



INGRID GOMES RENOLDI HEIMBECK

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIAS
PARA A IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS E
METABÓLITOS DURANTE O
DESENVOLVIMENTO DE FRUTOS DE CAFÉ
(*Coffea arabica* L.)**

LAVRAS - MG

2011

INGRID GOMES RENOLDI HEIMBECK

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIAS PARA A
IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS E METABÓLITOS DURANTE O
DESENVOLVIMENTO DE FRUTOS DE CAFÉ
(*Coffea arabica* L.)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal, área de concentração em Biotecnologia Vegetal, para obtenção do título de Mestre.

Orientador
Dr. Alan Carvalho Andrade

Coorientador
Dr^a. Maura Vianna Prates

LAVRAS-MG

2011

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca da UFLA**

Heimbeck, Ingrid Gomes Renoldi.

Desenvolvimento de metodologias para identificação de proteínas e metabólitos durante o desenvolvimento de frutos de café (*Coffea arabica L.*) / Ingrid Gomes Renoldi Heimbeck. – Lavras: UFLA, 2011.

110 p.: il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2011.

Orientador: Alan Carvalho Andrade.

Bibliografia.

1. Arbutina. 2. Composição bioquímica. 3. Cromatografia líquida. 4. Espectrometria de massa. 5. Proteômica. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 581.19245

INGRID GOMES RENOLDI HEIMBECK

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIAS PARA A
IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS E METABÓLITOS DURANTE O
DESENVOLVIMENTO DE FRUTOS DE CAFÉ
(*Coffea arabica* L.)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal, área de concentração em Biotecnologia Vegetal para a obtenção do título de Mestre.

Aprovada em 24 de Fevereiro de 2011.

PhD. Luciano Vilela Paiva

UFLA

Dra. Vânia Aparecida Silva

EPAMIG

Dr. Alan Carvalho Andrade
Orientador

LAVRAS - MG

2011

Dedico

A todos aqueles que
tornaram possível este sonho.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela força.

Aos meus pais, Lúcia e Rodolfo, pelo carinho, apoio e compreensão.

Aos meus irmãos por me proporcionarem momentos de descontração.

Aos meus tios, primos, padrinhos pelo carinho.

A toda equipe do LGM e Agroenergia: Lú, Lipe, Mari, Ada, Eder, Naty, Bárbara, Rebecca, André, Maria e Marry. Com vocês aprendi o verdadeiro sentido da frase “trabalho em equipe”.

Quero agradecer a todos do LEM: Carol, Kelliane, Mari Quesado, Daniel, Bia, Karlinha, Saulo, Eduardo e ao Jorge Taquita e Nathy M., em especial.

A todos do laboratório LCBM: Lílian, Kalyinka, Letícia, Douglas e Fabrício, em especial.

Ao Felipe Vinecky e a Luciana por terem me acompanhado nas etapas finais do meu trabalho, obrigada por toda dedicação e carinho.

Gostaria de agradecer ao Doutor Guilherme Brand pelos ensinamentos, por toda dúvida esclarecida e pelos momentos de descontração, muito obrigada!

Ao Dr. Luciano Paulino Silva por toda atenção e boa vontade em tirar as minhas dúvidas.

Ao Dr. Pierre Marraccinni, por ser a melhor companhia para fazer coletas no campo, por todos os ensinamentos, paciência e boa vontade.

Ao Dr. Carlos Bloch Júnior por toda sua experiência e genialidade, por todos os ensinamentos que levarei sempre comigo.

A minha queridíssima coorientadora, Maura Vianna Prates, por todo seu conhecimento, paciência, ensinamentos e conselhos.

Ao meu orientador Alan Carvalho Andrade, por ser sempre criativo, pelos conselhos, pela oportunidade, por todo ensinamento, boa vontade e momentos de descontração.

A todos que em algum momento me deram um lar: Mel-Lipe-Vasco, Michelle e família, Mari-Glaucia-Pita-Magda, Silvia e Geraldo, muitíssimo obrigada!

A república K-zona por terem se tornados a nossa segunda família em Lavras.

A cidade de Lavras que me recebeu tão bem.

A Cida por ter sido uma mãe nesses dois anos de mestrado.

Aos amigos de graduação sempre presentes na minha vida.

Aos amigos de mestrado.

Aos amigos mais que especiais que o mestrado me presenteou: Nádia e Romário.

Aos membros da banca examinadora, Dr. Luciano Paiva e Dra. Vania Aparecida Silva, por terem aceitado gentilmente participar da minha defesa.

A todos os professores do mestrado por todo conhecimento agregado.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal, da Universidade Federal de Lavras por me aceitar em seu corpo discente.

Agradeço também ao Consórcio Pesquisa Embrapa Café pela concessão da bolsa e a Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia pela infraestrutura disponibilizada e à FINEP pelo apoio financeiro ao projeto.

Em especial, ao Gabriel Alves por ter sido companheiro, amigo, namorado, pai-mãe-irmão, pelos conselhos, pela paciência inabalável, carinho, boa vontade, atenção, dedicação, por todas as horas de artigos discutidos, por sempre formatar as minhas apresentações e por ter me dado forças quando eu achava que não conseguiria mais, pelo carinho, boa vontade, os meus sinceros agradecimentos.

“Um homem precisa viajar. Por sua conta, não por meio de histórias, imagens, livros ou TV. Precisa viajar por si, com seus olhos e pés, para entender o que é seu. Para um dia plantar as suas próprias árvores e dar-lhes valor. Conhecer o frio para desfrutar o calor. E o oposto. Sentir a distância e o desabrigo para estar bem sob o próprio teto. Um homem precisa viajar para lugares que não conhece para quebrar essa arrogância que nos faz ver o mundo como o imaginamos, e não simplesmente como é ou pode ser. Que nos faz professores e doutores do que não vimos, quando deveríamos ser alunos, e simplesmente ir ver”.

(Amyr Klink)

RESUMO

O café é uma das bebidas mais consumidas e um dos principais produtos agrícolas comercializado mundialmente. A espécie *Coffea arabica* L. produz grãos cuja bebida é reconhecida como de melhor qualidade, pois se constitui bioquimicamente de elevadas concentrações de carboidratos, lipídeos e trigonelina. A bebida possui também muitos compostos fenólicos que são metabólitos secundários importantes para a qualidade final da bebida. Eles conferem ao café potentes efeitos biológicos, incluindo atividades antioxidantes. O desenvolvimento do fruto é caracterizado pela evolução dos tecidos embrionários e alterações bioquímicas, ilustrando a importância do seu estudo para melhor compreender as características finais dos grãos. O objetivo deste trabalho foi desenvolver uma nova metodologia eficaz na identificação do perfil proteico de frutos de café *C. arabica* L.var. Iapar-59 em diferentes estágios de maturação e na identificação do composto fenólico arbutina em dois tecidos embrionários diferentes (pericarpo e endosperma). A metodologia utilizada para determinar o perfil proteico baseou-se na estratégia proteômica do tipo “*bottom-up*” com digestão proteica, seguida de análises por cromatografia líquida em fase reversa (*online* e *offline*) e análises por espectrometria de massa. A interface *offline* permitiu o assinalamento da estrutura primária completa dos peptídeos de vinte e sete íons que foram identificados por meio de sequenciamento “*de novo*” após a obtenção dos espectros de MS/MS. Foram identificadas doze proteínas distintas, dentre elas destacam-se a globulina 11 S e uma dehidrina. Já os resultados obtidos com a interface *online* permitiu o assinalamento da estrutura primária de trinta e quatro íons que foram identificados por meio de análises computacionais realizadas pelo programa “ProteinLynx” (versão 2.0) da Waters/Micromass. Neste caso, foi possível identificar peptídeos correspondentes a trinta e três proteínas distintas. O método utilizado para a detecção do metabólito fenólico arbutina, em frutos de café, foi com base em análises clássicas de cromatografia líquida de alta eficiência, usando como referência um padrão comercial. Os resultados obtidos com esta análise nos permitiram concluir que não foi possível detectar esse metabólito em grãos de café, nas condições metodológicas utilizadas.

Palavras-chave: Arbutina. *Coffea arabica*. Composição bioquímica. Cromatografia Líquida. Espectrometria de massa. Proteômica.

ABSTRACT

Coffee is one of the most widely consumed beverages and most traded agricultural products worldwide. The *Coffea arabica* L. species provides beans which the beverage is recognized for its best quality because of its biochemical composition with high concentrations of carbohydrates, lipids and trigonelline. The beverage has many phenolic compounds which are secondary metabolites also important for the final beverage quality gives the coffee potent biological effects, including antioxidant activities. The coffee fruit development is characterized by biochemical changes associated with the involving embryonic tissues, illustrating the importance of its study to a better understand of the final characteristics of the beans. The objective of this study was to develop a new effective methodology to identify the protein profile of coffee fruits *C. arabica* L. var. Iapar-59 at different stages of maturation and the detection of the phenolic compound arbutin in two different embryonic tissues (pericarp and endosperm). The methodology used to determine the protein profile was based on the proteomic strategy called bottom-up with protein digestion followed by reversed-phase liquid chromatography (*online* and *offline*) and mass spectrometry analysis. The *offline* interface allowed the assignment of the complete primary structure of peptides from twenty-seven ions that were identified by *de novo* sequencing after obtaining the spectra of MS/MS. We identified twelve different proteins, among those the 11 S globulin and a dehydrin. In the other hand, the results obtained with the online interface has allowed the assignment of the primary structure of thirty-four ions that were identified by computational analysis performed by the program "ProteinLynx" (version 2.0) Waters / Micromass. In this case, it was possible to identify peptides corresponding to twenty- three different proteins. The method used for the detection of the phenolic metabolite arbutin in coffee fruits was based on classical analysis of high-performance liquid chromatography, using as reference a commercial standard. With the results obtained on this analysis we concluded that it was not possible to detect this metabolite in coffee beans, upon the used methodology.

Keywords: Arbutin. *Coffea arabica*.L. Biochemical composition. Liquid Chromatography. Mass spectrometry. Proteomics.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1. Principais regiões produtoras de café-Safra 2010, participação percentual por U.F (CONAB, 2010).25
- Figura 2. Corte longitudinal do fruto do café (AVALLONE, 2000).27
- Figura 3. Evolução dos tecidos durante o desenvolvimento e maturação do fruto de café. e: endosperma; ps: perisperma; pc: pericarpo.28
- Figura 4. Esquema básico de um equipamento para Cromatografia Líquida de Alta eficiência- CLAE.38
- Figura 5. Campo experimental da Embrapa Cerrados (Planaltina-DF, Brasil)....47
- Figura 6. Frutos de *Coffea arabica* L. (variedade IAPAR 59) coletados em diferentes estágios de desenvolvimento fenológico dos frutos.48
- Figura 7. Estrutura do fruto de *Coffea arabica* L. em corte transversal: Corte in vivo mostrando a formação dos tecidos: (A) primeiras fases do desenvolvimento (60-90 dias após florescimento- DAF); (B) fases finais (120-150 DAF) do desenvolvimento do fruto de café; (C) Representação esquemática: centro de corte (1); endosperma (2); película prateada (3); pergaminho (casca, endocarpo) (4); camada de pectina (5); polpa (mesocarpo) (6) e camada externa (pericarpo, epicarpo) (7).48
- Figura 8. Fracionamento do extrato protéico de grão verde (150 DAF) de *Coffea arabica* L. por cromatografia líquida de alta eficiência em modo de fase reversa utilizando uma coluna Vydac C4 e um gradiente de 5% de AcN-TFA 0,1% a 95% de AcN-TFA 0,1%.58
- Figura 9. Fracionamento do extrato protéico de grão maduro (210 DAF) de *Coffea arabica* L. por cromatografia líquida de alta eficiência em modo de fase reversa utilizando uma coluna Vydac C4 e um gradiente de 5% de AcN-TFA 0,1% a 95% de AcN-TFA 0,1%.58

Figura 10. Fracionamento do extrato protéico de grão seco (237 DAF) de <i>Coffea arabica</i> L. por cromatografia líquida de alta eficiência em modo de fase reversa utilizando uma coluna Vydac C4 e um gradiente de 5% de AcN-TFA 0,1% a 95% de AcN-TFA 0,1%.....	59
Figura 11. Cromatograma da Fração 1, obtida no fracionamento prévio com uma coluna C4, dos extratos protéicos tripsinados de grão maduro (210 DAF) de café, por cromatografia líquida de alta eficiência em modo de fase reversa utilizando uma coluna XR-ODS C18.	60
Figura 12. Cromatograma da Fração 2, obtida no fracionamento prévio com uma coluna C4, dos extratos protéicos tripsinados de grão maduro de café (210 DAF), por cromatografia líquida de alta eficiência em modo de fase reversa utilizando uma coluna XR-ODS C18.	60
Figura 13. Cromatograma da Fração 3, obtida no fracionamento prévio com uma coluna C ₄ , dos extratos protéicos tripsinados de grão maduro de café, por cromatografia líquida de alta eficiência em modo de fase reversa utilizando uma coluna XR-ODS C ₁₈	61
Figura 14. Espectro de massa obtido em modo MS para a fração 10 F 2 do grão maduro. O espectro apresenta a massa monoisotópica [M+H] ⁺ de cada íon dos componentes moleculares.	62
Figura 15. Padrão de fragmentação peptídica do íon precursor [M+H] ⁺ = 1041.00 Da. As séries y e b foram assinaladas e permitiram a anotação da estrutura primária do peptídeo. Similaridade com xyloglycan endo-transglycosylase, após análises por TBLASTn.	64
Figura 16. Padrão de fragmentação peptídica do íon precursor [M+H] ⁺ = 1061.80 Da. As séries y e b foram assinaladas e permitiram a anotação da estrutura primária do peptídeo. Similaridade com globulina 11 S, após análises por TBLASTn.....	64

- Figura 17. Padrão de fragmentação peptídica do íon precursor $[M+H]^+ = 1150.00$ Da. As séries y e b foram assinaladas e permitiram a anotação da estrutura primária do peptídeo. Similaridade com uma dehidrina. 65
- Figura 18. Fracionamento do extrato protéico de grão verde (150 DAF) de *Coffea arabica* por cromatografia líquida de alta performance, em modo de fase reversa, utilizando uma coluna capilar (NanoAcquity,UPLC-Waters,USA) em um gradiente de 3% -85% B. 70
- Figura 19. Fracionamento do extrato protéico do grão com 180 DAF, de *Coffea arabica* L. por cromatografia líquida de alta performance, em modo de fase reversa, utilizando uma coluna capilar (NanoAcquity,UPLC-Waters,USA) em um gradiente de 3% -85% B. 70
- Figura 20. Fracionamento do extrato protéico de grão verde (210 DAF) de *Coffea arabica* L. por cromatografia líquida de alta performance, em modo de fase reversa, utilizando uma coluna capilar (NanoAcquity,UPLC-Waters,USA) em um gradiente de 3% -85% B. 71
- Figura 21. Fracionamento do extrato protéico de grão seco (237 DAF) de *Coffea arabica* L. por cromatografia líquida de alta eficiência em modo de fase reversa utilizando uma coluna capilar (NanoAcquity,UPLC-Waters, USA) em um gradiente de 3-85% B. 72
- Figura 22. Fracionamento do extrato fenólico do pericarpo (22. A-B) e endosperma (22. C-D), respectivamente, da amostra 150 DAF de *C. arabica* L. var. I59 por UFLC em fase reversa utilizando uma coluna analítica de fase reversa C18 (Shimpack XR-ODS 2.0 mm i.d. x 30 mm) em um gradiente de eluição de 2-80% B (AcN + TFA 0,1%-FMB). A,C) Os cromatogramas A e C representam a eluição do extrato fenólico bruto comparado com a eluição da arbutina comercial (pico em vermelho). B, D) Os cromatogramas B e D representam a eluição

do extrato fenólico contendo a arbutina comercial comparado com a eluição da arbutina comercial (pico em vermelho).81

Figura 23. Fracionamento do extrato fenólico do pericarpo (23.A-B) e endosperma (23.C-D), respectivamente, da amostra 210 DAF, de *C. arabica* L. var. I59 por UFLC em fase reversa utilizando uma coluna analítica de fase reversa C18 (Shimpack XR-ODS 2.0 mm i.d. x 30 mm) em um gradiente de eluição de 2-80% B (AcN + TFA 0,1%-FMB). A,C) Os cromatogramas A e C representam a eluição do extrato fenólico bruto comparado com a eluição da arbutina comercial (pico em vermelho). B, D) Os cromatogramas B e D representam a eluição do extrato fenólico contendo a arbutina comercial comparado com a eluição da arbutina comercial (pico em vermelho).82

Figura 24. Fracionamento do extrato fenólico do endosperma 237 DAF de *Coffea arabica* L var. I59 por UFLC em fase reversa utilizando uma coluna analítica de fase reversa C18 (Shimpack XR-ODS 2.0 mm i.d. x 30 mm) em um gradiente de eluição de 2-80% B (AcN + TFA 0,1%-FMB). A) O cromatograma A representa a eluição do extrato fenólico bruto comparado com a eluição da arbutina comercial (pico em vermelho). B) O cromatograma B representa a eluição do extrato fenólico contendo a arbutina comercial comparado com a eluição da arbutina comercial (pico em vermelho).....83

Tabela 1. Principais diferenças entre as espécies *Coffea arabica* L. (Arábica) e *Coffea canephora* P. (Robusta) (Alzugaray e Alzugaray 1984).....23

Tabela 2. Correlação dos peptídeos encontrados nos diferentes estágios de desenvolvimento da maturação dos grãos com a sua identificação *in silico* utilizando o banco genômico do café (CENARGEN, Brasília-DF) como referência.....67

- Tabela 3. Resultados obtidos das análises realizadas com o software “Protein Lynx”, a partir dos dados coletados por espectrometria de massa das amostras de peptídeos trípticos de endosperma de frutos de café aos 150, 180, 210 e 237 DAF. Reprodutibilidade na triplicata (Rep), a identificação do “Hit” na base de dados (ID), massa molecular (mW), ponto isoelétrico (pI), “Protein Lynx Global Server” (PLGS score), nº de peptídeos identificados conforme o íon precursor, peptídeos teóricos (*in silico*).....73
- Tabela 4. Correlação dos peptídeos encontrados nas análises realizadas com o “Protein Lynx”, nas amostras de frutos de café em diferentes estágios de desenvolvimento com a Base de Dados CAFEst (CENARGEN, Brasília-DF), como referência..... 76
- Tabela 5. Resultados obtidos das análises realizadas com o software “Protein Lynx”, a partir dos dados coletados por espectrometria de massa da amostra de peptídeos trípticos de endosperma do fruto de café (150 DAF). A tabela mostra o número de identificação do “Hit” na base de dados (ID), massa molecular (mW), ponto isoelétrico (pI), “Protein Lynx Global Server” (PLGS score), nº de peptídeos identificados conforme o íon precursor (Pep), peptídeos teóricos *in silico* (Pep Teor.), cobertura (cov.), quantificação em fmol e ngmol e similaridade das proteínas..... 102
- Tabela 6: Resultados obtidos das análises realizadas com o software “Protein Lynx”, a partir dos dados coletados por espectrometria de massa da amostra de peptídeos trípticos de endosperma do fruto de café (180 DAF). A tabela mostra o número de identificação do “Hit” na base de dados (ID), massa molecular (mW), ponto isoelétrico (pI), “Protein Lynx Global Server” (PLGS score), nº de peptídeos identificados conforme o íon precursor (Pep), peptídeos teóricos *in silico* (Pep

Teor.), cobertura (cov.), quantificação em fmol e ngmol e similaridade das proteínas. 103

Tabela 7: Resultados obtidos das análises realizadas com o software “Protein Lynx”, a partir dos dados coletados por espectrometria de massa da amostra de peptídeos trípticos de endosperma do fruto de café (210 DAF). A tabela mostra o número de identificação do “Hit” na base de dados (ID), massa molecular (mW), ponto isoelétrico (pI), “Protein Lynx Global Server” (PLGS score), nº de peptídeos identificados conforme o íon precursor (Pep), peptídeos teóricos *in silico* (Pep Teor.), cobertura (cov.), quantificação em fmol e ngmol e similaridade das proteínas. 107

Tabela 8: Resultados obtidos das análises realizadas com o software “Protein Lynx”, a partir dos dados coletados por espectrometria de massa da amostra de peptídeos trípticos de endosperma do fruto de café (237 DAF). A tabela mostra o número de identificação do “Hit” na base de dados (ID), massa molecular (mW), ponto isoelétrico (pI), “Protein Lynx Global Server” (PLGS score), nº de peptídeos identificados conforme o íon precursor (Pep), peptídeos teóricos *in silico* (Pep Teor.), cobertura (cov.), quantificação em fmol e ngmol e similaridade das proteínas. 109

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	18
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	21
2.1 A história do café	21
2.2 Classificação botânica.....	21
2.3 Espécie <i>Coffea arabica</i> L.....	22
2.4 Importância sócioeconômica.....	23
2.5 Aspectos fenológicos do cafeeiro	25
2.6 Composição bioquímica do fruto de café.....	26
2.7 Metabólitos secundários	30
2.7.1 Arbutina.....	31
2.8 Proteômica	32
2.8.1 Preparo da amostra	34
2.8.2 Separação proteômica por Cromatografia Líquida.....	36
2.8.3 Identificação de proteínas por espectrometria de massas	39
2.8.4 Análises <i>in silico</i>	43
2.9 Trabalhos proteômicos em frutos de cafeeiro	44
3 OBJETIVOS.....	46
3.1 Objetivo geral	46
3.2 Objetivos específicos	46
4 MATERIAL E MÉTODO.....	47
4.1 Material biológico	47
4.2. Dissecção dos tecidos embrionários.....	48
4.3 Detecção e identificação de proteínas por cromatografia líquida de alta eficiência (<i>offline</i>) e espectrometria de massa (MALDI- TOF).....	49
4.3.1 Extração das proteínas totais de frutos de café.....	49
4.3.2 Quantificação das proteínas.....	51
4.3.3 Fracionamento das proteínas totais.....	52
4.3.4 Espectrometria de massa - MS-MS/MS	52
4.3.5 Identificação das proteínas (TBLASTn)	53
4.4 Detecção e identificação de proteínas com cromatografia líquida (<i>online</i>) acoplada à espectrometria de massa.	53
4.4.1 Extração protéica em solução ácida e precipitação por sulfato de amônio.....	53
4.4.2 Fracionamento das proteínas totais.....	54
4.4.3 Espectrometria de massa com ionização por <i>eletrospray</i>	54
4.4.4 Identificação das proteínas.....	55
4.5 Detecção do composto fenólico arbutina em frutos de café.....	55
4.5.1 Extração de composto fenólico arbutina.....	55
4.5.2 Fracionamento do extrato de metabólitos.....	56

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
5.1 Detecção e identificação de proteínas por cromatografia líquida de alta eficiência (<i>offline</i>) e espectrometria de massa (MALDI-TOF)	57
5.2 Detecção e identificação de proteínas por cromatografia líquida (<i>online</i>) acoplada à espectrometria de massa.	69
5.3 Comparação entre os métodos utilizados para a identificação de proteínas	78
5.4 Detecção do composto fenólico arbutina em frutos de café	80
6 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	85
REFERÊNCIAS	87
ANEXO A	101
APÊNDICE A	102

1 INTRODUÇÃO

O café além de ser uma das bebidas mais consumidas é um dos principais produtos agrícolas comercializado mundialmente, sendo considerado o segundo item em importância do comércio internacional de *commodities* (CONAB, 2009). O gênero *Coffea* pertence à família Rubiaceae é oriundo de regiões da África, que compreendem o sudoeste da Etiópia, sudeste do Sudão e norte do Quênia. Este gênero contém aproximadamente 100 espécies, mas a maioria do café comercialmente disponível consiste de grãos pertencentes à variedade arábica, robusta ou mistura destas duas. O café arábica tem um valor de mercado mais alto e é mais apreciado pelo consumidor, considerado de melhor qualidade, pois apresenta em sua composição bioquímica concentrações mais elevadas de carboidratos, lipídeos e trigonelina (LOPES, 2000).

A bebida de café destaca-se por apresentar sabores e aromas distintos (ILLY e VIANNI, 1996). A qualidade do café está relacionada a diversos fatores como os constituintes químicos responsáveis pelo sabor e aroma, presentes nos grãos verdes e modificados durante o processamento e torra. Os compostos químicos do grão de café verde dependem de fatores genéticos, influenciados pelo ambiente; pelas condições de manejo no campo; pelo processo de preparo da infusão e conservação do grão; pela torração, que podem modificar a constituição química do grão (AMORIM, 1978; CARVALHO e CHALFOUN, 1985).

O sabor e o aroma da bebida de café são altamente complexos, resultantes da presença combinada de vários constituintes químicos voláteis e não voláteis, destacando-se entre eles os ácidos, aldeídos, cetonas, açúcares, aminoácidos, ácidos graxos, compostos fenólicos, assim como a ação de enzimas em alguns destes constituintes e proteínas (SARRAZIN et al., 2000).

Sabe-se que as proteínas são componentes importantes na determinação dos sabores característicos do café, pois são essenciais na incorporação do nitrogênio a voláteis heterocíclicos, após o processo de torrefação, sendo portanto, importantes para a qualidade final da bebida. É também no processo de torrefação que os compostos fenólicos são gradualmente decompostos resultando na formação de voláteis componentes do aroma, materiais poliméricos (melanoidinas) e liberação de CO₂ (MENEZES, 1994). Os compostos fenólicos, além de serem relatados como contribuintes do sabor e aroma característicos das bebidas de café, são também conhecidos em razão das propriedades fisiológicas e farmacológicas que conferem à saúde humana, como a atividade antioxidante. (FARAH e DONANGELO, 2006).

Alguns trabalhos vêm sendo realizados com a finalidade de se determinar o conteúdo protéico de grãos de café utilizando-se uma estratégia conjunta de gel de eletroforese bidimensional, biblioteca de cDNA e degradação de Edman para confirmação das proteínas (ROGERS et al., 1999; DE CASTRO e MARRACCINI, 2006). Estes creditam à proteína de reserva 11 S, uma globulina de aproximadamente 55 kDa, 45% do conteúdo protéico dos grãos (SHEWRY et al., 1995; DE CASTRO e MARRACCINI, 2006).

O desenvolvimento do fruto de café é um processo longo caracterizado por várias mudanças e evoluções nos tecidos, sendo que importantes alterações bioquímicas quantitativas e qualitativas acompanham esse desenvolvimento, ilustrando a importância do seu estudo para uma melhor compreensão das características finais dos grãos de café. O presente trabalho teve por objetivo desenvolver uma ferramenta eficaz na separação, purificação e identificação das proteínas expressas nos diferentes estágios de desenvolvimento em frutos da espécie *Coffea arabica* L. utilizando uma estratégia proteômica do tipo *bottom-up*, com digestão protéica, análise por cromatografia líquida de fase

reversa e com análises posteriores de espectrometria de massa. Além disto, foram realizadas análises clássicas de cromatografia líquida de alta eficiência, para a detecção do metabólito fenólico arbutina, utilizando-se um padrão comercial com referência.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 A história do café

Diversas lendas contam a possível origem do café, sendo a mais conhecida a das cabras do Pastor etíope Kaldi, nascido há mais de 1000 anos. Sempre que suas cabras mastigavam os grãos amarelo-avermelhados dos arbustos nativos da região ficavam alegres e saltitantes, despertando a curiosidade de seu dono, que resolveu relatar esse fato a um monge da região, que decidiu comprovar seus efeitos revigorantes (NEVES, 1974).

O fruto do café era inicialmente consumido fresco e por possuir propriedades estimulantes era utilizado para alimentar os rebanhos durante as longas viagens. O hábito de se tomar café foi disseminado pela cultura árabe, 1000 d.C., por meio de infusões preparadas com os frutos cerejas e, somente no século XIV foi desenvolvido o processo de torrefação. A admiração pelo café chegou mais tarde à Europa, por volta de 1615, durante a expansão do Império Otomano (NEVES, 1974). De acordo com a ABIC (Associação Brasileira da Indústria do Café) o nome café provém da palavra árabe “*qahwa*”, que significa vinho. Na Europa o café era conhecido como "vinho da Arábia".

2.2 Classificação botânica

O cafeeiro é uma planta perene e arbustiva, originário do continente africano e pertencente à família Rubiaceae. A tribo *Coffeae* é dividida em dois gêneros: *Coffea* L. e *Psilanthus* Hook. f, que se distinguem principalmente pela estrutura floral (BRIDSON e VERDCOURT, 1988). As espécies do gênero *Coffea* possuem anteras e estigmas proeminentes, ultrapassando a extensão do

tubo da corola e flores com pistilo longo. Espécies do gênero *Psilanthus* possuem anteras e estigmas inclusos no tubo da corola cercando um estilete curto (BRIDSON, 1987). Cada um dos dois gêneros é dividido em subgêneros: o gênero *Coffea*, em *Coffea* e *Baracoffea* e o gênero *Psilanthus*, nos subgêneros *Psilanthus* e *Afrocoffea* (BRIDSON, 1987).

As espécies mais importantes economicamente pertencem ao subgênero *Coffea* com mais de 80 espécies agrupadas por Chevalier (1942) e que são nativas das regiões ocidental e centro oriental do continente Africano.

2.3 Espécie *Coffea arabica* L.

As plantas da espécie *C. arabica* L. desenvolvem-se melhor em sub-bosque, com temperaturas amenas (média anual entre 18,5 e 21,5 °C), precipitação pluviométrica entre 1.200 a 2.000 mm e períodos de seca entre 3 a 4 meses (GRANER e GODOY JUNIOR, 1967).

A provável origem da espécie *C. arabica* L. provém da hibridação natural entre as espécies diplóides *C. eugenioides* e *C. canephora* P. (LASHERMES et al., 2001). Esta espécie apresenta grande variabilidade morfológica entre seus cultivares, apesar da pouca diversidade genética (CHARRIER e BERTHAUD, 1988).

As plantas da espécie *Coffea arabica* L. além de serem autógamas, são também tetraplóides ($2n = 4x=44$ cromossomos) e propagam-se por autofecundação com taxas de 90 a 99 % (MENDES e BACCHI, 1940). As variedades Typica e Bourbon compõem a base genética da maioria dos cultivares melhorados de *Coffea arabica* L. (ANTHONY et al., 2001).

2.4 Importância socioeconômica

Dentre as espécies mais cultivadas do gênero *Coffea* no Brasil, *Coffea arabica* L. (Arábica) e *Coffea canephora* P. (Robusta) destacam-se economicamente como as espécies cultivadas mais importantes e representam, respectivamente, 70% e 30% da produção mundial (Organização Internacional do Café - OIC, 2009). A espécie *C. arabica* é preferível pelos agricultores por produzir grãos cuja bebida é reconhecida de melhor qualidade, apresentando baixos teores de cafeína. Já a espécie *C. Canephora* P. produz grãos considerados de menor qualidade e bebida menos saborosa, empregada como matéria-prima para o café solúvel, porém uma vantagem dessa espécie é apresentar resistência à ferrugem das folhas, doença muito prejudicial à cafeicultura comercial. As principais diferenças entre as duas espécies estão descritas na tabela 1. (LEROY et al., 2006; ALZUGARAY e ALZUGARAY, 1984).

Tabela 1. Principais diferenças entre as espécies *Coffea arabica* L. (Arábica) e *Coffea canephora* P. (Robusta) (Alzugaray e Alzugaray 1984).

Espécie	<i>C. arabica</i>	<i>C. robusta</i>
Altura	2 a 4m	2 a 5m
Arbusto	Lenho duro, ramos laterais	Multicaule, ramos no colo
Folha	Verde escura	Verde mais clara
Floração	-	1-2 dias/ 2-3x anual
Fruto	Maduro: vermelho/amarelo	Vermelho
Semente	Verde clara/ amarela	Verde

O café, segunda maior *commoditie* natural no comércio internacional, é a mercadoria mais comercializada e consumida no mundo, responsável por um grande número de geração de empregos que vai desde a produção agrícola até a comercialização e produção (ORMOND et.al, 1999).

Os maiores produtores mundiais de café na ordem crescente são: o Brasil, o Vietnã, a Colômbia, a Indonésia, a Índia, o México, a Etiópia, a Guatemala, a Uganda e o Peru (OIC, 2010), sendo o Brasil líder mundial de exportações do produto (CONAB, 2010).

Atualmente, o café é cultivado em várias regiões brasileiras (Minas Gerais, oeste de São Paulo, Espírito Santo, Paraná, Rondônia, Bahia, Acre e Mato Grosso, entre outros). Sua produção é responsável por 35% da produção mundial, sendo considerado o segundo produto brasileiro de maior exportação (OIC, 2010).

Em relação ao mercado consumidor, o Brasil é o 2º mercado do mundo, atrás apenas dos EUA (ICO, 2010). Observa-se em termos de produção nacional, que o Estado de Minas Gerais (com destaque para a região centro-sul) é o maior produtor de *C. arabica* L., sendo responsável pela produção de 50,3% de todo o café colhido no país. No caso de *C. canephora* P., espécie mais adaptada às regiões litorâneas, o estado do Espírito Santo é o estado que mais produz esse tipo de café (23,4%). Segundo dados da CONAB (2010), as principais regiões produtoras de café em 2010 estão apresentadas na Figura 1.

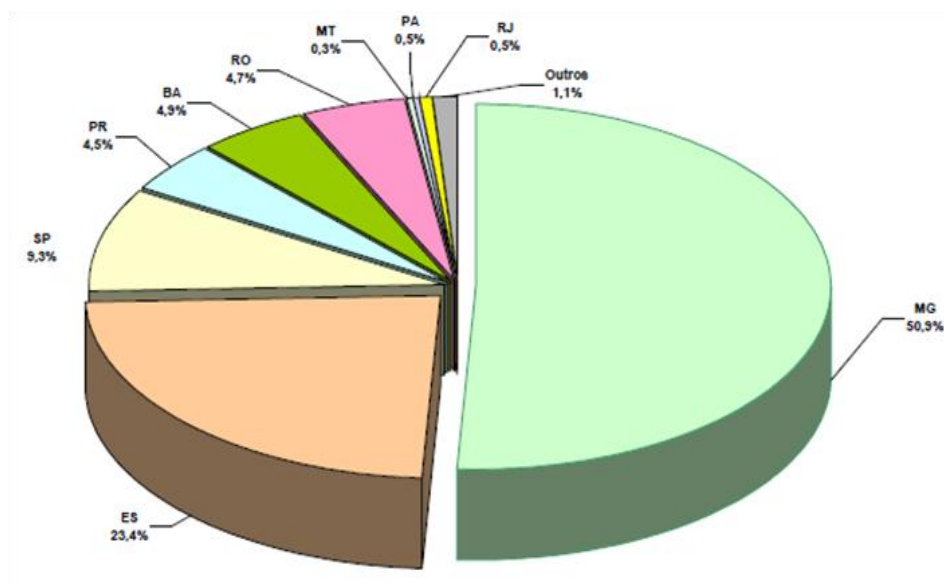


Figura 1. Principais regiões produtoras de café-Safra 2010, participação percentual por U.F (CONAB, 2010).

2.5 Aspectos fenológicos do cafeeiro

Compreender o ciclo biológico das plantas em todas as suas fases e estudar a influência do ambiente em cada estágio, contribui para o melhor manejo, maior produtividade e melhoria da qualidade do café. O ciclo fenológico do cafeeiro apresenta uma sucessão de fases vegetativas e reprodutivas que ocorrem em aproximadamente dois anos (CAMARGO, 1985).

A fenologia do desenvolvimento do fruto do cafeeiro foi caracterizada por alguns autores (BARROS et al., 1978), sendo representada em cinco estágios diferentes. O estágio 1 ou chumbinho, caracterizado por uma baixa taxa de crescimento, porém com uma taxa respiratória elevada que ocorre entre 6 a 10 semanas após o florescimento, nesta fase, o aumento se dá principalmente por divisão celular. O estágio 2 é caracterizado pela rápida expansão dos frutos por meio da expansão celular, neste período ocorre um aumento em tamanho e

massa fresca, sendo determinado o tamanho máximo do grão, que ocorre por volta da 16ª semana. Já o estágio 3 é marcado por um crescimento lento que pode se estender por até 2 semanas, quando o tamanho final do fruto é atingido, mas a matéria seca ainda é baixa. No estágio 4 ou granação, ocorre o enchimento do endosperma, entre a 17ª e 28ª semana, a matéria seca aumenta regularmente, com pequena mudança na matéria fresca. A massa seca é depositada principalmente no grão (sementes), que atinge sua massa seca final quando o fruto ainda está verde. A maturidade dos grãos se torna completa quando seu conteúdo máximo de matéria seca é atingido. O último estágio é a maturação, quando ocorrem mudanças no pericarpo, tal como o aumento em tamanho e em matéria seca e fresca, se tornando vermelho ou amarelo. A maturação pode se estender por um período de aproximadamente 10 semanas, da 24ª a 34ª semana após o florescimento. O tempo para atingir a maturação é variável entre espécies e também em relação às condições climáticas. Segundo Carvalho et al. (1991), a espécie *C. arabica* L. atinge a maturação dos frutos entre 210 a 250 dias após a florada enquanto que para espécie *C. canephora* P. é entre 300 a 350 dias.

2.6 Composição bioquímica do fruto de café

É fundamental, para uma melhor compreensão dos processos fisiológicos que ocorrem durante o processo de formação e maturação do grão, um melhor entendimento da anatomia e composição bioquímica do fruto de cafeeiro como um todo (DE CASTRO e MARRACINI, 2006; BORÉM, 2008).

Classificado como drupa, o fruto de café pode ser descrito como indeiscente, carnoso, com pericarpo diferenciado em exocarpo, mesocarpo e endocarpo (Figura, 2). O exocarpo, vulgarmente chamado de casca, é o tecido mais externo do fruto. Nas espécies *C. arabica* L. e *C. canephora* P., o exocarpo possui uma camada única de células compactas, poligonais e parenquimatosas,

com um número variado de cloroplastos, apresentando estômatos regularmente distribuídos na superfície (DE CASTRO e MARRACINI, 2006; BORÉM, 2008). O processo de formação das sementes é caracterizado por mudanças e evoluções nos tecidos embrionários que varia de seis a oito meses após a florada, levando em consideração fatores genéticos e climáticos (DE CASTRO e MARRACINI, 2006).

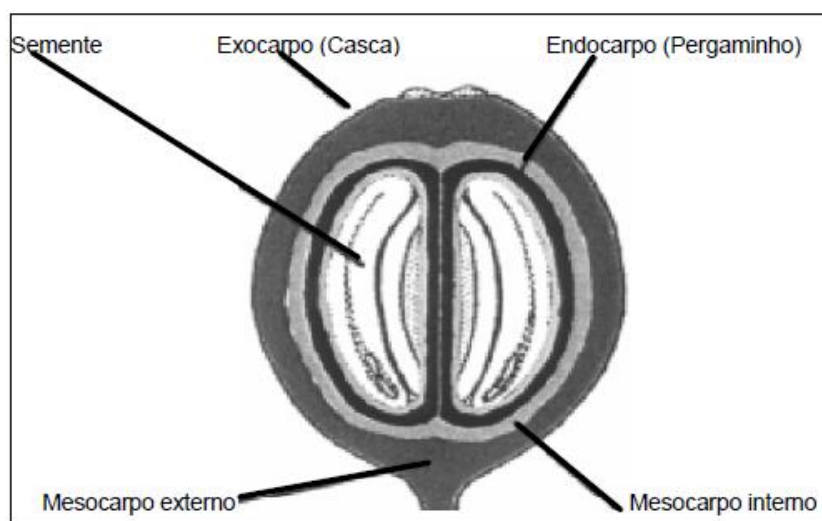


Figura 2. Corte longitudinal do fruto do café (AVALLONE, 2000).

O desenvolvimento do fruto, que pode ser visualizado na Figura 3, começa logo após sua fecundação. De 0 a 90 DAF (dias após a floração) quando começam as divisões e alongação das células do perisperma, um tecido transitório que será substituído progressivamente pelo endosperma. O perisperma é constituído de células esclerenquimáticas, remanescentes do tecido nucelar (DE CASTRO e MARRACINI, 2006; BORÉM, 2008).

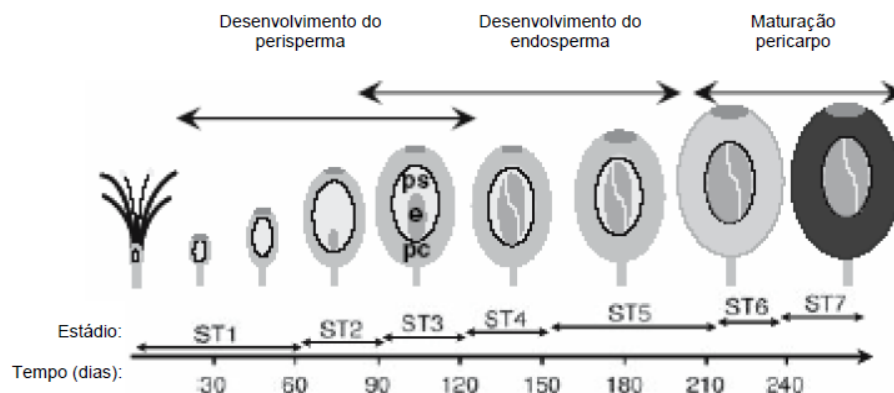


Figura 3. Evolução dos tecidos durante o desenvolvimento e maturação do fruto de café.
e: endosperma; ps: perisperma; pc: pericarpo.

Fonte: DE CASTRO e MARRACCINI (2006).

À medida que o fruto vai se desenvolvendo (150 a 200 DAF), o perisperma passa a dar lugar ao endosperma, restando apenas uma fina camada que apelidamos de película prateada. O endosperma é endurecido com o tempo, através do acúmulo gradual de proteínas de reserva, sacarose, polissacarídeos complexos e compostos fenólicos que contribuem para a qualidade da bebida e para o fornecimento de energia necessária para a germinação da semente (MARRACCINI, et.al., 2001; DE CASTRO e MARRACCINI, 2006).

Durante o processo de maturação do fruto, ocorrem também, alterações na cor do pericarpo, que é composto pelo exocarpo, mesocarpo e endocarpo. O exocarpo ou casca é composto basicamente por celulose, hemicelulose e os pigmentos clorofilados que conferem a cor verde durante as fases iniciais de maturação. Esses pigmentos vão sendo substituídos durante a maturação por teores de antocianina, pigmentos que conferem cor avermelhada e/ou amarelada, sendo um dos fatores que caracteriza o estágio “cereja” dos frutos (MARÍN-LÓPEZ et al., 2003).

O exocarpo juntamente com o mesocarpo, além de funcionarem como uma barreira à ação de microrganismos, são conhecidos como polpas e contém de 6 a 8% de mucilagem. A polpa do café é composta, principalmente, de carboidratos, proteínas brutas, fibras brutas e cinzas. O mesocarpo ou mucilagem é uma substância gelatinosa e adocicada, rica em substâncias pécticas, enzimas e açúcares (DE CASTRO e MARRACCINI, 2006; BORÉM, 2008).

O endocarpo, também chamado de pergaminho, é a estrutura que envolve completamente a semente, composto basicamente por fibras e hemicelulose (SALAZAR et al., 1994).

O sabor característico do café está relacionado à presença de vários constituintes químicos voláteis e não voláteis, proteínas, aminoácidos, ácidos graxos, aldeídos, cetonas, açúcares, proteínas, trigonelina, cafeína, compostos fenólicos e também à ação de enzimas sobre alguns desses constituintes, formando compostos que interferem no sabor e aroma (CARVALHO et al., 1997). Os compostos voláteis, ésteres e álcoois, que caracterizam o aroma do fruto maduro, são produzidos simultaneamente ao metabolismo de açúcares e ácidos à medida que se inicia o aumento da atividade respiratória em decorrência da síntese do etileno (CLIFFORD, 1985).

Embora a formação do aroma e sabor envolva reações mais complexas, o fruto do café maduro é rico em sacarose, substância considerada importante na qualidade da bebida (GEROMEL, 2006). Estudos anteriores relatam que diversos fatores estão correlacionados a formação da composição bioquímica do fruto, favorecendo ou não a qualidade final da bebida. Esses fatores podem ser genéticos e/ou ambientais. Processos de pós-colheita e armazenamento do grão que dependem por sua vez da umidade e da temperatura podem propiciar proliferações microbianas e fermentações indesejáveis a torração e ao preparo da infusão (CARVALHO e CHALFOUN, 1985).

Diante do exposto, é de grande interesse científico-comercial a realização de estudos com o objetivo de se caracterizar bioquimicamente o fruto do cafeeiro nos seus diferentes estágios de desenvolvimento e tecidos embrionários, além de correlacioná-los, se possível, com a qualidade da bebida de café (CLARKE e MACRAE, 1985; FRANCA et al., 2005).

2.7 Metabólitos secundários

Há dois tipos de metabólitos encontrados no reino vegetal, os metabólitos primários e os secundários. Os metabólitos primários (aminoácidos, nucleotídeos, açúcares e lipídeos) exercem função ativa nos processos de fotossíntese, respiração, assimilação de nutrientes e estão presentes em todo o reino vegetal. Já os metabólitos secundários, apresentam distribuição restrita no reino vegetal, ou seja, são específicos em uma espécie ou a um grupo de espécies relacionadas e estão intimamente associados a estratégias de defesa das plantas. Os principais metabólitos secundários estão distribuídos de acordo com a sua rota biossintética: terpenos e esteróides, os alcalóides e os compostos fenólicos (DILLARD e BRUCE GERMAN, 2000).

Os compostos fenólicos apresentam diversas propriedades benéficas à saúde e estão potencialmente envolvidos na proteção contra doenças degenerativas, câncer e doenças cardiovasculares (SCALBERT et al., 2005). Nas plantas, são responsáveis por sua morfologia (cor e suporte mecânico), crescimento, reprodução (atraem aves e insetos que ajudam na polinização) e na proteção contra ataque de patógenos e radiação ultravioleta (HEIM et al., 2002).

Mais de 8.000 compostos fenólicos já foram identificados e possuem caracteristicamente um ou mais grupos hidroxila (OH) ligados a um anel aromático, podendo ter vários grupos substituintes, como carboxilas, metoxilas, outras estruturas cíclicas não-aromáticas, entre outras (NYCHAS, 1995). Os

ácidos fenólicos são encontrados principalmente como conjugados com açúcares, ácidos orgânicos ou ligados a estruturas da parede celular (CLIFFORD, 2000).

Entre os compostos fenólicos encontrados no café estão o ácido caféico, o ácido clorogênico (CGAs) e outros derivados do ácido cafeoilquínico (DAGLIA et al., 2000). Os CGAs são sintetizados na via dos ácidos chiquímicos pela condensação das moléculas de glicose, ou seja, o fosfoenolpiruvato e a eritrose-4-fostato. Os fenilpropanóides são formados a partir do ácido corísmico, e têm como produto final a biossíntese dos CGAs induzido em resposta a condições de estresse ambiental, infecção por patógenos, injúria mecânica, exposição a raios ultravioletas ou de altos níveis de luz visível (HERRMANN, 1995).

Os níveis de ácidos clorogênicos em café vêm sendo estudados há mais de um século e estão presentes tanto nas folhas quanto nos frutos, estudos indicam sua importância fisiológica na adaptação ao estresse da planta e sua contribuição para a formação do aroma e sabor da bebida (FARAH e DONANGELO, 2006). Apesar das discrepâncias em consequência do uso de diferentes metodologias, a variação dos teores de CGAs, as diferenças nas distribuições isoméricas e a presença ou ausência de outros derivados menos abundantes se constituem em critérios de identificação genotípica do café (GUERRERO et al., 2001).

2.7.1 Arbutina

O composto fenólico arbutina (do inglês *arbutin* - 4-hydroxyphenyl- β -D-glucopyranoside) é uma hidroquinona glicosilada encontrada em diversas espécies vegetais tais quais nas folhas do mirtilo (*Vaccinium sp.*) (SUAU et al., 1991), na casca das pêras (CUI et al., 2005) e compõem 25% do peso seco das

folhas de *Myrothamnus flabellifolia*, conhecida como planta da ressurreição e tolerante à secas prolongadas (OLIVIER et al., 1996). A arbutina foi inicialmente identificada como uma substância antibiótica envolvida na resistência a ferrugem de fogo (*Erwinia amylovora*) (HILDEBRACD e SCHROTH, 1963). Extratos das folhas de *Arctostaphylos uvae-ursi* L. contendo arbutina como o principal componente ativo são usados para tratar infecções do trato urogenital (SCHINDLER, 2002).

Embora o papel da arbutina nas plantas ainda não esteja bem estabelecido, acredita-se que sua função esteja na manutenção das membranas das plantas por meio da interação deste composto com a bicamada lipídica das membranas expostas aos estresses ambientais (OLIVER et al., 1998).

A arbutina já vem sendo utilizada em alguns produtos cosméticos na despigmentação de manchas na pele, inibindo a ação da enzima tirosinase responsável pela produção de melanina (TOKIWA et al., 2007). Dotada de uma estrutura similar aos ácidos clorogênicos (CGAs), encontrados tanto nas folhas quanto nos frutos de café (KY et al., 2001), a arbutina nunca foi descrita em café.

2.8 Proteômica

Em 1994, surgiu pela primeira vez o termo “proteoma” para definir o conjunto total de proteínas expressas pelo genoma de uma célula, tecido ou organismo em um determinado ambiente, sob determinadas condições. O proteoma tornou-se vertente direto da era pós-genômica, além de produzir informações complementares sobre a função celular dos genes (WILKINS et al., 1995).

Neste sentido, o proteoma varia de acordo com o tecido ou estágio do ciclo celular estudado, ou em resposta a condições definidas como:

disponibilidade de nutrientes, mudanças climáticas, estresses bióticos e abióticos, condições patológicas e diferentes estados fisiológicos (CAHILL et al., 2001; SPEICHER, 2004). A análise do proteoma tornou-se uma importante ferramenta complementar aos estudos da expressão gênica em diferentes estados fisiológicos de um organismo (CAHILL et al., 2001).

Outra abordagem da proteômica é estudar as propriedades das proteínas, seus níveis de expressão, suas funções, interações, modificações pós-traducionais e pós-transcricionais, tais como fosforilação, metilação, acetilação, clivagem proteolítica, entre outras (BLACKSTOCK e WEIR, 1999; CAHILL et al., 2001).

A proteômica faz uso de metodologias que se complementam para a identificação das proteínas. O fluxo experimental consiste na extração de proteínas, quantificação e na sua identificação. O proteoma de uma amostra pode ser analisado por meio de duas estratégias. A primeira analisa as proteínas intactas (proteômica *top-down*), já a segunda faz análises a partir de seus peptídeos (proteômica *bottom-up*) (NESATY e SUTER, 2008).

Na proteômica *bottom-up*, as proteínas de uma mistura são digeridas e os peptídeos resultantes são analisados por um perfil de digestão ou impressão digital de peptídeos (do inglês *Peptide Mass Fingerprinting* - PMF,) utilizando MS ou sequenciamento *de novo* via tandem MS (MS/MS) (NESATY e SUTER, 2008).

Já a análise *top-down* permite deduzir a estrutura primária da proteína e a maior parte das modificações pós-traducionais. No entanto, essa estratégia é limitada pela energia de colisão necessária na fragmentação da proteína que é insuficiente para proteínas maiores que 50KDa, ficando restrita sua aplicação à análise de proteínas purificadas (NESATY e SUTER, 2008).

Os primeiros estudos proteômicos datam de 1975, quando O'Farrel e Klose descreveram pioneiramente a técnica de eletroforese bidimensional com o

isolamento e visualizações de proteínas de alguns organismos e a construção dos primeiros bancos de dados. Entretanto não era possível a identificação das proteínas por falta de métodos de sequenciamento sensíveis.

O primeiro método desenvolvido para a identificação de proteínas foi desenvolvido por Edman (1949). O sequenciamento de Edman consiste na leitura dos aminoácidos da extremidade N-terminal livres da proteína, porém deixou de ser usual por apresentar pouca sensibilidade, consumir muito tempo (horas ou dias) e não ser aplicável às proteínas cujo N-terminal estivesse bloqueado, como resultado de modificações sofridas durante a sua purificação (ASHCROFT, 2003).

A partir da década 1980, os avanços instrumentais e o desenvolvimento metodológico da espectrometria de massa (*mass spectrometry*-MS) facilitaram a identificação das biomoléculas tornando-a mais rápida, sensível e precisa, com a capacidade de fragmentar os peptídeos em segundos, sem a necessidade de purificação prévia ou sem apresentar problemas com as extremidades N-terminal bloqueadas ou modificadas (PANDEY e MANN, 2000; GRIFFIN e GOODLETT, 2001).

2.8.1 Preparo da amostra

O proteoma tem como meta, monitorar todas as proteínas celulares e para tanto, há na literatura vários procedimentos descritos para se fazer quantitativamente a extração total das proteínas a fim de separá-las, quantificá-las com precisão e determinar sua identidade (GODOVAC-ZIMMERMANN e BROWN, 2001). Os três passos fundamentais no preparo de amostras de proteínas são rompimento celular, inativação ou remoção de interferentes e solubilização das proteínas (GÖRG et al., 2000).

O preparo da amostra é a etapa mais importante de qualquer experimento em proteômica, e o desafio está na capacidade de separação, recuperação do material e rendimento específico. Desta forma, alguns ajustes metodológicos se fazem necessários, como um tratamento prévio das amostras para sua separação, a solubilização, desnaturação e a redução para quebrar completamente às interações entre as proteínas (RABILLOUD, 1996).

O método utilizado para o rompimento celular irá depender da natureza da amostra e pode ser realizado tanto por meios químicos quanto físicos (HERALD et al., 2003). Os mais utilizados são a lise osmótica, quando a célula é suspensa em um meio hipotônico e seu volume é aumentado até ocorrer a lise da membrana; lise por detergentes e lise enzimática da parede celular. Emprega-se também a maceração manual sob nitrogênio líquido em amostras sólidas para transformá-la em um pó fino. A homogeneização do material pode também se dar, pela trituração com sonda de aço (GÖRG et al., 2000).

Após o rompimento celular deve-se remover os interferentes como as proteases, sais, ácidos nucléicos, polissacarídeos, fenóis, entre outros. Inibidores de proteases são usualmente utilizados para impedir a degradação das proteínas (GÖRG et al., 2000). A precipitação das proteínas com ácido tricloroacético/acetona (TCA/AC) é muito útil para minimizar a degradação destas e remover compostos interferentes, tais como sais ou polifenóis, entretanto podem ocorrer perdas do material. Os sais podem ser removidos pela diálise ou, como já dito acima, pela precipitação de proteínas com TCA ou solventes orgânicos (por exemplo, acetona a 0 °C) (GÖRG et al., 2000).

Já os lipídeos, podem ser removidos pela extração com solventes orgânicos (por exemplo, etanol ou acetona a 0 °C), porém podem ocorrer perdas significativas de proteínas se estas forem solúveis em solventes orgânicos ou porque elas nem sempre se ressolubilizam (HERALD et al., 2003). Para a

remoção da camada lipídica pode-se empregar a centrifugação a alta velocidade (FOUNTOULAKIS et al., 2004).

Compostos fenólicos, presentes em materiais de origem vegetal, podem ser removidos pela adição de polivinilpolipirrolidona (PVPP), ou também, pela precipitação com TCA e subsequente extração de fenóis com acetona a 0 °C (GÖRG et al., 2000).

Após o rompimento celular e a remoção dos compostos interferentes, os polipeptídeos devem ser solubilizados e, dependendo da finalidade da análise, desnaturados e reduzidos para romper as interações intra e intermoleculares. A solubilização da amostra é geralmente realizada com um tampão contendo compostos caotrópicos (uréia ou tiouréia), detergentes não-iônicos ou zwitteriônico (por exemplo, Triton X-100), agentes redutores (ditiotreitól – DTT), anfólitos e, dependendo do tipo de amostra, inibidores de protease (GÖRG et al., 2000).

Os agentes redutores promovem a redução e a prevenção da reoxidação das pontes dissulfeto. Eles são necessários na clivagem das pontes intra e intermoleculares dissulfeto para se obter um desdobramento completo da proteína. Os redutores mais comumente usados são o 1,4 ditiotreitól (DTT), o ditioeritritól (DTE) e o 2-mercaptoetanol (ROCHA et al., 2005).

2.8.2 Separação proteômica por Cromatografia Líquida

Para minimizar algumas das limitações da eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida, a cromatografia líquida tem sido integrada com a espectrometria de massas, compondo uma nova plataforma para análise do proteoma.

O Botânico russo Mikhail Tswett, relatou no início do século XX, suas experiências na separação de pigmentos coloridos em extratos de folhas verdes,

utilizando uma coluna de vidro empacotada, finamente dividida, com carbonato de cálcio (fase estacionária) e éter de petróleo (fase móvel). A separação dos componentes pôde ser verificada por meio de faixas coloridas na coluna. (TSWETT, 1903; TSWETT, 1906).

A cromatografia, por definição, é uma técnica de separação físico-química dos componentes de uma mistura, realizada na distribuição desses componentes entre duas fases: fase móvel (gás, líquido ou um fluido supercrítico) e fase estacionária (fixa em coluna ou numa superfície sólida) (LANÇAS, 2009).

LANÇAS e MCHAIR (1983) discutiram que a classificação das técnicas cromatográficas mais utilizadas varia de acordo com o enfoque dado à pesquisa, e podem ser:

- Quanto ao mecanismo de separação (em coluna ou planar);
- Quanto à técnica empregada (cromatografia pode ser classificada nas modalidades afinidade e exclusão molecular);
- Em relação ao tipo de fase móvel utilizada (cromatografia líquida, quando a fase móvel for um líquido; cromatografia gasosa, quando a fase móvel for um gás e cromatografia com fluido supercrítico, quando um fluido supercrítico for empregado na fase móvel).

Um cromatógrafo líquido é composto por um reservatório de solvente (fase móvel), um injetor (introdução da amostra), um sistema para forçar a passagem da amostra e da fase móvel por meio da coluna (bomba) e um sistema de monitoramento (detector), como mostra a Figura 4.

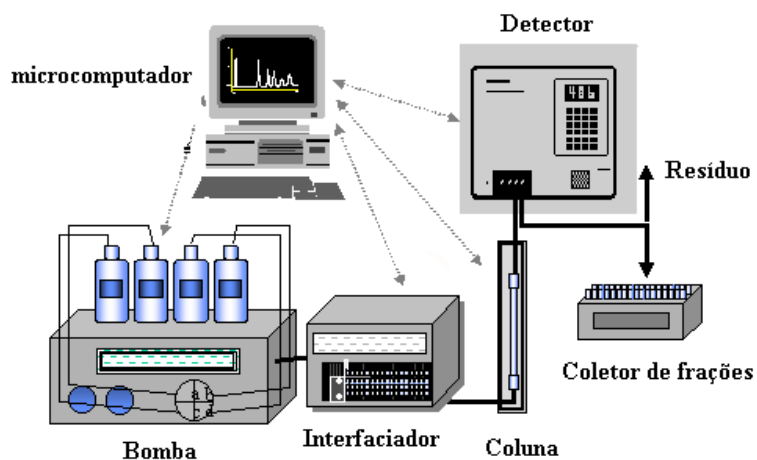


Figura 4. Esquema básico de um equipamento para Cromatografia Líquida de Alta eficiência- CLAE.

A cromatografia líquida pode ser por afinidade ou exclusão molecular, de acordo com a interação entre o soluto e a fase estacionária. Na modalidade afinidade, a cromatografia pode ser por adsorção, partição (fase normal ou reversa) e troca iônica. Por exclusão molecular, temos a cromatografia de permeação ou de filtração em gel (LANÇAS, 2009).

O sistema é dito em fase normal, quando este contém na sua fase estacionária grupos polares quimicamente ligados a sílica, neste caso o eluente é menos polar, para que ocorra a partição do analito entre duas fases, e a separação desejada, seja obtida (LANÇAS, 2009).

A cromatografia líquida de fase reversa (RPLC) se tornou uma ferramenta bem estabelecida e largamente utilizada para análise e purificação de biomoléculas. O principal motivo que explica esse fato é a alta resolução que pode ser conseguida com tal técnica. A RPLC é capaz de separar polipeptídeos de sequências muito próximas tanto de pequenos peptídeos quanto de grandes proteínas. Até mesmo polipeptídeos que diferem por apenas um resíduo de

aminoácido podem ser separados (RIVIER e MCCLINTOCK, 1983; KUNITANI e JOHNSON, 1986).

A cromatografia líquida de fase reversa pode ser usada para separação de peptídeos derivados de uma digestão enzimática (TEMPST et al., 1986) e para purificação de peptídeos naturais e sintéticos em grandes ou em pequenas quantidades (g ou mg) (SCARBOROUGH et al., 1984).

O princípio da separação em fase reversa é a hidrofobicidade e deve-se principalmente a interações entre a parte não polar do soluto e a fase estacionária, isto é, à repulsão desta parte do soluto pela fase móvel aquosa. A fase estacionária empregada contém grupos apolares, como os octadil (C_{18}), octil (C_8) ou hexil (C_6) (LANÇAS, 2009).

A cromatografia em fase reversa emprega a utilização de água (mais econômica) na composição da fase móvel, permitindo assim, a separação de uma grande variedade de compostos. A fase móvel mais utilizada é uma mistura de acetonitrila/água, podendo substituir a acetonitrila por metanol ou tetrahidrofurano quando necessário. São usados esses três solventes devido à pequena quantidade de solventes orgânicos miscíveis com água. É importante lembrar que a força do solvente em fase reversa aumenta com o decréscimo da polaridade do solvente (CASS e DEGANI, 2001).

2.8.3 Identificação de proteínas por espectrometria de massas

A espectrometria de massa baseia-se na determinação precisa da relação m/z (massa/carga) dos íons em fase gasosa. No início da década de 80, com o desenvolvimento de técnicas de ionização brandas, como a ionização por *eletrospray* (FENN et al., 1989) e a ionização MALDI (KARAS e HILLENKAMP, 1988), consolidou-se o estabelecimento de uma tecnologia central no campo da proteômica como ferramenta na determinação precisa da

massa molecular protéica, quantificação de cisteínas, localização de pontes dissulfeto, determinação de modificações pós-traducionais tais como glicosilações e fosforizações, determinação da sequência de aminoácidos e principalmente a identificação de proteínas (LARSEN e ROEPSTORFF, 2000).

Os componentes básicos de um espectrômetro de massa são: fonte de ionização (responsável pela introdução de cargas e vaporização da amostra), um ou mais analisadores de massa (determina a relação m/z do analito) e um detector (registra a presença dos analitos) (GRAVES; HAYSTEAD, 2002).

Existem dois tipos principais de fontes de ionização que são amplamente utilizadas atualmente para volatilização e ionização de proteínas ou peptídeos: a ionização por dessorção a laser auxiliada por matrix (*Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization* – MALDI) (KARAS e HILLENKAMP, 1988) e a ionização por eletropulverização (*Electron Spray Ionization* – ESI) (FENN et al., 1989). MALDI-MS normalmente usada para analisar misturas simples de peptídeos, enquanto que a cromatografia líquida, acoplada a ESI-MS, é preferida para amostras complexas (AEBERSOLD e MANN, 2003).

A ionização e dessorção da amostra ocorrem pela diluição desta em uma matriz orgânica, geralmente o ácido α -ciano-4- hidroxicinâmico (4HCCA), que contém um grupo cromóforo que absorve luz no comprimento de onda do ultravioleta ou infravermelho. À medida que os solventes da matriz e da amostra evaporam, ocorre uma cocristalização de ambos. Este cristal, submetido a tiros de laser na faixa de absorção do cromóforo, provoca uma fotoionização dos analitos pela transferência de carga dos íons da matriz para a amostra e sua posterior dessorção, fazendo com que entrem na fase gasosa. Nesta fase, os analitos são encaminhados ao analisador do tipo TOF, os íons são acelerados por uma diferença de potencial aplicada entre a fonte e o detector e, portanto percorrem um espaço livre (tubo de voo), sob vácuo, até serem detectados em tempos proporcionais à raiz quadrada da relação m/z dos íons gerando espectros

de massa de cada proteína ou peptídeo submetido à análise (STEEN e MANN, 2004; MAEDA et al., 2003).

Os principais analisadores de massa que acompanham os sistemas de ionização descritos, responsáveis pela acurácia dos espectros, são: aprisionamento de íons (*Ion Trap* - IT); tempo de voo (*Time-of-Flight* - TOF), quadrupolo (Q) e transformada de Fourier (*Fourier transform ion cyclotron* -FT) (MANN et al., 2001; RAPPSILBER et al., 2003).

Alguns destes analisadores podem ser associados em série (*tandem*) para reunir as vantagens de cada um. Podem se associar em tof-tof, quadrupolo e íon trap (Q-IT), quadrupolo e TOF (Q-TOF), duplo ou triplo quadrupolo (Q1-Q2-Q3), e outros (AEBERSOLD e MANN, 2003). Podem também ser colocados em posição anterior ao outro analisador para selecionar íons de uma razão m/z particular e enviá-lo para o próximo detector ou para reter um peptídeo para sofrer dissociação induzida por colisão no próximo detector (*collision induced dissociation* - CID) causando centenas de milhares de colisões do íon-molecular com um gás inerte, como o hélio (LIN et al., 2003).

MALDI-TOF é o espectrômetro de massa (MS) preferido para análise de peptídeos. O espectro de MS é relativamente simples de interpretação, pois cada espécie é um íon molecular monoprotonado (ASHCROFT, 2003). Os requisitos mínimos para definição de um pico de massa são a utilização dos picos monoisotópicos no envelope isotópico e uma relação de sinal-ruído maior que 2. (ASHCROFT, 2003).

Diferentes tipos de análises podem ser realizados a partir dos dados de espectrometria de massa. Uma delas é a identificação de “assinaturas peptídicas” (*Peptide Mass Fingerprinting* - PMF) ou *Peptide Mass Map Analysis*, na qual somente a massa do íon precursor (peptídeo) é considerada. Inicialmente, realiza-se a digestão enzimática da proteína a ser identificada para a produção dos seus respectivos peptídeos, neste caso, a identificação se dá pela aquisição

dos valores de massa/carga dos peptídeos individuais de uma mistura que dispostos em uma ordem determinada e única, correspondem aos peptídeos que compõem a proteína quando comparadas às massas dos peptídeos gerados pela digestão teórica de cada proteína. Com auxílio de softwares especiais, é possível comparar essa impressão digital com aquelas geradas, teoricamente, para todas as sequências protéicas presentes nos bancos de dados levando assim à identificação da proteína. (BALDWIN, 2004; BURLINGAME et al., 1998).

Em outro tipo de análise, que pode ser denominada de *Peptide Sequence* ou *Peptide Sequence Tag Query* emprega-se a espectrometria de massas em *tandem* (MS/MS) que permite a fragmentação dos peptídeos, gerados por digestão enzimática, das proteínas a serem identificadas. Peptídeos denominados “íons precursores ou parentais” são inicialmente detectados, e posteriormente fragmentados, para se obter íons dos resíduos que os constituem, sendo que neste procedimento são usados espectrômetros de massa que possuam analisadores em sequência para CID e para separação dos fragmentos formados. Para o sequenciamento peptídico, o valor de m/z analisado é o dos íons-produto da fragmentação, além do íon precursor ou parental. Novamente, empregando-se softwares especiais, é possível realizar as identificações protéicas pela comparação de uma sequência parcial, aliada a massa total do peptídeo que gerou tal sequência e a diferença de massa entre a sequência parcial obtida e as porções não sequenciadas do peptídeo, com aquelas presentes em banco de dados (CHAKRAVART et al., 2002).

Já na análise para sequenciamento *de novo*, um peptídeo individual é fragmentado, para se obter a sequência dos aminoácidos que constituem uma proteína, neste procedimento são usados espectrômetros de massa que possuam analisadores em sequência para CID e para separação dos fragmentos formados. Para o sequenciamento peptídico, o valor de m/z analisado é o dos íons-produto da fragmentação, o íon selecionado para fragmentação é o íon precursor ou

parental e apenas o íon de interesse é selecionado e fragmentado por colisão com um gás inerte, resultando em um novo espectro, no qual a diferença entre dois íons adjacentes corresponde, em massa, a um aminoácido (AEBERSOLD, 2003).

2.8.4 Análises *in silico*

A análise *in silico* dos dados obtidos pela espectrometria de massa (MS) é feita a partir de peptídeos oriundos da digestão da proteína com uma protease específica e os resultados são comparados com bancos de dados de proteínas. O resultado se dá pela correlação dos dados de massas e os dados armazenados nos bancos de dados. Esta correlação é feita por *softwares* desenvolvidos para busca, comparação e certificação da identificação da proteína com análises estatísticas (JAMES et al., 1994; JAMES, 1997b; MANN et al., 2001). Para tanto, as sequências depositadas são fragmentadas teoricamente (*in silico*) pelo mesmo método de digestão experimental e os valores das massas dos peptídeos teóricos são calculados e comparados com os valores experimentais. Essa abordagem de busca de coincidências de massa peptídica foi associada ao termo “identificação de assinaturas peptídicas” (PMF), pois cada proteína digerida por protease, como a tripsina, apresenta um único conjunto de peptídeos específicos, semelhante à particularidade da impressão digital de cada pessoa. (ASHCROFT, 2003; THIEDE et al., 2005) Para as análises de PMF, é preciso que os valores de massa sejam obtidos com exatidão. Alguns programas que usam algoritmos sofisticados são utilizados na busca de PMF, como por exemplo, o “Bayesian” do programa ProFound, “MOWSE modificado” e “número de matches” no MSFit e “MOWSE baseado em probabilidade” no Mascot. A identificação da proteína depende da comparação entre as massas obtidas experimentalmente e aquelas obtidas teoricamente (MANN et al., 2001; THIEDE et al., 2005).

2.9 Trabalhos proteômicos em frutos de cafeeiro

Os constituintes bioquímicos, como precursores dos compostos nitrogenados responsáveis pelo aroma e sabor da bebida de café, são alvos de estudos para elucidar suas rotas bioquímicas durante o desenvolvimento do fruto, permitindo assim, a manipulação das características associadas a esses processos (RIBEIRO, 2004; AMORIM, 1978).

Neste sentido, estudos com a finalidade de se determinar o conteúdo protéico dos grãos de café foram realizados, utilizando-se estratégias conjuntas de gel de eletroforese bidimensional, biblioteca de cDNA e degradação de Edman para confirmação das proteínas (ROGERS et al., 1999; DE CASTRO e MARRACCINI, 2006). Estes creditam à proteína de reserva 11 S, uma globulina de aproximadamente 55 kDa, 45% do conteúdo protéico dos grãos (SHEWRY, 1995; DE CASTRO e MARRACCINI, 2006).

Outras proteínas encontradas em alta quantidade em frutos, principalmente em perispermas jovens são as β -tubulinas. Estas proteínas estão presentes nos microtúbulos e por isso são consideradas marcadoras indicando divisão e expansão celular (ESTANISLAU, 2002).

Foram identificados também em frutos de café, a presença de cafeína, os ácidos clorogênicos, a trigonelina, os diterpenos, a sacarose, e compostos fenólicos (DE CASTRO e MARRACCINI, 2006; GEMOREI et al., 2006; CLIFFORD, 1999).

Rogers (1999) correlacionou as mudanças no conteúdo de açúcares, mioinositol, ácidos carboxílicos e íons inorgânicos como uma forma de identificar os mecanismos de transporte e de acúmulo desses componentes durante a maturação dos frutos de café.

Clarke e Macrae (1985) caracterizaram proteínas de natureza enzimática, dentre elas: as polifenoloxidasas, fosfatases, malato desidrogenases, catalases, α e β -galactosidasas, entre outras enzimas hidrolíticas e oxidativas.

Em estudos recentes, Bandil (2008) identificou por meio de eletroforese bidimensional associada à espectrometria de massa, 6 proteínas envolvidas em vias glicolíticas do fruto *Coffea arabica* L., em estágios iniciais, como a proteína de reserva 11 S, traumatina-like, precursor de cloroplasto, frutose bifosfato aldolase, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase e malato desidrogenase. Enquanto que, Livramento (2008) notou diferenças no perfil proteômico dos cafés naturais despulpados submetidos a diferentes processos de pós-colheita.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Estabelecer uma metodologia eficaz na caracterização e identificação de proteínas e metabólitos em frutos de café, em dois tecidos específicos (pericarpo e endosperma) nos diferentes estágios de desenvolvimento.

3.2 Objetivos específicos

1. Propor um modelo experimental no qual seja possível avaliar o método de análise do perfil protéico do fruto de *Coffea arabica* L por meio da estratégia proteômica *bottom up* e *shotgun*.
2. Caracterizar o proteoma do fruto do café (*Coffea arabica* L.) em diferentes estágios de desenvolvimento e tecidos específicos (pericarpo e endosperma) utilizando diferentes métodos de extração protéica.
3. Identificação de proteínas diferencialmente expressas por espectrometria de massa com interfaces *offline* e *online* (LC-MS -*Liquid chromatography-mass spectrometry*).
4. Identificação do composto fenólico arbutina por padrões cromatográficos nos diferentes estágios de desenvolvimento do café e tecidos específicos (pericarpo e endosperma).

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 Material biológico

As coletas do material biológico aconteceram no campo experimental da Embrapa Cerrados (Planaltina-DF, Brasil - $15^{\circ} 35'43''\text{S}$ - $47^{\circ}43'52''\text{O}$) representado na Figura 5. Os frutos da espécie *Coffea arabica* L. variedade IAPAR 59, foram coletados manualmente, de forma aleatória, sempre do lado leste, na região do terço médio da planta, nas três linhas internas deixando as bordaduras. As coletas foram realizadas nos períodos de outubro (2008) a abril (2009). As coletas foram realizadas durante o estágio de desenvolvimento fenológico do fruto, em intervalos de 30 dias após o florescimento (DAF).

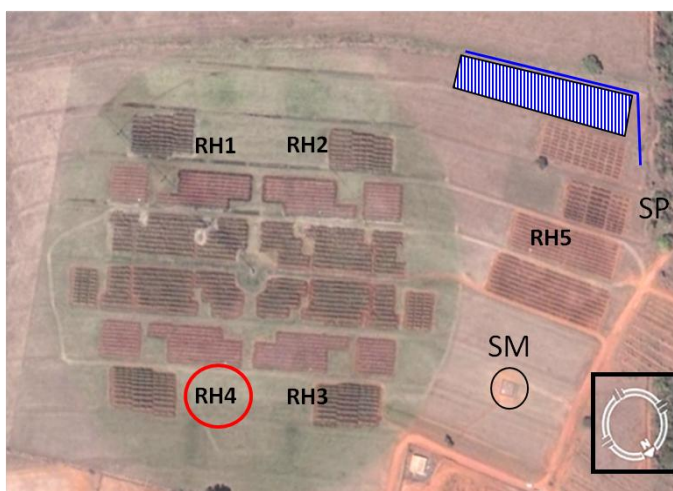


Figura 5. Campo experimental da Embrapa Cerrados (Planaltina-DF, Brasil).

Os frutos coletados foram denominados de 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210 e 237 DAF, conforme demonstrado na Figura 6, e acondicionados em tubos de polipropileno com capacidade volumétrica de 50 mL, congelados em

nitrogênio líquido e estocados em *freezer* - 80 até o momento da dissecação dos tecidos embrionários.



Figura 6. Frutos de *Coffea arabica* L. (variedade IAPAR 59) coletados em diferentes estágios de desenvolvimento fenológico dos frutos.

4.2. Dissecação dos tecidos embrionários

Os frutos de *Coffea arabica* L. foram dissecados em pericarpo, perisperma e endosperma (quando este já estava presente) como mostrado na Figura 7. Para os frutos coletados com 30 dias após a floração, não houve separação dos tecidos embrionários. Já os frutos com 60, 90 e 120 DAF foram separados em pericarpo, perisperma e endosperma. Os frutos com 150, 180, 210 e 237 DAF foram separados apenas em pericarpo e endosperma.

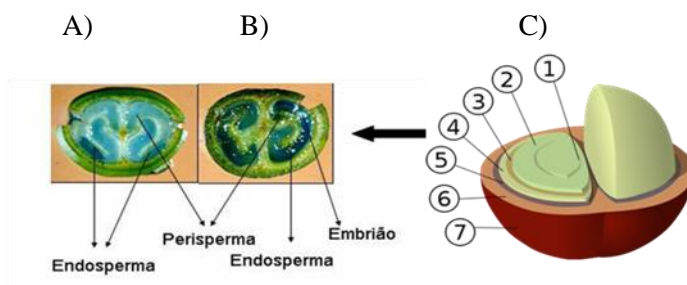


Figura 7. Estrutura do fruto de *Coffea arabica* L. em corte transversal: Corte in vivo mostrando a formação dos tecidos: (A) primeiras fases do desenvolvimento (60-90 dias após florescimento- DAF); (B) fases finais (120-150 DAF) do

desenvolvimento do fruto de café; (C) Representação esquemática: centro de corte (1); endosperma (2); película prateada (3); pergaminho (casca, endocarpo) (4); camada de pectina (5); polpa (mesocarpo) (6) e camada externa (pericarpo, epicarpo) (7).

4.3 Detecção e identificação de proteínas por cromatografia líquida de alta eficiência (*offline*) e espectrometria de massa (MALDI-TOF)

4.3.1 Extração das proteínas totais de frutos de café

A extração das proteínas totais de *Coffea arabica* L. foi realizada no Laboratório de Genética Molecular (LGM-NTBio, Embrapa-Cenargen, Brasília). Os tecidos embrionários (pericarpo e endosperma) foram pulverizados em nitrogênio líquido com o auxílio de um almofariz e pistilo de porcelana. Para as análises com interface *offline* a extração total protéica seguiu o protocolo modificado SDS-Fenol (WANG et al., 2003).

Protocolo SDS-Fenol modificado (WANG et al., 2003): após se obter um pó homogêneo por meio da pulverização com nitrogênio líquido, as amostras foram pesadas (aproximadamente 6 g) e aliqüotadas em tubos falcon de 50 mL. Adicionou-se 15 mL de solução de extração gelada (PVPP 1%, β -mercaptoetanol 2%, PMSF 1mmol/L, em acetona gelada qsp 15 mL) e em seguida, os tubos foram agitados vigorosamente em vórtex por 30s, mantidos em gelo para não haver oxidação das amostras.

As amostras foram homogeneizadas com ajuda de um sonificador de ponta por 30s com intervalos no gelo, por 4 vezes na potência de 30%, a fim de ocasionar o rompimento da parede celular, membrana plasmática e quebra do DNA para que o conteúdo celular extravasasse e ficasse em solução. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm por 15 min a 4 °C para garantir um precipitado bem firme e evitar uma provável perda do material.

O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspendido em 20 mL de acetona absoluta gelada e centrifugado novamente a 10.000 rpm, por 5 min a 4°C, esse passo foi repetido por 2 vezes. Posteriormente, o precipitado foi ressuspendido em 15 mL de TCA 10% em acetona absoluta gelada, com o auxílio do vórtex por 30s. Depois as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm por 5 min a 4°C, descartando o sobrenadante. Este procedimento foi repetido 3-4 vezes até o precipitado ficar esbranquiçado. O precipitado foi ressuspendido, mais duas vezes em 15 mL de TCA 10% em solução aquosa (água destilada gelada), outras duas utilizando 15 mL de acetona 80% gelada (para lavar o TCA) e mais uma com 15 mL de etanol 80% gelado. Todas as ressuspensões das amostras foram realizadas no vórtex seguidas de centrifugações a 10.000 rpm por 5 min a 4 °C e tiveram o sobrenadante descartado. O precipitado repousou em temperatura ambiente até todo o etanol ter sido evaporado.

A segunda etapa do protocolo consistiu em adicionar 10 mL de tampão SDS-denso (Sacarose 30%; SDS 2%; Tris-HCl 0,1 mol/L, pH 8,0; β -mercaptoetanol 2% e PMSF 1 mmol/L) ao precipitado obtido na primeira etapa. As amostras foram imediatamente ressuspendidas em vórtex por 30 s cada, durante 5 min a temperatura ambiente. Foi adicionado às amostras, 8 mL de fenol tamponado (pH 8,0). As amostras foram mantidas em gelo por 10 minutos para haver precipitação do SDS e evitar a degradação, durante cada minuto os tubos foram agitados para maximizar o contato entre a solução aquosa e o fenol.

Na etapa posterior, as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm por 5 min a 4 °C para haver separação das fases, de modo que a fase fenólica ficasse na parte superior. A fase fenólica, na qual as proteínas ficam solubilizadas, foi transferida para novos tubos de centrifuga de polipropileno com cuidado para que a interface dos solventes não se desfizesse. Foram adicionados de 3-4 volumes de acetato de amônio 0,1mol/L em metanol absoluto gelado, e deixados por 2 horas em *freezer* -20 °C para que houvesse precipitação das proteínas, e

depois foram centrifugados a 12.000 rpm por 10 min a 4 °C e descartado o sobrenadante.

O *pellet* foi ressuspendido duas vezes em 15 mL de acetato de amônio em metanol absoluto gelado 0,1 mol/L, e centrifugado a 12.000 rpm, por 10 min a 4 °C. Mais três ressuspensões com 15 mL de acetona absoluta gelada 80% e outras três com 15 mL de etanol 70%, foram feitas.

A massa protéica obtida após a extração foi ressuspensa em tampão de carbonato de amônio 100 mM (pH 8,0), com a ajuda de um vórtex e de um sonicador de ponta, reduzida com a adição de 50mM de DTT a 72 °C por 2 horas. Logo após, 25 mM de iodoacetamida foi adicionada e a mistura incubada por 1 hora a 37 °C. A digestão do material foi feita utilizando tripsina imobilizada em gel de agarose durante 18 horas também a 37 °C seguindo as instruções do fabricante.

4.3.2 Quantificação das proteínas

A dosagem das proteínas foi feita pelo método de Bradford (1976) em triplicata. Como padrão foi utilizada a albumina bovina na concentração de 5mg/mL. Para o preparo do reagente Bradford foi dissolvido 10mg de comassie G250 em 5 mL de etanol a 95%. Foi adicionado à solução contendo comassie, 10 mL de ácido fosfórico a 85% sob agitação até dissolução total, em seguida foi adicionado 100 mL de água destilada e armazenada no escuro. Antes de ser usada a solução foi filtrada em filtros de papel.

As amostras foram analisadas em espectrofotômetro a 595 nm. A comparação dos resultados de absorvância com a curva padrão permitiu a determinação da concentração da proteína.

4.3.3 Fracionamento das proteínas totais

O extrato protéico foi fracionado em um sistema de cromatografia líquida ultrarrápida - UFLC usando uma coluna analítica de fase reversa Vydac 214TP510 (C₄) (10 mm/250 mm) equilibrada com TFA 0,1 % com gradiente de TFA 0,1 % em acetonitrila em um fluxo de 1,0 mL min⁻¹. A absorvância da amostra foi monitorada a 216 e 280 nm e as frações foram coletadas em 3 tubos falcon, os quais foram liofilizados. O conteúdo dos tubos falcon foi ressuspensão e os peptídeos foram recromatografados usando uma coluna C₁₈ (Shimpack XR-ODS 50x2mm) utilizando gradientes otimizados.

4.3.4 Espectrometria de massa -MS-MS/MS

Peptídeos foram analisados por MALDI-TOF MS e MS/MS usando um espectrômetro Autoflex II (TOF-TOF), realizadas no Núcleo de Estrutura e Função de Biomoléculas (Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas) gentilmente cedido pelo pesquisador Adriano Pimenta da Universidade Federal de Minas Gerais, em Belo Horizonte, MG.

As amostras foram misturadas com uma solução saturada de matriz ácido α -cyano-4-hydroxicinâmico em acetonitrila e TFA 3 % (5:1 v/v) e aplicadas em uma placa de MALDI.

Os espectros em modo MS e MS/MS foram obtidos no modo refletor com calibração externa, usando a mistura de calibração. O sequenciamento *de novo* dos peptídeos foi realizado por meio da fragmentação do precursor, usando N₂ como gás indutor de dissociação.

4.3.5 Identificação das proteínas (TBLASTn)

Buscas por similaridade foram feitas na base de dados CAFEst (<https://alanine.cenargen.embrapa.br/cafEST/>) utilizando análises por tblastn e as montagens dos bancos café (2004-07), com as condições padrão do algoritmo do BLAST.

4.4 Detecção e identificação de proteínas com cromatografia líquida (*online*) acoplada à espectrometria de massa.

4.4.1 Extração protéica em solução ácida e precipitação por sulfato de amônio

Para extração foi pesado 10 g de tecido vegetal (endosperma) correspondendo aos estágios de desenvolvimento 150, 180, 210 e 237 DAF que foram aliqüotadas em tubos de centrífuga de polipropileno com capacidade volumétrica de 50 mL. Adicionou-se então, 120 mL de solução ácida (12 mL HCl- Ácido Clorídrico + 2,4 mL NaCl-Cloreto de Sódio + 105 mL H₂O deionizada). As soluções ficaram sob agitação a 4 °C (*overnight*). No dia seguinte, as soluções foram filtradas a vácuo e centrifugadas por 20 min a 4 °C. Descartou-se o *pellet* e retirou-se o sobrenadante de cada amostra. O pH dos sobrenadantes foi corrigido para 7 com NaOH e deixados em repouso na geladeira por 1 hora. Em seguida, centrifugou-se a 10.000 g por 20 min a 4 °C. O *pellet* foi descartado novamente. Adicionou-se sulfato de amônio 60% sob agitação. Em seguida, as soluções foram deixadas em repouso por 12 horas a 4 °C, para que houvesse a precipitação das proteínas. No dia seguinte, as soluções foram centrifugadas 10.000g por 20 min a 4 °C. O *pellet* foi

ressuspendido em água deionizada e dialisado por 2 dias. As amostras após serem liofilizadas foram submetidas à digestão enzimática no ANEXO A.

4.4.2 Fracionamento das proteínas totais

As frações referentes às amostras 150, 180, 210 e 237 DAF do fruto de café foram individualmente separadas por cromatografia de fase reversa acoplada a espectrometria de massas (LC- MS/MS), usando uma coluna analítica capilar (NanoAquity, UPLC- Waters, USA) com capilaridade de 1,7 μ m. A fase móvel A constituiu-se de água + ácido fórmico 0,1% e a fase móvel B de acetonitrila + ácido fórmico 0,1%. Para tal análise, empregou-se o seguinte gradiente de eluição: 2 min – 99% A; 2-82 min, 3-40% – B; 85-87 min -85% B; 88-90 min-3%B. A etapa de lavagem da amostra com o solvente A (99%) a 7 μ L/min por 2 min. O fluxo da corrida foi de 0,6 μ L/min.

4.4.3 Espectrometria de massa com ionização por *electrospray*

As análises foram conduzidas em um espectrômetro de massas da alta resolução composto por um arranjo híbrido de um quadrupolo (Q) e um analisador por tempo de voo (TOF - *Time-of-flight*) (Q-Tof, Micromass, Reino Unido). A fonte de *electrospray* foi operada no modo positivo V, com fluxo de gás (N₂) constante a 0,25 L.min⁻¹ e temperatura de nebulização a 50°C. As tensões utilizadas no capilar, cone de amostragem e cone de extração foram 3.000, 40 e 10 V, respectivamente. A faixa de *m/z* analisada foi de 50-1990 Da. As amostras foram introduzidas diretamente na fonte ESI por meio do bombeamento de uma seringa com um fluxo constante de 0.6 μ L/min. Neste instrumento, os experimentos de MS/MS são feitos por meio da seleção do íon

de interesse, no quadrupolo Q. O íon de interesse é dissociado na câmara de colisão (q2), após colidir com o argônio (*collision induced dissociation* – CID). Os íons produzidos neste processo são analisados no analisador de massas TOF.

4.4.4 Identificação das proteínas

Os dados brutos obtidos, resultantes dos experimentos de LCMS/MS, foram processados usando o programa “ProteinLynx” (versão 2.0) da Waters/Micromass, o qual já possui um aplicativo para identificação das proteínas.

4.5 Detecção do composto fenólico arbutina em frutos de café

4.5.1 Extração de composto fenólico arbutina

Foram selecionados três diferentes estágios de desenvolvimento fenológico do fruto (150, 210 e 237 DAF) e dois tecidos embrionários (pericarpo e endosperma) para as análises de identificação da arbutina em *Coffea arabica* L. Tanto o pericarpo quanto o endosperma foram pulverizados em nitrogênio líquido com a ajuda de um almofariz e pistilo de porcelana até ficarem um pó fino e homogêneo. Foi pesado em uma balança semianalítica de precisão 2 g do tecido pulverizado e aliqotado em tubos de centrífuga de polipropileno com capacidade volumétrica de 50 mL.

A extração fenólica baseou-se no método descrito por Cui et al. (2005). Foi adicionada a cada amostra 2 mL de etanol 95% (pré-resfriado a -18 °C) contendo ácido fosfórico 0,4% (v/v). Em seguida, as amostras foram homogeneizadas em um ultrassom por 40 min. A solução foi centrifugada a

13.200 rpm por 5 min e aproximadamente 2 mL de cada sobrenadante foi evaporado em uma centrífuga a vácuo. O resíduo foi dissolvido em 1 mL do solvente A (água + TFA 0,1%) e filtrado por meio de uma membrana 0,45µm antes da análise no UFLC.

4.5.2 Fracionamento do extrato de metabólitos

O extrato fenólico foi fracionado em um sistema de cromatografia líquida ultrarrápida - UFLC (Shimadzu Co., Kyoto, Japan), usando uma coluna analítica de fase reversa C₁₈ (Shimpack XR-ODS 2.0 mm *i.d.* x 30 mm) a 30⁰C . Os solventes utilizados foram água Milli Q contendo TFA 0,1% (fase móvel **A**) e acetonitrila contendo TFA 0,1% (fase móvel **B**). A eluição dos componentes da amostra foi realizada em gradiente de concentração de 2-80% **B**, com fluxo de 0.3 mL.min⁻¹. A absorbância das amostras foi monitorada a 278 e 274 nm. A concentração da amostra padrão da arbutina comercial (Sigma – #A4256) foi de 1µg. µL⁻¹ com injeções de 10µL de amostra padrão. Para as amostras correspondentes aos diferentes estágios fenológicos dos frutos também foram injetados 10 µL. As frações foram coletadas separadamente e liofilizadas para análises posteriores.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Detecção e identificação de proteínas por cromatografia líquida de alta eficiência (*offline*) e espectrometria de massa (MALDI-TOF)

A preparação dos extratos protéicos após o tratamento com tripsina, por cromatografia líquida de alta eficiência (*offline*) foi feita em duas etapas. Na primeira etapa, utilizou-se uma coluna C₄ (Vydac 214TP510) (Figuras, 8-10) e três frações foram coletadas: fração 1 de aproximadamente 15 a 40% de AcN, fração 2 de aproximadamente 40-60% de AcN e fração 3 de 61% até o final do gradiente. Para cada estágio de desenvolvimento do fruto foram feitas 4 corridas cromatográficas.

Com o intuito de se obter melhor resolução das frações cromatográficas, as frações (1-3) das amostras obtidas conforme descrito acima, foram recromatografadas separadamente, utilizando uma coluna C₁₈ (Shimpack XR-ODS 50x2mm) com gradientes otimizados para cada amostra (Figuras, 11-13). Para cada estágio de desenvolvimento do fruto foram feitos 4 corridas cromatográficas. Cada corrida cromatográfica resultou em aproximadamente 20 frações, as quais foram coletadas e posteriormente, submetidas a análises por espectrometria de massa.

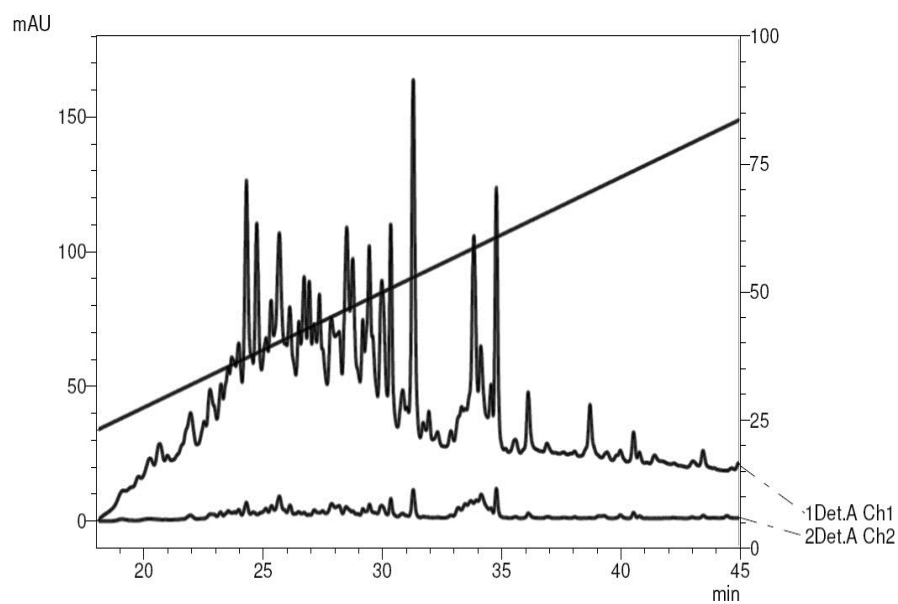


Figura 8. Fracionamento do extrato protéico de grão verde (150 DAF) de *Coffea arabica* L. por cromatografia líquida de alta eficiência em modo de fase reversa utilizando uma coluna Vydac C_4 e um gradiente de 5% de AcN-TFA 0,1% a 95% de AcN-TFA 0,1%.

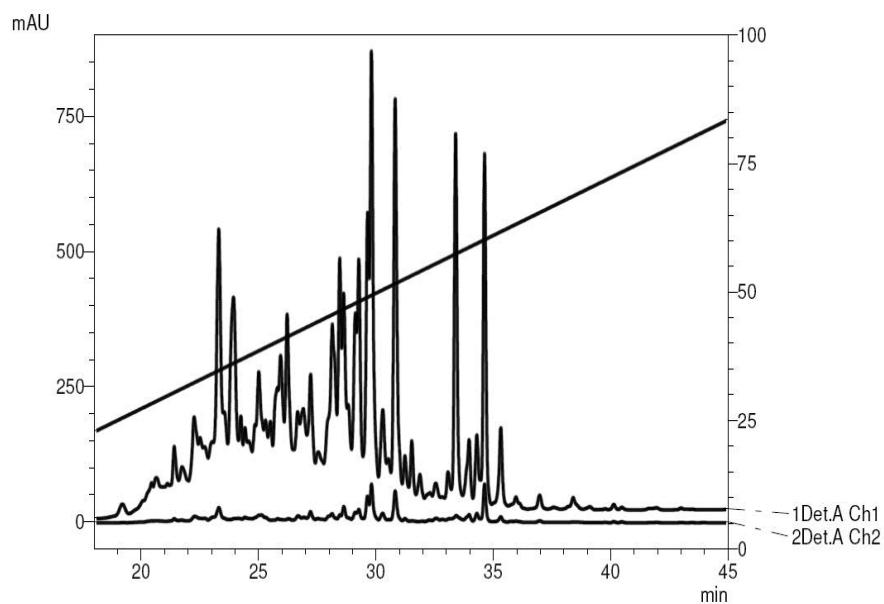


Figura 9. Fracionamento do extrato protéico de grão maduro (210 DAF) de *Coffea arabica* L. por cromatografia líquida de alta eficiência em modo de fase

reversa utilizando uma coluna Vydac C₄ e um gradiente de 5% de AcN-TFA 0,1% a 95% de AcN-TFA 0,1%.

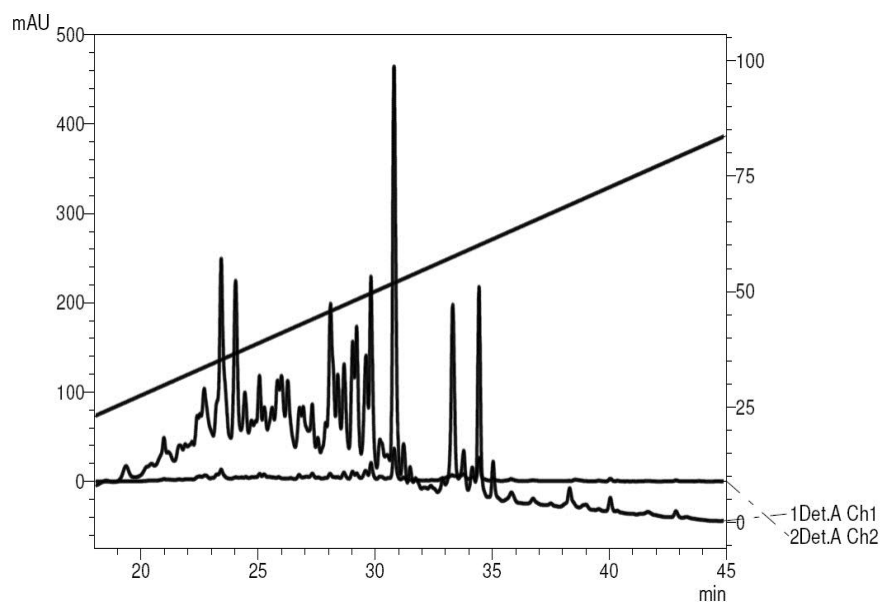


Figura 10. Fracionamento do extrato protéico de grão seco (237 DAF) de *Coffea arabica* L. por cromatografia líquida de alta eficiência em modo de fase reversa utilizando uma coluna Vydac C₄ e um gradiente de 5% de AcN-TFA 0,1% a 95% de AcN-TFA 0,1%.

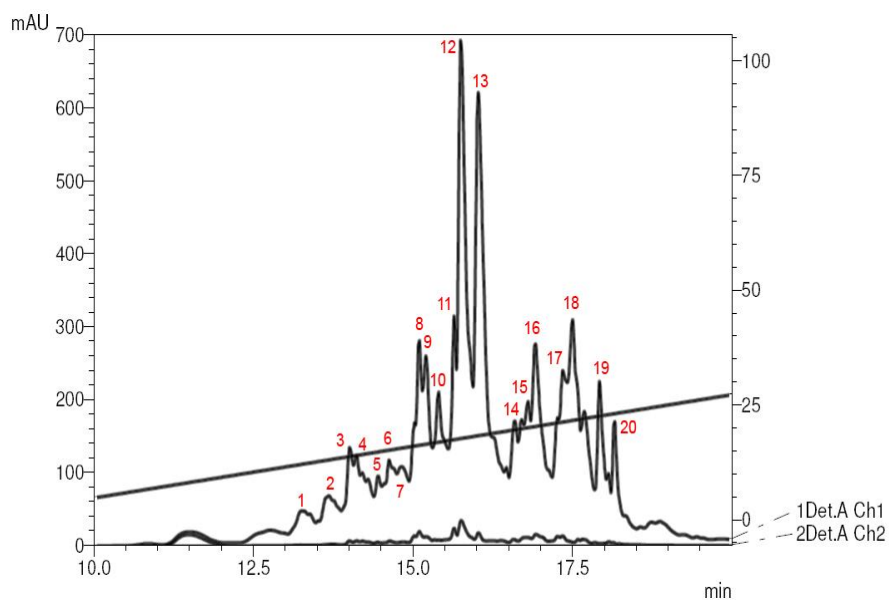


Figura 11. Cromatograma da Fração 1, obtida no fracionamento prévio com uma coluna C_4 , dos extratos protéicos tripsinados de grão maduro (210 DAF) de café, por cromatografia líquida de alta eficiência em modo de fase reversa utilizando uma coluna XR-ODS C_{18} .

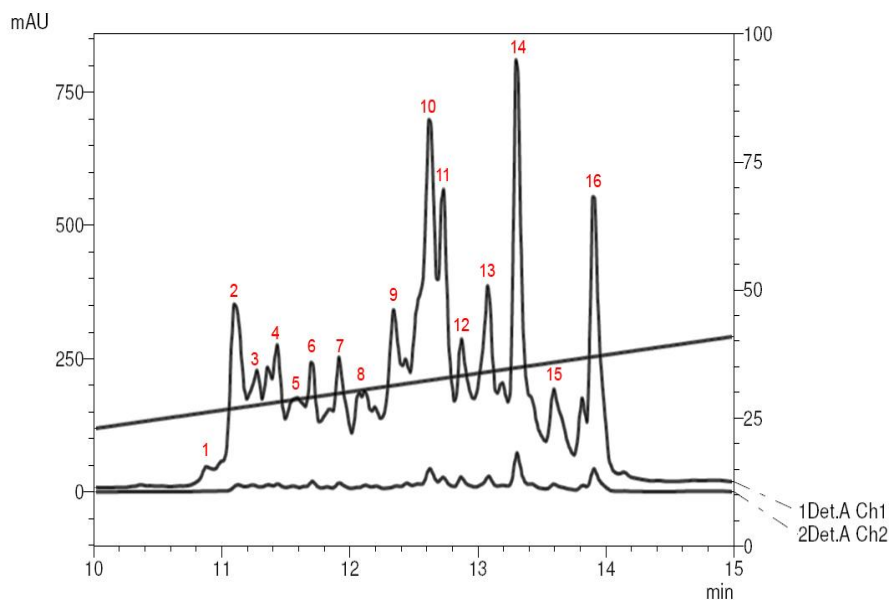


Figura 12. Cromatograma da Fração 2, obtida no fracionamento prévio com uma coluna C_4 , dos extratos protéicos tripsinados de grão maduro de café (210 DAF), por

cromatografia líquida de alta eficiência em modo de fase reversa utilizando uma coluna XR-ODS C₁₈.

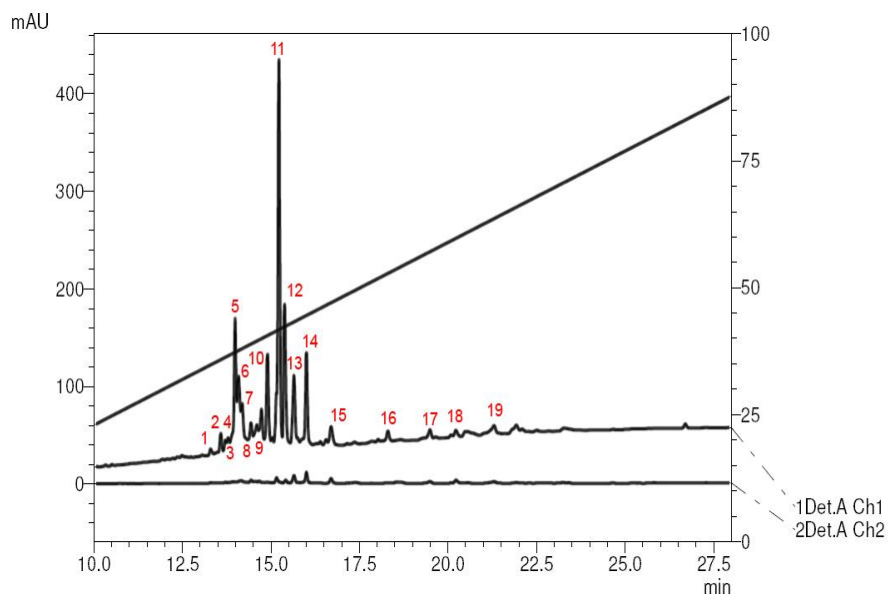


Figura 13. Cromatograma da Fração 3, obtida no fracionamento prévio com uma coluna C₄, dos extratos protéicos tripsinados de grão maduro de café, por cromatografia líquida de alta eficiência em modo de fase reversa utilizando uma coluna XR-ODS C₁₈.

A extração protéica feita pelo protocolo de Wang et al. (2003), julgando pela quantidade de frações encontradas nos cromatogramas, apresentou resultados satisfatórios, porém o extrato protéico forma um precipitado difícil de solubilização em tampão carbonato de amônio. O presente trabalho foi feito com proteínas solúveis e também partículas em solução, para que estas continuassem acessíveis a tripsinólise e que sua digestão gerasse peptídeos solúveis. É possível que o precipitado observado, seja composto primariamente da globulina de reserva 11 S, proteína muito abundante no endosperma de café.

O fracionamento dos peptídeos gerados após a tripsinólise dos extratos protéicos ocorreu de forma satisfatória e a metodologia se mostrou eficiente na separação destes. Cada uma das frações cromatográficas supracitadas foi

diretamente ressuspensa em 10 μ L de matriz de ionização (ácido α -ciano hidroxinamínico) e analisada em um espectrômetro de massa Autoflex II (Bruker Daltonics) no modo refletido, em triplicatas. A Figura 14 é um exemplo representativo de um espectro em modo MS obtido para a fração 10 F2, do extrato obtido a partir do grão maduro (210 DAF).

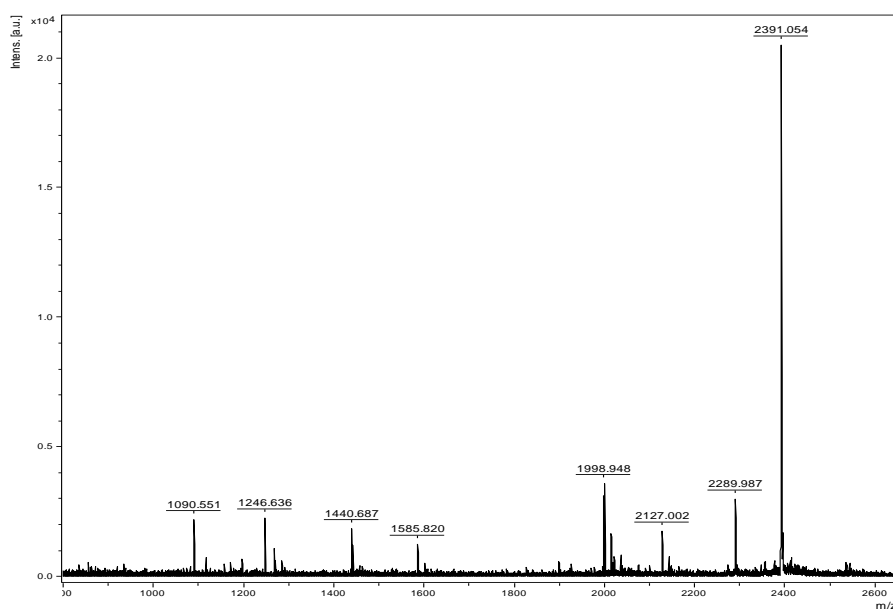


Figura 14. Espectro de massa obtido em modo MS para a fração 10 F 2 do grão maduro. O espectro apresenta a massa monoisotópica [M+H]⁺ de cada íon dos componentes moleculares.

Cada fração resultante das preparações cromatográficas, obtidas a partir do extrato protéico proveniente de frutos de café, em três estágios de maturação, foi analisada no modo MS. A partir do espectro de massa de cada fração cromatográfica foi elaborada uma lista de íons, filtrada de acordo com a intensidade (relação sinal ruído, ou SN nas tabelas) contendo a massa monoisotópica dos peptídeos encontrados nos grãos de café verde, maduros e secos. Grande parte deles resultou em espectros de MS de boa qualidade, com

intensidade suficiente para sua fragmentação, o que permitiu a assinalação das suas sequencias peptídicas.

Os grãos de café verde resultaram em um menor número de íons detectáveis, seguido dos grãos maduros e dos grãos secos. Boa parte dos íons detectados foi encontrada nas amostras de mais de um estágio de maturação.

Os peptídeos selecionados foram fragmentados e tiveram os íons derivados assinalados como parte da série de íons y e b, o que permitiu a assinalação das sequências peptídicas. As Figuras 15-17 exemplificam os padrões de fragmentação peptídica e as sequências primárias assinaladas, a partir dos espectros MS/MS.

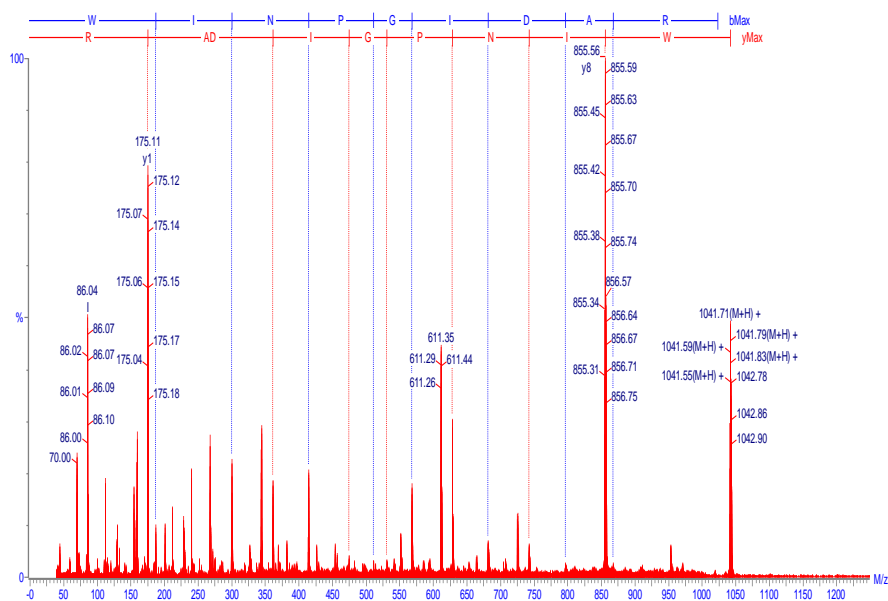


Figura 15. Padrão de fragmentação peptídica do íon precursor $[M+H]^+ = 1041.00$ Da. As séries y e b foram assinaladas e permitiram a anotação da estrutura primária do peptídeo. Similaridade com xyloglycan endo-transglycosylase, após análises por TBLASTn.

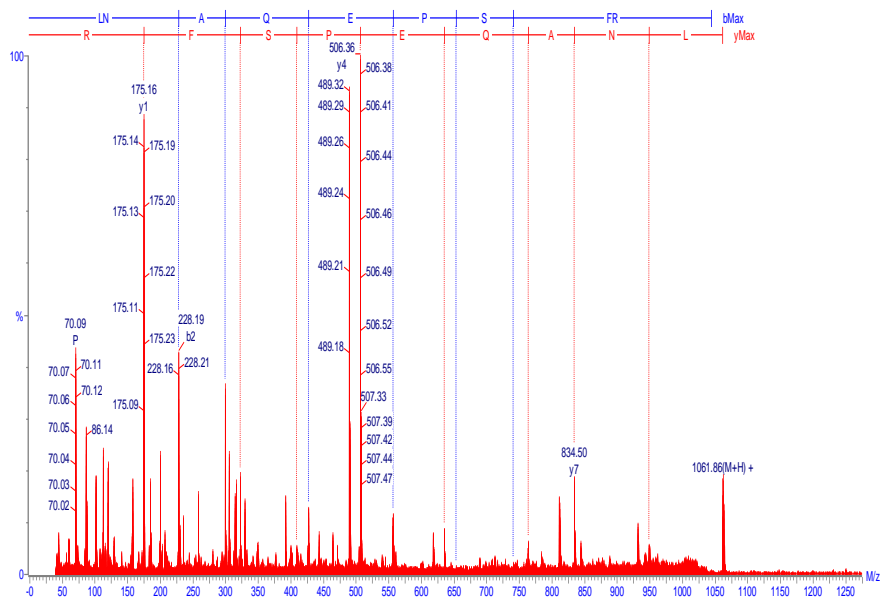


Figura 16. Padrão de fragmentação peptídica do íon precursor $[M+H]^+ = 1061.80$ Da. As séries y e b foram assinaladas e permitiram a anotação da estrutura

primária do peptídeo. Similaridade com globulina 11 S, após análises por TBLASTn.

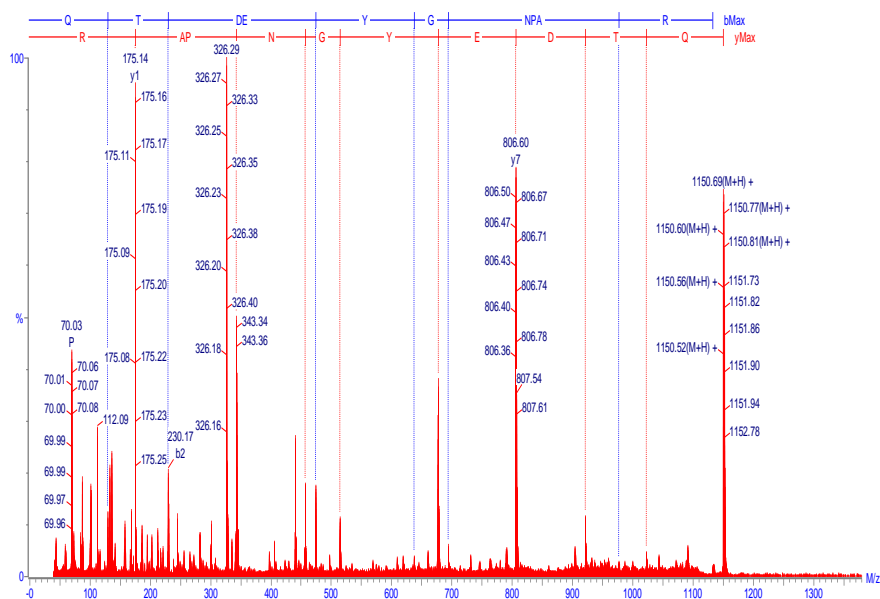


Figura 17. Padrão de fragmentação peptídica do íon precursor $[M+H]^+ = 1150.00$ Da. As séries y e b foram assinaladas e permitiram a anotação da estrutura primária do peptídeo. Similaridade com uma dehidrina.




Vários íons detectados em modo MS tiveram intensidade suficiente para fragmentação, porém de todas as moléculas fragmentadas, somente vinte e nove resultaram em espectros de MS/MS que permitiram o assinalamento completo das sequências.

Os peptídeos submetidos a experimentos do tipo MS/MS tiveram suas sequências peptídicas assinaladas manualmente (sequenciamento *de novo*). De todos os espectros de MS/MS obtidos, somente vinte e nove íons permitiram o assinalamento da estrutura primária completa dos peptídeos. A identificação das proteínas correspondentes foi feita por meio de análises por TBLASTn, utilizando a Base de Dados do Genoma Café (CAFEst), como referência. Alguns peptídeos encontrados tiveram a estrutura primária idêntica à tradução teórica

dos *contigs* presentes na Base de Dados, enquanto outros divergiram em alguns aminoácidos. Desta forma, a metodologia utilizada foi eficiente em identificar doze proteínas diferentes, a partir dos extratos protéicos de grãos de café analisados. A estrutura primária dos peptídeos identificados, assim como as proteínas das quais estes se originam podem ser conferidos na tabela 2.

Nota-se pelos dados apresentados na tabela 2, que vários dos peptídeos identificados, correspondiam à proteína globulina 11 S (íons 1061.80, 1320.00, 1397.00, 1455.00, 1572.00, 1870.00, 1899.00, 2014.00, 2390.00, 2563.00), o que indica alta abundância dessa proteína em frutos de café. Estes dados confirmam as observações de ROGERS et al. (1999) e também de SHEWRY (1995), onde descreveram que a proteína de reserva 11 S, uma globulina de aproximadamente 55 kDa, perfaz cerca de 45% do conteúdo protéico dos grãos de café. Além da globulina 11 S, outras proteínas também puderam ser identificadas como a dehidrina, também já descrita em frutos de café.

Tabela 2. Correlação dos peptídeos encontrados nos diferentes estágios de desenvolvimento da maturação dos grãos com a sua identificação *in silico* utilizando o banco genômico do café (CENARGEN, Brasília-DF) como referência.

Íon	ID				Seq. Peptídeo	Proteína
1061.80	Contig 1050				LNAQEPSFR 1747 LNAQEPSFR 1721	11 S storage protein [<i>Coffea arabica</i>]
1150.00	Contig 11904				QTDEYGNPAR 706 QTDEYGNPAR 677	emb CAC20238.1 putative dehydrin [<i>Helianthus annuus</i>]
1243.00	Contig 3197				EHHGLGMLHR 526 EHHGLGMLHR 494	putative dehydrin [<i>Helianthus annuus</i>]
1253.00	Contig 7304				CDRIHEPNGR 186 IHEPNGR 206	Contig2769
1271.00	Contig 11904				IQYGAEYGNQK 769 QYGAEYGNQK 740	putative dehydrin [<i>Helianthus annuus</i>]
1278.00	Contig 7395				VSVENDYSPLR 305 SVENGYSPTR 334	gb AAK68815.1 Unknown protein [<i>Arabidopsis thaliana</i>]
1320.00	Contig 1050				FFLAGNPQQGGGK 1258 FFLAGNPQQGGGK 1220	11 S storage protein [<i>Coffea arabica</i>]
1337.00	Contig 17766				498 IQEQQQQLWH 469 516 IQEQQQQLWH 487	gb AAK15088.1 2S albumin [<i>Sesamum indicum</i>]
1397.00	Contig 1050				PEFGCAGVEFER 241 PEFGCAGVEFER 276	11 S storage protein [<i>Coffea arabica</i>]
1455.00	Contig 1050				IGLPQEADVFNPR 925 IGLPQEADVFNPR 887	11 S storage protein [<i>Coffea arabica</i>]
1474.00	Contig 17298				SVEILEGDGGVGTIK 231 SVEILEGDGGVGTIK 275	sp O50001 PRU1_ PRUAR Major allergen Pru ar 1
1530.00	CC00-XX-SH3-053-D09-EM.F				TAAPGYGGEQHEK 355 TAAPGYGGEQHEK 311	putative dehydrin [<i>Helianthus annuus</i>]
1572.00	Contig				DVANEANQLDLQSR	11 S storage

	1050			172 DVANEANQLDLQSR 213	protein [<i>Coffea arabica</i>]
1619.00	Contig 12015			QPIISTEFGEVSGVR 153 QPIISTEFGEVSGVR 197	dbj BAB78478.1 prepro MP73 [<i>Cucurbita maxima</i>]
1626.00	Contig 10670			LTQGGTPSSSCCSGVK 1239 LTQGGNPSSSCCSGVK 1286	dbj BAA82107.1 NtWRKY1 [<i>Nicotiana tabacum</i>]
1626.00	Contig 10670			LTQGGTPSSSCCSGVK 472 LTQGGNPSSSCCSGVK 425	dbj BAC77694.1 lipid transfer protein [<i>Atriplex nummularia</i>]
1870.00	Contig 1050			ALLDVANEANQLDLQSR 163 ALLDVANEANQLDLQSR 213	11 S storage protein [<i>Coffea arabica</i>]
1899.00	Contig 1050			LSENIQLPQEADVFNPR 979 LSENIQLPQEADVFNPR 1029	11 S storage protein [<i>Coffea arabica</i>]
1916.00	Contig 17766			IQEQQQIWHCQQY 220 IQEQQQLWHCQQY 261	1 2S albumin [<i>Sesamum indicum</i>]
1984.00	Contig 5590			GREDQQYSQGSADSSNVR 1647 GREDQQYSQGSADSSNVR 1700	dbj BAC53927.1 hypothetical protein [<i>Nicotiana tabacum</i>]
1995.70	Contig 4769			KEG-TIGYLDQFGTELPVK 603 KEGXTIGYLDQFGTELPVK 659	Single hybrid motif [<i>Medicago truncatula</i>]
2014.00	Contig 1050			WDSNNPEFGCAGVEFER 227 WDSNNPEFGCAGVEFER 277	11 S storage protein [<i>Coffea arabica</i>]
2390.00	Contig 1050			TEFWDSNNPEFGCAGVEFER 1699 TEFWDSNNPEFGCAGVEFER 1640	11 S storage protein [<i>Coffea arabica</i>]
2411.00	Contig 17193			EIQQQGGGWQGEEMQQQV 375 QQLQQGGGWQGEEMQQQV 428	hypothetical protein [<i>Vitis vinifera</i>]
2563.00	Contig 1050			GLTEFWDSNNPEFGCAGVEFER 211 GLTEFWDSNNPEFGCAGVEFER 276	11 S storage protein [<i>Coffea arabica</i>]
2668.00	CC00- XX-SH3- 053-D09- EM.F			EAQSGQEYSSATAAPGYGGE 532 EAQPGQEYSSATAAPGYGGE 591	emb CAC20238.1 putative dehydrin [<i>Helianthus annuus</i>]

5.2 Detecção e identificação de proteínas por cromatografia líquida (*online*) acoplada à espectrometria de massa.

O método de extração utilizado nestas análises foi feito com precipitação de sulfato de amônio, seguido de digestão trípica. Nesta metodologia utilizada, o fracionamento dos peptídeos foi realizado por uma coluna capilar (C₁₈) acoplada *online* ao espectrômetro de massas. Neste caso, cada uma das frações é diretamente analisada por espectrometria de massa e os resultados dos íons obtidos nos modos MS e MS/MS caracterizados automaticamente, por meio de análises computacionais realizadas pelo *software* “Protein Lynx”, para a determinação da sequência primária.

Os dados da cromatografia das amostras protéicas obtidas de frutos de café em diferentes estágios de desenvolvimento, estão apresentados nas Figuras 18-21. As análises foram realizadas em triplicata e pode-se observar pelos cromatogramas apresentados, diferenças no perfil cromatográfico de algumas corridas, como por exemplo, a terceira corrida da amostra de frutos de 150 DAF (Figura, 18). Isto indica que houve algum problema instrumental, na cromatografia realizada, naquela repetição.

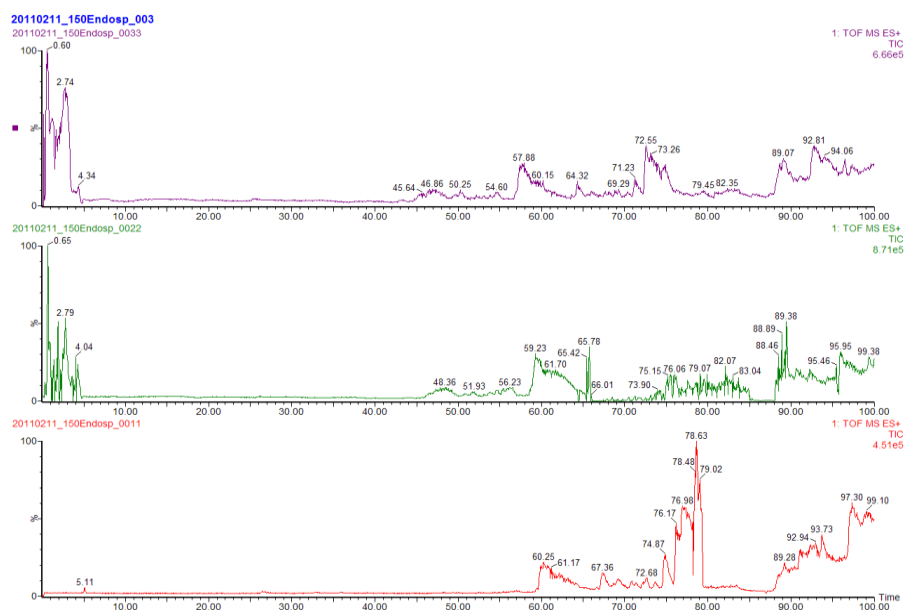


Figura 18. Fracionamento do extrato protéico do grão verde (150 DAF) de *Coffea arabica* L. por cromatografia líquida de alta performance, em modo de fase reversa, utilizando uma coluna capilar (NanoAcquity, UPLC-Waters, USA) em um gradiente de 3% -85% B.

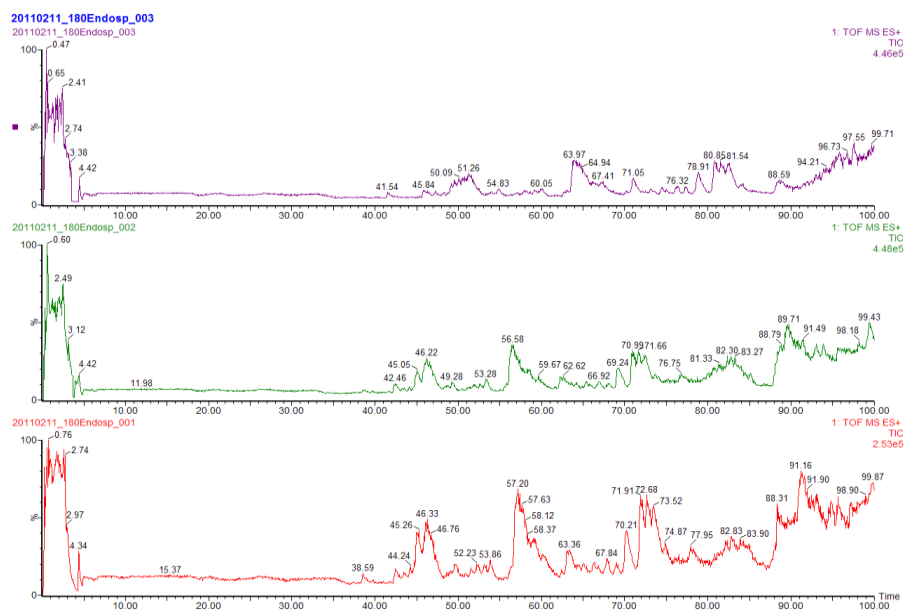


Figura 19. Fracionamento do extrato protéico do grão com 180 DAF, de *Coffea arabica* L. por cromatografia líquida de alta performance, em modo de fase reversa,

utilizando uma coluna capilar (NanoAcquity, UPLC-Waters, USA) em um gradiente de 3% -85% B.

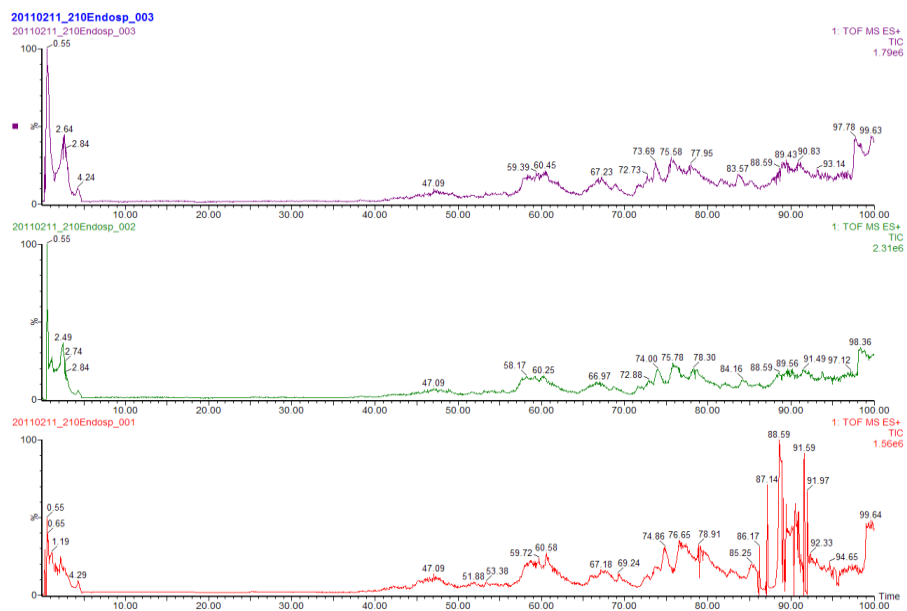


Figura 20. Fracionamento do extrato protéico de grão verde (210 DAF) de *Coffea arabica* L. por cromatografia líquida de alta performance, em modo de fase reversa, utilizando uma coluna capilar (NanoAcquity, UPLC-Waters, USA) em um gradiente de 3% -85% B.

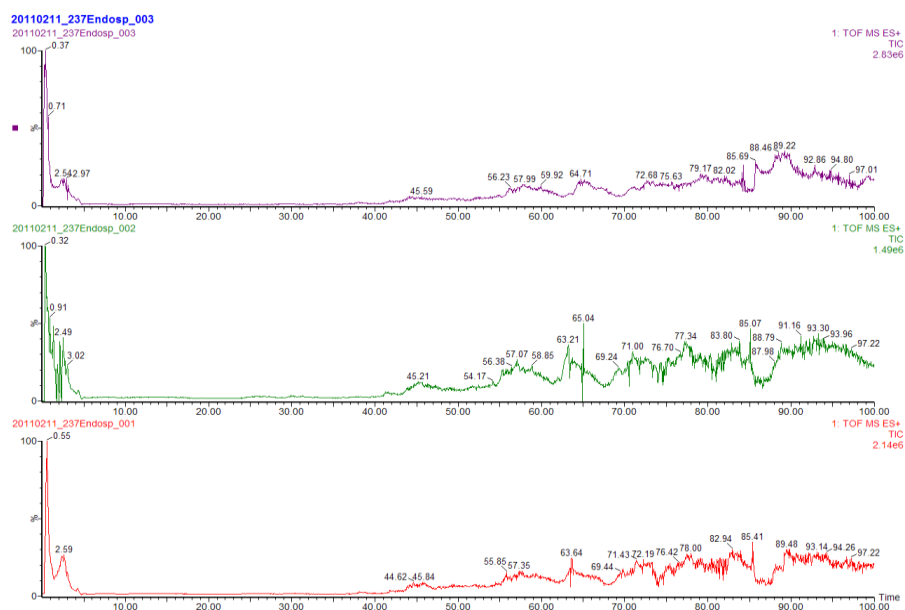


Figura 21. Fracionamento do extrato protéico de grão seco (237 DAF) de *Coffea arabica* L. por cromatografia líquida de alta eficiência em modo de fase reversa utilizando uma coluna capilar (NanoAcquity, UPLC-Waters, USA) em um gradiente de 3-85% B.

Observa-se pelos dados apresentados na Tabela 3, que foi possível identificar peptídeos e as proteínas correspondentes em todas as amostras analisadas. Nota-se, entretanto, que as amostras dos frutos aos 210 DAF resultaram em um maior número de peptídeos identificados, quando comparado com as outras amostras analisadas. Além disso, pode-se observar também que nestas amostras (210 DAF), a reprodutibilidade nas triplicatas foi maior assim como os resultados de *PGLS score*, indicando uma maior significância dos resultados.

Tabela 3. Resultados obtidos das análises realizadas com o software “Protein Lynx”, a partir dos dados coletados por espectrometria de massa das amostras de peptídeos trípticos de endosperma de frutos de café aos 150, 180, 210 e 237 DAF. Reprodutibilidade na triplicata (Rep), a identificação do “Hit” na base de dados (ID), massa molecular (mW), ponto isoelétrico (pI), “Protein Lynx Global Server” (PLGS score), nº de peptídeos identificados conforme o íon precursor, peptídeos teóricos (*in silico*).

150 DAF						
Rep	ID	mW (Da)	pI (pH)	PLGS Score	Peptídeos	Peptídeos Teóricos
1	119793	12629	6.8844	71.6305	4	11
2	120121	43608	5.3701	628.5696	5	25
1	120912	54139	6.8804	776.0632	11	29
1	126200	7533	7.1616	250.8663	5	7
1	127028	5975	6.4894	260.224	2	2
2	128247	9378	5.5792	816.7012	6	4
1	129131	6049	5.2773	85.4584	1	4
1	132485	19830	5.8737	88.6406	3	21
180 DAF						
Rep.	ID	mW (Da)	pI (pH)	PLGS Score	Peptídeos	Peptídeos Teóricos
2	120121	43608	5.3701	573.1380	11	25
2	120242	17156	5.9394	284.5651	7	14
2	120523	25822	8.0186	316.8697	1	9
1	121884	29922	6.7423	161.0268	3	20
1	122201	7335	9.295	510.3208	3	7
3	122258	13658	5.0235	348.961	8	12
1	123063	14749	9.4971	168.6385	1	12
1	124784	17319	4.9211	545.9471	8	26





1	126938	7496	5.4556	183.6879	1	2
1	127285	18626	4.3066	175.8242	7	15
3	128247	9378	5.5792	1374.5000	2	4
210 DAF						
						Peptídeos
Rep.	ID	mW (Da)	pI (pH)	PLGS Score	Peptídeos	Teóricos
2	120121	43608	5.3701	1320.9490	8	25
3	120196	13263	8.0125	632.7524	3	11
2	120242	17156	5.9394	1216.3900	10	14
2	120243	17147	6.0963	765.5245	8	12
2	120523	25822	8.0186	778.4191	3	9
3	120777	27472	4.7651	1809.4990	13	19
3	120912	54139	6.8804	2017.9380	21	29
1	121579	29783	5.9524	303.4189	10	19
3	121870	17800	6.9131	711.9429	14	12
2	122258	13658	5.0235	1190.7670	8	12
2	122584	18745	9.9197	243.6721	8	13
3	123491	20195	4.9063	744.5805	13	14
1	123497	14351	9.3406	371.7265	5	13
1	123928	22194	5.031	389.7162	10	24
1	124703	10926	5.0347	209.1245	3	6
3	124784	17319	4.9211	633.7161	15	26
2	124995	28996	8.5774	444.7728	11	29
1	127041	20998	5.4754	1087.6050	7	10
1	128247	9378	5.5792	409.0975	5	4
1	131575	14176	9.7564	230.2074	3	6
237 DAF						
						Peptídeos
Rep.	ID	mW (Da)	pI (pH)	PLGS Score	Peptídeos	Teóricos

2	120121	43608	5.3701	1389.0890	7	25
1	120777	27472	4.7651	311.9426	7	19
1	121442	25668	9.7522	324.2577	5	22
2	121830	41201	9.4204	387.5762	12	32
3	121870	17800	6.9131	1356.8710	10	12
3	122258	13658	5.0235	388.9761	5	12
1	123497	14351	9.3406	699.5144	2	13
1	124472	22931	5.0314	289.5542	2	12
2	124784	17319	4.9211	478.1583	10	26
2	128247	9378	5.5792	1056.5590	4	4
1	128270	4956	3.752	304.7965	2	2

Os dados apresentados na Tabela 4 mostram que várias proteínas identificadas utilizando-se a metodologia anterior (cromatografia *offline*), também foram identificadas nessas análises.

Uma nova análise das amostras acima descritas foi realizada para validar os dados obtidos, a tabela encontra-se no APÊNDICE A e os novos resultados estão em fase de avaliação.

Tabela 4. Correlação dos peptídeos encontrados nas análises realizadas com o “Protein Lynx”, nas amostras de frutos de café em diferentes estágios de desenvolvimento com a Base de Dados CAFEst (CENARGEN, Brasília-DF), como referência.

Contig					Resultado de Blastp
Contig2681	Green				gi 297745972 CBI16028.3 unnamed protein product [<i>Vitis vinifera</i>]
Contig10670	Green	Yellow	Red	Dark	dbj BAC77694.1 lipid transfer protein [<i>Atriplex nummularia</i>]
Contig412			Red		gi 148278099 ABQ53932.1lipid transfer protein [<i>S. indicum</i>]
Contig8343		Yellow	Red		gi 147853972 CAN79558.1hypothetical protein VITISV_025732 [<i>Vitis vinifera</i>]
Contig17298			Red		gi 147853972 CAN79558.1hypothetical protein VITISV_025732 [<i>Vitis vinifera</i>]
Contig14025		Yellow	Red		gi 269996497 ACZ57583.1 allergenic thaumatin [<i>Olea europaea</i>]
Contig3643			Red	Dark	gi 126078 P09444.1 Late embryogenesis abundant protein;
Contig1050	Green		Red		gi 2979526 AAC61881.111 S storage globulin [<i>Coffea arabica</i>]
Contig16505				Dark	gi 225441872 XP_002278584.1PREDICTED: hypothetical protein [<i>Vitis vinifera</i>]
Contig1509			Red		gi 224071850 XP_002303583.1glutathione peroxidase [<i>Populus trichocarpa</i>]
Contig17485				Dark	gi 67937773 AAY83345.1non-specific lipid transfer protein precursor [<i>Fragaria xananassa</i>]
Contig3197			Red	Dark	gi 84314116 ABC55670.1 dehydrin DH1a [<i>Coffea canephora</i>]
Contig3227		Yellow			gi 224141799 XP_002324250.1 predicted protein [<i>Populus trichocarpa</i>]
Contig4997		Yellow			No hit
Contig3616		Yellow	Red	Dark	gi 89275331 ABD66069.1EMZ08 [<i>Elaeis guineensis</i>]

Contig18563					gi 18750 CAA45126.1 soybean seed maturation polypeptides [<i>Glycine max</i>]
Contig7382		Yellow			gi 32400332 BAC78656.1 beta-primeverosidase [<i>Camellia sinensis</i>]
Contig839					gi 300827456 ADK36668.1 cytosolic class I small heat shock protein 3B [<i>Nicotiana tabacum</i>]
Contig17091					gi 156891145 ABU96710.1 glutaredoxin [<i>Solanum tuberosum</i>]
Contig16605					gi 225446559 XP_002276288.1 PREDICTED: hypothetical protein [<i>Vitis vinifera</i>]
Contig3416					gi 224139610 XP_002323191.1 predicted protein [<i>Populus trichocarpa</i>]
Contig3113					gi 219123955 XP_002182280.1 predicted protein [<i>Phaeodactylum tricornutum</i> CCAP 1055/1]
Contig18204		Yellow			gi 302777019 ADL70200.1 late embryogenesis abundant protein [<i>Solanum lycopersicum</i>]
Contig16104					gi 232275 Q01544.1 class II heat shock protein
Contig10380	Green				gi 298359665 ADI77438.1 Why2 protein [<i>Solanum tuberosum</i>]
Contig17766		Yellow			No hit
Contig13869	Green				No hit
Contig3643					gi 15228768 NP_188888.1 late embryogenesis abundant protein, putative / LEA protein, putative [<i>Arabidopsis thaliana</i>].
Contig16462		Yellow			gi 147818517 CAN67470.1 hypothetical protein VITISV_037818 [<i>Vitis vinifera</i>]
Contig17042	Green	Yellow			gi 229485307 P0C8Y8.1 2S sulfur-rich seed storage protein 2
CC01-TK-PR1-020-O24-RF. F					gi 198276899 ZP_03209430.1 hypothetical protein BACPLE_03104 [<i>Bacteroides plebeius</i> DSM 17135]
CC01-TK-LF1-028-G19-RF.F	Green				No hit

Contig11760				gi 322793620 EFZ17070.1 hypothetical protein SINV_02818 [<i>Solenopsis invicta</i>]
Contig16441				gi 224131982 XP_002321226.1 predicted protein [<i>Populus trichocarpa</i>]

5.3 Comparação entre os métodos utilizados para a identificação de proteínas

De acordo com os resultados apresentados, pode-se afirmar que o método de cromatografia (*online*) acoplada ao espectrômetro de massa, mostrou-se superior na identificação de um número maior de peptídeos e, conseqüentemente, proteínas. Essa superioridade está relacionada ao fato desse método agregar duas técnicas simultâneas, possibilitando uma melhor separação dos analitos, evitando-se perdas e na identificação de mais componentes da amostra.

Trinta e quatro peptídeos puderam ser identificados e caracterizados utilizando-se as análises do “Protein Lynx”, sendo trinta e três deles correspondentes a proteínas distintas, ao passo que por cromatografia *offline* e espectrometria de massa, foram identificados apenas vinte e sete peptídeos sendo doze deles, proteínas distintas.

Ambos os métodos se mostraram extremamente eficazes na identificação de proteínas já relatadas em estudos anteriores e que apresentam alta abundância em grãos de café. Neste trabalho, a proteína mais abundante encontrada foi a globulina 11 S. Isso se deve ao fato de que a 11 S é a proteína mais abundante encontrada nos grãos de café, perfazendo cerca de 45% das proteínas totais e 5-7% da matéria seca. Rogers et. al. (1991), observaram ainda que esta proteína é formada por uma subunidade α (ácida) e outra β (básica) com aproximadamente 33 e 24 KDa, respectivamente, derivadas de um único precursor e ligadas por uma ponte dissulfeto. A subunidade β é, normalmente,

altamente conservada e possui duas cisteínas adicionais que podem formar ligações intermoleculares adicionais. O fruto de café contém tecidos especializados para a deposição de proteínas de reserva durante a maturação, as quais constituem a maior parte das proteínas encontradas nos grãos após o desenvolvimento. (ACUÑA et al., 1999).

Outro grupo de proteínas encontrado em abundância foram as dehydrinas. As dehydrinas estão envolvidas na proteção das células vegetais contra a desidratação (CLOSE, 1996; ALLAGULOVA et al, 2003). As dehydrinas também participam em outros aspectos específicos e importantes nos grãos, se associando a outras proteínas e auxiliando na aclimatação dos tecidos dos grãos ao menor teor de água. Presume-se também que as dehydrinas sintetizadas durante a maturação das sementes continuam a estabilizar as estruturas celulares associadas à quiescência das sementes (CLOSE, 1996; NYLANDER et al, 2001). Maccarthy et al. (2006) isolaram 5 cDNAs que codificam dehydrinas e avaliaram o padrão de expressão dessas proteínas em diferentes tecidos embrionários e estágios de maturação em *C. canephora* P. e *C. arabica* L. Dois, dos cinco cDNAs isolados apresentaram sequências primárias de aminoácidos relativamente diferentes e classificados como Y3SK2 com base na distribuição de Y (tirosina), S (serina) e K (lisina) das respectivas sequências, apresentando também padrões de expressões semelhantes durante a fase posterior ao desenvolvimento do grão.

A metodologia também foi eficaz na identificação da Proteína de transferência de lipídeos (LTP). Essas proteínas estão divididas em duas subfamílias com massas moleculares de 9 kDa (LTP1s) e 7 kDa (LTP2s). As LTPs são formadas principalmente de um segmento α -hélice (40% do total de estruturas secundárias) ligado por pontes dissulfeto. Há também uma cavidade interna hidrofóbica, formando um local adequado para a interação entre a cadeia alifática dos lipídeos e os resíduos hidrofóbicos expostos. Esta família de

proteínas é caracterizada por facilitar a transferência de lipídeos entre as membranas naturais ou artificiais. No entanto, não está bem documentado ainda, a sua participação efetiva no fluxo intracelular dos lipídeos. Várias funções têm sido sugeridas a esta família, como por exemplo, participação na formação da cutícula e embriogênese, no estabelecimento de relações simbióticas, na adaptação das plantas a diversas condições ambientais como temperatura, umidade e salinidade e, finalmente, na defesa contra patógenos uma vez que possui propriedades antimicrobianas. Devido a essa baixa especificidade, LTPs também são chamadas "proteínas de transferência não específica de lipídeos" (TERRAS et al., 1992; MOLINA et al., 1993; SEGURA et al., 1993; GARCIA-OLMEDO et al. 1998; CARVALHO et al., 2001).

5.4 Detecção do composto fenólico arbutina em frutos de café

A fim de se conseguir reprodutibilidade entre os cromatogramas das amostras e do padrão foram testados diferentes parâmetros. O primeiro parâmetro a ser testado foi a utilização de diferentes fluxos de eluição em ordem decrescente 0,3; 0,2 e 0,1. Percebeu-se que quanto menor o fluxo mais difícil foi eluir as amostras. Dois diferentes métodos de eluição também foram testados, sendo o gradiente e o isocrático com diferentes tempos de corrida. O método de eluição gradiente com duração de 18 minutos foi o que obteve uma melhor eluição das amostras. Várias corridas cromatográficas foram feitas a fim de se otimizar o experimento e tornar os cromatogramas reprodutíveis, assim como um bom condicionamento da coluna. Primeiramente realizou-se a eluição somente da amostra padrão (arbutina) com o intuito de se conhecer o tempo de retenção da amostra. Depois foram feitas análises cromatográficas somente do extrato bruto fenólico que quando comparado com o cromatograma da amostra padrão indicava que naquele tempo de retenção não era eluído nenhum

composto similar ao da arbutina. Depois, adicionou-se ao extrato fenólico a arbutina industrial para se comparar com os cromatogramas que continham somente o extrato fenólico bruto.

As Figuras de 1 a 5 representam os cromatogramas das amostras 150 e 210 DAF (pericarpo e endosperma) e 237 DAF (endosperma). O pico em vermelho corresponde a arbutina comercial, os cromatogramas **A** representam o extrato fenólico bruto e **B** o extrato fenólico contendo a arbutina comercial.

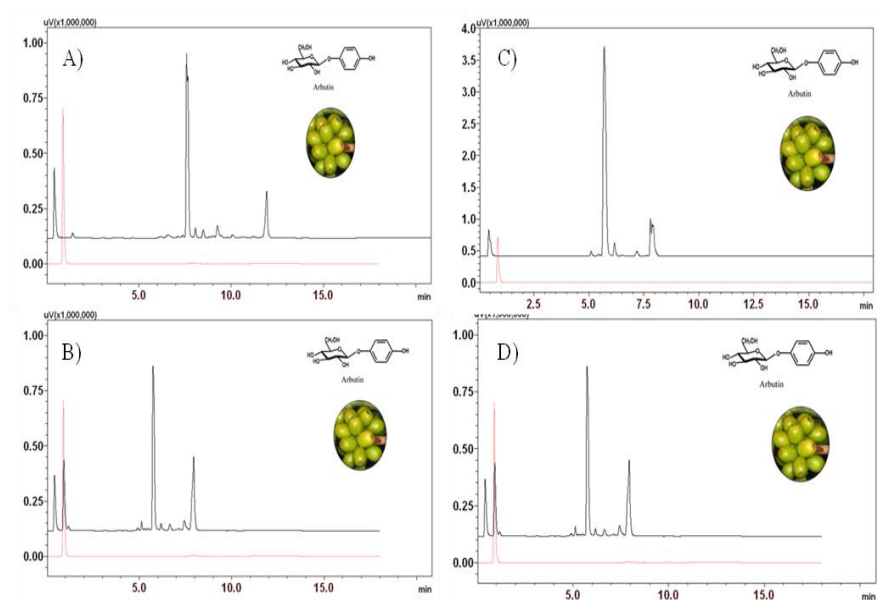


Figura 22. Fracionamento do extrato fenólico do pericarpo (22. A-B) e endosperma (22. C-D), respectivamente, da amostra 150 DAF de *C. arabica* L. var. I59 por UFLC em fase reversa utilizando uma coluna analítica de fase reversa C_{18} (Shimpack XR-ODS 2.0 mm i.d. x 30 mm) em um gradiente de eluição de 2-80% **B** (AcN + TFA 0,1%-FMB). Os cromatogramas (A) e (C) representam a eluição do extrato fenólico bruto comparado com a eluição da arbutina comercial (pico em vermelho). Os cromatogramas (B) e (D) representam a eluição do extrato fenólico contendo a arbutina comercial comparado com a eluição da arbutina comercial (pico em vermelho).

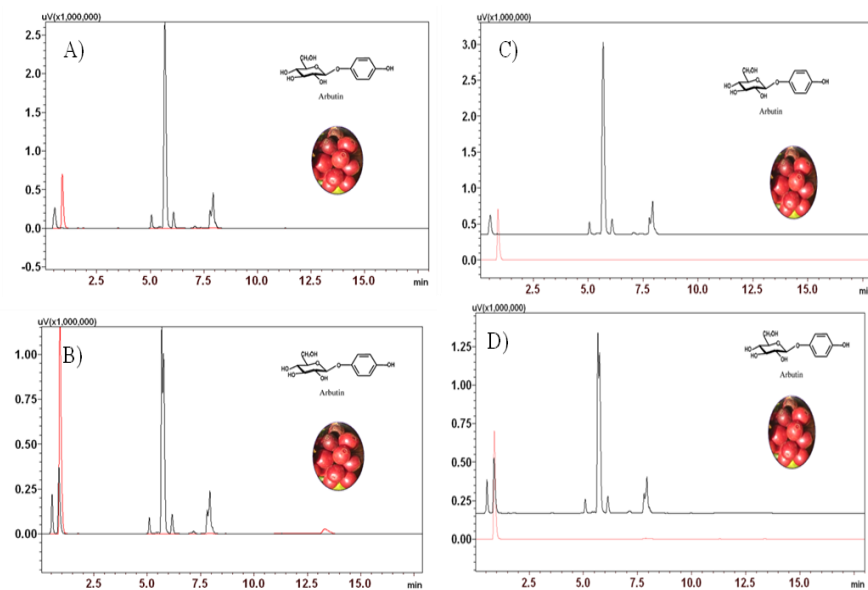


Figura 23. Fracionamento do extrato fenólico do pericarpo (23. A-B) e endosperma (23. C-D), respectivamente, da amostra 210 DAF, de *C. arabica* L. var. I59 por UFLC em fase reversa utilizando uma coluna analítica de fase reversa C_{18} (Shimpack XR-ODS 2.0 mm i.d. x 30 mm) em um gradiente de eluição de 2-80% **B** (AcN + TFA 0,1%-FMB). Os cromatogramas (A) e (C) representam a eluição do extrato fenólico bruto comparado com a eluição da arbutina comercial (pico em vermelho). Os cromatogramas (B) e (D) representam a eluição do extrato fenólico contendo a arbutina comercial comparado com a eluição da arbutina comercial (pico em vermelho).

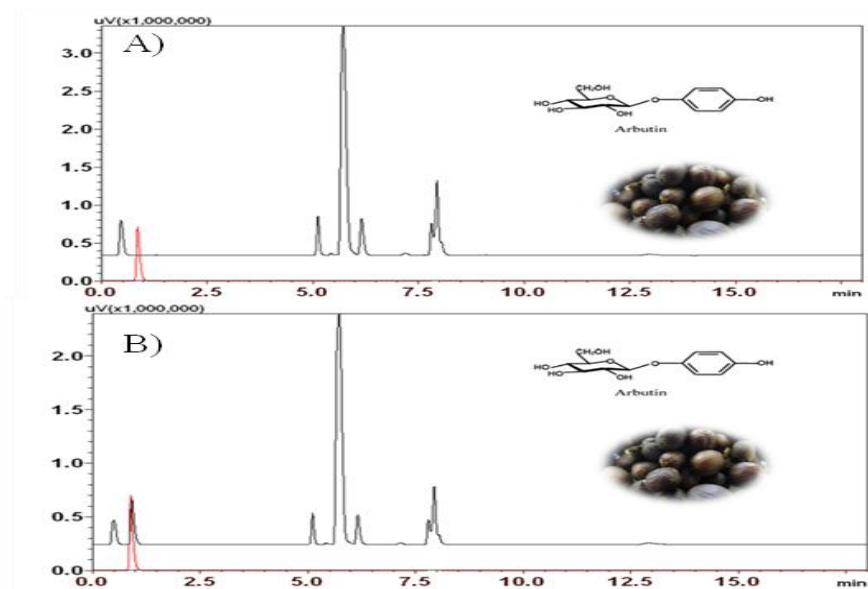


Figura 24. Fracionamento do extrato fenólico do endosperma 237 DAF de *Coffea arabica* L var. I59 por UFLC em fase reversa utilizando uma coluna analítica de fase reversa C₁₈ (Shimpack XR-ODS 2.0 mm i.d. x 30 mm) em um gradiente de eluição de 2-80% B (AcN + TFA 0,1%-FMB). O cromatograma (A) representa a eluição do extrato fenólico bruto comparado com a eluição da arbutina comercial (pico em vermelho). O cromatograma (B) representa a eluição do extrato fenólico contendo a arbutina comercial comparado com a eluição da arbutina comercial (pico em vermelho).

A arbutina comercial foi utilizada como controle para identificar o tempo de retenção deste composto nas análises cromatográficas. Os resultados apresentados (Figuras, 22-24), indicam que de acordo com a metodologia utilizada não foi possível identificar a presença da arbutina em nenhum dos tecidos (pericarpo e endosperma) e estágios de desenvolvimento testados. Apesar dos resultados, acredita-se que a arbutina seja sintetizada pela mesma via biossintética dos ácidos clorogênicos, a via dos fenilpropanóides. A arbutina tem sido descrita como um metabólito importante na tolerância de plantas em resposta a condições de estresses ambientais (bióticos e abióticos), como infecção por patógenos microbianos, injúria mecânica, e UV excessiva ou de

alto nível de luz visível (HERRMANN, 1995; HAARD e CHISM, 1996; CROWE et al., 2002). Esse mecanismo é perfeitamente ilustrado na espécie *Myrothamnus flabellifolia*, conhecida popularmente como planta da ressurreição.

Ainda, podemos concluir que esse composto fenólico pode estar associado ou complexado a outras moléculas, o que alteraria o perfil de eluição desta molécula, quando comparado ao controle padrão. Estudos posteriores para avaliar esta hipótese necessitam ser realizados.

6 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

As análises realizadas neste trabalho tiveram por objetivo o desenvolvimento de novas metodologias de caracterização do perfil protéico e metabólico de frutos de café em diferentes estágios de desenvolvimento, visando-se propiciar um arcabouço metodológico que permita a realização de estudos posteriores para um melhor entendimento da relação entre a composição bioquímica do grão verde de café e a qualidade final de bebida.

Os resultados apresentados nos permitem concluir que as técnicas utilizadas abrem boas perspectivas para uma melhor compreensão das alterações proteômicas que ocorrem durante os diferentes estágios de desenvolvimento e maturação dos grãos de café. Foi demonstrado neste trabalho que proteínas abundantes previamente descritas em grãos de café, puderam ser identificadas além de outras ainda não descritas. Entretanto, ajustes metodológicos ainda se fazem necessários para permitir a identificação de um número bem maior de proteínas, especialmente aquelas de menor abundância. Neste sentido, pode-se sugerir tentativas de remoção das albuminas por imunoafinidade ou outros métodos de precipitação e preparo dos extratos. Da mesma forma, novos parâmetros de corrida nas análises com a cromatografia (*online*) acoplada à espectrometria de massa, podem ser testados, visando-se uma melhor separação dos peptídeos trípticos e conseqüentemente a obtenção de melhores resultados.

Com relação às análises de metabólitos, especificamente do composto fenólico arbutina, a metodologia utilizada não foi eficiente em detectar moléculas com características similares ao padrão de referência, nos extratos obtidos das amostras de frutos de café em diferentes estágios de desenvolvimento. Este fato pode ser devido à arbutina realmente não fazer parte da composição bioquímica do fruto do café. Entretanto, ainda existe a

possibilidade deste composto estar complexado com outras moléculas, e estudos posteriores para se avaliar esta hipótese ainda se fazem necessários.

REFERÊNCIAS

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

AEBERSOLD, R. H.; MANN, M. Mass spectrometry-based proteomics. **Nature**, London, v. 422, n. 6928, p. 198-207, Mar. 2003.

ALLAGULOVA, C. R. et al. 2003. The plant dehydrins: structure and putative functions. **Biochemistry**, Moscow, v. 68, p.945–951, 2003.

ALZUGARAY, D.; ALZUGARAY, C. Flora brasileira. São Paulo: Grupo de Comunicação Três, 1984

ALZUGARAY, D.; ALZUGARAY, C. Flora brasileira. São Paulo-SP: Três Livros, 1984. se for livro falta edição editora.

AMORIM, H. V. **Aspectos bioquímicos e histoquímicos do grão de café verde relacionados com deterioração da qualidade**. 1978. P. 85. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 1978.

ANTHONY, F.; BERTRAND, B.; QUIROS, O.; WILCHES, A.; LASHERMES, P.; BERTHAUD, J.; CHARRIER, A. Genetic diversity of wild coffee (*Coffea arabica* L.) using molecular markers. **Euphytica**, Dordrecht, v.118, n.1, p.53-65, 2001

ASHCROFT, A. E. Protein and peptide identification: the role of mass spectrometry in proteomics. **Natural Product Reports**, v.20, n.2, p.202-215, 2003.

Associação Brasileira da Indústria do Café Disponível em <http://www.abic.com.br/publique/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=38>. Acesso em: 15 jan. 2011.

BANDIL, G.B. **Análise proteômica comparativa do fruto de café (*Coffea arabica*) em dois estágios iniciais de desenvolvimento**. Universidade Estadual de Ponta Grossa, (Dissertação em Agronomia), 2008.

BARROS, R. S.; MAESTRI, M.; COONS, M. P. The physiology of flowering in coffee: a review. **Journal of Coffee Research**, Balehonnur, v. 8, n. 2/3, p. 29-73, 1978.

BERTHAUD, J.; CHARRIER, A. Genetic resources of *Coffea*. In: CLARKE, R. J.; MACRAE, R. (Eds.) **Coffee**. London: Elsevier Applied Science, 1988. v. 4, p.1-42.

BLACKSTOCK, W. P.; WEIR, M. P. (1999).Proteomics: quantitative and physical mapping of cellular proteins. **Trends in Biotechnology**, v.17, n.3, p.121-127, 1999.

BORÉM, F. M. (Ed.). Pós-colheita do café. Lavras: UFLA, 2008.

BRIDSON, D. M. Nomenclatural notes on *Psilanthus*, including *Coffea* sect. *Paracoffea* (Rubiaceae tribe Coffeae). **Kew Bulletin**, v. 42, n. 2, p.453-460, 1987.

BRIDSON, D. M. VERDCOURT, B. Flora of tropical East África – Rubiaceae (Part 2). Poehill R. M. (eds), 727 p. 1988.

BURLINGAME, A. L.; BOYD, R. K.; GASKELL, S. J. Mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, Columbus, v. 70, n. 12, p 647R-716R, June 1998.

CAHILL, D. J. et al. Bridging genomics and proteomics. In: PENNINGTON, S. R; DUNN, M. J. Proteomics from protein sequence to function. **BIOS Scientific Publishers Limited**, p.1-22, 2001.

CAMARGO, A. P. de; CAMARGO, M. B. P. Definição e esquematização das fases fenológicas do cafeeiro arábica nas condições tropicais do Brasil. **Bragantia**, Campinas, v. 60, n. 1, p. 65-68, jan./abr. 2001.

CAMARGO, A. P.de. Florescimento e frutificação de café arábica nas diferentes regiões (cafeeiras) do Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 20, n. 7, p.830-839, jul. 1985.

CARVALHO, A. et al. Aspectos genéticos do cafeeiro. **Revista Brasileira de Genética**, Ribeirão Preto, v. 14, n. 1, p. 135-183, 1991.

CARVALHO, V. D. de ; CHALFOUN, S. M.; CHAGAS, S. J. de R. Fatores que afetam a qualidade do café. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 18, n. 187, p. 5-20, 1997.

CARVALHO, V. D. de; CHALFOUN, S. M. Aspectos qualitativos do café. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 11, n. 126, p. 79-92, 1985.

CASS, Q. B.; DEGANI, A. L. G.; Desenvolvimento De Métodos Por HPLC,Fundamentos, Estratégias e Validação. Editora da Ufscar. 2001.

CHARRIER, A.; BERTHAUD, J. Principles and Methods in Coffee Plant Breeding: *Coffea canephora* Pierre. In: Clarke,R.J. and Macrae, R.(eds). **Coffe: Agronomy**. London, v. 4, p.167-197,1988.

CHEVALIER, A. Iconographie des caféiers sauvages et cultivés et des Rubiacées prises pour des caféiers. **Les caféiers du Globe**, Lechevalier, p. 36p, 1942.

CLARKE, R. J.; MACRAE, R. Coffee chemistry. Essex: Elsevier Science, 1985. v.1.

CLIFFORD, M. N. Chemical and physical aspects of green coffee and coffee products. In: CLIFFORD, M. N, WILLSON, K.C (eds), Coffee: botany, biochemistry and production of beans and beverage, **Avi Publishing Company**, Westport, Connecticut, USA, p.305-374, 1985..

CLIFFORD, M. N. Chlorogenic acids and other cinnamates – nature, occurrence, dietary burden, absorption and metabolism. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, n.80, p.1033–1043, 2000.

CLIFFORD, M. N. Chlorogenic acids and other cinnamates nature, occurrence and dietary burden. **Journal of Science Food and Agriculture**, London, v. 79, n. 3, p. 363-372, Mar. 1999.

CLOSE T. Dehydrins: emergence of a biochemical role of a family of plant dehydration proteins. **Physiologia Plantarum**, v. 97, p.795–803, 1996.

Companhia Nacional de Abastecimento. **Avaliação da Safra Agrícola Cafeeira 2008/2009**. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>>. Acesso em:13dez. 2010.

CUI, T.; NAKAMURA K, M.A. L.; LI, J.-Z.; KAYAHARA, H. Analyses of arbutin and chlorogenic acid, the major phenolic constituents in oriental pear. **J. Agric. Food Chem.**v. 53, p. 3882-3887, 2005.

DAGLIA, M.; PAPETTI, A.; GREGOTTI, C.; BERTÈ, F.; GAZZANI, G. In vitro antioxidant and ex vivo protective activities of green and roasted coffee. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.48, n.5, p.1449-1454, 2000.

DAMATTA, F. M. et al. Ecophysiology of coffee growth and production. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Londrina, v. 19, n. 4, p. 485-510, 2007.

DAMATTA, F. M.; RENA, A. B.; CARVALHO, C. H. S de. Aspectos fisiológicos do crescimento e da produção do cafeeiro. In: CARVALHO, C. H. S de. **Cultivares de café: origem, características e recomendações**. Brasília, Embrapa-Café, 2008.

DE CASTRO, R.; MARRACCINI, P. Cytology, biochemistry and molecular changes during coffee fruit development. **Brazilian Journal Plant Physiology**, v. 18, p.175-199, 2006.

DILLARD, C.J.; BRUCE GERMAN, J. Phytochemicals: Nutraceuticals and human health. **Journal of the Science of Food and Agriculture** . v.80, n. 12, p. 1744-1756, 2000.

DOLAN, J.; SNYDER, L.; *Troubleshooting HPLC Systems*, **Humana Press**, Clifton, 1989

EDMAN, P. A method for the determination of the amino acid sequence of peptides. **Archives of biochemistry and biophysics**, Amsterdam, v. 22, p. 475-483, 1949.

FARAH, A.; DONANGELO, C.M. Phenolic compounds in coffee. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v.18, p.23-26, 2006.

FENN, J. B. et al. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. **Science**, New York, v. 246, p. 64-71, Oct. 1989.

FOUNTOULAKIS, M. et al. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. **Proteomics**, v. 4, p. 3665-3685, 2004.

FRANCA, A. S.; MENDONÇA, J. C. F.; OLIVEIRA, S. D. Composition of green and roasted coffees of different cup qualities. **Lebensmittel-Wissenschaft und technologie (LWT)**, v. 38, p. 709–715, 2005

GALPERIN, M. Y.; KOLKER, E. (2006).New metrics for comparative genomics. **Curr Opin Biotechnol**, v.17, n. 5, p.440-447, 2006.

GEROMEL, C. **Metabolismo da sacarose em frutos de café. Campinas**, 2006. p.78. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal)–Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia, Campinas, SP, 2006.

GODOVAC-ZIMMERMANN, J; BROWN, L. R. Perspectives for mass spectrometry and functional proteomics. **Mass Spectrometry Reviews.**, v. 20, p. 1-57, 2001.

GÖRG, A. et al. The current state of two-dimensional eletrophoresis with immobilized ph gradients. **Electrophoresis**, v. 21, n. 6, p. 1037-1053, 2000.

GÖRG, A.; et al. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. **Electrophoresis**, Weinheim, Germany, v. 21, p. 1037-1053, 2000.

GRANER, E. A.; GODOY JUNIOR, C. **Manual do cafeicultor**. Ed. Universidade de São Paulo. SP. 320, p. 1967.

GRAVES, P. R.; HAYSTEAD, T. A. (2002).Molecular biologist's guide to proteomics. **Microbiol Mol Biol Rev**, v.66, n.1, p.39-63, 2002.

GRIFFIN, T. J. et al. Advances in proteome analysis bymass spectrometry. **Curr Opin Biotechnol**, v.12, n.6, p.607-612, 2001.

GUERRERO, G.; SUÁREZ, M.; MORENO, G. Chlorogenic acids as a potential criterion in coffee genotype selections. **J. Agric. Food Chem.** v.49, p. 2454-2458, 2001.

HEIM, K.E.; TAGLIAFERRO, A.R.; Bobilya, D.J. Flavonoid antioxidants: Chemistry, metabolism and structure-activity relationships. **Journal of Nutritional Biochemistry**. v.13, n.10, p. 572-584, 2002.

HERALD, P.J.; DAVIDSON, P.M. Antibacterial activity of selected hydroxycinnamic acids. **J. Food Sci.**, v. 48, p. 1378-1379, 1983.

HERBERT, B. R. Advances in protein solubilisation for two-dimensional electrophoresis. **Electrophoresis**, Weinheim, Germany, v. 20, p. 660-663, 1999.

HERBERT, B. R. et al.. What place for polyacrylamide in proteomics? **Trends in Biotechnology**, Oxford, v. 19 (Supplement), p. 3-9, 2001.

HERMANN, K. M. The shikimate pathway as an entry to aromatic secondary metabolism. **Plant Physiol**. v.107, n.1, p.7-12, 1995.

HILDEBRAND, D.C.; SCHROTH, M.N. Relation of arbutin-hydroquinone in pear blossoms to invasion by *E. amylovora*. **Nature**. v.197, p. 513, 1963.

HINNIGER, C. et al. "Isolation and characterization of cDNA encoding three dehydrins expressed during *Coffea canephora* (Robusta) grain development." **Ann Bot.**, Londres, v. 97, n. 5, p.755-65, 2006.

KARAS, M.; HILLENKAMP, F. Laser desorption ionization of proteins with molecular mass exceeding 10.000 daltons. **Analytical Chemistry**, Columbus, v. 60, n. 20, p.2299-2301, Oct. 1988.

KLOSE, J. Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals. **Humangenetik**, Berlin, v. 26, n. 3, p. 231-243, 1975.

KUNITANI, M.; JOHNSON, D. Model of Protein Conformation in the Reversed-Phase Separation of Interleukin-2 Muteins. **Journal of Chromatography**, v. 371, p. 313-333, 1986.

KY, C.L. et al. Caffeine, trigonelline, chlorogenic acids and sucrose diversity in wild *Coffea arabica* L. and *C. canephora* P. accessions. **Food Chem.** 75: 223-230, 2001.

LANÇAS, F.M.; MCNAIR, H.M. **Quim. Nova**, v.6,1983.

LARSEN, M. R. et al. Graphite powder as an alternative or supplement to reversed-phase material for desalting and concentration of peptide mixtures prior to matrix-assisted laser desorption/ionization-mass spectrometry. **Proteomics**, v. 2, p.1277-1287, 2002.

LASHERMES, P.; COMBES, M.C.; PRAKASH, N.S.; TROUSLOT, P.; LOURIEUX, M.; CHARRIER, A. Genetic linkage map of *Coffea canephora*: effect of segregation distortion and analysis of recombination rate in male and female meioses. **Genome**, v.44, p.589-596, 2001.

LEROY, T. et al, 2006. Genetics of coffee quality. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v., n.18, p. 229–242, 2006.

LIN, D., D. L. et al. Large-scale protein identification using mass spectrometry. **Biochim Biophys Acta**, v. 1646, n. 1-2, p.1-10, 2003

LIVRAMENTO, K.G. **Proteômica diferencial de café arábica submetido a diferentes processamentos e secagem**. Larvas: UFLA,. (Dissertação em Biotecnologia Vegetal), 2008

LOPES, L. M .V. **Avaliação da Qualidade de grãos crus e torrados de cultivares de cafeeiro (*Coffea arabica* L.)**. Larvas: UFLA, 2000. p 95. (Dissertação em Ciência dos Alimentos), UFLA, 2000.

MANN, M., R. C. et al. Analysis of proteins and proteomes by mass spectrometry. **Annual Review of Biochemistry**, v. 70, n.1, p.437-473, 2001.

MARIN-LOPEZ, S. M. et al. Cambios físicos y durante la maduración del fruto de café (*Coffea arabica* L. var. Colombia). **Cenicafé**, Chinchiná, v. 54, n. 3, p. 208-225, 2003.

MARRACCINI, P. et al. Molecular and biochemical characterization of endo- β -mannanases from germinating coffee (*Coffea arabica*) grains. **Planta**. v. 214, p.296-308, 2001.

MATIELLO, J. B. **Café: do cultivo ao consumo**. São Paulo: Globo, p.320, 1991.

MENDES, A.J.T.; BACCHI, O. Observações citológicas em *Coffea* V. Uma variedade haplóide (dihaploide) de *C. arabica* L. **Jornal da Agronomia**, v. 3, n. 3, p.183-207, 1940.

MENEZES, H. C. Variação dos monoisômeros e diisômeros do ácido cafeoilquínico com maturação de café. Campinas: UNICAMP,. 171p.(Tese – Doutorado em Tecnologia de Alimentos), 1994.

MOLINA, A.; Segura, A. and Garcia-Olmedo, F. Lipid transfers proteins (nsLTPs) from barley and maize leaves are potent inhibitors of bacterial and fungal plant pathogens. **FEBS Lett.**, v. 316, p.119-122, 1993.

MÔNACO, L. C.; CARVALHO, A.; ROCHA, T.R. Melhoramento do cafeeiro: XXVIII. Experimento de seleções regionais em Mococa. **Bragantia**, Campinas, v.24, n.2, p.9-27, 1965.

MORAIS, H. et al. Escala fenológica detalhada da fase reprodutiva de *coffea arabica*. **Bragantia**, Campinas, v. 67, n. 1, p. 257-260, 2008.

MUSCHLER, R. Shade improves coffee quality in a sub-optimal coffee zone of Costa Rica. **Agroforestry systems**, Dordrecht, v.51, n. 2, p. 31-139, Apr. 2001.

NESATY, V.J.; SUTER, M.J.F. Analysis of environmental stress response on the proteome level. **Mass spectrometry Reviews**, v.27, p.556-574, 2008.

NEVES, C. A. - Estória do Café. **Instituto Brasileiro do Café**, Rio de Janeiro, 52p, 1974.

NYCHAS, G.J.E. Natural antimicrobials from plants. In: GOULD, G.W. (Ed.). *New methods of food preservation*. Londres: **Blackie Academic & Professional**, p. 59-87, 1995.

NYLANDER, M. et al. Stress-induced accumulation and tissue-specific localization of dehydrins in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Molecular Biology**, v. 45, p.263–279, 2001.

O'FARREL, P. H. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. **The Journal Of Biological Chemistry**, Bethesda, MD, v. 250, n. 10, p. 4007-4021, May 1975.

OLIVER A.E. Interactions of arbutin with dry and hydrated bilayers. **Biochim. Biophys. Acta.**v. 1370, p. 87-97, 1998.

OLIVER, A.E. Arbutin inhibits PLA2 in partially hydrated model systems. **Biochim. Biophys. Acta.** v.1302, p. 69-78, 1996

Organização Internacional do Café ., 2009 Disponível em: <http://www.ico.org>. Acesso em: jul 2010.

ORMOND, J. G. P.; PAULA, S. R. L.; FAVERET FILHO, P. Café (re)conquista de mercados. BNDES Setorial, Rio de Janeiro, n. 10, p. 3-56, set. 1999.

PANDEY, A. MANN, M. Proteomics to study genes and genome. **Nature**. v.405, n.6788, p. 837-46. 2000.

PEZZOPANE, J. R. M. et al. Escala para a avaliação de estádios fenológicos do cafeeiro arábica. **Bragantia**, Campinas, v. 62, n. 3, p. 499-505, 2003.

RABILLOUD, T. 2002. Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: old, old fashioned, but still climbs up the mountains. **Proteomics**, v.2, p.3-10, 2002.

RABILLOUD, T. Solubilization of proteins for electrophoresis analysis. **Electrophoresis**, v. 17, p. 813-829, 1996.

RENA, A. B.; MAESTRI, M. Ecofisiologia do cafeeiro. In: CASTRO, P. R. C.; FERREIRA, S. O.; YAMADA, T. **Ecofisiologia da produção agrícola**. Piracicaba: Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato, p. 119-147, 1987.

RENA, A. B; BARROS, R. S; MAESTRI, M. Desenvolvimento reprodutivo do Cafeeiro. In: ZAMBOLIN, L. (Ed.). **Tecnologias de produção de café com qualidade**. Viçosa, MG: UFV, Departamento de Fitopatologia,. p. 101- 127, 2001.

RIBEIRO, F. R. Identificação e caracterização de cDNAs expressos diferencialmente durante a maturação dos frutos *de Coffea arabica* L.Universidade Estadual de Campinas,SP, 2004. (Dissertação em Biologia Celular), 2004.

RIVIER, J.; MCCLINTOCK R. Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography of Insulins from Different Species. **Journal of Chromatography**, v. 268, p. 112–119, 1983.

ROCHA, T. L. Et. Al. Eletroforese bidimensional e analise de proteomas. **Comunicado Técnico**, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, n. 136, p. 1- 12, 2005.

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

SALAZAR, G.M.R.et al. Studio morfológico, anatômico y ultraestrutural Del fruto de café *Coffea arábica* L. **Cenicafé**, Caldas, v. 45, n. 3, p. 93-105, 1994.

SARRAZIN, C. et al. Representativeness of coffee aroma extracts: a comparison of different extraction methods, **Food Chemistry**, v.70, p.99-106, 2000.

SCALBERT, A.; JOHNSON, I.T.; SALTMARSH, M. Polyphenols: antioxidants and beyond. **Am. J. Clin. Nutr.** 81(suppl): 215S-217S, 2005.

SCARBOROUGH, R. M. et. al. - Isolation and primary structure of two peptides with cardio acceleratory and hyperglycemic activity from the corpora cardiaca of *Periplaneta americana*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 81, p. 5575–5579, 1984.

SCHINDLER, G. et al. Urinary excretion and metabolism of arbutin after oral administration of *Arctostaphylos uvae ursi* extract as film-coated tablets and aqueous solution in healthy humans. **J. Clin. Pharmacol.** v.42, p. 920-927, 2002.

SEGURA, A.; MORENO, M.; GARCIA-OLMEDO, F. Purification and antipathogenic activity of lipid transfer proteins (LTPs) from the leaves of *Arabidopsis* and spinach. **FEBS Lett**, v. 332, p. 243-246, 1993.

SHEWRY, P. R.; NAPIER, J.A.; TATHAM, A.S. Plant storage proteins. **The Plant Cell**, v. 7, n. 7, p. 945-956, July 1995.

SPEICHER, D. W. Overview of proteome analysis. In: D. W. Speicher (Ed.). Proteome Analysis. Overview of proteome analysis. **Interpreting the Genome**, p.375, 2004.

STEEN, H., MANN, M. The ABC's (and XYZ's) of peptide sequencing. **Nature Reviews-Molecular Cell Biology**, London, UK, v. 5, n. 9, p. 699-711, Sept. 2004

SUAU, R., et al., Arbutin and sucrose in the leaves of the resurrection plant *Myrothamnus flabellifolia*. **Phytochemistry** . v.30, n.8, p.2555–2556, 1991.

TEMPST, P. et al. Microscale Structure Analysis of a High Molecular Weight, Hydrophobic Membrane Glycoprotein Fraction with Platelet-Derived Growth Factor-Dependent Kinase Activity. **Journal of Chromatography**, v. 359, p. 403–412, 1986.

TERRAS, F. R. G. et al. Analysis two novel classes of plant antifungal proteins from radish (*Raphanus sativus L.*) seeds. **J. Biol. Chem**, v. 267, p.15301-15309, 1992.

TOKIWA, Y. et al. Enzymatic synthesis of arbutin undecylenic acid ester and its inhibitory effect on melanin synthesis. **Bioorg Med Chem Lett**. v. 17, p. 3105-3108, 2007.

Tong, J., S. Liu, et al. "A novel descriptor of amino acids and its application in peptide QSAR." **J Theor Biol** v. 253, n. 1, p. 90-97, 2008.

TSWETT, M. Ber. Deut. **Botan. Gesell**, .24, n.316,1906

TSWETT, M. Naturatistes Varisovic. **Trav. Sol**, v.14, 1903.

WANG, W., M. et al. Protein extraction for two-dimensional electrophoresis from olive leaf, a plant tissue containing high levels of interfering compounds." **Electrophoresis**, v.24, n. 14, p.2369-75, 2003.

WILKINS, M. R., C. et al. From proteins to proteomes: large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis. **Biotechnonology**, New York, v.14, n.1, p.61-65, 1996.

WITTMANN-LIEBOLD, B., H.-R. et al. Two-dimensional gel electrophoresis as tool for proteomics studies in combination with protein identification by mass spectrometry. **Proteomics**, n.6, p.4688-4703, 2006.

ANEXO ADigestão enzimática das proteínas totais para análises LC- MS/MS:

1. Coloque 50 μL de amostra (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) em um microtubo para microcentrífuga.
2. Adicione 10 μL de Bicarbonato de Amônio (NH_4HCO_3) (50 mM).
3. Adicione 25 μL de solução RapiGest 0.2% (Waters) e homogeneizar em vórtex.
4. Coloque as amostras em um banho seco a 80 °C por 15 minutos.
5. Remova do banho seco e centrifugue. Adicione 2.5 μL de DTT (100 mM) e leve ao vórtex.
6. Coloque as amostras em um banho seco a 60 °C. Aqueça por 30 minutos.
7. Remova as amostras do banho seco, deixe esfriar a temperatura ambiente e centrifugue.
8. Adicione 2.5 μL de iodoacetamida (300 mM) e leve ao vórtex.
9. Coloque as amostras em um local escuro a temperatura ambiente por 30 minutos.
10. Adicione 10 μL da enzima Tripsina (Promega) preparada na concentração de 50 mM em NH_4HCO_3 , e leve ao vórtex. As amostras serão digeridas em um banho seco a 37 °C, *overnight*.
11. Após a digestão, para hidrolisar o RapiGest, adicione 10 μL de TFA 5% e leve ao vórtex. Incube as amostras a 37 °C por 90 minutos. Centrifugue a 14,000 rpm (6 °C) por 30 minutos. Transfira o sobrenadante para os tubos de amostra (Waters, PART n°. 186000385).
12. Adicione 5 μL de ADH (1 pmol/ μL)(Alcohol Dehydrogenase, PART n°. 186002328). Então, adicione 85 μL de acetonitrila 3% + ácido fosfórico 0.1%. A concentração final da proteína deverá estar em 250 ng/ μL e o ADH em 25 fmol/ μL . O volume final do vial deverá estar em 200 μL .

APÊNDICE A

Tabela 5. Resultados obtidos das análises realizadas com o software “Protein Lynx”, a partir dos dados coletados por espectrometria de massa da amostra de peptídeos trópticos de endosperma do fruto de café (150 DAF). A tabela mostra o número de identificação do “Hit” na base de dados (ID), massa molecular (mW), ponto isoelétrico (pI), “Protein Lynx Global Server” (PLGS score), nº de peptídeos identificados conforme o íon precursor (Pep), peptídeos teóricos *in silico* (Pep Teor.), cobertura (cov.), quantificação em fmol e ngmol e similaridade das proteínas.

150 DAF (ID)	mW (Da)	pI	PGLS Score	Pep.	Pep. Teor.	Cov. (%)	Amo. (fmol)	Amo. (ngmol)	Proteína
120121	43608	5.4	1208.2	11	25	11.3	961.1819	41.6208	lipid transfer protein 3 (LTP 3) identical to lipid transfer protein 3 from <i>Arabidopsis thaliana</i> [gi:8571921]
120912	54139	6.9	21799.6	40	29	51.7	310.5541	16.7891	12S seed storage protein (CRA1) nearly identical to SP
120242	17156	5.9	3267.6	14	14	74.2	40.4046	0.6937	PRU1_PRUAR Major allergen Pru ar 1 [<i>Prunus armeniaca</i>]
ADH	36668	6.3	894.6	24	24	28.5	25	0.9173	
124784	17319	4.9	940	26	26	65.9	12.9266	0.224	late embryogenesis abundant (LEA) protein, putative similar to SP P13934
120243	17147	6.1	3061.4	12	12	60.4	2.5443	0.0437	PRU1_PRUAR Major allergen Pru ar 1 [<i>Prunus armeniaca</i>]

Tabela 6: Resultados obtidos das análises realizadas com o software “Protein Lynx”, a partir dos dados coletados por espectrometria de massa da amostra de peptídeos trípticos de endosperma do fruto de café (180 DAF). A tabela mostra o número de identificação do “Hit” na base de dados (ID), massa molecular (mW), ponto isoelétrico (pI), “Protein Lynx Global Server” (PLGS score), nº de peptídeos identificados conforme o íon precursor (Pep), peptídeos teóricos *in silico* (Pep Teor.), cobertura (cov.), quantificação em fmol e ngmol e similaridade das proteínas.

180 DAF (ID)	mW (Da)	pI	PGLS Score	Pep.	Pep. Teor.	Cov. (%)	Amo. (fmol)	Amo. (ngmol)	Proteína
120121	43608	5.4	1943.2	17	25	33.9	658.9515	28.5337	lipid transfer protein 3 (LTP 3) [<i>Arabidopsis thaliana</i>] [
125746	17474	6.3	187.2	2	12	19	522.6231	9.0802	light-harvesting chlorophyll a/b binding protein CHLOROPHYLL A-B BINDING PROTEIN 4 PRECURSOR (LHCI TYPEIII CAB-4) – [<i>Arabidopsis thaliana</i>]
128247	9378	5.6	617.4	4	4	41.5	224.1481	2.0538	No hit
128513	11666	9.6	222.7	2	4	40.7	174.0235	2.0315	short-chain dehydrogenase/reductase family protein contains INTERPRO family IPR002198
130228	20194	5.2	355.5	3	9	24.9	136.5717	2.7445	DnaJ domain-containing protein contains Pfam profile PF00226
120242	17156	5.9	4943.1	9	14	62.9	63.886	1.0968	PRU1_PRUAR Major

									allergen [<i>Prunus armeniaca</i>]
120912	54139	6.9	2290.6	25	29	53.8	56.6335	3.0617	12S seed storage protein (CRA1) nearly identical to SP P15455
121830	41201	9.4	854.7	7	32	17.3	46.8803	1.9067	sucrose synthase (UDP-glucose-fructose glucosyltransferase/sucrose-UDP glucosyltransferase/SUS1)
121870	17800	6.9	1027	7	12	38.4	37.05	0.6599	Dehydrin:
124784	17319	4.9	1392.6	7	26	43.7	30.9996	0.5372	late embryogenesis abundant (LEA) protein, putative similar to SP P13934
ADH	36668	6.3	1173.8	17	24	35.7	25	0.9173	
119817	30800	8.3	305.5	7	20	39.1	21.3919	0.6593	glycosyl hydrolase family 19 (basic endochitinase) identical to basic endochitinase precursor SP:P19171 from [<i>Arabidopsis thaliana</i>]
124957	54111	5.6	212.1	13	35	48.6	19.9012	1.0731	cupin domain-containing protein similar to preproMP27-MP32 [<i>Cucurbita</i> cv. <i>Kurokawa</i>]

									<i>Amakuri</i>
124995	28996	8.6	229.9	7	29	36.2	16.72	0.4814	class II heat shock protein identical to 17.6 kDa class II heat shock protein SP:P29830 from [<i>Arabidopsis thaliana</i>]
123491	20195	4.9	294.3	8	14	45.6	12.9267	0.2598	small heat shock protein - related 223 1e-58
120777	27472	4.8	262	13	19	74.7	12.6584	0.3466	LEA protein - related similar to LEA protein in group GB:BAA11 016 from [<i>Arabidopsis thaliana</i>]
120505	21296	9.9	155.6	7	11	35.7	12.0859	0.2535	ATP/GTP-binding site motif A (P-loop):
120523	25822	8	948.4	5	9	57.7	11.8263	0.3029	osmotin-like protein (OSM34) nearly identical to SPIP50700 OSL3_AR ATH Osmotin-like protein OSM34 precursor [<i>Arabidopsis thaliana</i>]
122258	13658	5	429.4	7	12	44.9	8.6248	0.1179	ABA-regulated gene (ATEM6) 114 4e-26
120196	13263	8	274.5	5	11	29.9	6.7372	0.0894	lipid transfer protein 6 (ltp6) identical to

									GI:8571927
120674	21830	4.6	195.4	7	17	62.9	3.5555	0.0773	glutamine-rich protein predicted protein T21P5.12 – [<i>Arabidopsis thaliana</i>]
120243	17147	6.1	4657.6	7	12	54.1	2.5016	0.0429	PRU1_PR UAR Major allergen [<i>Prunus armeniaca</i>]
130481	4550	9.9	165	1	2	63.4	2.0638	0.0094	No hit
131041	17434	6.5	169.7	5	9	66.7	1.803	0.0313	F-box protein family ; similar to SKP1 interacting partner 2 (SKIP2) TIGR_Ath1
132513	25402	7.7	156	3	25	25.4	1.7722	0.0448	expressed protein contains Pfam profile: PF00561 alpha/beta hydrolase fold

Tabela 7: Resultados obtidos das análises realizadas com o software “Protein Lynx”, a partir dos dados coletados por espectrometria de massa da amostra de peptídeos trípticos de endosperma do fruto de café (210 DAF). A tabela mostra o número de identificação do “Hit” na base de dados (ID), massa molecular (mW), ponto isoelétrico (pI), “Protein Lynx Global Server” (PLGS score), nº de peptídeos identificados conforme o íon precursor (Pep), peptídeos teóricos *in silico* (Pep Teór.), cobertura (cov.), quantificação em fmol e ngmol e similaridade das proteínas.

210 DAF (ID)	mW (Da)	pI	PGLS Score	Pep.	Pep. Teór.	Cov. (%)	Amo. (fmol)	Amo. (ngmol)	Proteína
120912	54139	6.9	18852.8	43	29	72.7	376.3891	20.3482	12S seed storage protein (CRA1) nearly identical to SP P15455
120121	43608	5.4	1099.7	3	25	7.2	248.0515	10.7411	lipid transfer protein 3 (LTP 3) identical to lipid transfer protein 3 from <i>Arabidops is thaliana</i>
120242	17156	5.9	9923.3	14	14	74.8	104.7808	1.7988	PRU1_PR UAR Major allergen Pru ar 1 [<i>Prunus armeniaca</i>]
121870	17800	6.9	1172.2	3	12	19.2	86.4066	1.539	Dehydrin:
120243	17147	6.1	9493.9	11	12	66	61.1029	1.0484	PRU1_PR UAR Major allergen Pru ar 1 [<i>Prunus armeniaca</i>]
123460	64097	4.9	892.7	39	71	44	53.9667	3.4553	cupin domain-containing protein low similarity to

									preproMP 27-MP32 from <i>Cucurbita</i> cv. <i>Kurokawa</i> <i>Amakuri</i>
125103	39156	5.8	841.1	15	26	45.7	33.2333	1.2984	cysteine proteinase similar to cysteine endopepti dase precursor CysEP GI:294444 6 from [<i>Ricinus</i> <i>communis</i>]
124784	17319	4.9	1679.3	9	26	60.5	28.2004	0.4887	late embryoge nesis abundant (LEA) protein, putative similar to SP P13934
ADH	36668	6.3	1619.6	22	24	49.6	25	0.9173	
120523	25822	8	1037	3	9	45.6	18.5377	0.4749	osmotin- like protein (OSM34) nearly identical to SP P50700 OSL3_A RATH Osmotin- like protein OSM34 precursor [<i>Arabidop</i> <i>sis</i> <i>thaliana</i>]

Tabela 8: Resultados obtidos das análises realizadas com o software “Protein Lynx”, a partir dos dados coletados por espectrometria de massa da amostra de peptídeos trípticos de endosperma do fruto de café (237 DAF). A tabela mostra o número de identificação do “Hit” na base de dados (ID), massa molecular (mW), ponto isoelétrico (pI), “Protein Lynx Global Server” (PLGS score), nº de peptídeos identificados conforme o íon precursor (Pep), peptídeos teóricos *in silico* (Pep Teór.), cobertura (cov.), quantificação em fmol e ngmol e similaridade das proteínas.

237 DAF (ID)	mW (Da)	pI	PGLS Score	Pep.	Pep. Teór.	Cov. (%)	Amo. (fmol)	Amo. (ngmol)	Proteína
120912	54139	6.9	15425	34	29	52.8	453.4785	24.5158	12S seed storage protein (CRA1) nearly identical to SP P15455
120121	43608	5.4	843.7	7	25	14.4	207.1143	8.9684	lipid transfer protein 3 (LTP 3) identical to lipid transfer protein 3 from <i>Arabidopsis thaliana</i>
120243	17147	6.1	6747.5	14	12	76.1	32.0417	0.5498	PRU1_PRUAR Major allergen Pru ar 1 [<i>Prunus armeniaca</i>]
120242	17156	5.9	6699	14	14	59.1	30.5583	0.5246	PRU1_PRUAR Major allergen Pru ar 1 [<i>Prunus armeniaca</i>]
ADH	36668	6.3	1408.9	15	24	39.2	25	0.9173	
125103	39156	5.8	866.2	14	26	37	24.0074	0.938	cysteine proteinase similar to cysteine endopeptidase precursor CysEP GI:2944446 from [<i>Ricinus communis</i>]
124667	16689	4.6	1563.2	10	15	58.7	18.5862	0.3104	Bet v I allergen family similar to major pollen allergen Bet v

									1 from [<i>Betula pendula</i>]
122258	13658	5	1054.8	3	12	30.7	9.7698	0.1335	ABA- regulated gene (ATEM6) 114 4e-26
122665	5467	6.3	996.1	4	3	70	2.0501	0.0112	No hit