



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

LEONARDO CARDOSO ALVES

**ANÁLISE PROTEÔMICA DE PERISPERMA DE FRUTOS DO
CAFÉ (*Coffea arabica*) RELACIONADA À QUALIDADE**

LEONARDO CARDOSO ALVES

**ANÁLISE PROTEÔMICA DE PERISPERMA DE FRUTOS DO
CAFÉ (*Coffea arabica*) RELACIONADA À QUALIDADE**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Luiz Filipe Protasio Pereira

Londrina
2012

LEONARDO CARDOSO ALVES

**ANÁLISE PROTEÔMICA DE PERISPERMA DE FRUTOS DO CAFÉ
(*Coffea arabica*) RELACIONADA À QUALIDADE**

BANCA EXAMINADORA

Dr. Luiz Filipe Protasio Pereira
IAPAR – Londrina - PR

Dr. Humberto Josué de Oliveira Ramos
UFV – Viçosa - MG

Dra. Jesiane Stefania da Silva Batista
EMBRAPA – Londrina - PR

Dr. Douglas Silva Domingues
IAPAR – Londrina - PR

Dra. Geni da Silva Varéa
UEL – Londrina - PR

Londrina, 11 de maio de 2012.

*A meu pai Jorge, meus irmãos
Eduardo e Lariana e a quem
mais gostaria de ver esta
etapa concluída: minha mãe
Veralucia. Eterna saudade!*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter me dado a oportunidade de chegar aonde cheguei;

Aos meus pais pela criação baseada em dignidade e honestidade que me proporcionaram e apoio para seguir com meus estudos e aos meus irmãos Eduardo e Lariana pela companhia e força nas horas em que mais precisei;

Agradeço em especial à minha mãe pelo apoio às minhas escolhas e decisões e amor incondicional. A saudade é grande, mas um dia nos encontraremos novamente;

Ao meu orientador Dr. Luiz Filipe pela oportunidade, confiança e atenção. Grato por tudo!

A todos os amigos pelo companheirismo, em especial aos que cresceram comigo e que continuarão junto: Romeu, Alexandre, Luis Gustavo e Maurinho;

Agradeço à Suzana, Sílvia, Lucas, Rafaelle, Sandra, Alessandra, Kenia, João e todos os vários amigos do laboratório por proporcionarem um ambiente tão agradável e muitas vezes me ajudarem. Também ao Diogo Magalhães por me ensinar e ajudar a trabalhar em meu projeto;

Ao pessoal da turma do Mestrado em Biotecnologia, professores e funcionários do departamento de Bioquímica e Biotecnologia.

Aos membros da banca examinadora: Jesiane, Humberto, Douglas e Geni pela disponibilidade e colaboração em meu trabalho;

Ao pessoal do laboratório Max Feffer de Genética de Plantas – ESALQ/USP, especialmente prof. Carlos Labate, Mônica, Daniele e Lívia pela

colaboração na análise por espectrometria de massa e responder às muitas perguntas que fiz depois.

À UEL e ao IAPAR por permitirem a realização de meus estudos e pesquisa;

À CAPES e Qualicafé-FINEP pelo apoio financeiro;

A todos que de alguma forma contribuíram para o que sou e alcancei até hoje.

ALVES, Leonardo Cardoso. **Análise proteômica de perisperma de frutos do café (*Coffea arabica*) relacionada à qualidade**. 2012. 87f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2012.

RESUMO

O grão de café produz uma bebida apreciada mundialmente e o Brasil é o seu maior produtor, com 33% da produção mundial em 2011. Devido à importância econômica e consumo crescente da bebida, estudos relacionados à qualidade vem ganhando cada vez mais destaque na pesquisa cafeeira. A qualidade do café relaciona-se a diversos fatores, dentre eles: genéticos, tempo de maturação dos frutos, tamanho do grão, técnicas de colheita e pós-colheita e técnicas de preparo da bebida. Embora sejam conhecidas diversas proteínas envolvidas em processos que podem ser relacionados à qualidade, poucos estudos proteômicos sobre o desenvolvimento dos frutos foram realizados. Desta forma, este trabalho visou analisar frutos em diferentes estádios de maturação e de plantas com tamanho de grão diferente para comparar o perfil protéico das etapas e analisar variações de expressão tentando relacioná-las com a qualidade. Foram utilizadas as cultivares IPR 59 e IPR 59 Graúdo (GDO) coletadas em novembro e dezembro/2007 (60 e 90 dias após florada - DAF) e março/2008 (180 DAF). As proteínas de perisperma foram extraídas e separadas em eletroforese 2D e os géis foram analisados computacionalmente para verificar diferenças de expressão tanto entre os estádios de desenvolvimento de uma mesma cultivar, como entre as diferentes cultivares em um mesmo estádio. As análises identificaram um total de 112 *spots* diferenciais com variação de $\pm 1,5x$ em %Vol, sendo: 12 entre IPR59 60 x 90 DAF, 39 entre IPR59 90 x 180 DAF, 23 entre IPR59 GDO 90 x 180 DAF, 24 entre IPR 59 x IPR59 GDO 60 DAF, 6 entre IPR59 x IPR59 GDO 90 DAF e 8 entre IPR59 x IPR59 GDO 180 DAF. Foram identificadas via espectrometria de massas 17 proteínas e agrupadas de acordo com as funções em: reserva, desenvolvimento celular, metabolismo de carboidratos, processos metabólicos de oxidação/redução, metabolismo de metionina, fotossíntese, síntese de ATP e processamento de RNA. Foi observado presença e grande acúmulo da proteína 11S em perisperma durante a maturação. Também foram identificadas a metionina sintase e S-adenosil-metionina sintase, que podem estar relacionadas com a biossíntese de cafeína e de etileno, importantes para a maturação dos frutos e qualidade da bebida. As proteínas inibidor de quitinase similar à xilanase, extensina e actinas podem estar relacionadas com crescimento da célula através de reorganização da parede celular. O trabalho trouxe novas informações e conhecimento a respeito da dinâmica protéica de maturação dos frutos de diferentes tamanhos e diferentes etapas de maturação, os quais não haviam sido relatados anteriormente, e que podem ser aplicados em trabalhos futuros visando melhorias na qualidade do café.

Palavras chave: Café. Espectrometria de massas. Perisperma. IAPAR 59. Maturação.

ALVES, Leonardo Cardoso. **Proteomic analysis of coffee fruit's perisperm (*Coffea arabica*) related to quality**. 2012. 87p. Dissertation (Master's Degree Dissertation) – State University of Londrina, Londrina. 2012.

ABSTRACT

Coffee is a drink enjoyed worldwide. Brazil is the largest producer, responsible for 33% of coffee world production in 2011. Due to its economic value and growing consumption of beverage, studies about quality have been increasing prominence in coffee research. Coffee quality is related to several factors, like: genetic, fruit's ripening time, grain size, harvesting and post-harvesting techniques and brewing techniques. Although it's known several proteins involved in processes which can be related to quality, few proteomic studies about fruits development has been performed. Thus, this study aimed to analyse the protein profile of fruits at different growth stages as well as from plants with different fruit size, related to quality. Two cultivars were selected, the IPR59 and the IPR59 Graudo (GDO), harvested in November and December/2007 (60 and 90 days after flowering – DAF) and March/2008 (180 DAF). The perisperm proteins were extracted and separated by 2D electrophoresis and the gels were analyzed by computer software to detect the differential expression patterns. The 2D analysis showed 112 differential spots varying in %Vol, as: 12 between IPR59 60 x 90 DAF, 39 between IPR59 90 x 180 DAF, 23 between IPR59 GDO 90 x 180 DAF, 24 between IPR 59 x IPR59 GDO 60 DAF, 6 between IPR59 x IPR59 GDO 90 DAF and 8 between IPR59 x IPR59 GDO 180 DAF. Using mass spectrometry 17 proteins were identified and grouped by functions such: reserve, cellular development, carbohydrates metabolism, oxidation/reduction metabolic processes, methionine metabolism, photosynthesis, ATP synthesis and RNA process. It was observed great presence and accumulation of 11S protein in perisperm during the maturation. Also was identified the methionine synthase and the S-adenosyl-methionine-synthase, which can be related with caffeine and ethylene byosynthesis, both important to fruits maturation and beverage quality. The proteins chitinase like xylanase inhibitor, extensin and actins can be related with cellular growing through reorganization of the cell wall. This study has brought new knowledge about de protein dynamics of maturation of different size fruits and different stages of maturation which can be applied in further studies aiming improving coffee quality.

Keywords: Coffee. Mass spectrometry. IAPAR 59. Maturation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Ramos de cafeeiro arábica com frutos maduros (à esquerda) e cafezal com arábicas floridos (à direita).	15
Figura 2 – Diversas fases de maturação ocorrendo no mesmo cafeeiro. É possível observar os estágios verde até passa.....	21
Figura 3 – Estádios de maturação dos frutos desde seus primeiros dias (chumbinho com cerca de 0 a 30 DAF) até os últimos (seco com cerca de 240 a 270 DAF).	21
Figura 4 – Etapas de desenvolvimento do fruto do café. Nos estágio iniciais há expansão do perisperma, em seguida há involução deste e o endosperma toma seu lugar. Os próximos passos são o enchimento e mudança de cor da polpa (pericarpo). Ao fim o perisperma é uma fina camada chamada de película prateada.	23
Figura 5 – Frutos das cultivares IAPAR 59 e IAPAR 59 Graúdo dispostos lado a lado demonstrando o maior tamanho dos grãos.	24
Figura 6 – Géis 2D demonstrando proteínas de perisperma e endosperma em diferentes estádios de desenvolvimento do fruto de café. Aos 56 DAF observa-se no círculo quitinases de classe III perispermáticas. Entre 168-240 DAF estão evidenciadas subunidades α e β de proteínas 11S endospermáticas que se mantêm desde a fase de armazenamento até o estágio maduro.....	36
Figura 7 – Gel 2D com proteínas de IPR 59 60 DAF. Dentro da região tracejada encontram-se a maioria dos spots, entre pls 4,5 – 7 e MM 97 – 16 KDa.	46
Figura 8 – Exemplos de géis 2D obtidos a partir das amostras de IPR59 e IPR59 GDO.	48
Figura 9 – Spots presentes apenas aos 180 DAF (setas pretas) ou com maior intensidade em uma das datas de maturação (setas amarelas).	49
Figura 10 – Spots com maior diferença de expressão em cada condição na comparação entre IPR59 60 DAF x 90 DAF.....	50
Figura 11 – Spots com maior diferença de expressão em cada condição na comparação entre IPR59 90 DAF x 180 DAF.....	52
Figura 12 – Spots com maior diferença de expressão em cada condição na comparação entre IPR59 GDO 90 DAF x 180 DAF.	53
Figura 13 – Spots com maior diferença de expressão em cada condição na comparação entre IPR59 x IPR59 GDO 60 DAF.....	55

Figura 14 –Spots com maior diferença de expressão em cada condição na análise entre IPR59 x IPR59 GDO 90 DAF.....	56
Figura 15 –Spots com maior diferença de expressão em cada condição na análise entre IPR59 x IPR59 GDO 180 DAF.....	57
Figura 16 –Agrupamento funcional das proteínas identificadas por espectrometria de massa. Os números indicam a quantia de spots de cada grupamento.....	60
Figura 17 –Evolução de spots representantes de subunidades da proteína 11S identificados por espectrometria de massas ou localizados próximos a estes em géis de IPR59 90 e 180 DAF. Abaixo visão tridimensional mostrando os spots 1124 e 2051. A: IPR59 90 DAF. B: IPR59 180 DAF.....	69
Figura 18 –Comparação entre a localização dos spots identificados como subunidades da proteína 11S em gel SDS-PAGE publicado por Rogers et al. (1999) e em géis obtidos neste trabalho. A: gel de Coffea arabica Caturra (ROGERS et al., 1999). B: gel de IPR59 90 DAF. C: gel de IPR59 180 DAF.....	70
Figura 19 –Spots diferencialmente expressos relacionados ao metabolismo de metionina identificados por espectrometria de massa a partir dos géis de IPR59 e IPR59 GDO.....	72
Figura 20 –Evolução de spots representantes da proteína inibidor de xilanase similar à quitinase identificados por espectrometria de massas ou localizados próximos a estes em géis de IPR59 e IPR59 GDO aos 60, 90 e 180 DAF. 1: spot 1204; 2: spot 2322; 3: spot 1306.....	76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Proteínas encontradas em frutos do cafeeiro e seus papéis.....	28
Tabela 2 – Quantia média de spots detectados em géis de perisperma de IPR59 e IPR59 GDO nas três datas analisadas.....	47
Tabela 3 - Spots com maior diferença de expressão na comparação entre IPR59 60 DAF x 90 DAF com variação quantitativa acima de 1,5x (p<0,05).	50
Tabela 4 – Spots com maior diferença de expressão na comparação entre IPR59 90 DAF x 180 DAF com variação quantitativa acima de 1,5x (p<0,05).	51
Tabela 5 – Spots com maior diferença de expressão na comparação entre IPR59 GDO 90 DAF x 180 DAF com variação quantitativa acima de 1,5x (p<0,05).	53
Tabela 6 – Spots com maior diferença de expressão na comparação entre IPR59 x IPR59 GDO 60 DAF com variação quantitativa acima de 1,5x (p<0,05).	54
Tabela 7 – Spots com maior diferença de expressão significativa na comparação entre IPR59 x IPR59 GDO 90 DAF com variação quantitativa acima de 1,5x (p<0,05).	55
Tabela 8 – Spots com maior diferença de expressão significativa na comparação entre IPR59 x IPR59 GDO 180 DAF com variação quantitativa acima de 1,5x (p<0,05).	57
Tabela 9 – Quantia de spots presentes e up-regulated em cada condição nas diferentes comparações realizadas.	58
Tabela 10 –Identificação de proteínas em perisperma de café das cultivares IPR59 e IPR59 GDO aos 60, 90 e 180 DAF por análises em MALDI-TOF-TOF. Os números entre parênteses nos spot IDs referem-se às análises correspondentes.	61
Tabela 11 –Evolução em %Vol dos spots pertencentes às subunidades da proteína 11S identificados ou não por espectrometria de massa nos géis de IPR59 e IPR59 GDO. Os números entre parênteses referem-se à correspondência entre os spots nos diferentes genótipos.....	68
Tabela 12 –Evolução em %Vol dos spots pertencentes à proteína inibidor de xilanase similar à quitinase identificados por espectrometria de massa ou localizados próximos a estes nos géis de IPR59 e IPR59 GDO.	75

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1	CAFÉ	15
2.2	HISTÓRIA DO CAFÉ	16
2.3	QUALIDADE	18
2.3.1	Frutificação do Café	21
2.4	COMPOSTOS QUÍMICOS DO CAFÉ	24
2.5	PROTEÔMICA	32
2.5.1	Proteômica do Café	33
3	OBJETIVOS	37
3.1	OBJETIVO	37
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	37
4	MATERIAL E MÉTODOS	38
4.1	MATERIAL VEGETAL	38
4.2	SEPARAÇÃO DE TECIDOS E EXTRAÇÃO DE PROTEÍNA TOTAL	38
4.2.1	Quantificação de Proteínas	40
4.3	ELETOFORESE 2D	40
4.3.1	Primeira Dimensão	40
4.3.1.1	Hidratação das tiras	40
4.3.1.2	Isoeletrofocalização	41
4.3.2	Segunda Dimensão	41
4.3.2.1	Géis SDS-PAGE	41
4.3.2.2	Análise dos géis	42
4.3.2.3	Extração e digestão de proteínas dos spots	42
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
5.1	EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS	45
5.2	ELETOFORESE 2D	46
5.2.1	Diferenças de Expressão Durante o Desenvolvimento do Perisperma	48

5.2.2	Diferenças de Expressão Entre as Variedades IPR59 e IPR59 GDO	54
5.3	IDENTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS	58
5.3.1	Proteína de Reserva 11S	67
5.3.2	Metabolismo de Metionina.....	71
5.3.3	Proteínas Relacionadas ao Desenvolvimento Celular	74
6	CONCLUSÃO	78
	REFERÊNCIAS	79

1 INTRODUÇÃO

Há séculos o café é uma das bebidas mais apreciadas no mundo. Comercializado como *commodity*, envolve globalmente cerca de 500 milhões de pessoas, desde sua produção até o produto para consumo. Em 2011 foram produzidas mais de 132 milhões de sacas e o Brasil correspondeu por aproximadamente 33% desta produção, continuando a liderar o mercado produtor e exportador seguido por Vietnã e Colômbia (DAMATTA et al., 2007; ICO, 2012).

O consumo da bebida em nosso país vem crescendo e, segundo dados da Associação Brasileira de Café (ABIC), aumentou 4,15% no ano de 2009. Um importante motivo para este crescimento é a melhora na qualidade do café (ABIC, 2010), tornando a bebida mais apreciável e conseqüentemente levando-a a novos consumidores.

Alguns fatores relacionados à qualidade do café produzido são: clima, irrigação, altitude, solo, tipo de colheita e tratamentos pós-colheita, condições de processamento (fermentação, lavagem, secagem e armazenamento), fisiologia, genética e variedade das cultivares (LEROY et al., 2006; DE CAMARGO, 2007; ALONSO-SALCES et al., 2009). Além disso, o estágio de maturação e uniformidade dos frutos no momento da colheita aliados ao tamanho do grão também podem contribuir com melhores características organolépticas ao café (Pereira et al., 2005). O tamanho do grão de café está relacionado com o desenvolvimento do perisperma, que sofre grande aumento em massa e depois involui, tendo seu espaço tomado pelo endosperma, tecido constituinte do grão (DE CASTRO; MARRACCINI, 2006; GEROMEL et al., 2006; BUDZINSKI et al., 2011).

Dentre as cultivares de café arábica no mercado encontra-se IAPAR 59, que é reconhecida por produzir frutos de boa qualidade e bom tamanho. Após seleções entre populações desta planta foi desenvolvida a variedade IAPAR 59 Graúdo, uma cultivar de frutos e grãos maiores (SILVEIRA et al., 2003; DE CARVALHO et al., 2008; BUDZINSKI et al., 2011).

A caracterização molecular e bioquímica dos processos relacionados com o desenvolvimento e maturação de frutos pode ajudar a desenvolver estratégias para o melhoramento de cafeeiros visando aumentar a qualidade. Neste sentido a proteômica pode ser utilizada como ferramenta analisando proteínas e comparando produção proteica de frutos e grãos de diferentes cultivares, visando a identificação

de proteínas que possam ser relacionadas com maior qualidade dos cafés.

As análises proteômicas costumam utilizar técnicas de eletroforese com focalização isoeletrica e géis de poliacrilamida adicionados de SDS (SDS-PAGE), possibilitando a separação protéica em duas dimensões (2D) (SILVA; CORRÊA; REIS, 2007). Frequentemente são aliadas técnicas de espectrometria de massas como *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization* (MALDI) e *Electrospray Ionization* (ESI). Quando ambas são associadas ao analisador *Time-of-Flight* (TOF) podem fornecer a massa de peptídeos rapidamente e com eficácia (GUIMARÃES, 2007).

Embora atualmente existam muitos estudos discutindo as características agronômicas do cafeeiro, ainda faltam pesquisas a nível molecular relacionadas à maturação dos frutos (BANDIL, 2008) principalmente envolvendo análises proteômicas relacionadas à qualidade. Portanto, tendo em vista a importância de se estudar e identificar fatores relacionados à qualidade em cafés, este trabalho procurou investigar proteínas que possam estar envolvidas em processos metabólicos no início da maturação dos frutos, particularmente durante o desenvolvimento do perisperma, comparando as cultivares IAPAR 59 e IAPAR 59 Graúdo.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 CAFÉ

Pertencente à família das Rubiáceas, que agrega cerca de 500 gêneros e 6000 espécies, o gênero *Coffea* foi descrito no século XVIII por Lineu (ICO, 2012) e conta com 103 espécies catalogadas, sendo 41 originárias do continente africano, 59 da Ilha de Madagascar e 3 da Ilha de Mascarenhas. Todavia apenas duas espécies são utilizadas na produção do café em bebida: *C. arabica* Lineu (café arábica) (Figura 1) e *C. canephora* Pierre (café robusta ou conilon), correspondendo respectivamente por cerca de 60% e 30% da produção mundial de café (DAVIS et al., 2006; SOARES, 2008; ICO, 2012) e envolvendo mais de 150 variedades (GIL-AGUSTI et al., 2005). Davis et al. (2006) também descrevem *C. liberica* (café Liberica ou Excelsa) como utilizada na produção, no entanto Carvalho et al. (1990) comentam que esta espécie é inexpressiva no comércio, sendo usada apenas para cruzamentos visando melhorar qualidade e produtividade (CUBRY et al., 2008).

Figura 1 – Ramos de cafeeiro arábica com frutos maduros (à esquerda) e cafezal com arábicas floridos (à direita).



C. arabica é tetraplóide ($2n=4x=44$), originário de recente cruzamento natural entre *C. canephora* e *C. eugenoides* e a única espécie autógama no gênero (CHARRIER; BERTHAUD, 1985; LASHERMES et al., 1999). Este café é empregado na produção, pois sua bebida é reconhecidamente de melhor qualidade devido a fatores como melhores propriedades organolépticas, tais como: sabor mais leve e frutado (ALONSO-SALCES et al., 2009), maior quantia de compostos voláteis e não-voláteis (DE CASTRO; MARRACCINI, 2006) além da

presença de cerca de duas vezes mais sacarose que robusta (KY et al., 2001). Segundo Damatta et al. (2007) as variedades mais tradicionais são Catuaí e Mundo Novo.

C. canephora tem menor valor que *C. arabica*, frutifica mais lentamente (SIMKIN et al., 2006), porém é mais vigorosa, produtiva e tem menor custo ao agricultor (DAMATTA et al., 2007). A planta é diplóide ($2n=22$) e auto-incompatível o que explica a maior diversidade genética da espécie (CHARRIER; BERTHAUD, 1985). De fato a espécie é uma fonte de genes em cruzamentos com vista à resistência contra pragas e adaptação a diferentes ambientes. Contém o dobro de cafeína (DAMATTA et al., 2007), mas sua bebida é inferior à de *C. arabica* por caracterizar-se como neutra, com pouco sabor e ocasionalmente apresentando forte amargor (ALONSO-SALCES et al., 2009). O nome “robusta” representa a cultivar mais conhecida mundialmente, porém no Brasil a cultivar de *C. canephora* mais plantada é a conilon (DAMATTA et al., 2007). Comercialmente o café robusta é utilizado na fabricação de café solúvel e na composição de blends (combinações) enquanto frutos de *C. arabica* seguem para a produção de cafés expresso e especiais (gourmets).

2.2 HISTÓRIA DO CAFÉ

O primeiro contato do homem com o café é desconhecido, o que se sabe são suposições baseadas em relatos antigos e culturais. Segundo Ukers (1935) a história da propagação da planta está intimamente ligada à da bebida. Este autor comenta em seu livro que a primeira menção às propriedades da planta ocorreu perto do séc. X por Ludolfo, um físico árabe que dizia ser o café produto da Abissínia (hoje norte da Etiópia). Os abissínios levaram o café para a Arábia onde, devido à alta lucratividade, a planta era protegida para que não houvesse forma de ser cultivada em outro local, evitando concorrentes. Porém o café arábica acabou sendo levado para o Iêmen.

Outra versão é uma lenda cuja afirmação é de que o hábito de beber café começou por volta do séc. XV na província etiopiana de Kaffa quando um pastor de cabras observou que seus animais ficavam agitados depois de comerem partes da planta. Ele experimentou o fruto e sentiu-se mais disposto, passando a

consumir café e difundir o hábito pela região. A partir dali o café foi também levado para o Iêmen (SIQUEIRA, 2005; MERGUIZZO, 2000 apud SCHMIDT, 2008; ICO, 2012).

A história fica mais clara após a saída do café da Etiópia para o Iêmen, de onde mudas foram levadas por holandeses para serem cultivadas em Java (CLARENCE-SMITH; TOPIK, 2003). O próximo passo foi a entrada na Europa (séc. XVII) abastecendo cidades como Amsterdam, Paris, Veneza, Londres e Viena. No séc. XVIII o cultivo chegou a Martinica – situada no Caribe – de onde pode ter surgido a planta mãe do café latino-americano, um descendente direto do café etíope (CLARENCE-SMITH; TOPIK, 2003; SIQUEIRA, 2005).

O café foi introduzido no Brasil em 1727 pelo sargento Francisco de Mello Palheta que trouxe as mudas de Cayena na Guiana Francesa. O cultivo começou em Belém e se difundiu para o Amazonas e Maranhão. Em 1770 o desembargador João Alberto de Castelo Branco levou ao Rio de Janeiro as primeiras mudas de café, que foram plantadas em mosteiros e depois em chácaras pela cidade. Mais tarde foi cultivado em cidades próximas como Vassouras e Resende (UKERS, 1935; SIQUEIRA, 2005; SCHMIDT, 2008). Segundo Siqueira (2005) este foi o começo do ciclo agrícola mais impactante no país desde seu descobrimento. Dali o café se expandiu para Minas Gerais, São Paulo e Espírito Santo e em 1928 estes eram os três maiores produtores do país (SIQUEIRA, 2005). Ukers (1935) relata que o Paraná foi agraciado com os cafezais em 1860, mas a plantação em larga escala foi iniciada somente em 1907, graças ao coronel Antonio Barboza Ferraz, que plantou na região norte pioneira do estado.

Hoje a área cultivada no país é de 2.350 mil hectares e os estados de Minas Gerais, Espírito Santo, São Paulo, Bahia, Paraná, Rondônia e Rio Janeiro correspondem por 98% da produção nacional de café que em 2011 foi de 44 milhões de sacas de 60kg e está estimada para 2012 entre 49 e 52 milhões de sacas do grão beneficiado (CONAB, 2012).

Em escala mundial atualmente a *commodity* envolve cerca de 500 milhões de pessoas, desde sua produção até o produto para consumo. Em 2011 foram produzidas 132 milhões de sacas e o Brasil correspondeu por aproximadamente 33% desta produção, continuando a liderar o mercado produtor e exportador seguido por Colômbia e Vietnã (DAMATTA et al., 2007; ICO, 2012).

2.3 QUALIDADE

Os brasileiros formam o segundo maior mercado consumidor de café no mundo, atrás apenas dos Estados Unidos (PROMAR INTERNATIONAL, 2001). Segundo a Associação Brasileira de Café (ABIC) o consumo em nosso país vem crescendo há alguns anos e aumentou 4,15% no ano de 2009. Um importante motivo para este crescimento é a melhora na qualidade do café (ABIC, 2010a), tornando a bebida mais apreciável e conseqüentemente levando-a a novos consumidores.

A busca pela melhor qualidade também visa a competição no mercado externo. O preço da saca de café brasileiro tem diminuído frente aos provenientes da América Central, Colômbia, Quênia e México devido à suavidade da bebida desses países e ao aumento na produção (PIMENTA, CHAGAS e COSTA, 1997; KOBAYASHI et al., 2007). O café brasileiro é visto como de baixa qualidade por conta dos métodos de colheita e processamento (ALONSO-SALCES et al., 2009). Porém esforços como o da ABIC, que lançou um selo de pureza e um programa de qualidade para melhorar técnicas de processamento e torra do café, comprometendo as empresas com bons padrões de qualidade (PROMAR INTERNATIONAL, 2001; ABIC, 2010a), aliados à pesquisa podem contribuir para a retomada de melhores preços de mercado.

Segundo Leroy et al. (2006) a qualidade do café é algo complexo e difícil de ser definido, já que envolve muitos atributos. Os autores listam como alguns fatores o tamanho do grão, a falta de defeitos, características físicas, umidade, estabilidade de características, origem, composição bioquímica e propriedades organolépticas.

Embora não haja definição para qualidade, pode-se afirmar que ela representa as características organolépticas da bebida, ou seja, a qualidade é resultado da interação da composição química do grão e das condições ambientais gerando sabores e aromas agradáveis aos consumidores.

É possível analisar e em seguida classificar as bebidas em grupos de acordo com as características presentes. Leroy et al. (2006) comentam haver duas formas de análise mais comuns, a hedônica, baseada na preferência dos consumidores, e a análise descritiva, cujo fundamento é a discriminação da bebida em questão por *experts*.

Segundo Schmidt (2008) os testes de preferência vem se tornando cada vez mais confiáveis e a análise descritiva tem sido mais utilizada depois que a Organização Internacional do Café a recomendou, porém a metodologia que continua sendo utilizada para efeito de comercialização é a tradicional prova de xícara, que permite classificar o café brasileiro da seguinte forma (do melhor ao pior):

- Estritamente mole: apresenta todos requisitos do sabor mole, porém mais acentuado;
- Mole: aroma e sabor agradável, brando e adocicado;
- Apenas mole: levemente doce e suave sem adstringência ou aspereza no paladar;
- Duro: sabor acre, aspereza e adstringência, porém sem paladares estranhos;
- Riado: leve sabor, típico de iodofórmio ou ácido fênico;
- Rio: sabor típico e acentuado de iodofórmio;
- Rio zona: aroma e sabor muito acentuado, semelhante ao iodofórmio tornando-o repugnante ao paladar.

Cafés Gourmets são constituídos apenas de grãos arábica e apresentam bebida mole ou estritamente mole. Os Superiores constituem-se de arábica ou blends com robusta gerando bebida dura a mole. Os cafés Tradicionais também podem ser provenientes de arábica ou blends com robusta, no entanto produzem bebida mole a rio (SCHMIDT, 2008).

A ABIC disponibiliza um guia com o qual é possível relacionar características sensoriais com a qualidade global da bebida. O sistema funciona com notas de 0 a 10, sendo que acima de 4,5 os padrões são aceitáveis. Bebidas recomendáveis apresentam aroma e sabor suave a intenso, corpo leve a encorpado, torra clara a escura e moagem fina a grossa. Estas qualidades permitem, ao momento da degustação, identificar o odor e sabor característicos dos bons cafés, como de caramelo, pão torrado, nozes e chocolate (ABIC, 2010b).

Quando características organolépticas são analisadas é importante que se leve em conta a nacionalidade dos consumidores. Leroy e colaboradores (2006) comentam que cada mercado ou país apresenta suas características organolépticas preferenciais. Alemães e suecos preferem cafés leves e mais ácidos que italianos. Já na Grécia, Líbano e norte da França a preferência é pelo sabor “rio”

– forte, lembrando iodofórmio ou ácido fênico (FARAH et al., 2006). Nos países escandinavos há grande aceitação do “café das monções”, que tem baixa acidez e sabor de queijo (AHMAD; THARAPPAN; BONGIRWAR, 2003; THARAPPAN; AHMAD, 2006) enquanto brasileiros preferem café duro.

Fatores genéticos, fisiológicos, ambientais, diferenças inter/intraespecíficas, manejo na colheita e pós-colheita, tamanho do grão e tempo de maturação dos frutos são características comumente atreladas à qualidade (SERA et al., 1996 apud SCHMIDT, 2008; AYUB; GEBIELUCA, 2003; DE CASTRO; MARRACCINI, 2006; LEROY et al., 2006; RIBAS; PEREIRA; VIEIRA, 2006; CAMARGO, 2007; BUDZINSKI, 2008; ALONSO-SALCES et al., 2009).

A qualidade do café também tem sido associada com a fase de maturação dos frutos no momento da colheita. Quando a floração se estende por muito tempo pode ocorrer desuniformidade na maturação dos frutos sendo que a presença de frutos verdes e passa pode alterar a acidez e amargor, podendo acarretar diminuição da qualidade e trazer sabor indesejável ao produto final (PEREIRA et al., 2005) (Figura 2). Além disso, De Castro e Marraccini (2006) afirmam que o crescimento do fruto é assíncrono na fase de desenvolvimento, com diferentes proporções de tamanhos. Logo, é importante que haja uniformidade e boa qualidade do fruto, com colheitas efetuadas nos estádios vermelho e cereja, que permitem a produção de grãos com as melhores características organolépticas ao café (RIBAS; PEREIRA; VIEIRA, 2006).

Outro ponto importante relacionado à qualidade é o tamanho do grão de café, que é classificado através de um teste envolvendo diversas peneiras de formas circulares e alongadas designadas por números divididos por 64, baseados no tamanho e forma do grão, sendo as peneiras de crivos redondos retentoras de grãos chatos e as de crivos alongados retentoras de grãos mocas (arredondados, mais compridos que largos, mais afinados nas pontas e com ranhura longitudinal) (LAVIOLA et al., 2006). As peneiras de grãos chatos vão de 12 a 20 e as de grãos mocas de 8 a 13, sendo reconhecidos como de boa qualidade os grãos a partir de 16. A qualificação por tamanho é parte do decreto nº27173 de 14/09/1949 e tecnicamente é muito importante, pois permite uma torra mais uniforme. Com o mesmo tempo de torra grãos graúdos ficam tostados, ao passo que pequenos carbonizam (NASSER; CHALFOUN, 2001).

Figura 2 – Diversas fases de maturação ocorrendo no mesmo cafeeiro. É possível observar os estágios verde até passa.

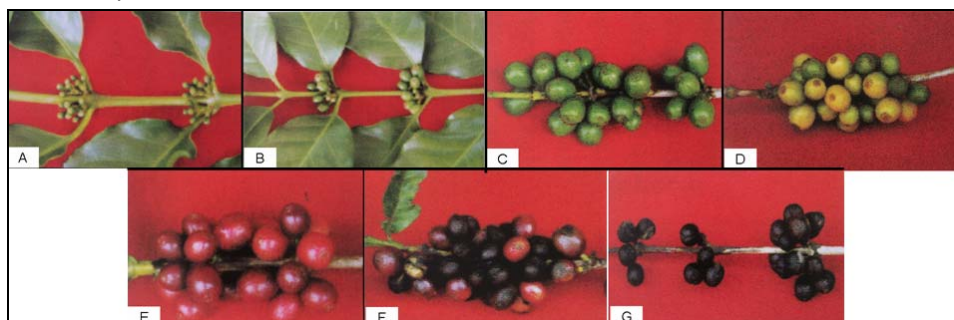


2.3.1 Frutificação do Café

O café tem seu ciclo em 2 dois anos, sendo que nos primeiros 10 meses desenvolvem-se gemas foliares e parte vegetativa. Próximo do 13º mês a florada inicia e é seguida pela granação (formação dos chumbinhos) e maturação dos frutos. Ao fim há o repouso e senescência dos ramos mais antigos da planta (DE CAMARGO; DE CAMARGO, 2001).

Seguindo Pezzopane et al. (2003) observam-se sete estádios de maturação dos frutos (Figura 3): A – chumbinho (0 a 30 dias após a florada – DAF), B – expansão dos frutos – chumbão (30 a 60 DAF), C – grão verde (60 a 90 DAF), D – verde-cana – fruto com cores verde e amarela (90 a 120 DAF), E – cereja – cor vermelha, representa o fruto maduro (180 a 210 DAF), F – passa – frutos começando a secar (210 a 240 DAF) e G – seco (240 a 270 DAF).

Figura 3 – Estádios de maturação dos frutos desde seus primeiros dias (chumbinho com cerca de 0 a 30 DAF) até os últimos (seco com cerca de 240 a 270 DAF).



Fonte: Pezzopane et al. (2003 apud De Camargo, 2007).

O fruto do café é uma drupa oval contendo de 10 a 15 mm de comprimento formada por endosperma, perisperma e pericarpo (polpa) (ARCILA-PULGARÍN et al., 2002; DE CASTRO; MARRACCINI, 2006). Quando maduro constitui-se de duas sementes formadas pelo endosperma (grãos do café) cobertas pelo pergaminho, que é a camada mais interna da polpa, por uma camada de mucilagem e pelo perisperma (fino e membranoso) (ARCILA-PULGARÍN et al., 2002).

No entanto, durante a maturação a proporção e importância destes tecidos se alteram significativamente. Nos primeiros dois meses o chumbinho cresce lentamente (ARCILA-PULGARÍN et al., 2002) e de 60 a 90 dias após a florada (DAF) o perisperma entra em fase de intensa divisão celular com aumento súbito de seu peso fresco (ARCILA-PULGARÍN et al., 2002; GEROMEL et al., 2006; DE CASTRO; MARRACCINI, 2006). Neste período o endosperma encontra-se em estágio inicial de desenvolvimento e ainda não é aparente, fazendo parte do saco embrionário (DE CASTRO; MARRACCINI, 2006). Essa é uma das fases de desenvolvimento crítica para a qualidade, pois o espaço ocupado pelo perisperma determina o tamanho do grão (DE CASTRO; MARRACCINI, 2006; GEROMEL et al., 2006; BUDZINSKI et al., 2011). Aos 75 DAF o endosperma já pode ser observado e aos 118 DAF separado do perisperma, quando os dois encontram-se em proporções iguais (GEROMEL et al., 2006). Quanto à polpa, contém clorofila e as células do mesocarpo (polpa verdadeira) são caracterizadas por paredes compactas e densas (DE CASTRO; MARRACCINI, 2006).

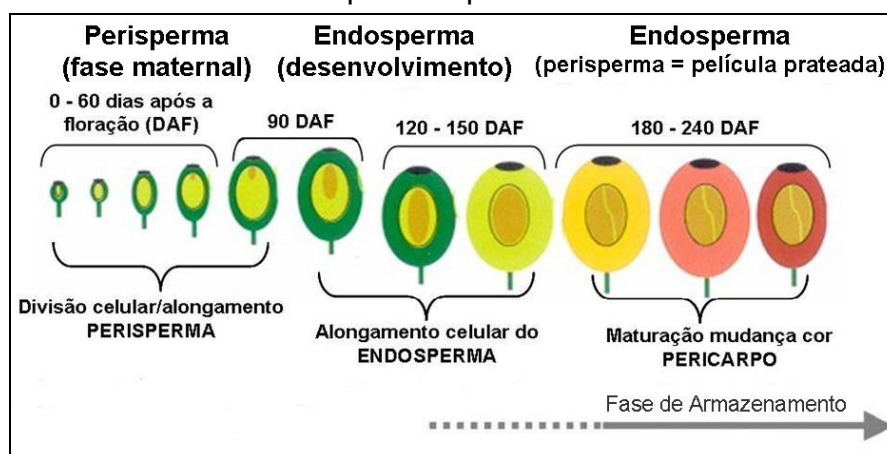
De fato, Budzinski et al. (2011) demonstraram grande expressão das α -expansinas *CaEXPA1* e *CaEXPA3* (proteínas indutoras de crescimento dos tecidos através de extensão da parede celular) aos 60 DAF em frutos de *Coffea arabica* cv. IAPAR 59 e até os 90 DAF em IAPAR 59 Graúdo, cultivar próxima que apresenta frutos maiores. Esta extensão de tempo observada em IAPAR 59 Graúdo indicou possível relação com o maior tamanho do fruto. O perisperma das duas cultivares apresentava alta transcrição de *CaEXPA1* aos 90 DAF e pequena taxa de *CaEXPA3* durante todo o período, enquanto o endosperma não demonstrou presença destas expansinas e a polpa apresentou picos no início e fim da maturação para as duas isoformas.

De 90 a 150 DAF há grande histodiferenciação e crescimento do endosperma e embrião, com o perisperma tendo seu lugar tomado pelo endosperma,

que passa de um estado inicial líquido para ficar endurecido devido ao acúmulo de proteínas, sacarose e polissacarídeos que formam a reserva da semente (ARCILA-PULGARÍN et al., 2002; BUDZINSKI et al., 2011).

Próximo aos 200 DAF o perisperma já se transformou numa fina camada (película prateada) envolvendo o endosperma enquanto a polpa teve as células da parede afinadas e um grande declínio na quantia de clorofila (DE CASTRO; MARRACCINI, 2006). Ao final da maturação, cerca de 210 a 240 DAF, o endosperma já corresponde a 99% da massa do fruto e contém todos precursores para gerar o aroma do café (JOET et al., 2009). A evolução do fruto pode ser representada pela Figura 4.

Figura 4 – Etapas de desenvolvimento do fruto do café. Nos estágios iniciais há expansão do perisperma, em seguida há involução deste e o endosperma toma seu lugar. Os próximos passos são o enchimento e mudança de cor da polpa (pericarpo). Ao fim o perisperma é uma fina camada chamada de película prateada.

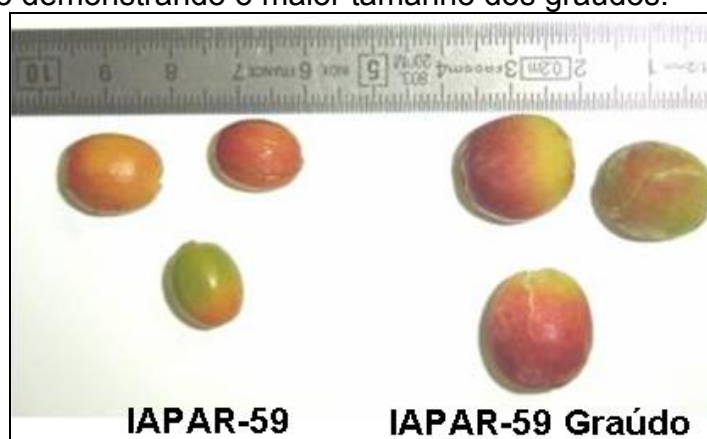


Fonte: adaptado de De Castro e Marraccini (2006).

Desde 1993 o Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR) recomenda para plantio adensado de cafeeiros a cultivar IAPAR 59 que contém como principal característica a resistência à ferrugem do cafeeiro (AYUB; GEBIELUCA, 2003; SERA et al., 1996 apud SCHMIDT, 2008). A planta é originária do cruzamento entre *C. arabica* cv. Villa Sarchi e o Híbrido de Timor, que é proveniente da cruzamento interespecífica de *C. arabica* e *C. canephora*. Esta planta apresenta grãos com bom tamanho (peneira média 16), frutos vermelhos com maturação medianamente precoce e boa qualidade de bebida (SILVEIRA et al., 2003; DE CARVALHO et al., 2008). A partir de seleções entre populações de IAPAR 59 foi desenvolvida a

variedade IAPAR 59 Graúdo, uma cultivar de frutos e grãos maiores (BUDZINSKI, et al., 2011). A Figura 5 demonstra a comparação entre os tamanhos dos frutos das duas cultivares.

Figura 5 – Frutos das cultivares IAPAR 59 e IAPAR 59 Graúdo dispostos lado a lado demonstrando o maior tamanho dos graúdos.



2.4 COMPOSTOS QUÍMICOS DO CAFÉ

Sabe-se que as características organolépticas são produtos de compostos químicos como cafeína, trigonelina, ácidos clorogênicos, sacarose, ácidos graxos, proteínas e enzimas (KNOPP; BYTOF; SELMAR, 2001; KY et al., 2001; AGUIAR, 2005; DE CASTRO; MARRACINNI, 2006; DUARTE; PEREIRA; FARAH, 2010). Sabe-se também que a torrefação é responsável por mudanças químicas relacionadas ao aroma e sabor final da bebida, que fazem do café um dos produtos mais modificados durante o processamento (TOCI; FARAH; TRUGO, 2006).

A sacarose é conhecida precursora de compostos relacionados ao aroma e sabor da bebida (KY et al., 2001; GEROMEL et al., 2006, 2008; KLEINWACHTER; SELMAR, 2010). Sua concentração é cerca de 60 vezes maior que a de frutose e até mais de 100 vezes a de glicose (KLEINWACHTER; SELMAR, 2010), representando em média 9,2% da massa seca do fruto de *C. arabica* e 5,45% de *C. canephora* (KY et al., 2001). Joet et al. (2009) observaram grande aumento de sacarose a partir dos 180 DAF, de 1,5 mg/semente para cerca de 8 mg/semente, correspondendo a 7,5% da massa seca.

Durante a torra do grão há rápida degradação da sacarose através da pirólise (caramelização) e/ou reação de Maillard (condensação de sua carbonila com grupamento amino de um aminoácido) gerando compostos voláteis como furanos, piridinas e pirrolinas, responsáveis pelo odor característica da bebida (DE MARIA; MOREIRA; TRUGO, 1999). Furanos são responsáveis pelos odores de caramelo e açúcar queimado (dependendo da concentração), o primeiro considerado como proveniente de bons cafés e o outro de ruins (DE MARIA; MOREIRA; TRUGO, 1999; ABIC, 2010b). Foi observado aumento na concentração conforme a torra é prolongada e maior quantia em Robusta que Arábica, todavia ainda não se sabe ao certo o motivo desta diferença entre espécies (ARISSETO et al., 2011).

Grãos verdes de café são ricas fontes de ácidos clorogênicos (CGAs), principal tipo de compostos fenólicos (ALONSO-SALCES et al., 2009). Eles constituem uma família de ésteres formados entre ácidos caféico, ferúlico e quínico (MONTAVON et al., 2003) e conferem pigmentação, odores de queimado, especiarias, cravo, fumo, além de adstringência e amargor ao café, sendo esta última característica aceitável, porém não excessivamente, após reações de oxidação que os transformam em semiquinonas e quinonas (DE MARIA et al., 1995; KY et al., 2001; MONTAVON et al., 2003; TOCI; FARAH; TRUGO, 2006; ABIC, 2010b). CGAs surgem no perisperma, ainda a 75 DAF, aumentando aceleradamente quando o endosperma se desenvolve e ao final da maturação podem encontrar-se cerca de sete vezes mais concentrados (JOET et al., 2009). A qualidade da bebida aumenta se a quantia de CGAs diminui (ALONSO-SALCES et al., 2009).

Há maior presença destes ácidos em *C. canephora* (11,3%) que em *C. arabica* (4,1%) (KY et al., 2001) e, de fato, a bebida de arábica é de melhor qualidade. Quantias de 7,02g e 5,78g/100g de massa seca foram encontradas em amostras de cafés arábica com bebida Rio zona e Mole, respectivamente (FARAH et al., 2006). O mesmo trabalho observou significativa correlação entre presença de CGAs e má qualidade após torras leves e médias (8 e 12 minutos a 200°C).

Como os ácidos clorogênicos, a cafeína também confere amargor à bebida (ALONSO-SALCES et al., 2009). Junto à trigonelina são os dois compostos nitrogenados de baixo peso molecular mais abundantes no café (KOSHIRO et al., 2006). A cafeína não participa de nenhuma reação específica e não é degradada durante a torração (KOSHIRO et al., 2006; RODARTE et al., 2009).

Relatos de Koshiro et al. (2006) demonstram que a produção de cafeína ocorre no início da maturação, mais precisamente antes da formação do endosperma (cerca de 60 DAF), e em sementes jovens de frutos em desenvolvimento (cerca de 150 a 180 DAF) e vai se acumulando até chegar a altos níveis nos estágios finais da maturação. Diferentes cultivares demonstraram diferentes dinâmicas de produção. *C. arabica* cv. Catimor já continha teobromina (precursora de cafeína) e cafeína presentes no estágio chumbinho, enquanto a cv. Moca só demonstrou estes sinais no estágio antes da formação do endosperma e manteve produção até o final da maturação. *C. canephora* apresentou produção apenas de teobromina nos chumbinhos, ao passo que antes de formar-se o endosperma foi observada também a cafeína. Estes dados corroboram estudos anteriores onde se encontrou maior quantia de cafeína em frutos imaturos do que maduros de diversas espécies de café, devido ao intenso metabolismo (MAZZAFERA; MAGALHÃES, 1991 apud AGUIAR, 2005).

Rodarte et al. (2009) analisaram bebidas mole, dura e rio de arábica em torrações clara, utilizada porque facilita a percepção de atributos sensoriais desejáveis ou não; média, pois ressalta o sabor e aroma característicos do café; e escura, que diminui a acidez, acentua sabor amargo, reduz doçura e origina bebida escura. Eles observaram que não houve diferença significativa entre cafés crus e torrados, quanto à concentração do composto. Cafés crus de bebida mole e rio continham cafeína a 1,3 g/100g de café e após a torra os moles passaram a conter 1,35 g/100g (torra escura) enquanto os rios 1,32 g/100g (torra clara). Para os de bebida dura encontrou-se 1,18 g/100g nos crus e 1,28 g/100g após a torra escura.

Filho e Mazzafera (2003) relataram valores de cafeína de 12,2 e 12,8 mg/g de semente nas cultivares de *C. arabica* Mundo Novo e Catuaí Vermelho, respectivamente. Já as de *C. canephora* apresentaram maiores valores: robusta 13,1 mg/g, Kouillou 17,4 mg/g e Apoatã 14 mg/g de semente. Estes resultados corroboram com o fato da bebida de *C. canephora* poder apresentar mais amargor (ALONSO-SALCES et al., 2009).

Outro alcalóide, a trigonelina, encontra-se na ordem de 0,8% em café robusta e 1% em café arábica cru, porém nestes cafés chegou a apresentar 97% e 83%, respectivamente, de sua concentração degradada durante a torra. Cafés com mais trigonelina são potencialmente mais aromáticos que os com menor concentração. Além disso, confere bom sabor à bebida (TOCI; FARAH; TRUGO,

2006; LEITE, 2009). Sua degradação térmica gera niacina (vitamina B3) e os pirróis, compostos voláteis que conferem desde notas aromáticas como de pão, caramelo, cogumelos, café torrado até a de carne bovina (DE MARIA; TRUGO, 1999; TOCI; FARAH; TRUGO, 2006).

2.4.1 Proteínas

As proteínas do café constituem cerca de 13% do grão (LEITE, 2009). Durante a torrefação são desnaturadas e degradadas a peptídeos e aminoácidos, que são essenciais para a conversão de açúcares redutores (provenientes da degradação da sacarose e polissacarídeos de parede celular) em precursores do aroma através da reação de Maillard. Os aminoácidos livres podem ser degradados durante a torrefação, ou combinados com outros componentes, gerando uma mistura de complexos voláteis e não voláteis (DE MARIA et al., 1996; TOCI; FARAH; TRUGO, 2006) que são relacionados com cheiro e sabor da bebida.

Algumas dessas substâncias voláteis produzidas na torrefação são tiofenos, oxazóis, pirazinas e piridinas, que resultam das reações de Maillard e Strecker, pirólise de aminoácidos ou degradação de trigonelina (DE MARIA; TRUGO, 1999).

As proteínas atuam como fonte de nitrogênio para a síntese de diversos compostos, mas sua importância quanto à qualidade ainda vai mais além, porque também remete ao fato de muitas enzimas estarem envolvidas na síntese/degradação dos compostos químicos do café e nos processos de maturação. A Tabela 1 demonstra algumas proteínas do café que podem estar relacionadas com qualidade e os papéis que desenvolvem.

Tabela 1 - Proteínas encontradas em frutos do cafeeiro e seus papéis.

Proteína	Papel desenvolvido no café
Proteínas 11S	Reserva de aminoácidos e nitrogênio para germinação da semente; precursoras de melanoidinas
ACC-sintase (E.C. 4.4.1.14)	Relacionadas à síntese do etileno (fitormônio responsável por ativar a maturação)
ACC-oxidase (E.C. 1.4.3)	
S-adenosil-metionina sintase (E.C. 2.5.1.6)	
Endo- β -manases (E.C. 3.2.1.78)	Sintetizam galactomananas (componentes da parede celular do fruto)
α -galactosidase (E.C. 3.2.1.22)	Retira galactose da galactomanana e leva ao endurecimento do endosperma
Polifenoloxidase (E.C. 1.10.3.1)	Oxida/reduz compostos fenólicos e tem atividade aumentada conforme o fruto amadurece
Poligalacturonases (E.C. 3.2.1.15)	Relacionadas à maturação em várias frutas climatéricas e à senescência dos frutos
Pectina-metil-esterases (E.C. 3.1.1.11)	Relacionadas à maturação em várias frutas climatéricas
Invertases (E.C. 3.2.1.26)	Hidrolizam sacarose
Sacarose fosfato sintase (E.C. 2.4.1.14)	Sintetiza sacarose
Sacarose sintase (E.C. 2.4.1.13)	Hidroliza e sintetiza sacarose
Expansinas	Induzem a expansão de paredes celulares de frutos e flores
ATPases	Suprem a alta demanda de energia do fruto em estágio inicial

Fonte: Rogers et al., 1999; Marraccini et al., 2001; Pimenta e Vilela, 2003; Montavon, Mauron e Duruz, 2003; Cavalari, 2004; Marraccini et al., 2005; Geromel et al., 2006; Ribas, Pereira e Vieira, 2006; Laviola, 2007; Agüero-Chapin et al., 2009; Budzinski et al., 2011.

Sementes de dicotiledôneas costumam possuir globulinas como proteínas de reserva, sua produção é iniciada no retículo endoplasmático rugoso e são agrupadas de acordo com a sedimentação em principalmente 7S e 11S (MIERNYK; HAJDUCH, 2011).

Em estudos proteômicos, Rogers et al. (1999) demonstraram a presença das proteínas de reserva 11S no café e as classificaram como as mais abundantes no endosperma, sendo produzidas e acumuladas continuamente até o ponto intermediário da maturação. Estas moléculas correspondem por 45% das proteínas do endosperma, e sua estrutura globular é formada pelas subunidades α –

32 KDa – e β – 20 KDa. Seu papel é de fornecer aminoácidos e nitrogênio para a germinação da semente (MONTAVON; MAURON; DURUZ, 2003). Embora esta família protéica tenha sido descrita como endospermática, Bandil (2008) a identificou em frutos em estágio inicial de desenvolvimento, justamente quando o perisperma é dominante e o endosperma praticamente inexistente. As subunidades das 11S interagem com polifenóis para produzir, através de autooxidação, as melanoidinas (responsáveis pela cor marrom do café torrado) durante a torra (MONTAVON; MAURON; DURUZ, 2003).

Os últimos estágios da maturação são ativados pelo aumento do etileno presente dos frutos. Este fitormônio, associado a um aumento na respiração, promove amolecimento da parede celular, acumulação de açúcar, modificações em compostos ácidos e fenólicos e acúmulo de pigmentos (antocianinas e carotenóides) (PEREIRA et al., 2006; RIBAS; PEREIRA; VIEIRA, 2006). Sua síntese tem os últimos passos deflagrados pela S-adenosil-metionina sintase (E.C. 2.5.1.6), que converte metionina em S-adenosil-metionina (SAM). Esta é convertida em ácido 1-carboxílico-aminociclopropano (ACC) pela ACC-sintase (E.C. 4.4.1.14). Ao fim a ACC-oxidase (E.C. 1.4.3) faz a conversão em etileno.

Pereira et al. (2006) observaram em frutos de café cv. IAPAR 59 que houve um pico na produção de etileno acompanhado por grande expressão da ACC-oxidase entre os estágios verde-cana e cereja, demonstrando maturação climática neste vegetal. Estes estudos trouxeram conhecimento a respeito da maturação dos frutos, o que permite criar estratégias visando uniformidade neste processo e melhorar a qualidade. Este comportamento em frutas climáticas foi também observado por Chaves et al. (1997) ao estudarem a atividade da ACC oxidase em maçã e tomate, cujas taxas de etileno aumentaram 250 e 70 vezes durante a transição entre os períodos pré-climático e climático.

As enzimas endo- β -manases (E.C. 3.2.1.78) estão relacionadas com a biosíntese de mananas, galactomananas e glicomananas (componentes da parede celular) e sua hidrólise durante a germinação. Podem também atuar com especificidades espaciais e teciduais, bem como em controles de expressão hormonal. Cerca de 56% a 58% do peso seco do endosperma de *C. arabica* e *C. canephora* são formados por polissacarídeos, sendo 26% galactomananas, que durante o processamento do café para produzir bebida instantânea podem formar

sedimentos (borras) de baixo valor comercial que representam perdas, além de clarificá-la (MARRACCINI et al., 2001; CAVALARI, 2004).

Marraccini et al. (2005) comentam que quando o perisperma é substituído pelo endosperma ocorrem mudanças na estrutura das galactomananas, de forma que têm suas galactoses retiradas pela α -galactosidase (α -GAL) (E.C. 3.2.1.22). Estes autores observaram que a proporção galactose/manose foi entre 1:2 e 1:7 no endosperma precoce e caiu para entre 1:7 e 1:40 ao fim de sua maturação.

Adicionalmente, também estudaram a atividade da α -GAL em grãos de 21 espécies de café, havendo observado atividade nula até cerca de 70 DAF (etapa de dominância perispermática) e positiva na polpa e endosperma entre 210 e 280 DAF, sendo que no endosperma foi cerca de oito vezes maior. Quando analisada via eletroforese bidimensional (SDS-PAGE) (pH 3-10) a proteína demonstrou conter, ao menos, duas isoformas de massa molecular 40 KDa e pIs 5,5 e 5,7 e ser similar a outra α -GAL de café. Esta enzima parece manter alta a proporção galactose/manose, de forma que permite o tráfego intracelular dos sacarídeos levando ao endurecimento do endosperma. Os açúcares são translocados das cadeias reserva de mananas para a parede celular.

A ação das endo- β -manases e α -galactosidase é essencial, tendo em vista que a hidrólise das mananas produz açúcares redutores que mais à frente serão convertidos, junto de aminoácidos, em precursores do aroma pela reação de Maillard (JOET et al., 2009).

A polifenoloxidase (E.C. 1.10.3.2) oxida compostos fenólicos em quinonas. Embora não se tenha certeza de sua função biológica, parece estar envolvida em resistência a doenças e herbívoros, de forma que a oxidação dos fenóis modifica proteínas da planta e reduz seu valor nutritivo. Todavia a reação das quinonas com proteínas pode participar na qualidade do café (MAZZAFERA; ROBINSON, 2000; DE CASTRO; MARRACCINI, 2001).

Mazzafera e Robinson (2000) caracterizaram a polifenoloxidase no endosperma e observaram grande afinidade *in vivo* da enzima com ácidos clorogênicos, especificamente o isômero 5-CQA.

Pimenta e Villela (2003) também afirmaram que a atividade da polifenoloxidase, aliada a outros parâmetros químicos, serve para avaliar a qualidade do café. Em seu trabalho eles observaram que colheitas realizadas no último estágio de maturação (com 70% de grãos passa) corresponderam à maior

atividade da enzima, enquanto nas mais precoces (com 35% de grãos verdes) a atividade foi menor. Os autores concluíram que a presença de muitos frutos verdes nos estádios anteriores de maturação pode ter sido o motivo da menor ação enzimática e que à medida que se estendeu a época de colheita diminuíram os compostos fenólicos e aumentou a atividade da polifenoloxidase. Curiosamente esta enzima tem sua atividade aumentada quando seu substrato principal, CGAs, está em menor concentração, pois, como citado anteriormente, os grãos verdes são a maior fonte de CGAs (ALONSO-SALCES, 2009).

Outras enzimas como poligalacturonases (E.C. 3.2.1.15) e pectina-metil-esterases (E.C. 3.1.1.11) têm sido relacionadas à maturação em vários frutos climatéricos, sendo que poligalacturonases também apresentam papel na senescência dos frutos (RIBAS; PEREIRA; VIEIRA, 2006; BUDZINSKI, 2008; AGÜERO-CHAPIN et al., 2009).

Há ainda as expansinas que induzem a expansão de paredes celulares de frutos e flores as ATPases que suprem a alta demanda de energia do fruto em estágio inicial além das invertases (E.C. 3.2.1.26) que hidrolizam, sacarose fosfato sintase (E.C. 2.4.1.14) que sintetiza e sacarose sintase (E.C. 2.4.1.13) que sintetiza/hidroliza sacarose (CAVALARI, 2004; GEROMEL et al., 2006; LAVIOLA, 2007; BUDZINSKI et al., 2011).

Leroy et al. (2011) analisaram QTLs (*Quantitative Trait Loci*) de *C. canephora* e correlacionaram tratos organolépticos e bioquímicos com qualidade. Eles reportaram alta significância positiva entre sabor, acidez e nota global de preferência (obtida em testes de xícara) com conteúdos de sacarose e 5-CQA. A acidez está negativamente correlacionada com conteúdos de trigonelina e 5-CQA, enquanto que o amargor é positivamente correlacionado com a presença de cafeína e negativamente com a de sacarose. A relação com os QTLs foi de que localizados próximos dos genes responsáveis pela síntese de tais compostos houve diferenças no metabolismo que puderam ser relacionadas à qualidade.

2.5 PROTEÔMICA

Na genética dos dias de hoje sabe-se que o fenótipo pode ser observado através da morfologia, fisiologia, bioquímica e características moleculares de um organismo. Ao nível molecular o fenótipo pode ser descrito em termos de RNA e proteínas, associados ao genoma e influenciados pelo ambiente (SALVATO; DE CARVALHO, 2010).

A quantia de proteínas nem sempre é relacionada à de RNA, além disso, muitas proteínas sofrem modificações pós-traducionais como remoção de peptídeos sinais, fosforilação, glicosilação que são extremamente importantes para atividades e localização subcelular (GUIMARÃES, 2007) e esta não foi uma previsão do “Dogma Central da Biologia Molecular”.

Embora a expressão de mRNA não possa ser deixada de lado, sabe-se pouco a respeito da célula para prever quando há maior expressão de certo gene pela maior expressão de proteínas e de atividade funcional. Algumas modulações de expressão de mRNAs devem especificar as direções da atividade celular, enquanto para proteínas muitas vezes isto significa o ajuste fino do aparelho celular (FEY; LARSEN, 2001).

Ademais, ao mesmo tempo em que são fruto da maquinaria de transcrição e tradução, as proteínas podem atuar na regulação deste processo. Também podem levar a mudanças na membrana plasmática, citoplasma e citoesqueleto em resposta às condições ambientais (KOSOVA et al., 2011).

Com efeito, as mais de 135 mil sequências de genes (*Expressed Sequence Tags* – ESTs) geradas pelo Projeto Genoma Café Brasileiro (MONDEGO et al., 2011) não fornecem muitas respostas quantitativas ou qualitativas que possam ser relacionadas com as proteínas.

A proteômica é uma abordagem interessante que pode trazer tais respostas. O termo foi cunhado por WILKINS et al. (1996) que o definiram como a caracterização em larga escala do conjunto de proteínas expressas (proteoma) em uma célula ou tecido num dado momento. A aceitação da técnica foi tamanha que dez anos depois Rossignol et al. (2006) realizaram uma pesquisa em publicações referentes ao intervalo 2004-2006 e encontraram mais de 200 trabalhos envolvendo pelo menos 35 espécies e diversas temáticas, sendo que isto representava menos de 1% da produção existente. Outro estudo demonstra que o número de trabalhos

saltou de 250 para 5.000 entre os anos 2000 e 2010 e que a proteômica foi o campo da biotecnologia mais crescente neste período (PENG, 2011).

Para Franco et al. (2009) a proteômica permite medidas qualitativas e quantitativas de muitas proteínas envolvidas diretamente na bioquímica celular e traz análises seguras do estado celular ou mudanças do sistema durante crescimento, desenvolvimento e resposta a fatores ambientais. Todavia Salvato e De Carvalho (2010) revendo o momento em que encontra-se esta ciência, afirmam que apenas a geração de dados proteômicos não resolve por si só a complexidade dos sistemas biológicos, mas que é necessário que genômica, transcritômica, metabolômica, bioinformática e proteômica interajam. Assim, a proteômica vem para expandir a gama de informações biológicas, permitindo melhor entendimento de aspectos fundamentais da biologia de plantas e podendo gerar no futuro um evidente impacto nas práticas agronômicas.

2.5.1 Proteômica do Café

Embora existam muitos estudos proteômicos, são poucos os que envolvem o café. Gil-Agusti et al. (2005) compararam frutos maduros de *C. arabica* cv. Colômbia e *C. canephora* cv. Robusta Indiano via mapas 2D para caracterizar as diferenças entre as espécies e futuramente evitar adulterações além de identificar OGMs. Foram observados 30 *spots* com diferenças de expressão e 9 foram identificados como: gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, relacionada com metabolismo de carboidratos, glutathione peroxidase fosfolipídio hidroperóxido, ligada à proteção celular e enzimática através de redução de compostos peróxidos e proteína 11S.

Livramento (2008) analisou o perfil proteômico de grãos de café despulpados e com polpa submetidos à secagem em terreiro e secador. Observou-se que os de secador apresentaram menor quantidade de *spots*, tendo sido isto atribuído à temperatura de secagem mecânica (60°C) que pode ter ocasionado degradação de proteínas ou permitido ação de proteases. No tratamento envolvendo cafés despulpados secos em secador e terreiro notou-se 18 *spots* com abundância diferencial (entre 1,7x e 14x). Nos cafés com polpa os resultados demonstraram grande quantidade de *spots* (22) com diferença significativa de intensidade de proteínas, sendo que apenas um estava mais intenso no café seco mecanicamente. A autora

observou maior abundância da globulina 11S e da enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, que atua na glicólise e relaciona-se com falta de oxigênio no meio.

Bandil (2008) analisou extratos de frutos inteiros de *C. arabica* IAPAR 59 nos estágios chumbinho e chumbão, a fim de identificar expressões diferenciais das proteínas. Não houve diferença significativa entre os estágios de desenvolvimento, talvez pela proximidade temporal. Foram levados à espectrometria de massa 16 *spots* e 7 foram identificados. Destes, apenas *taumatina-like* foi mais expressa em chumbinho, enquanto proteína de reserva 11S, precursor de cloroplasto, frutose bifosfato aldolase, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase e malato desidrogenase estavam mais expressos no chumbão. As três últimas proteínas estão relacionadas ao metabolismo de carboidratos, cuja função é suprir demandas de energia para o desenvolvimento. *Taumatina-like* estaria representando resposta a algum estresse ou patógeno e precursor de cloroplasto reforçou a idéia de que frutos verdes são fotossintetizantes.

Franco et al. (2009) estudaram padrões de expressão em frutos de *C. arabica* cv. Catuaí Vermelho IAC-99 aos 210 DAF e 255 DAF. Dos 185 *spots* observados, 10 foram levados à análise por espectrometria de massa. Aos 210 DAF observou-se a proteína U1 SNRP 70K, relacionada ao splicing de sn-RNAs (que atuam no processamento de RNAs), quinases, que podem ser estimuladas por fatores de crescimento, citocinas, irradiação e mudanças na osmolaridade, proteína realçadora de oxigênio, que pode estar relacionada a intensos processos metabólicos e uma ATPase. Nas amostras de 255 DAF foram identificadas uma proteína hipotética de *Oryza sativa* (arroz), ribulose-1-5-bifosfato carboxilase/oxigenase, importante na conversão de CO₂ em componentes celulares, glutarredoxina, relacionada a estresses oxidativos, fator MYB, cuja ação relaciona-se com sinalização celular e controle de produção de tanino (relacionado à defesa contra patógenos) e fosfocolina citidiltransferase (CTP), que atua na síntese de fosfatidilcolina e relaciona-se com tolerância ao frio.

Com o objetivo de comparar perfis protéicos de sementes, embrião e endosperma de frutos verde-cana, Koshino et al. (2008) também estudaram o Catuaí Vermelho IAC-99. Onze *spots*, sendo 3 do embrião e 4 do endosperma, foram definidos como a proteína 11S, demonstrando maior expressão nestes materiais. Proteínas relacionadas à defesa contra patógenos também foram observadas: uma pertence à superfamília das cupinas e outra sugerindo ser a Mal d1, possivelmente

associadas à proteção da planta contra patógenos. Ademais, os autores sugeriram a descoberta de uma proteína com pI 4,5 e MM 30 KDa que não tinha sua sequência depositada em bancos de dados públicos de café.

Outros tecidos como folhas e raízes também foram objeto de estudo em outros trabalhos. Ao verificar proteínas de folha dos clones de *C. canephora* 109A – susceptível e 120 – resistente à seca, Guimarães (2007) observou semelhança nos géis resultantes das duas condições. Quando comparados com os controles o clone 109A apresentou mais proteínas com volume diferencial. Além disso, três proteínas foram observadas *up-regulated* nas duas espécies em resposta ao déficit. Observou-se maior expressão de chaperonas e subunidades da Rubisco e menor de proteínas fotossistemas, que pode ser resultado da tentativa de manter o papel antioxidativo da fotorrespiração. Ao mesmo tempo, no clone 120 houve maior volume de NADPH-quinona redutase sob estresse, que poderia estar atuando na detoxificação de espécies reativas de oxigênio resultantes da falta de água. O clone 109A sofreu aumento de expressão das chaperonas *HSP (Heat Shock Protein)* que num estresse hídrico podem contribuir no correto dobramento protéico para manter as corretas conformações e prevenir agregações de outras proteínas. O autor sugere que os resultados indicam possível adaptação ao estresse enfrentado.

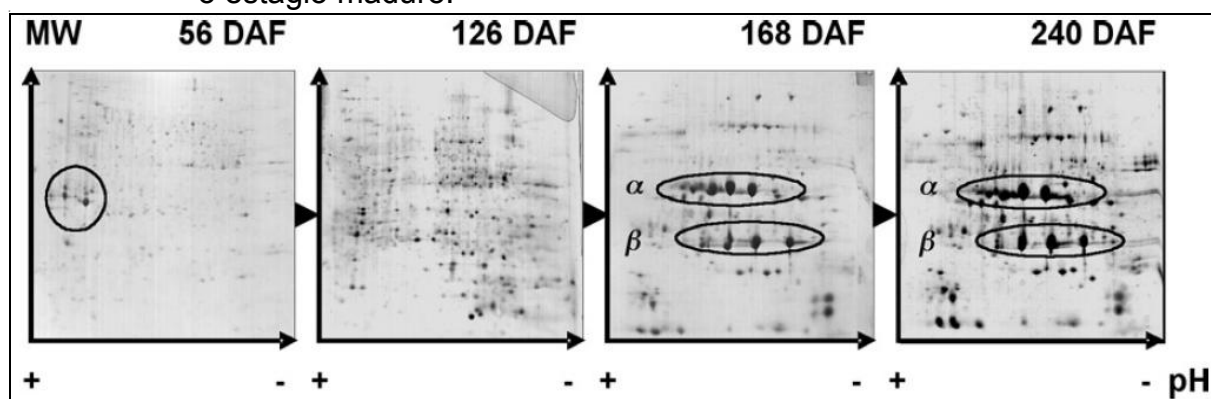
Seguindo o protocolo de Guimarães (2007) Soares (2008) analisou raízes de *C. canephora* 109A e 120 em condições de seca e normais. Foram observadas reduções na abundância de 38 *spots* nos clones 109A e 120. Por outro lado, a abundância foi maior para 18 e 19 *spots* nestes materiais. Via espectrometria de massa 57 proteínas foram identificadas, sendo relacionadas ao metabolismo de carboidratos, desenvolvimento e crescimento, processamento protéico, defesa e estresse oxidativo.

De Castro e Marraccini (2006) revendo alguns estudos comentaram que o perisperma contém muitas proteínas abundantes diferentes do endosperma (Figura 6). Existem quitinases de classe III perispermáticas que costumam ser expressas após infecções, mas também podem atuar como reserva e parecem estar *up-regulated* em tecidos com intensa divisão celular, sugerindo participação no crescimento e desenvolvimento da planta. Notadamente o perisperma é um tecido característico pela intensa divisão celular e a β -tubulina (componente de microtúbulos) que indica eventos de divisão e expansão celular também encontrava-se *up-regulated* neste tecido. Já no endosperma o acúmulo de β -tubulina começa a

diminuir aos 120 DAF até não existir no final da maturação.

A caracterização molecular e bioquímica dos processos relacionados com o desenvolvimento e maturação de frutos pode ajudar no desenvolvimento de estratégias para o melhoramento de cafeeiros visando aumentar a qualidade da bebida. Ainda há necessidade de estudos proteômicos envolvendo café, especialmente com frutos em estágio inicial de maturação, e neste sentido a proteômica pode ser utilizada como ferramenta analisando proteínas e comparando produção protéica de frutos e grãos de diferentes cultivares, almejando a identificação de proteínas que possam ser relacionadas com maior qualidade dos cafés.

Figura 6 – Géis 2D demonstrando proteínas de perisperma e endosperma em diferentes estádios de desenvolvimento do fruto de café. Aos 56 DAF observa-se no círculo quitinases de classe III perispermáticas. Entre 168-240 DAF estão evidenciadas subunidades α e β de proteínas 11S endospermáticas que se mantêm desde a fase de armazenamento até o estágio maduro.



Fonte: adaptado de De Castro e Marraccini (2006).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO

Este trabalho visou melhor entendimento da expressão e perfil protéicos nos frutos do cafeeiro relacionados ao desenvolvimento do perisperma com vistas à qualidade.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Identificar proteínas com variação de expressão em diferentes estádios de desenvolvimento de perisperma e em frutos com tamanhos diferentes.

Entender o papel destas proteínas referente à regulação da maturação frutífera.

Integrar os dados proteômicos obtidos com dados existentes de transcriptômica.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Biotecnologia (LBI) do Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR). As extrações protéicas e eletroforeses seguiram procedimentos prévios realizados por Marraccini et al. (2012) e Magalhães (2009) modificados.

4.1 MATERIAL VEGETAL

Frutos de *Coffea arabica* das variedades IAPAR 59 (IPR59) e IAPAR 59 Graúdo (IPR59 GDO) foram coletados em três estádios de desenvolvimento: 60 dias após a florada (DAF) (novembro/2007), 90 DAF (dezembro/2007) e 180 DAF (março/2008). As variedades também foram comparadas entre si quando no mesmo estágio de desenvolvimento.

4.2 SEPARAÇÃO DE TECIDOS E EXTRAÇÃO DE PROTEÍNA TOTAL

Com auxílio de pinça e bisturi os frutos foram cortados ao meio e o perisperma separado. O processo foi realizado rapidamente e em presença de nitrogênio líquido para evitar oxidação do tecido. Os materiais permaneceram estocados em ultrafreezer a -80 °C até a extração protéica.

A extração de proteínas realizou-se utilizando o método fenol/SDS (WANG et al., 2003) modificado, que envolve a maceração do material e posteriores lavagens com solventes orgânicos, solubilizações com tampão e precipitação em TCA em água e acetona. Após estas etapas, com a aplicação do tampão com SDS e do fenol, foi realizada a efetiva separação protéica. Dessa forma, ao final, as proteínas que ainda estavam dentro das células ficaram solubilizadas na fase fenólica, que foi coletada.

O perisperma foi macerado imerso em nitrogênio líquido. Cerca de 5 a 10g do materiais macerados foram transferidos a tubos de centrífuga onde se adicionou 20 mL de solução tampão gelada contendo PVPP (poli-vinil-poli-pirrolidona) 15% em acetona (1% m/v), β -mercaptoetanol (2% v/v), PMSF (fenil-metil-sulfonil fluoreto) 1mM (m/v) e acetona 90% (v/v). As amostras repousaram por 40 minutos em gelo e em seguida foram sonicadas por três ciclos de 25 segundos a 30% da

potência total. Posteriormente houve centrifugação a 25000 xg por 7 minutos a 4 °C e o sobrenadante foi descartado.

Os *pellets* sofreram ciclos de lavagens subseqüentes com centrifugações nas mesmas condições acima, todavia em presença de 10 a 15 mL dos seguintes componentes:

- acetona pura (2 ciclos);
- ácido tricloroacético (TCA) 10% em acetona (m/v) (3 a 4 ciclos ou até o sobrenadante ficar incolor);
- TCA 10% em água (m/v) (2 ciclos);
- acetona 80% em água (v/v) (2 ciclos);
- etanol 80% em água (v/v) (1 ciclo).

As amostras repousaram a 35 °C até secarem.

Os extratos secos foram então transferidos para tubos falcon onde adicionou-se 10 a 20 mL de tampão SDS denso (com agitação) contendo sacarose 30% (m/v), SDS 2% (v/v), Tris-HCl – pH 8,5 – 0,1 M (v/v), β-mercaptoetanol 2% (v/v) e PMSF 1mM (m/v) e 2,5 a 12 mL de fenol tamponado (pH 7,3). Os tubos repousaram por 5 minutos e foram centrifugados a 24000 xg por 10 minutos a 4 °C, de modo que se formassem duas fases: a inferior com SDS e a superior fenólica, onde se encontravam solubilizadas as proteínas. Esta fase foi coletada com cuidado e adicionou-se 5 volumes de acetato de amônio 0,1M em metanol gelado *overnight* para precipitar proteínas.

Em seguida houve nova rodada de ciclos de lavagens para retirar o fenol residual. Foram realizadas centrifugações a 19500 xg, 15 minutos e 4 °C em presença dos seguintes reagentes:

- acetato de amônio 0,1M em metanol (v/v) (1 ciclo);
- acetona 80% em água (v/v) (3 ciclos);
- etanol 70% em água (v/v) (1 ciclo).

O *pellet* foi deixado em temperatura ambiente até secar completamente. Em seguida foi ressuspenso em tampão de solubilização contendo uréia 7M, tioureia 2M e 3-(3-cholamidopropil-dimetilamonio)-1-propanosulfonato (CHAPS) 4% (m/v) e repousou por no mínimo 2 horas em temperatura ambiente até a máxima solubilização protéica possível. O material foi armazenado em ultrafreezer a -80°C até quantificação de proteínas.

4.2.1 Quantificação de Proteínas

Utilizou-se o método de Bradford (1976) para quantificação protéica. Esta técnica envolve a interação de proteínas e corante BBG-250, que no pH reacional tem seu equilíbrio deslocado para a forma aniônica, absorvendo radiação a 595 nm (ZAIA; ZAIA; LICHTIG, 1998). A curva de calibração continha padrões com concentrações entre 0 a 30 µg/mL de soroalbumina bovina adicionados de reativo de Bradford. Em seguida foram quantificadas as amostras protéicas sob as mesmas condições de reação.

Foram separadas alíquotas com aproximadamente 600 µg de proteínas e armazenadas em ultrafreezer a -80°C até a realização da isoeletrofocalização.

4.3 ELETROFORESE 2D

A realização da eletroforese 2D foi dividida nas etapas descritas a seguir.

4.3.1 Primeira Dimensão

4.3.1.1 Hidratação das Tiras

Foram utilizadas tiras *IPG strips* (GE Healthcare) de 13 cm e pH 4-7. Cada alíquota contendo 600 µg de proteína foi adicionada em solução com volume final de 250 µL contendo 4µL de ditioteritol (DTT) 50 mM, 2% de IPG buffer (pH 4-7) e o restante de tampão DeStreak. Em seguida, distribuiu-se estas soluções nas canaletas do recipiente *Reswelling Tray* (GE Healthcare) preenchendo o comprimento corresponde ao tamanho das tiras e adicionou-se as tiras, a fim de hidratá-las com as soluções. O material foi coberto com uma camada de óleo mineral para proteção.

4.3.1.2 Isoeletrofocalização

Após 14 a 16 horas foi iniciada a isoeletrofocalização e o material foi coberto com óleo mineral para proteção. A temperatura de análise foi fixada em 20°C, a amperagem máxima de 55 μ A por tira e as etapas de voltagens foram: 1 – passo: 200 V com acúmulo de 200 VHrs; 2 – passo: 500 V com acúmulo de 500 VHrs; 3 – gradiente: 1000 V com acúmulo de 1000 VHrs; 4 – gradiente: 7000 V com acúmulo de 11300 VHrs; 5 – gradiente: 8000 V com acúmulo de 35000 VHrs (MARRACINI et al., 2012, modificado).

Logo antes da separação em gel SDS-PAGE, as tiras foram equilibradas sob agitação durante 15 minutos em solução de equilíbrio (uréia 6M, Tris-HCl 75 mM – pH 8, glicerol 29,3%, SDS 2% e corante azul de bromofenol 0,002%) adicionada de DTT (10 mg/mL) e em seguida de iodoacetamida (IOD) (35 mg/mL).

4.3.2 Segunda Dimensão

4.3.2.1 Géis SDS-PAGE

A separação em segunda dimensão ocorreu em géis de poliacrilamida – SDS (SDS-PAGE) de 13 cm com 11% de acrilamida e em cuba eletroforética vertical (Hoefler SE 600 Ruby – Amershan Biosciences), à temperatura de 10°C utilizando tampão Tris-Glicina descrito por Laemmli (1970). Foram produzidos dois géis para cada *bulk* de plantas, totalizando 36 géis. As condições da corrida foram:

1º ciclo: 45 minutos, 250 V, 15 mA por gel, 50 W e 10 °C.

2º ciclo: 3 h 40 min, 250 V, 30 mA por gel, 50 W e 10 °C.

Após a corrida os géis foram retirados do suporte e imersos em fixador contendo ácido acético 10%, etanol 40% e água sob agitação lenta *overnight*. Em seguida foram lavados em água destilada e corados com solução coloidal Coomassie Blue G-250 sob agitação lenta durante três dias. A retirada do corante ocorreu através de lavagens com água destilada sob agitação lenta por três dias e os géis foram estocados em solução de ácido acético 5% no refrigerador até o momento da análise dos *spots* (NEUHOFF; STAMM; EIBL, 1985 - modificado).

4.3.2.2 Análise dos géis

Os géis foram escaneados com aparelho *Image Scanner* (UMAX) sob comando do programa *Lab Scan* (GE Healthcare) e as análises dos *spots* foram desenvolvidas utilizando o programa *Image Master 2D Platinum 6.0* (GE Healthcare), com conferência e edições manuais quando necessário. Somente foram considerados *spots* com intensidade maior que 0,01 e área acima de 0,8. As imagens contendo o maior número de *spots* e o melhor padrão protéico foram escolhidas como referência (gel *master*) e foram comparadas com as imagens dos outros géis de cada grupo. Como normalização foi realizada uma divisão entre o volume de cada *spot* pelo volume total do gel, constituindo o volume relativo ou porcentagem de volume (%Vol). Foram considerados *spots* com diferença de expressão aqueles que estavam presentes nos três géis de cada amostra e apresentaram variação de ao menos $\pm 1,5$ vezes em %Vol com significância através da análise de variância ($p < 0,05$) realizada pelo *software* SISVAR (FERREIRA, 2008).

4.3.2.3 Extração e digestão de proteínas dos *spots*

Os *spots* selecionados foram extraídos dos géis com ponteiros de 1000 μL estéreis e transferidos para microtubos. A digestão de proteínas e extração de peptídeos dos géis seguiu o protocolo de SHEVCHENKO et al. (2007) modificado, que consiste de descoloração e desidratação dos *spots* seguido de digestão e extração dos peptídeos.

Para a etapa de descoloração aplicou-se solução com acetonitrila (ACN) 50% e tampão bicarbonato de amônio (AMBIC) 25 mM em agitação por 10 min com troca de solução até a retirada completa do corante. Em seguida, os *spots* foram desidratados com ACN 100% em agitação por 10 min, repetindo o processo até a desidratação total, com posterior secagem à temperatura ambiente.

Aos *spots* foi adicionada solução redutora (DTT 20 mM e AMBIC 50 mM) e mantida por 40 min a 56°C. Esta solução foi removida e aplicou-se solução de alquilação (IOD 55 mM e AMBIC 50 mM) por 30 min no escuro e em temperatura ambiente. Em seguida os *spots* foram lavados em AMBIC 25 mM e desidratados em ACN 100%, com posterior secagem à temperatura ambiente.

Para a clivagem das proteínas foi utilizada solução enzimática com Tripsina (*Trypsin Gold Mass Spectrometry* – Promega) em ácido acético (20 ng/μL). Adicionou-se 10 μl de solução em cada tubo. Os materiais repousaram por 15 min a 4°C para penetração da tripsina nos fragmentos e, em seguida, adicionou-se AMBIC 50 mM até cobertura dos *spots* com posterior incubação a 37°C por 14 horas. Após o período a atividade da enzima foi interrompida por solução bloqueadora (ACN 50% e ácido fórmico 5%).

Os peptídeos foram eluídos em três passos: 1) foi adicionada no tubo com os fragmentos a solução de eluição 1 (metanol 60% e ácido fórmico 1%) e o material sonicado por 15 min a 40°C. Este procedimento foi repetido e os sobrenadantes foram recolhidos em um tubo separado; 2) realizou-se o mesmo procedimento, porém aplicando a solução de eluição 2 (ACN 50% e ácido fórmico 1%) com recolhimento dos sobrenadantes no mesmo tubo separado no passo 1; 3) adicionou-se ACN 100% e o sobrenadante foi recuperado e adicionado ao tubo separado. A solução contendo os peptídeos foi concentrada em *speed-vac* e ressuspendida em ácido fórmico 0,1%. Os materiais passaram por purificação em microcolunas *Zip-Tip*.

As análises por espectrometria de massa foram realizadas em equipamento MALDI-TOF-TOF (AB Sciex) no laboratório Max Feffer de Genética de Plantas da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz – USP. A análise foi realizada aplicando-se 1 μL de solução com amostra e ACN 50% e 1 μL de matriz ácido-α-ciano-4-hidroxicinâmico na placa MALDI.

O aparelho operou em modo automático e foi calibrado com padrão interno (CAL Mix 1 – AB Sciex). Os espectros de espectrometria de massa (MS) e de massa em *tandem* (MS/MS) foram obtidos no modo refletor positivo a 400 Hz em MS e 1000 Hz em MS/MS; fonte de íons com voltagem de 3400 kV em MS e 4700 kV em MS/MS; 1000 tiros/espectro no modo MS e 2500 tiros/espectro no modo MS/MS. Os peptídeos foram identificados através de *Peptide Mass Fingerprinting* (PMF) utilizando o método *Collision Induced Dissociation* (CID).

Os dados de massas e cargas dos peptídeos foram obtidos pelo programa AB Sciex MALDI TOF/TOF Series Explorer 4.1 e a análise do conjunto de dados foi realizada através do programa Protein Pilot 4.0, que executou as buscas por sequências homólogas através da plataforma MASCOT (Matrix Science), consultando o banco de dados do café e com filtragem para *Coffea* sp. na data de

31/01/2012. Os parâmetros para a busca monoisotópica foram carbamidometilação de cisteína, oxidação de metionina e duas clivagens trípticas perdidas. As sequências de cDNA obtidas foram alinhadas contra o banco de dados de ESTs do café (<http://www.bioinfo04.ibi.unicamp.br/>) utilizando-se a ferramenta BLASTn para comparação com *clusters* de *C. arabica* e conseqüente identificação do *contig* pertencente. Em seguida, a sequência de DNA do *contig* foi analisada pela ferramenta BLASTx disposta no *The Arabidopsis Information Resource* (TAIR) (<http://www.arabidopsis.org/Blast/index.jsp>) ou no banco de dados do NCBI visando a identificação da função da proteína correspondente.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

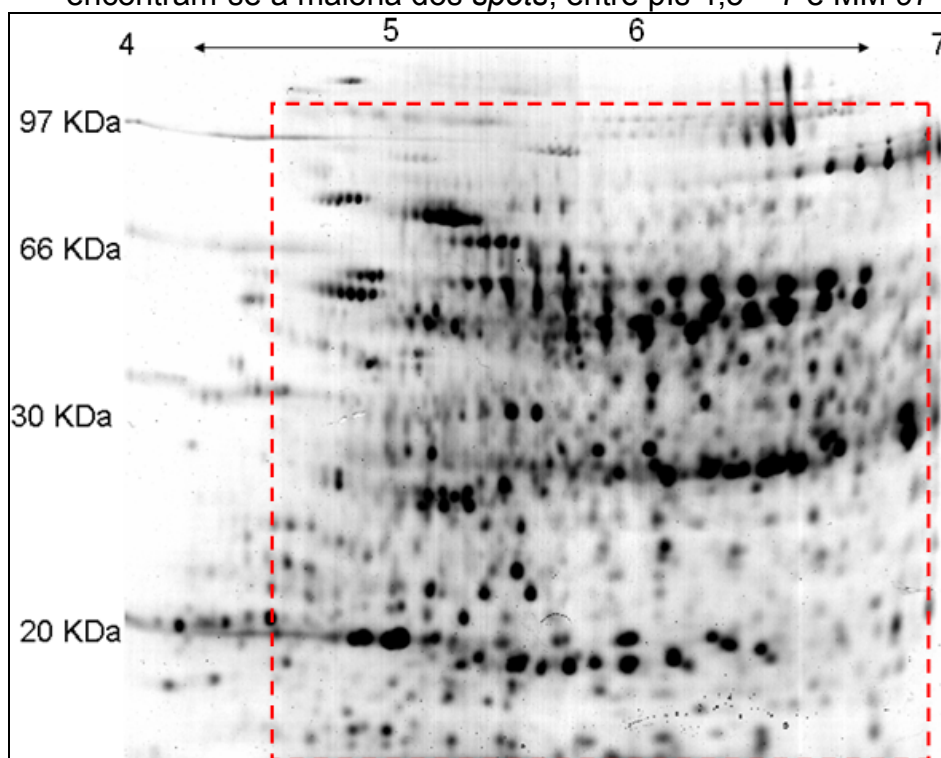
5.1 EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS

As extrações utilizando o método de precipitação em TCA e extração em fenol/SDS seguida de precipitação em acetato de amônio mostraram-se satisfatórias com rendimento protéico médio de 1,8 mg/g de amostra. A obtenção de diversos *spots* com elevada resolução e reprodutibilidade demonstrou que a metodologia empregada foi eficiente visando minimizar a presença de pigmentos, polifenóis, lipídios, polissacarídeos e ácidos nucleicos.

Estudos de Sheoran et al. (2009) compararam análises proteômicas em pólen de tomate após quatro diferentes métodos de extração (TCA-acetona, fenol, tampão IEF e tampão Tris-HCl). Eles observaram que os métodos baseados em TCA-acetona e fenol demonstraram melhores resultados com média de 555 e 558 *spots*, respectivamente e com menos impurezas e linhas nos géis 2D. Adicionalmente Wang et al. (2003) compararam os métodos fenol, tampão SDS e fenol/SDS em folhas de oliveira e observaram que fenol/SDS permitiu recuperar 13% e 42% mais proteínas que os outros, respectivamente.

A grande maioria das proteínas obtidas neste trabalho enquadraram-se num espectro de massa molecular (MM) de 97 a 16 KDa e entre os pontos isoelétricos (pIs) 4,5 – 7 (Figura 7). Tais observações estão de acordo com os trabalhos de Guimarães (2007) e Livramento (2008) onde foram extraídas proteínas de raiz e fruto de café.

Figura 7 – Gel 2D com proteínas de IPR 59 60 DAF. Dentro da região tracejada encontram-se a maioria dos *spots*, entre pls 4,5 – 7 e MM 97 – 16 KDa.



5.2 ELETROFORESE 2D

Embora existam alternativas, a eletroforese em géis 2D é a técnica mais utilizada para resolver extratos complexos de proteínas (SHEORAN et al., 2009). Esta técnica permite obter centenas de produtos gênicos num único gel, o que possibilita examinar variações em expressão gênica em um genoma – proteínas formadas em resposta às condições da planta – e variações genéticas entre genomas – como a caracterização de mutantes ou relações filogenéticas (THIELLEMENT; ZIVY; PLOMION, 2002).

Mesmo com a grande necessidade de tempo requerida, a maioria dos estudos em proteômica comparativa de plantas envolvem eletroforeses 2D com isoeletrofocalização em primeira e SDS-PAGE em segunda dimensão (OELJEKLAUS; MEYER; WARSCHEID, 2009; TAKAC; PECHAN; SAMAJ, 2011).

A separação protéica em primeira e segunda dimensões foi demonstrada após a ação do corante Coomassie Blue G-250 (Figura 7). As amostras de cada genótipo em cada data da maturação foram coletadas e divididas em três *bulks* e produziram-se dois géis para cada um, totalizando seis géis por

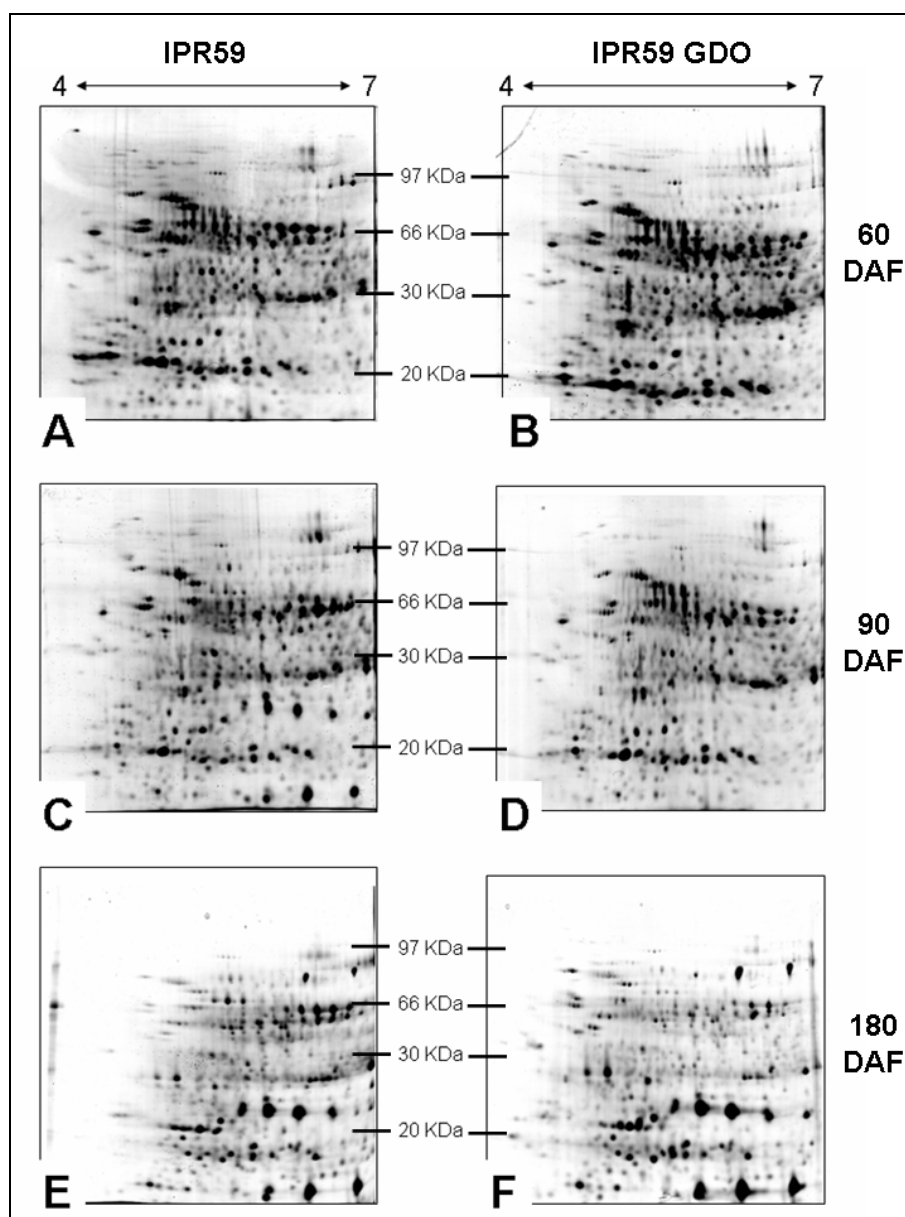
amostra. Foram obtidos géis com boa reprodutibilidade e qualidade para todas as amostras. Após detecção, edição e adição (quando necessário), os géis de IPR 59 apresentaram quantia média de *spots* levemente superior que os de IPR59 GDO, sendo que IPR59 90 DAF obteve a maior quantia (350 *spots*) e IPR59 GDO 90 DAF a menor (287). As médias de *spots* detectados em cada cultivar e data são demonstradas na Tabela 2. A Figura 8 ilustra exemplos de géis obtidos para cada genótipo e data de colheita.

A sobreposição de todos géis foi igual ou superior a 60% em cinco das sete análises realizadas. Todavia, nas comparações entre IPR59 90 x 180 DAF e IPR59 GDO 90 x 180 DAF estes números ficaram muito próximos, com média de 59%.

Tabela 2 – Quantia média de *spots* detectados em géis de perisperma de IPR59 e IPR59 GDO nas três datas analisadas.

Data da coleta	Cultivar	
	IPR 59	IPR 59 GDO
	Nº de <i>spots</i>	Nº de <i>spots</i>
60 DAF	346	302
90 DAF	350	287
180 DAF	319	319

Figura 8 – Exemplos de géis 2D obtidos a partir das amostras de IPR59 e IPR59 GDO.

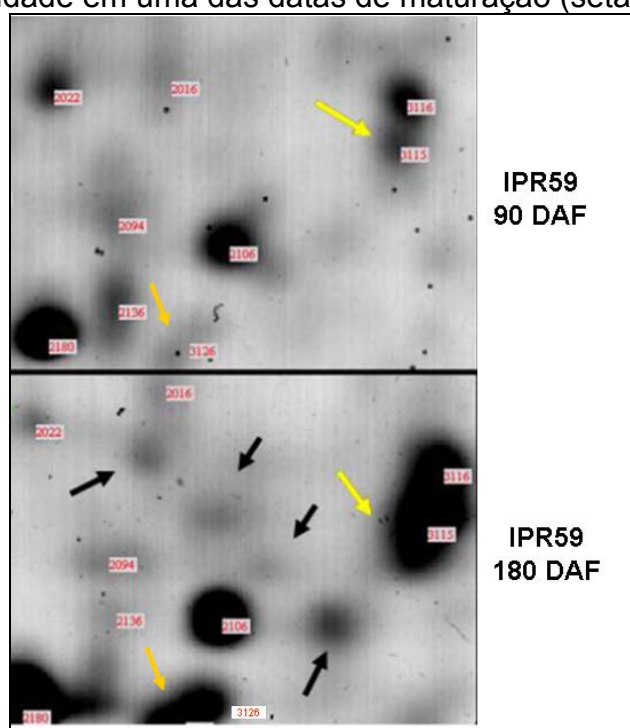


5.2.1 Diferenças de Expressão Durante o Desenvolvimento do Perisperma

Após agrupar e comparar as imagens em classes foi possível observar diferença de expressão entre os estádios e genótipos analisados. Devido à proximidade temporal, os géis referentes a 60 e 90 DAF continham um padrão similar com apenas alguns *spots* presentes em um dos estádios, sendo assim a maior diferença foi quantitativa.

Entre 0-90 DAF o perisperma encontra-se em intensa divisão celular com aumento súbito de sua massa seca, enquanto aos 180 DAF este tecido já se transformou numa fina camada envolvendo o endosperma (DE CASTRO; MARRACCINI, 2006) e sofreu alterações no perfil protéico. Algumas destas alterações podem ser observadas na Figura 9 onde se observa *spots* de proteínas presentes apenas a 180 DAF e outros com maior intensidade em IPR59.

Figura 9 – *Spots* presentes apenas aos 180 DAF (setas pretas) ou com maior intensidade em uma das datas de maturação (setas amarelas).



Foram realizadas quatro análises comparando os géis correspondentes às diferentes datas de maturação dos frutos para cada genótipo. Os géis escolhidos como *master* (referência) pertenciam ao menor período de maturação do fruto.

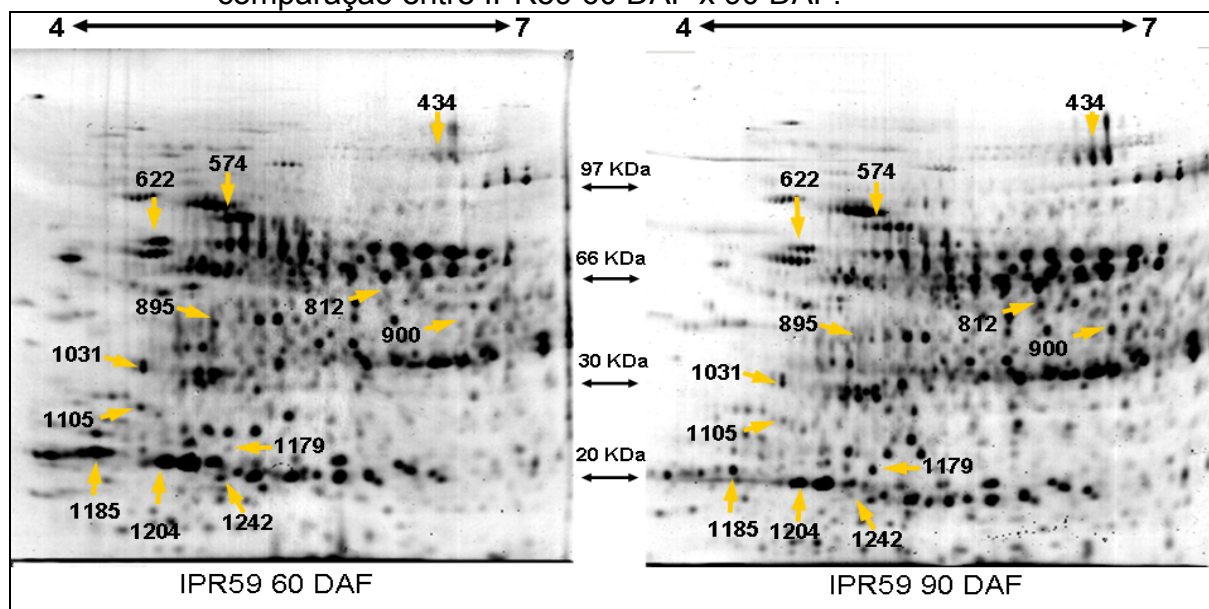
Na comparação entre IPR59 60 DAF x 90 DAF (análise 1) foram identificados 36 *spots* com expressão diferencial, destes 8 estavam presentes apenas a 60 DAF e 16 apenas a 90 DAF. Outros 12 *spots* obtiveram variação de expressão de, no mínimo, $\pm 1,5x$ em %Vol, sendo 8 *up-regulated* aos 60 DAF. Em média foram reconhecidos 296 *spots* (67,4%) dos géis de 90 DAF sobre o *master*. Os *spots* 574 e 1242 demonstraram variação de expressão de +2,33x e +2,43x aos

60 DAF, enquanto os *spots* 1179 e 434 aumentaram em +2,64x e +2,28x a 90 DAF (Figura 10). Os valores de diferenças de expressão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 - *Spots* com maior diferença de expressão na comparação entre IPR59 60 DAF x 90 DAF com variação quantitativa acima de 1,5x ($p < 0,05$).

Spot	pI/MM (KDa)	Estádio de desenvolvimento	Variação
574	5,33/81	60 DAF	2,33x
1242	5,29/18	60 DAF	2,43x
1105	4,88/24	60 DAF	1,81x
895	5,26/37	60 DAF	1,72x
1204	4,99/19	60 DAF	1,75x
1185	4,63/20	60 DAF	1,61x
622	4,94/74	60 DAF	1,61x
1031	4,90/29	60 DAF	1,50x
1179	5,33/20	90 DAF	2,64x
434	6,43/101	90 DAF	2,28x
812	6,15/53	90 DAF	1,97x
900	6,52/42	90 DAF	1,86x

Figura 10 – *Spots* com maior diferença de expressão em cada condição na comparação entre IPR59 60 DAF x 90 DAF.



Analisando IPR59 GDO 60 DAF x 90 DAF (análise 2) observou-se 34 *spots* diferencialmente expressos, porém 25 estavam presentes apenas a 60 DAF. Em média foram reconhecidos 256 *spots* (74%) dos géis de 90 DAF sobre o *master*. Entretanto os *spots* considerados pelo software como diferencialmente

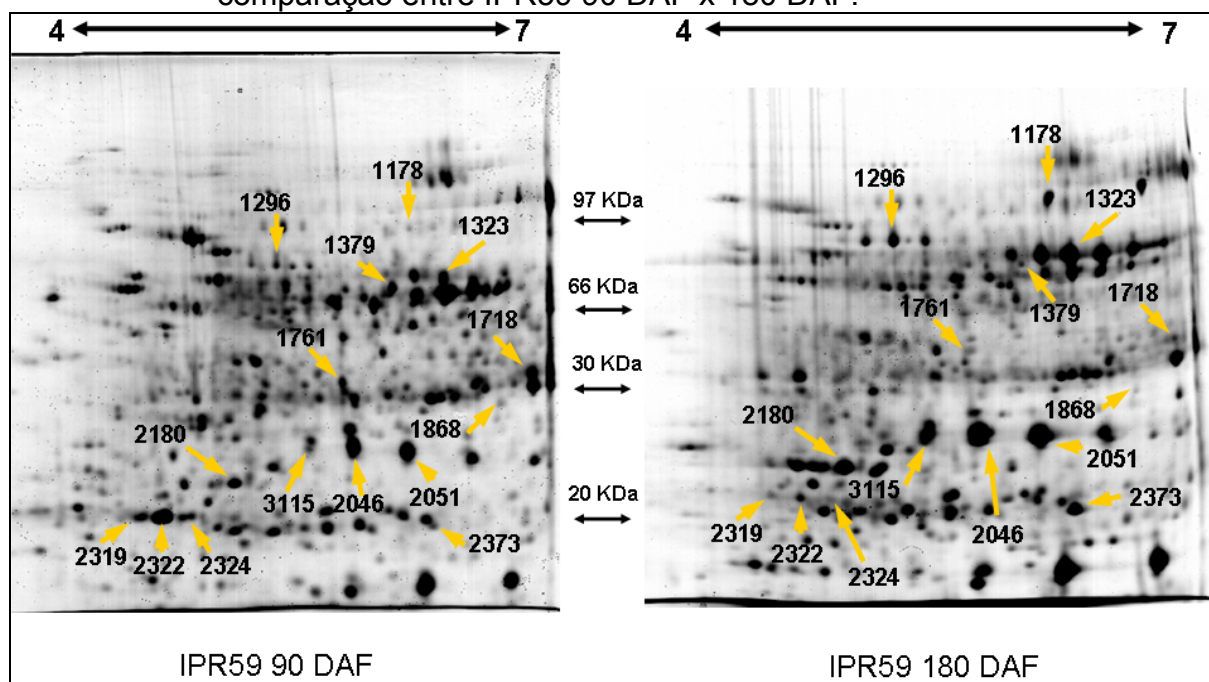
expressos nesta análise não estavam presentes nos três géis de cada condição e, após a aplicação do teste T de Student, não foram obtidas diferenças de expressão significativas. Possivelmente a qualidade inferior dos géis obtidos com amostras de 90 DAF tenha influenciado na pequena quantia de *spots* encontrados apenas em 90 DAF (9 *spots*), tendo em vista que muitos não estavam bem definidos nos géis.

A análise entre IPR59 90 DAF x 180 DAF (análise 3) indicou 130 *spots* presentes apenas a 90 DAF e 5 *spots* presentes apenas a 180 DAF, demonstrando a grande variação entre os perfis protéicos inicial e final do perisperma. Outros 39 *spots* obtiveram variação de expressão de, no mínimo, $\pm 1,5x$ em %Vol, sendo 29 *up-regulated* aos 90 DAF. Os valores dos principais *spots* com diferenças de expressão são representados na Tabela 4. A média de *spots* protéicos reconhecidos dos géis de 180 DAF sobre o *master* foi de 229 (59,9%) e as maiores variações em %Vol aos 90 DAF foram dos *spots* 2322 (+23,59x) e 1379 (+2,98x) e aos 180 DAF aos *spots* 1178 (+8,5x) e 3115 (3,28x) (Figura 11).

Tabela 4 - *Spots* com maior diferença de expressão na comparação entre IPR59 90 DAF x 180 DAF com variação quantitativa acima de 1,5x ($p < 0,05$).

<i>Spot</i>	pI/MM (KDa)	Estádio de desenvolvimento	Variação
2322	5,14/20	90 DAF	23,59x
1379	6,23/61	90 DAF	2,98x
2324	5,16/17	90 DAF	2,58x
1868	6,70/29	90 DAF	2,45x
2319	5,00/19	90 DAF	2,45x
1718	6,97/38	90 DAF	2,24x
1761	6,05/32	90 DAF	2,09x
3115	5,77/23	180 DAF	3,28x
1178	6,31/93	180 DAF	8,50x
2046	6,09/25	180 DAF	2,96x
2373	6,47/17	180 DAF	2,82x
2051	6,32/25	180 DAF	2,63x
1323	6,45/70	180 DAF	2,26x
2180	5,35/22	180 DAF	2,20x
1296	5,67/68	180 DAF	2,10x

Figura 11 – Spots com maior diferença de expressão em cada condição na comparação entre IPR59 90 DAF x 180 DAF.

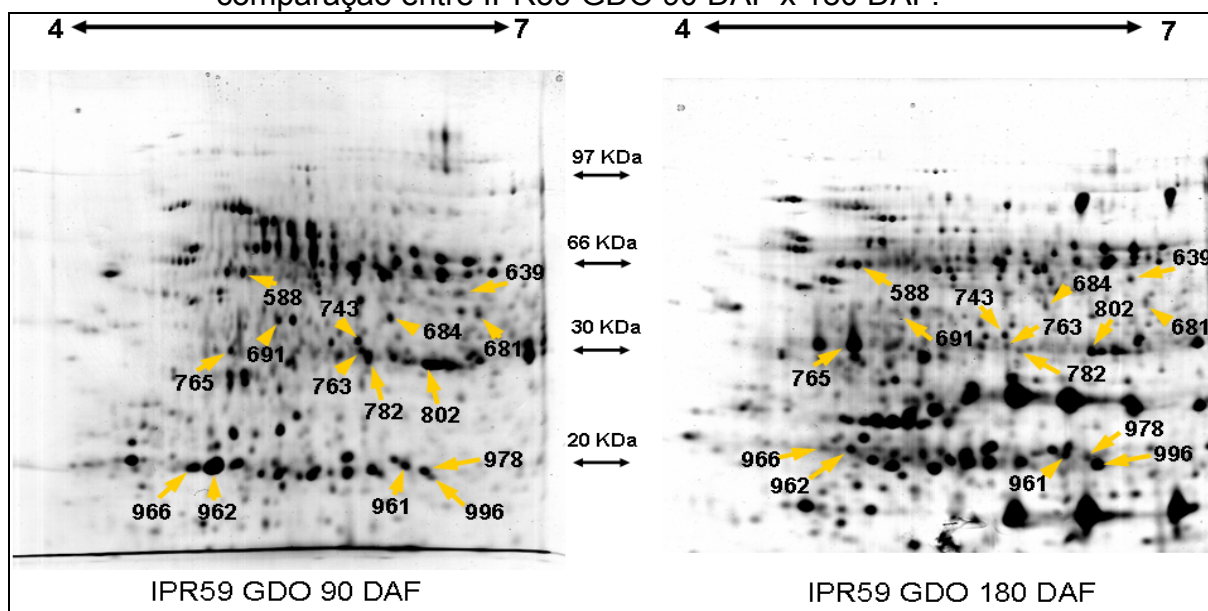


A comparação entre IPR59 GDO 90 DAF x 180 DAF (análise 4) apresentou 66 *spots* expressos somente aos 90 DAF e 2 *spots* somente aos 180 DAF. Observou-se variação de expressão de, no mínimo, $\pm 1,5x$ em %Vol, em 23 *spots*, destes 19 foram *up-regulated* aos 90 DAF. Em média foram reconhecidos 194 *spots* de proteína (59%) dos géis de 180 DAF sobre o *master*. As maiores variações de expressão referiram-se aos *spots* 962 (+22,37x) e 966 (+5,35x) para as amostras de 90 DAF e 765 (+2,97x) para as amostras de 180 DAF (Figura 12). Os valores das principais diferenças de expressão são apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 – Spots com maior diferença de expressão na comparação entre IPR59 GDO 90 DAF x 180 DAF com variação quantitativa acima de 1,5x ($p < 0,05$).

Spot	pI/MM (KDa)	Estádio de desenvolvimento	Varição
966	4,98/19	90 DAF	5,34x
962	5,17/19	90 DAF	22,37x
782	6,04/30	90 DAF	5,24x
681	6,69/42	90 DAF	4,20x
961	6,30/19	90 DAF	2,58x
684	6,28/36	90 DAF	2,38x
978	6,45/19	90 DAF	2,02x
639	6,67/48	90 DAF	2,02x
588	5,35/52	90 DAF	2,00x
763	6,10/28	90 DAF	1,98x
743	6,08/30	90 DAF	1,95x
691	5,53/36	90 DAF	1,90x
765	5,20/28	180 DAF	2,97x
802	6,40/28	180 DAF	1,82x
996	6,43/18	180 DAF	1,75x

Figura 12 – Spots com maior diferença de expressão em cada condição na comparação entre IPR59 GDO 90 DAF x 180 DAF.



5.2.2 Diferenças de Expressão Entre as Variedades IPR59 e IPR59 GDO

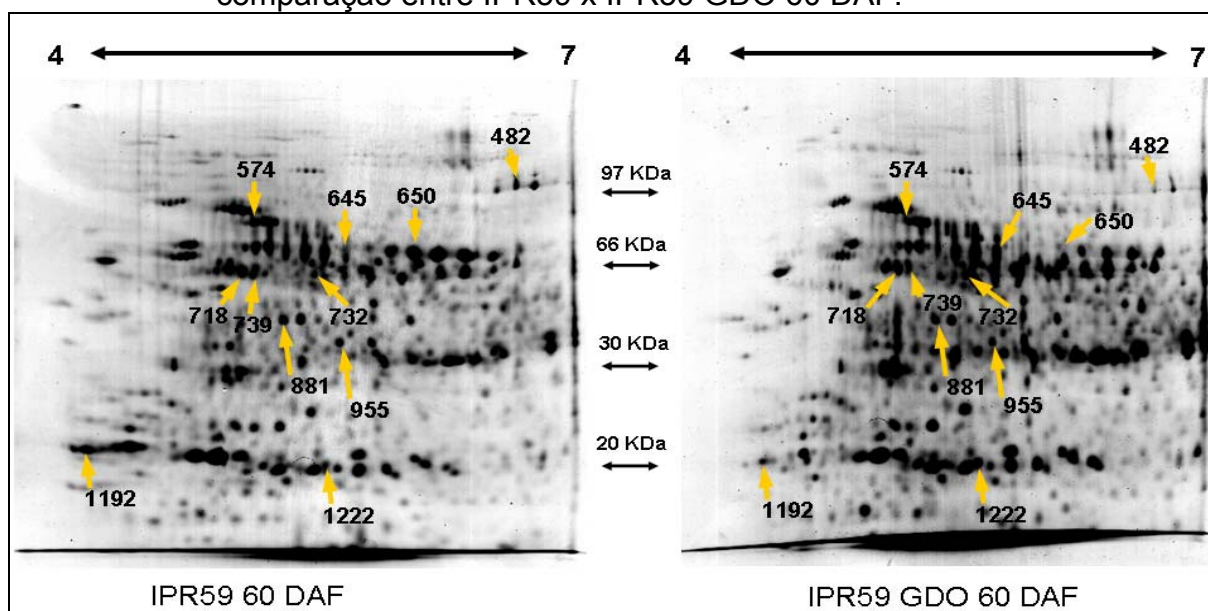
Foram realizadas três análises comparando os géis correspondentes às mesmas datas de maturação dos frutos entre os dois genótipos. Os géis escolhidos como *master* pertenciam à amostra de IPR59 da respectiva data de coleta.

O teste entre IPR59 x IPR59 GDO 60 DAF (análise 5) demonstrou 64 *spots* diferencialmente expressos, sendo 32 presentes apenas em IPR59 e outros 17 com maior expressão nesta variedade contra 8 encontrados apenas em IPR59 GDO e 7 expressos positivamente. Em média foram reconhecidos 274 *spots* (78,78%) dos géis de IPR59 GDO 60 DAF sobre o *master*. Os *spots* com maior variação de expressão em IPR 59 foram 650 (+2,33x) e 739 (+2,17x) e em IPR59 GDO foram 645 (+1,65x) e 1222 (+1,51x) (Figura 13). Os valores das diferenças de expressão são apresentados na Tabela 6.

Tabela 6 – *Spots* com maior diferença de expressão na comparação entre IPR59 x IPR59 GDO 60 DAF com variação quantitativa acima de 1,5x ($p < 0,05$).

<i>Spot</i>	pI/MM (KDa)	Genótipo	Variação
650	6,20/68	IPR59	2,33x
739	5,31/55	IPR59	2,17x
574	5,33/85	IPR59	1,95x
482	6,77/94	IPR59	1,87x
1192	4,43/20	IPR59	1,69x
955	5,78/34	IPR59	1,57x
732	5,65/55	IPR59	1,54x
881	5,49/42	IPR59	1,52x
718	5,27/57	IPR59	1,51x
645	5,82/74	IPR59 GDO	1,65x
1222	5,75/23	IPR59 GDO	1,51x

Figura 13 – Spots com maior diferença de expressão em cada condição na comparação entre IPR59 x IPR59 GDO 60 DAF.

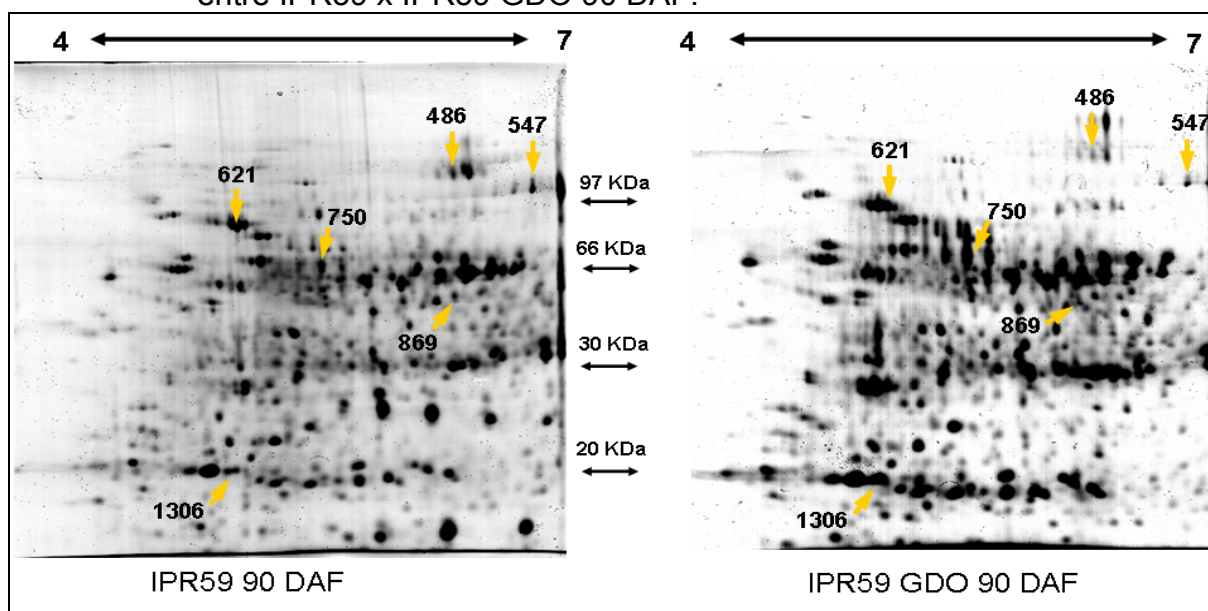


Comparando IPR59 x IPR59 GDO 90 DAF (análise 6) foram observados 48 *spots* diferenciais, sendo 42 expressos somente em IPR 59 e outros 4 *spots* com maior %Vol nesta variedade. Outros 2 *spots* continuam maior %Vol em IPR59 GDO. Em média foram reconhecidos 261 *spots* (79,9%) dos géis de IPR59 GDO 90 DAF sobre o *master*. As maiores variações positivas em expressão nas amostras de IPR59 referiram-se aos *spots* 547 (+1,92x) e 486 (+1,88x) enquanto em IPR59 GDO referiram-se os *spots* 750 (+2,18x) e 1306 (+1,58x) (Figura 14). Os valores das diferenças de expressão são apresentados na Tabela 7.

Tabela 7 – Spots com maior diferença de expressão significativa na comparação entre IPR59 x IPR59 GDO 90 DAF com variação quantitativa acima de 1,5x ($p < 0,05$).

Spot	pI/MM (KDa)	Genótipo	Variação
547	6,81/96	IPR59	1,92x
486	6,46/110	IPR59	1,88x
869	6,27/45	IPR59	1,75x
621	5,24/79	IPR59	1,70x
750	5,68/60	IPR59 GDO	2,18x
1306	5,16/20	IPR59 GDO	1,57x

Figura 14 – Spots com maior diferença de expressão em cada condição na análise entre IPR59 x IPR59 GDO 90 DAF.

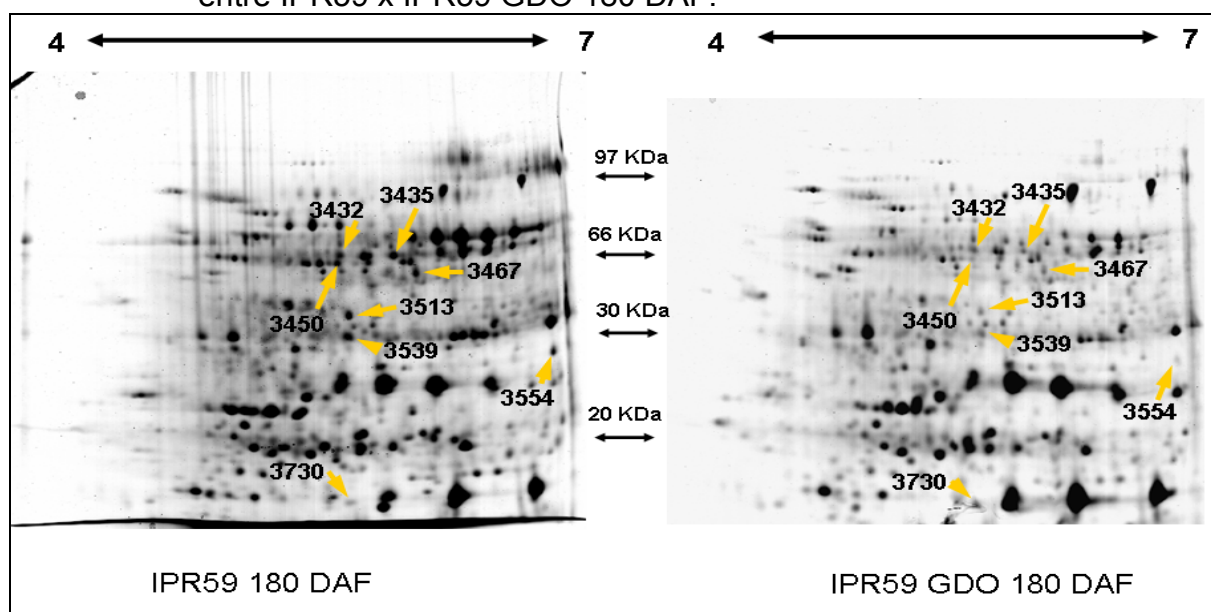


Na comparação entre IPR59 x IPR59 GDO 180 DAF (análise 7) foram observados 52 *spots* diferencialmente expressos, sendo 43 presentes somente em IPR59 e 1 presente somente em IPR59 GDO. Destes, 8 demonstraram variação em %Vol de $\pm 1,5x$, sendo 7 *up-regulated* em IPR59. Em média foram reconhecidos 207 *spots* (87%) dos géis de IPR59 GDO 180 DAF sobre o *master*. As maiores variações de expressão positivas em IPR59 referiram-se aos *spots* 3554 (2,29x) e 3513 (+2,12x) e em IPR59 GDO ao *spot* 3730 (+1,59x) (Figura 15). Os valores das diferenças de expressão são apresentados na Tabela 8.

Tabela 8 – Spots com maior diferença de expressão significativa na comparação entre IPR59 x IPR59 GDO 180 DAF com variação quantitativa acima de 1,5x ($p < 0,05$).

Spot	pI/MM (KDa)	Genótipo	Varição
3554	6,97/24	IPR59	2,29x
3513	5,84/31	IPR59	2,12x
3467	6,20/51	IPR59	2,10x
3539	5,80/26	IPR59	1,77x
3432	5,75/57	IPR59	1,70x
3450	5,71/46	IPR59	1,62x
3435	6,06/50	IPR59	1,53x
3730	5,81/15	IPR59 GDO	1,59x

Figura 15 – Spots com maior diferença de expressão em cada condição na análise entre IPR59 x IPR59 GDO 180 DAF.



As comparações que apresentaram maior quantidade de *spots up/down-regulated* foram entre IPR59 90 x 180 DAF (39 *spots*), IPR59 x IPR59 GDO 60 DAF (24 *spots*) e IPR59 GDO 90 x 180 DAF (23 *spots*). A Tabela 9 demonstra as quantias de *spots* presentes e *up-regulated* em cada condição nas diferentes comparações.

Tabela 9 – Quantia de *spots* presentes e up-regulated em cada condição nas diferentes comparações realizadas.

Comparação	
IPR59 60 x 90 DAF	
36 <i>Spots</i> diferenciais	
<i>Spots</i> presentes em cada condição	<i>Spots up-regulated</i> em cada condição
8 aos 60 DAF	8 aos 60 DAF
16 aos 90 DAF	4 aos 90 DAF
IPR59 90 x 180 DAF	
174 <i>Spots</i> diferenciais	
<i>Spots</i> presentes em cada condição	<i>Spots up-regulated</i> em cada condição
130 aos 90 DAF	29 aos 90 DAF
5 aos 180 DAF	10 aos 180 DAF
IPR59 GDO 90 x 180 DAF	
91 <i>Spots</i> diferenciais	
<i>Spots</i> presentes em cada condição	<i>Spots up-regulated</i> em cada condição
66 aos 90 DAF	19 aos 90 DAF
2 aos 180 DAF	4 aos 180 DAF
IPR59 x IPR59 GDO 60 DAF	
64 <i>Spots</i> diferenciais	
<i>Spots</i> presentes em cada condição	<i>Spots up-regulated</i> em cada condição
32 em IPR59	17 em IPR59
8 em IPR59 GDO	7 em IPR59 GDO
IPR59 x IPR59 GDO 90 DAF	
48 <i>Spots</i> diferenciais	
<i>Spots</i> presentes em cada condição	<i>Spots up-regulated</i> em cada condição
42 em IPR59	4 em IPR59
	2 em IPR59 GDO
IPR59 x IPR59 GDO 180 DAF	
52 <i>Spots</i> diferenciais	
<i>Spots</i> presentes em cada condição	<i>Spots up-regulated</i> em cada condição
43 em IPR59	7 em IPR59
1 em IPR59 GDO	1 em IPR59 GDO

5.3 IDENTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS

Dentre os *spots* considerados com diferenças de expressão significativas e presença/ausência, 95 foram selecionados para análise por espectrometria de massas e 25 foram identificados com significância. Estes *spots* continham volumes de proteínas visando favorecer as identificações via espectrometria.

As identificações por espectrometria de massas das proteínas foram consideradas significativas segundo o algoritmo MASCOT utilizando-se o *score* de probabilidades *Mowse*. A significância é representada pelo *score* calculado por $-10 \cdot \log(P)$, onde P é a probabilidade de que o alinhamento obtido seja um evento

randômico. MASCOT Scores superiores a 72 foram considerados significativos ($p < 0,05$). A busca dos peptídeos nos bancos de dados de transcriptoma do projeto Genoma Café permitiu a identificação das sequências de ESTs correspondentes. Após a confirmação da homologia foi utilizado o banco do genoma de *Arabidopsis* sp. para definição funcional das proteínas. Em alguns casos a definição funcional das proteínas foi realizada utilizando o banco de dados do NCBI através da ferramenta tBLASTn. Os 25 *spots* identificados corresponderam a 17 proteínas que são demonstradas na Tabela 10 de acordo com o genótipo e estágio de maturação em que se encontravam *up-regulated*.

As proteínas identificadas foram categorizadas funcionalmente, de acordo com a literatura, para possibilitar melhor entendimento a respeito de sua expressão diferencial nos diferentes estádios de maturação e genótipos analisados (Figura 16). A maior proporção de proteínas encontrou-se em três dos oito grupos formados, com maior quantia de *spots* relacionados ao desenvolvimento celular (6 *spots*), reserva (5 *spots*), e metabolismo de carboidratos (4 *spots*). O primeiro grupo constituiu-se da proteína 11S, principal componente protéico das sementes, enquanto os outros dois refletiram a condição do perisperma de tecido em rápido desenvolvimento, cuja requisição é por proteínas formadoras de citoesqueleto, quitinases (DE CASTRO; MARRACCINI, 2006), e envolvidas em síntese/degradação de carboidratos. Proteínas envolvidas com processos metabólicos de oxidação/redução (3 *spots*), metabolismo de metionina (3 *spots*), fotossíntese (2 *spots*), síntese de ATP (1 *spot*) e processamento de RNA (1 *spot*) também foram observadas neste trabalho.

A seguir serão discutidos três grupos de proteínas buscando relação com desenvolvimento do fruto. As demais proteínas identificadas continuam em análise e espera-se que contribuam para o melhor entendimento da dinâmica de maturação dos frutos em estágio inicial de desenvolvimento.

Figura 16 – Agrupamento funcional das proteínas identificadas por espectrometria de massa. Os números indicam a quantia de *spots* de cada grupamento.

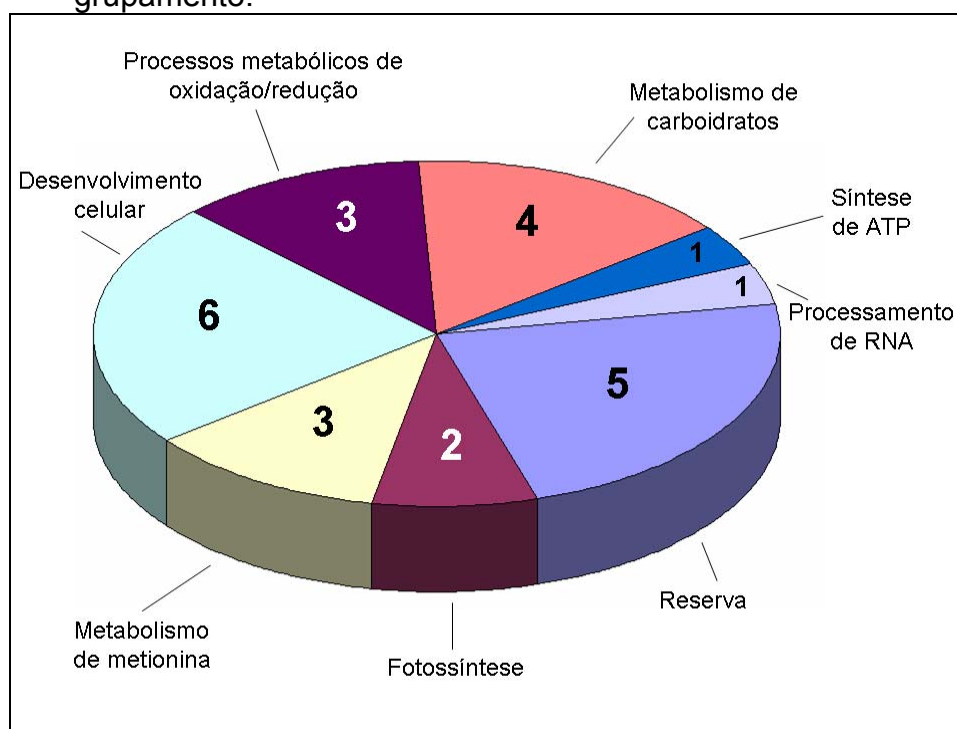


Tabela 10 – Identificação de proteínas em perisperma de café das cultivares IPR59 e IPR59 GDO aos 60, 90 e 180 DAF por análises em MALDI-TOF-TOF. Os números entre parênteses nos *spot* IDs referem-se às análises correspondentes.

<i>Spot</i> ID ^A	Sequências ^B	Score _C	Cobertura _D	Proteína	Acesso (NCBI)	MM (KDa)/pI observado ^E	MM (KDa)/pI esperado ^F	Varição (%Vol)
IAPAR 59 – 60 DAF								
877(5)	DAYVGDEAQSKR IWHHTFYNELR VAPEEHPVLLTEAPLNPK TTGIVLDSGDGVSHTVPIYEGYALPHAILR GYMFTTSAER LAYVALDFEQELETAK NYELPDGQVITIGNER	218	46%	Actina	gi 311170725	36/5,53	27/5,39	1,50
1204(1)	GIQVLLSLGGAPNLSSR RDFLDDLAK LFLGLPASPEAAPSGGFIPHR KSMISLLWMSKFLSLSYER NKYNIIP	115	29%	Inibidor de xilanase similar à quitinase	gi 315858245	19/4,99	28/8,36	1,75
739(5)	RDFLDDLAK LFLGLPASPEAAPSGGFIPHR KSMISLLWMSKFLSLSYER NKYNIIP	111	22%	Inibidor de xilanase similar à quitinase	gi 315858245	55/5,30	28/8,36	2,17
1031(1)	GGFLEKVK LVSGLIPDAGTLHAHGSETVK IPLTLIYDDIK STYDDIKPGSIIPYR	105	31%	Extensina	gi 311207563	29/4,90	19/4,79	1,50
1242(1)	RFETCYQIALAIK AGINVIQIDEAALR YGAGIGPGVYDIHSPR	99	20%	Metionina sintase	gi 315838194	18/5,29	24/5,63	2,43

Continuação

881(5)	VAPEEHPVLLTEAPLNPK TTGIVLDSGDGVSHTVPIYEGYALPHAILR GYSFTTTAER SYELPDGQVITIGSER	92	38%	Actina 7	gi 315797727	42/5,50	21/4,81	1,50
658(5)	NQSHLPPTVVDLGYNGTDTDATDIER AGDAPSPGAGSIEAIPHIPIHR DIVFYSHHANVDR MGYIYPK	75	26%	Polifenoxidase	gi 311170889	67/6,35	27/5,77	1,70
1302(5)	AGGLGDLKYPLISDITR YPLISDITR SISAAYNVLIPDQGIALLR GLFIIDKEGVVIQHATINNLAIGR EGVIQHATINNLAIGR SVDETLR	153	26%	Cisteína peroxirredoxina	gi 311189629	15/4,9	27/8,42	Presença ^G
IAPAR 59 – 90 DAF								
547(6)	AGINVIQIDEAALR KAEHAFYLDWAVHSFR YGAGIGPGVYDIHSPR IPSTEEIADR YAEVKPALPNMVAAAK	171	41%	Metionina sintase	gi 315894267	96/6,81	19/5,19	1,56
486(6)	DILTVNGLFPGPTLHLR VIITEEIGTLWWHAHSDWSR ATVHGAIIIYPK	84	23%	Lacase 14	gi 311183838	110/65	24/6,46	1,88
1379(3)	SNIEIHTFNQSQYPR VQLLEIAQVPDEHVNEFK	75	16%	Nucleosídeo trifosfato hidrolase contendo <i>p-loop</i>	gi 311199541	61/6,23	22/5,74	2,98

Continuação

1072(1)	LNAQEPSFR LPHYSNVPK QRFPDR KFFLAGNPQQGGGK KFFLAGNPQQGGGKEGHQGQQQHR EGHQQQQQHR	141	23%	11 S	gij315799388	27/6,09	23/5,14	Presença ^G
IAPAR 59 – 180 DAF								
1178(3)	LSENIPLQEADVFNPR ITTVNSQKIPILSSLQLSAER IPILSSLQLSAER VFDDEVK QGQLIIVPQYFAVIK KAGNQGFEYVAFK AIPEEVLK SSFQISSEAEELKYGR YGRQEALLLSEQSQQGK	298	45%	11 S	gij315824538	77/6,30	27/7,92	8,50
3126(3)	NSPPEFQK FVEKDGIDYAAVTVQLPGGER DGIDYAAVTVQLPGGER VPFLFTIK QLVASGKPEFSGFEFLVPSYR GSSFLDPK GGSTGYDSAVALPAGGRGDEEELVKENIK SKPETGEVIGVFESVQPSDTDLGSK	200	57%	Subunidade II de fotossistema – PSBO-2	gij311175374	20/5,50	23/5,21	4,55
3435(7)	IILELSAR TYVHER VYDEFVEK SVGDPFRQEIEQGPQVDSEQFEK EEIFGPVQSILKFK FKDLDEVIR DLDEVIR YGLAAGVFTQNLDANR	92	31%	Aldeído desidrogenase	gij311210926	50/6,10	28/5,25	1,53

Continuação

3450(7)	FSVAFWHTFR IRPLWGTAQLFLHPR KAIEVTHYLGGENYVFWGGR HQYDWDATSANFLR	88	23%	Xilose isomerase	gi 311153589	46/5,70	29/6,28	1,62
3467(7)	CKRMPLR HRFPAGLANTYQSVFR VVAGPWCSSASGSISSSSSSK TEEAKQRALR RFCFCR HQYDWDATSANFLR	74	41%	Snuportina I	gi 315912309	51/6,20	22/9,37	2,10
2051(3)	LNAQEPSFR LPHYSNVPK QRFPDR KFFLAGNPQQGGGK FFLAGNPQQGGGK EGHQGQQQHR	284	23%	11 S	gi 315799388	25/6,32	23/5,14	2,60
IAPAR 59 GRAÚDO – 60 DAF								
1222(5)	RRMASEK YTADLSQR WNIFWLDER LAYDGFLSK VSIPGGQIFPINDKK SPEGAAEDYEALHR WVTFITNSPKPPPPR	85	29%	6- fosfogluconolacton ase	gi 311151443	23/5,70	29/6,60	1,51
763(5)	VNQIGSVTESIEAVR YNQLLR IEEELGADAIYAGASFR	80	19%	Enolase	gi 311194660	60/5,60	22/6,25	2,34

Continuação

IAPAR 59 GRAÚDO – 90 DAF								
777(4)	NAPPEFQK DGIDYAAVTVQLPGGER VPFLFTIK QLVASGKPESFSGEFLVPSYR GSSFLDPK GGSTGYDSAVALPAGGRGDEEELVKENIK SKPETGEVIGVFESVQPSDTDLGSK IQGIWYAQLE	298	53%	Subunidade II de fotossistema – PSBO-2	gij311151577	29/5,88	26/6,03	2,91
1306(6)	GIQVLLSLGGAPNLSSR LFLGLPASPEAAPSGGFIPHR TLTFGRRSK	115	18%	Inibidor de xilanase similar à quitinase	gij315856796	20/5,16	28/6,66	1,57
673(4)	TIFHLNPSGR FVIGGPHGDAGLTGR VDRSGAYIVR SVVASGLAR TAAYGHFGR TAAYGHFGRDDPDFSWETVK	97	32%	S-adenosil- metionina sintase	gij315888077	44/6,60	21/9,36	Presença ^G
IAPAR 59 GRAÚDO – 180 DAF								
1050(4)	LSENIPLQEADVFNPR IPILSSLQLSAER VFDDEVK QGQLIIVPQYFAVIK AGNEGFYVAFK AIPEEVLR SSFQISSEEAELKYGR	278	42%	11 S	gij315906117	16/6,04	24/7,11	Presença ^G
3730(7)	LSENIPLQEADVFNPR IPILSSLQLSAER AGNEGFYVAFK AIPEEVLR SSFQISSEEAELKYGR	118	36%	11 S	gij315909955	15/5,81	20/7,04	1,58

A: o número entre parênteses refere-se à análise a que pertencia o *spot* identificado.

1 – IPR59 60 x 90 DAF

3 – IPR59 90 x 180 DAF

4 – IPR59 GDO 90 x 180 DAF

5 – IPR59 x IPR 59 GDO 60 DAF

6 – IPR59 x IPR 59 GDO 90 DAF

7 – IPR59 x IPR 59 GDO 180 DAF

B: sequências de peptídeos identificados por MS.

C: MASCOT *score* (baseado na probabilidade do alinhamento obtido ser randômico [$p < 0,05$]).

D: cobertura dos peptídeos identificados em relação à sequência completa da proteína.

E: massa molecular (MM) e ponto isoelétrico (pI) experimentais observados através do *software Image Master 2D*.

F: massa molecular (MM) e ponto isoelétrico (pI) preditos através da identificação pela ferramenta MASCOT.

G: *spots* observados somente no genótipo e estágio de maturação na comparação realizada.

5.3.1 Proteína de Reserva 11S

As sementes utilizam proteínas de reserva como fonte de nitrogênio em sua germinação. Dicotiledôneas sintetizam predominantemente globulinas para esta função e, dentre as principais encontram-se a 7S, 12S e 11S. Estas proteínas são sintetizadas como grandes precursores que sofrem modificações pós-traducionais e a proteína final apresenta dímeros polipeptídicos formados por subunidades α e β unidos por pontes dissulfeto (MIERNICK; HAJDUCH, 2011).

A proteína 12S é composta por seis dímeros com cerca de 55 KDa cada, enquanto a 11S é constituída por um dímero com subunidades de cerca de 30 e 20 KDa. Esta configuração pode ser observada em géis 2D onde há a separação das subunidades em regiões com MM e pI diferentes (ROGERS et al., 1999; MIERNICK; HAJDUCH, 2011).

O perisperma é um tecido com rápido desenvolvimento metabólico que surge no início da maturação do fruto e continua ativo até cerca de 180 DAF, quando tem seu espaço tomado pelo endosperma e continua presente apenas como uma fina camada ao redor deste. Neste estudo foi possível observar a evolução do acúmulo de proteína 11S neste tecido nos dois genótipos estudados. Nos géis de 60 DAF não havia *spots* de proteína 11S com volume mínimo detectável pelo programa *Image Master*, porém aos 90 e 180 DAF tornou-se marcante a presença de *spots* desta proteína, o que permite inferir que o acúmulo de 11S no perisperma começa durante seu estágio intermediário e aumenta substancialmente em volume até o final de sua fase de grande desenvolvimento metabólico.

Em IPR59 aos 90 DAF o *spot* 1072 (1) apresentou %Vol 0,66 enquanto aos 180 DAF a %Vol reduziu para 0,47. Esperava-se um aumento na %Vol, todavia houve má separação entre este *spot* e o 1124 – que se encontrava logo abaixo – nos géis de 90 DAF, dificultando o cálculo da abundância pelo *Image Master*. Aos 180 DAF o ponto 1124 encontrava-se isolado e 2,96x *up-regulated* (evolução de 1,44 para 6,6 em %Vol) (Figura 17).

O *spot* 2051 (3) continha acúmulo 2,60x maior em IPR59 aos 180 DAF (evolução de 0,36 para 1,63 em %Vol) enquanto o *spot* 1178 (3) apresentou expressão 8,50x maior neste estágio que em 90 DAF (evolução de 0,16 para 1,83 em %Vol). Outros *spots* (1124, 1120, 1048 e 1071), embora não identificados via espectrometria de massas, foram considerados como subunidades da 11S (devido

tanto à similaridade com o padrão dos géis de Rogers et al., [1999] como à proximidade entre eles) e também apresentaram maior acúmulo em %Vol de 90 DAF para 180 DAF (Tabela 11 e Figura 17).

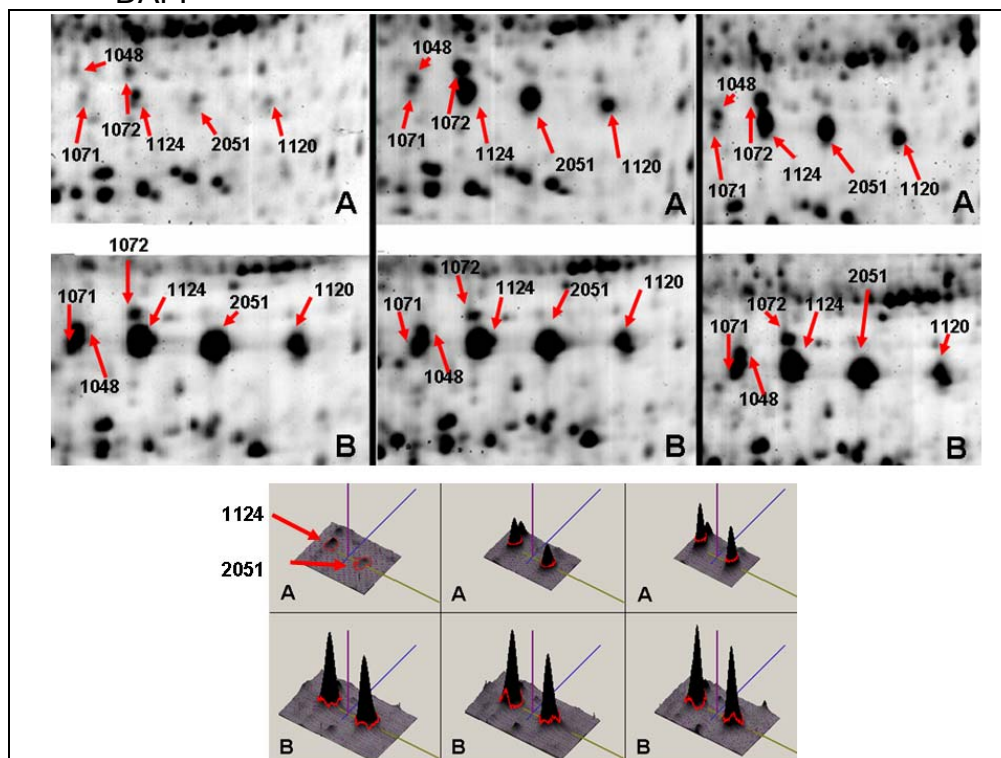
Nos géis de IPR59 GDO dois *spots* foram identificados como 11S, sendo o *spot* 1050 (4) presente somente aos 180 DAF e 3730 (7) 1,58x mais abundante neste genótipo que em IPR59. O *spot* 3730 também foi observado na análise entre IPR59 90 x 180 DAF, porém sem diferença de expressão, mas não foi detectado em IPR59 GDO 90 DAF. As comparações entre *spots* diferenciais de IPR59 GDO 60 e 90 DAF não foram significativas e a abundância dos *spots* para 11S foi muito baixa nestes géis. Todavia, o acúmulo desta proteína pode ser observado na transição de 90 para 180 DAF representado por alguns *spots* como 882 e 880 (Tabela 11).

Tabela 11 – Evolução em %Vol dos *spots* pertencentes às subunidades da proteína 11S identificados ou não por espectrometria de massa nos géis de IPR59 e IPR59 GDO. Os números entre parênteses referem-se à correspondência entre os *spots* nos diferentes genótipos.

Genótipo					
IPR59			IPR59 GDO		
<i>Spot</i>	%Vol 90 DAF	%Vol 180 DAF	<i>Spot</i>	%Vol 90 DAF	%Vol 180 DAF
1072	0,66	0,46	1072 (834)	0,30	0,29
1178	0,94	0,08	1178 (461)	0,13	1,55
2051	0,36	1,63	2051 (880)	0,16	5,19
1050 (3731)	-	0,97	1050	-	2,44
3730	0,15	0,16	3730 (1056)	-	0,33
1124*	1,44	6,60	1124 (1138)	0,06	4,23
1120*	0,58	1,11	1120 (883)	0,05	0,73
1048*	0,31	0,48	1048 (882)	0,16	0,39
1071*	0,34	1,66	1071 (915)	0,13	0,39

* *spot* não identificado por MS

Figura 17 – Evolução de *spots* representantes de subunidades da proteína 11S identificados por espectrometria de massas ou localizados próximos a estes em géis de IPR59 90 e 180 DAF. Abaixo visão tridimensional mostrando os *spots* 1124 e 2051. A: IPR59 90 DAF. B: IPR59 180 DAF.



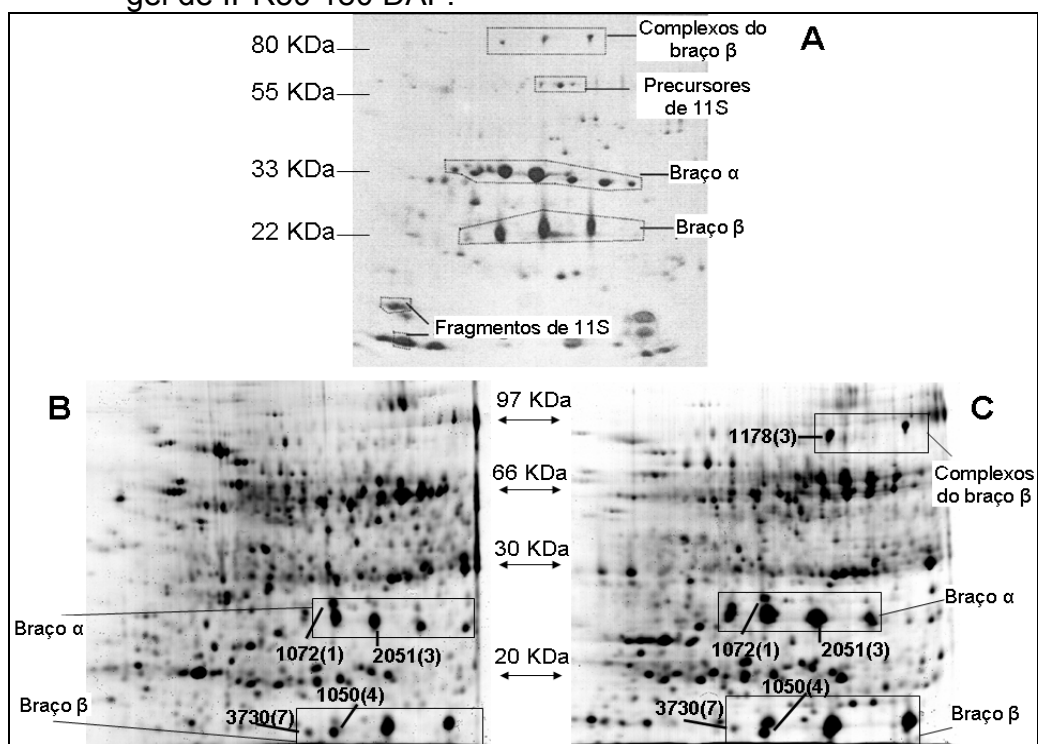
A proteína 11S foi descrita em café como estritamente endospermática e responsável por 45% do conteúdo protéico deste tecido (ROGERS et al., 1999). Sua presença foi detectada em diversos estudos proteômicos posteriores envolvendo frutos maduros, grãos, sementes e embriões de café (GIL-AUGUSTI et al., 2005; LIVRAMENTO, 2008; KOSHINO et al., 2008). Bandil (2008) detectou a proteína 11S em frutos em estágio inicial de desenvolvimento, todavia sem separação de tecidos. Dados de transcriptoma revelaram gene para 11S em frutos de *Coffea canephora* em estágio intermediário de desenvolvimento, quando há presença de perisperma e endosperma (LIN et al., 2005), porém ainda não havia evidências eletroforéticas ou relatos proteômicos na literatura demonstrando sua presença neste tecido após ser separado do fruto.

O padrão de localização nos géis dos *spots* referentes à proteína 11S em perisperma demonstrou-se muito similar ao descrito por Rogers et al. (1999) em seu estudo com material endospermático. Foram identificados *spots* na região superior do gel que representam polipeptídeos provenientes da fragmentação do

braço β desta proteína e nas regiões entre 50 e 20 KDa, representando as subunidades α e β típicas desta proteína (Figura 18).

Porém foram também observados fragmentos com MMs diferentes do esperado pelo padrão de identificação da proteína 11S, como exemplo os *spots* 1178 (3) e 1050 (4) para os quais eram esperadas MMs 27 e 20 KDa e foram observadas 77 e 15 KDa. Ochuodho, Modi e Beukes (2006) comentam que extrações utilizando agentes redutores, como DTT, podem fragmentar as pontes dissulfeto existentes entre as subunidades destas proteínas e produzir fragmentos com diferentes MM. Os autores observaram este padrão estudando proteína 12S de *Cleome gynandra* (pertencente à ordem *Capparales* junto de *Arabisopsis* sp. e *Brassica* sp.) onde um padrão inicial de polipeptídeos com 41-48, 25-28 e 15-17 KDa foi modificado após redução. Os polipeptídeos com cerca de 41-48 KDa desapareceram após o tratamento e surgiu um padrão de banda com 62 KDa, enquanto polipeptídeos com cerca de 27, 18 e 13 KDa aumentaram sua acumulação. gel de IPR59 90 DAF. C: gel de IPR59 180 DAF.

Figura 18 – Comparação entre a localização dos *spots* identificados como subunidades da proteína 11S em gel SDS-PAGE publicado por Rogers et al. (1999) e em géis obtidos neste trabalho. A: gel de *Coffea arabica* Caturra (ROGERS et al., 1999). B: gel de IPR59 90 DAF. C: gel de IPR59 180 DAF.



5.3.2 Metabolismo de Metionina

Dentre os compostos envolvidos com a qualidade da bebida a cafeína tem um papel como estimulante, mas também está relacionada com o seu amargor. Este alcalóide derivado de purinas tem sua via principal de biossíntese caracterizada por uma sequência de reações de metilação dos seus precursores, com os grupos metil sendo doados pela S-adenosil-metionina (SAM), que é fruto da conversão de metionina e ATP pela S-adenosil-metionina sintase (SAM-sintase) (E.C. 2.5.1.6) (DOORSSELAERE et al., 1993; ASHIHARA; SANO; CROZIER, 2008; GRILLO; COLOMBATTO, 2008).

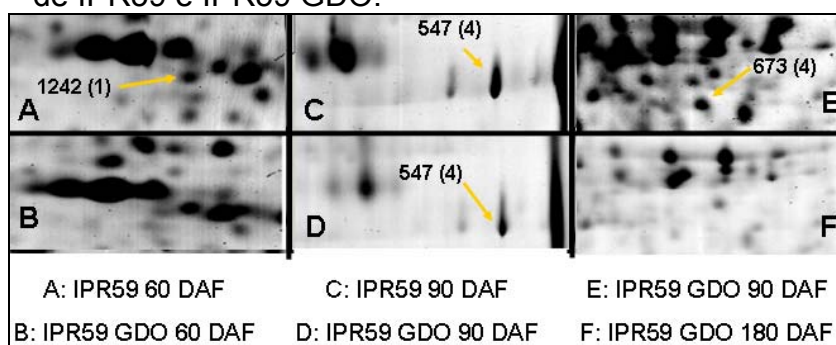
Em plantas a metionina não figura somente como aminoácido essencial, mas tem papel importante como precursora da SAM. A enzima responsável por catalisar o último passo de sua síntese é a metionina sintase (MS) (E.C. 2.1.1.13), utilizando homocisteína como substrato (GAKIERE et al., 2000).

Após estudar as variedades Moca e Catimor de *C. arabica*, Koshiro et al. (2006) observaram o padrão de expressão de um gene codificante da MS aliado a outros relacionados à via biossintética de alcalóides purínicos e concluíram que a síntese ativa de cafeína ocorre em perisperma e pericarpo de frutos em estágio inicial de desenvolvimento (cerca de 60 DAF) e endosperma de frutos intermediários (150 – 180 DAF).

Os resultados obtidos neste trabalho demonstram que a cultivar IPR59 apresentou expressão diferencial de MS mais cedo que IPR59 GDO. Aos 60 DAF o *spot* 1242 (1) estava 2,43x mais expresso, ao passo que nos géis de IPR59 GDO não foi detectado este *spot*. Aos 90 DAF, comparando diretamente as duas cultivares, a MS estava 1,92x mais expressa em IPR59 – *spot* 547 (6). Não houve presença destes *spots* nos géis de 180 DAF e nem mesmo identificação de outros *spots* como MS neste estágio, o que corrobora a afirmação de que a expressão desta proteína em perisperma ocorre no início do desenvolvimento também para estas cultivares de *C. arabica*.

Enquanto a MS estava *downregulated* em IPR59 GDO, a SAM-sintase encontrava-se presente somente aos 90 DAF – *spot* 673 (4) – na análise entre 90 e 180 DAF, confirmando o padrão de expressão em estágios iniciais do perisperma. A Figura 19 demonstra os *spots* com expressão diferencial relacionados ao metabolismo de metionina observados neste trabalho.

Figura 19 – Spots diferencialmente expressos relacionados ao metabolismo de metionina identificados por espectrometria de massa a partir dos géis de IPR59 e IPR59 GDO.



Embora o efeito estimulante do café seja um dos motivos de sua grande popularidade, muitos consumidores preferem cafés descafeinados. Todavia os métodos de retirada da cafeína utilizam produtos químicos tóxicos e a bebida costuma ter qualidade inferior. Uma alternativa a estes processos é o melhoramento de variedades já existentes cujos frutos naturalmente possuem pouca cafeína por apresentarem sua via de biossíntese defeituosa (BORRELL, 2012). Desta forma o conhecimento da expressão de proteínas relacionadas à síntese deste alcalóide pode contribuir em trabalhos visando a obtenção de cafeeiros livres de cafeína, mas que produzam bebida de boa qualidade

Outra possível explanação a respeito da maior expressão destas proteínas em estágios iniciais de desenvolvimento do fruto é o envolvimento na síntese do hormônio etileno. A metionina é precursora deste hormônio, sendo convertida pela SAM-sintase na SAM. Em seguida a ACC-sintase converte SAM em ACC e a ACC-oxidase produz etileno (YANG; HOFFMAN, 1984; WANG; LI; ECKER, 2002).

Em frutos climatéricos, a maturação é característica por demonstrar um grande aumento na produção de etileno que promove os eventos seguintes, como amolecimento da parede celular, mudança de cor e de composição química e uma queda na concentração próxima do estágio de abscisão (PEREIRA et al., 2005). Este padrão foi demonstrado em café utilizando ferramentas moleculares por Pereira et al. (2005), onde a concentração do gás partiu de um nível basal 0,25 nL/g em frutos verde cana (~140 DAF) e chegou a 1,5 nL/g em frutos vermelhos (~200 DAF), para depois reduzir a 1 nL/g em frutos passa (~220 DAF).

A expressão de proteínas relacionadas com metionina observadas neste trabalho pode sugerir que o fruto esteja produzindo e reservando precursores para a futura síntese do etileno já em seus estágios iniciais de desenvolvimento perispermático, e que há diferença no padrão deste acúmulo entre as cultivares. A expressão de MS aos 60 DAF somente em IPR59 (*spot* 1242 [1]) e 1,92x maior em IPR59 90 DAF do que em IPR59 GDO (*spot* 547 [6]) pode permitir o início da síntese do etileno mais cedo em IPR59. Em IPR59 GDO esta menor expressão aliada à presença de SAM-sintase somente aos 90 DAF (*spot* 673 [4]) pode manter o fruto por maior tempo na etapa de enchimento do perisperma, com consequente aumento no tamanho do fruto antes de deflagrar o final da maturação. Um padrão similar de expressão gênica para expansinas foi recentemente observado, onde em frutos de IPR59 GDO a expressão foi prolongada até os 90 DAF, enquanto em IPR59 foi somente até os 60 DAF (BUDZINSKI et al., 2011). Dados de maturação de frutos de IPR59 GDO também demonstram um período de maturação maior, com uma colheita mais tardia que IPR59, corroborando para a hipótese de um período mais prolongado no desenvolvimento do fruto.

A ausência de *spots* para estas proteínas em géis de 180 DAF é coerente com resultados em tomate, também climatérico, obtidos por Faurobert et al. (2007), que também observaram maior expressão de SAM-sintase no início da maturação e posterior redução durante a maturação.

A expressão de genes para SAM-sintase em estágio inicial de desenvolvimento do fruto também foi observada em microarranjo produzido por Janssen et al. (2008). Os autores ainda relataram a expressão de genes para SAM-sintase e para 6-fosfogluconolactonase (E.C. 3.1.1.31) em resposta ao etileno, sendo que 6-fosfogluconolactonase pertence à via das pentoses fosfato (MICLET et al., 2001; NELSON; COX, 2002). Neste trabalho a 6-fosfogluconolactonase estava 1,50x mais expressa aos 60 DAF em IPR59 GDO que em IPR59 (*spot* 1222 [5]).

Uma das formas de melhorar a maturação dos frutos é controlando a ação de genes relacionados com a etapa de maturação desencadeada pelo etileno (PEREIRA et al., 2005). O entendimento da dinâmica de produção das proteínas relacionadas em sua biossíntese pode permitir estudos visando priorizar a etapa de crescimento dos frutos, de forma que fiquem maiores e adquiram maior valor comercial.

5.3.3 Proteínas Relacionadas ao Desenvolvimento Celular

Como revisto por De Castro e Marraccini (2006) e Takac, Pechan e Samaj (2011), a classe de proteínas *Pathogenesis-Related* (PR) é conhecida por ser expressa como resistência contra patógenos após infecções, mas também pode apresentar funções diversas, como de reserva. Uma subclasse de PR formada por quitinases classe III foi encontrada com expressão positiva em tecidos de café e de milho com significativa divisão celular.

Em nosso trabalho três *spots* foram identificados como inibidor de xilanase similar à quitinase (CLXIP) (Figura 20), uma proteína pertencente ao grupo das quitinases classe III (*spots* 1204[1], 739 [5] e 1306 [6]). Recentemente Vasconcelos et al. (2011) estudaram a atividade de defesa desta proteína de café após cloná-la e expressá-la em bactérias e testá-la contra esporos obtidos de folhas de soja contaminadas com ferrugem. Embora tenha sido observada tal atividade, foi utilizado o *contig* 14550 do banco de dados de ESTs do café como sequência gênica codificante e a ação ocorreu em folhas. Nossos resultados de identificação das proteínas são coerentes com o *contig* 660 e a extração foi realizada em frutos com intenso desenvolvimento celular. Além disso, o *contig* 14550 é quase duas vezes menor que o 660 – 721 nucleotídeos contra 1292 – e é similar somente à região interna deste. As proteínas preditas para estas sequências também diferem em tamanho e constituição aminoacídica.

É possível que a expressão diferencial destas proteínas esteja relacionada com o desenvolvimento da parede celular dos frutos. Em dicotiledôneas o principal constituinte da hemicelulose é a xilana, um polímero formado por xilose que pode ser hidrolisado por xilanases (KULKARNI; SHENDYE; RAO, 1999). Fragmentos xilosídicos da parede podem resultar em respostas ao desenvolvimento celular, como por exemplo, inibir seu enfraquecimento excessivo ou influenciar a diferenciação das células (TAIZ; ZIEGER, 2004). Outro polímero com xilose, o xiloglucano, atua permitindo que a célula altere sua forma nas regiões de crescimento e diferenciação e mantenha sua forma final após a maturação (HAYASHI; KAIDA, 2011).

A atividade de inibição da xilanase pode ter sido útil no tocante a evitar que a parede fosse demasiado degradada no crescimento celular. Em IPR59 60 DAF o *spot* 1204 (1) tinha %Vol 1,75x maior que aos 90 DAF e o *spot* 739 (5)

estava 2,17x mais expresso que em IPR59 GDO. Já em IPR59 GDO 90 DAF o *spot* 1306 (6) estava 1,57x mais expresso que em IPR59.

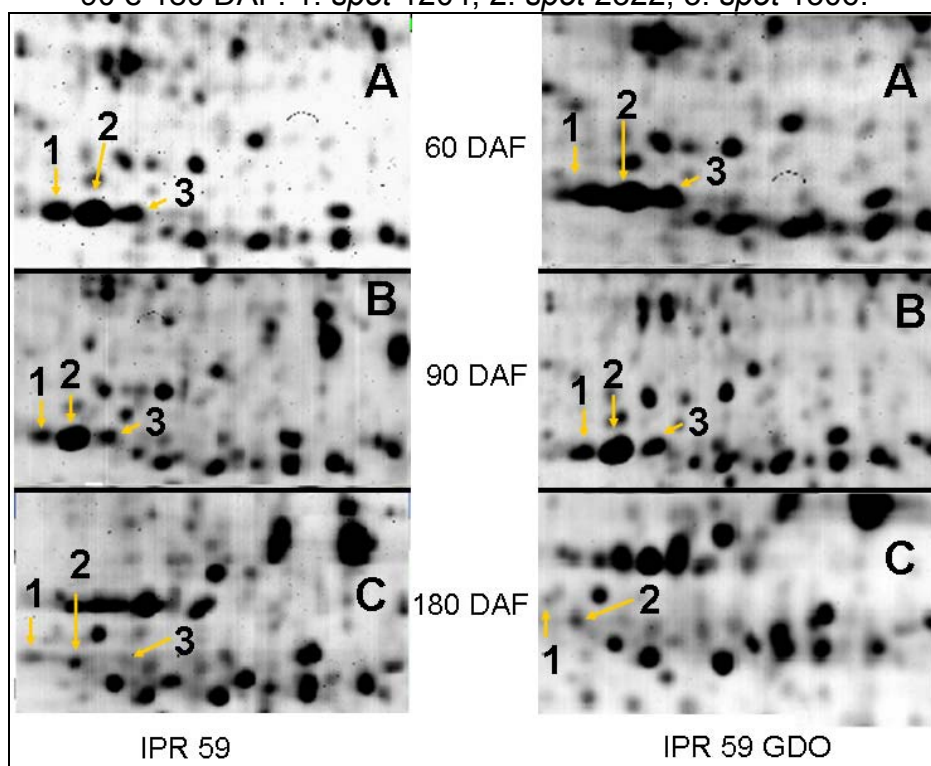
A análise destas proteínas é relevante, pois os *spots* 1204 (1) e 1306 (6) fizeram parte de um grupo proeminente nos géis dos dois genótipos aos 60 e 90 DAF, com grande mudança no perfil e redução da %Vol aos 180 DAF. Isto pode significar que a requisição destes polipetídeos ocorra nos estágios iniciais do desenvolvimento perispermático, reconhecidos por intensa divisão e expansão celular (DE CASTRO; MARRACCINI, 2006). Embora não tenha sido identificado via espectrometria de massas, o *spot* 2322 (3) também pertenceu ao grupo e apresentou grandes diferenças de expressão aos 90 DAF nas análises entre IPR59 GDO 90 x 180 DAF (+22,37x) e IPR59 90 x 180 DAF (+23,59x). A união dos *spots* 1204, 1306 e 2322 parece configurar subunidades da proteína CLXIP (Figura 20). A Tabela 12 demonstra a evolução das %Vol destes *spots*.

O *spot* 1031 (1) continha %Vol 1,50x maior em IPR59 60 DAF que em 90 DAF e foi identificado como extensina, cujas funções podem estar relacionadas com suporte para facilitação e garantia da correta deposição e organização da parede no início do crescimento celular e junção celular (CANNON et al., 2008; PEREIRA et al., 2011). O *spot* estava presente, embora sem diferença de expressão, nas análises entre IPR59 GDO 60 x 90 DAF, IPR59 x IPR59 GDO 60 DAF e 90 DAF. Aos 180 DAF foi presente somente em IPR59 GDO.

Tabela 12 – Evolução em %Vol dos spots pertencentes à proteína inibidor de xilanase similar à quitinase identificados por espectrometria de massa ou localizados próximos a estes nos géis de IPR59 e IPR59 GDO.

Spot	Genótipo					
	IPR59			IPR59 GDO		
	%Vol 60 DAF	%Vol 90 DAF	%Vol 180 DAF	%Vol 60 DAF	%Vol 90 DAF	%Vol 180 DAF
1204	2,10	0,73	0,16	1,22	0,91	0,11
2322	7,59	6,08	0,18	11,80	13,02	0,27
1306	1,04	0,55	0,13	1,05	1,33	-

Figura 20 – Evolução de *spots* representantes da proteína inibidor de xilanase similar à quitinase identificados por espectrometria de massas ou localizados próximos a estes em géis de IPR59 e IPR59 GDO aos 60, 90 e 180 DAF. 1: *spot* 1204; 2: *spot* 2322; 3: *spot* 1306.



Como revisto por Petrasek e Schwarzerová (2009) e Takac, Pechan e Samaj (2011) microfilamentos de actina juntamente de microtúbulos são conhecidos por envolver-se no aparato mitótico, citocinético, alongamento celular e o acúmulo de proteínas ligantes à actina acompanha o aumento na taxa de divisão celular. Os microfilamentos de actina constituem parte fundamental do citoesqueleto de eucariotos (GILLILAND et al., 2003) e recentemente a actina foi também relacionada com controle do formato e permeabilidade da membrana em plantas (HOHENBERGER et al., 2011).

Neste trabalho foram identificados dois *spots* como actina e actina 7, ambos estavam 1,50x mais expressos em IPR59 que em IPR59 GDO na comparação aos 60 DAF. Gilliland et al. (2003) comentam que o gene para actina 7 é mais expresso em situações de *stress* e rápido crescimento e que a actina 7 é a principal envolvida no controle do crescimento do ápice da raiz e da divisão celular em *Arabidopsis* sp. Também estudando esta planta Mathugapatti, McKinney e Meagher (2009) relataram que mutantes com falta de actina 7 sofreram severo

retardamento no desenvolvimento das raízes afetando sua alongação e densidade pilífera e que as sementes destas plantas desenvolveram cotilédones menores.

Possivelmente a expressão diferencial das actinas detectada neste trabalho, esteja relacionada com a hipótese de que o IPR59 tem seu processo de alta divisão celular mais cedo ou mais rápido que o genótipo IPR59 GDO – como sugerido neste trabalho para as proteínas relacionadas à síntese de etileno e de expansinas (BUDZINSKI et al., 2011) – e, permanecendo por menor tempo nesta etapa de desenvolvimento do perisperma, seus frutos acabam sendo menores que os de IPR59 GDO.

6 CONCLUSÃO

O protocolo de extração e a análise utilizando géis 2D foram realizadas com eficiência tanto para obtenção de proteínas dos frutos de café como para a separação de proteínas e obtenção de géis com boa qualidade. A quantia de *spots* detectados foi superior nos géis de IPR59.

O perfil protéico dos materiais a 60 e 90 DAF foi similar, devido à proximidade temporal. Todavia, aos 180 DAF o padrão de expressão demonstrou-se distinto das etapas anteriores.

Foram identificados 25 *spots* que corresponderam a 17 proteínas envolvida com reserva, desenvolvimento celular, metabolismo de carboidratos, metabolismo de metionina, processos metabólicos de oxidação/redução, fotossíntese, síntese de ATP e processamento de RNA.

A proteína de reserva 11S foi detectada em perisperma separado do fruto e sua evolução em %Vol demonstrou-se relevante até o final do período perispermático.

Proteínas relacionadas com síntese e metabolismo de metionina podem estar envolvidas nas vias de produção de cafeína e etileno, ambos importantes para a qualidade da bebida no tocante ao sabor e maturação frutífera.

De acordo com nossas observações o perisperma de IPR59 GDO parece permanecer por maior tempo na fase de grande crescimento que IPR59, podendo estar relacionado com a produção de frutos maiores e de melhor qualidade.

O trabalho trouxe conhecimentos a respeito das mudanças no perfil protéico dos frutos das duas cultivares em diferentes estádios de maturação relacionados com a fase de formação do espaço em que será armazenada a semente.

REFERÊNCIAS

- AGUIAR, A.T. da E. **Atributos químicos de espécies de café**. 2005. 88f. Tese (Doutorado em Agronomia – Fitotecnia) – Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.
- AHMAD, R.; THARAPPAN, B.; BONGIRWAR, D.R. Impact of gamma irradiation on the monsooning of coffee beans. **Journal of Stored Products Research**, v.39, p.149-157, 2003.
- ALONSO-SALCES, R.M.; SERRA, F.; RENTERO, F.; HÉBERGER, K. Botanical and geographical characterization of green coffee (*Coffea arabica* and *Coffea canephora*): chemometric evaluation of phenolic and methylxantine contents. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.57, p.4224-4235, 2009.
- ARCILA-PULGARÍN, J. et al. Application of the extended BBCH scale for the description of the growth stages of coffee (*Coffea* spp.). **Annals of Applied Biology**, v.141, n.1, p.19-27, 2002.
- ASHIHARA, H.; SANO, H.; CROZIER, A. Caffeine and related purine alkaloids: biosynthesis, catabolism, function and genetic engineering. **Phytochemistry**, v.69, n.4, p.841-856, 2008.
- Associação Brasileira da Indústria de Café – ABIC: <<http://www.abic.com.br>> Acesso em 11/02/2010
- Associação Brasileira da Indústria de Café – ABIC. Guia prático do programa de qualidade do café. 2 ed. Disponível em: <http://www.abic.com.br/gar_qualidade.html> Acesso em 12/11/2010)
- AVALLONE, S.; GUIRAUD, J.P.; GUYOT, B.; OLGUIN, E.; BRILLOUET, J.M. Fate of mucilage cell wall polysaccharides during coffee fermentation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.49, n.11, p.5556-5559, 2001.
- AYUB, R.A.; GEBIELUCA, A.N. Embriogênese somática em genótipos de café (*Coffea arabica*) é citocinina dependente. **Ciências Exatas e da Terra, Ciências Agrárias e Engenharias**, v.9, n.2, p.25-30, 2003.
- BANDIL, G.B. **Análise proteômica comparativa do fruto de café (*Coffea arabica*) em dois estádios iniciais de desenvolvimento**. 2008. 83f. Dissertação (Mestrado em Agronomia – Agricultura) – Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa.
- BATISTA, L.R.; CHALFOUN, S.M.; PRADO, G.; SCHWAN, R.F.; WHEALS, A.E. Toxigenic fungi associated with processed (green) coffee beans (*Coffea arabica* L.). **International Journal of Food Microbiology**, v.85, p.293-300, 2003.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-254, 1976.

BORRELL, B. Plant biotechnology: make it a decaf. **Nature**, v.483, p.264-266, 2012.

BUDZINSKI, I.G.F. **Caracterização da expressão de três genes de α -expansinas em *Coffea arabica* e *Coffea racemosa* durante o desenvolvimento e maturação do fruto**. 2008. 85f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

BUDZINSKI, I.G.F. et al. Expression patterns of three α -expansin isoforms in *Coffea arabica* during fruit development. **Plant Biology**, v.13, n.3, p.462-471, 2011.

CANNON, M.C. et al. Self-assembly of the plant cell wall requires an extensin scaffold. **Process of National Academy of Science of the USA**, v.105, n.6, p.2226-2231, 2008.

CARVALHO, A.; FAZUOLI, L.C.; TEIXEIRA, A.A.; FILHO, O.G. Aproveitamento do café excelsa em mistura com o café arábica. **Bragantia**, v.48, n.2, p. 335-343, 1990.

CHAVES, A.L.; BIERHALS, J.D.; ZIMMER, P.D.; SILVA, J.A.; VALMOR, C. Caracterização imunológica da ACC (ácido-1-carboxílico-1-aminociclopropano) oxidase em frutos climatéricos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.17, n.3, p.320-324, 1997.

CHARRIER, A.; BERTHAUD, J. Botanical classification of coffee. In: CLIFFORD, M.N.; WILSON, K.C. (Eds) **Coffee: botany, biochemistry and production of beans and beverage**. 1 ed. Londres: Croom Helm, 1985

CLARENCE-SMITH, W.G.; TOPIK, S. *The global coffee economy in Africa, Asia and Latin America, 1500-1989*. 1 ed. Cambridge: Cambridge University Press, 2003.

Companhia Nacional de Abastecimento – CONAB. Acompanhamento da safra brasileira: café. Safra 2012, primeira estimativa, janeiro/2012. Disponível em <<http://www.conab.gov.br>> Acesso em 27/04/2012

CUBRY, P. et al. Diversity in coffee assessed with SSR markers: structure of the genus *Coffea* and perspectives for breeding. **Genome**, v.51 p.50-63, 2008.

DAMATTA, F.M.; RONCHI, C.P.; MAESTRI, M.; BARROS, R.S. Ecophysiology of coffee growth and production. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v.19, n.4, p. 485-510, 2007.

DAVIS A.P.; GOVAERTS R.; BRIDSON D.M.; STOFFELEN P. An annotated taxonomic conspectus of the genus *Coffea* (Rubiaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, v.152, n.4, p.465–512, 2006.

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

DE CAMARGO, M.B.P. Influência do clima na produtividade de grãos e na qualidade da bebida do café. In: SALVA, T. de J.G.; FILHO, O.G.; THOMAZIELLO, R.A.; FAZUOLI, L.C. (Eds) **Cafés de Qualidade: Aspectos tecnológicos, Científicos e Comerciais**. 1.ed. Campinas: Instituto Agrônomo de Campinas, 2007.

DE CARVALHO, C.H.S. et al. Cultivares de café arábica de porte baixo. In: DE CARVALHO, C.H.S. (Ed) **Cultivares de café: origem, características e recomendações**. 1.ed. Brasília: Embrapa Café, 2008.

DE CASTRO, R.R. de; MARRACCINI, P. Cytology, biochemistry and molecular changes during coffee fruit development. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v.18, n.1, p.229-242, 2006.

DE MARIA, C.A.B.; MOREIRA, R.F.A.; TRUGO, L.C. Componentes voláteis do café torrado. Parte I: compostos heterocíclicos. **Química Nova**, v.22, n.2, p.195-203, 1999.

DE MARIA, C.A.B.; TRUGO, L.C.; AQUINO, N.F.R.; MOREIRA, R.F.A.; ALVIANO, C.S. Composition of green coffee water-soluble fractions and identification of volatiles formed during roasting. **Food Chemistry**, v.55, p.203-207, 1996.

DE MARIA, C.A.B.; TRUGO, L. C.; MOREIRA, R. S. A.; PETRACCO, M. Simultaneous determination of total chlorogenic acids, trigonelline and caffeine in green coffee samples by high performance gel filtration chromatography. **Food Chemistry**, v.52, n.4, p.447-449, 1995.

DOORSSELAERE, J.V.; GIELEN, J; MONTAGU, M.V.; INZÉ, D. A cDNA encoding S-adenosyl-L-methionine synthetase from Poplar. **Plant Physiology**, v.102, p.1365-1366, 1993.

DUARTE, G.S.; PEREIRA, A.A.; FARAH, A. Chlorogenic acids and other relevant compounds in brazilian coffees processed by semi-dry and wet post-harvesting methods. **Food Chemistry**, v.118, p.851-855, 2010.

FARAH, A.; MONTEIRO, M.C.; CALADO, V.; FRANCA, A.S.; TRUGO, L.C. Correlation between cup quality and chemical attributes of brasilian coffee. **Food Chemistry**, v.98, p.373-380, 2006.

FAUROBERT, M. et al. Major proteome variations associated with cherry tomato pericarp development and ripening. **Plant Physiology**, v.143, p.1327-1346, 2007.

FEY, S.J.; LARSEN, P.M. 2D or not 2D. **Current Opinion in Chemical Biology**, v.5, p.26-33, 2001.

FERREIRA, D.F. SISVAR: um programa para análises e ensino de estatística. **Symposium**, v.6, n.2, p.36-41, 2008.

FILHO, O.G.; MAZZAFERA, P. Caffeine and resistance of coffee to the berry borer *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.51, p.6987-6991, 2003.

FRANCO, O.L. et al. Proteomic evaluation of coffee zygotic embryos in two different stages of seed development. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.47, p.1046-1050, 2006.

GAKIERE, B.; RAVANEL, S.; DROUX, M. DOUCE, R.; JOB, D. Mechanisms to account for maintenance of the soluble methionine pool in transgenic *Arabidopsis* plants expressing antisense cystathione γ -synthase cDNA. **Comptes Rendus de l'Académie des Sciences – Series III – Sciences de la Vie**, v.323, n.10, p.841-851, 2000.

GE Healthcare. **2-D electrophoresis: principles and methods**. 2005. Disponível em: <www.gelifesciences.com/apatrix/upp00919.nsf/Content/LD_319798244-C534?OpenDocument&hometitle=tech_support_service&ParentDoc=A5398443586C5EA7C125763B00328FDC>. Acesso em 04/05/2010.

GEROMEL, C. et al. Biochemical and genomic analysis of sucrose metabolism during coffee (*Coffea arabica*) fruit development. **Journal of Experimental Botany**, v.57, n.12, p.3243-3258, 2006.

GEROMEL, C. et al. Effects of shade on the development and sugar metabolism of coffee (*Coffea arabica* L.) fruits. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.46, p.569-579, 2008.

GIL-AGUSTI, M.T.; CAMPOSTRINI, N.; ZOLLA, L.; CIAMBELLA, C.; INVERNIZZI, C.; RIGHETTI, P.G. Two-dimensional mapping as a tool for classification of green coffee bean species. **Proteomics**, v.5, n.3, p.710-718, 2005.

GILLILAND, L.U.; PAWLOSKI, L.C.; KANDASAMY, M.K.; MEAGHER, R.B. *Arabidopsis* actin gene ACT7 plays an essential role in germination and root growth. **The Plant Journal**, v.33, p.319-328, 2003.

GRILLO, M.A.; COLOMBATTO, S. S-adenosylmethionine and its products. **Amino Acids**, v.34, p.187-193, 2008.

GUIMARÃES, B.L.S. **Proteômica diferencial em clones de Coffea canephora sob condições de déficit hídrico**. 2007. 59f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

HAYASHI, T.; KAIDA, R. Functions of xyloglucan in plant cells. **Molecular Plant**, v.4, n.1, p.17-24, 2011.

HOHENBERGER, P.; EING, C.; STRAESSNER, R.; DURST, S.; FREY, W.; NICK, P. Plant actin controls membrane permeability. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1808, n.9, p.2304-2312, 2011.

International Coffee Organization - ICO: <www.ico.org> Acesso em 24/04/2012).

JANSSEN, B.J. et al. Global gene expression analysis of apple fruit development from the floral bud to ripe fruit. **BMC Plant Biology**, v.8, n.16, 2008.

JOET, T.; LAFFARGUE, A.; SALMONA, J.; DOULBEAU, S.; DESCROIX, F.; BERTRAND, B.; KOCHLO, A.; DUSSERT, S. Metabolic pathways in tropical dicotyledonous albuminous seeds: *Coffea arabica* as a case study. **New Phytologist**, v.182, p.146-162, 2009.

KNOPP, S.; BYTOF, G.; SELMAR, D. Influence of processing on the content of sugars in green Arabica coffee beans. **European Food Research and Technology**, v.223, n.2, p.195-221, 2006.

KLEINWACHTER, M.; SELMAR, D. Influence of drying on the content of sugars in wet processed green Arabica coffees. **Food Chemistry**, v.119, p.500-504, 2010.

KOBAYASHI, E, S.; SAKAI, E.; SILVA, E. da; PIRES, R. C. M. Condições ambientais e o manejo da irrigação influenciando a qualidade do café. **O Agrônomo**, v.59, n.1, p.30-32, 2007.

KOSHIRO, Y.; ZHENG, X.-Q.; WANG, M.-L.; NAGAI, C.; ASHIHARA, H. Changes in content and biosynthetic activity of caffeine and trigonelline during growth and ripening of *Coffea arabica* and *Coffea canephora* fruits. **Plant Science**, v.171, p.242-250, 2006.

KOSHINO, L.L.; GOMES, C.P.; SILVA, L.P.; EIRA, M.T.S.; JUNIOR, C.B.; FRANCO, O.L.; MEHTA, A. Comparative proteomic analysis of zygotic embryo and endosperm from *Coffea arabica* seeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.56, p.10922-10926, 2008.

KOSOVÁ, K.; VÍTÁMVÁS, P.; PRÁSÍL, I.T.; RENAUT, J. Plant proteome changes under abiotic stress – contribution of proteomics studies to understanding plant stress response. **Journal of Proteomics**, v.74, n.8, p.1301-1322, 2011.

KULKARNI, N.; SHENDYE, A.; RAO, M. Molecular and biotechnological aspects of xylanases. **FEMS Microbiology Reviews**, v.23, p.411-456, 1999.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v.227, p.680-685, 1970.

LASHERMES, P.; COMBES, M.-C.; ROBERT, J. TROUSLOT, P. D'HONT, A.; ANTHONY, F. CHARRIER, A. Molecular characterization and origin of the *Coffea arabica* L. genome. **Molecular and General Genetics**, v.261, p.259-266, 1999.

LAVIOLA, B.G.; MAURI, A.L.; MARTINEZ, H.E.P.; ARAÚJO, E.F.; NEVES, Y.P. Influência da adubação na formação de grãos mocas e no tamanho de grãos de café (*Coffea arabica* L.). **Coffee Science**, v.1, n.1, p.36-42, 2006.

LEITE, C.L. *Aceitação e preferência por cafés submetidos a diferentes métodos de extração de cafeína*. 2009. 116f. Dissertação (Mestrado em Nutrição e Saúde Pública) – Universidade de São Paulo, Faculdade de Saúde Pública, São Paulo.

LEROY, T. et al. Improving quality of african robustas: QTL for agronomic and quality related traits in *Coffea canephora*. **Tree Genetics & Genomics**, v.7, n.4, p.781-798, 2011.

LEROY, T.; RIBEYRE, F.; BERTRAND, B.; CHARMETANT, P.; DUFOUR, M.; MONTAGNON, C.; MARRACCINI, P.; POT, D. Genetics of coffee quality. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v.18, n.1, p.229-242, 2006.

LIN, C.; MUELLER, L.A.; Mc CARTHY, J.; CROUZILLAT, D.; PÉTIARD, V.; TANKSLEY, S. D. Coffee and tomato share common gene repertoires as revealed by deep sequencing of seed and cherry transcripts. **Theoretical and Applied Genetics**, v.112, n.1, p.114-130, 2005.

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

MAGALHÃES, D.M. **Análise proteômica em plantas transgênicas de citrumelo 'Swingle' com alto acúmulo de prolina submetidas ao déficit hídrico**. 2009. 120f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

MARRACCINI, P. et al. Differentially expressed gene and proteins upon drought acclimation in tolerant and sensitive genotypes of *Coffea canephora*. **Journal of Experimental Botany**, v.63, n.9, 2012.

MARRACCINI, P. et al. Biochemical and molecular characterization of α -D-galactosidase from coffee beans. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.43, p.909-920, 2005.

MATHUGAPATTI, K.K.; McKINNEY, E.C.; MEAGHER, R.B. A single vegetative actin isovariant overexpressed under the control of multiple regulatory sequences is sufficient for normal *Arabidopsis* development. **The Plant Cell**, v.21, p.701-718, 2009.

MAZZAFERA, P.; ROBINSON, S.P. Characterization of polyphenol oxidase in coffee. **Phytochemistry**, v.55, p.285-296, 2000.

MICLET, E.; STOVEN, V.; MICHELS, P.A.M; OPPERDOES, F.R.; LALLEMAND, J.-Y. ; DUFFIEUX, F. NMR spectroscopic analysis of the first two steps of the pentose-phosphate pathway elucidates the role of 6-phosphogluconolactonase. **The Journal of Biological Chemistry**, v.276, n.14, p.34840-34846, 2001.

MONDEGO, J.M.C. et al. An EST-based analysis identifies new genes and reveals distinctive gene expression features of *Coffea arabica* and *Coffea canephora*. **BMC Plant Biology**, v.11, n.30, 2011.

MONTAVON, P.; DURUZ, E.; RUMO, G.; PRATZ, G. Evolution of green coffee protein profiles with maturation and relationship to coffee cup quality. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v.51, p.2328-2334, 2003.

MONTAVON, P.; MAURON, A.-F.; DURUZ, E. Changes in green coffee protein profiles during roasting. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v.51, p.2335-2343, 2003.

NASSER, P. P.; CHALFOUN, S. M.; **Influência da separação de café (*Coffea arabica* L.) de acordo com o tamanho sobre espectro de coloração dos grãos**. In: II Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil, Vitória – ES. Anais do II Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil, 2001.

NEUHOFF, V.; STAMM, R.; EIBL, H. Clear background and highly sensitive protein staining with Coomassie Blue dyes in polyacrylamide gels: A systematic analysis. **Electrophoresis**, v.6, n.9, p.427-448, 1985.

NELSON, D.L.; COX, M.M. **Lehninger: princípios de bioquímica**. 3.ed. São Paulo, Sarvier, 2002.

OCHUODHO, J.O.; MODI, A.T.; BEUKES, M. Accumulation of seed storage proteins in *Cleome gynandra* L. and *Brassica kaber* L. **South African Journal of Botany**, v.72, p.238-244, 2006.

OELJEKLAUS, S.; MEYER, H.E.; WARSCHEID, B. Advances in plant proteomics using quantitative mass spectrometry. **Journal of Proteomics**, v.72, p.545-554, 2009.

PENG, W. Trends in biotech literature 2009-2010. **Nature Biotechnology**, v.29, n.9, p.781, 2011.

PEREIRA, L.F.P.; GALVÃO, R.M.; KOBAYASHI, A.K.; CAÇÃO, S.M.; VIEIRA, L.G.E. Ethylene production and acc oxidase gene expression during fruit ripening of *Coffea arabica* L. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v.17, n.3, p.283-289, 2005.

PEREIRA, C.S.; RIBEIRO, J.M.L.; VATULESCU, A.D.; FINDLAY, K.; MacDOUGALL, A.J.; JACKSON, P.A.P. Extensin network formation in *Vitis vinifera* callus cells is an essential and causal event in rapid and H₂O₂-induced reduction in primary cell wall hydration. **BMC Plant Biology**, v.11, n.106, 2011.

PETRASEK, J.; SCHWARZEROVA, K. Actin and microtubule cytoskeleton interactions. **Current Opinion in Plant Biology**, v.12, p.728-734, 2009.

PEZZOPANE, J.R.M.; JÚNIOR, M.J.P.; THOMAZIELLO, R.A.; CAMARGO M.B.P. de. Escala para avaliação de estádios fenológicos do cafeeiro arábica. **Bragantia**, v.62, n.3, p.499-505, 2003.

PIMENTA, C.J.; CHAGAS, S.J. de; COSTA, L. Polifenoloxidase, lixiviação de potássio e qualidade de bebida de café colhido em quatro estádios de maturação. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.32, n.2, p.171-177, 1997.

PIMENTA, J.C.; VILELA, E.R. Efeito do tipo e época de colheita na qualidade do café (*Coffea arabica* L.). **Acta Scientiarum: Agronomy**, v.25, n.1, p.131-136, 2003.

PROMAR INTERNATIONAL. Brazil coffee to 2010: implications for global coffee players. 2001.

RIBAS, A.F.; PEREIRA, L.F.P.; VIEIRA, L.G.E. Genetic transformation of coffee. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v.18, n.1, p.83-84, 2006.

RODARTE, M.P.; ABRAHÃO, S.A.; PEREIRA, R.G.F.A.; MALTA, M.R. Compostos não voláteis em cafés da região sul de minas submetidos a diferentes pontos de torração. **Ciência e Agrotecnologia**, v.33, n.5, p.1366-1371, 2009.

- ROGERS, J.W.; BÉZARD, G.; DESHAYES, A.; MEYER, I.; PÉTIARD, V.; MARRACCINI, P. Biochemical and molecular characterization and expression of the 11S-type storage protein from *Coffea arabica* endosperm. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.37, n.4, p.261-272, 1999.
- ROSSIGNOL, M.; PELTIER, J.-B.; MOCK, H.-P.; MATROS, A.; MALDONADO, A.M.; JORRÍN, J.V. Plant proteome analysis: a 2004-2006 update. **Proteomics**, v.6, p.5529-5548, 2006.
- SALVATO, F.; DE CARVALHO, M.C.da C.G. Métodos e estratégias em proteômica e suas aplicações na área vegetal. **Ciência Rural**, v.40, n.3, p.727-734, 2010.
- SHEORAN, I.S.; ROSS, A.R.S.; OLSON, D.J.H.; SAWHNEY, V.K. Compatibility of plant protein extraction methods with mass spectrometry for proteome analysis. **Plant Science**, v.176, p.99-104, 2009.
- SCHMIDT, C.A.P. **Caracterização qualitativa, química e microbiológica de cafés de solos de basalto e arenito**. 2008. 160f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina.
- SHEVCHENKO, A.; TOMAS, H.; HAVLIS, J.; OLSEN, J.V.; MANN, M. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. **Nature Protocols**, v.1, n.6, p.2856-2860, 2007.
- SILVEIRA, S.R.; RUAS, P.M.; RUAS, C. de F.; SERA, T.; CARVALHO, V. de P.; COELHO, A.S.G. Assessment of genetic variability within and among coffee progenies and cultivars using RAPD markers. **Genetics and Molecular Biology**, v.26, n.3, p.329-336, 2003.
- SIQUEIRA, T.V. de. A cultura do café: 1961-2005. **BNDES Setorial**, n.22, p.205-270, 2005.
- SIMKIN, A.J. et al. Oleosin gene family of *Coffea canephora*: quantitative expression analysis of five oleosin genes in developing and germinating coffee grain. **Journal of Plant Physiology**, n.163, p.691-708, 2006.
- SOARES, C.Q.G. **Proteômica diferencial e caracterização fisiológica de dois clones de *Coffea canephora* sob déficit hídrico**. 2008. 98f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- TAIZ, L.; ZIEGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3.ed. Porto Alegre: Artmed, 2004.
- TAKAC, T.; PECHAN, T.; SAMAJ, J. Differential proteomics of plant development. **Journal of Proteomics**, v.74, p.577-588, 2011.
- THARAPPAN, B.; AHMAD, R. Fungal colonization and biochemical changes in coffee beans undergoing monsooning. **Food Chemistry**, v.94, p.247-252, 2006.
- THIELLEMENT, H.; ZIVY, M. PLOMION, C. Combining proteomic and genetic studies in plants. **Journal of Chromatography**, v.782, p.137-149, 2002.

TOCI, A.; FARAH, A.; TRUGO, L.C. Efeito do processo de descafeinação com diclorometano sobre a composição química dos cafés arábica e robusta antes e após a torração. **Química Nova**, v.29, n.5, p.965-971, 2006.

UKERS, W.H. *All about coffee*. 2 ed. New York: The Tea & Coffee Trade Journal Company, 1935.

WANG, K. L.-C.; LI, H.; ECKER, J.R. Ethylene biosynthesis and signaling networks. **The Plant Cell**, v.14, p.131-151, 2002.

WANG, W.; SCALI, M.; VIGNANI, R.; SPADAFORA, A.; SENSI, E.; MAZZUCA, S.; CRESTI, M. Protein extraction for two-dimensional electrophoresis from olive leaf, a plant tissue containing high levels of interfering compounds. **Electrophoresis**, v.24, p.2369-2375, 2003.

WILKINS, M. R. J. C. et al. HOCHSTRASSER, D. F.; WILLIAMS, K. L. Progress with proteome projects : why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. **Biotechnology & Genetic Engineering Reviews**, v.13, p.19-50, 1996.

YANG, S.F.; HOFFMAN, N.E. Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. **Annual Review of Plant Physiology**, v.35, p.155-189, 1984.

ZAIA, D.A.M.; ZAIA, C.T.B.V.; LICHTIG, J. Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes. **Química Nova**, v.21, n.6, p.787-793, 1998.