorrência dessa crescente mudança, observa-se maior busca e valorização por melhor qualidade, estando esses novos consumidores dispostos a pagarem mais pelos atributos desejados.

2.2 Café Bourbon e café Acaiá

A cultivar Bourbon amarelo pertence à espécie *Coffea arabica* L., que é um alotetrapoide, com $2n=4x=44$ cromossomos, sendo a única espécie autógama, apresentando 10% de alogamia (GUIMARÃES; MENDES; SOUZA, 2002).

Fazuoli et al. (2005) caracterizam as plantas de Bourbon, como sendo vulneráveis à ferrugem, possuindo porte médio/alto, maturação precoce e frutos de coloração avermelhada ou amarelada e sementes com peneira média de 16mm. Sendo seu plantio indicado em regiões com altitudes acima de 1000m para produção de cafés especiais.

Sensorialmente, verificou-se genótipos da variedade Bourbon em três diferentes ambientes, notando variações quanto à qualidade de bebida apresentada entre os genótipos e que um mesmo genótipo pode expressar qualidades diferentes de bebida dependendo do ambiente no qual foi cultivado (FIGUEIREDO, 2010).

A cultivar Acaiá é uma planta com porte alto, copa cilíndrica, frutos vermelhos e de maturação mais uniforme de média para precoce; peneira média 18; suscetível à ferrugem. Ótima qualidade de bebida. Excelente para a colheita mecânica. (GUERREIRO FILHO; FAZUOLI; AGUIAR, 2014)

2.3 Qualidade de bebida do café

Para o café, a boa qualidade da bebida é determinada pelo sabor e aroma formados a partir de compostos químicos voláteis e não voláteis, durante a torração do grão cru. Esses atributos sensoriais dependem do equilíbrio entre acidez e o amargor do café, gerando sabor e aroma agradáveis, bom corpo e suavidade ao paladar (BORÉM, 2008).

Em grãos crus, os compostos químicos precursores de sabor e aroma encontram no endosperma e suas proporções estão entre 6-12 % de proteínas, 8-11% de água, 13-20 % de lipídeos, 6-9% de ácidos clorogênicos, 1-2,5% de cafeína, 7-30% de açúcares, 3-4% de minerais, 15-20% de celulose (ILLY; VIANI, 1995).

Vários fatores interferem diretamente na composição química do grão, alterando a qualidade final da bebida, dentre eles, influência genética, ambiental e tratos culturais, além dos métodos de colheita, processamento e armazenamento (ALPIZAR; BERTRAND, 2004; FARAH et al., 2006).

Estudos sobre a composição química do café e a qualidade de bebida ainda não elucidaram definitivamente essa relação, apresentando apenas algumas evidências. No entanto, sabe-se que a qualidade da bebida está vinculada à complexidade dos compostos presentes no café torrado (FRANCA; MENDONÇA; OLIVEIRA, 2004).

As condições geográficas ideais para plantio de cafés de qualidades elevadas são alta altitude e solo fértil. Dessa forma, regiões localizadas ao redor da zona equatorial (entre as latitudes 25° ao norte e 30° ao sul), onde, durante o dia, as temperaturas são elevadas e, à noite, são baixas, são consideradas fatores determinantes no que diz respeito à qualidade da bebida (NATIONAL COFFEE ASSOCIATION - NCA, 2014).

As características de clima influenciam a qualidade do café em função da velocidade do desenvolvimento dos frutos, se o ciclo é longo, o amadurecimento é mais lento e as transformações bioquímicas são completadas. Com isso, ocorre acúmulo de precursores levando o grão a apresentar características mais favoráveis de bebida. □Dentre os fatores climáticos que atuam na qualidade natural da bebida do café arábica, destaca-se a temperatura do ar por sua influência na duração do ciclo produtivo e condicionando a época de colheita. (ORTOLANI et al., 2001; VAAST et al., 2006).

A temperatura possui influência direta sobre processos regulatórios da planta, interferindo na velocidade das reações enzimáticas. Menores temperaturas estão relacionadas ao decréscimo nas taxas fotossintéticas e respiratórias (LAVIOLA et al., 2007).

Estudo avaliou a qualidade da bebida de café, provenientes de diferentes ambientes em Honduras, e mostraram que altas altitudes e baixo índice pluviométrico, interferem de forma favorável na qualidade da bebida, produzindo grãos maiores e com maior quantidade de lipídeos (DECAZY et al., 2003).

Dentro desse mesmo contexto, estudos mostram que os cafés sem a presença dos defeitos, produzidos na faixa de altitude de 920 a 1120 metros, apresentam corpo e acidez mais fracos e doçura mais alta do que os produzidos na faixa de 720 a 920 metros; e que maiores altitudes possibilitam a produção de cafés de melhor qualidade (SILVA et al., 2004).

Entre os fatores climáticos, pesquisas recentes revelaram que a temperatura média do ar durante o desenvolvimento dos grãos de café influenciou, consideravelmente, o perfil sensorial. Dois compostos voláteis (etanal e acetona) foram identificados como indicadores de temperaturas frias. Entre os voláteis detectados, o acúmulo da maioria dos álcoois, aldeídos, cetonas, hidrocarbonetos foram diretamente relacionados aos grãos cultivados à

elevadas temperaturas e alta radiação solar, e o perfil sensorial desses grãos apresentou defeitos maiores, isto é, sabor verde e terroso (BERTRAND et al., 2012).

No campo, a produtividade da cultivar Obatã foi avaliada sob os efeitos de diversos regimes de luz e disponibilidade de água no solo e verificou-se que, em condições com sombreamento em torno de 70%, houve um favorecimento dos processos fisiológicos e melhorias na qualidade da bebida (FAHL; CARELLI, 2007).

Em relação ao genótipo, foram analisadas 16 cultivares de café, entre elas a cultivar Bourbon Amarelo e Acaiá, concluindo que os grãos crus das cultivares avaliadas possuem diferenças significativas na sua composição química (açúcares, polifenóis, cafeínas e outros) (MENDONÇA et al., 2007). Por outro lado, sete diferentes cultivares de *Coffea arabica* L. foram avaliados e os resultados permitiram concluir que não existe uma grande variação nos teores dos açúcares totais, redutores e não redutores nos grãos crus (LOPES; PEREIRA; MENDES, 2000).

Os teores de ácidos clorogênicos, compostos fenólicos presentes em quantidades altas em folhas e grãos de plantas de café, foram estudados por suas relações com a resistência a doenças e com a qualidade de bebida do café. Este estudo forneceu dados sobre os teores de ácidos clorogênicos em inúmeras espécies de *Coffea*, e foi constatada relação entre a qualidade de bebida e a quantidade de ácidos clorogênicos nos grãos, sendo que os mais altos teores de ácido clorogênicos foram obtidos em *C. canephora*, que apresenta qualidade de bebida inferior a de *C. arabica* L. (FAHL; CARELLI, 2007).

Os processos de colheita e pós-colheita também são capazes de influenciar a composição química final do grão de café. Para produção de cafés de alta qualidade, a colheita seletiva é a mais indicada, já que, nesse caso,

resultará numa uniformidade dos frutos, sendo em sua totalidade frutos maduros (BORÉM, 2008).

O preparo por via seca ou via úmida geralmente influencia na formação de cafés com qualidade de bebidas variáveis, dependendo também do processo de secagem empregado, uma vez que podem afetar enzimas e proteínas essenciais na preservação dessa qualidade (TAVEIRA et al., 2012).

Trabalhos que avaliam os efeitos do tipo de processamento sobre os grãos de café, têm demonstrado alterações na concentração de aminoácidos livres nos grãos de café. Por exemplo, a concentração do ácido γ -amino butírico (GABA) em via úmida é bem menor que nos grãos processados por via seca (SELMAR; BYTOF, 2006).

Também foi possível observar uma forte influência do pré-processamento dos grãos crus de cafés arábica cultivar catuaí amarelo. O teor dos principais precursores de voláteis, como os açúcares redutores e aminoácidos livres para o café processado por via seca apresentou-se elevado, já o teor dos açúcares totais, ácidos clorogênicos e trigonelina apresentaram-se mais elevados nos grãos de café processado por via úmida (ARRUDA et al., 2012).

Da mesma forma, quando se comparou grãos de cafés processados por via seca e via úmida, foram observadas variações em outros compostos químicos. Em grãos processados por via úmida foi verificada uma redução em hidratos de carbono livres (frutose e glicose), ácidos orgânicos (quínico e ácido oxálico), compostos minerais (por exemplo, K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cu^{2+}), trigonelina e, em grãos processados por via seca, um aumento em ácidos clorogênicos, polissacarídeos da parede celular (por exemplo, arabinogalactanos, mananos) e lipídeos (LELOUP et al., 2004).

2.4 Proteínas dos grãos de café

Relacionar a composição química do grão de café com a qualidade da bebida ainda é um desafio, em razão da complexidade dos processos. Assim, é evidente a importância de se realizar estudos mais aprofundados, capazes de elucidar modificações fisiológicas e bioquímicas, selecionando rotas metabólicas e moléculas contribuintes no sabor e aroma da bebida. Nesse contexto, destacam-se as proteínas, macromoléculas de suma importância por apresentarem muitas funções biológicas e por participarem, direta e/ou indiretamente na formação do sabor e aroma da bebida do café.

As proteínas dão origem a vários compostos voláteis e não voláteis responsáveis pelo sabor e aroma do café torrado. No grão de café, as proteínas estão livres no citoplasma ou ligados a polissacarídeos da parede celular, sendo desnaturadas durante a torração. O teor de proteína do café cru pode variar com a idade e variedade da planta, e também com o estágio de maturação dos frutos (HOFFMANN, 2001; PIMENTA, 1995).

Uma das importâncias das proteínas na qualidade da bebida de café está relacionada à sua participação na reação de Maillard, a partir das interações estabelecidas com açúcares redutores e com o grupamento amino de aminoácidos, sendo fundamentais no desenvolvimento do aroma e sabor da bebida. Tal reação ocorre durante a torração e é responsável pela produção de aromas e coloração escura em diversos alimentos (REINECCIUS, 1995).

O papel das enzimas é de grande importância na qualidade de bebida de café, sendo que a atuação destas pode contribuir para qualidade, dependendo da sua função e nível de expressão. Várias transformações químicas que ocorrem no grão do café são de natureza enzimática, uma vez que as enzimas são constituintes do próprio grão ou de microrganismos (AMORIM, 1978; GOURLAT, 2003).

As proteases também têm papel de importância na qualidade da bebida, são específicas e agem promovendo a quebra de determinadas proteínas e liberando aminoácidos que estarão envolvidos na realocação e formação de novas proteínas relacionadas ao aroma e sabor (LUDWING et al., 1999).

A literatura tem mostrado que, juntamente com o conteúdo dos aminoácidos e de compostos fenólicos, o perfil protéico e enzimático encontrado nos frutos pode ter uma relação direta com as condições ambientais das diferentes regiões em que as plantas são cultivadas, principalmente em relação à temperatura e precipitação pluviométricas (MENDONÇA, 2012; SILVA et al., 2005).

Os primeiros trabalhos relacionados com proteomas caracterizaram algumas proteínas presentes no grão cru de café e foram identificadas devido à sua natureza enzimática. Dentre essas estão polifenoloxidase, fosfatase, malato desidrogenase, catalase, α e β -galactosidase, entre outras enzimas hidrolíticas e oxidativas (CLARKE; MACRAE, 1985).

Em *Coffea* sp a proteína de reserva globulina 11S é a mais estudada do endosperma de grãos. Análises de géis de eletroforese SDS_PAGE mostraram que ela possui peso molecular de 55 kDa, constituída por duas subunidades, uma de 33 kDa (cadeia α) e outra de 24 kDa (cadeia β). E, por análise imunocitoquímica, foi observada a presença dessas proteínas em grandes vacúolos no citoplasma de semente maduras de café (ACUÑA et al., 1999).

Utilizando análises por eletroforese bidimensional (2DE), estudos de caracterização molecular e bioquímica complementares identificaram as subunidades α e β da proteína 11S como sendo ácida e básica e pressupôs que essas proteínas correspondam a 45% do conteúdo protéico dos grãos de café. Nesse mesmo trabalho, foi observada a presença de muitas isoformas, o que indica que essas proteínas são codificadas por uma família multigênica (ROGERS et al., 1999).

A partir da análise comparativa dos perfis protéicos de duas espécies de café (*C. arabica* e *C. canephora*), foi possível identificar diferenças na presença e concentração de diversas proteínas. Dezesesseis proteínas foram encontradas apenas em *C. canephora* (var. Indiano Robusta) e cinco apenas em *C. arabica* (var. Colombia). Outras oito proteínas foram mais abundantes em *C. canephora* (var. Indiano Robusta) e outras duas mais abundantes em *C. arabica* (var. Colombia) (GIL-AGUSTINI et al, 2005).

Grãos de *C. arabica* também foram avaliados quanto ao seu perfil bioquímico, após serem submetidos a diferentes processamento e secagem. Um desses trabalhos, apresentou diferenças significativas entre os perfis proteômicos de grãos secos em terreiro e secador, demonstrando claramente os efeitos da temperatura sobre os peptídeos (LIVRAMENTO, 2008). Outro trabalho realizou análises bioquímicas de grãos processados por via seca ou via úmida, por meio da eletroforese de proteínas resistentes ao calor LEA e de enzimas antioxidantes. Os resultados deste trabalho evidenciaram a promissora ideia que proteínas podem ser marcadores de qualidade dos cafés (TAVEIRA et al, 2012).

Espera-se que o estudo proteômico comparativo dos diferentes genótipos de café em resposta ao ambiente e ao processamento e sua relação com a qualidade de bebida, possa contribuir para uma padronização do cultivo e controle das tecnologias empregadas nos tratamentos pós-colheita, minimizando a formação de potenciais componentes químicos prejudiciais à qualidade da bebida.

REFERÊNCIAS

ABBOT, A. News briefing: a post-genomic challenge: learning to read patterns of protein synthesis. **Nature**, London, v. 402, n. 6367, p. 715-720, Dec. 1999.

ACUÑA, R. et al. Coffee seeds contain 11S storage protein. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 105, n. 1, p. 122-131, Jan. 1999.

ALPIZAR, E.; BERTRAND, B. Incidence of elevation on chemical composition and beverage quality of coffee in Central America. In: INTERNATIONAL CONFERENCE IN COFFEE SCIENCE, 20., 2004, Bangalore. **Proceedings...** Bangalore: ASIC, 2004. 1 CD-ROM.

AMORIM, H. V. **Aspectos bioquímicos e histoquímicos do grão de café verde relacionados com a deterioração de qualidade**. 1978. 85 f. Tese (Livre-Docência) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 1978.

ARRUDA, N. P. et al. Correlação entre precursores e voláteis em café arábica brasileiro processado pelas vias seca, semiúmida e úmida e discriminação através da análise por componentes principais. **Química Nova**, São Paulo, v. 35, n. 10, p. 2044-2051, 2012.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE CAFÉ. **Evolução do consumo interno de café**. Disponível em: <<http://www.abic.com.br/publique/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=61#evocons2013.2>>. Acesso em: 3 fev. 2014.

BERTRAND, B. et al. Climatic factors directly impact the volatile organic compound fingerprint in green Arabica coffee bean as well as coffee beverage quality. **Food Chemistry**, Oxford, v. 135, n. 4, p. 2575-2583, Dec. 2012.

BORÉM, F. M. Processamento do café. In: _____. **Pós-colheita do café**. Lavras: UFLA, 2008. p. 127-158.

BRASIL. Ministério da Agricultura. **Café**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/cafe>>. Acesso em: 3 fev. 2014.

CAGNEY, G. et al. In silico proteome analysis to facilitate proteomics experiments using mass spectrometry. **Proteome Science**, Washington, v. 1, n. 5, p. 1-15, Aug. 2003.

CLARKE, R. J.; MACRAE, R. **Coffee**. London: Elsevier Science, 1985. v. 1, 306 p.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **4ª estimativa café:** safra/2013, dezembro. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/14_01_17_09_29_46_boletim_cafe_-_original_normalizado.pdf>. Acesso em: 3 fev. 2014.

DECAZY, F. et al. Quality of different Honduras coffee in relation to several environments. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 68, n. 7, p. 2356-2361, 2003.

FAHL, J.; CARELLI, M. L. C. Os estudos sobre a fisiologia do cafeeiro no Instituto Agrônômico. **O Agrônômico**, Campinas, v. 59, n. 1, p. 48-53, 2007.

FARAH, A. et al. Correlation between cup quality and chemical attributes of Brazilian coffee. **Food Chemistry**, Oxford, v. 98, n. 2, p. 373-380, 2006.

FAZUOLI, L. C. et al. Avaliação das cultivares Mundo Novo, Bourbon Amarelo e Bourbon Vermelho de *Coffea arabica* L. em Campinas, SP. **Bragantia**, Campinas, v. 64, n. 3, p. 533-546, 2005.

FIGUEIREDO, L. P. **Perfil sensorial e químico de genótipos de cafeeiro Bourbon de diferentes origens geográficas**. 2010. 95 p. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2010.

FRANCA, A. S.; MENDONÇA, J. C. F.; OLIVEIRA, S. S. D. Composition of green and roasted coffees of different cup qualities. **LWT**, London, v. 38, p. 709-715, Aug. 2004.

GIL-AGUSTINI, M. T. et al. Two-dimensional mapping as a tool for classification of green coffee bean species. **Proteomics**, Weinheim, v. 5, p. 710-718, Feb. 2005.

GOURLAT, P. F. P. Análise comparativa entre lixiviação de potássio, condutividade elétrica, teor de ácido clorogênico e métodos de quantificação da atividade da polifenoloxidase em extratos semipurificados de amostras de café de diferentes padrões de qualidade. **Revista Brasileira de Armazenamento**, Viçosa, MG, n. 7, p. 78-85, 2003.

GUERREIRO FILHO, O.; FAZUOLI, L. C.; AGUIAR, A. T. E. **Cultivares de Coffea arabica selecionadas pelo IAC:** características botânicas, tecnológicas,

agronômicas e descritores mínimos. Disponível em:
<http://www.infobibos.com/Artigos/2006_2/Cultivares_cafe/Index.htm>.
Acesso em: 9 jun. 2014.

GUIMARÃES, R. J.; MENDES, A. N. G.; SOUZA, C. A. S. (Ed.).
Cafeicultura. Lavras: UFLA-FAEPE, 2002. 317 p.

HOFFMANN, C. E. **Resfriamento no processo de torra nas características de qualidade tecnológica e sensorial do café**. 2001. 86 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2001.

ILLY, A.; VIANI, R. **Espresso coffee: the chemistry of quality**. San Diego: Academic, 1995. 398 p.

INTERNATIONAL COFFEE ORGANIZATION. **Coffee in China**. Disponível em: <<http://dev.ico.org/documents/cy2012-13/icc-111-8e-study-china.pdf>>.
Acesso em: 3 fev. 2014.

JOCELYN, H.; ILAG, L. **Dividing and conquering proteomics**. Weinheim: Proteomics, 2002. 98 p.

LAVIOLA, B. G. et al. Alocação de fotoassimilados em folhas e frutos de cafeeiro cultivado em duas altitudes. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 42, n. 11, p. 1521-1530, nov. 2007.

LEÃO, E. de A.; PAULA, N. M. de. A produção de cafés especiais no Brasil e a emergência de novos padrões de competitividade. In: ENCONTRO REGIONAL DE ECONOMIA, 13., 2010, Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre: UFRGS, 2010. p. 1-18.

LELOUP, V. et al. Impact of wet and dry process on green coffee composition and sensory characteristics. In: INTERNATIONAL CONFERENCE IN COFFEE SCIENCE, 20., 2004, Bangalore. **Resumes...** Bangalore: ASIC, 2004. 1 CD-ROM.

LIVRAMENTO, K. G. **Proteomica diferencial de café arábica submetido a diferentes processamentos e secagem**. 2008. 67 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008.

LOPES, L. M. V.; PEREIRA, R. G. F. A.; MENDES, A. N. G. Variação no teor de açúcares totais, redutores e não redutores de grãos crus e torrados de sete cultivares de café (*Coffea arabica* L.). In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS

CAFÉS DO BRASIL, 1., 2000, Poços de Caldas. **Resumos Expandidos...**
Poços de Caldas: EMBRAPA Café, 2000. p. 748-751.

LUDWING, E. et al. Investigations of peptides and proteases in green coffee beans. **European Food Research and Technology**, Berlin, v. 211, p. 111-116, Sept. 1999.

MENDONÇA, L. M. C. **Proteômica comparativa da expressão da qualidade sensorial de genótipos de Bourbon em diferentes ambientes**. 2012. 82 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.

MENDONÇA, L. M. V. L. et al. Composição química de grãos crus de cultivares de *Coffea arabica* L. susceptíveis e resistentes a *Hemileia vastatrix* Berg et Br. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 2, p. 413-419, mar./abr. 2007.

MO, W.; KARGER, B. L. Analytical aspects of mass spectrometry and proteomics. **Current Opinion in Chemical Biology**, London, v. 6, n. 5, p. 666-675, Oct. 2002.

NATIONAL COFFEE ASSOCIATION. **Coffee from around the world**. Disponível em: <<http://www.ncausa.org/i4a/pages/index.cfm?pageid=75>>. Acesso em: 5 fev. 2014.

ORTOLANI, A. A. et al. Regionalização da época de maturação e qualidade natural de bebida do café arábica no Estado de São Paulo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE AGROMETEOROLOGIA, 12., 2001, Fortaleza. **Anais...** Fortaleza: UFC, 2001. 1 CD-ROM.

PIMENTA, C. J. **Qualidade do café (*Coffea arabica* L.) originado de diferentes frutos colhidos em quatro estágios de maturação**. 1995. 94 f. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1995.

REINECCIUS, G. A. The maillard reaction and coffee flavor. In: COLLOQUIUM, 16., 1995, Kyoto. **Proceedings...** Paris: ASIC, 1995. p. 249-257.

ROGERS, W. J. et al. Biochemical and molecular characterization and expression of the 11S-type storage protein from *Coffea arabica* endosperm. **Plant Physiology Biochemistry**, Paris, v. 37, n. 4, p. 261-272, Feb. 1999.

SELMAR, D.; BYTOF, G. Green coffee is ALIVE!: a review on the metabolic process taking place in Coffee Beans during processing and their implication for modern coffee research. In: COLLOQUE SCIENTIFIQUE INTERNATIONAL SUR LE CAFÉ, 21., 2006, Montpellier. **Proceedings...** Montpellier: ASIC, 2006. 1 CD-ROM.

SILVA, E. A. et al. The influence of water management and environmental conditions on the chemical composition and beverage quality of coffee beans. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Piracicaba, v. 17, n. 2, p. 229-238, June 2005.

SILVA, R. F. et al. Qualidade do café cereja descascado produzido na região Sul de Minas Gerais. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 28, n. 6, p. 1367-1375, nov./dez. 2004.

TAVEIRA, J. H. S. et al. Perfis protéicos e desempenho fisiológico de sementes de café submetidas a diferentes métodos de processamento e secagem. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 47, n. 10, p. 1511-1517, out. 2012.

VAAST, P. et al. Fruit thinning and shade influence bean characteristics and beverage quality of *C. arabica* in optimal conditions. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 86, n. 2, p. 197-204, Jan. 2006.

SEGUNDA PARTE

Artigos

ARTIGO 01
NORMAS DA REVISTA CIENTÍFICA
PLoS ONE
(VERSÃO PRELIMINAR)

ARTIGO 01**EFEITO DA ALTITUDE NO PROTEOMA DE GRÃOS DE CAFÉ
ARÁBICA CULTIVAR BOURBON AMARELO.****Resumo**

Embora se saiba que o cultivo do café em regiões mais elevadas contribui para a qualidade final da bebida, a descrição dos parâmetros que relacionam as condições climáticas desses locais com a composição química dos grãos é escassa. Para melhor caracterizar os efeitos do ambiente de cultivo e sua interação com o metabolismo da planta, este trabalho compara o proteoma dos grãos e analisa as alterações proteicas. As proteínas foram extraídas de amostras de grãos de café natural e desmucilado, coletadas de plantas cultivadas em locais abaixo de 1000m e acima de 1200m. Por análise dos géis provenientes da eletroforese bidimensional foi possível verificar a presença de duas proteínas diferencialmente abundantes em grãos de café natural e seis nos grãos desmucilados. Dentre as proteínas, o fator de tradução IF-1 foi mais abundante nos grãos de café natural cultivados abaixo de 1000m, em relação aos cultivados acima de 1200m. Na segunda análise, as proteínas mais abundantes foram a ferritina e globulina 11S, identificadas em grãos desmucilados cultivados acima de 1200m, quando comparados aos grãos de café cultivados abaixo de 1000m. Os resultados apresentados poderão ser a base para estudos posteriores que almejam entender as alterações bioquímicas dentro do endosperma dos grãos de café.

Palavras-chaves: *Coffea arabica* L.; Eletroforese bidimensional; Fatores ambientais; Proteína; Qualidade da bebida

INTRODUÇÃO

O café é um dos principais produtos agrícola comercializados do mundo. O Brasil é o maior exportador e produz cerca de um terço da produção mundial. Com, aproximadamente, 26 milhões de pessoas vinculadas à sua produção e comercialização no mundo, gera uma receita financeira de aproximadamente 3 bilhões de dólares [1, 2].

A produção anual do café sofre oscilações regulares, determinada, principalmente, pelo ciclo bianual da espécie e efeitos adversos do clima. Longos períodos sem chuva e temperaturas elevadas são alguns dos fatores que afetam o desenvolvimento da planta e sua produção [3].

Porém, os fatores climáticos, principalmente a temperatura, não afetam apenas a produtividade, mas também interferem na composição química (açúcares redutores, proteínas, cafeína, etc.) dos grãos e, conseqüentemente, na qualidade final da bebida [4].

Nos últimos anos, o mercado tem aumentado a demanda por cafés que têm uma bebida de qualidade superior, crescendo também a necessidade de certificação e, por isso, diferenciar a sua origem tem tido muita importância [5]. Passa a ser crucial denominar a origem da produção do café, porque cafés cultivados em regiões mais elevadas possuem a reputação de gerarem uma bebida de melhor qualidade e, por isso, seu preço pode atingir valor superior aos cafés de bebida padrão [6, 7].

No entanto, poucos são os relatos científicos que relacionam os efeitos das condições climáticas na qualidade de bebida. Pesquisas realizadas na Guatemala e em países da América Central demonstraram que o café cultivado em elevadas altitudes, onde as temperaturas são mais amenas, produzem uma bebida de qualidade superior [8-11].

Recentemente, dois compostos químicos (butan-1,3-diol e o butan-2,3 diol) foram relacionados à qualidade da bebida inferior, proveniente de cafés cultivados em regiões com temperaturas mais elevadas e baixa altitude [7]. Outro estudo correlacionou a qualidade de bebida com a temperatura, concluiu que o maior acúmulo dos precursores do aroma e sabor de bebidas de alta qualidade são provenientes de um processo de amadurecimento mais lento provocado pelas baixas temperaturas [6].

Muitas pesquisas relatam as diferentes concentrações de compostos químicos em grãos cultivados em diferentes regiões, mas focam seus estudos em quantificar açúcares, ácido clorogênico, trigonelina e outros [6, 7, 9, 11]. Em relação às proteínas, pouco se sabe sobre sua expressão e comportamento no grão e, conseqüentemente, como interferem no sabor e aroma da bebida.

Sabendo da grande necessidade para entender como as condições climáticas interferem nas transformações químicas dentro dos grãos, o presente trabalho teve o intuito de agregar informações sobre as proteínas presentes nos grãos. A partir de géis obtidos por eletroforese bidimensional, o objetivo principal foi analisar o perfil proteômico dos grãos cultivados em duas faixas diferentes de altitude, abaixo de 1000m e acima de 1200m, e identificar os peptídeos diferencialmente expressos por espectrometria com ionização por eletrospray (ESI-MS/MS) nas duas condições.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório Central de Biologia Molecular (LCBM) da Universidade Federal de Lavras (UFLA).

2.1 Procedência dos grãos de café

Para o presente estudo, foram coletadas amostras de café Bourbon Amarelo (*Coffea arabica* L.), ao longo da safra agrícola (2009/10), em lavouras comerciais localizadas no município de Carmo de Minas (-22°6', 45°8'), na Serra da Mantiqueira em Minas Gerais, Brasil. O ambiente de cultivo do café foi estratificado em duas classes de altitude (inferior a 1.000 m e superior a 1.200 m).

A colheita foi realizada manual e seletivamente, em triplicata. Somente os frutos maduros (cerca de 60L) foram coletados de diversas plantas de um talhão identificado. Em seguida, os frutos foram separados por diferença de densidade, aproveitando-se somente aqueles mais densos. Aproximadamente, 14 L de frutos selecionados foram dispostos em telas para secagem ao sol, obtendo-se, assim, as amostras de café natural (via seca). Para a obtenção do café via úmida, optou-se pelo processo desmucilagem mecânica. Aproximadamente, 20 L de frutos maduros, previamente selecionados, foram descascados e desmucilados. Em seguida, em torno de 7 L de café desmucilado foram dispostos em telas para secagem ao sol. A secagem iniciou-se imediatamente após o processamento.

Todos os procedimentos de colheita, processamento e secagem foram realizados segundo Borém (2008).

Posteriormente, todos os grãos com defeitos foram retirados, visando à uniformização e, sobretudo, à minimização de interferências que não fossem relacionadas ao material genético, ao processamento ou ao ambiente de cultivo.

As análises comparativas foram constituídas da seguinte forma:

- Análise 01 - grãos de café natural - abaixo de 1000m X acima de 1200m.
- Análise 02 - grãos de café desmucilados - abaixo de 1000m X acima de 1200m.

2.2 Extração de proteínas totais

Todas as amostras foram submetidas à retirada da casca e pergaminho e foram conservadas em tubos falcon no freezer -80°C. Para análise, os grãos foram macerados em nitrogênio líquido, com auxílio de graal (almofariz) e de pistilo de porcelana. As proteínas foram extraídas de acordo com Gallardo et al (2002) [12] com pequenas modificações. Foram utilizados 200-300mg do pulverizado, com 660µl tampão de lise, contendo 7M ureia, 2M tiureia, 14mM trizma base (GE Healthcare), 100µl do coquetel de inibidores de proteases (GE Healthcare), 12 unidades de DNaseI (1mg/ml), 20µl de RNase A (1mg/ml), 0,2% (v/v) Triton X-100, 60mM CHAPS (GE Healthcare) e 17,5mM DTT (GE Healthcare). A mistura foi homogeneizada em vortex e colocada no gelo. Após 15 minutos, os tubos foram centrifugados a 14.000 rpm por 10 minutos, a 4°C. O sobrenadante contendo as proteínas totais foi centrifugado novamente nas mesmas condições anteriores e estocado, a -20°C, em alíquotas de 100 µl.

A concentração das proteínas dos diversos extratos foi quantificada por densidade ótica, de acordo com o método de Bradford (1976) [13], utilizando-se albumina sérica bovina (BSA) como padrão, pelo espectrofotômetro Gene Quant (GE Healthcare).

2.3 Análise da integridade das proteínas

A fim de observar a integridade das proteínas e a eficiência do método de extração, foram escolhidas, aleatoriamente, dez amostras de proteínas totais (10µg) para visualização em gel de poliacrilamida 12% (m/v), de acordo com o método descrito por Laemmli (1970). A separação das proteínas ocorreu por eletroforese, realizada pelo sistema MiniVE (GE Healthcare), a 100V, 400mA e 50W, por 1hora e 40minutos aproximadamente. O gel foi corado com solução de Azul de Comassie G-250.

2.4 Eletroforese bidimensional

Após a confirmação da integridade, as proteínas foram separadas por focalização isoeletrica (IEF), utilizando-se fita de 18cm com pH imobilizado de 3-10 (Immobiline Drystrips - GE Healthcare). As fitas para IEF foram reidratadas no suporte de reidratação individual em canaletas (Reswelling Tray GE Healthcare), por 15 horas, à temperatura ambiente, em tampão tiureia/ureia, contendo 7M ureia, 2M de tiureia, 1% (v/v) IPG Buffer (GE Healthcare), 2% CHAPS (p/v), 1,8mM DDT e azul de bromofenol. O volume final de 340µl de tampão mais 230µg de proteína foram aplicados nas canaletas. Após posicionar as fitas nas canaletas, 2,0 ml de *Cover Fluid* (GE Healthcare) foram aplicados sobre cada fita. A focalização isoeletrica ocorreu a 15°C, a 150V, por 1 minuto; 150V, por 3 horas; 500V, por 3 horas; 3.500V por 5 horas e 3.500 V, por 12 horas, acumulando um total de 55 kWh. Ao final da focalização isoeletrica, as fitas foram armazenadas em tubos de vidro autoclavados, a -80°C, até o início da eletroforese de segunda dimensão.

Antes da eletroforese de segunda dimensão, as fitas foram equilibradas em uma solução contendo 6M ureia, 29% (v/v) glicerol, 2% (p/v) SDS, 75mM Tris-HCl 1,5M, pH8,8, 0,002% (p/v) azul de bromofenol 1%, com 65mM DTT (primeiro passo) e com 0,2M iodoacetamida (segundo passo - sem DTT), por 30 minutos cada passo, sob agitação. Cada fita equilibrada foi colocada sobre o gel de poliacrilamida 12,5% homogêneo (Amersham Bioscience), ao lado do tampão sólido (Buffer Strip – GE Healthcare), na extremidade negativa da cuba. A eletroforese de segunda dimensão ocorreu a 15°C, a 600V, 20mA, 30W, por 35 minutos e a 600V, 50mA, 30W por 1 hora e 40 minutos ou até o marcador de corrida atingir o tampão sólido na extremidade positiva, pelo Sistema MultiphorII (GE Healthcare).

2.5 Coloração dos géis bidimensionais

Os géis foram inicialmente colocados por 30 minutos em uma solução de fixação contendo 7% (v/v) de ácido acético, 40% (v/v) metanol e, em seguida, transferidos para a solução de coloração, contendo quatro partes da solução com 0,1% (p/v) de Azul de Coomassie G-250, 2% (v/v) ácido fosfórico e 15% (p/v) sulfato de amônio mais uma parte de metanol, submetidos à agitação, por 48 horas. Ao fim desse período, os géis foram neutralizados por 3 minutos em solução contendo 1,2% (p/v) Tris-Base e pH 6,5 ajustado com ácido fosfórico. Posteriormente, foram lavados em solução contendo 25% (v/v) de metanol e armazenados em solução contendo 20% (p/v) sulfato de amônio.

2.6 Análise dos géis bidimensionais

Os géis corados tiveram suas imagens digitalizadas em scanner de alta resolução FLA 3000 (FujiFilm), equipado como programa Image Reader v. 1.8; 532nm e filtro O580. As análises das imagens foram feitas pelo programa ImageMaster 2D Platinum 7.0.6 (GE Healthcare). Para a detecção dos *spots*, os géis foram aliados e agrupados e, então, a determinação quantitativa dos volumes de cada *spot* foi realizada. Após esse procedimento, foram feitas as análises dos grupos, classes e teste estatístico (Teste T de Student). *Spots* com uma diferença de pelo menos 1,5X e um resultado significativo no teste T de Student ($p < 0,05$) foram considerados como um ponto de proteína, sendo diferencialmente expressa.

2.7 Obtenção de peptídeos tripsinolisados do gel

Após a corrida eletroforética, os pontos protéicos de interesse foram excisados com auxílio de lâmina de bisturi nº15 individualmente do gel,

desidratados com acetonitrila 100%, secos em *speed vac* e, posteriormente, tratados com a enzima tripsina (Promega[®]), a 58°C, por 30 minutos. Os peptídeos resultantes da tripsinólise da amostra foram ressuspensos em solução contendo acetonitrila 5% com ácido fórmico 0,1% e, posteriormente, analisados por espectrometria de massa.

2.8 Espectrometria de massa

Foi utilizado um espectrômetro de massa (microTOF Q-II, Bruker Daltonik, Bremen, Alemanha), equipado com uma interface de ionização por eletrospray, e acoplado a um sistema UFLC (Shimadzu, Kyoto, Japão) composto por duas bombas, (LC-20AD) e um degaseificador (DGU-20A₃). As injeções foram realizadas por um injetor automático (SIL-20A HT) equipado com um loop de 100µL, dos quais foram injetados apenas 40µL. O sistema foi operado através do software Hystar (Bruker Daltonik, v. 3.2.44.0). Uma pré-coluna de 5 mm e uma coluna analítica de 150 mm×75 µm preenchida com fase estacionária C18, 2.7 µm (Supelco, Bellefonte, Pennsylvania, Estados Unidos) foi utilizada para a separação dos peptídeos. As amostras foram injetadas através de um fluxo de 200 µLmin⁻¹ em uma solução a 5 % (v/v) acetonitrila e 0.1 % (v/v) AF em água (Fluka, Buchs, Suíça). A fase móvel (A) utilizada para separação foi um gradiente entre água, contendo 0.1% (v/v) AF LC-MS Chromasolv-Fluka e acetonitrila contendo 0.1% (v/v) AF LC-MS Chromasolv-Fluka (B). O programa utilizado para a eluição era composto pelas seguintes proporções: 0–5 min isocrático 5% B; 5–60 min gradiente linear até 40% B; 60–70 gradiente linear até 50 % B; 70–75 gradiente linear até 90%B; 75–80 min isocrático 90%B; 80–80.1 min alteração para 5% B; 80.1–90 min isocrático 5% B. O fluxo para separação dos peptídeos foi de 200 µLmin⁻¹. As configurações utilizadas na espectrometria de massa foram: intervalo de massa: 50–2500m/z; voltagem do

spray: 2000 V; gás de secagem (N₂) temperatura: 180°C; fluxo: 9 Lmin⁻¹; funnel 1 RF 300.0 Vpp; funnel 2 RF 400.0 Vpp; Hexapolo RF 400.0 Vpp; energia do quadrupolo 5.0 eV; menor massa do quadrupolo 322.00 m/z; energia de colisão 10.0 eV; RF da colisão 800.0 Vpp; tempo de transferência 150us; armazenamento pré-pulso 5.0 us. As configurações para o MS/MS foram: número de íons precursores: 3; limite mínimo absoluto: 2×10³; limite mínimo absoluto: 0.1 %; smart exclusion após 4x; active exclusion após três espectros e por 1 min; modo de busca de peptídeos ativado, estado de carga preferido 2-4. Os dados cromatográficos obtidos via LC-MS-MS foram analisados com o software Bruker Data Analysis, version 4.0 (Build 253). O espectro de MS/MS que foi obtido no intervalo de 5-30 min foi exportado como um arquivo xml, após a deconvolução do estado de carga e utilizado para busca em banco de dados, utilizando o software Biotools Version 3.2 (Bruker Daltonik) nas seguintes condições: enzima: tripsina; modificações fixas: carbamidometilação da cisteína; modificações variáveis: oxidação da metionina; tolerância do íon precursor: 0.2 Da; foi aceita na busca uma não clivagem pela tripsina.

O perfil de massa molecular da amostra obtida por MS e MS/MS foi submetido à análise comparativa, utilizando-se o programa MASCOT (<http://www.matrixscience.com>), para a comparação das massas de peptídeos observados com bancos de dados e para a identificação das proteínas mais prováveis. Os bancos de dados utilizados nas análises foram o do Genoma Café [15] e o do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Proteínas têm funções bioquímicas e fisiológicas fundamentais no metabolismo dos organismos e qualquer mudança ambiental ocorrida refletirá

em seu perfil protéico. A proteômica tem a capacidade de detectar essa alteração, além de permitir o mapeamento dos caminhos metabólicos e a identificação de novos genes alvos que podem ser usados na manipulação genética. E, por isso, a proteômica tem sido amplamente utilizada nas análises bioquímicas de células ou tecidos de diversos vegetais.

Neste trabalho foram realizadas duas avaliações comparativas do perfil proteômico, por meio da análise de géis bidimensionais de grãos de café cultivados em duas altitudes. Os géis corados revelaram aproximadamente 230 pontos de proteínas com tamanhos que variaram de 14kDa a 100kDa, presentes no pH entre 3 e 10. A primeira avaliação comparativa dos proteomas foi realizada com proteínas extraídas dos grãos de café natural provenientes da região abaixo de 1000m e da região acima de 1200m. Essa avaliação permitiu a detecção de 02 de pontos protéicos n°.68 e n°.171, com abundância diferencial variando de 1,6 a 4 vezes, respectivamente, sendo encontrados com maior abundância em grãos cultivados abaixo de 1000m (Figura 01).

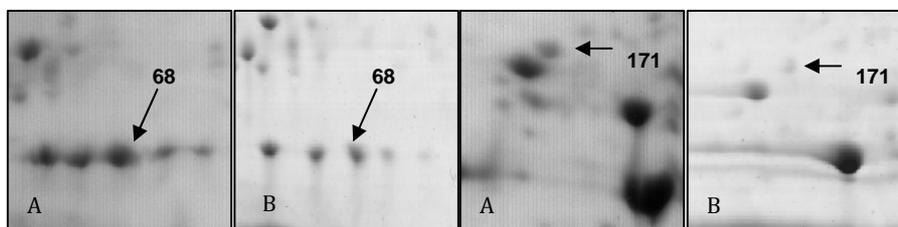


Figura 01 Detalhe dos pontos protéicos diferencialmente abundantes identificados nos grãos de café natural provenientes da região localizada abaixo de 1000m (A) e acima de 1200m (B).

Os peptídeos dos spot 68 e 171 foram sequenciados. Apenas os peptídeos do spot 68 foram identificados após confrontar os dados com o banco de dados e encontrou-se homologia destes com a proteína fator de tradução IF-1 (Tabela 1 - ANEXO).

Tabela 01. Lista de proteínas diferencialmente abundantes, encontradas em grãos de *Coffea arabica* L. cv. bourbon, e identificadas por análise dos peptídeos por espectrometria de massa por eletrospray.

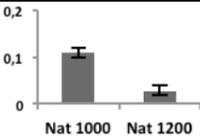
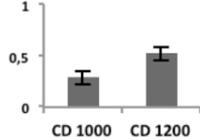
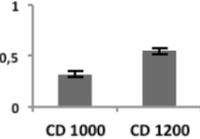
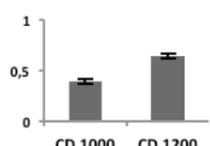
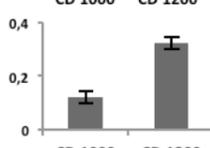
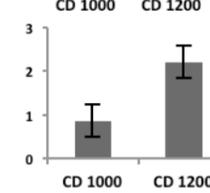
Spot n. ^a	Volume relativo ^b	Proteína	Organismo	Código acesso	Sequências dos peptídeos	Exp/ThMr ^c
Análise 01 Análise comparativa do perfil proteômico de grãos de café natural e desmucilado cultivados na região abaixo de 1000m.						
68		Fator de tradução IF-1	<i>Coffea arabica</i>	A0A370	R.SFIR.I -.MKEQK.W	521.59/521.29 662.44/662.34
Análise 02 - Análise comparativa do perfil proteômico de grãos de café natural e desmucilado cultivados na região acima de 1200m.						
42		Proteína de reserva 11S	<i>Coffea arabica</i>	Q9SAN3	K.FFLAGNPQQ GGGK.E	1319.66/1319.66
43		Ferritina	<i>Coffea arabica</i>	D3WFN6	K.LVNEKLLK.L	955.57/955.60

Tabela 01. Continua.

47		Proteína de reserva 11S	<i>Coffea arabica</i>	Q9SAN3	K.LNAQEPSFR. F	1060.52/1060.53
52		Proteína de reserva 11S	<i>Coffea arabica</i>	Q9SAN3	K.FFLAGNPQQ GGGK.E R.KFFLAGNPQ QGGGK.E	1319.66/1319.66 1447.75/1447.75
96		Proteína de reserva 11S	<i>Coffea arabica</i>	Q9SAN3	K.LNAQEPSFR. F K.FFLAGNPQQ GGGK.E	1060.52/1060.53 1319.66/1319.66

a Número do ponto proteico identificado

b. Grãos de café natural (NAT) e desmucilados (CD)

c Massa molecular (Mr) teórica (Th) e experimental (Exp) dos peptídeos identificados

O IF1 é um elemento altamente conservado na maquinaria de tradução de células procarióticas sendo também encontrado em cloroplastos de diversas plantas [16]. A tradução é o último passo para a correta expressão da informação genética, sendo dividida em quatro etapas: iniciação, alongação, terminação e reciclagem.

A iniciação, primeiro passo da biossíntese de proteínas representa um evento fundamental na vida celular por determinar a fidelidade, eficiência e regulação da expressão genica. Em *E. coli*, além dos RNA's e das subunidades ribossômicas é necessária a presença de 3 proteínas adicionais conhecidas como fatores de iniciação IF1, IF2 e IF3 [17-20]. O fator de iniciação IF1 tem um peso molecular de 8.2 KDa e é a menor porção dentre os três [17]. e contém 71 resíduos de aminoácidos [21] que compõem estruturalmente o gene *infA* [22].

Várias funções têm sido atribuídas ao IF1, uma delas a relaciona com a taxa de associação/dissociação das subunidades ribossômicas [23]. O fator de iniciação IF1 modula a afinidade do IF2 com o ribossomo [24-26] e, conseqüentemente, modula a tradução.

Em angiospermas, esse fator de iniciação da tradução 1 é também codificado pelo gene *infA*. O produto do gene *infA* é um componente da proteína ribossômica L23 (*rpl23*) e transcrito como um RNAm policistrônico [27]. No café, o gene *infA* está intacto, em contraste com outros representantes da família Solanaceae, onde é um pseudogene em tabaco e outras 17 espécies examinadas. Quatro gêneros da família da Rubiaceae (*Coffea*, *Galium*, *Ixora* e *Pentas*), foram pesquisados, usando uma combinação de hibridização Southern com uma sonda para o gene *infA* e sequenciamento de DNA. Dois gêneros, *Coffea* e *Ixora*, apresentaram o gene *infA*, enquanto que, nos outros dois gêneros, *Pentas* e *Galium*, o gene estava ausente no genoma do cloroplasto [28].

Além disso, muitos fatores de tradução envolvidos na expressão de genes em resposta à estresse e na constituição de subunidades ribossômicas 60S

(proteína ribossomal P2-A) foram encontradas no proteoma nuclear de *A. thaliana* [29]. Diante desse estudo, podemos inferir que a super-expressão do fator de tradução IF-1, em nosso trabalho, pode estar relacionada à necessidade das células de se adaptarem a algum tipo de estresse sofrido pelos grãos de café natural.

A segunda análise comparativa foi realizada entre os grãos desmucilados provenientes da região abaixo de 1000m e da região acima de 1200m. Foram detectados 06 pontos protéicos com abundância diferencial variando de 1,6 a 2,7 vezes (Figura 02), que foram selecionados pelo resultado do teste t-student ($p < 0,05$).

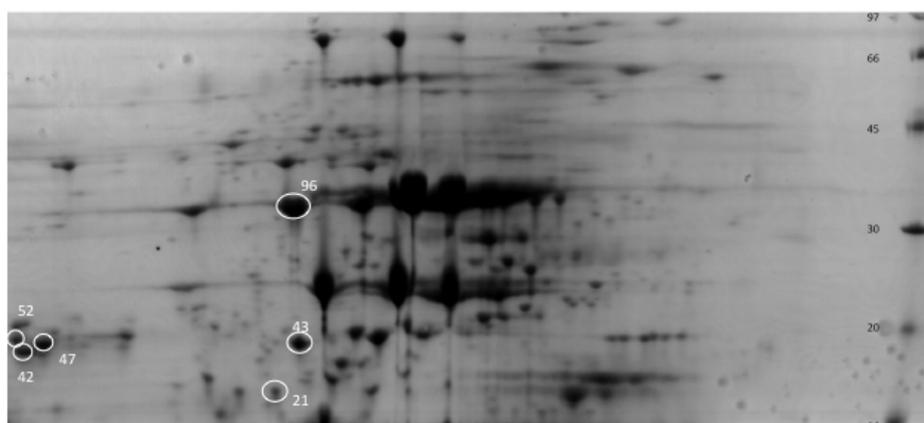


Figura 02. Gel bidimensional do perfil proteômico de grãos de café. Os círculos assinalam os pontos protéicos excisados, com diferença de abundância ($>1,5X$) após avaliação comparativa do proteoma de grãos de café desmucilados provenientes da região abaixo de 1000m e da região acima de 1200m.

Foram identificados por espectrometria de massas cinco pontos protéicos, sendo todos estes mais abundantes nos grãos cultivados em região acima de 1200m (Figura 03). Das cinco proteínas identificadas, quatro delas

apresentaram homologia com a proteína de reserva 11S (spot n.42, n.47, n.52, n.96) e outra com a ferritina (spot n.43) (Tabela 1).

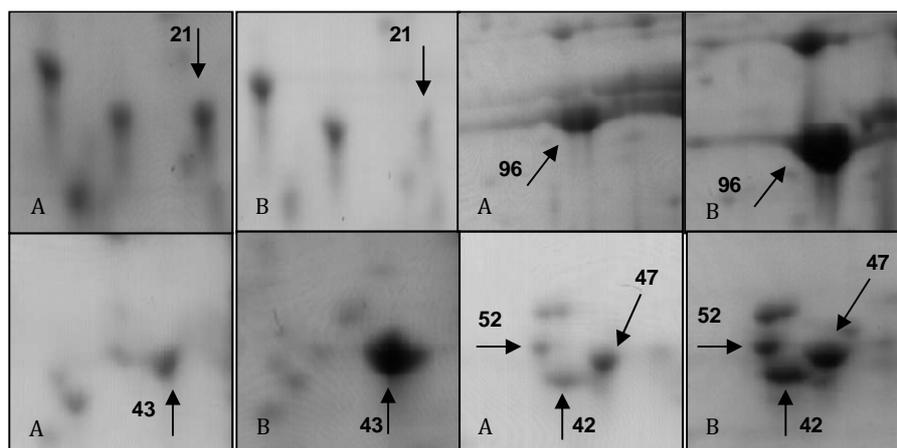


Figura 03. Detalhes dos pontos protéicos diferencialmente abundantes identificados nos grãos desmucilados provenientes da região abaixo de 1000m (A) e da região acima de 1200m (B).

Em *Coffea* sp., a proteína de reserva globulina 11S, localizada no endosperma de grãos, é a mais estudada por abordagens genômicas e proteômicas [30-32]. Análises de géis de eletroforese SDS-PAGE mostraram que essa proteína possui peso molecular de 55 kDa, constituída por duas subunidades, uma de 33 kDa (cadeia α) e outra de 24 kDa (cadeia β). E, por análise imunocitoquímica, foi observado a presença dessas proteínas em grandes vacúolos no citoplasma de semente maduras de café [31].

Outro estudo, utilizando análises por eletroforese bidimensional (2DE), identificou as subunidades α e β da proteína 11S como sendo ácida e básica e pressupôs que essas proteínas correspondem a 45% do conteúdo protéico dos grãos de café. Nesse mesmo trabalho, foi observada a presença de muitas

isoformas, o que indica que essas proteínas são codificadas por uma família multigênica [33]. Essa é provavelmente a razão que justifique a identificação de várias isoformas encontradas em nosso trabalho.

A maior ocorrência das isoformas da 11S reveladas neste estudo, pode ser relacionada à qualidade final da bebida, sendo a fonte principal de aminoácidos livres. Segundo REINECCIUS (1995) [34], a Reação de Maillard ocorre durante a torração, entre açúcares redutores e proteínas, sendo fundamentais no desenvolvimento do aroma e sabor da bebida do café.

Outra proteína também mais abundante encontrada em grãos desmucilados cultivados acima 1200m foi a ferritina. Essa proteína é altamente conservada, encontrada em animais, plantas, fungos e bactérias, com capacidade de armazenar cerca de 4.500 átomos de ferro por molécula, em uma forma considerada não tóxica. Trata-se de uma proteína multimérica, de aproximadamente 450kDa, composta por 24 subunidades [35-38].

Uma das funções fisiológicas da ferritina nas plantas é o armazenamento de ferro na cavidade central da molécula e sua liberação quando requerido, por exemplo, durante a síntese de clorofila, nos processos de fotossíntese, respiração, fixação de nitrogênio, síntese de DNA e hormônios [39, 40]. Além disso, a ferritina também proporciona proteção às células contra os efeitos tóxicos do excesso de ferro, O_2 , H_2O_2 e sob certas condições [37, 41]. Estudo recente também demonstrou o importante papel da ferritina contra o estresse oxidativo em culturas de células em suspensão de *Coffea arabica* L. Os dados sugerem que a ferritina participa do sistema antioxidante, protegendo as células contra os danos oxidativos que o excesso de ferro presente no meio de cultura induz [42].

Nas plantas, os primeiros estudos a respeito da ferritina são baseados em relações entre localização dessas proteínas e sua expressão em resposta a fatores ambientais e estádios de desenvolvimento [43, 44]. A expressão do gene da

ferritina é modulada por vários fatores ambientais, incluindo a seca, frio, intensidade de luz e ataque de patógenos. Ao longo de seu ciclo de vida, as plantas, muitas vezes, experimentam esses estresses, que pode aumentar transitoriamente a concentração de Fe reativo livre intracelular, levando a uma maior reatividade com o oxigênio para gerar ROS. É muito provável que a ferritina auxilie as plantas a lidar com situações adversas e os efeitos deletérios [40].

Em nosso estudo, a variação da quantidade de ferritina nos dois tipos de grãos cultivados pode ser relacionada às variações climáticas encontradas nas duas altitudes em questão. Diante das funções descritas acima, a maior abundância da ferritina pode estar vinculada no combate ao estresse oxidativo provocado por inúmeras circunstâncias de campo, como alta luminosidade e baixas temperaturas. o que contribui, provavelmente, para uma melhor qualidade da bebida.

Nossos resultados corroboram com pesquisas recentes que demonstraram que as plantas de café cultivadas em regiões de elevada altitude e baixas temperaturas, têm o sistema antioxidante mais preservado que as cultivadas em regiões de baixa altitude e elevada temperatura. De um modo geral, verificou-se que essas plantas possuem, tanto em folhas quanto em frutos, uma concentração maior do antioxidante ácido ascórbico, maiores atividades das enzimas dismutase do superóxido (SOD), peroxidase do ascorbato (APX) e catalase (CAT), o que resultou em menores concentrações de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e malondialdeído (MDA), moléculas indicadoras de estresse oxidativo [45 - 46], prolongando o ciclo de maturação [45] e, possivelmente, contribuindo para a qualidade de bebida. Em adição à essas informações, por causa de uma maior produção de EROS, em decorrência das menores temperaturas e maior radiação, plantas alpinas geralmente apresentam um mecanismo de proteção contra danos oxidativos muito mais eficientes quando

comparados a plantas que crescem em menores altitudes, o que garante uma alta eficiência fotossintética nesse ambiente [47].

Neste trabalho, outras proteínas diferencialmente abundantes também foram excisadas dos géis e analisadas por MS/MS. No entanto, muitos peptídeos obtidos não apresentaram homologia significativa nos bancos de dados pesquisados ou não foram suficientes para a identificação devido a baixa quantidade de proteína ou baixa capacidade de ionização.

CONCLUSÃO

Foi possível observar alterações sutis entre os perfis protéicos de grãos cultivados acima de 1200m ou abaixo de 1000m, independente do processamento pós-colheita ao qual foi submetido.

Estudos adicionais devem ser realizados para determinar o papel funcional destas proteínas e uma possível relação com as condições climáticas do cultivo e a qualidade da bebida.

Além disso, estudar os produtos gênicos relacionados com estresse abiótico é potencialmente importante no cenário recente de alterações ambientais adversas, tais como o aumento de temperaturas extremas e os períodos de seca. A compreensão da relação entre os mecanismos de tolerância / susceptibilidade e estresse abiótico é essencial para a prospecção de estratégias biotecnológicas e de manejo da cultura do café, que possivelmente será ameaçada pelo aquecimento global.

REFERÊNCIAS

1. International Coffee Organization - IOC, 2014 - Disponível em:
<http://dev.ico.org/documents/cy2012-13/icc-111-8e-study-china.pdf>.
Acessado em 03 de fevereiro de 2014.
2. Companhia Nacional De Abastecimento - CONAB. 4ª Estimativa Café - Safra/2013 - Dezembro. Disponível em:
http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/14_01_17_09_29_46_boletim_cafe_-_original_normalizado.pdf.. Acesso em: 03 fevereiro de 2014.
3. DaMatta FM, Ramalho JDC (2006) Impact of drought and temperature stress on coffee physiology and production: a review. *Braz J Plant Physiol* 18: 55-81.
4. Silva EA, Mazzafera P, Brunini O, Sakai E, Arruda FB, et al. (2005) The influence of water management and environmental conditions on the chemical composition and beverage quality of coffee beans. *Braz J Plant Physiol* 17: 229-238
5. Giovannucci D, Liu P, Byers A (2008). Adding value: Certified coffee trade in North America. In Pascal Liu (Ed.), *Value-adding Standards in the North American Food Market – Trade opportunities in certified products for developing countries*. Rome: FAO.
6. Vaast P, Bertrand B, Perriot JP, Guyot B, Génard M (2006) Fruit thinning and shade influence bean characteristics and beverage quality of *C. arabica* in optimal conditions. *J Sci Food Agric* 86:197-204.
7. Bertrand B, Boulanger R, Dussert S, Ribeyre F, Berthiot L, et al. (2012) Climatic factors directly impact the volatile organic compound fingerprint in green Arabica coffee bean as well as coffee beverage quality. *Food Chem* 135:2575-2583.
8. Guyot B, Gueule D, Manez JC, Perriot JJ, Giron J, Villain L. (1996) Influence de l'altitude et de l'ombrage sur la qualité des cafés Arabica. *Plantations, Recherche, Développement* 3: 272-280.
9. Decazy F, Avelino J, Guyott B, Perriot JJ, Pineda C, Cilas C (2003) Quality of different Honduras coffee in relation to several environments. *J Food Sci* 68:2356-2361.
10. Avelino J, Barboza B, Araya JC, Fonseca C, Davrieux F, Guyot B, et al. (2005) Effects of slope exposure, altitude and yield on coffee quality in two

- altitude terroirs of Costa Rica, Orosi and Santa Maria de Dota. *J Sci Food Agric* 85:1869-1876.
11. Bertrand B, Vaast P, Alpizar E, Etienne H, Davrieux F, Charmetant P (2006) Comparison of bean biochemical composition and beverage quality of arabica hybrids involving Sudanese-Ethiopian origins with traditional varieties at various elevations in Central America. *Tree Physiol* 26:1239-1248.
 12. Gallardo K, Job C, Groot Spc, Puype M, Demol H, Vandekerckhove J, Job D. (2002) Proteomics of Arabidopsis seed germination: a comparative study of wild-type and gibberellin-deficient seeds. *Plant Physiol* 129:823-837.
 13. Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254.
 14. Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227: 680-685.
 15. Vieira LGE, Andrade AC, Colombo CA, Moraes AHA, Metha A, et al. (2006) Brazilian coffee genome project: an EST-based genomic resource. *Braz J Plant Physiol* 18:95-108.
 16. Sijben-Müller G, Hallick RB, Alt J, Westhoff P, Herrmann RG (1986) Spinach plastid genes coding for initiation factor IF-1, ribosomal protein S11 and RNA polymerase α -subunit. *Nucleic Acids Res* 14:1029-1044.
 17. Hershey JW (1987) Protein synthesis. In *Escherichia coli and Salmonella Typhimurium: Cellular and Molecular Biology*, Neidhardt FC, Ingraham J, Low K, Magasanik B, Schaechter M, Umberger H (eds), Washington, DC: American Society for Microbiology.
 18. Gualerzi CO, Pon CL (1990). Initiation of mRNA translation in prokaryotes. *Biochemistry-US* 29, 5881–5889.
 19. Atkinson GC, Kuzmenko A, Kamenski P, Vysokikh MY, Lakunina V, et al. (2012) Evolutionary and genetic analyses of mitochondrial translation initiation factors identify the missing mitochondrial IF3 in *S. cerevisiae* *Nucleic Acids Res* doi:10.1093/nar/gks272
 20. GÄBEL K, SCHMITT J, SCHULZ S, NÄTHER DJ, SOPPA J. (2013) A comprehensive analysis of the importance of translation initiation factors for *Haloferax volcanii* applying deletion and conditional depletion mutants. *PLoS ONE* 8:11.

21. PON CL, GUALERZI CO (1984) Mechanism of protein biosynthesis in prokaryotic cells. Effect of initiation factor IF1 on the initial rate of 30 S initiation complex formation. FEBS Lett 175:203-207.
22. Sands JF, Cummings HS, Sacerdot C, Dondon L, Grunberg-Manago M, Hershey JW (1987) Cloning and mapping of *infA*, the gene for protein synthesis initiation factor IF1. Nucleic Acids Res 15:5157-5168.
23. Dottavio-Martin D, Suttle DP, Ravel JM (1979) The effects of initiation factors IF-1 and IF-3 on the dissociation of Escherichia coli 70 S ribosomes. FEBS Lett 97:105-110.
24. Stringer EA, Sarkar P, Maitra U (1977) Function of initiation factor 1 in the binding and release of initiation factor 2 from ribosomal initiation complexes in Escherichia coli. J Biol Chem 252:1739-1744.
25. Celano B, Pawlik RT, Gualerzi CO (1988) Interaction of Escherichia coli translation-initiation factor IF-1 with ribosomes. Eur J Biochem 178:351-355.
26. Moreno JM, Drskjotersen L, Kristensen JE, Mortensen KK, Sperling-Petersen HU (1999) Characterization of the domains of E. coli initiation factor IF2 responsible for recognition of the ribosome. FEBS Lett 455:130-134.
27. Hirosea T, Ideuea T, Wakasugib T, Sugiuraa M (1999) The chloroplast *infA* gene with a functional UUG initiation codon. FEBS Lett 445:169-172.
28. Millen RS, Olmstead RG, Adams KL, Palmer JD, Lao NT, Heggie L, Kavanagh TA, Hibberd JM, Gray JC, Morden CW, Calie PJ, Jermin LS, Wolfe KH. (2001) Many parallel losses of *infA* from chloroplast DNA during angiosperm evolution with multiple independent transfers to the nucleus. Plant Cell 13:645-658.
29. Bae MS, Cho EJ, Choi EY, Park OK (2003) Analysis of the Arabidopsis nuclear proteome and its response to cold stress. Plant J 36:652-63.
30. Marraccini P, Deshayes A, Petiard V, Rogers WJ (1999) Molecular cloning of the complete 11S seed storage protein gene of Coffea arabica and promoter analysis in transgenic tobacco plants. Plant Physiol Biochem 37:273-282.
31. Acuña R, Bassüner R, Beilinson V, Cortina, H, Cadena-Gómez G, et al. (1999) Coffee seeds contain 11S storage protein. Physiologia Plantarum 105:122-131.

32. De Castro RD, Marraccini P. (2006) Cytology, biochemistry and molecular changes during coffee fruit development. *Braz J Plant Physiol* 18:175–199.
33. Rogers WJ, Bézard G, Deshayes A, Meyer I, Pétiard V, Marraccini P (1999) Biochemical and molecular characterization and expression of the 11S-type storage protein from *Coffea arabica* endosperm. *Plant Physiol Bioch* 37: 261-272.
34. Reineccius GA (1995) The Maillard reaction and coffee flavor. In *Proceedings of XVI International Conference on Coffee Science (ASIC, ed.)*. Association Scientifique Internationale du Café (ASIC), Paris, pp.249-257.
35. Sczekan SR, Joshi JG (1987) Isolation and characterization of ferritin from soybeans (*Glycine max*). *J Biol Chem* 262:13780-13788.
36. Goto F, Yoshihara T, Masuda T, Takaiwa F. (2001) Genetic improvement of iron content and stress adaptation in plants using ferritin gene. *Biotechnol Genet Eng* 18:351-371.
37. Goto F, Yoshihara T, Shigemoto N, Toki S, Takaiwa F (1999) Iron fortification of rice seed by the soybean ferritin gene. *Nature Biotechnol* 17:282-286.
38. Vasconcelos M, Datta K, Oliva N, Klalekuzzaman M, Torrizo L, Krishnan S, Oliveira M, Goto F, Datta SK (2003) Enhanced iron and zinc accumulation in transgenic rice with the ferritin gene. *Plant Sci* 164:371-378.
39. Kim SA, Guerinot ML (2007) Mining iron: iron uptake and transport in plants. *FEBS Lett* 581:2273-2280.
40. Ravet KT, Touraine B, Boucherez J, Briat JF, Gaymard F, Cellier F (2009) Ferritins control interaction between iron homeostasis and oxidative stress in *Arabidopsis* *Plant J* 57: 400–412.
41. Boughammoura A, Franza T, Dellagi A, Roux C, Matzanke-Markstein B, Expert D (2007) Ferritins, bacterial virulence and plant defence. *Biometals* 20:347-353.
42. Bottcher A, Nobile PM, Martins PF, Conte FF, Azevedo RA, Mazzafera P (2011) A role for ferritin in the antioxidant system in coffee cell cultures. *Biometals* 24:225-237.
43. Briat JF, Lobréaux S (1997) Iron transport and storage in plants. *Trends Plant Sci.* 2:187-193.
44. Briat JF, Lobréaux S, Grignon N, Vansuyt G. (1999) Regulation of plant ferritin synthesis: how and why. *Cell Mol Life Sci* 56: 155-166.

45. Santos MO (2013) Aspectos fisiológicos do desenvolvimento de frutos de cafeeiros cultivados em um gradiente de altitude na Serra da Mantiqueira M.Sc. Thesis, The federal University of Lavras Disponível: http://repositorio.ufla.br/bitstream/1/611/1/TESE_Aspectos%20fisiol%C3%B3gicos%20do%20desenvolvimento%20de%20frutos%20de%20cafeeiros%20cultivados%20em%20um%20gradiente%20de%20altitude%20na%20Serra%20da%20Mantiqueira.pdf Acessado em 23 de junho de 2014.
46. Silveira, HRO (2014) Variação sazonal de atributos ecofisiológicos e metabólicos de café arábica em três altitudes. M.Sc. Thesis, The federal University of Lavras Disponível: Acessado em 23 de junho de 2014
47. Öncel, I, Yurdakulol E, Keleş Y, Kurt L, Yıldız A (2004) Role of antioxidant defense system and biochemical adaptation on stress tolerance of high mountain and steppe plants. *Acta Oecol* 26:211-218.

ARTIGO 02
NORMAS DA REVISTA CIENTÍFICA
FOOD CHEMISTRY
(VERSÃO PRELIMINAR)

ARTIGO 02

ANÁLISE COMPARATIVA DO PROTEOMA DE GRÃOS DE CAFÉ BOURBON AMARELO PROCESSADOS POR VIA SECA E VIA ÚMIDA

Resumo

As técnicas de processamento dos grãos de café mais empregadas, via seca e via úmida, e a escolha por uma delas influenciará fortemente a qualidade sensorial da bebida e seu valor no mercado. Embora se saiba que o processamento afeta a composição química dos grãos e, conseqüentemente, o sabor e a aroma da bebida, informações sobre as transformações bioquímicas que ocorrem no interior do grão são pouco entendidas e descritas na literatura. Com o intuito de iniciar uma investigação a respeito das alterações químicas induzidas pelo processamento, este trabalho teve como objetivo comparar o perfil proteômico do endosperma de café. Para essa avaliação, foram extraídas amostras de proteínas totais de grãos processados por via seca e via úmida, provenientes de dois locais de cultivo. O perfil protéico foi obtido por eletroforese bidimensional e as peptídeos diferencialmente expressos foram analisados por espectrometria com ionização por eletrospray (ESI-MS/MS). A maioria das proteínas mais abundantes foram encontradas nos grãos de café natural, independentemente de sua origem. Dentre as proteínas, destacam-se a 11S, deidrina, frutose bifosfato aldolase, alfa-galactosidase e enolase. Espera-se que esses resultados possam contribuir, no futuro, para um melhor entendimento das tecnologias pós-colheita empregadas nos grãos de café, minimizando a formação de potenciais componentes químicos prejudiciais à qualidade de bebida.

Palavras-chaves: Conteúdo bioquímico grãos, *Coffea arabica* L, processamento do café, tratamentos pós-colheita

INTRODUÇÃO

A maioria das pesquisas sobre a qualidade de bebida do café tem focado nos compostos químicos voláteis, em açúcares, ácidos clorogênicos, trigonelina e ácidos graxos (Vaast et al., 2006; Joët et al., 2010; Duarte, Pereira, & Farah, 2010; Arruda, Hovell, Rezende, Freitas, Couri, & Bizzo, 2012). Alguns poucos trabalhos, descrevem uma comparação quantitativa de proteínas totais presentes nos grãos (Taveira, Rosa, Borém, Giomo, & Saath, 2012; Vasconcelos, Franca, Glória, & Mendonça, 2007; Montavon, Mauron, & Duruz, 2003), porém nenhum relato foi encontrado até o momento sobre a constituição protéica (análise qualitativa) dos grãos e como esta pode ser influenciada pelos procedimentos pós-colheita, entre eles o processamento.

Em grãos de café, a participação das proteínas em rotas bioquímicas e sua função na formação de compostos responsáveis pelo sabor e aroma da bebida é pouco esclarecida. Sabe-se que elas participam diretamente de reações importantes na geração destes compostos precursores, como ocorre durante a torração, na qual juntamente com os açúcares, participam da Reação de Maillard (Reineccius, 1995).

Sabe-se também que várias transformações químicas que ocorrem no grão do café são de natureza enzimática, uma vez que as enzimas são constituintes do próprio grão ou de microrganismos, e que estas podem contribuir para qualidade, dependendo da sua função e nível de expressão. (Amorim, 1978; Goulat, 2003). Além disso, as proteases agem promovendo a quebra de determinadas proteínas (Silva et al., 2005) e liberando aminoácidos que estarão envolvidos na realocação e formação de novas proteínas relacionadas ao aroma e sabor (Ludwig, Lipke, Raczek, & Jaeger, 2000).

A análise de proteínas tem sido utilizada para avaliar diversos produtos de origem vegetal. Recentemente, a qualidade do malte foi discriminada a partir

da análise de seu proteoma (Jin, Z ; Mu, Yw ; Sun, Jy ; Li, Xm ; Gao, Xl ; Lu, J., 2013). Outro estudo, utilizou das análises comparativas dos perfis protéicos de citros para melhor compreender os efeitos da baixa temperatura e longos períodos de armazenamento na manutenção da qualidade dos frutos (Yun et al., 2012).

Considerando a influência dos processos pós-colheita na obtenção de uma bebida de qualidade superior e sua relação com a formação de compostos precursores de aroma e sabor, o melhor entendimento das transformações químicas, que ocorrem no interior do grão, é amplamente requerido. Com o intuito de agregar mais informações, o trabalho visa o estudo do proteoma dos grãos de café, a partir de géis obtidos por eletroforese bidimensional. O objetivo principal do trabalho foi analisar proteínas diferencialmente abundantes em grãos submetidos aos processamentos via seca e via úmida, provenientes de dois locais de cultivo.

MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório Central de Biologia Molecular (LCBM) da Universidade Federal de Lavras (UFLA).

2.1 Procedência dos grãos de café

Para o presente estudo, foram coletadas amostras de café Bourbon Amarelo (*Coffea arabica* L.), ao longo da safra agrícola (2009/10), em lavouras comerciais localizadas no município de Carmo de Minas (-22°6', 45°8'), Minas Gerais, Brasil. O ambiente de cultivo do café foi estratificado em duas classes de altitude (inferior a 1.000 m e superior a 1.200 m).

A colheita foi realizada manual e seletivamente, em triplicata. Somente os frutos maduros (cerca de 60L) foram coletados de diversas plantas de um talhão identificado. Em seguida, os frutos foram separados por diferença de densidade, aproveitando-se somente aqueles mais densos. Aproximadamente, 14 L de frutos selecionados foram dispostos em telas para secagem ao sol, obtendo-se, assim, as amostras de café natural (via seca). Para a obtenção do café via úmida, optou-se pelo processo “cereja” desmucilado, removendo-se mecanicamente a mucilagem remanescente após a operação de descascamento dos frutos. Aproximadamente 20 L de frutos maduros, previamente selecionados, foram descascados e desmucilados. Em seguida, em torno de 7 L de café desmucilado foram dispostos em telas para secagem ao sol. A secagem iniciou-se imediatamente após o processamento.

Todos os procedimentos de colheita, processamento e secagem foram realizados segundo Borém (2008).

Posteriormente, todos os defeitos foram retirados, visando à uniformização e, sobretudo, à minimização de interferências que não fossem relacionadas ao material genético, ao processamento ou ao ambiente de cultivo.

As análises comparativas foram constituídas da seguinte forma:

- Análise 01 - abaixo de 1000m - grãos de café natural X grãos de café desmucilado
- Análise 02 - acima de 1200m - grãos de café natural X grãos de café desmucilado

2.2 Extração de proteínas totais

Todas as amostras foram submetidas à retirada da casca e pergaminho e foram conservadas em tubos falcon no freezer -80°C. Para análise, os grãos

foram macerados em nitrogênio líquido, com auxílio de graal (almofariz) e de pistilo de porcelana. As proteínas foram extraídas de acordo com Gallardo et al (2002) com pequenas modificações. Foram utilizados 200-300mg do pulverizado, com 660µl tampão de lise contendo 7M ureia, 2M tiureia, 14mM trizma base (GE Healthcare), 100µl do coquetel de inibidores de proteases (GE Healthcare), 12 unidades de DNaseI (1mg/ml), 20µl de RNase A (1mg/ml), 0,2% (v/v) Triton X-100, 60mM CHAPS (GE Healthcare) e 17,5mM DTT (GE Healthcare). A mistura foi homogeneizada em vortex e colocada no gelo. Após 15 minutos, os tubos foram centrifugados a 14.000 rpm por 10 minutos, a 4°C. O sobrenadante contendo as proteínas totais foi centrifugado novamente nas mesmas condições anteriores e estocado, a -20°C, em alíquotas de 100 µl.

A concentração das proteínas dos diversos extratos foi quantificada por densidade ótica, de acordo com o método de Bradford (1976), utilizando-se albumina sérica bovina (BSA) como padrão, pelo espectrofotômetro Gene Quant (GE Healthcare).

2.3 Análise da integridade das proteínas

A fim de observar a integridade das proteínas e a eficiência do método de extração, foram escolhidas, aleatoriamente, dez amostras de proteínas totais (10µg) para visualização em gel de poliacrilamida 12% (m/v), de acordo com o método descrito por Laemmli (1970). A separação das proteínas ocorreu por eletroforese, realizada pelo sistema MiniVE (GE Healthcare), a 100V, 400mA e 50W, por 1 hora e 40 minutos aproximadamente. O gel foi corado com solução de Azul de Coomassie G-250.

2.4 Eletroforese bidimensional

Após a confirmação da integridade, as proteínas foram separadas por focalização isoeletrica (IEF), utilizando-se fita de 18cm com pH imobilizado de 3-10 (Immobiline Drystrips - GE Healthcare). As fitas para IEF foram reidratadas no suporte de reidratação individual em canaletas (Reswelling Tray GE Healthcare), por 15 horas, à temperatura ambiente, em tampão tiureia/ureia, contendo 7M ureia, 2M de tiureia, 1% (v/v) IPG Buffer (GE Healthcare), 2% CHAPS (p/v), 1,8mM DDT e azul de bromofenol. O volume final de 340µl de tampão mais 230µg de proteína foram aplicados nas canaletas. Após posicionar as fitas nas canaletas, 2,0 ml de *Cover Fluid* (GE Healthcare) foram aplicados sobre cada fita. A focalização isoeletrica ocorreu a 15°C, a 150V, por 1 minuto; 150V, por 3 horas; 500V, por 3 horas; 3.500V por 5 horas e 3.500 V, por 12 horas, acumulando um total de 55 kWh. Ao final da focalização isoeletrica, as fitas foram armazenadas em tubos de vidro autoclavados, a -80°C, até o início da eletroforese de segunda dimensão.

Antes da eletroforese de segunda dimensão, as fitas foram equilibradas em uma solução contendo 6M ureia, 29% (v/v) glicerol, 2% (p/v) SDS, 75mM Tris-HCl 1,5M, pH8,8, 0,002% (p/v) azul de bromofenol 1%, com 65mM DTT (primeiro passo) e com 0,2M iodoacetamida (segundo passo - sem DTT), por 30 minutos cada passo, sob agitação. Cada fita equilibrada foi colocada sobre o gel de poliacrilamida 12,5% homogêneo (Amersham Bioscience), ao lado do tampão sólido (Buffer Strip – GE Healthcare), na extremidade negativa da cuba. A eletroforese de segunda dimensão ocorreu a 15°C, a 600V, 20mA, 30W, por 35 minutos e a 600V, 50mA, 30W por 1 hora e 40 minutos ou até o marcador de corrida atingir o tampão sólido na extremidade positiva, pelo Sistema MultiphorII (GE Healthcare).

2.5 Coloração dos géis bidimensionais

Os géis foram inicialmente colocados por 30 minutos em uma solução de fixação contendo 7% (v/v) de ácido acético, 40% (v/v) metanol e, em seguida, transferidos para a solução de coloração, contendo quatro partes da solução com 0,1% (p/v) de Azul de Coomassie G-250, 2% (v/v) ácido fosfórico e 15% (p/v) sulfato de amônio mais uma parte de metanol, submetidos à agitação, por 48 horas. Ao fim desse período, os géis foram neutralizados por 3 minutos em solução contendo 1,2% (p/v) Tris-Base e pH 6,5 ajustado com ácido fosfórico. Posteriormente, foram lavados em solução contendo 25% (v/v) de metanol e armazenados em solução contendo 20% (p/v) sulfato de amônio.

2.6 Análise dos géis bidimensionais

Os géis corados tiveram suas imagens digitalizadas em scanner de alta resolução FLA 3000 (FujiFilm), equipado como programa Image Reader v. 1.8; 532nm e filtro O580. As análises das imagens foram feitas pelo programa ImageMaster 2D Platinum 7.0.6 (GE Healthcare). Para a detecção dos *spots*, os géis foram aliados e agrupados e, então, a determinação quantitativa dos volumes de cada *spot* foi realizada. Após esse procedimento, foram feitas as análises dos grupos, classes e teste estatístico (Teste T de Student). *Spots* com uma diferença de pelo menos 1,5X e um resultado significativo no teste T de Student ($p < 0,05$) foram considerados como um ponto de proteína sendo diferencialmente expressa.

2.7 Obtenção de peptídeos tripsinolisados do gel

Após a corrida eletroforética, os pontos protéicos de interesse foram excisados com auxílio de lâmina de bisturi nº15 individualmente do gel, desidratados com acetonitrila 100%, secos em *speed vac* e, posteriormente, tratados com a enzima tripsina (Promega®), a 58°C, por 30 minutos. Os peptídeos resultantes da tripsinólise da amostra foram ressuspensos em solução contendo acetonitrila 5% com ácido fórmico 0,1% e, posteriormente, analisados por espectrometria de massa.

2.8 Espectrometria de massa

Foi utilizado um espectrômetro de massa (microTOF Q-II, Bruker Daltonik, Bremen, Alemanha), equipado com uma interface de ionização por eletrospray, e acoplado a um sistema UFLC (Shimadzu, Kyoto, Japão) composto por duas bombas, (LC-20AD) e um degaseificador (DGU-20A₃). As injeções foram realizadas por um injetor automático (SIL-20A HT) equipado com um loop de 100µL, dos quais foram injetados apenas 40µL. O sistema foi operado através do software Hystar (Bruker Daltonik, v. 3.2.44.0). Uma pré-coluna de 5 mm e uma coluna analítica de 150 mm×75 µm preenchida com fase estacionária C18, 2.7 µm (Supelco, Bellefonte, Pennsylvania, Estados Unidos) foi utilizada para a separação dos peptídeos. As amostras foram injetadas através de um fluxo de 200 µLmin⁻¹ em uma solução a 5 % (v/v) acetonitrila e 0.1 % (v/v) AF em água (Fluka, Buchs, Suíça). A fase móvel (A) utilizada para separação foi um gradiente entre água, contendo 0.1% (v/v) AF LC-MS Chromasolv-Fluka e acetonitrila contendo 0.1% (v/v) AF LC-MS Chromasolv-Fluka (B). O programa utilizado para a eluição era composto pelas seguintes proporções: 0–5 min isocrático 5% B; 5–60 min gradiente linear até 40% B; 60–70 gradiente linear até 50 % B; 70–75 gradiente linear até 90%B; 75–80 min isocrático 90%B; 80–

80.1 min alteração para 5% B; 80.1–90 min isocrático 5% B. O fluxo para separação dos peptídeos foi de 200 μLmin^{-1} . As configurações utilizadas na espectrometria de massa foram: intervalo de massa: 50–2500m/z; voltagem do spray: 2000 V; gás de secagem (N₂) temperatura: 180°C; fluxo: 9 Lmin^{-1} ; funnel 1 RF 300.0 Vpp; funnel 2 RF 400.0 Vpp; Hexapolo RF 400.0 Vpp; energia do quadrupolo 5.0 eV; menor massa do quadrupolo 322.00 m/z; energia de colisão 10.0 eV; RF da colisão 800.0 Vpp; tempo de transferência 150us; armazenamento pré-pulso 5.0 us. As configurações para o MS/MS foram: número de íons precursores: 3; limite mínimo absoluto: 2×10^3 ; limite mínimo absoluto: 0.1 %; smart exclusion após 4x; active exclusion após três espectros e por 1 min; modo de busca de peptídeos ativado, estado de carga preferido 2-4. Os dados cromatográficos obtidos via LC–MS–MS foram analisados com o software Bruker Data Analysis, version 4.0 (Build 253). O espectro de MS/MS que foi obtido no intervalo de 5-30 min foi exportado como um arquivo xml, após a deconvolução do estado de carga e utilizado para busca em banco de dados, utilizando o software Biotools Version 3.2 (Bruker Daltonik) nas seguintes condições: enzima: tripsina; modificações fixas: carbamidometilação da cisteína; modificações variáveis: oxidação da metionina; tolerância do íon precursor: 0.2 Da; foi aceita na busca uma não clivagem pela tripsina.

O perfil de massa molecular da amostra obtida por MS e MS/MS foi submetido à análise comparativa utilizando-se o programa MASCOT (<http://www.matrixscience.com>), para a comparação das massas de peptídeos observados com bancos de dados e para a identificação das proteínas mais prováveis. Os bancos de dados utilizados nas análises foram o do Genoma Café (VIEIRA et al., 2006) e o do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

RESULTADOS

Os mapas bidimensionais das proteínas dos grãos de café foram analisados nesse trabalho. Foram feitos géis de proteínas totais extraídas de grãos provenientes de plantas cultivadas em regiões acima de 1200m e abaixo de 1000m, que foram comparados quanto ao tipo de processamento: via seca e via úmida.

Os géis foram corados com Azul de Coomassie G-250, o que revelou proteínas com tamanhos que variaram de 14kDa a 100kDa e presentes no pH entre 3 e 10. O número de pontos protéicos foram determinados pelo programa ImageMaster v. 7.0.6 (GE Healthcare) e aproximadamente, 230 pontos puderam ser claramente visualizados. O número de pontos protéicos tende a ser subestimados devido a sensibilidade da coloração e, também, devido a dificuldade de detectar os pontos nas região extremas de pH do gel. A aglomeração de alguns grupos de proteínas é um evento comum em sementes e foi observada em todas as repetições.

Foram realizadas duas avaliações comparativas dos mapas protéicos. A primeira avaliação comparou os grãos de café natural e desmucilado, provenientes da região abaixo de 1000m. As análises revelaram uma grande quantidade de proteínas diferencialmente abundantes e permitiram a detecção de 11 pontos protéicos (spot n.00, 34, 37, 65, 73, 85, 105, 108, 110, 112 e 118) com abundância diferencial variando de 1,5 a 6 vezes (Figura 01), que foram selecionados pelo resultado do teste t-student ($p < 0,05$).

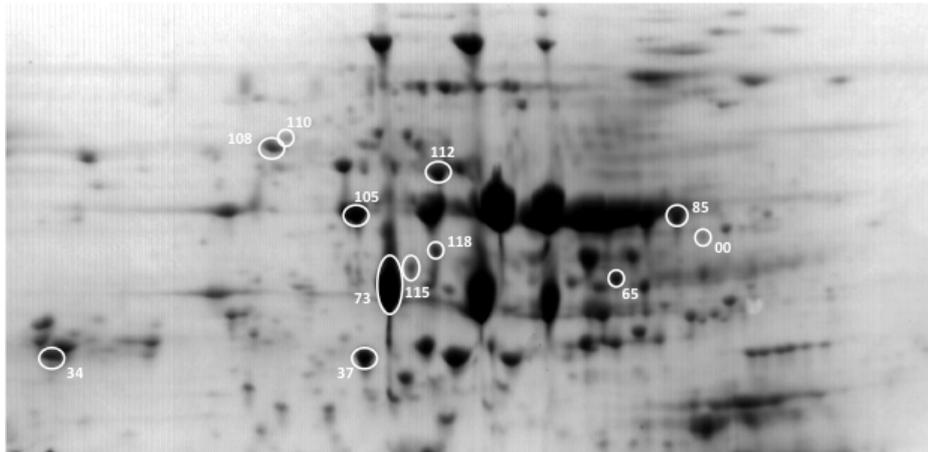


Figura 01 Gel bidimensional do perfil proteômico de grãos de café. Os círculos assinalam os pontos protéicos excisados, com diferença de abundância ($>1,5X$) após avaliação comparativa do proteoma de grãos de café natural e desmucilados provenientes de plantas cultivadas em regiões abaixo de 1000m.

Somente 02 desses pontos protéicos (spot n. 00 e 85) foram encontrados com maior abundância em grãos desmucilados e os demais em grãos de café natural (Figura 02).

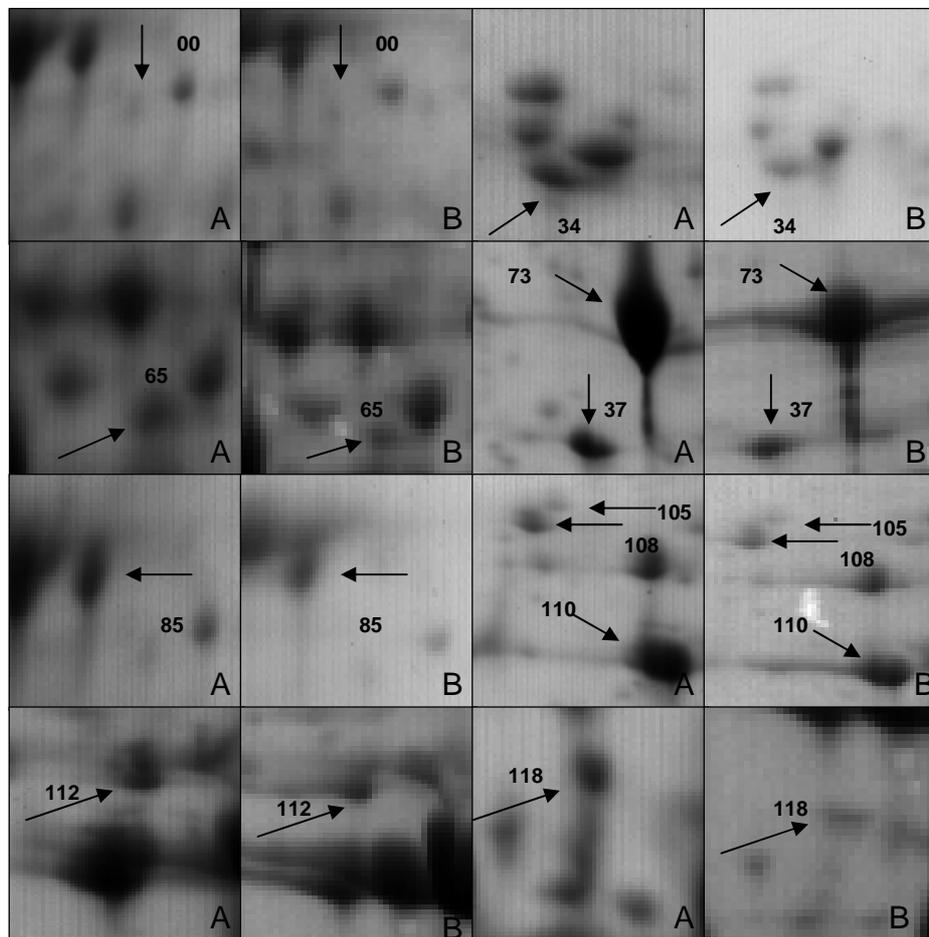


Figura 02. Detalhe dos pontos protéicos diferencialmente abundantes em grãos de café natural (A) e desmucilado (B), provenientes da região abaixo de 1000 m.

Todos os pontos protéicos foram sequenciados e, após a geração dos espectros de massa, apenas 08 proteínas apresentaram homologia com os bancos de dados, tais como a Globulina 11S, deidrina, frutose bifosfato aldolase e a alfa-galactosidase (Tabela 1).

Tabela 01 Lista de proteínas diferencialmente abundantes, encontradas em grãos de *Coffea arabica* L. cv. bourbon, e identificadas por análise dos peptídeos por espectrometria de massa por eletrospray.

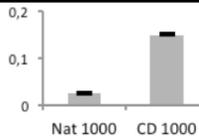
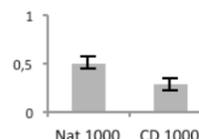
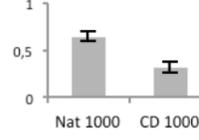
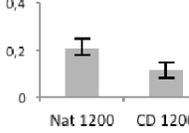
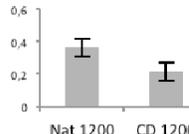
n. ^a	Volume relativo ^a	Proteína	Organismo	Código acesso	Sequências dos peptídeos	Exp/ThMr ^b
Análise 01 - Análise comparativa do perfil proteômico de grãos de café natural e desmucilado cultivados na região abaixo de 1000m.						
00		Proteína ribossomal 50S/L36	<i>Coffea arabica</i>	A0A369	R.RGR.I R.ASVR.K -.MKIR.A	387.24/387.23 431.27/431.24 546.32/546.33
34		Proteína de reserva 11S	<i>Coffea arabica</i>	Q9SAN3	K.FFLAGNPQQGGGK.E	1319.66/1319.66
37		Ferritina	<i>Coffea arabica</i>	D3WFN6	K.LVNEKLLK.L	955.57/955.60

Tabela 01. Continua.

Análise 02 - Análise comparativa do perfil proteômico de grãos de café natural e desmucilado cultivados na região sudeste de Minas Gerais.

Proteína	Organismo	Accession	Protein ID	Score
Deidrina	<i>Coffea arabica</i>	Q1A523	K.SQYDEYGNPVR.Q	1326.58/1326.58
DH1b	<i>Coffea arabica</i>	O82437	K.AGNQGFYVAFK.T	1329.63/1329.63
Proteína de reserva 11S	<i>Coffea arabica</i>	Q9SAN3	K.AGNQGFYVAFK.T	1330.63/1329.63
Proteína de reserva 11S	<i>Coffea arabica</i>	P93079	K.IPILSSLQLSAER.G	1426.81/1425.81
Proteína de reserva 11S	<i>Coffea arabica</i>	P93079	R.AIPEEVLR.S	925.527/925.523
Proteína de reserva 11S	<i>Coffea arabica</i>	Q9SAN3	K.LNAQEPSFR.F	1060.52/1060.53
Proteína de reserva 11S	<i>Coffea arabica</i>	Q9SAN3	K.FFLAGNPQQGGGK.E	1319.66/1319.66
Proteína hipotética	<i>Populus trichocarpa</i>	gi 224130680	R.IGEILDKVK.K	1013.55/1013.61
Frutose bifosfato aldolase	<i>Cicer arietinum</i>	ALF_CICAR	K.GILAADESTGTIGK.R	1331.69/1331.69
Proteína de reserva 11S	<i>Coffea arabica</i>	Q9SAN3	K.GILAADESTGTIGKR.L	1487.32/1487.39
Alfa-galactosidase	<i>Coffea arabica</i>	A8Y5V3	R.LVAFSK.G	663.39/663.39
	<i>Coffea arabica</i>		K.YAWKPDSCNLPR.F	1505.71/1505.70
	<i>Coffea arabica</i>		R.GDSQPWDYVQDGSTS.D	1867.82/1867.82

Tabela 01. Continua.

189		Enolase	<i>Ricinus communis</i>	2:::ENO RICCO	K.VQIVGDDLLVTNPK.R	1509.84/1509.84
					K.VNQIGSVTESIEAVR. M	1600.83/1600.84
207		Proteína de reserva 11S	<i>Coffea arabica</i>	Q9ZNY2	K.TYDLNFKEENNDGSQ K.I	1900.84/1900.84
					K.TNDNAMINPLVGR.L	1430.7/1429.6

a Número do ponto proteico identificado

b Grãos de café natural (NAT) e desmucilados (CD)

c Massa molecular (Mr) teórica (Th) e experimental (Exp) dos peptídeos identificados

)

A segunda análise comparativa foi realizada entre os grãos de café natural e desmucilado, provenientes da região acima de 1200m. Foram detectados 07 pontos protéicos (identificados como n.46, 47, 99, 128, 136, 189 e 207) com abundância diferencial variando de 1,5 a 2 vezes (Figura 03 e 04) que foram selecionados pelo resultado do teste t-student ($p < 0,05$).

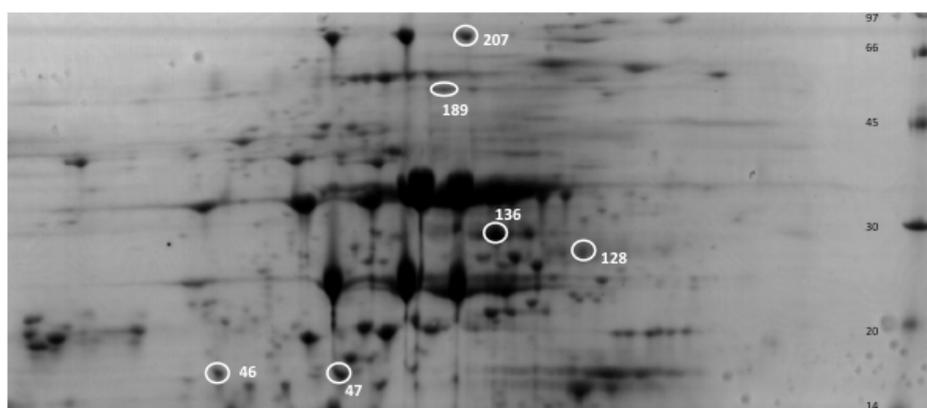


Figura 03 Gel bidimensional do perfil proteômico de grãos de café. Os círculos assinalam os pontos protéicos excisados, com diferença de abundância ($>1,5X$) após avaliação comparativa do proteoma de grãos de café natural e desmucilados provenientes de plantas cultivadas em regiões acima de 1200m.

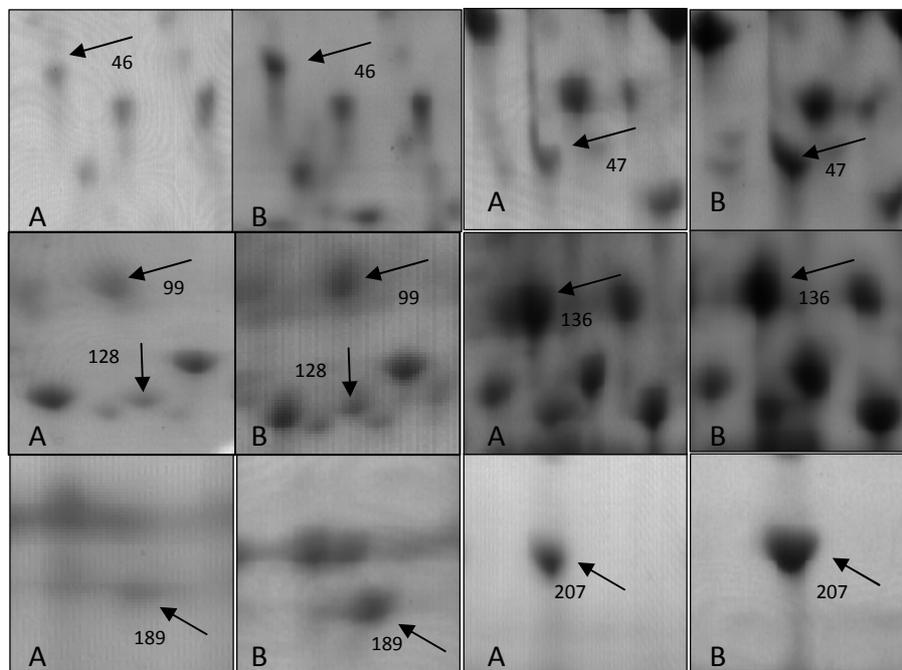


Figura 04. Detalhe dos pontos protéicos diferencialmente abundantes em grãos de café natural (A) e desmucilado (B), provenientes da região acima de 1200 m.

Os pontos identificados apresentaram homologia com a proteína de reserva 11S e enolase (Tabela 01).

DISCUSSÃO

Na primeira análise comparativa dos proteomas desse trabalho, a única proteína detectada após a coloração com Comassie-blue e indicada pela análise do ImageMaster como mais abundante em grãos desmucilados cultivados abaixo de 1000m, foi a proteína ribossomal 50S. Proteínas ribossomais, em conjunto com o rRNA, servem para controlar a tradução (Carrasco, Tan, & Duman, 2011). Cabe ressaltar que a remoção da mucilagem no café permite o

desencadeamento de diversas reações fisiológicas relacionadas à germinação (Selmar, Bytof, Knopp, Bradbury, Wilkens, & Becker, 2004), resultando em diferentes perfis metabólicos comparativamente ao café natural (Borém, 2008; Livramento, 2008). A maior presença destas proteínas ribossomais pode indicar um aumento da tradução de diversas outras proteínas, o que pode ser a chave para a sobrevivência das células perante as novas necessidades fisiológicas, bem como da manutenção da qualidade dos grãos.

Análises de uma biblioteca de ESTs de grãos tipo cereja de *Coffea canephora*, com 18-22 semanas após a polinização, revelaram uma série de proteínas ribossomais expressas neste estágio de maturação das sementes, indicando um intenso esforço celular na tradução (Andrade, Carazzolle, Colombo, Costa, Mondego & Parizzi, 2011).

As demais proteínas identificadas em grãos de café cultivados abaixo de 1000m, estavam mais abundantes em grãos de café natural, como é o caso da globulina 11S.

No café, a família de proteínas globulina 11S representa 45 % da proteína total no endosperma, o que corresponde a 5-7 % do peso seco do grão de café (Marraccini, Deshayes, Petiard, & Rogers, 1999) e é provavelmente uma das principais fontes de nitrogênio utilizadas durante a torração do grão de café. Os aminoácidos livres, juntamente com os açúcares redutores, produzem o produto final da Reação de Maillard, responsáveis pelo aroma e sabor da bebida. Segundo Reineccius (1995) tal reação ocorre durante a torração e é responsável pela produção de aromas e coloração escura em diversos alimentos, inclusive no café.

As proteínas globulinas são amplamente estudadas em sementes de dicotiledôneas. Pesquisas demonstraram em *Coffea* sp. a existência da proteína de reserva globulina 11S, com peso molecular de 55 kDa, constituída por duas subunidades, uma de 33 kDa (cadeia α) e outra de 24 kDa (cadeia β) (Acuña et

al., 1999). Utilizando 2DE, foram identificadas as subunidades α e β como sendo ácida e básica, respectivamente, e a presença de muitas isoformas (Rogers, Bézard, Deshayes, Meyer, Pétiard, & Marraccini, 1999).

A degradação da globulina 11S e a liberação de aminoácidos livres foi identificada a partir das análises do perfil proteômico de grãos de *C. canephora*, submetidos em condições aeróbicas. Este processo de degradação oxidativo das subunidades de proteínas de reserva do café foi considerado importante na constituição do sabor e aroma da bebida a partir da geração de compostos nitrogenados (Montavon et al., 2003).

Pesquisa recente, mostrou a diferença de expressão gênica da globulina 11S em duas espécies de café. Dois genes foram mais expresso em frutos de *C. arabica* e apenas um em *C. canephora*. Além disso, as análises das bibliotecas de ESTs relacionaram a maior expressão dessas proteínas de reserva com uma maior expressão de proteinases específicas (cisteína-protease e protease aspártica) o que pode indicar a liberação de aminoácidos livres ou de pequenos peptídeos, que podem contribuir para a qualidade da bebida de café (Andrade et al., 2011).

Outra proteína identificada em maior abundância em grãos de café natural foi a ferritina. Esta proteína é altamente conservada, encontrada em animais, plantas, fungos e bactérias, capaz de armazenar cerca de 4.500 átomos de ferro por molécula, em uma forma não tóxica. Trata-se de uma proteína multimérica, de aproximadamente 450kDa, composta por 24 subunidades (Sczekan & Joshi, 1987; Goto, F., Yoshihara, T., Masuda, T., And Takaiwa, F., 2001; Goto, F., Yoshihara, T., Shigemoto, N., Toki, S., And Takaiwa, F. I., 1999; Vasconcelos et al., 2003).

Uma das funções fisiológicas da ferritina nas plantas é o armazenamento de ferro na cavidade central da molécula e sua liberação quando requerido, por exemplo, durante a síntese de clorofila, nos processos de fotossíntese,

respiração, fixação de nitrogênio, síntese de DNA e hormônios (Briat et al., 1995). Além disso, a ferritina também proporciona proteção às células contra os efeitos tóxicos do excesso de ferro (Goto et al., 2001). Estudo recente também demonstrou o importante papel da ferritina contra o estresse oxidativo em culturas de células em suspensão de *Coffea arabica L.* Os dados sugerem que a ferritina participa do sistema antioxidante, protegendo as células contra os danos oxidativos que o excesso de ferro presente no meio de cultura induz (Bottcher, Nobile, Martins, Conte, Azevedo, & Mazzafera, 2011).

Se esta relação com um sistema antioxidante, citada acima, for extensiva às estresses sofridos pelos grãos, podemos inferir que a maior abundância dessa proteína pode estar relacionada com o estresse ocorrido durante a processamento via seca. Além disso, a germinação se inicia mais rapidamente em grãos desmucilados e o aparato fotossintético está em plena formação. Moléculas de ferro são requisitadas nessa mudança fisiológica e, dessa forma, com menos ferro livre, a ação da ferritina não é tão requerida e sua expressão pode ser reduzida.

Outra proteína envolvida em resposta ao estresse é a deidrina. Esta proteína estava mais abundante no perfil proteômica de grãos de café natural. A deidrina pode auxiliar no processo de tolerância a dessecação e, também, agir, hipoteticamente, para evitar a agregação de proteínas sensíveis a desidratação e estabilizar interações hidrófobas em grande escala, tais como aqueles encontrados em membranas e em proteínas hidrofóbicas (Tunnacliffe & Wise, 2007), garantindo a proteção celular. Pesquisadores usaram análise proteômica e de microarrays para mostrar que as deidrininas são super-expressas durante a exposição a baixa temperatura. Estudos evidenciaram o aumento da expressão da proteína deidrina em resposta à outros tipos de estresse, incluindo a salinidade elevada e a baixa temperatura (Close, 1997; Kosová K, Vítámvása,

P.; Práçêila, T. I., 2007), provavelmente por interações de membranas (Egerton & Warburton et al., 1997; Danyluk et al., 1998).

Diante disso, podemos inferir que a alta concentração das proteínas deidrinas nos grãos de café natural se deva a algum tipo de estresse que o processamento via seca possa ocasionar no estado fisiológico do grão, bem como na qualidade final da bebida.

A proteína Frutose-bifosfato-aldolase (aldolase) é uma enzima envolvida no metabolismo dos carboidratos. Essa enzima participa das vias metabólicas da glicólise e gliconeogênese, pois catalisa a clivagem reversível da hexose frutose-1,6-bifosfato em duas trioses: gliceraldeído-3-fosfato (GAP) e diidroxicetona-fosfato (DHAP) (Rutter, 1964).

Pesquisa recente identificou e analisou oitos genes da família frutose-bifosfato-aldolase em *Arabidopsis thaliana*. Os resultados deste estudo sugerem que todos os membros da multifamília gênica apresentaram diferentes padrões de expressão, em resposta à diferentes tipos estresse, incluindo temperaturas extremas e déficit hídrico (Lu et al, 2012).

A proteína alfa-galactosidase é uma das três principais enzimas envolvidas na degradação ou modificação de galactomananos (polissacarídeos constituído por manose e galactose) da parede celular de plantas (Reid & Meier, 1973). Trabalhos realizados para caracterização molecular e bioquímica da alfa-galactosidase de grãos de café, analisou os perfis protéicos, através dos géis bidimensionais, e demonstraram a existência de duas isoformas dessa enzima, acumulada ao longo de maturação dos grãos de café arábica e robusta. Neste mesmo trabalho, foi observado que a atividade dessa proteína aumentou a níveis elevados durante a germinação *in vitro* de grãos de café, sugerindo uma função importante desta enzima neste processo (Marraccini et al., 2005). Dados correlatos ao anterior, demonstraram a expressão mais elevada de três genes da alfa-galactosidase nos estádios finais de desenvolvimento da semente *C.*

canephora. Além disso, as pesquisas revelaram a possibilidade desta enzima ser responsável pela redução dos níveis de oligossacarídeos da família rafinose (OFR) nos últimos estágios do desenvolvimento da semente de café (Andrade et al., 2011). Os OFR são açúcares solúveis, tais como a rafinose, estaquiase e verbascose, que são imobilizados durante estágios do desenvolvimento para suprir a necessidade de galactose na síntese de galactomananos. Além disso, o acúmulo RFO está associado com respostas a estresses abióticos, protegendo o metabolismo celular dos danos oxidativos e deficit hídrico (Nishizawa, Yabuta, & Shigeoka, 2008; Marraccini, 2005).

Dessa forma, em grãos de café natural a maior concentração de alfa-galactosidase pode influenciar na redução de OFR, diminuindo sua ação protetora contra danos oxidativos. Além disso, por serem constituintes estruturais da parede celular, a redução desses açúcares podem provocar uma fragilidade na membrana celular, permitindo a descompartimentalização dos constituintes químicos e, assim, influenciando na geração ou degradação de compostos químicos precursores do sabor e aroma da bebida.

Finalmente, na segunda análise comparativa, na qual se comparou grãos de café natural e desmucilados cultivados em regiões acima de 1200m, foi encontrada a proteína enolase (ou 2-fosfo-D-glicerato hidrolase) em maiores concentrações em grãos de café naturais.

A enolase é uma enzima que catalisa a conversão de 2-fosfoglicerato em fosfoenolpiruvato, a única etapa de desidratação da via glicolítica (Van Der Straeten, Rodrigues-Pousada, Goodman, & Van Montagu, 1991).

Estudo proteômico analisou clones de *C. canephora* sob estresse hídrico e observou o aumento dos níveis de enolase tanto no clone sensível quanto no clone tolerante, sob condições de deficit hídrico. A enolase é uma proteína que favorece o aumento da produção de piruvato pela via glicolítica, juntamente com a redução de enzimas relacionadas com etapas posteriores. Os autores sugerem

ainda que a enolase também pode estar envolvida na produção de hexoses fosfatadas contribuindo para o ajustamento osmótico no sistema radicular como um mecanismo de aclimatação às condições de déficit hídrico (Soares, 2008).

Cabe ressaltar, que piruvato também é um ativador alostérico da oxidase alternativa (AOX), enzima presente na cadeia transportadora de elétrons da mitocôndria de plantas que catalisa a oxidação do ubiquinol e a redução do oxigênio a água (Onda et al., 2007). Maxwell, D.P., Wang, Y. and McIntosh, L (1999) mostraram que a enzima AOX pode estar relacionada com a prevenção na produção de espécies reativas de oxigênio.

Pesquisas envolvendo alagamento mostraram um aumento na quantidade de enolase nos perfis proteômicos de folhas de tomate e raízes de soja submetidas a tal estresse. Ahsan et al. (2007) e Alam et al. (2010) observaram ainda alterações *in vivo* do conteúdo de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e peroxidação lipídica em folhas de tomate e raízes de soja, respectivamente. Indicando que este fator de estresse tem um componente oxidativo. A falta de oxigênio, provocada pelo alagamento, conduz ao desenvolvimento do metabolismo anaeróbico, especialmente da glicólise e da fermentação, que estão associadas com um aumento da concentração de proteínas anaeróbicas (ANPS), ou seja, fosfoglicerato quinase, enolase e álcool desidrogenase (Kosová; K.; Vítámvása, P.; Práeila, T. I.; Renautb, J., 2011).

Além disso, após acompanhamento do proteoma em diferentes fases fisiológicas, foi observada a presença da enolase em embriões no estágio torpedo de diferentes plantas, sugerindo que a mesma pode ser utilizada como marcador molecular nesse estágio (Andriotis V. M., Kruger N. J., Pike M. J, Smith A. M. , 2010; Tonietto et al., 2012). E sua função como proteína de reserva foi revelada em diferentes estudos com sementes de ciclamem, os quais relataram a constante presença dessa proteína e as relacionam com a função de armazenamento, juntamente com globulinas 7S e 11S (Winkelmann, T.; Heintz, D.; Van

Dorsselaer, A.; Serek, M.; Braun, H.P., 2006; Rode, C.; Gallien, S.; Heintz, D.; Van Dorsselaer, A., Braun H.P., Winkelmann T., 2011; Mwangia, J. W.; Rodea, C.; Colditza, F.; Haasea, C.; Brauna, H-P.; Winkelmann, T. 2013).

As três últimas proteínas citada neste trabalho foram encontradas em maiores concentrações em grãos naturais, independente do local de cultivo. Todas essas proteínas, Aldolase, alfa-galactosidase e enolase, são proteínas envolvidas no metabolismo dos açúcares e estão diretamente relacionadas com a produção de energia (Kosová et al 2011).

Como pode ser observado na tabela 01, na segunda análise comparativa, duas proteínas de reserva 11S foram encontradas em maiores concentrações em grãos de café natural e outras duas em grãos de café desmucilados. Em grãos de café natural, essas proteínas (nº. 136 e 207 - tabela 01) apresentaram um peso molecular aproximado de 50kDa, correspondente às duas subunidades. No entanto, em grãos desmucilados, as proteínas 11S encontradas (nº. 46 e 47 - tabela 01) apresentaram peso molecular abaixo de 20kDa.

Uma explicação para tal ocorrência, pode ser baseada em pesquisas já publicadas. Por eletroforese bidimensional, Rogers et al (1999) verificaram a presença das subunidades (β -básica - 20kDa e α - ácida - 32kDa) e a presença de vários peptídeos de 12 a 16 kDa, provavelmente produtos da degradação gerados pela ação de proteases.

Recentemente, análises das bibliotecas de ESTs relacionaram a maior expressão das proteínas de reserva 11S com uma maior expressão de proteinases específicas (cisteína-protease e protease aspártica), o que pode indicar a liberação de aminoácidos livres ou de pequenos peptídeos, que possivelmente contribuem para a qualidade da bebida de café (Andrade et al., 2011).

Além disso, é importante salientar que em grãos desmucilados o desencadeamento da germinação é um processo antecipado em relação aos grãos naturais (Selmar et al., 2004). E a demanda por proteínas de reserva é

naturalmente maior. Ou seja, provavelmente, nessa condição fisiológica, a presença de fragmentos da proteínas 11S, possa ser devido à degradação das mesmas pela maior demanda que em grãos naturais.

CONCLUSÃO

Na primeira análise comparativa, o tipo de processamento influenciou fortemente no perfil proteômico dos grãos cultivados em regiões abaixo de 1000m. Nos grãos de café natural foi possível detectar maior abundância das proteínas globulina 11S, deidrina, frutose bifosfato aldolase e alfa-galactosidase.

Na segunda análise comparativa, com grãos provenientes de plantas cultivadas acima de 1200m, foram encontrados fragmentos da proteína de reserva Globulina 11S com diferentes pesos moleculares em grãos de café natural e desmucilado. Somente a proteína enolase foi a mais abundante em grãos de café natural.

As análises proteômicas em *Coffea sp.* são notoriamente pouco relatadas na literatura quando comparado com estudos metabolômicos, que visam analisar a composição química dos grãos de café. No entanto, a comparação dos dados de expressão proteica com os dados de genômica, transcriptômica e metabolômica, certamente, ajudará a compreender os processo de formação destes compostos e permitirá o desenvolvimento de um controle das tecnologias pós-colheita empregadas nos grãos de café, a fim de contribuir com a melhoria da qualidade do sabor e aroma da bebida do café, minimizando a formação de potenciais componentes químicos prejudiciais à qualidade de bebida.

REFERÊNCIAS

- Acuña, R.; Bassüner, R.; Beilinson, V.; Cortina, H.; Cadena-Gómez, G.; Montes, V.; Nielsen, N.C. (1999) Coffee seeds contain 11S storage protein. *Physiologia Plantarum*, 105, 122-131.
- Amorim, H. V. *Aspectos bioquímicos e histoquímicos do grão de café verde relacionados com a deterioração de qualidade*. 1978. 85p. Tese (Livre-docência) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, SP.
- Andriotis V. M., Kruger N. J., Pike M. J, Smith A. M. (2010) Plastidial glycolysis in developing Arabidopsis embryos. *New Phytology*, 185, 649–662.
- Andrade, A. C.; Carazzolle, M. F.; Colombo, C. A.; Costa, G. G. L.; Mondego, J. M. C.; Parizzi, L. P. (2011) An EST-based analysis identifies new genes and reveals distinctive gene expression features of *Coffea arabica* and *Coffea canephora*. *BMC Plant Biology*, 11, 30. DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2229-11-30>
- Ahsan N, Lee Dg, Lee Sh, Kang Ky, Bahk Jd, Choi Ms, et al. A comparative proteomic analysis of tomato leaves in response to waterlogging stress. *Physiology Plant*, v.131, p. 555–70. 2007.
- Alam I, Lee Dg, Kim Kh, Park Ch, Sharmin Sa, Lee H, et al. Proteome analysis of soybean roots under waterlogging stress at an early vegetative stage. *Journal Bioscience*, v. 35, p. 49–62, 2010.
- Arruda, N.P.; Hovell, A.M.C.; Rezende, C.M.; Freitas, S. P., Couri, S.; & Bizzo, H. R. (2012) Correlação entre precursores e voláteis em café arábica brasileiro processado pelas vias seca, semiúmida e úmida e discriminação através da análise por componentes principais. *Química Nova*, 35, 2044-2051.
- Borém, F. M. Processamento do café. In: Borém, F. M. (1Ed.). *Pós-colheita do café*. Lavras: UFLA, 2008. p. 127-158.
- Briat, J.F.; Fobisloisy, I.; Grignon, N.; Lobreaux, S.; Pascal, N.; Savino, G.; Thoiron, S.; Vonwiren, N.; Vanwuytswinkel, O. (1995) Cellular and

- molecular aspects of iron metabolism in plants. *Biology of the Cell*, 84, 69-78.
- Bottcher, A.; Nobile, P. M.; Martins, P. F.; Conte, F. F.; Azevedo, R. A.; Mazzafera, P. (2011) A role for ferritin in the antioxidant system in coffee cell cultures. *BioMetals*, 24, 225 -237.
- Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.
- Carrasco M. A.; Tan, J. C.; Duman, J.G. A (2011) Cross-species compendium of proteins/gene products related to cold stress identified by bioinformatic approaches. *Journal of Insect Physiology*, 57, 1127–1135.
- Close, T.J., (1997) Dehydrins: a commonality in the response of plants to dehydration and low temperature. *Plant Physiology*, 100, 291–296.
- Danyluk, J.; Perron, A.; Houde, M.; Limin, A.; Fowler, B.; Benhamou, N.; Sarhan, F. (1998) Accumulation of an acidic dehydrin in the vicinity of the plasma membrane during cold acclimation of wheat. *Plant Cell*, 10, 623–638.
- Duarte, G. S.; Pereira, A. A.; Farah, A. (2010) Chlorogenic acids and other relevant compounds in brazilian coffees processed by semi-dry and wet post-harvesting methods. *Food chemistry*, 118, 851-855.
- Egerton-Warburton, L.M., Balsamo, R.A., Close, T.J. (1997) Temporal accumulation and ultrastructural localization of dehydrins in *Zea mays*. *Plant Physiology*, 101, 545–555.
- Franca, A. S.; Mendonça, J. C. F.; Oliveira, S. S. D. (2005) Composition of green and roasted coffees of different cup qualities. *LWT*, 38, 709 - 715.
- Gallardo, K.; Le Signor, C.; Vandekerckhove, J.; Thompson, R. & Bustin, J. (2003) Proteomics of *Medicago truncatula* seed development establishes the time frame of diverse metabolic processes related to reserve accumulation. *Plant Physiology*, 133, 664-682.
- Goto, F., Yoshihara, T., Masuda, T., And Takaiwa, F. (2001) Genetic improvement of iron content and stress adaptation in plants using ferritin gene. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 18, 351-371.

- Goto, F., Yoshihara, T., Shigemoto, N., Toki, S., And Takaiwa, F. I. (1999) Iron fortification of rice seed by the soybean ferritin gene. *Nature Biotechnology*, 17, 282-286.
- Gourlat, P.F.P. (2003) Análise comparativa entre lixiviação de potássio, condutividade elétrica, teor de ácido clorogênico e métodos de quantificação da atividade da polifenoloxidase em extratos semipurificados de amostras de café de diferentes padrões de qualidade. *Revista brasileira de armazenamento*, 7, 78-85.
- Jin, Z ; Mu, Yw ; Sun, Jy ; Li, Xm ; Gao, Xl ; Lu, J. (2013) Proteome Analysis of Metabolic Proteins (pI 4-7) in Barley (*Hordeum vulgare*) Malts and Initial Application in Malt Quality Discrimination. *Journal Of Agricultural And Food Chemistry*, 61, 402-409.
- Joët, T.; Laffargue, A.; Descroix, F.; Doubeau, S.; Bertrand, B.; De Kochko, A.; Dussert, S.; (2010) Influence of environmental factors, wet processing and their interactions on the biochemical composition of green Arabica coffee beans. *Food Chemistry*, 118, 693-701.
- Kosová, K.; Vítámvása, P.; Práeila, T. I.; Renautb, J. (2011) Plant proteome changes under abiotic stress — Contribution of proteomics studies to understanding plant stress response. *Journal of Proteomics*, 74, 1301–1322.
- Kosová K, Vítámvása, P.; Práeila, T. I.; (2007) The role of dehydrins in plant response to cold. *Biology Plant*, 51, 601–17.
- Laemmli, U, K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227: 680-685.
- Livramento, Kalynka Gabriella do (2008) *Proteômica diferencial e caracterização fisiológica de dois clones de Coffea canephora sob déficit hídrico*. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal). Lavras, MG.
- Lu, W ; Tang, Xl ; Huo, Yq ; Xu, R ; Qi, Sd ; Huang, Jg ; Zheng, Cc ; Wu, Ca. (2012) Identification and characterization of fructose 1,6-bisphosphate aldolase genes in Arabidopsis reveal a gene family with diverse responses to abiotic stresses. *Gene*, 503, 65-74.

- Ludwig, E., Lipke, U., Raczek, U., & Jaeger, A. (2000) Investigations of peptides and proteases in green coffee beans. *European Food Research and Technology*, 211, 111-116.
- Marraccini, P., Deshayes, A., Petiard, V., & Rogers, W. J. (1999) Molecular cloning of the complete 11 S seed storage protein gene of *Coffea arabica* and promoter analysis in transgenic tobacco plants. *Plant Physiology Biochemistry*, 37, 273-282.
- Marraccini, P., Rogers, W.J., Caillet, V., Deshayes, A., Granato, D., Lausanne, F., Lechat, S., Pridmore, D., & Petiard, V. (2005) Biochemical and molecular characterization of alpha-D-galactosidase from coffee beans. *Plant Physiology Biochemistry*, 43, 909-920.
- Maxwell, D.P., Wang, Y., & Mcintosh, L. (1999) The alternative oxidase lowers mitochondrial reactive oxygen production in plant cells. *Proceedings of National Academy of Sciences*, 96, 8271-8276.
- Mwangia, J. W.; Rodea, C.; Colditza, F.; Haasea, C.; Brauna, H-P.; Winkelmann, T. (2013) Proteomic and histological analyses of endosperm development in *Cyclamen persicum* as a basis for optimization of somatic embryogenesis. *Plant Science*, 201, 52–65.
- Montavon, P.; Mauron, A.F.; Duruz, E. (2003) Changes in green coffee protein during roasting. *Journal of agricultural and food chemistry*, 51, 2335-2343.
- Nishizawa A, Yabuta Y, Shigeoka S. (2008) Galactinol and raffinose constitute a novel function to protect plants from oxidative damage. *Plant Physiology*, 147, 1251-1263.
- Onda, Y.; Kato, Y.; Abe, Y.; Ito, T.; Ito-Inaba, Y.; Morohashi, M.; Ito, Y.; Ichikawa, M.; Matsukawa, K.; Otsuka, M. (2007) Pyruvate-sensitive AOX exists as a non-covalently associated dimer in the homeothermic spadix of the skunk cabbage, *Symplocarpus renifolius*. *Federation of Biochemical Societies Letters*, 581, 5852-5858.
- Reid, J.S.G. & Meier, H. (1973) Enzymatic activities and galactomannan mobilization in germinating seeds of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L. *Leguminosae*). Secretion of a-galactosidase and b-mannosidase by the aleurone layer. *Planta*, 112, 301–308.

- Reineccius, G. A. The maillard reaction and coffee flavor. In: COLLOQUIUM, 16., 1995, Kyoto. *Proceedings...* Paris: ASIC, 1995, p. 249- 257.
- Rogers, W. J.; Bézard, G.; Deshayes, A.; Meyer, I.; Pétiard, V.; Marraccini, P. (1999) Biochemical and molecular characterization and expression of the 11S-type storage protein from *Coffea arabica* endosperm. *Plant Physiology Biochemistry*, 37, 261-272.
- Rode, C.; Gallien, S.; Heintz, D.; Van Dorsselaer, A., Braun H.P., Winkelmann T. (2011) Enolases: storage compounds in seeds? Evidence from a proteomic comparison of zygotic and somatic embryos of *Cyclamen persicum* Mill. *Plant Molecular Biology*, 75, 305–319.
- Rutter, W. J. (1964) Evolution of aldolase. *Federation Proceedings*, v. 23, p. 1248-1257.
- Sczekan, S.R., & Joshi, J.G. (1987) Isolation And Characterization Of Ferritin From Soybeans (*Glycine Max*). *Journal Of Biological Chemistry*, 262, 13780-13788.
- Selmar, D.; Bytof, G.; Knopp, S. E.; Bradbury, A.; Wilkens, J.; Becker, R. Biochemical insights into coffee processing: quality and nature of green coffee are interconnected with an active seed metabolism. In: INTERNATIONAL CONFERENCE IN COFFEE SCIENCE, 20., 2004, Bangalore. *Proceedings...* Bangalore: ASIC, 2004. 1 CD-ROM.
- Silva, E. A. da, Mazzafera, P., Brunini, O., Sakai, E., Arruda, F.B., Mattoso, L. H. C., Carvalho, C.R. L., Pires, R. C. M. (2005) The influence of water management and environmental conditions on the chemical composition and beverage quality of coffee beans. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 17, 229-238.
- Soares, C. Q. G. *Proteômica diferencial e caracterização fisiológica de dois clones de Coffea canephora sob déficit hídrico*. Dissertação (Programa de Pós- Graduação em Fisiologia Vegetal). Viçosa, MG. 2008
- Taveira, J. H. S.; Rosa, S.D.V.F.; Borém, F.M.; Giomo, G.S.; Saath, R. (2012) Perfis protéicos e desempenho fisiológico de sementes de café submetidas a diferentes métodos de processamento e secagem. *Pesquisa agropecuária brasileira*, 47, 1511-1517.

- Tonietto, A.; Sato, J.H.; Teixeira, J.B.; Souza, E. M. De; et al. (2012) Proteomic analysis of developing somatic embryos of *Coffea arabica*. *Plant Molecular Biology Report*, 30, 1393 –1399.
- Tunnacliffe, A. & Wise, M.J. (2007) The continuing conundrum of the LEA proteins. *Naturwissenschaften*, 94, 791–812.
- Vaast, P., B. Bertrand, J.P. Perriot, B. Guyot And M. Génard. (2006). Fruit thinning and shade influence bean characteristics and beverage quality of *C. arabica* in optimal conditions. *Journal Science Food Agriculture*. 86:197 – 204.
- Van Der Straeten, D.; Rodrigues-Pousada, R.A.; Goodman, H.M. & Van Montagu, V. (1991) Plant enolase: gene structure, expression, and evolution. *The Plant Cell*, 3, 719-735.
- Vasconcelos, A. L. S.; Franca, A. S.; Glória, M. B. A.; Mendonça, J. C.F. (2007) A comparative study of chemical attributes and levels of amines in defective green and roasted coffee beans. *Food chemistry*, 101, 26-32.
- Vasconcelos, M., Datta, K., Oliva, N., Klalekuzzaman, M., Torrizo, L., Krishnan, S., Oliveira, M., Goto, F., & Datta, S.K. (2003) Enhanced iron and zinc accumulation in transgenic rice with the ferritin gene. *Plant Science* v. 164, p. 371-378.
- Vieira, L.G.E. et al (2006) Brazilian coffee genome project: an EST-based genomic resource. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 18, 95-108.
- Winkelmann, T.; Heintz, D.; Van Dorsselaer, A.; Serek, M.; Braun, H.P. (2006) Proteomic analyses of somatic and zygotic embryos of *Cyclamen persicum* Mill. reveal new insights into seed and germination physiology, *Planta*, 224, 508–519.
- Yun, Ze ; Jin, Shuai ; Ding, Yuduan ; Wang, Zhuang ; Gao, Huijun ; Pan, Zhiyong ; Xu, Juan ; Cheng, Yunjiang ; Deng, Xiuxin. (2012) Comparative transcriptomics and proteomics analysis of citrus fruit, to improve understanding of the effect of low temperature on maintaining fruit quality during lengthy post-harvest storage. *Journal of Experimental Botany*, 63, 2873-2893.

ARTIGO 03
NORMAS DA REVISTA CIENTÍFICA
PLANT MOLECULAR BIOLOGY REPORT
(VERSÃO PRELIMINAR)

ANÁLISE DO PERFIL PROTEÔMICO DE GRÃOS DE CAFÉ NATURAL E DESMUCILADO CULTIVADOS NA SERRA DA MANTIQUEIRA EM DIFERENTES FAIXAS DE ALTITUDE.

Resumo

A análise dos efeitos resultantes das condições climáticas e do processamento dos grãos de café é de grande interesse nas pesquisas, porque a composição química do grão e conseqüentemente a qualidade de bebida são fortemente influenciados pelas condições de cultivo e/ou métodos de processamento. Neste estudo, utilizando uma abordagem proteômica, grãos de *Coffea arabica* cv. Acaiá, cultivados em duas altitudes (abaixo de 1000m e acima de 1200M), foram analisados numa tentativa de melhor entender as mudanças protéicas ocorridas durante dois tipos de processamento (via seca e via úmida). A análise da eletroforese bidimensional revelou uma ampla gama de proteínas com expressão diferencial, variando entre 14 e 100kDa e pH entre 3 e 10. Muitas proteínas diferencialmente abundantes entre os tratamentos foram identificadas por espectrometria de massa, dentre elas a globulina 11S, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, deidrina e proteína *Heat shock*. Esses resultados contribuem para o entendimento sobre os efeitos da altitude e processamento que afetam a composição química dos grãos e espera-se que sirvam de alicerce para futuras pesquisas relacionadas à qualidade de bebida do café.

Palavras-chaves: conteúdo bioquímico dos grãos, eletroforese bidimensional, fatores ambientais, processamento do café, proteína.

INTRODUÇÃO

O café é uma das bebidas mais populares em todo o mundo, sendo a segunda *commodity* mais importante depois do petróleo. Existem duas espécies comercialmente importantes do gênero *Coffea* na família Rubiaceae, *C. canephora* e *Coffea arabica* P. L., que representam cerca de 30% e 70% de produtos do mundo, respectivamente. Em 2011/12, os valores de exportação do agronegócio mundial do café atingiram cerca de 20 bilhões de dólares, aproximadamente 145 milhões de sacas (60kg) exportadas, e envolvimento de aproximadamente 26 milhões de pessoas trabalhando nos 48 países produtores (IOC, 2014).

Embora o café arábica seja altamente vulnerável às condições climáticas (Davis et al. 2012), seus grãos tendem a gerar sabores superiores e produzir bebidas de alta qualidade. Em relação às condições climáticas, é empiricamente conhecido que a alta altitude tem efeitos benéficos sobre a qualidade do café, por ter uma forte influência na temperatura do ar, e seus efeitos positivos têm sido quase sempre atribuídos a condições climáticas mais frias (Joët et al. 2010).

Baixas temperaturas retardam o processo de amadurecimento, que por sua vez leva a uma maior acúmulo de precursores de aroma (Vaast et al. 2006). Em geral, é aceito que a alta altitude melhora a qualidade do café (Avelino et al., 2005; Decazy et al. 2003; Guyot et al. 1996). A faixa de temperatura média anual ideal para a produção de café é de 19-21°C (Camargo 1985), embora existem alguns locais com temperaturas mais elevadas (24-25 °C) produzindo grãos com qualidade satisfatória, tais como, no nordeste do Brasil (DaMatta 2004).

Hoje, as plantações de café já estão sofrendo as influências do aquecimento global (Baker and Hagggar 2007; Hagggar and Schepp 2011) e a tendência é que se intensifique esses efeitos, porque estudos mostram que

ocorrerá um aumento de temperatura em torno 1,8-4°C até o final do século XXI (IPPC 2007). O entendimento da relação entre os mecanismos de tolerância e o estresse abiótico (por exemplo, temperatura e precipitações pluviométricas) é essencial para a prospecção de estratégias biotecnológicas que visam elucidar seus efeitos sobre a qualidade de bebida.

Em adição, os efeitos do manejo pós-colheita também podem interferir na qualidade da bebida, porque, durante o processamento e secagem, os grãos estão sujeitos à muitas alterações físicas, bioquímicas e fisiológicas (Borém 2008). Embora não muito bem elucidadas, essas alterações resultam em diferenças importantes entre os compostos precursores do sabor e aroma, que ao final conferem as características peculiares de cada bebida (Bytof et al. 2007).

Considerando a importância da altitude e dos tratamentos pós-colheita na geração de sabor, uma melhor compreensão da composição química e suas relações com o estado metabólico dos grãos, parece altamente justificada.

Quanto à composição química, pouca informação é encontrada na literatura sobre o conteúdo protéico dos grãos. Portanto, um melhor entendimento da composição protéica auxiliará na elucidação dos processos metabólicos associadas ao diferentes fenômenos que ocorrem nos grãos durante seu desenvolvimento e durante os processos pré e pós-colheita. Isso poderá levar à identificação de biomarcadores, que podem ser úteis para avaliar a qualidade dos grãos de arábica e, conseqüentemente sua qualidade de bebida.

Diante disso, esse trabalho objetivou o estudo do proteoma dos grãos de café, a partir de géis obtidos por eletroforese bidimensional, a fim de analisar proteínas diferencialmente abundantes em grãos submetidos aos processamentos via seca e via úmida, provenientes de cultivos localizados em duas faixas de altitude.

MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos nos seguintes laboratórios: Laboratório Central de Biologia Molecular (LCBM) da Universidade Federal de Lavras (UFLA).

2.1 Procedência dos grãos de café

Para o presente estudo, foram coletadas amostras de café Bourbon Amarelo (*Coffea arabica* L.), ao longo da safra agrícola (2009/10), em lavouras comerciais localizadas no município de Carmo de Minas (-22°6', 45°8'), Minas Gerais, Brasil. O ambiente de cultivo do café foi estratificado em duas classes de altitude (inferior a 1.000 m e superior a 1.200 m).

A colheita foi realizada manual e seletivamente, em triplicata. Somente os frutos maduros (cerca de 60L) foram coletados de diversas plantas de um talhão identificado. Em seguida, os frutos foram separados por diferença de densidade, aproveitando-se somente aqueles mais densos. Aproximadamente, 14 L de frutos selecionados foram dispostos em telas para secagem ao sol, obtendo-se, assim, as amostras de café natural (via seca). Para a obtenção do café via úmida, optou-se pelo processo desmucilagem mecânica. Aproximadamente, 20 L de frutos maduros, previamente selecionados, foram descascados e desmucilados. Em seguida, em torno de 7 L de café desmucilado foram dispostos em telas para secagem ao sol. A secagem iniciou-se imediatamente após o processamento.

Todos os procedimentos de colheita, processamento e secagem foram realizados segundo Borém (2008).

Posteriormente, todos os grãos com defeitos foram retirados, visando à uniformização e, sobretudo, à minimização de interferências que não fossem relacionadas ao material genético, ao processamento ou ao ambiente de cultivo.

As análises comparativas foram constituídas da seguinte forma:

- Análise 01 - abaixo de 1000m - grãos de café natural X grãos de café desmucilado
- Análise 02 - acima de 1200m - grãos de café natural X grãos de café desmucilado
- Análise 03 - grãos de café desmucilado - abaixo de 1000m X acima de 1200m

2.2 Extração de proteínas totais

Todas as amostras foram submetidas à retirada da casca e pergaminho e foram conservadas em tubos falcon no freezer -80°C. Para análise, os grãos foram macerados em nitrogênio líquido, com auxílio de graal (almofariz) e de pistilo de porcelana. As proteínas foram extraídas de acordo com Gallardo et al (2002) com pequenas modificações. Foram utilizados 200-300mg do pulverizado, com 660µl tampão de lise, contendo 7M ureia, 2M tiureia, 14mM trizma base (GE Healthcare), 100µl do coquetel de inibidores de proteases (GE Healthcare), 12 unidades de DNaseI (1mg/ml), 20µl de RNase A (1mg/ml), 0,2% (v/v) Triton X-100, 60mM CHAPS (GE Healthcare) e 17,5mM DTT (GE Healthcare). A mistura foi homogeneizada em vortex e colocada no gelo. Após 15 minutos, os tubos foram centrifugados a 14.000 rpm por 10 minutos, a 4°C. O sobrenadante contendo as proteínas totais foi centrifugado novamente nas mesmas condições anteriores e estocado, a -20°C, em alíquotas de 100 µl.

A concentração das proteínas dos diversos extratos foi quantificada por densidade ótica, de acordo com o método de Bradford (1976), utilizando-se

albumina sérica bovina (BSA) como padrão, pelo espectrofotômetro Gene Quant (GE Healthcare).

2.3 Análise da integridade das proteínas

A fim de observar a integridade das proteínas e a eficiência do método de extração, foram escolhidas, aleatoriamente, dez amostras de proteínas totais (10 μ g) para visualização em gel de poliacrilamida 12% (m/v), de acordo com o método descrito por Laemmli (1970). A separação das proteínas ocorreu por eletroforese, realizada pelo sistema MiniVE (GE Healthcare), a 100V, 400mA e 50W, por 1 hora e 40 minutos aproximadamente. O gel foi corado com solução de Azul de Coomassie G-250.

2.4 Eletroforese bidimensional

Após a confirmação da integridade, as proteínas foram separadas por focalização isoeletrica (IEF), utilizando-se fita de 18cm com pH imobilizado de 3-10 (Immobiline Drystrips - GE Healthcare). As fitas para IEF foram reidratadas no suporte de reidratação individual em canaletas (Reswelling Tray GE Healthcare), por 15 horas, à temperatura ambiente, em tampão tiureia/ureia, contendo 7M ureia, 2M de tiureia, 1% (v/v) IPG Buffer (GE Healthcare), 2% CHAPS (p/v), 1,8mM DDT e azul de bromofenol. O volume final de 340 μ l de tampão mais 230 μ g de proteína foram aplicados nas canaletas. Após posicionar as fitas nas canaletas, 2,0 ml de *Cover Fluid* (GE Healthcare) foram aplicados sobre cada fita. A focalização isoeletrica ocorreu a 15°C, a 150V, por 1 minuto; 150V, por 3 horas; 500V, por 3 horas; 3.500V por 5 horas e 3.500 V, por 12 horas, acumulando um total de 55 kVh. Ao final da focalização isoeletrica, as

fitas foram armazenadas em tubos de vidro autoclavados, a -80°C , até o início da eletroforese de segunda dimensão.

Antes da eletroforese de segunda dimensão, as fitas foram equilibradas em uma solução contendo 6M ureia, 29% (v/v) glicerol, 2% (p/v) SDS, 75mM Tris-HCl 1,5M, pH8,8, 0,002% (p/v) azul de bromofenol 1%, com 65mM DTT (primeiro passo) e com 0,2M iodoacetamida (segundo passo - sem DTT), por 30 minutos cada passo, sob agitação. Cada fita equilibrada foi colocada sobre o gel de poliacrilamida 12,5% homogêneo (Amersham Bioscience), ao lado do tampão sólido (Buffer Strip – GE Healthcare), na extremidade negativa da cuba. A eletroforese de segunda dimensão ocorreu a 15°C , a 600V, 20mA, 30W, por 35 minutos e a 600V, 50mA, 30W por 1 hora e 40 minutos ou até o marcador de corrida atingir o tampão sólido na extremidade positiva, pelo Sistema MultiphorII (GE Healthcare).

2.5 Coloração dos géis bidimensionais

Os géis foram inicialmente colocados por 30 minutos em uma solução de fixação contendo 7% (v/v) de ácido acético, 40% (v/v) metanol e, em seguida, transferidos para a solução de coloração, contendo quatro partes da solução com 0,1% (p/v) de Azul de Coomassie G-250, 2% (v/v) ácido fosfórico e 15% (p/v) sulfato de amônio mais uma parte de metanol, submetidos à agitação, por 48 horas. Ao fim desse período, os géis foram neutralizados por 3 minutos em solução contendo 1,2% (p/v) Tris-Base e pH 6,5 ajustado com ácido fosfórico. Posteriormente, foram lavados em solução contendo 25% (v/v) de metanol e armazenados em solução contendo 20% (p/v) sulfato de amônio.

2.6 Análise dos géis bidimensionais

Os géis corados tiveram suas imagens digitalizadas em scanner de alta resolução FLA 3000 (FujiFilm), equipado como programa Image Reader v. 1.8; 532nm e filtro O580. As análises das imagens foram feitas pelo programa ImageMaster 2D Platinum 7.0.6 (GE Healthcare). Para a detecção dos *spots*, os géis foram aliados e agrupados e, então, a determinação quantitativa dos volumes de cada *spot* foi realizada. Após esse procedimento, foram feitas as análises dos grupos, classes e teste estatístico (Teste T de Student). *Spots* com uma diferença de pelo menos 1,5X e um resultado significativo no teste T de Student ($p < 0,05$) foram considerados como um ponto de proteína diferencialmente expressa.

2.7 Obtenção de peptídeos tripsinolisados do gel

Após a corrida eletroforética, os pontos protéicos de interesse foram excisados com auxílio de lâmina de bisturi nº15 individualmente do gel, desidratados com acetoneitrila 100%, secos em *speed vac* e, posteriormente, tratados com a enzima tripsina (Promega®), a 58°C, por 30 minutos. Os peptídeos resultantes da tripsinólise da amostra foram ressuspensos em solução contendo acetoneitrila 5% com ácido fórmico 0,1% e, posteriormente, analisados por espectrometria de massa.

2.8 Espectrometria de massa

Foi utilizado um espectrômetro de massa (microTOF Q-II, Bruker Daltonik, Bremen, Alemanha), equipado com uma interface de ionização por eletrospray, e acoplado a um sistema UFLC (Shimadzu, Kyoto, Japão) composto por duas bombas, (LC-20AD) e um degaseificador (DGU-20A₃). As injeções

foram realizadas por um injetor automático (SIL-20A HT) equipado com um loop de 100 μ L, dos quais foram injetados apenas 40 μ L. O sistema foi operado através do software Hystar (Bruker Daltonik, v. 3.2.44.0). Uma pré-coluna de 5 mm e uma coluna analítica de 150 mm \times 75 μ m preenchida com fase estacionária C18, 2.7 μ m (Supelco, Bellefonte, Pennsylvania, Estados Unidos) foi utilizada para a separação dos peptídeos. As amostras foram injetadas através de um fluxo de 200 μ Lmin⁻¹ em uma solução a 5 % (v/v) acetonitrila e 0.1 % (v/v) AF em água (Fluka, Buchs, Suíça). A fase móvel (A) utilizada para separação foi um gradiente entre água, contendo 0.1% (v/v) AF LC-MS Chromasolv-Fluka e acetonitrila contendo 0.1% (v/v) AF LC-MS Chromasolv-Fluka (B). O programa utilizado para a eluição era composto pelas seguintes proporções: 0–5 min isocrático 5% B; 5–60 min gradiente linear até 40% B; 60–70 gradiente linear até 50 % B; 70–75 gradiente linear até 90%B; 75–80 min isocrático 90%B; 80–80.1 min alteração para 5% B; 80.1–90 min isocrático 5% B. O fluxo para separação dos peptídeos foi de 200 μ Lmin⁻¹. As configurações utilizadas na espectrometria de massa foram: intervalo de massa: 50–2500m/z; voltagem do spray: 2000 V; gás de secagem (N₂) temperatura: 180°C; fluxo: 9 Lmin⁻¹; funnel 1 RF 300.0 Vpp; funnel 2 RF 400.0 Vpp; Hexapolo RF 400.0 Vpp; energia do quadrupolo 5.0 eV; menor massa do quadrupolo 322.00 m/z; energia de colisão 10.0 eV; RF da colisão 800.0 Vpp; tempo de transferência 150us; armazenamento pré-pulso 5.0 us. As configurações para o MS/MS foram: número de íons precursores: 3; limite mínimo absoluto: 2 \times 10³; limite mínimo absoluto: 0.1 %; smart exclusion após 4x; active exclusion após três espectros e por 1 min; modo de busca de peptídeos ativado, estado de carga preferido 2-4. Os dados cromatográficos obtidos via LC–MS–MS foram analisados com o software Bruker Data Analysis, version 4.0 (Build 253). O espectro de MS/MS que foi obtido no intervalo de 5-30 min foi exportado como um arquivo xml, após a deconvolução do estado de carga e utilizado para busca em banco de

dados, utilizando o software Biotools Version 3.2 (Bruker Daltonik) nas seguintes condições: enzima: tripsina; modificações fixas: carbamidometilação da cisteína; modificações variáveis: oxidação da metionina; tolerância do íon precursor: 0.2 Da; foi aceita na busca uma não clivagem pela tripsina.

O perfil de massa molecular da amostra obtida por MS e MS/MS foi submetido à análise comparativa, utilizando-se o programa MASCOT (<http://www.matrixscience.com>), para a comparação das massas de peptídeos observados com bancos de dados e para a identificação das proteínas mais prováveis. Os bancos de dados utilizados nas análises foram o do Genoma Café (VIEIRA et al., 2006) e o do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

RESULTADO

Esses resultados são os primeiros que demonstram a influência significativa dos efeitos do processamento e da altitude nos perfis proteômicos dos grãos de café cv. Acaiá.

Neste trabalho realizou-se a avaliação do perfil protéico dos grãos de café sob diferentes aspectos. A primeira análise constituiu da avaliação comparativa do proteoma de grãos de café natural e desmucilados provenientes de plantas cultivadas em regiões abaixo de 1000m. Nesta análise, os géis bidimensionais foram avaliados com auxílio do programa ImageMaster v.7.0.6., o que resultou na detecção de aproximadamente 240 pontos protéicos (Figura 01). Destes, foram escolhidos os 10 pontos (n. 96, 106, 177, 221, 250, 251, 254, 262, 264, 268) com diferencial de abundância acima de 1,5X, com $p < 0,05$ pelo Teste de student.

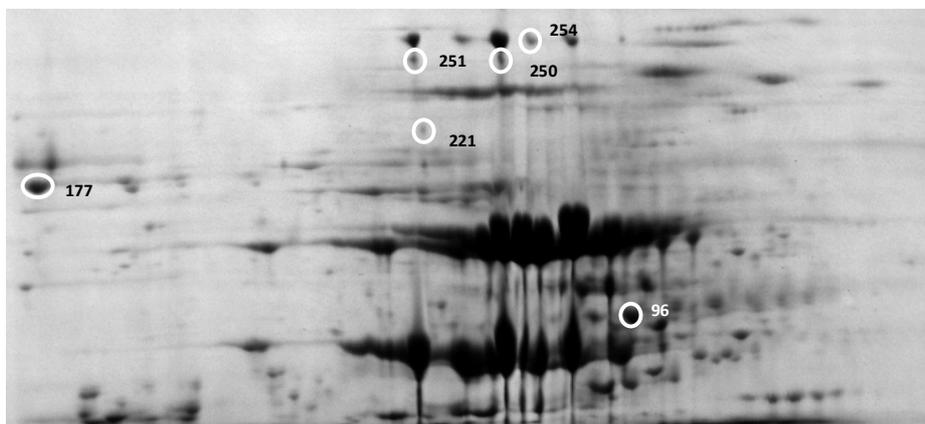


Figura 01. Gel bidimensional do perfil proteômico de grãos de café. Os círculos assinalam os pontos protéicos excisados, com diferença de abundância (>1,5X) após avaliação comparativa do proteoma de grãos de café natural e desmucilados provenientes de plantas cultivadas em regiões abaixo de 1000m.

Todos os pontos protéicos foram tripsinolizados e injetados no espectrômetro de massas e os peptídeos gerados foram comparados com o banco de dados com auxílio do programa MASCOT. As proteínas diferencialmente abundantes foram: quatro isoformas da globulina 11S, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase e deidrina DHb1 (Tabela01, Figura 02). Os demais pontos protéicos não geraram espectros suficiente para comparação nos bancos de dados.

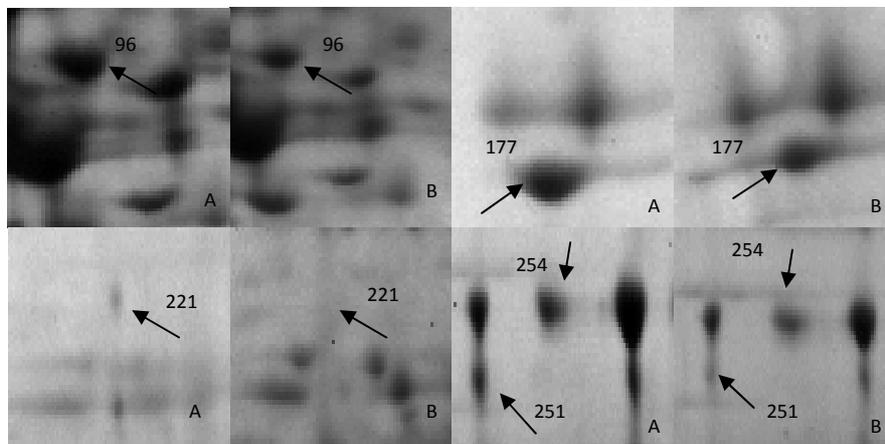


Figura 02. Detalhe dos pontos protéicos diferencialmente abundantes em grãos de café desmucilado (A) e natural (B), cultivados na região abaixo de 1000 m.

Tabela 01 Lista de proteínas diferencialmente abundantes, encontradas em grãos de *Coffea arabica* L. cv. acaia, e identificadas por análise dos peptídeos por espectrometria de massa por eletrospray.

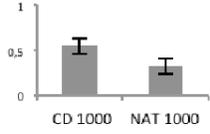
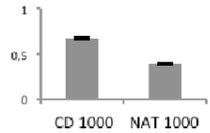
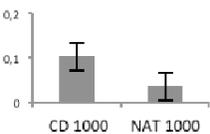
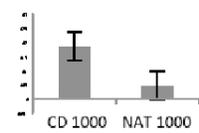
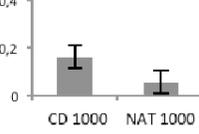
n. ^a	Volume relativo ^b	Proteína	Organismo	n. acesso	Sequências dos peptídeos	Exp/ThMr ^c
Análise 01 - Análise comparativa do perfil proteômico de café desmucilado e natural cultivados na região abaixo de 1000m.						
96		Deidrina DH1b	<i>Coffea canephora</i>	Q1A523	K.SQYDEYGNPVR.Q	1326.58/1326.58
177		Gliceraldeido-3-fosfato desidrogenase	<i>Coffea arabica</i>	J7LF18	R.SSIFDAK.A K.VLPALNGK.L R.AASFNIIPSSTGAAK.A	766.39/766.38 810.50/810.49 1433.75/1433.75
221		Proteína de reserva 11S	<i>Coffea arabica</i>	Q9ZNY2	K.TNDNAMINPLVGR.L	1429.69/1429.69

Tabela 01. Continua.

251		Proteína de reserva 11S	<i>Coffea arabica</i>	O82437	R.AIPEEVL.R.S	925.53/925.52
					K.AGNQGFYVAFK.T	1329.63/1329.63
254		Proteína de reserva 11S	<i>Coffea arabica</i>	P93079	R.AIPEEVL.R.S	925.527/925.523
					K.AGNEGFEYVAFK.T	1330.61/1330.61
					K.TNDNAMINPLVGR.L	1413.70/1413.70
					R.QEALLSEQSQQGK.R	1557.80/1557.79

Análise 02 Análise comparativa do perfil proteômico de café desmucilado e natural cultivados na região acima de 1200m.

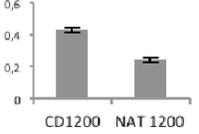
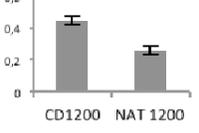
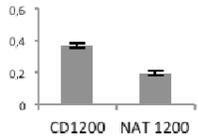
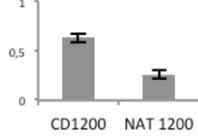
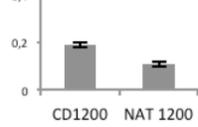
36		Deidrina DH1b	<i>Coffea canephora</i>	Q1A523	K.SQYDEYGNPVR.Q	1326.58/1326.58
42		Proteína de reserva 11S	<i>Coffea arabica</i>	Q9SAN3	K.LNAQEPSFR.F	1060.52/1060.53

Tabela 01. Continua.

73		Deidrina DH1b	<i>Coffea canephora</i>	Q1A523	K.SQYDEYGNPVR.Q	1326.58/1326.58
81		Proteína de reserva 11S	<i>Coffea arabica</i>	P93079	R.AIPEEVL.R.S K.AGNEGFEYVAFK.T K.TNDNAMINPLVGR.L	925.527/925.523 1330.61/1330.61 1429.69/1429.69
82		Fragmento da proteína <i>Heat shock</i>	<i>Coffea arabica</i>	Q9AT71	R.FRLPENAK.M	973.56/973.53

Análise 03 - Análise comparativa do perfil proteômico de café desmucilado cultivados na região abaixo de 1000m e acima de 1200 m.

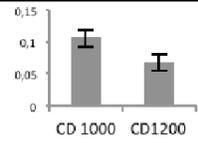
29		Proteína de reserva 11S	<i>Coffea arabica</i>	Q9SAN3	K.FFLAGNPQQGGGK.R	1060.52/1060.53
----	--	-------------------------	-----------------------	--------	-------------------	-----------------

Tabela 01. Continua.

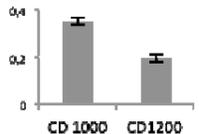
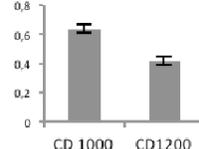
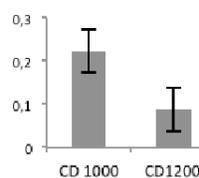
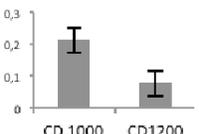
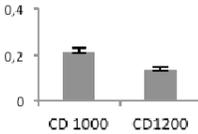
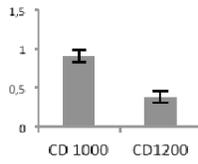
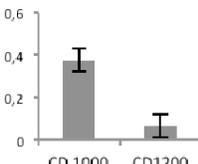
38		Proteína de reserva 11S	<i>Coffea arabica</i>	O82437	R.AIPEEVL.R.S K.AGNQGFYVAFK.T K.TNDNMINPLVGR.L R.QEALLSEQSQGK.R	925.53/925.52 1329.63/1329.63 1413.70/1413.70 1557.80/1557.79
107		Proteína de reserva 11S	<i>Coffea arabica</i>	P93079	R.AIPEEVL.R.S K.LNAQEPSFR.F R.SNGNEGFYVAFK.T K.AGNEGFYVAFK.T K.TNDNMINPLVGR.L	925.527/925.523 1060.53/106053 1349.64/1349.64 1330.61/1330.61 1429.69/1429.69
110		Proteína de reserva 11S	<i>Coffea arabica</i>	P93079	R.AIPEEVL.R.S K.AGNEGFYVAFK.T K.TNDNMINPLVGR.L R.QEALLSEQSQGK.R R.SSFQISSEAEELK.R K.LSENIGLPQEADVFR.A	925.53/925.52 1330.62/1330.61 1429.70/1429.69 1557.80/1557.79 1557.80/1557.79 1897.95/1897.95
116		Proteína de reserva 11S	<i>Coffea arabica</i>	P93079	R.AIPEEVL.R.S K.AGNEGFYVAFK.T K.TNDNMINPLVGR.L	925.53/925.52 1330.62/1330.61 1429.70/1429.69

Tabela 01. Continua.

130		Proteína hipotética	<i>Vitis vinifera</i>	gi 225424256	K.SIEVLEGDGK.S	1045.53/1045.52
135		Proteína de reserva 11S	<i>Coffea arabica</i>	O82437	K.VFDDEVK.Q R.AIPEEVL.R.S K.AGNQGFYVAFK.T K.TNDNMINPLVGR.L R.QEALLSEQSQGK.R	850.38/850.40 925.53/925.52 1329.63/1329.63 1413.70/1413.70 1557.80/1557.79
136		Proteína de reserva 11S	<i>Coffea arabica</i>	O82437	R.AIPEEVL.R.S K.AGNQGFYVAFK.T K.TNDNMINPLVGR.L R.QEALLSEQSQGK.R R.SSFQISSEAEELK.Y	925.53/925.52 1329.63/1329.63 1413.70/1413.70 1557.80/1557.79 1582.73/1582.73

a Número do ponto proteico identificado

b Grãos de café natural (NAT) e desmucilados (CD)

c Massa molecular (Mr) teórica (Th) e experimental (Exp) dos peptídeos identificados

A segunda análise comparativa dos perfis proteômicos envolveu os grãos de café natural e desmucilado provenientes de plantas cultivadas no alto da região da Serra da Mantiqueira, com altitude acima de 1200m. Após análise dos géis bidimensionais corados com Azul de Comassie G-250, foi possível visualizar aproximadamente 240 pontos protéicos entre os géis (Figura 03). Destes pontos protéicos, a avaliação comparativa realizada pelo ImageMaster revelou a presença de seis pontos (n.36, 42, 73, 77, 81, 82) diferencialmente abundantes, que foram excisados do gel e tripsinolizados.

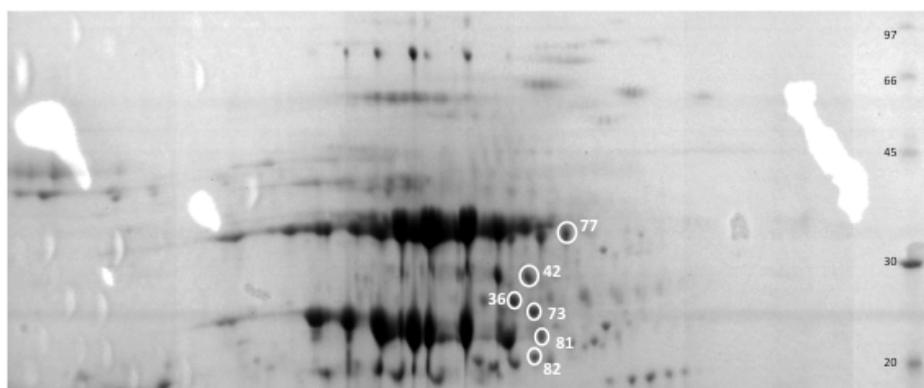


Figura 03. Gel bidimensional do perfil proteômico de grãos de café. Os círculos assinalam os pontos protéicos excisados, com diferença de abundância (>1,5X) após avaliação comparativa do proteoma de grãos de café natural e desmucilados provenientes de plantas cultivadas em regiões acima de 1200m.

Os peptídeos foram analisados por espectrometria com ionização por eletrospray (ESI-MS/MS) e geraram espectros suficientes para comparação no banco de dados. Dentre os pontos protéicos, alguns apresentaram homologia às seguintes proteínas: duas isoformas da globulina 11S, duas isoformas da proteína deidrina DHb1 e uma proteína de baixo peso molecular denominada Heat Shock (Tabela 01, Figura 04).

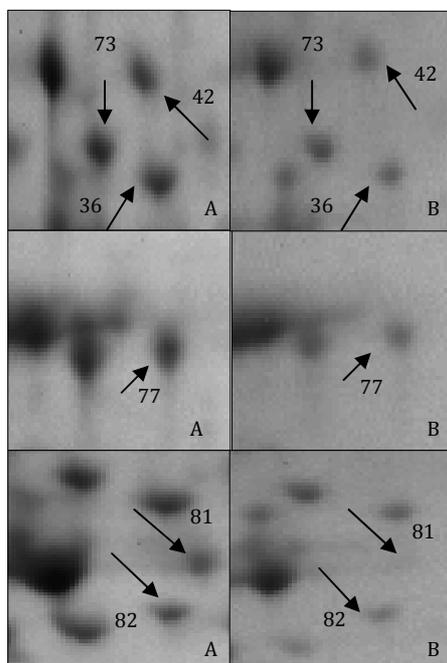


Figura 04. Detalhe dos pontos proteicos diferencialmente abundantes em grãos de café desmucilado (A) e natural (B), cultivados em região acima de 1200m.

Para melhor compreender os efeitos do local de cultivo das plantas de café, realizamos uma terceira análise comparativa do conteúdo protéico dos grãos em relação ao local de cultivo da planta de café. Nesta análise, proteínas totais foram extraídas dos grãos desmucilados provenientes de plantações cultivadas em região abaixo de 1000m e acima de 1200m. Os géis bidimensionais foram corados com Azul de Comassie G250 e sua imagens foram digitalizadas utilizando scanner de alta resolução FLA-3000. (Figura 05).

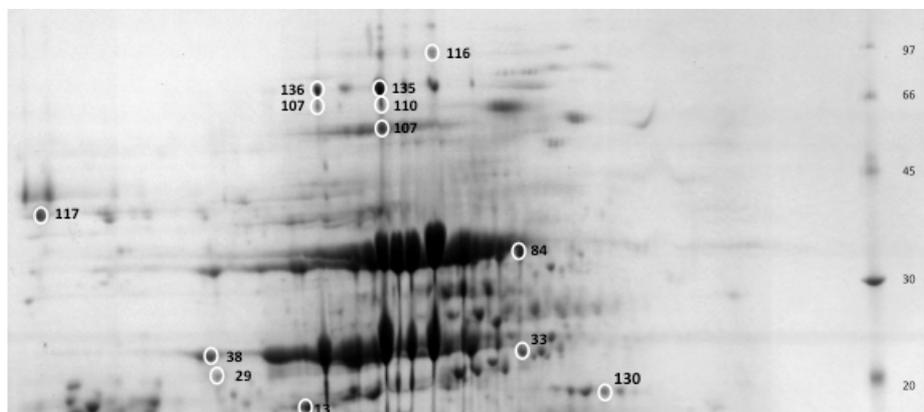


Figura 05. Figura 03. Gel bidimensional do perfil proteômico de grãos de café. Os círculos assinalam os pontos protéicos excisados, com diferença de abundância (>1,5X) após avaliação comparativa do proteoma de grãos de café desmucilados provenientes de plantas cultivadas em regiões abaixo de 1000m e acima de 1200m.

Após análise das imagens, foi possível visualizar claramente cerca de 250 pontos de proteínas, que foram avaliados estatisticamente pelo teste-T ($p < 0,05$) para a detecção diferencial de seus volumes relativos. Nestas condições foi possível identificar 18 pontos de proteínas (n.13, 29, 33, 38, 55, 57, 67, 84, 93, 107, 109, 110, 116, 117, 121, 130, 135 e 136) com expressão diferencial de 1,5X. Todos os pontos de proteínas foram excisados e digeridos com tripsina para a geração dos peptídeos que foram ionizados no espectrômetro de massas. Os espectros gerados foram comparados com os bancos de dados para busca por homologia às proteínas já descritas. Diversas proteínas foram encontradas, entre elas, sete isoformas da globulina 11S e uma proteína não caracterizadas (Tabela 01 e figura 06). Os demais pontos protéicos não apresentaram homologia com os peptídeos dos bancos de dados ou não geraram espectros suficiente para a comparação.

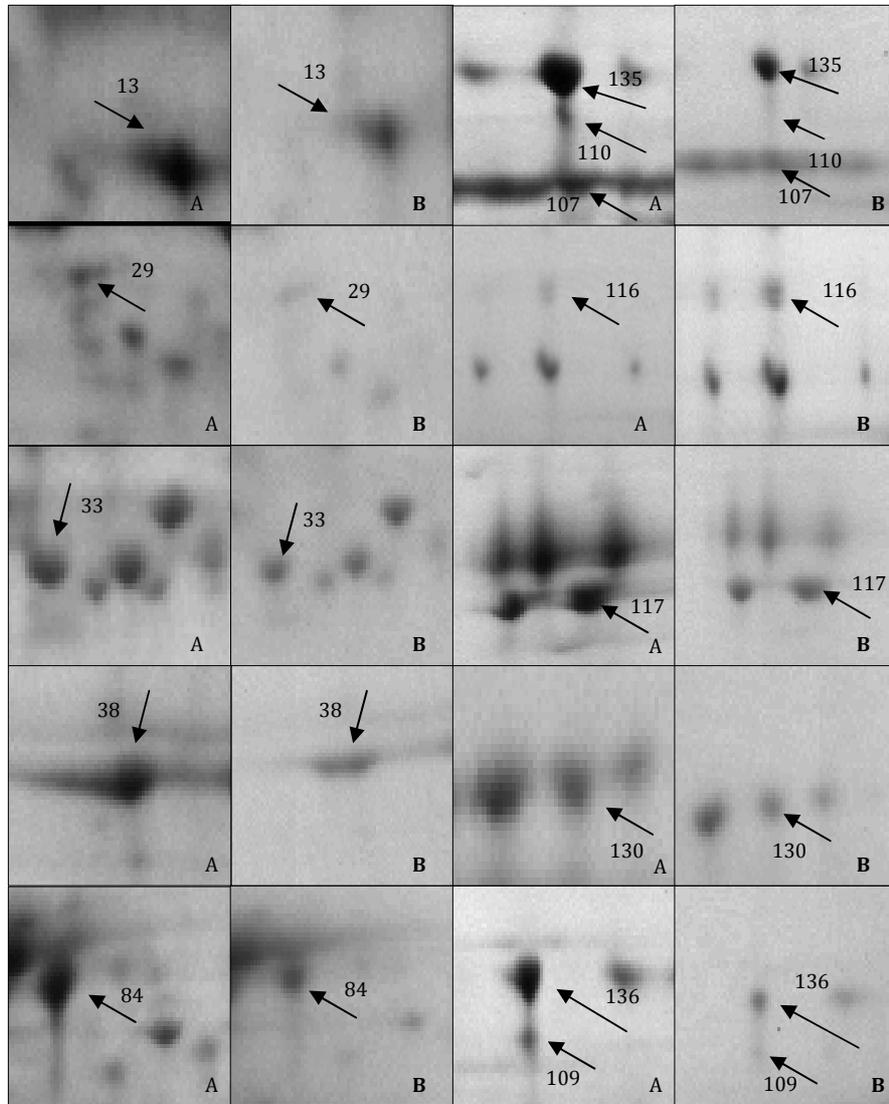


Figura 06. Detalhe dos pontos protéicos diferencialmente abundantes em grãos de café desmucilados cultivados em região abaixo de 1000 m (A) e acima de 1200m (B).

DISCUSSÃO

Neste trabalho, a primeira avaliação comparativa de proteomas foi realizada entre grãos de café natural e desmucilado provenientes de plantas cultivadas abaixo de 1000m. A proteína Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) apareceu em maiores concentrações no perfil proteômico de grãos desmucilados.

A GAPDH é uma enzima envolvida no metabolismo dos açúcares, mais especificamente na sexta etapa da glicólise, reação na qual a glicose é convertida em piruvato para seguir o metabolismo e gerar energia na forma de ATP (Nelson and Cox 2002).

Em trabalhos recentes de proteômica, a presença da GAPDH tem sido observada em maior ou menor abundância. O perfil protéico de grãos de soja submetidos à estresse salino apresentou redução de diversas enzimas glicolíticas, entre elas a GAPDH, quando comparado ao perfil protéico de grãos não tratados (Sobhanian et al. 2010).

O aumento da expressão da proteína GAPDH foi relatado em diferentes condições quando plantas são submetidas a estresses. Plântulas de milho tiveram suas raízes emergidas em solução contendo N_2 e O_2 (hipoxia) e em outra contendo apenas N_2 (Anoxia). Sob hipoxia, foi observado no perfil proteômico um aumento de enzimas fermentativas e glicolíticas, entre elas a GAPDH (Chang et al. 2000). Tratamento de videiras com herbicida flumioxazin interferiu diretamente no perfil proteômico das mesmas pelo efeito da privação de oxigênio, diminuindo drasticamente a concentração de proteínas da fotossíntese e aumentando a GAPDH, denominada como proteína anaeróbica (Castro et al. 2005).

A ocorrência de maiores concentrações da GAPDH em grãos desmucilados pode estar vinculada à diferentes estresses ocorridos durante o processamento por via úmida, o que estimula as células a produzirem mais energia para a manutenção da homeostase celular.

O endosperma é um tecido caracterizado pelo acúmulo de compostos de armazenamento em quantidades elevadas. De fato, neste estudo foi possível identificar, nas três avaliações comparativas do perfil proteômico dos grãos de café, diversas isoformas da proteína globulina 11S.

As globulinas 11S são proteínas de reserva presente em grande quantidade no endosperma dos grãos, constituindo cerca de 45% do total de proteínas (Marraccini et al. 1999). A presença desta proteína, de aproximadamente 55kDa, foi elucidada por eletroforese bidimensional onde verificou-se as subunidades (β arms – 20kDa e α arms – 32kDa). Também constataram a presença de vários peptídeos de 12 a 16 kDa, provavelmente produtos da degradação gerados pela ação de proteases. Além disso, após realizarem o alinhamento de sequências de proteínas de armazenamento com outras codificadas por dois cDNA de globulina11S em arábica, verificou-se 23 variações. As diferenças, as quais incluem-se *gap*, adição de nucleotídeos, bem como mudanças nos aminoácidos, podem explicar a presença de isoformas (Rogers et al. 1999).

A proteína de armazenamento 11S é a principal fonte de peptídeos e aminoácidos encontrados principalmente no endosperma do fruto. O acúmulo dessas proteínas ocorre ao longo do desenvolvimento do fruto com um pico de abundância na primeira metade do período de maturação do fruto, que corresponde à fase de máxima expansão do endosperma nos grãos (Rogers et al. 1999).

Estudos mostram que ocorre acúmulo de sacarose nos grãos de café no período final da maturação (Geromel 2006), e assim, em conjunto com grandes

quantidades de proteína globulina 11S, fonte de aminoácidos livres, podemos sugerir que essa condição pode ser um fator importante na geração de sabor e aroma da bebida. Uma vez que, durante a torração dos grãos de café muitos compostos gerados favorecem o sabor e aroma da bebida, e esses compostos são provenientes da Reação de Maillard, que ocorre entre os açúcares redutores e os aminoácidos livres (Reineccius 1995).

As proteínas deidrinadas foram selecionadas a partir dos géis bidimensionais dos grãos desmucilados, tanto na primeira quanto na segunda avaliação comparativa.

As deidrinadas são proteínas LEA do tipo II, altamente induzidas sob condições específicas de estresse, tais como a déficit hídrico e salinidade, conferindo uma relativa tolerância à desidratação celular e minimizando os efeitos negativos de processos oxidativos, e o seu maior acúmulo diante dessas condições tem sido muito relatado (Kosová et al. 2011; Mowla et al. 2006; Shinozaki et al. 2007).

Normalmente estas proteínas agem sinergicamente com a sacarose na formação do estado viscoso da matriz citoplasmática garantindo a estabilidade celular em organismos tolerantes a dessecação (Berjak and Pammenter 2007).

Diante destas informações, levando-se em conta a ação conjunta da sacarose e deidrinadas, podemos inferir que o elevado teor dessa proteína e a maior concentração de sacarose presente nos grãos possam contribuir para a estabilidade da membrana celular e, conseqüente, preservação dos compostos químicos precursores de sabor e aroma, tão peculiar da bebida proveniente de grãos desmucilados.

Na análise de proteomas dos grãos de café natural e desmucilado, provenientes de plantio mantidos acima de 1200m, foi observado um aumento significativo de um fragmento de baixo peso molecular da proteína *Heat Shock* (Hsps) no perfil dos grãos desmucilados.

Hsps são proteínas geralmente envolvidas em proteção, reparo e degradação de componentes danosos à célula, especialmente durante muitos estresses abióticos (Parsell and Lindquist 1994; Downs et al. 1999; Hamilton and Heckathorn 2001). Hsps são sintetizadas e acumuladas em tecidos muito desidratados e auxiliam na estabilização da configuração terciária das proteínas (Schöffl et al. 1998). Sua síntese é aumentada quando proteínas não são corretamente formadas (enovelamento incorreto) e a quantidade de ATP é limitada (Kabakov and Gabai 1997).

Um crescente número de estudos sugere que as HSPs interagem com outros mecanismos de resposta a estresses, agindo sinergicamente para prevenir danos celulares e restabelecer a homeostase celular (Wang et al. 2004).

Estudos recentes têm reportado a presença de HSPs em perfis proteômicos de diferentes espécies sob diferentes estresse. Por exemplo, géis bidimensionais revelaram cinco distintas sub-famílias de HSPs (classificadas de acordo com seu peso molecular: HSP70, HSP60, HSP90, Hsp100 e pequenas HSPs) em maiores quantidades em frutos de citros sob efeito de baixa temperatura durante a estocagem, em relação aos estocados em temperatura ambiente (Yun et al. 2012). Por outro lado, sob condições de alta temperatura, o aumento de três HSPs (HPS100, HSP70 e HSPs) foram sistematicamente observadas em diferentes trabalhos com folhas de arroz, *Carissa spinarum* e *Populus euphratica* (Lee et al. 2007; Zhang et al. 2010; Ferreira et al. 2006). Além disso, HSPs, foram observadas em maiores quantidades em frutos amadurecidos de banana após análise proteômica comparativa de frutos em duas diferentes fases fisiológicas (Toledo et al. 2012).

Em nosso trabalho, o aumento das proteínas HSPs e deidrinas em grãos desmucilados pode ser relacionada ao próprio processamento via úmida, que envolve diversas etapas e, conseqüentemente, algum tipo estresses às células dos grãos, gerando diferentes respostas fisiológicas em comparação aos grãos

naturais. Estudos posteriores devem ser realizados a fim de se determinar o quanto a ação dessa proteínas podem afetar fisiologicamente os grãos e alterar o sabor e aroma da bebida de café.

CONCLUSÃO

Os resultados evidenciaram, pela primeira vez no café, que as condições ambientais das diferentes altitudes estudadas tiveram um impacto significativo para diferentes proteínas durante o desenvolvimento dos grãos e processamento, alterando substancialmente sua presença no perfil protéico dos grãos.

Este trabalho abre caminho para uma análise geral do sistema abrangente da qualidade de bebida do café. A integração dos dados gerados com transcriptômica, metabolômica e outros de grande escala "-ômicas" pode abrir novos caminhos no sentido de entender as alterações sofridas dentro dos grãos antes, durante e depois da colheita. E assim, evitar manejos indesejáveis que possam prejudicar a produtividade e a qualidade dos grãos.

Além disso, os resultados gerados servirão de base para estudos posteriores a respeito do metabolismo do café diante das alterações climáticas. Uma vez que, o estudo da genômica funcional pode fornecer uma percepção fundamental para relacionar organismo e suas respostas ao estresse. E a abordagem proteoma mostrou-se ser uma ferramenta muito poderosa para estudar os padrões de proteínas que resultam da expressão diferencial de genes.

REFERÊNCIAS

- Avelino J, Barboza B, Araya JC et al (2005) Effects of slope exposure, altitude and yield on coffee quality in two altitude terroirs of Costa Rica, Orosi and Santa Maria de Dota. *J Sci Food Agric* 85:1869–1876.
- Baker PS, Hagggar J. (2007) Global Warming: the impact on global coffee. SCAAconference handout. Long Beach, USA.
- Berjak P, Pammenter NW (2007) From *Avicennia* to *Zizania*: Seed Recalcitrance in Perspective. *Ann Bot* 101:213-228.
- Borém FM. (2008) Processamento do café. In: BORÉM, F. M. (Ed.). Pós-colheita do café. UFLA, Lavras, pp. 127-158.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding. *Analytical Biochem* 72: 248-254.
- Bytof G, Knopp SE, Kramer D et al (2007) Transient occurrence of Seed Germination Processes during Coffee Post-harvest Treatment. *Ann. Bot.*100:61-66.
- Camargo, AP (1985) O clima e a cafeicultura no Brasil. *Informe Agropecuário* 11:13-26.
- Castro AJ, Carapito C, Zorn N et al (2005) Proteomic analysis of grapevine (*Vitis vinifera* L.) tissues subjected to herbicide stress. *J Exp Bot* 56: 2783–95.
- Chang WWP, Huang L, Shen M et al (2000) Patterns of protein synthesis and tolerance to anoxia in root tips of maize seedlings acclimated to a low-oxygen environment, and identification of proteins by mass spectrometry. *Plant Physiol* 122:295–317.
- DaMatta FM (2004) Exploring drought tolerance in coffee: a physiological

- approach with some insights for plant breeding. *Braz J Plant Physiol* 16:1-6.
- Davis AP, Gole TW, Baena S, Moat J. (2012) The impact of climate change on indigenous Arabica coffee (*Coffea arabica*): predicting future trends and identifying priorities. *PLoS One* 7: e47981.
- Decazy F, Avelino J, Guyot B et al (2003) Quality of different Honduras coffee in relation to several environments. *J Food Sci* 68: 2356-2361.
- Downs CA, Ryan SL, Heckathorn ESA (1999) The chloroplast small heat-shock protein: evidence for a general role in protecting photosystem II against oxidative stress and photoinhibition. *J Plant Physiol* 155:488–496.
- Ferreira S, Hjernø K, Larsen M et al (2006) Proteome profiling of *Populus euphratica* Oliv. upon heat stress. *Ann Bot* 98:61–77.
- Geromel C, Ferreira LP, Guerreiro SMC et al (2006) Biochemical and genomic analysis of sucrose metabolism during coffee (*Coffea arabica*) fruit development. *J Exp Bot* 57: 3243-3258.
- Gallardo K, LeSignor C, Vandekerckhove J et al (2003) Proteomics of *Medicago truncatula* seed development establishes the time frame of diverse metabolic processes related to reserve accumulation. *Plant Physiol.* 133:664-682.
- Guyot B, Gueule D, Manez JC et al (1996) Influence de l'altitude et de l'ombrage sur la qualité des cafés Arabica. *Plantations, Recherche, Développement* 3:272–280.
- Haggar J, Schepp, K. (2011) Coffee and climate change. Desk study: impacts of climate change in four pilot countries of the coffee and climate initiative. Hamburg: Coffee and Climate.
- Hamilton EW, Heckathorn SA (2001) Mitochondrial adaptations to NaCl stress: Complex I is protected by anti-oxidants and small heat shock proteins,

- whereas Complex II is protected by proline and betaine. *Plant Physiol* 126:1266–1274.
- International Coffee Organization - IOC (2013) Coffee in China
<http://dev.ico.org/documents/cy2012-13/icc-111-8e-study-china.pdf>.
Accessed 03 de fevereiro de 2014.
- IPCC (2007) Summary for policymakers. In *Climate Change 2007*, published for the Intergovernmental Panel on Climate Change. Cambridge: Cambridge University Press.
- Joët T, Laffargue A, Descroix F et al (2010) Influence of environmental factors, wet processing and their interactions on the biochemical composition of green Arabica coffee beans. *Food Chem* 118:693-701.
- Kabakov AEE, Gabai VL (1997) *Heat Shock Proteins and Cryoprotection: ATP-Deprived Mammalian Cells*. Springer, New York.
- Kosová K, Vítámvása P, Práeila TI, Renautb J (2011) Plant proteome changes under abiotic stress — Contribution of proteomics studies to understanding plant stress response. *J Proteomics* 74:1301–1322.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
- Lee DG, Ahsan N, Lee SH et al (2007) A proteomic approach in analyzing heat-responsive proteins in rice leaves. *Proteomics* 7:3369–3383.
- Marraccini P, Deshayes A, Petiard V, Rogers WJ (1999) Molecular cloning of the complete 11S seed storage protein gene of *Coffea arabica* and promoter analysis in transgenic tobacco plants. *Plant Physiol Biochem* 37:273-282.
- Mowla S.B, Cuypers A, Driscoll S.P et al (2006) Yeast complementation reveals a role for an *Arabidopsis thaliana* late embryogenesis abundant (LEA)-like protein in oxidative stress tolerance. *Plant J* 48:743–756.

- Nelson DL, Cox MM, (2011) *Lehninger: Princípios de Bioquímica*. 5º Ed. Sarvier: São Paulo.
- Parsell DA, Lindquist, S. (1994) Heat shock proteins and stress tolerance. In R. Morimoto, A. Tissieres, and C. Georgopoulos [eds.], *The biology of heat shock proteins and molecular chaperones*, 457–494. Cold Spring Harbor Press, New York.
- Reineccius GA (1995) The maillard reaction and coffee flavor. In: COLLOQUIUM, 16., 1995, Kyoto. Proceedings... Paris: ASIC, pp 249-257.
- Rogers WJ, Bézard G, Deshayes A et al (1999) Biochemical and molecular characterization and expression of the 11S-type storage protein from *Coffea arabica* endosperm. *Plant Physiol Biochem* 37:261-272.
- Schöffl F, Prändl RE, Reindl A (1998) Regulation of the heatshock response. *Plant Physiol* 117:1135–1141.
- Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2007) Gene networks involved in drought stress response and tolerance. *J Exp Bot* 58: 221-227.
- Sobhanian H, Razavizadeh R, Nanjo Y et al (2010) Proteome analysis of soybean leaves, hypocotyls and roots under salt stress. *Proteome Sci* 8:19.
- Toledo TT, Nogueira SB, Cordenunsi BR et al (2012) Proteomic analysis of banana fruit reveals proteins that are differentially accumulated during ripening. *Postharvest Biol Technol* 70: 51-58.
- Vaast P, Bertrand B, Perriot JP et al (2006) Fruit thinning and shade influence bean characteristics and beverage quality of *C. arabica* in optimal conditions. *J Sci Food Agric* 86:197 – 204.

- Vieira LGE, Andrade AC, Colombo C et al (2006) Brazilian coffee genome project: an EST-based genomic resource. *Braz J Plant Physiol* 18:95-108.
- Wang W, Vinocur B, Shoseyov O, Altman A (2004) Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. *TRENDS Plant Sci* 9:244-252.
- Yun ZE, Jin S, Ding Y, Wang Z et al (2012) Comparative transcriptomics and proteomics analysis of citrus fruit, to improve understanding of the effect of low temperature on maintaining fruit quality during lengthy post-harvest storage. *J Exp Bot* 63:2873-2893.
- Zhang MH, Li GW, Huang W et al (2010) Proteomic study of *Carissa spinarum* in response to combined heat and drought stress. *Proteomics* 10:3117-3129.