

**PROTEÔMICA DIFERENCIAL DE CAFÉ  
ARÁBICA SUBMETIDO A DIFERENTES  
PROCESSAMENTOS E SECAGEM**

**KALYNKA GABRIELLA DO LIVRAMENTO**

**2008**

**KALYNKA GABRIELLA DO LIVRAMENTO**

**PROTEÔMICA DIFERENCIAL DE CAFÉ ARÁBICA SUBMETIDO A  
DIFERENTES PROCESSAMENTOS E SECAGEM**

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

**Orientador**

**Prof. Dr. José Donizeti Alves**

**LAVRAS  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2008**

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

Livramento, Kalyinka Gabriella.

Proteômica diferencial de café arábica submetido a diferentes processamentos e secagem /Kalyinka Gabriella Livramento. – Lavras: UFLA, 2008.

67 p.: il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2008.

Orientador: José Donizeti Alves.

Bibliografia.

1. Proteômica diferencial . 2. Café arábica. 3.Processamento. 4.Secagem. 5.Espectrometria de massa I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 663.93

**KALYNKA GABRIELLA DO LIVRAMENTO**

**PROTEÔMICA DIFERENCIAL DE CAFÉ ARÁBICA SUBMETIDO A  
DIFERENTES PROCESSAMENTOS E SECAGEM**

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

**APROVADA em 28 de agosto de 2008**

**Prof. Dr Flávio Meira Borém**

**UFLA**

**Prof. Dr. Luciano Vilela Paiva**

**UFLA**

**Prof. Dr. José Donizeti Alves**  
**UFLA**  
**(Orientador)**

**LAVRAS**  
**MINAS GERAIS – BRASIL**  
**2008**

*A Deus, pelo dom da vida, saúde e presença constante em minhas jornadas;*

*Ao Luciano Vilela Paiva, presença marcante em minha vida, ao meu lado em todos os momentos, com muito amor, muito carinho e incentivo.*

## **DEDICO**

*A meus pais, Livramento e Graça, exemplos de caráter,*

*Ao meu irmão e ao meu futuro sobrinho, que me trará muita felicidade.*

## **OFEREÇO**

## **AGRADECIMENTOS**

É com muito carinho que escrevo esta sessão de agradecimentos, pois as pessoas que aqui menciono tornaram possível a realização deste trabalho, fizeram parte do meu dia-a-dia neste período e significaram muito para a minha formação.

A Deus, por ter-me proporcionado saúde, força e disposição para vencer mais esta etapa de minha vida.

À Coordenação de aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pela concessão de bolsa de estudos durante o mestrado.

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

Ao professor Anderson Cleiton José, pela ajuda vital, sem seu auxílio este trabalho teria sido muito mais árduo.

Ao professor José Donizeti Alves, pelas sugestões e contribuições em todo o período do mestrado e por todos os recursos disponibilizados.

Ao professor Flávio Meira Borém, pela disponibilidade, atenção, contribuições e interesse no desenvolvimento das atividades deste projeto.

À professora Patrícia de Fátima Pereira Goulart, que despertou em mim o interesse pela biologia molecular, durante a graduação.

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

Ao amado professor Luciano Vilela Paiva, pela ajuda incondicional e pelo amor dedicado durante todos esses anos de convívio.

Aos colegas do Laboratório Central de Biologia Molecular (LCBM).

Aos seguintes laboratórios: Laboratório Central de Biologia Molecular, de Bioquímica, de Fisiologia Vegetal, pelo espaço físico e reagentes concedidos para a realização do experimento.

Ao Núcleo de Estrutura e Função de Biomoléculas (Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas) da Universidade Federal de Minas Gerais, em Belo Horizonte, MG, pela disponibilidade e ajuda nos seqüenciamentos das proteínas. Ao Agenor Valadares, por ter seqüenciado as proteínas; muito obrigada pela dedicação e boa vontade.

A toda a minha família, pelo incentivo, apoio e dedicação, que possibilitaram mais uma conquista.

E aos meus cães, Lili, Tayná, Pipoca, Manchinha, Charles, Barão e Invasora, que me ensinaram que brincar um pouco todos os dias faz bem e é necessário.

Ficam aqui registrados em papel meus sinceros agradecimentos, mas, muito mais importante, ficam guardadas, em um local muito especial, todas essas pessoas que marcaram de forma tão singular esta etapa de minha vida. Muito obrigada.

## SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	iii
1 INTRODUÇÃO .....	01
2 REFERENCIAL TEÓRICO .....	03
2.1 Café.....	03
2.2 Processamento do café .....	04
2.3 Secagem do café .....	06
2.4 Qualidade do café.....	09
2.4.1 Avaliação da qualidade de bebida do café.....	10
2.5 Composição química do café.....	11
2.5.1 Proteínas .....	12
2.6 Proteoma.....	14
2.6.1 Eletroforese Bidimensional.....	16
2.6.2 Métodos de visualização dos géis bidimensionais.....	18
2.7 Identificação de proteínas por espectrometria de massa.....	19
2.7.1 Identificação das proteínas <i>in silico</i> .....	20
2.7.2 Pesquisas desenvolvidas utilizando como ferramenta de análise a espectrometria de massa e identificação de proteínas <i>in silico</i> .....	21
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	23
3.1 Procedência da matéria-prima .....	23
3.2 Processamento do café e caracterização do processo de secagem.....	23
3.3 Extração de proteínas totais.....	24
3.4 Análise da integridade das proteínas.....	24
3.5 Eletroforese Bidimensional.....	25
3.6 Coloração dos géis bidimensionais.....	26



3.7 Análise dos géis Bidimensionais.....	26
3.8 Obtenção de peptídeos tripsinolisados do gel.....	27
3.9 Espectrometria de massa.....	27
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	29
4.1 Análise dos géis.....	29
4.2 Identificação das proteínas.....	43
5 CONCLUSÕES.....	51
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	52

## RESUMO

LIVRAMENTO, Kalyinka Gabriella. **Proteômica diferencial de café arábica submetido a diferentes processamentos e secagem** 2008. 67 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.<sup>1</sup>

A qualidade do café é fundamental nas relações comerciais e exerce enorme influência sobre o preço do produto. Além do genótipo e do meio ambiente, o processamento pós-colheita, assim como o método de secagem, contribui para a qualidade final da bebida. Hoje, sabe-se que a qualidade do café está fortemente relacionada aos eventos bioquímicos que ocorrem nas sementes durante os processos pós-colheita dos grãos. Por isso, inúmeras pesquisas vêm sendo desenvolvidas no intuito de correlacionar a composição química do grão de café e a qualidade da bebida. A recente introdução da tecnologia proteômica na análise e na pesquisa da qualidade de café inaugura uma nova era de caracterização e identificação molecular e, assim, determina um desenvolvimento diferencial nas áreas de caracterização de sabor, aroma e qualidade de frutos. Pelo exposto, este trabalho foi realizado com o objetivo de comparar o perfil das proteínas diferencialmente expressas em grãos de *C. arabica*, submetidos a quatro diferentes tratamentos: café despulpado, secos em terreiro e em secador a 60°C e café natural, submetidos às mesmas condições de secagem até atingir o teor de água de 11% (b.u). O trabalho foi conduzido no Laboratório Central de Biologia Molecular, da Universidade Federal de Lavras, em Lavras, MG e no Laboratório de Venenos e Toxinas Animais, da Universidade Federal de Minas Gerais, em Belo Horizonte, MG, Brasil. Para a análise proteômica, a eletroforese bidimensional foi conduzida pelo sistema MultiphorII (Amersham Bioscience). Os géis, corados com azul de Commassie G-250, foram analisados pelo programa ImageMaster 2D Platinum 5.0 (Amersham Bioscience). As proteínas com uma diferença de expressão de pelo menos 1,7X e um resultado significativo no teste T ( $p < 0,05$ ) foram excisadas e seqüenciadas por espectrometria de massa MALDI ToF/ToF. A temperatura de 60°C da secagem interferiu no perfil proteômico dos grãos, naturais e despulpados, reduzindo substancialmente a quantidade de pontos protéicos mais abundantes, quando comparados aos grãos secos em terreiro. A maioria dos pontos protéicos mais abundantes foi observada, de modo geral, no café despulpado. Os pontos protéicos 1256 e 1422 foram seqüenciados e mostraram

---

<sup>1</sup>Comitê orientador: Prof. Dr. José Donizeti Alves – DBI/UFLA (orientador)  
Prof. Dr. Luciano Vilela Paiva – DQI/UFLA e Prof. Dr. Anderson Cleiton José -  
UFT (co-orientadores)

alta similaridade com a globulina 11S e o gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, respectivamente. Os resultados desta pesquisa evidenciaram que a análise proteômica foi eficiente em diferenciar bioquimicamente os cafês submetidos a diferentes processos pós-colheita.

## ABSTRACT

LIVRAMENTO, Kalynka Gabriella. **Differential Proteomic of arabica coffee submitted to different processings and drying**. 2008. 67 p. Dissertation (Master in Plant Biotechnology) – Federal University of Lavras, Lavras, MG.<sup>2</sup>

Coffee quality is fundamental in the commercial relationships and exercises a huge influence upon the product price. In addition to the genotype and environment, the post-harvest processing as well as the drying method contributes to the final quality of the beverage. Today, it is known that coffee quality is strongly related to the biochemical events occurring inside the seeds during the post-harvest processes of beans. Therefore, a number of research works have been developed with the goal to correlating the chemical composition of coffee bean with beverage quality. The recent introduction of proteomic technology in the analysis and research of coffee quality gives rise to a new era of characterization and molecular identification and so, determine a differential development in the areas of characterization of flavor, aroma and berry quality. The objective of this work was to compare the profile of the proteins distinctly expressed in *C. arabica* grains submitted to four different treatments: pulped coffee, coffee dried on yard and in dryer at 60°C and natural coffee, submitted to the same drying conditions till they reach the water content of 11% (b.u). The work was conducted in the Central Laboratory of Molecular Biology of the Federal University of Lavras, at Lavras-MG and in the Laboratory of Animal Poisons and Toxins of the Federal University of Minas Gerais, in Belo Horizonte - MG, Brazil. For proteomic analysis, bi-dimensional electrophoresis was conducted by the MultiphorII system (Amersham Bioscience). The gels stained with Commassie Blue G-250 were analyzed by the ImageMaster 2D Platinum 5.0 program (Amersham Bioscience). The proteins with a expression difference of at least 1.7X and a significant result in T test ( $p < 0.05$ ) were excised and sequenced by MALDI ToF/ToF mass spectrometry. The temperature of 60°C of drying interfered in the proteomic profile of beans, both natural and pulped, reducing markedly the amount of most abundant protein points, as compared with yard-dried beans. Most of the most abundant protein points were observed, in a general way, in the pulped coffee, possibly by their shortest drying time comparatively to natural beans. Protein points 1256 and 1422 were sequenced and showed a high similarity with Globuline 11S and

---

<sup>2</sup>Guidance Committee: Prof. Dr. José Donizeti Alves – DBI/UFLA (Adviser)  
Prof. Dr. Luciano Vilela Paiva – DQI/UFLA and Prof. Dr. Anderson Cleiton José – UFT (Co-Advisers)

Gliceraldeído-3-phosphate dehydrogenase, respectively. The results of this study have shown that proteomics analysis was efficient in the cafes differentiate biochemically subjected to different post-harvest processes.

## 1 INTRODUÇÃO

Atualmente, o Brasil ocupa a posição de maior produtor e exportador de café do mundo, sendo responsável pela produção de 45 milhões de sacas. Isso equivale a um crescimento de 35% em relação à safra anterior. Desse total, 76% são representados pelo *Coffea arabica* L., ao qual é conferida a característica de fornecer a melhor qualidade de bebida. O estado de Minas Gerais é o maior produtor dessa espécie (65% da produção nacional), com um total de 1.748,85 mil hectares, representando 76,37% da área cultivada com café no país (Conab, 2008).

Associado ao aumento na produção, para poder suprir as necessidades do mercado externo, que a cada dia demonstra mais interesse pelos cafés especiais, o Brasil está adotando novas tecnologias de produção e beneficiamento, além de investir em pesquisas para aumentar a qualidade do produto nacional. Os cafés especiais são aqueles que apresentam sabor e aroma únicos, muito bem aceitos no mercado mundial. Isso é de extrema importância, uma vez que, entre os cafés considerados finos e os de pior qualidade, pode haver uma desvalorização no preço de até 40% (BSCA, 2005).

O termo qualidade do café pode ser definido como um conjunto de atributos físicos, químicos, sensoriais e de segurança que atendam aos gostos dos diversos tipos de consumidores. A qualidade da bebida do café pode ser atribuída a espécie, variedades cultivadas e fatores pré-colheita, pós-colheita e ambientais. Esses parâmetros podem alterar as substâncias que formam o sabor e o aroma da bebida.

Tendo em vista a variedade e a complexidade dos processos fisiológicos envolvidos na qualidade de bebida do café, são necessárias informações que possibilitem selecionar rotas metabólicas e moléculas que mais contribuam para as mudanças bioquímicas, de forma a conduzir estudos mais aprofundados, que

validem a significância desses mecanismos. Atualmente, as técnicas de biologia molecular podem oferecer ferramentas para a obtenção desse entendimento. Uma delas é o estudo do perfil completo de proteínas expressas pelo genoma de um organismo sob determinada condição fisiológica, chamada proteômica (Van Wijk, 2001).

A proteômica, por ser uma análise sistemática comparativa de proteínas funcionais, poderá ajudar a desvendar as razões que diferenciam a qualidade de bebida de café. Recentemente, a abordagem mais adequada para o estudo de proteomas é a eletroforese bidimensional (2DE), seguida da identificação e da caracterização das proteínas isoladas pelas técnicas de espectrometria de massa e bioinformática (Mann et al., 2001; Glish e Vachet, 2003).

A proposta do presente trabalho foi analisar grãos de *Coffea arabica* L. submetidos a diferentes condições de processamento e secagem. O objetivo foi identificar diferenças quantitativas das proteínas responsivas a esses diferentes tratamentos, no intuito de tentar responder o quanto esse processo pós-colheita interfere nas condições fisiológicas que determinam a qualidade de bebida do café.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Café

Pertencente à família das rubiáceas, o café foi trazido da Guiana Francesa para o Brasil no século XVIII. As primeiras lavouras se estabeleceram somente por volta de 1870, no Rio de Janeiro, no vale do Paraíba, em São Paulo e em Minas Gerais (ABIC, 2007).

Atualmente, o café é cultivado em várias regiões brasileiras (Minas Gerais, oeste de São Paulo, Espírito Santo, Paraná, Rondônia, Bahia, Acre e Mato Grosso, entre outros). Sua produção é responsável por 35% da produção mundial, sendo considerado o segundo produto brasileiro de maior exportação. Assim, o Brasil é o maior produtor e exportador do mundo. Esses dados refletem em ganhos gerados pela cafeicultura, que correspondem a 7 milhões de empregos diretos e indiretos e movimentação anual de cerca de R\$ 10 bilhões (Agriannual, 2008; ABIC, 2008).

Estatísticas prevêm que a produção nacional de café deverá ser de 45.544 mil sacas de 60 quilos de café em 2008, superior à safra passada em 35%. Desse montante, a produção do café arábica representa 76,19%, tendo como maior produtor o estado de Minas Gerais, com 65,89%. Isso totaliza uma área ocupada com *Coffea arabica* L. de 1.748,85 mil hectares, representando 76,37% da área cultivada com café no país (Conab, 2008).

Apesar desses dados animadores, como o café tem seu preço vinculado à sua qualidade e, principalmente, à qualidade sensorial. Ele ainda tem suas limitações quanto à exportação no Brasil, uma vez que os cafés produzidos na Colômbia, Jamaica, Costa Rica, Etiópia e Quênia apresentam parâmetros quantitativos melhores e ganham o mercado externo, que busca por cafés especiais (Carvalho et al, 1997).



O café especial apresenta uma ampla gama de conceitos quanto aos seus atributos de qualidade, que vão desde características físicas, como origens, variedades, cor e tamanho; sensoriais, como corpo e aroma, até preocupações de ordem ambiental e social, como os sistemas de produção e as condições da mão-de-obra sob as quais o café é produzido. De maneira geral, os cafés especiais são aqueles que apresentam sabor e aroma únicos, muito bem aceitos no mercado mundial (Souza et al, 2002).

Segundo Edgard Bressani, da Brazil Specialty Coffee Association (BSCA), o mercado interno absorve apenas 3% das vendas de cafés especiais, mas a demanda tem crescido, em média, 15% ao ano. Em sua opinião, embora o custo de produção seja até 20% mais alto, esse é um investimento que compensa, uma vez que o quilo de café especial pode custar cerca de 40% mais que o preço do café comum (BSCA, 2005).

Devido a isso, o Brasil tem investido em pesquisa e tecnologia no intuito de aprimorar os processos pós-colheita e, assim, adquirir cafés de melhor qualidade sensorial, facilitando a comercialização e conseguindo melhores retornos econômicos (Moss, 2006).

## **2.2 Processamento do café**

O processamento é um dos fatores primordiais para a obtenção de um café de qualidade, principalmente porque ele promove uma homogeneidade dos grãos, o que proporciona uma bebida de qualidade. Essa etapa pós-colheita é realizada conforme a condição econômica do produtor, da quantidade de sacas produzidas e do padrão de qualidade desejado (Wilbaux, 1963; Coradi 2007). Torna-se importante estabelecer, para o produtor, as condições ideais para a obtenção de um café com excelente qualidade de bebida, visto que muitos trabalhos associam o processamento à qualidade do café, como o de Selmar et al (2008).

O processamento do café pode ser realizado de formas distintas: mantendo-se o fruto com casca e mucilagem (café natural), processamento conhecido por via seca; removendo-se apenas a casca e parte da mucilagem (descascado); removendo-se a casca e a mucilagem mecanicamente (desmucilado) ou removendo-se a casca mecanicamente e a mucilagem por meio de fermentação biológica (despolpado), procedimentos esses conhecidos por via úmida (Bartholo & Guimarães, 1997; Borém et al., 2003; Borém, 2004).

O processo via seca originou-se na Etiópia e na África Central (Villela, 2002) e tem sido muito utilizado no Brasil, principalmente em regiões tropicais onde o clima é seco no período da colheita. Em geral, os cafés produzidos por via seca apresentam atributos sensoriais que os distinguem dos cafés produzidos por via úmida, como menor acidez e maior corpo (Tosello, 1957; Wilbaux, 1963; Vincent, 1987; Illy & Viani, 1995; Puerta-Quitero, 1996; Villela, 2002), sendo muito utilizado para compor as ligas de café expresso (Borém, 2008). Muitos autores alegam que constituintes químicos presentes na mucilagem difundem-se para o interior do grão, afetando o sabor e o aroma da bebida (Brando, 1999; Villela, 2002).

O processamento via úmida surgiu na Etiópia, por volta do ano de 1730 e, hoje, é muito utilizado nas regiões equatoriais com alto índice pluviométrico; no Brasil, vem se expandido a cada colheita (Torsello, 1957; Puerta-Quitero, 1996). É uma técnica que apresenta muitas vantagens em relação ao processamento via seca, entre elas, o menor volume processado, o menor tempo de secagem, a redução do consumo de energia, além de favorecer a obtenção de cafés de melhor qualidade e boas cotações no mercado internacional, mantendo características típicas de corpo, doçura e aroma (Bicudo, 1962; Brando, 1999; Villela, 2002; Silva, 2003; Borém, 2004). Devido a isso, diversos autores chegaram à conclusão de que cafés descascados, despolpados e desmucilados

apresentam características superiores de bebida em relação ao café natural (Teixeira et al, 1979; Villela, 2002; Malta et al, 2003).

### **2.3 Secagem do café**

A segunda etapa pós-colheita muito importante é a secagem. Segundo Borém (2004), o uso de técnicas adequadas na pós-colheita, principalmente uma secagem bem feita, proporciona ao café aroma e sabor de qualidade superior.

O café pode ser submetido a diferentes métodos de secagem: em terreiro, secagem mecânica (secador) ou a secagem combinada dos dois métodos citados. A escolha do método depende da infra-estrutura, das condições econômicas do produtor e das condições climáticas (Coradi, 2007).

A secagem em terreiro é ainda a mais utilizada, apresentando a desvantagem de colocar em risco a qualidade do produto final, caso as condições de clima não sejam favoráveis, facilitando a indesejável propagação de microorganismos fermentadores. Além disso, como a secagem em terreiro acontece de forma lenta, exige-se um tempo maior de exposição dos frutos aos raios solares, o que também induz à contaminação, a fermentações e à redução da qualidade sensorial da bebida (Giranda, 1998; Pimenta, 2001; Côrrea et al, 2002). Porém, Borém (2004) e Batista (2005) afirmam que a secagem em terreiro pode proporcionar cafés de boa qualidade sensorial e segurança microbiológica, desde que haja preocupação com a construção dos terreiros e com o monitoramento das técnicas de manejo corretas.

Em contrapartida, os secadores permitem evitar esses problemas, porém, apresentam um custo mais elevado para o produtor (Corrêa, 1982; Sivetz & Desrosier, 1979a; Souza, 2000; Renato, 2002). No Brasil, antes da década de 1960, praticamente todos os produtos agrícolas eram secos no próprio campo ou em terreiros (Tosello, 1946, 1957). Hoje, o processo de secagem artificial tem

sido mais empregado, porém, só é escolhido se o custo/benefício do mesmo for comprovado para o produtor.

Uma vantagem da secagem mecânica é que ela permite o controle da temperatura, influenciando a taxa e a eficiência da secagem, bem como a qualidade final do produto, evitando danos físicos aos grãos (Afonso Júnior, 2001; Oliveira, et al 2001; Ribeiro, 2003).

Ferraz & Veiga (1954) foram os primeiros a chamar atenção para a importância da relação temperatura de secagem do café com a qualidade de bebida. Desde então, muitas pesquisas têm sido realizadas no intuito de entender essa relação a fim de prevenir danos, descoloração do produto, redução do teor de amido, óleo e proteínas nos grãos, o que pode comprometer a qualidade sensorial da mesma (IBC, 1985; Guida & Vilela, 1996; Octaviani, 2000; Afonso Júnior, 2001; Oliveira et al., 2001; Ribeiro et al., 2003; Obando-Flor et al., 2004).

Teixeira et al (1979) relataram que temperaturas elevadas devem ser evitadas, apesar de acelerar o processo, porque resultam em defeitos que podem contribuir para a perda da qualidade do café. A partir disso, para se obter um café de boa qualidade e um produto de bebida suave, é necessário manter a temperatura de secagem ao redor de 45°C na massa de café (Souza, 2000; Borém, 2008).

De qualquer forma, a secagem deve ser iniciada imediatamente após a colheita, a fim de se eliminar rapidamente a umidade da casca, da polpa e da mucilagem, bem como evitar fermentações que possam prejudicar a qualidade do café (Cortez, 2001).

Hoje, existem poucos relatos na literatura que descrevem as alterações na composição química do café, decorrente do processo de secagem. As primeiras mudanças que afetam a qualidade dos grãos são atribuídas a vários processos bioquímicos, substâncias tóxicas e desnaturação de biomoléculas

(Basavarajappa et al., 1990). Amorim e Teixeira (1975) observaram que as transformações bioquímicas indesejáveis que ocorrem no grão de café durante e após a colheita, e que levam a formação de uma bebida inferior, são, principalmente, de natureza enzimática.

Segundo Hoekstra et al. (2001), durante a retirada da água, observa-se a redução do volume celular, provocando uma aglomeração dos componentes citoplasmáticos, aumentando, assim, as chances para as interações moleculares que podem causar a desnaturação de proteínas e fusão de membranas.

Algumas pesquisas têm mostrado variações no conteúdo de glicose e de frutose, bem como de aminoácidos livres nos grãos crus de café, dependendo da forma de processamento (Bytof et al.; 2000; Leloup et al., 2004; Selmar et al., 2004; Bytof et al., 2005; Selmar & Bytof., 2006; Selmar et al, 2008). Acredita-se que isso seja devido aos danos nas membranas celulares, permitindo que os componentes químicos, antes compartimentalizados, entrem em contato com enzimas hidrolíticas e oxidativas, afetando as características de cor, sabor e aroma da bebida (Amorim, 1978; Prete, 1992).

Apesar dos inúmeros eventos fisiológicos e bioquímicos que ocorrem no café durante a pós-colheita e que podem resultar nas características que distinguem cafés, a explicação tradicional para essas diferenças refere-se à ocorrência de fermentações indesejáveis, frequentemente associadas ao processamento por via seca, bem como à ausência de cuidados no momento da colheita e secagem do café natural. No entanto, tais afirmações não explicam as diferenças na qualidade de café quando os grãos são processados da mesma forma e com o mesmo cuidado. Na verdade, muitos eventos bioquímicos, fisiológicos, químicos podem resultar em cafés com as mais diferentes qualidades (Clifford & Ramirez-Martinez, 1991 a,b; Guimarães et al, 2002; Leloup et al, 2004; Mazzafera & Purcino, 2004).

Embora existam vários trabalhos encontrados na literatura, relatando alterações na qualidade do café submetido a diferentes condições de secagem, não há uma explicação satisfatória sobre como e por que essas alterações ocorrem. Conhecer essas alterações provocadas pela secagem torna-se importante na tentativa de minimizar as características indesejáveis.

## **2.4 Qualidade da bebida do café**

O termo qualidade pode ser conceituado como o conjunto de melhores características de um produto ou serviço para determinadas condições de consumo e utilização (Juran & Frank, 1980). No que diz respeito aos produtos e ou serviços vendidos no mercado, há várias definições para qualidade: "conformidade com as exigências dos clientes", "relação custo/benefício", etc. Enfim, qualidade é um conceito que está relacionado diretamente às percepções de cada indivíduo e, portanto, subjetivo.

No caso do café, a boa qualidade é aquela que apresenta bebida com sabor e aroma agradáveis, bom corpo, acidez natural e suavidade ao paladar (Borém, 2004). Ainda deve conter poucos defeitos, apresentar cor e aspecto homogêneos e estar de acordo com as normas higiênico-sanitárias (Sivetz & Desrosier, 1979b; Clifford, 1985; Mendonça, 2004).

A qualidade sensorial do café está relacionada com as características de aroma e sabor e está relacionada diretamente com a composição química dos grãos. Porém, a satisfação do consumidor é que determina qual é a qualidade desejável. Vale ressaltar que os consumidores de café vêm se tornando cada vez mais exigentes com relação à qualidade sensorial do produto, sendo crescente a exigência por cafés especiais (Saath, 2000).

Neste contexto, o Brasil, como maior produtor mundial de café vem se adequando às normas que abrangem a qualidade do café, inserindo-se no mercado nacional e ou internacional em termos de qualidade tecnológica, o que

proporciona, conseqüentemente, uma melhora significativa na qualidade sensorial da bebida (Leite, 1998).

#### **2.4.1 Avaliação da qualidade de bebida do café**

A classificação quanto à bebida é determinada segundo o sabor e o aroma que o café apresenta na análise sensorial, mais conhecida como “prova da xícara”. Essa prova surgiu no Brasil, no início do século XX e foi adotada pela Bolsa Oficial de Café e Mercadorias de Santos, a partir de 1917.

No Brasil, utilizam-se os seguintes termos para a classificação do café: estritamente mole – bebida de sabor suavíssimo e adocicado, sabor e aroma muito acentuado; mole – bebida de sabor suave, brando e adocicado; apenas mole – bebida de sabor levemente doce e suave, mas sem adstringência ou aspereza de paladar; dura – bebida de sabor acre, adstringente e áspero, porém, não apresenta paladares estranhos; riada – bebida com leve sabor iodofórmio; rio – bebida com sabor forte e desagradável, sabor típico e acentuado de iodofórmio e rio zona – bebida de sabor e odor intoleráveis ao paladar e ao olfato. Estas classificações são baseadas no Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade, para a classificação do café beneficiado grão cru, da Instrução Normativa nº 08, de 2003, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), que tem como objetivo definir as características sensoriais da bebida, além da avaliação das características físicas dos grãos, como tipo, cor, peneira.

Os procedimentos de avaliação são baseados em parâmetros subjetivos, pois dependem de sensações e das habilidades pessoais adquiridas com muitos anos de experiência (Chagas, 1994; Cortez, 1997). Assim, a complementação desses procedimentos em uso com a adoção de métodos físicos e químicos tornaria mais objetiva a determinação da qualidade do café (Prete, 1992).

Nesse intuito, muitas pesquisas vêm sendo conduzidas com o objetivo de determinar quais as alterações bioquímicas e por que elas diferem tanto a qualidade de bebida, além de buscar por marcadores moleculares que associam as características desejáveis de sabor e aroma da bebida.

## **2.5 Composição química do café**

Segundo Carvalho e Chalfoun (1985), a qualidade de bebida do café está associada a diversos fatores, dentre os quais se destacam a composição química dos grãos, determinada por fatores genéticos e ambientais, pelos processos pós-colheita e conservação do grão, no qual intervém a ação da umidade e da temperatura, propiciando infecções microbianas e fermentações indesejáveis; a torração e o preparo da infusão que modificam a constituição química do grão, modificação esta sempre relacionada à composição original do grão cru. Pesquisas têm sido feitas no intuito de caracterizar quimicamente o grão de café e correlacionar a composição química com a qualidade da bebida.

O grão de café apresenta, em sua constituição química, inúmeros componentes voláteis e não-voláteis, tais como ácidos, aldeídos, cetonas, açúcares, proteínas, aminoácidos, ácidos graxos, trigonelina, compostos fenólicos, cafeína, bem como enzimas, que agem sobre esses próprios constituintes (Clarke & Macrae, 1985; Franca et al., 2005a,b). Essa constituição poderá ser modificada durante os processos de pós-colheita, ou seja, dependerá muito das condições de processamento, secagem e armazenamento (Afonso Júnior, 2001; Afonso Júnior et al., 2004).

Leloup et al. (2004) relatam a causa das diferentes concentrações de compostos, entre eles açúcares e trigonelina, devido a degradações do longo período de secagem que os cafés naturais necessitam em relação aos cafés despulpados. Além disso, trabalhos têm demonstrado alterações na concentração de aminoácidos livres nos grãos de café, dependendo do processamento. Por



exemplo, o ácido  $\gamma$ -amino butírico (GABA) em via úmida, cuja concentração é bem menor que nos grãos processados por via seca (Selmar et al., 2004, Bytof, et al, 2005).

Contudo, verifica-se a complexidade em se relacionar qualidade da bebida com a composição química do grão de café (Prete, 1992). Dessa forma, surge a necessidade de novas linhas de pesquisas e de se utilizar diferentes métodos de análise capazes de selecionar rotas metabólicas e moléculas que mais contribuem para o sabor e o aroma da bebida. Entre essas, as proteínas merecem destaque por serem muito ricas em informação biológica: suas atividades específicas, estado de modificação, associação com outras biomoléculas e os níveis de expressão são essenciais para a descrição de sistemas biológicos (Aebersold, 2003).

### **2.5.1 Proteínas**

O estudo de proteínas não recebeu muita atenção, nas últimas décadas, devido à dificuldade e à complexidade das análises. A determinação da composição protéica requeria a hidrólise da proteína e a quantificação era feita apenas com os aminoácidos resultantes. Dessas análises, também era possível identificar e quantificar os aminoácidos. Essa análise ainda é importante porque os aminoácidos livres, embora representem somente 1% da composição química nos grãos crus, são componentes importantes responsáveis pelo sabor após a torração (Flament, 1991). Em adição a isso, Ludwig et al. (1995) mostraram que peptídeos e proteínas também são, provavelmente, precursores do aroma.

Dessa forma, a análise de proteínas pode se tornar a cada dia mais importante para o esclarecimento do sabor e do aroma da bebida do café, uma vez que elas são a fonte principal de aminoácidos e peptídeos, gerados durante a torra, tão requisitados para a reação de Maillard, reconhecida como essencial para o desenvolvimento do aroma da bebida de café (Macrae, 1985; Arnold et

*al*, 1994; Reineccius, 1995; Ludwig *et al*, 2000). Além disso, as proteínas participam na forma de enzimas, como catalisadores biológicos de inúmeras rotas metabólicas envolvidas na qualidade de bebida (Amorim, 1978).

Muitas pesquisas revelaram que a fração de proteína total ou bruta mostra valores na faixa de 13% para grãos de café (Sivetz, 1963). Para Bassoli (1992), os teores de proteínas em grãos de café podem situar-se na faixa de 9% a 16% e o mesmo teor foi encontrado por Pimenta (1995), quando comparou o teor de proteínas em diferentes estágios de maturação do fruto.

As primeiras informações a respeito das características estruturais das proteínas, presentes no grão cru de café, foram obtidas por eletroforese SDS-PAGE e pela focalização isoeletrica (Macrae, 1985).

Muitas das proteínas de grão cru de café foram caracterizadas e identificadas devido à sua natureza enzimática. Dentre essas estão polifenoxidase, fosfatase, malato desidrogenase, catalase,  $\alpha$  e  $\beta$ -galactosidase, entre outras enzimas hidrolíticas e oxidativas (Clarke & Macrae, 1985). A relação entre proteínas e aroma, em conjunto com esses resultados iniciais, foi o incentivo para a identificação e a caracterização de cada proteína presente no grão de café e suas análises comparativas entre grãos submetidos a diferentes processamentos pós-colheita.

O estudo de determinadas proteínas envolvidas com o tipo de processamento ao qual o grão foi submetido poderá ser relacionada com outros tipos de pesquisas, como, por exemplo, as pesquisas metabolômicas, como as desenvolvidas por Borém (2006b). Essa pesquisa detectou mais de 1.700 sinais diferentes de massa, usando cromatografia líquida com espectrometria de massa de alta precisão, ao analisar grãos submetidos a diferentes condições de processamento e secagem.

No entanto, uma melhor caracterização das proteínas poderá ser obtida pelo estudo proteômico (Wijk, 2001) usando a eletroforese bidimensional (Görg

et al., 2000) seguida da identificação e da caracterização das proteínas isoladas pelas técnicas de espectrometria de massa e bioinformática (Abbot, 1999; Cagney *et al.*, 2003).

## **2.6 Proteoma**

O termo "proteoma" foi utilizado pela primeira vez por Marc Wilkins, em 1994, na reunião inaugural da eletroforese bidimensional (2-D) em Sienna, Itália. E foi originalmente definido como conjunto de proteína provenientes do genoma. E o termo "Proteômica" foi definido como o estudo do proteoma (Wilkins et al., 1996). Desde então, muitas definições têm sido utilizadas, como o termo "proteoma", para referir-se à identificação sistemática do perfil protéico total do genoma (Blackstock & Weir, 1999; Lopez, 1999), ou seja, refere-se ao conjunto de proteínas que são expressas pelo genoma de um organismo ou tipo celular (Haynes & Yates, 2000). No entanto, esse termo pode também ser usado em um sentido menos universal, para se referir ao conjunto de proteínas que está sendo expresso num dado momento da vida da célula (Abbot, 1999).

Contrariamente ao genoma, que funciona como repositório estático da informação genética e cujo conteúdo não muda com o tempo, o proteoma é altamente dinâmico. Um único genoma pode gerar um número muito grande de proteomas, dependendo de variáveis como estágio do ciclo de crescimento, disponibilidade de nutrientes, temperatura, resposta a diferentes tratamentos, a estresse, condições patológicas e estados fisiológicos diversos (Cahill *et al.*, 2001). Contudo, o proteoma é diversificado e complexo e pode ser infinito (Huber, 2003).

A proteômica tem como objetivo estudar as propriedades das proteínas, seus níveis de expressão, suas funções, modificações pós-traducionais e interações, entre outras (Blackstock & Weir, 1999). Uma descrição completa do proteoma de um organismo fornece não apenas um catálogo do conjunto de

proteínas que está sendo expresso pelo genoma, mas também dados de expressão celular sob condições definidas e a distribuição dessas proteínas na célula (Cash, 1998). Portanto, o passo do genoma para o proteoma é um passo do nível da informação genética para a função celular.

As concentrações de proteínas que são alteradas em determinadas condições fisiológicas podem mostrar quais funções sofrem modificações (Jungblut, 2001). Um único gene pode codificar para uma ou mais proteínas e estas podem aparecer em vários pontos do gel bidimensional, devido às modificações pós-traducionais e pós-transcricionais (Wilkins et al, 1996), como fosforilação, metilação, acetilação e clivagem proteolítica, entre outras. Por esse motivo, a estrutura final e a função das diversas proteínas não podem ser definidas com base apenas nas seqüências nucleotídicas dos genes que as codificam (Cahil et al., 2001).

Dessa forma, a análise do proteoma torna-se importante em estudos de comparações da expressão gênica em diferentes estados fisiológicos de um organismo.

Existem várias formas de se analisar um perfil proteômico. A abordagem clássica é o estudo da expressão protéica global (*expression proteomics*), que envolve a criação de mapas quantitativos das proteínas expressas de extratos de células ou tecidos e, para tal, dois princípios são utilizados: o de separação e o de identificação (Jocelyn & Ilang, 2002). As duas técnicas de separação mais utilizadas são a eletroforese bidimensional e a cromatografia líquida multidimensional (Abbot, 1999; Cagney et al, 2003). Na eletroforese bidimensional, as proteínas são separadas por uma focalização isoeletrica (IEF) e, posteriormente, por massa molecular (O'Farrel, 1975). Essa estratégia resulta em uma alta resolução para separar proteínas de extrato protéico complexo (Joubert et al., 2000). Na cromatografia multidimensional, as proteínas são separadas pela utilização de cromatografia em várias colunas com

princípios de separação diferentes, sendo, geralmente, utilizada a cromatografia em colunas de troca iônica e cromatografia em colunas de fase reversa (Maynard et al., 2004). A espectrometria de massa permite a identificação de proteínas em pequenas concentrações por seqüenciamento (Mo & Karger, 2002) e os dados gerados são, então, comparados com os obtidos nos bancos genômicos, que favorecem a análise do proteoma, aliando espectrometria de massa com análise *in silico* do proteoma (Cagney et al., 2003).

Contudo, a análise proteômica é recente e utiliza tecnologias relativamente imaturas (Patterson and Aebersold, 2003) e ainda está em crescente desenvolvimento (Pardanani et al., 2002).

### **2.6.1 Eletroforese bidimensional**

Em 1975, O'Farrel e Klose descreveram pioneiramente a técnica de eletroforese bidimensional. Atualmente, é o modo mais utilizado para mapear o proteoma de um organismo (Lopez, 1999). Na eletroforese bidimensional, a primeira dimensão consiste em separar as proteínas de acordo com seu ponto isoelétrico (pI) por focalização isoelétrica (IEF) e a segunda dimensão as separa de acordo com sua massa molecular por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS, conhecida por SDS-PAGE (O'Farrel, 1975).

Alguns problemas que ocorriam quando a IEF era feita segundo O'Farrel foram resolvidos quando surgiram as tiras com gradiente de pH imobilizado (*Immobilised pH Gradients*, ou IPGs), nas quais um determinado gradiente de pH é imobilizado em uma matriz de poliacrilamida, o que permitiu melhor reprodutibilidade dos géis de isoeletrofocalização. Esta técnica foi aprimorada por Görg e, atualmente, é o método mais utilizado para a realização da primeira dimensão (Dunn & Görg, 2001).

Nesta técnica, todas as proteínas em uma amostra são separadas simultaneamente, fornecendo informações úteis sobre ponto isoelétrico, massa

molecular, expressão, abundância relativa e modificações pós-traducionais, verificadas pela alteração da mobilidade eletroforética (Pandey & Mann, 2000), se caracterizando como um método de separação muito eficiente. Sua precisão é tanta que variações em um único aminoácido podem resultar na mudança de posição de uma proteína em um gel bidimensional (Jungblut, 2001).

Embora cada *spot* não represente necessariamente uma proteína diferente neste mapa (proteínas fosforiladas e não fosforiladas aparecem como *spots* de pI diferente, assim como a glicosilação e outras modificações mudam consideravelmente o peso molecular dos polipeptídeos), a análise dos géis reflete a síntese de proteínas em cada tecido, nos diferentes estágios de desenvolvimento (Mullen et al., 1996).

Alguns fatores dificultam a análise proteômica. Diversos estudos demonstraram que apenas as proteínas mais abundantes da célula são identificadas por meio de eletroforese bidimensional. Proteínas responsáveis pela manutenção e reprodução celular representam, aproximadamente, 80% das proteínas de um determinado tecido ou organismo (Wilkins & Hochstrasser, 1996) e podem estar presentes em concentrações até 10.000 vezes superiores às proteínas de baixo número de cópias que, normalmente, realizam funções importantes na célula, como função enzimática, receptores e proteínas de transdução de sinal (Abbot, 1999). Outra limitação é a separação de proteínas grandes (com MM superior a 100kDa), proteínas extremamente ácidas ou básicas (pI<3,5 ou pI>9,5) e proteínas de membranas (Herbert et al., 2001; Shen & Smith, 2002).

Para contornar tais limitações, diversos procedimentos podem ser adotados, tais como o pré-fracionamento da amostra, a utilização de faixas estreitas de pH para realização da IEF, o fracionamento subcelular e ou a remoção das proteínas mais abundantes da amostra (Hancock et al., 2002).

### 2.6.2 Métodos de visualização dos géis bidimensionais

Há uma enorme variedade de métodos de coloração que podem ser utilizados para visualizar as proteínas separadas por meio de eletroforese bidimensional. Os métodos de visualização mais utilizados são: azul de Coomassie, nitrato de prata e marcação das proteínas por fluorescência.

O azul de Coomassie possui sensibilidade para detectar de 10 a 100ng de proteína sendo menos sensível que a coloração com prata, que detecta 0,2 ng, os métodos de fluorescência, que detectam cerca de 0,1 ng e o método de marcação radioativa, que detecta 0,001 ng (Patton, 2000).

Entretanto, a coloração com nitrato de prata apresenta certas desvantagens, como a falta de linearidade e o problema de gerar coloração negativa em regiões com altas concentrações de proteínas, devido à saturação (Dunn & Görg, 2001), além de ser incompatível com a análise por espectrometria de massa e gerar muitos resíduos (Yan et al., 2000). O azul de Coomassie é compatível com a análise espectrométrica, gera poucos resíduos, tem boa reprodutibilidade, porém, não permite a análise de amostras de quantidades limitadas (Candiano et al., 2004). A coloração por fluorescência é, atualmente, a melhor alternativa, devido à sua alta sensibilidade e linearidade, além de ser totalmente compatível com espectrometria de massa (Patton, 2002; Köpke, 2003).

Adicionalmente, as proteínas podem ser detectadas por meio de técnicas de auto-radiografia. Para isso, é necessário que a amostra seja constituída de proteínas marcadas radioativamente *in vivo*, utilizando, por exemplo, os isótopos  $^{35}\text{S}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^3\text{H}$ , ou, no caso de fosfoproteínas, o  $^{32}\text{P}$  (Wilkins & Hochstrasser, 1996).

## 2.7 Identificação de proteínas por espectrometria de massa

Em 2002, John B. Feen e Koichi Tanaka receberam o prêmio Nobel em química pelo aprimoramento das técnicas de ionização brandas utilizadas em ionização por eletrospray (ESI) e ionização por remoção a laser assistida por matriz (MALDI), respectivamente. Os trabalhos deles na espectrometria de massa (MS) foram essenciais para a complementação da análise proteômica porque possibilitaram identificar rapidamente um grande número de proteínas. Atualmente, MALDI e ESI são as tecnologias utilizadas para ionização das proteínas e sua subsequente identificação é considerada branda pela sua capacidade de gerar íons a partir de macromoléculas não voláteis, sem ou com pouca fragmentação da molécula analisada. (Köpke, 2003). O equipamento MALDI, acoplado a um analisador de massas tipo tempo de voo (TOF), é, normalmente, utilizado para a realização da impressão digital de peptídeos (PMF) de proteínas e outras moléculas (Aebersold & Goodlet, 2001).

A espectrometria de massa determina a massa molecular de peptídeos ionizados, obtidos após digestão da proteína com tripsina. A tripsina, normalmente utilizada para a digestão das proteínas, faz clivagem específica C-terminal adjacente aos resíduos de arginina e lisina, gerando um conjunto de peptídeos únicos, cujas massas são determinadas por espectrometria de massa (Shevchenko et al., 1996; Cagney *et al.*, 2003) e que podem ser considerados como impressão digital daquela molécula (Quadroni & James, 2001).

O espectrômetro de massa é um instrumento analítico que converte componentes de amostras em íons gasosos (moléculas eletricamente carregadas) e mensura a sua massa. O espectrômetro de massa é sensível a pequenas quantidades de analito (na ordem de pmol/L) e pode distinguir substâncias diferentes com o mesmo tempo de retenção. Por meio da espectrometria de massa, é possível também determinar seqüências de DNA, de ácidos nucleicos,



de aminoácidos em proteínas e de estruturas complexas de carboidratos (Westermeier & Naven, 2004).

Os íons tripticos são separados com base na razão massa/carga ( $m/z$ ). Em geral, na fonte de íons de um espectrômetro de massa ocorre a formação ou a dessorção de íons. Moléculas neutras são convertidas em íons por meio da ionização por elétrons ou por ionização química. Após a ionização, um setor magnético separa os íons gasosos, acelerando-os por campo elétrico e defletindo-os com valores diferentes de razão  $m/z$  em trajetórias distintas. Os íons, então, ao término da trajetória são detectados por um multiplicador de elétrons, que funciona de forma semelhante a uma fotomultiplicadora em um espectrofotômetro. O espectro de massa obtido é um gráfico da resposta do detector contra valores de  $m/z$ . Na maioria das vezes, a técnica MALDI, método que produz vaporização e ionização de macromoléculas biológicas não-voláteis de uma fase de estado sólido diretamente em fase gasosa, é utilizada com espectrômetros de massa de tempo de vôo, podendo medir valores de  $m/z$  até  $10^6$ , com poder de resolução  $10^3$ - $10^4$  e a exatidão na massa pode ser de 0,005% a 0,05% (Westermeier & Naven, 2004; Cravatt et al., 2007).

### **2.7.1 Identificação das proteínas *in silico***

A identificação de uma proteína pelos valores das massas moleculares de seus peptídeos é realizada por comparação *in silico* em banco de dados disponíveis.

A impressão digital da proteína provê uma identificação virtual da seqüência de interesse pela comparação dos valores de massas dos fragmentos obtidos experimentalmente após a digestão triptica com fragmentos virtuais obtidos de uma simulação de hidrólise triptica de proteínas de um banco de dados, considerando os seguintes aspectos: 1) a combinação das seqüências de proteínas em um banco de dados possui um valor (score) e são “ranqueadas” de

acordo com o número de combinações de massas de peptídeos, a acurácia das massas e o tamanho da proteína; 2) se há uma identificação a massa da seqüência peptídica é correlacionada à seqüência protéica do banco e 3) geralmente, um grande número de peptídeos com alta acurácia de massa é encontrado, este resultado pode significar em um alto escore (ou seja, alta similaridade) e alta cobertura da seqüência protéica (Cravatt et al., 2007).

O programa MASCOT faz alinhamentos de espectros de massa de peptídeos ou proteínas obtidos experimentalmente com os deduzidos *in silico* a partir do genoma ou banco de proteínas. Os dados obtidos também podem ser analisados utilizando-se outros programas, tais como PepTident, ProFound, Ms-Fit, MultiIdent, TagIdent, ou CombSearch.

Quando se tem banco de dados não consolidados os quais apresentam erros, estes podem afetar toda a análise proteômica, pois uma diferença de apenas um aminoácido em um único peptídeo pode acarretar em um erro de centenas de daltons, o que, em análise de espectrometria de massa, não é aceitável. Os maiores erros permitidos nas análises de proteômica estão na ordem de 1 Da. Os escores são fornecidos pelo programa por meio do cálculo de probabilidade baseada no modelo estatístico *Mowse Score*, sendo que a combinação observada dos dados é um evento aleatório (Perkins et al., 1999).

### **2.7.2 Pesquisas desenvolvidas utilizando como ferramenta de análise a espectrometria de massa e a identificação de proteínas *in silico***

Em pesquisa, como a desenvolvida por Guimarães (2007), utilizou-se a identificação por espectrometria de massa por MALDI ToF-ToF, seguida pela identificação *in silico* das proteínas pelo programa MASCOT. Nesse estudo, foram identificadas proteínas responsivas, em clones de *Coffea canephora*, sensíveis e resistentes ao estresse hídrico. Em outro trabalho usando a mesma

abradagem, Koshino et al. (2007) analisaram embriões zigóticos e endosperma de *Coffea arabica*. Após eletroforese bidimensional, nos embriões zigóticos, algumas proteínas mais abundantes foram seqüenciadas e identificadas como sendo proteínas da família Globulina 11S. Estas proteínas também foram diferencialmente expressas no endosperma, bem como uma proteína alergênica.

Gil-Agustini et al. (2005), utilizando essas técnicas, propôs, em seus estudos, o mapeamento protéico bidimensional para a classificação de espécies de cafés. Seus resultados identificaram e caracterizaram proteínas diferencialmente expressas em duas diferentes espécies, *C.arabica* e *C. canephora*. Esse estudo demonstra a amplitude de possibilidades dessas ferramentas, incluindo-as como valiosas ferramentas para o controle de qualidade de produtos alimentícios.

Pesquisas mais recentes demonstram que essas ferramentas de análise possibilitam uma nova forma de análise das proteínas presentes em grãos de café, a denominada Imagens por espectrometria de massa (IMS). Essa tem sido muito utilizada no mapeamento espacial de moléculas em amostras de tecido. Silva et al. (2007) detectaram a distribuição espacial de macromoléculas durante os diferentes estágios de desenvolvimento dos frutos de café e identificaram uma proteína diferencialmente expressa e com prováveis modificações pós-traducionais em certas regiões do endosperma.

## **3 MATERIAL E MÉTODOS**

### **3.1 Procedência da matéria-prima**

As amostras de café (*Coffea arabica* L.) foram fornecidas pela fazenda Bom Jardim, de Josué Pereira de Figueiredo, localizada no município de Bom Sucesso, MG, a 1.100m de altitude, sendo o café da variedade Topázio.

### **3.2 Processamento do café e caracterização do processo de secagem**

Os grãos de café utilizados neste trabalho foram colhidos, processados e secos em 2005 por Coradi (2006).

O café foi colhido manualmente e de forma seletiva. Toda a matéria-prima foi uniformizada por meio da separação hidráulica, removendo-se os grãos de menor densidade. Posteriormente, os frutos imaturos e sobre maduros ainda presentes após o lavador foram removidos manualmente.

Cerca de 300 litros de café cereja foram subdivididos em duas parcelas. A primeira, denominada de café natural, foi levada diretamente para o terreiro onde foram subdivididas em duas sub-parcelas. Uma delas permaneceu no terreiro até secagem a 11% (b.u.) e a outra sofreu uma pré-secagem por dois dias, após o que, foi levada para o secador a temperatura de 60°C até a umidade de 11%. A segunda parcela dos frutos cereja foi despulpada e submetida aos mesmos procedimentos citados anteriormente. A única diferença foi o período de pré-secagem de apenas um dia.

O experimento foi constituído por fatorial 2 x 2, sendo dois tipos de processamento (natural e despulpado) e dois tipos de secagem (terreiro e secador), com três repetições constituindo as quatro amostras, a saber: café

natural seco em terreiro, café natural seco em secador, café despulpado seco em terreiro e café despulpado seco em secador.

### **3.3 Extração de proteínas totais**

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

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

### **3.4 Análise da integridade das proteínas**

Foram escolhidas, aleatoriamente, dez amostras de proteínas totais extraídas para visualização em gel de poliacrilamida 12% (m/v), a fim de observar a integridade das mesmas e a eficiência do método de extração. A

separação das proteínas ocorreu por eletroforese, realizada pelo sistema MiniVE (Amersham Bioscience), a 100V, 400mA e 50W, durante, aproximadamente, 1hora e 40minutos.

### **3.5 Eletroforese bidimensional**

A análise bidimensional das proteínas foi realizada no Laboratório Central de Biologia Molecular da Universidade Federal de Lavras, em Lavras, MG. Proteínas foram separadas por focalização isoeétrica (IEF), utilizando-se 18 cm de fita com pH imobilizado, entre 3-10 (Immobiline Drystrips - Amersham Biosciences). As fitas para IEF foram reidratadas no suporte de reidratação individual em canaletas (Reswelling Tray Amersham Bioscience), por 15 horas, à temperatura ambiente, em tampão tiuréia/uréia, contendo 7M uréia, 2M de tiuréia, 1% (v/v) IPG Buffer (Amersham Bioscience), 2% CHAPS (p/v), 1,8mM DDT e azul de bromofenol. O volume final de 340µl de tampão mais 230µg de proteína foram aplicados nas canaletas. Após posicionar as fitas nas canaletas, 2,0 ml de *Cover Fluid* (Amersham Bioscience) foram aplicados sobre cada fita. A focalização isoeétrica ocorreu a 15°C, a 150V, por 1 minuto; 150V, por 3 horas; 500V, por 3 horas; 3.500V por 5 horas e 3.500 V, por 12 horas, acumulando um total de 55 kVh. Ao final da focalização isoeétrica, as fitas foram armazenadas em tubos de vidro autoclavados, a -80C, até o início da eletroforese de segunda dimensão.

Antes da eletroforese de segunda dimensão, as fitas foram equilibradas em uma solução contendo 6M uréia, 29% (v/v) glicerol, 2% (p/v) SDS, 75mM Tris-HCl 1,5M, pH8,8, 0,002% (p/v) azul de bromofenol 1%, com 65mM DTT (primeiro passo) e com 0,2M iodoacetamida (segundo passo - sem DTT), por 30 minutos cada passo, sob agitação. Cada fita equilibrada foi colocada sobre o gel de poliacrilamida 12,5% homogêneo (Amesham Biscience), ao lado do tampão

sólido (Buffer Strip – Amersham Bioscience), na extremidade negativa da cuba, uma de cada vez. A eletroforese de segunda dimensão ocorreu a 15°C, a 600V, 20mA, 30W, por 35 minutos e a 600V, 50mA, 30W por 1 hora e 40 minutos ou até o marcador de corrida atingir o tampão sólido na extremidade positiva, pelo Sistema Multiphor II (Amersham Bioscience).

### **3.6 Coloração dos géis bidimensionais**

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

### **3.7 Análise dos géis bidimensionais**

Os géis corados tiveram suas imagens digitalizadas em scanner de alta resolução (ImageScanner, Amersham Bioscience), equipado com o programa Ulmax MagicScan 4.6, em modo transmissivo, com 300dpi. As análises das imagens foram feitas pelo programa ImageMaster 2D Platinum 5.0 (Amersham Bioscience). Para a detecção dos *spots*, os géis foram aliados e agrupados e, então, a determinação quantitativa dos volumes de cada *spot* foi realizada. Após esse procedimento, foram feitas as análises dos grupos, classes e teste estatístico (Teste T de Student). *Spots* com uma diferença de, pelo menos, 1,7X e um

resultado significativo no teste T de Student ( $p < 0,05$ ) foram considerados como um ponto de proteína sendo diferencialmente expressa.

### **3.8 Obtenção de peptídeos tripsinolisados do gel**

Após a corrida eletroforética, a banda corada pelo método coloidal, amostra reduzida e alquilada, foi excisada com auxílio de lâmina de bisturi nº 15 individualmente do gel, descorada com acetonitrila 50% e bicarbonato de amônio 25mM pH 8,0, desidratada com acetonitrila 100%, seca em *speed vac* e, posteriormente, tratada com a enzima tripsina (Promega<sup>®</sup>), a 37°C, de 16 a 24 horas. Os peptídeos resultantes da tripsinólise da amostra foram dessalinizados por meio de micropurificação em ZiTips<sup>®</sup> C18 (Millipore-Bedford, EUA), seguindo recomendações dos fabricantes e, posteriormente, analisados por espectrometria de massa.

### **3.9 Espectrometria de massa**

As análises espectrométricas foram realizadas pelo no Núcleo de Estrutura e Função de Biomoléculas (Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas) da Universidade Federal de Minas Gerais, em Belo Horizonte, MG. Para tanto, foi utilizado o espectrômetro de massa sistema MALDI-TOF-TOF MS (Autoflex III Smartbeam, Bruker Daltonics, Alemanha). A análise foi realizada com a aplicação de 0,5 µL de amostra e 0,5µL de matriz CHCA (ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico), em uma placa MTP *AnchorChip* 800/384.

Os espectros de espectrometria de massa (MS) e espectrometria de massa em *tandem* (MS/MS) foram obtidos no modo positivo. O modo de operação da aquisição foi *Linear*; *Laser repetition rate*, a 50 Hz; *Ion source*



*voltage 1*, a 20 kV; *Ion source voltage 2*, a 18,3 kV; *Ion source lens voltage* 6,75 kV e *number of shots* de 200. Para a fragmentação de peptídeos tripsinolisados no *Peptide Mass Fingerprinting* (PMF), foi empregado o método *Collision induced dissociation* (CID) (N<sub>2</sub>).

Os resultados da espectrometria foram obtidos na forma da razão massa/carga para cada amostra, utilizando-se o programa FlexControl 3.0. As análises dos conjuntos de dados adquiridos foram feitas com o auxílio dos programas FlexAnalysis 3.0 e Biotools 3.0 (conjunto de ferramentas de análise de espectros de massas, como, por exemplo, o programa MASCOT). O aparelho foi calibrado com padrões externos (*Protein Calibration Standard I e IV* - Bruker Daltonics).

O perfil de massa molecular da amostra obtida por MS e MS/MS foi submetido à análise comparativa utilizando-se o programa MASCOT, para a comparação das massas de peptídeos observados com um banco de dados e para a identificação das proteínas mais prováveis. Os bancos de dados utilizados nas análises foi o do Genoma Café e o do NCBI.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Análise dos géis

O método de extração, utilizando o tampão uréia/tiuréia, foi eficiente na extração de proteínas, com uma concentração final média de 15,3 mg/mL de proteína total. Nos géis bidimensionais foi observado um grande número de pontos individualizados de proteínas (*spots*), sem arrastes horizontais ou verticais, o que revela a ausência ou a baixa quantidade de interferentes como lipídeos e carboidratos (Amersham Bioscience, 2004). A reprodutibilidade experimental foi alcançada, o que dispensou estudos preliminares envolvendo métodos de extração, como preconizado por Guimarães (2007).

O gel correspondente ao café despolpado seco em terreiro (Figura 1B) foi o que mais apresentou pontos de proteína, 360 *spots* em média, seguido do gel referente ao café natural seco em terreiro (Figura 1D), com 252 *spots*, em média. Os géis de café despolpado seco em secador a 60°C (Figura 1A) foi o que apresentou o menor número de pontos protéicos, com média de 190 *spots*, seguido do gel referente ao café natural (Figura 1C), nas mesmas condições de secagem, com média de 210 *spots*.

O menor número de pontos protéicos nos extratos de grãos secos em secador, provavelmente, se deve à temperatura de secagem, que pode ter sido suficiente para provocar uma degradação/desnaturação de algumas proteínas ou para facilitar a atividade enzimática das proteases, causando, claramente, uma diferença nos perfis proteômicos observados (Figura 1).

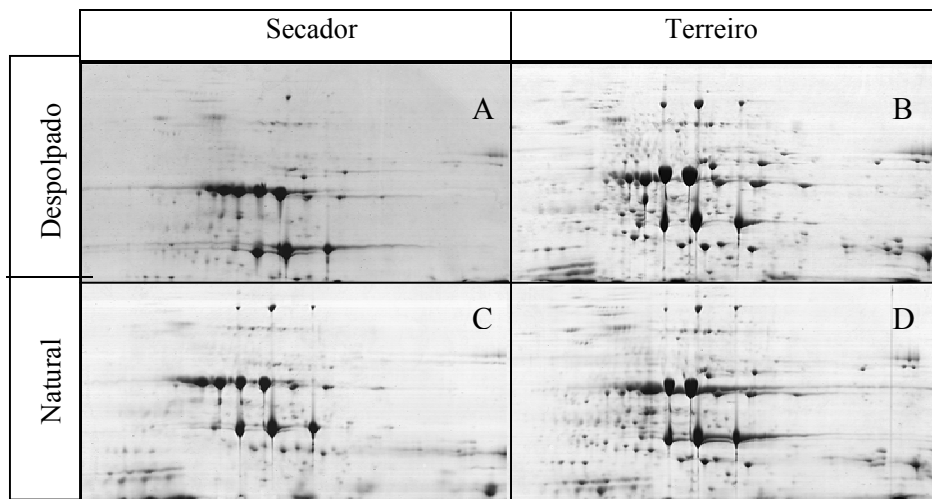


FIGURA 1. Géis bidimensionais dos tratamentos com café despolpado secos em secador (A) e em terreiro (B) e com café natural seco em secador (C) e em terreiro (D).

Resultados dos primeiros estudos realizados por Ferraz & Veiga (1954) revelaram que as temperaturas empregadas durante a secagem influenciam a qualidade da bebida, sendo que temperaturas de 50-55°C já podem prejudicar a qualidade. Seguindo essa mesma linha de pesquisa, Coradi (2006) verificou que as bebidas provenientes dos grãos, naturais e despolpados, secados em terreiro, obtiveram as melhores notas de análise sensorial, quando comparadas às provenientes dos grãos, naturais ou despolpados, secados em secador a temperatura de 60°C. Nesse mesmo trabalho, o café despolpado, quando comparado ao natural, apresentou um melhor sabor e aroma de bebida.

Sugere-se que tanto a presença de diferentes proteínas quanto as variações na quantidade total de proteínas podem estar relacionadas com a maior ou menor qualidade da bebida, em função do processamento e secagem, como relatado por Coradi (2006). Neste caso, a presença de maior quantidade e variedade de proteínas, como no caso dos cafés despolpados e naturais secos em

terreiro, tendem a oferecer grupos aminos peptídeos ou aminoácido livres que em conjunto com os açúcares redutores nos grãos podem participar da Reação de Maillard, responsável pelo sabor e aroma da bebida após a torração do café (Reineccius, 1995).

Neste trabalho, a maioria das proteínas foi focalizadas entre pI 5-7, aproximadamente. E grande parte das proteínas que apresentaram expressão diferencial tem massa molecular entre 20 e 95 kDa (Figura 2).

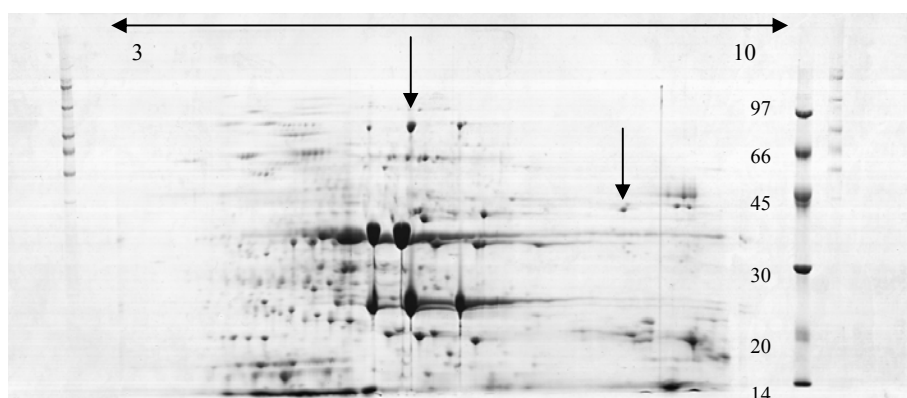


FIGURA 2. Gel bidimensional mostrando a referência do gradiente de pH utilizado nas tiras de IEF e as massas moleculares do marcador de peso. As setas indicam, da esquerda pra direita, os *spots* 1256 e 1422.

Na primeira análise comparativa, foram analisados os cafés despulpados secos no secador e no terreiro. Após o alinhamento (sobreposição) dos géis, aproximadamente 70% dos *spots* formaram grupos e a partir da análise por porcentagem de volume (% Vol – média do volume ocupado por cada *spot* no gel), foi possível a identificação de 18 pontos de proteínas com abundância diferencial variando de 1,7X a 14,0X (Tabela 1 e Figura 3). No tratamento com café despulpado seco em terreiro, de todos os *spots*, 16 apresentaram maior

abundância protéica em relação aos géis referentes ao tratamento com café despulpado seco no secador (Tabela 1).

**TABELA 1:** Média da abundância (% Vol) das proteínas responsivas aos tratamentos, com aumento quantitativo de, pelo menos, 1,7 vezes e um resultado significativo no teste t-student ( $p < 0,05$ ).

<i>Spots</i>	Despolpado		Diferença quantitativa de proteínas
	Secador	Terreiro	
<b>1256</b>	0,49 (0,15)	+ 1,76 (0,39)	<b>3,6X</b>
<b>1260</b>	0,04 (0,01)	+ 0,55 (0,22)	<b>14,0X</b>
<b>1261</b>	0,05 (0,02)	+ 0,63 (0,013)	<b>12,0X</b>
<b>1312</b>	0,32 (0,02)	+ 0,64 (0,15)	<b>2,0X</b>
<b>1367</b>	0,03 (0,01)	+ 0,06 (0,006)	<b>2,0X</b>
<b>1388</b>	0,12 (0,01)	+ 0,33 (0,03)	<b>2,7X</b>
<b>1417</b>	0,13 (0,04)	+ 0,23 (0,05)	<b>1,8X</b>
<b>1418</b>	0,64 (0,33)	+ 1,20 (0,19)	<b>1,8X</b>
<b>1422</b>	0,11 (0,05)	+ 0,34 (0,06)	<b>3,0X</b>
<b>1469</b>	0,29 (0,02)	+ 1,16 (0,12)	<b>4,0X</b>
<b>1505</b>	0,09 (0,04)	+ 0,29 (0,04)	<b>3,0X</b>
<b>1510</b>	+ 0,76 (0,09)	0,15 (0,06)	<b>5,0X</b>
<b>1529</b>	0,09 (0,02)	+ 0,16 (0,03)	<b>1,8X</b>
<b>1601</b>	+ 0,32 (0,06)	0,15 (0,03)	<b>2,0X</b>
<b>1602</b>	0,24 (0,06)	+ 0,40 (0,02)	<b>1,7X</b>
<b>1603</b>	0,36 (0,07)	+ 0,88 (0,05)	<b>2,5X</b>
<b>1625</b>	0,95 (0,23)	+ 1,80 (0,28)	<b>2,0X</b>
<b>1632</b>	0,60 (0,20)	+ 1,0 (0,07)	<b>1,7X</b>

Os valores representam as médias da porcentagem de volume das proteínas, em três repetições, dos géis de grãos despolpados secos em secador e terreiro. O valor entre parênteses equivale ao erro padrão. *Spots* referentes à Figura 3. Ver Tabela 5 para a identificação das proteínas.

Os *spots* que mais se destacaram quantitativamente, na comparação destes perfis protéicos, foram os pontos 1261 e 1260, que tiveram uma

quantidade de proteína aumentada em 12,0 X e 14,0 X, respectivamente, no tratamento com café despulpado seco em terreiro.

Ferraz & Veiga (1954) já haviam alertado a respeito da importância da temperatura de secagem sobre os grãos. O controle da temperatura de secagem é muito importante para evitar danos internos no grão, uma vez que altas temperaturas degradam as membranas internas e expõem óleos e outros componentes à ação do oxigênio (Borém, 2006a).

Levando em conta essa afirmação, é possível que os grãos analisados tenham tido sua estrutura comprometida, liberando compostos capazes de provocar a degradação de proteínas ou de reduzir sua expressão gênica durante o processo de secagem. Além disso, é possível inferir que a temperatura de 60°C pode ter contribuído para a atividade das proteases.

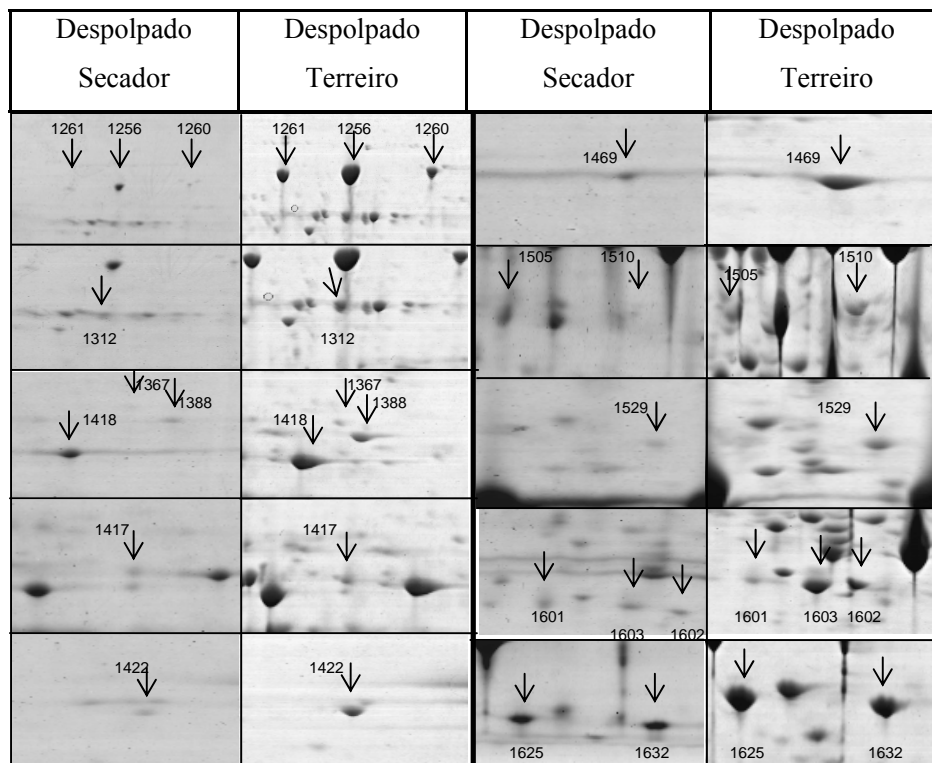


FIGURA 3. Detalhes comparativos de partes dos géis bidimensionais dos tratamentos com grãos despoldados secos em secador e em terreiro, representando os 18 *spots* com diferença de abundância protéica.

Esses resultados, adicionalmente com o número total de *spots* encontrados nos géis bidimensionais já apresentados, mostram que existem diferenças significativas no número e na abundância das proteínas encontradas. Particularmente, nessa primeira comparação, a temperatura de 60°C influenciou diretamente no perfil protéico dos grãos durante a secagem (Figura 1A).

A segunda análise comparativa envolveu o café despoldado e natural seco em terreiro. Foi essa análise que apresentou melhor pareamento, com 83% dos *spots* formando grupos alinhados e poucas diferenças foram encontradas.



Após a comparação dos *spots* por porcentagem de volume (% Vol), apenas 5 apresentaram diferença quantitativa, variando de 2X a 4X (Tabela 2 e Figura 4).

**TABELA 2:** Média da abundância (% Vol) das proteínas responsivas aos tratamentos, com aumento quantitativo de, pelo menos, 2,0 vezes e um resultado significativo no teste t-student ( $p < 0,05$ ).

<i>Spots</i>	Despolpado	Natural	Diferença quantitativa de proteínas
	Terreiro		
<b>1261</b>	+ 0,63 (0,13)	0,24(0,04)	<b>3,0X</b>
<b>1449</b>	0,14 (0,03)	+ 0,60 (0,20)	<b>4,0X</b>
<b>1487</b>	+ 0,15 (0,03)	0,07 (0,01)	<b>2,0X</b>
<b>1510</b>	0,15 (0,06)	+ 0,30 (0,08)	<b>2,0X</b>
<b>1603</b>	+ 0,89 (0,06)	0,50 (0,22)	<b>2,0X</b>

Os valores representam as médias da porcentagem de volume das proteínas, em três repetições, dos géis de grãos secos em terreiro despolpados e naturais. O valor entre parênteses equivale ao erro padrão. *Spots* referentes à Figura 4. Ver Tabela 5 para a identificação das proteínas.

Dos cinco *spots*, três (1261, 1487 e 1603) apresentaram maior abundância no gel bidimensional do café despolpado seco em terreiro. Os demais foram mais abundantes nos géis bidimensionais do café natural seco em terreiro.

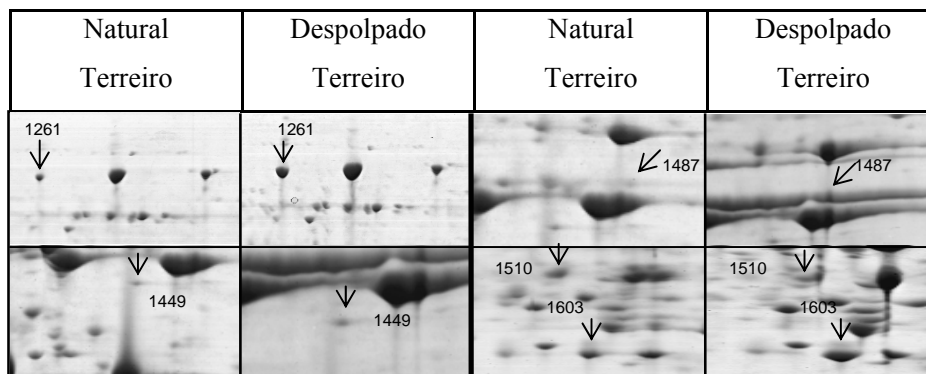


FIGURA 4. Detalhes comparativos de partes dos géis bidimensionais dos tratamentos com grãos despolpados e naturais secos em terreiro, representando os 05 *spots* com diferença de abundância protéica.

Esse resultado demonstra que a secagem do café natural ou despolpado, em terreiro, não provoca alterações tão significativas relacionadas à quantidade e à abundância das proteínas (Figura 1B e D), quando analisado juntamente com as demais comparações realizadas neste trabalho.

A terceira análise comparativa ocorreu entre os cafés despolpado e natural secos em secador. Diferenças significativas na porcentagem de volume (% Vol) das proteínas foram observadas em 15 *spots* (Tabela 3 e Figura 5), com variações entre 1,8X e 6,9X, tendo dez *spots* mais abundantes nos géis do café despolpado.

Dos dois grupos formados, os *spots* 1314, 1418, 1424, 1442, 1456, 1477, 1551, 1574, 1603 e 1630 apresentaram maior abundância nos géis representantes do café despolpado seco em secador. Quantitativamente, o *spot* 1424 foi o que mais se destacou, com um aumento de 4,0X (Tabela 3).

Os demais *spots*, 1256, 1260, 1261, 1302 e 1572, apresentaram maior abundância nos géis bidimensionais dos grãos naturais secos em secador, tendo o *spot* 1260 apresentado uma diferença protéica de 6,9X (Tabela 3).

**TABELA 3:** Média da abundância (%Vol) das proteínas responsivas aos tratamentos, com aumento quantitativo de, pelo menos, 1,8X e um resultado significativo no teste t-student ( $p < 0,05$ ).

<i>Spots</i>	Despolpado	Natural	Diferença quantitativa de proteínas
	Secador		
<b>1256</b>	0,49 (0,15)	+ 1,20 (0,01)	<b>2,5X</b>
<b>1260</b>	0,039 (0,01)	+ 0,27 (0,34)	<b>6,9X</b>
<b>1261</b>	0,05 (0,02)	+ 0,21 (0,16)	<b>4,0X</b>
<b>1302</b>	0,15 (0,07)	+ 0,30 (0,11)	<b>1,8X</b>
<b>1314</b>	+ 0,32 (0,04)	0,16 (0,01)	<b>2,0X</b>
<b>1418</b>	+ 0,65 (0,33)	0,18 (0,01)	<b>3,0X</b>
<b>1424</b>	+ 0,80 (0,2)	0,18 (0,01)	<b>4,0X</b>
<b>1442</b>	+ 2,0 (0,63)	1,11 (0,01)	<b>1,8X</b>
<b>1456</b>	+ 0,90 (0,05)	0,48 (0,08)	<b>1,8X</b>
<b>1477</b>	+ 0,77 (0,09)	0,44 (0,01)	<b>1,8X</b>
<b>1551</b>	+ 0,24 (0,06)	0,08 (0,04)	<b>3,0X</b>
<b>1572</b>	0,08 (0,06)	+ 0,37 (0,01)	<b>5,0X</b>
<b>1574</b>	+ 0,34 (0,02)	0,16 (0,16)	<b>2,0X</b>
<b>1603</b>	+ 0,36 (0,07)	0,12 (0,01)	<b>3,0X</b>
<b>1630</b>	+ 0,35 (0,08)	0,18 (0,01)	<b>2,0X</b>

Os valores representam as médias da porcentagem de volume das proteínas, em três repetições, dos géis de grãos despolpados e naturais secos em secador. O valor entre parênteses equivale ao erro padrão. *Spots* referentes à Figura 5. Ver Tabela 5 para a identificação das proteínas.

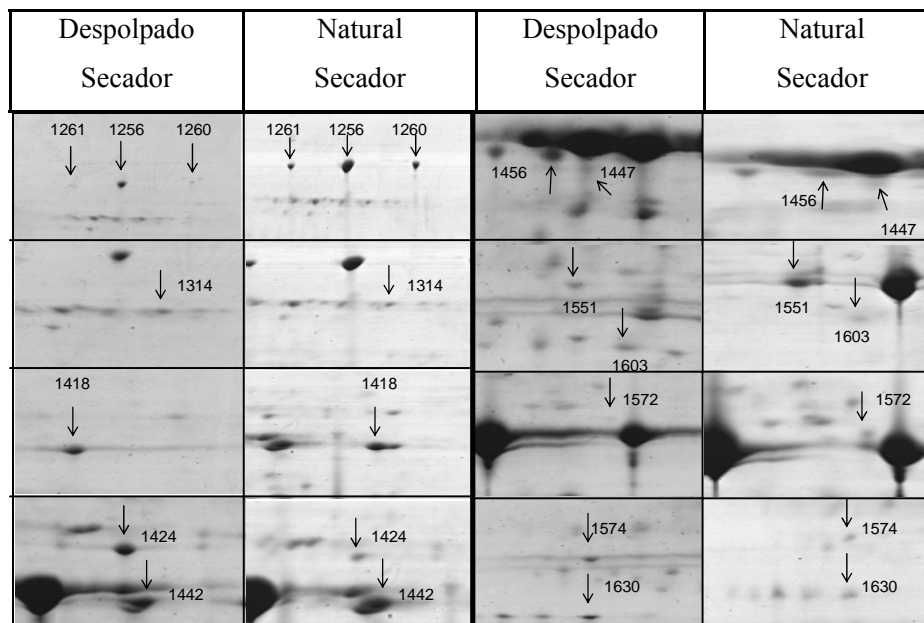


FIGURA 5. Detalhes comparativos de partes dos géis bidimensionais dos tratamentos com grãos despoldados e naturais secos em secador, representando os 15 spots com diferença de abundância protéica.

O grande número de pontos protéicos com menor abundância de proteínas encontradas nos grãos naturais secos no secador demonstra que eles são mais afetados durante a secagem mecânica a 60°C (Figura 1A e C), possivelmente pela maior demora para atingir a umidade ideal de secagem. No início da secagem do fruto natural, com alto teor de água, a evaporação é mais rápida na superfície. Porém, assim que a casca e a polpa perdem água, vão se tornando duras, constituindo barreiras para a penetração de calor e evaporação da água do interior para a periferia, tornando a secagem mais lenta (Oliveira, 2002).

Esse tempo prolongado é a causa de muitas contaminações e fermentações indesejáveis (Giranda, 1998; Pimenta, 2001; Corrêa et al, 2002) e,

provavelmente, de muitas mudanças fisiológicas no interior dos grãos e, conseqüentemente, da provável degradação/utilização de compostos, entre eles as proteínas e aminoácidos. Diversos trabalhos ao confirmarem essa hipótese, descrevem que os grãos processados por via úmida ou por via seca, sofrem diferentes estresses quando submetidos a secagem, armazenamento dentre outros processos pós-colheita. As alterações nas vias metabólicas, com ativação de rotas degradativas e de síntese são as principais conseqüências desses estresses (Selmar et al, 2004; Bytof et al, 2005; Selmar & Bytof, 2006; Selmar et al, 2008).

A última análise comparativa realizada entre os cafés naturais, seco em secador e em terreiro, apresentou o maior número de *spots* com diferença significativa em relação à quantidade de proteínas (% Vol), totalizando 22 *spots* (Tabela 4 e Figura 6). Analisando cada ponto protéico selecionado estatisticamente, observa-se que para o café natural seco mecanicamente, somente o *spot* 1565 apresentou maior abundância de proteínas (2,0X). Os demais pontos protéicos analisados tiveram uma redução na quantidade de proteínas quando submetidos ao mesmo processo.

**TABELA 4:** Média da abundância (% Vol) das proteínas responsivas aos tratamentos, com aumento quantitativo de, pelo menos, 1,8 vezes e um resultado significativo no teste t-student ( $p < 0,05$ ).

<i>Spots</i>	Natural		Diferença quantitativa de proteínas
	Secador	Terreiro	
<b>1303</b>	0,07 (0,01)	+ 0,16 (0,02)	<b>2,0 X</b>
<b>1314</b>	0,16 (0,01)	+ 0,47 (0,01)	<b>3,0 X</b>
<b>1316</b>	0,08 (0,02)	+ 0,19 (0,04)	<b>2,0 X</b>
<b>1337</b>	0,08 (0,01)	+ 0,16 (0,01)	<b>2,0 X</b>
<b>1388</b>	0,04 (0,01)	+ 0,20 (0,07)	<b>5,4X</b>
<b>1405</b>	0,125 (0,02)	+ 0,40 (0,07)	<b>3,0X</b>
<b>1417</b>	0,10 (0,02)	+ 0,25 (0,06)	<b>2,0 X</b>
<b>1418</b>	0,18 (0,04)	+ 0,91 (0,19)	<b>5,0 X</b>
<b>1419</b>	0,07 (0,03)	+ 0,43 (0,14)	<b>5,5 X</b>
<b>1424</b>	0,19 (0,02)	+ 1,20 (0,36)	<b>6,0 X</b>
<b>1448</b>	0,74 (0,82)	+1,94 (0,17)	<b>2,5 X</b>
<b>1482</b>	0,07 (0,02)	+ 0,13 (0,006)	<b>1,8 X</b>
<b>1501</b>	0,80 (0,40)	+ 1,91 (0,10)	<b>2,5 X</b>
<b>1540</b>	0,06 (0,001)	+ 0,36 (0,11)	<b>5,5X</b>
<b>1551</b>	0,08 (0,02)	+ 0,35 (0,12)	<b>4,0X</b>
<b>1565</b>	+ 0,39 (0,06)	0,17 (0,05)	<b>2,0X</b>
<b>1596</b>	0,08 (0,03)	+ 0,17 (0,03)	<b>2,0X</b>
<b>1602</b>	0,16 (0,02)	+ 0,36 (0,09)	<b>2,0X</b>
<b>1603</b>	0,13 (0,06)	+ 0,50 (0,22)	<b>3,9X</b>
<b>1617</b>	0,31 (0,07)	+ 1,00 (0,33)	<b>3,0X</b>
<b>1625</b>	0,69 (0,15)	+ 1,34 (0,20)	<b>1,95X</b>
<b>1632</b>	0,54 (0,15)	+ 1,00 (0,23)	<b>1,8X</b>

Os valores representam as médias da porcentagem de volume das proteínas, em três repetições, dos géis dos grãos naturais secos em secador e no terreiro. O valor entre parênteses equivale ao erro padrão. *Spots* referentes à Figura 6. Ver Tabela 5 para a identificação das proteínas.

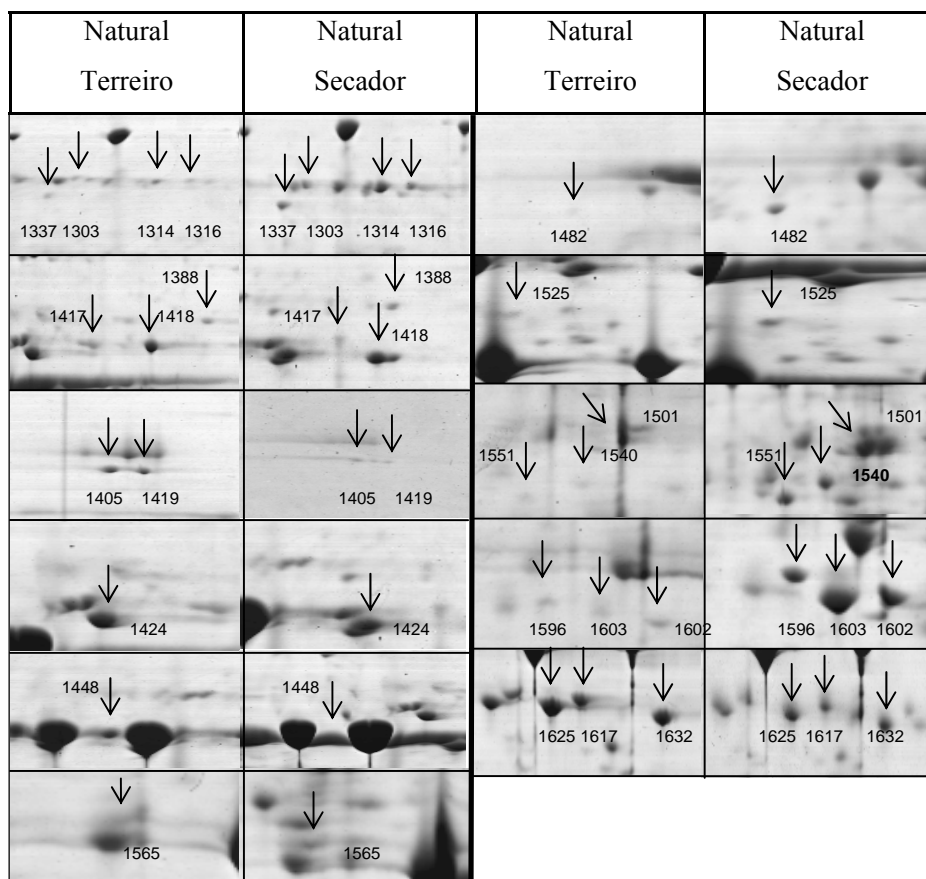


FIGURA 6. Detalhes comparativos de partes dos géis bidimensionais dos tratamentos com grãos naturais secos em secador e em terreiro, representando os 22 spots com diferença de abundância protéica.

Nessa última análise, pode-se inferir que, assim como na primeira análise, a temperatura atingida no interior dos grãos durante a secagem prejudica substancialmente a sua composição protéica (Figura 1 C e D). Fica evidente que o efeito da temperatura provoca desnaturação/degradação de proteínas, reações ainda desconhecidas que têm estas macromoléculas como substrato. Bem como

afeta as estruturas internas, ocasionando a liberação de compostos que podem influenciar na expressão gênica dessas proteínas ou degradá-las ou, até mesmo, podendo facilitar a atividade enzimática das proteases nesses grãos devido à temperatura de 60°C.

#### **4.2 Identificação das proteínas**

Dentre os *spots* enviados para seqüenciamento, até o presente momento, apenas duas seqüências foram obtidas, referentes aos *spots* 1256 e 1422.

A identificação utilizando apenas valores provenientes das massas trípticas dos peptídeos sem dados do genoma somente funciona para proteínas cuja seqüência é muito bem conservada entre organismos. Na maioria dos estudos nos quais houve sucesso, a identificação das proteínas foi realizada utilizando-se os dados provenientes de PMF, fragmentos trípticos, juntamente com dados do genoma do organismo (Giometti et al., 2002; Hesketh et al., 2002; Smolka et al., 2003). Neste trabalho, dados dos peptídeos trípticos, oriundos das análises por MALDI-ToF/ToF e, conseqüente, análises pelo Mascot e pelo banco de dados do Genoma Café foram suficientes para a identificação dos pontos protéicos.

Após análise *in silico*, o ponto protéico identificado pelo número 1256 teve significativa similaridade (elevado *score*), com seqüência da proteína 13S *globulin basic chain*, da espécie *Fagopyrum esculentum* (Figura 7). Essa é considerada uma proteína de reserva, com alta concentração de metionina e lisina, muito encontrada em cotilédones e endospermas. Existe uma grande similaridade dessas proteínas com a família de proteínas de reserva globulinas 11S.



**1** GIDENVCTMK LRENIKSPQE ADFYNPKAGR ITTANSQKLP ALRSLQMSAE  
**51** RGFLYSNGIY APHWNINAHS ALYVTRGNAK VQVVGDEGKNK VFDDEVK**QGO**  
**101** **LIIVPOYFAV** **IKKAGNOGFE** **YVAFK**TNDNA MINPLVGRLS AFRAIPEEVL  
**151** RSSFQISSEE AEELKYGRQE ALLLSEQSQQ GKREVADEKE RERF

FIGURA 7. Seqüência de aminoácidos da globulina 13S. Os peptídeos trípticos provenientes das análises por MALDI-ToF/ToF estão destacados em negrito e sublinhados.

Após essa análise, a seqüência da proteína globulina 13S, descrita acima, foi comparada (tBlastp) com o banco de dados do Genoma Café. O resultado encontrado foi uma elevada similaridade com a proteína de armazenamento da família globulina 11S (Tabela 5).

**TABELA 5:** Proteínas responsivas aos tratamentos, identificadas por espectrometria de massa.

Spot	Maldi Tof-Tof		Proteína	Espécie	Número de acesso NCBI	Massa <sup>B</sup> (kDa) / pI <sup>B</sup>
	Seqüências*	Score <sup>A</sup>				
1256	EYVAFK SIKISSIR IGIIRR WDNHR GPPR	128	Globulina 11S	<i>Coffea arabica</i>	gi:3641256	22.9 / 6.24
1422	ADSTHWCW RTSYGVP	143	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	Zea mays	gi:162462949	36.6/7.01

\* - Seqüência dos peptídeos fragmentados (MS/MS)

A – *Íons Score* é igual a  $-10\log(P)$ , em que P é a probabilidade de alinhamento num evento aleatório. *Individual ions score* maior que 38 indicam identidade ou elevada homologia ( $p < 0,05$ ).

B - pI e MM encontrados pela identificação tanto por *Peptide Mass Fingerprint* (PMF) quanto por MS/MS *Íon Score* utilizado o algoritmo MASCOT.

Bewley e Black (1994) descreveram que sementes de dicotiledôneas têm como principal reserva energética, proteínas de armazenamento, tais como as globulinas, leguminas e vicilinas, que são requisitadas durante a germinação e servem como reserva energética inicial para esse desenvolvimento. Esse resultado foi compatível com os encontrados por Sheoran et al. (2007) que analisaram o proteoma proveniente de sementes de tomate. Nesse trabalho, foram encontrados 11 pontos protéicos correspondentes a legumininas, 11 correspondentes a vicilinas e 2 correspondentes a albumina, todas consideradas proteínas de reserva.

Além dos trabalhos descritos, outros também descrevem a presença abundante de proteínas de armazenamento, como o de Watson et al. (2003) que, ao analisarem sementes *Medicago truncatula*, encontraram cerca de 60% de proteínas de reserva, sendo as mais abundantes proteínas da família 7S e 11S globulinas. Eles relataram, ainda, que isoformas dessas famílias são encontradas em múltiplos pontos do gel com diferentes pI e massas moleculares.

Recentemente, Acuña et al. (1999) revelaram que, em *Coffea* sp., existe a proteína de reserva globulina 11S, com peso molecular de 55 kDa, constituída por duas subunidades, uma de 33 kDa (cadeia  $\alpha$ ) e outra de 24 kDa (cadeia  $\beta$ ). No mesmo ano, Rogers et al (1999), utilizando 2DE, identificaram as subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  como sendo ácida e básica, respectivamente, e que essas são ligadas por pontes de dissulfeto. Além disso, sugeriram também que essas proteínas têm muitas isoformas.

Yuffa et al. (1994) demonstraram que proteínas de armazenamento se acumulam gradualmente no endosperma do grão, constituindo cerca de 50% do total de proteínas presente na semente madura. Essas proteínas são as mais abundantes e sua expressão é temporariamente regulada durante embriogênese, além de ser restrita a determinados tecidos: cotilédones e endosperma (Shewry, 1995). Plantas em desenvolvimento estocam e acumulam carboidratos, lipídeos

e proteínas que, subseqüentemente, serão utilizadas durante a germinação como fonte de energia, carbono e nitrogênio (Acuña et al., 1999).

Diante de trabalhos anteriores, era de se esperar que em grãos de café houvesse também uma grande concentração de proteínas de armazenamento e que as mesmas fossem identificadas.

Na terceira análise comparativa deste trabalho, a proteína globulina 11S, identificada pelo *spot* 1256, apresentou maior abundância, com uma diferença quantitativa de 2,5X, no café natural seco no secador em relação ao despulpado seco nas mesmas condições. O ocorrido pode ser resultado da utilização dessas proteínas pela germinação da semente de café despulpado. Selmar et al. (2004) afirmaram que vários processos bioquímicos ocorrem na semente do café durante o processamento, inclusive a germinação, que se inicia e prossegue após a retirada da casca e da mucilagem. Bytof et al. (2005) sugerem que a geminação ocorre durante o despulpamento e justificam a não ocorrência ou a baixa taxa de germinação em grãos processados por via seca, porque a mucilagem dos grãos contém inibidores da germinação.

Os resultados deste trabalho permitem inferir que durante o processamento do café despulpado, pode ter iniciado a germinação com a conseqüente mobilização das reservas, incluindo as proteínas globulina 11S. Assim, a baixa quantidade dessa proteína nesses grãos, em comparação com as do café natural, deve-se ao fato de as mesmas terem sido possivelmente requisitadas durante a germinação.

A baixa concentração da globulina 11S no café despulpado seco no secador, em relação aos que foram secos no terreiro (1ª análise comparativa), é justificada pelos danos causados pela elevada temperatura de 60°, que pode ter facilitado o processo de desnaturação destas proteínas ou induzido a atividade enzimática das proteases.

Não há, na literatura, relatos de que essa proteína globulina 11S ou outras proteínas de reserva sejam precursoras de compostos responsáveis pelo aroma e sabor da bebida do café, nem a relação destas com o tipo de secagem e temperatura às quais os grãos são submetidos.

Os peptídeos tripticos referentes ao *spot* 1422, após análise pelo Mascot e comparação (Blastp) no Banco de dados do Genoma Café, apresentou elevada similaridade com a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GPDH) (Tabela 5 e Figura 8), uma das enzimas chaves da via glicolítica, cuja síntese é ativada pela deficiência de oxigênio no meio (Manjunath & Sachs, 1997).

```
1 MAKIKIGING FGRIGRLVAR VALQSDDVEL VAVNDPFIST DYMTYMFKYD
51 TVHGQWKHHE VKVKDSKTLT FGEKEVAVFG CRNPEEIPWG SVGAEYVVE
101 TGVFTDQEKA AAHLKGGAKK VVISAPSKDA PMFVVGVNEK EYKSDINIVS
151 NASCTTNCLA PLAKVINDKF GIVEGLMTTV HAITATQKTV DGPSSKDWRG
201 GRAASFNIIP SSTGAAKAVG KVLPLVNGKL TGMSFRVPTV DVSVDLTVR
251 LEKSATYDEI KAAVKAEAEK SLKGILGYVE EDLVSTDFQG DSRSSIFDAK
301 AGIALNGNFV KLVSWYDNEW GYSTRVVDLI RHMNSTK
```

FIGURA 8. Seqüência de aminoácidos da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase. Os peptídeos tripticos provenientes das análises por MALDI-ToF/ToF estão destacados em negrito e sublinhados.

GAPDH é responsável pela catalisação da reação na qual o gliceraldeído-3-fosfato é oxidado (desidrogenado) pelo NAD<sup>+</sup> (e o NAD<sup>+</sup> passa a NADH) e fosforilado por um fosfato inorgânico, dando origem a 1,3-bifosfoglicerato (1,3 BPG), permitindo a continuidade da glicólise.

Todas as proteínas anaeróbicas identificadas até o momento estão envolvidas com a via glicolítica, seja como intermediário da via que produz substratos para a oxidação mitocondrial ou como produtos gênicos relacionados com a síntese de sacarose, piruvato descarboxilase ou álcool desidrogenase. (Sachs & Ho, 1986).

Adicionalmente, o estresse pelo calor é responsável por induzir as mesmas funções enzimáticas em alguns organismos. O estresse proveniente do calor, em leveduras, promove a ativação da GAPDH-3, bem como da fosfoglicerol quinase e enolase (Lindquist & Craig, 1988). Em trabalho com embriões de sapos, foi demonstrado que ocorre a ativação dessa enzima também induzida pelo calor. Esses autores sugerem, ainda, que existam dois genes envolvidos na expressão desta enzima (Nickells & Browder, 1988).

A GAPDH, em milhos, é codificada por uma família de multigênica, codificada pelos genes *gpc1*, *gpc2*, *gpc3* e *gpc4* (Kersanach et al, 1994; Russel & Sachs., 1989; Russel & Sachs, 1991), que se expressam quando essas plantas são cultivadas em condições de ausência ou de redução de oxigênio (Russel & Sachs, 1989).

Similar ao milho, outras plantas e células de mamíferos podem mostrar um aumento da expressão de genes glicolíticos diante de situações de baixa concentração de oxigênio (Webster, 1987; Webster & Murph, 1988).

Gil-Augusti et al. (2005) relataram a presença dessa enzima ao comparar o perfil proteômico de duas espécies de café (*C. canephora* e *C. arabica*), no intuito de diferenciar polipeptídeos presentes diferencialmente nestas espécies. A análise de um dos *spots* por Maldi-ToF possibilitou a identificação desta enzima, com massa molecular em torno de 42 kDa e pI igual a 6.4. Nesse trabalho não há descrição da sua expressão nem da sua função em cafés.

Embora fosse esperado que a GAPDH fosse mais expressa nas condições de elevada temperatura, como é o caso dos grãos despolpados submetidos à secagem mecânica a 60°C, no presente trabalho foi verificada sua maior abundância nos grãos despolpados secos em terreiro. As possíveis explicações para tal fato podem ser baseadas na desnaturação/degradação desta enzima, na atividade das proteases aumentada devido à elevada temperatura ou,

ainda, que sua expressão tenha sido afetada pela alta temperatura durante a secagem.

Nota-se que a proteína globulina 11S não se encontra nas proximidades dos dados fornecidos após seqüenciamento (pI e MM), sua massa teórica fornecida após análise pelo Mascot está muito menor que a mostrada no gel (Figura 02). A proteína gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase também não está localizada nas proximidades do pI fornecido pela análise e relatada na literatura, como foi feito por Gil-Augusti et al. (2005) (Figura 2).

Alguns autores explicam que modificações do pI das proteínas são decorrentes da fosforilação, acetilação e adição de grupos glicosídicos. Modificações da massa molecular (MM) podem ser devido à proteólise limitada da proteína (nos casos em que a MM encontrada é menor que a esperada) ou formação de agregados de uma mesma proteína ou, ainda, associação com outras proteína quando a MM observada é superior à esperada (Giometti et al., 2002; Hesketh et al., 2002; Wildgruber et al., 2002; Lee et al., 2003).

Além das proteínas discutidas, proteínas presentes nos *spots* 1260 e 1261 foram seqüenciadas, no entanto, sem eficiência.

Mesmo utilizando os valores das massas de peptídeos trípticos provenientes das análises por MALDI-ToF/ToF, juntamente com valores de pI e MM, não foi possível chegar a um consenso sobre a identidade das proteínas. O uso de software como o Mascot resultou em identificações não conclusivas. Porém, o genoma do *Coffea* sp. já foi seqüenciado e está sendo anotado. Posteriormente, essas informações poderão ser utilizadas para identificar estas proteínas.

A dificuldade de seqüenciar estas proteínas, provavelmente, pode ter sido causada pela baixa quantidade de proteína presente no *spot* ou pela sobreposição dos pontos por diferentes proteínas. É difícil prever quantas proteínas estão representadas nos pontos protéicos detectados, pois,

freqüentemente, produtos protéicos de múltiplos genes podem migrar para as mesmas coordenadas de um gel bidimensional. Gyi et al (2000) verificaram os produtos de seis genes presentes em um mesmo ponto fracamente corado de um gel bidimensional.

Outros pesquisadores (Zhang & Chait, 2000; Hancock et al., 2002) também verificaram a presença de múltiplas proteínas em apenas um ponto protéico. A utilização de faixas mais estreitas de pH para a isoeletrofocalização e o pré-fracionamento das amostras pode contribuir para a diminuição da co-migração de proteínas em géis bidimensionais.

Os demais *spots* ainda serão analisados pela mesma metodologia. Espera-se que eles, juntamente com os *spots* já seqüenciados, possam contribuir para relacionar as proteínas codificadas durante o processo de secagem e processamento com a qualidade de bebida e, assim, contribuir para entender o metabolismo responsável pelo sabor e aroma do café.

## CONCLUSÕES

A temperatura de secagem a 60°C interferiu no perfil proteômico dos cafés naturais e despulpados, reduzindo substancialmente a quantidade de pontos protéicos mais abundantes, quando comparados aos grãos secos em terreiro.

A maioria dos pontos protéicos mais abundantes também foi observada, de um modo geral, nos grãos despulpados.

Os pontos protéicos 1256 e 1422 foram seqüenciados e mostraram alta similaridade com a Globulina 11S e Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, respectivamente.

Os resultados desta pesquisa evidenciaram que a análise proteômica foi eficiente em diferenciar bioquimicamente os cafés submetidos a diferentes processos pós-colheita.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ACUÑA, R.; BASSÜNER, R.; BEILINSON, V.; CORTINA, H.; CADENA-GÓMEZ, G.; MONTES, V.; NIELSEN, N.C. Coffee seeds contain 11S storage protein. **Physiologia Plantarum**, v. 105, n. 1, p. 122-131, Jan. 1999.

AEBERSOLD, R. Constellations in a cellular universe. **Nature**, v. 422, n. 6928, p. 115-116, Mar. 2003.

AEBERSOLD, R.; GOODLET, D. R. Mass spectrometry in proteomics. **Chemical Review**, v. 101, n. 2, p. 269-295, Feb. 2001.

AFONSO JÚNIOR, P. C. **Aspectos físicos, fisiológicos e da qualidade do café em função da secagem e do armazenamento**. 2001. 373 p. Tese (Doutorado em Engenharia Agrícola) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

AFONSO JÚNIOR, P. C.; CORRÊA, P. C.; GONELI, A. L. D.; SILVA, F. S. da. Contribuição das etapas do pré-processamento para a qualidade do café. **Revista Brasileira de Armazenamento**, Viçosa, v. 29, n. 8, p. 6-53, 2004. Edição especial.

ANUÁRIO DA AGRICULTURA BRASILEIRA. **Café**. São Paulo: FNP Consultoria e Comércio, 2008. p. 213-230.

AMERSHAM BIOSCIENCE. **2-D Electrophoresis using Immobilized pH Gradients**: principles and methods. Uppsala, Sweden, 2004. 168 p. (Handbook, 80-6429-60).

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

AMORIM, H. V.; TEIXEIRA, A. A. Transformações bioquímicas, químicas e físicas dos grãos de café verde e a qualidade da bebida. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, 3., 1975, Curitiba. **Resumos...** Rio de Janeiro: MIC/IBC, 1975. p. 21.

ARNOLD, U.; LUDWIG, E.; KÜHN, R.; MÖSCHWITZER, U. Analysis of free amino acids in green coffee beans. **Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und- Forschung**, Springer Berlin, Heidelberg, v. 199, n. 1, p. 22-25, July 1994.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE CAFÉ. **A história do café : origem e trajetória**. Disponível em: <<http://www.abic.com.br/scafehistoria.html>>. Acesso em: 05 jan. 2007.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE CAFÉ. **Indicadores da indústria de café no Brasil. Pesquisa e relatório da ABIC, 2008**. Disponível em: <[http://www.abic.com.br/gar\\_qualidade.html](http://www.abic.com.br/gar_qualidade.html)>. Acesso em: 27 fev. 2008.

BARTHOLO, G. F.; GUIMARÃES, P. T. G. Cuidados na colheita, no preparo do café. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 18, n. 187, p. 33-42, 1997.

BASAVARAJAPPA, B. S.; SHETTY, H. S.; PRAKASH, H. S. Membrane deterioration and other biochemical changes, associated with accelerated ageing of maize seeds. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 19, n. 2, p. 279-286, 1990.

BASSOLI, P. G. **Avaliação da qualidade de cafés verdes brasileiros : uma análise multivariada**. 1992. 110 p. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR.

BATISTA, L. R. **Incidência de fungos produtores de acrotoxina A em grãos de café. (Coffea arabica L.) pré-processados por via seca e úmida**. Lavras: UFLA, 2005. 218 p.

BEWLEY, J. D.; BLACK, M. **Seeds : physiology of development and germination**. New York: Plenum, 1994. 445 p.

BICUDO, L. P. Para fazer café fino não é indispensável gastar muito. **Lavoura e Criação**, São Paulo, n. 155, p. 17-20, 1962.

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

BORÉM, F. M. **Cafeicultura empresarial : produtividade e qualidade**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2004. 103 p. (Textos Acadêmicos).

BORÉM, F. M. Processamentos do café. In: BORÉM, F. M. (Ed.). **Pós-colheita do café**. Lavras: UFLA, 2008. p. 127-158.

BORÉM, F. M.; REINATO, C. H. R.; SILVA, P.; FARIA, L. F. Processamento e secagem dos frutos verdes do cafeeiro. **Revista Brasileira de Armazenamento**, Viçosa, n. 9, p. 19-24, 2006a. Especial Café.

BORÉM, F. M.; REINATO, C. R.; PEREIRA, R. G. F. A. Alterações na bebida do café despolpado secado em terreiro de concreto, lama asfáltica, terra, leito suspenso e em secadores rotativos. In: SIMPOSIO DE PESQUISA DOS CAFES DO BRASIL E WORKSHOP INTERNACIONAL DE CAFÉ & SAÚDE, 3., 2003, Porto Seguro, BA. **Anais ... Brasília, DF: Embrapa Café, 2003. p. 155.**

BORÉM, F. M.; VOS, C. H. R.; BINO, R. J. Untargeted metabolomics as a novel tool in coffee research. In: INTERNATIONAL CONFERENCE IN COFFEE SCIENCE, 21., 2006, Montpellier. **Proceedings...** Montpellier: ASIC, 2006b. p.125-132.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1 p. 248-254, May 1976.

BRANDO, C. H. J. Cereja descascado, desmucilado, fermentado, despolpado ou lavado. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, 25., 1999, França. **Anais...** Rio de Janeiro: MAA/PROCAFÉ, 1999. p. 342-346.

BRAZIL SPECIALTY COFFEE ASSOCIATION. **Specialty coffee social environmental management systems**. 2005. Disponível em: <[http://www.bsca.com.br/news.php?lang=pt-BR&an\\_id=288](http://www.bsca.com.br/news.php?lang=pt-BR&an_id=288)>. Acesso em: 24 set. 2007.

BYTOF, G.; SELMAR, D.; SCHIEBERLE, P. New aspects of coffee processing : how do the different post harvest treatments influence the formation of potential flavour precursors? **Journal of Applied Botany**, Berlin, v. 74, n. 3/4, p. 131-136, Sept. 2000.

BYTOF, G.; KNOPP, S. E.; SCHIEBERLE, P.; TEUTSCH, I.; SELMAR, D. Influence of processing on the generation of  $\gamma$ -aminobutyric acid in green coffee beans. **European Food Research Technology**, London, v. 220, n. 3/4, p. 245-250, Mar. 2005.

CAGNEY, G.; AMIRI, S.; PREMAWARADENA, T.; LINDO, M.; EMILI, A. In silico proteome analysis to facilitate proteomics experiments using mass spectrometry. **Proteome Science**, v. 1, n. 5, p. 1-15, Aug. 2003.

CAHILL, D. J.; NORDHOFF, E.; O'BRIEN, J.; KLOSE, J.; EICKHOFF, H.; LEHRACH, H. Bridging genomics and proteomics. In: PENNINGTON, S. R.; DUNN, M. J. (Ed.). **Proteomics from protein sequence to function**. Oxford: BIOS Scientific, 2001. p. 1-22.

CANDIANO, G.; RUSCHI, M.; MUSANTE, L.; SANTUCCI, L.; GHIGGERI, G. M.; CARNEMOLLA, B.; ORECCHIA, P.; ZARDI, L.; RIGHETTI, P. G. Blue silver : a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. **Electrophoresis**, Weinheim, Germany, v. 25, n. 9, p. 1327-1333, Nov. 2004.

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

CARVALHO, V. D.; CHALFOUNS, M. Aspectos qualitativos do café. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 11, n. 16, p. 79-92, jun. 1985.

CASH, F. Review : characterization of bacterial proteomes by two-dimensional electrophoresis. **Analytica Chimica Acta**, Scotland, v. 372, p. 121-145, Oct. 1998.

CHAGAS, S. J. de R. **Caracterização química e qualitativa de cafés de alguns municípios de três regiões produtoras de Minas Gerais**. 1994. 83 p. Dissertação (Mestrado em Ciências dos alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

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

CLIFFORD, M. N. Chemical and physical aspects of green coffee and coffee products. In: CLIFFORD, M. N. ; WILSON, K. C. (Ed.). **Coffee : botany, biochemistry, and production of beans and beverage**. London: Croom Helm Publishers Ltd, 1985. p. 305-374.

CLIFFORD, M. N.; RAMIREZ-MARTINEZ, J. R. Phenols and caffeine in wet-processed coffee beans and coffee pulp. **Food Chemistry**, New York, v. 40, n. 1 p. 35-42, 1991a.

CLIFFORD, M. N.; RAMIREZ-MARTINEZ, J. R. Tannis in wet-processed coffee beans and coffee pulp. **Food Chemistry**, New York, v. 40, n. 2, p. 191-200, 1991b.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira café safra 2008, segunda estimativa, maio/2008**. Brasília. Disponível em: < <http://www.conab.gov.br/conabweb/>>. Acesso em: 01 ago. 2008.

CORADI, PAULO CARTERI. **Alterações na qualidade de café cereja natural e despolpado submetidos a diferentes condições de secagem e armazenamento**. 2006. 75 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, 2006

CORADI, P.C.; BORÉM, F. M.; SAATH, R.; MARQUES, E. R. Effect of drying and storage conditions on the quality of natural and washed coffee. **Coffee Science**, Lavras, v. 2, n. 1, p. 38-47, jan./jun. 2007.

CORRÊA, P. C.; AFONSO JÚNIOR, P. C.; PINTO, F. de A. de C.; OLIVEIRA, T. T. de. Efeito da temperatura de secagem na cor dos grãos de café pré-processados por via seca e via úmida. **Revista Brasileira de Armazenamento**. Viçosa, n. 5, p. 22-27, 2002. Especial Café.

CORRÊA, P. C. **Simulação de secagem de café em camada espessa**. 1982. 47 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, MG.

CORTEZ, J. G. Aptidão climática para a qualidade da bebida nas principais regiões cafeeiras de Minas Gerais. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 18, n. 187, p. 21-26, 1997.

CORTEZ, J. G. **Efeito de espécies e cultivares e do processamento agrícola e industrial nas características da bebida do café**. 2001. 71 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, SP.

CRAVATT, B. F.; SIMON, G. M.; YATES, J. R. The biological impact of mass-spectrometry-based proteomics. **Nature**, v. 450, n. 7172, p. 991-1000, Dec. 2007.

DUNN, M. J.; GÖRG, A. Two-dimensional polyacrilamide gel electrophoresis for proteome analysis. In: PENNINGTON, S. R.; DUNN, M. J. (Ed.).

**Proteomics from protein sequence to function.** Oxford: BIOS Scientific, 2001. p. 43-63.

FERRAZ, M. B.; VEIGA, A. A. Secagem racional do café. **Boletim da Superintendência dos Serviços do Café**, São Paulo, v. 29, n. 325, p. 5-16, mar. 1954.

FLAMENT, I. Coffee, cacao and tea. In: MAARSE, H. (Ed.). **Volatile compounds in foods and beverage.** New York: Marcel Dekker, 1991. cap. 17, p. 617-669.

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

FRANCA, A. S.; OLIVEIRA, S. D.; MENDONÇA, J. C. F.; SILVA, X. A. Physical and chemical attributes of defective crude and roasted coffee beans. **Food Chemistry**, v. 90, n. 1/2, p. 84-89, Mar./Apr. 2005b.

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

GIRANDA, R. do N. **Aspectos qualitativos de cafés (Coffea arábica L.) submetidos a diferentes processos de secagem.** 1998. 83 p. Dissertação (Mestrado em Ciências dos alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

GIOMETTI, C. S.; REICH, C.; TOLLAKSEN, S.; BAGNIGG, G.; LIM, H.; ZHU, W.; YATES, J.; OLSEN, G. Global analysis of a “simple” proteome : *Methanococcus jannaschii*. **Journal of Chromatography B : Biomedical Sciences and Applications**, v. 782, n. 1/2, p. 227–243, Dec. 2002.

GLISH, G. L.; VACHET, R. W. The basic of mass spectrometry in the twenty-first century. **Nature Reviews: Drug Discovery**, v. 2, p. 140-150, Feb. 2003.

GÖRG, A.; OBERMAIER, C.; BOGUTH, G.; HARDER, A.; SCHEIBE, B.; WILDGRUBER, R.; WEISS, W. The current state of two-dimensional eletrophoresis with immobilized ph gradients. **Electrophoresis**, Weinheim, Germany, v. 21, n. 6, p. 1037-1053, Apr. 2000.

GUIDA, V. F. A. A.; VILELA, E. R. Influencia do fluxo de ar e do período de descanso na secagem do café (*Coffea arabica* L.) despulpado em secador experimental de camada fixa. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 20, n. 2, p. 232-237, 1996.

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

GUIMARÃES, R. M.; VIEIRA, M. G. G. C.; FRAGA, A. C.; PINHO, E. V. R. V.; FERRAZ, V. P. Tolerância à dessecação em sementes de cafeeiro (*Coffea arabica* L.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 26, n. 1, p. 128-139, jan./fev. 2002.

GYGI, S. P.; CORTHALS, G. L.; ZHANG, Y.; ROCHON, Y.; AEBERSOLD, R. Evaluation of two-dimensional gel electrophoresis-based proteome analysis technology. **Proceeding of the National Academy of Science**, Seattle, WA, v. 97, n. 17, p. 9390-9395, Aug. 2000.

HANCOCK, W. S.; WU, S. L.; STANLEY, R.; GOMBOCZ, E. A. Publishing large proteome datasets : scientific policy meets emerging technologies. **Trends in Biotechnology**, v. 20, n. 1, p. 39-44, Jan. 2002.

HAYNES, P.; YATES, J. R. Review article : proteome profiling : pitfalls and progress. **Yeast**, Chichester, England, v. 17, p. 81-87, July 2000.

HERBERT, B. R.; LARRY, J. L.; PACKER, N. H.; GOOLEY, A. A.; PEDERSON, S. K. What place for polyacrilamide in proteomics? **Trends in Biotechnology**, v. 19, p. 3-9, Oct. 2001. Supplement 1.

HESKETH, A. R.; CHANDRA, G.; SHAW, A. D.; ROWLAND, J. J.; KELL, D.B.; BIBB, M. J.; CHATER, K. F. Primary and secondary metabolism, and post-translational protein modifications as portrayed by proteomic analysis of *Streptomyces coelicor*. **Molecular Microbiology**, v. 46, n. 4, p. 917-932, Nov. 2002.

HOEKSTRA, F. A.; GOLOVINA, E. A.; BUITINK, J. Mechanisms of plant desiccation tolerance. **Trends in Plant Science**, London, v. 6, n. 9, p. 431-438, Sept. 2001.

HUBER, L. A. Is proteomics heading in the wrong direction? **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 4, n. 1, p. 74–80, Jan. 2003.

ILLY, A.; VIANI, R. **Espresso coffee** : the chemistry of quality. 2. ed. San Diego: Academic, 1995. 253 p.

INSTITUTO BRASILEIRO DO CAFÉ. **Cultura de café no Brasil** : processamento, classificação e armazenamento do café. 5. ed. Rio de Janeiro: IBC GERCA, 1985. p. 423-461.

JOCELYN, H.; ILAG, L. Dividing and conquering proteomics. **Proteomics**, Weinheim, Germany, p. 96-98, 2002.

JOUBERT, R.; BRIGNON, P.; LEHMANN, C.; MONRIBOT, C.; GENDRE, F.; BOUCHERIE, H. Two-dimensional gel analysis of the proteome of lager brewing yeasts. **Yeast**, Chichester, England, v. 16, n. 6, p. 511-522, Apr. 2000.

JUNGBLUT, P. R. Proteome analysis of bacterial pathogens. **Microbes and Infection**, v. 3, n. 10, p. 831-840, Aug. 2001.

JURAN, J. M.; FRANK, M. **Quality planning and analysis**. New York: McGraw-Hill Companies, 1980. 672 p.

KERSANACH, R.; BRINKMAN, H.; LIAUD, M. F.; ZHANG, D. X.; MARTIN, W.; CERFF, R. Five identification intron positions in ancient duplicated genes of eubacterial origin. **Nature**, v. 367, n. 6461, p. 387-389, Jan. 1994.

KÖPKE, A. **Proteomics** : a new drug discovery tool. Disponível em: <<http://www.wita-proteomics.com>>. Acesso em: 01 nov. 2003.

KOSHINO, L. L.; ANDRADE, L. P. S.; BLOCH JÚNIOR, C.; FRANCO, O. L.; EIRA, M. T. S. ; TEIXEIRA, J. B. ; MEHTA, A. Análise proteômica de embriões zigóticos e endosperma de sementes de *Coffea arabica*. In: SIMPÓSIO DE PESQUISAS DOS CAFÉS DO BRASIL, 5., 2007, Águas de Lindóia, SP. **Anais...** Brasília, DF: Embrapa Café, 2007. p. 4.

LEE, C.-L.; HSIAO, H.-H.; LIN, C.-W.; WU, S.-P.; HUANG, S.-Y., WU, C.-Y.; KHOO, K-H. Strategic shotgun proteomics approach for efficient construction of an expression map of targeted protein families in hepatoma cell lines. **Proteomics**, Weinheim, Germany, v. 3, n. 12, p. 2472- 2486, 2003.

LEITE, R. A. Qualidade tecnologica do cafe (*Coffea arabica* L.) pré-processado por “via seca” e “via úmida” avaliada por método químico. **Revista Brasileira**



**de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, PB, v. 2, n. 3, p.308-311, set./dez. 1998.

LELOUP, V.; GANCEL, C.; LIARDON, R.; RYTZ, A.; PITHON, A. Impact of wet and dry process on green coffee composition and sensory characteristics. In: INTERNATIONAL CONFERENCE IN COFFEE SCIENCE, 20., 2004, Bangalore. **Resumes...** Bangalore: ASIC, 2004. 1CD-ROM.

LINDQUIST, S.; CRAIG, E. A. The heat-shock proteins. *Annual Review of Genetics*, v. 22, p. 631-677, Dec. 1988.

LOPEZ, M. F. Proteome analysis : I. Gene products are where the biological action is. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 722, n. 1/2, p. 191–202, Feb. 1999.

LUDWIG, E.; LIPKE, U.; RACZEC, U.; JÄGER, A. Investigations of peptides and proteases in green coffee beans. **European Food Research Technology**, v. 211, p. 111-116, 2000.

LUDWIG, E.; RACZEK, N. N.; KURZROCK, T. Contribution to composition and reactivity of coffee protein. In: ÈME COLLOQUE SCIENTIFIQUE INTERNATIONAL SUR LE CAFÉ, 16., 1995, Kyoto, Japan. **Proceedings...** Paris, France: Association Scientifique Internationale sur le Café, 1995. p. 259-346.

MACRAE, R. Nitrogenous compounds. In: CLARKE, R. J. ; MACRAE, R. (Ed.). **Chemistry coffee**. London: Elsevier Applied Science, 1985. v. 1, p. 115-152, 1985

MALTA, M. R.; CHAGAS, S. J. de R.; OLIVEIRA, W. M. de. Composição físico-química e qualidade do café submetido a diferentes formas de pré-processamento. **Revista Brasileira de Armazenamento**, Viçosa, n. 6, p. 37-41, 2003.

MANJUNATH, S.; SACHS, M. M. Molecular characterization and promoter analysis of the maize cytosolic glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase gene family and its expression during anoxia. **Plant Molecular Biology**, v. 33, n. 1, p. 97-112, Jan. 1997.

MANN, M. ; HENDRICKSON, R. C. ; PANDEY, A. Analysis of proteins and proteomes by mass spectrometry. **Annual Review of Biochemistry**, v. 70, p. 437-473, July 2001.

- MAZZAFERA, P.; PURCINO, R. P. Post harvest processing methods and physiological alterations in the coffee fruit. In: INTERNATIONAL CONFERENCE IN COFFEE SCIENCE, 20., 2004, Bangalore, India. **Proceedings...** Bangalore: ASIC, 2004. 1 CD-ROM.
- MAYNARD, D. M.; MASUDA, J.; YANG, X.; KOWALAK, J. A.; MARKEY, S. P. Characterizing complex peptide mixtures using a multi-dimensional liquid chromatography–mass spectrometry system : *Saccharomyces cerevisiae* as a model system. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 810, n. 1, p. 69-76, Oct. 2004.
- MENDONÇA, L. M. V. L. **Características químicas, físico-químicas e sensoriais de cultivares de *Coffea arabica* L.** 2004. 153 p. Tese (Doutorado em Ciências dos alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade, para a classificação do café beneficiado grão cru, da Instrução Normativa nº 08, de 2003.** Disponível em: < <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do>>. Acesso em: 30 ago. 2008
- MO, W.; KARGER, B. L. Analytical aspects of mass spectrometry and proteomics. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 6, n. 5, p. 666-675, Oct. 2002.
- MOSS, S. R. **Competitividade da produção do café arábica em Minas gerais e São Paulo.** 2006. 90 p. Dissertação (Mestrado em Economia Aplicada) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.
- MULLEN R. T.; KING J. E.; GIFFORD, D. J. Changes in mRNA populations during loblolly pine (*Pinus taeda*) seed stratification, germination and post-germinative growth. **Physiologia Plantarum**, v. 97, n. 3, p. 545-553, July 1996.
- NICKELLS, R. W.; BROWDER, L. W. A role for glyceradehyde-3-phosphate dehydrogenase in the development of thermotolerance in *Xenopus laevis* embryos. **Journal of Cell Biology**, v. 107, n. 5, p. 1901-1909, Nov. 1988.
- OBANDO-FLOR, E. P.; CÍCERO, S. M.; FRANÇA NETO, J. de B.; KRZYZANOWSKY, F. C. Avaliação de danos mecânicos em sementes de soja por meio da análise de imagens. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 26, n. 1, p. 68-76, 2004.

OCTAVIANI, J. C. **Secagem de café cereja descascado desmucilado com utilização de gás liquefeito de petróleo.** 2000. 101 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP.

O'FARREL, P. H. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. **Journal Biology Chemistry**, USA, v. 250, n. 10, p. 4007-4021, 1975.

OLIVEIRA, G. A. **Qualidade dos cafés cereja, bóia e mistura submetidos a diferentes períodos de amontoamento e tipos de secagem.** 2002. 100 p. Tese (Doutorado em Ciências dos alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

OLIVEIRA, G. A.; VILELA, E. R.; BORÉM, F. M.; PEREIRA, R. G. F. A.; ANDRADE, E. T. efeito de diferentes graus de maturação do café (*Coffea arabica* L.) e diferentes temperaturas de secagem na qualidade. In: SIMPÓSIO DE PESQUISAS DOS CAFÉS DO BRASIL, 2., 2001, Vitória, ES. **Anais...** Vitória, ES: IBC, 2001, p. 864-871.

PANDEY, A.; MANN, M. Proteomics to study genes and genomes. **Nature**, v. 405, n. 6788, p. 837-846, June 2000.

PARDANANI, A.; WIEBEN, E. D.; SPELSBERG, T. C.; TEFFERI, A. Primer on medical genomics part IV : expression proteomics. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 77, n. 11, p. 1185–1196, Nov. 2002.

PATTERSON, S. D.; AEBERSOLD, R. H. Proteomics : the first decade and beyond. **Nature Genetics**, v. 33, n. 3, p. 311–323, Mar. 2003.

PATTON, W. F. A thousand points of light: the application of fluorescence detection technologies to two-dimensional gel electrophoresis and proteomics. **Electrophoresis**, Weinheim, Germany, v. 21, n. 6, p. 1123–1144, Apr. 2000.

PATTON, W. F. Detection technologies in proteome analysis. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 771, n. 1/2, p. 3-31, May 2002.

PERKINS, D. N.; PAPPIN, D. J. C.; CREASY, D. M.; COTTRELL, J. S. Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. **Electrophoresis**, Weinheim, Germany, v. 20, n. 18, p. 3551-3567, Dec. 1999.

PIMENTA, C. J. **Época de colheita e tempo de permanência dos frutos à espera da secagem, na qualidade do café.** 2001. 145 p. Tese (Doutorado em Ciência dos alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

PIMENTA, C. J. **Qualidade do café (*Coffea arábica* L.) originado de diferentes frutos colhidos em quatro estádio de maturação.** 1995. 94 p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos alimentos). Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

PRETE, C. E. C. **Condutividade elétrica do exsudato de grãos de café (*Coffea arabica* L.) e sua relação com a qualidade da bebida.** 1992. 125 p. Dissertação (Doutorado em Fitotecnia) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, SP.

PUERTA-QUITERO, G. I. P. Evaluacion de la calidade del café colombiano processado por via seca. **Cenicafé**, San José, v. 47, n. 2, p. 85-90, 1996.

QUADRONI, M.; JAMES, P. Enhancing high-throughput proteome analysis: the impact of stable isotope labeling. In: PENNINGTON, S. R.; DUNN, M. J. (Ed.). **Proteomics from protein sequence to function.** Oxford: Bioscience Scientific, 2001. p. 151-169.

REINATO, C. H. R. **Avaliação técnica, econômica e quantitativa do uso de lenha e GLP na secagem de café.** 2002 126 p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

REINECCIUS, G. A. The maillard reaction and coffee flavor. In: ÈME PROCEEDING OF THE COLLOQUE SCIENTIFIQUE INTERNATIONAL SUR LE CAFÉ, 16., 1995, Kyoto, Japan. **Proceedings...** Paris, France: ASIC, 1995. p. 249-257.

RIBEIRO, D. M.; BORÉM, F. M.; ANDRADE, E. T. de. ; ROSA, S. D. F. da. Taxa de redução de água do café cereja descascado em função da temperatura da massa, fluxo de ar e período de pré-secagem. **Revista Brasileira de Armazenamento**, Viçosa, v. 28, n. 7, p. 94-107, 2003. Especial.

RIBEIRO, D. M. **Qualidade do café cereja descascado submetido a diferentes temperaturas, fluxos de ar e períodos de pré-secagem.** 2003. 86 p. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Alimentos) Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

ROGERS, W. J.; 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 Biochemistry**, Paris, v. 37, n. 4, p. 261-272, Feb. 1999.

RUSSEL, D. A.; SACHS, M. M. The maize glyceraldehyde3-phosphate dehydrogenase gene family : organ-specific expression and genetic analysis. **Molecular General Genetics**, v. 229, n. 2, p. 219-228, Oct. 1991.

RUSSEL, D. A.; SACHS, M. M. Differential expression and sequence analysis of the maize glyceraldehyde3-phosphate dehydrogenase gene family. **The Plant Cell**, v. 1, n. 8, p. 783-793, Aug. 1989.

SAATH, R. **Microscopia eletrônica de varredura do endosperma de café (Coffea arabica L.) durante o processo de secagem**. 2000. 90 p. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

SACHS, M. M.; HO, T. H. D. Alteration of gene expression during environmental stress in plants. **Annual Review Plant Physiology**, v. 37, p. 363-376, June 1986.

SELMAR, D.; BYTOF, G.; KNOPP, S. E. The storage of green coffee (*Coffea arabica*) : decrease of viability and changes of potential aroma precursors. **Annals of Botany**, v. 101, n. 1, p. 31–38, Jan. 2008.

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

SELMAR, D.; BYTOF, G.; KNOPP, S. E.; BRADBURY, A.; WILKENS, J.; BECKER, R. Biochemical insights into coffee processing: quality and nature of green coffee are interconnected with an active seed metabolism. In: INTERNATIONAL CONFERENCE IN COFFEE SCIENCE, 20., 2004, Bangalore. **Proceedings...** Bangalore: ASIC, 2004. 1 CD-ROM.

SHEN, Y.; SMITH, R. D. Proteomics based on high-efficiency capillary separations. **Electrophoresis**, Weinheim, Germany, v. 23, n. 18, p. 3106-3124, Sept. 2002.

SHEORAN, I. S.; ROSS, R. S. A.; OLSON, J. H. D.; SAWHNEY, K. V.  
Proteomic analysis of tomato (*Lycopersicon esculentum*) pollen Inder S.  
**Journal of Experimental Botany**, v. 58, n. 13, p. 3525–3535, Oct. 2007.

SHEVCHENKO, A.; JENSEN, O. N.; PODTELEJNIKOV, A. V.; FRANCIS  
SAGLIOCCO, F.; WILM, M.; VORM, O.; MORTENSEN, P.;  
SHEVCHENKO, A.; BOUCHERIE, H.; MANN, M. Linking genome and  
proteome by mass spectrometry: Large-scale identification of yeast proteins  
from two dimensional gels. **Proceeding National Academy Science of United  
States of America**, v. 93, n. 25, p. 14440-14445, Dec. 1996.

SHEWRY, P. R. Plant storage proteins. **Biology Review**, v. 7, n. 7, p. 945-9, 56,  
July 1995.

SILVA, P. L.; VINECK, F.; BARBOSA, E. A.; ANDRADE, A. C.; BLOCH  
JÚNIOR, C. Imagens por espectrometria de massa (IMS) como uma ferramenta  
inovadora para estudos moleculares de frutos de café. In: SIMPÓSIO DE  
PESQUISAS DOS CAFÉS DO BRASIL, 5., 2007, Águas de Lindóia, SP.  
**Anais...** Brasília, DF: Embrapa Café, 2007. p. 197-200.

SILVA, R. F. **Qualidade do café cereja descascado produzido no sul de  
Minas Gerais**. 2003. 81 p. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Alimentos) –  
Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

SIVETZ, M. **Coffee processing technology**. Westport, Connecticut: Avi, 1963.  
v. 2, p. 379.

SIVETZ, M.; DESROSIER, N. W. Drying green coffee beans. In: \_\_\_\_\_.  
**Coffee technology**. Westport, Connecticut: Avi, 1979a. cap. 6, p. 117-169.

SIVETZ, M.; DESROSIER, N. W. Physical and chemical aspects of coffee. In:  
\_\_\_\_\_. **Coffee technology**. Westport, Connecticut: Avi, 1979b. cap. 14, p. 527-  
575.

SMOLKA, M. B.; MARTINS, D.; WINCK, F.V.; SANTORO, C. E.;  
CASTELLARI, R. R.; FERRARI, F.; BRUM, I. J.; GALEMBECK, E.;  
COLETTA FILHO, H. D.; MACHADO, M. A.; MARANGONI, S.;  
NOVELLO, J. C. Proteome analysis of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*  
reveals major cellular and extracellular proteins and a peculiar codon bias  
distribution. **Proteomics**, Weinheim, Germany, v. 3, n. 2, p. 224-237, Feb. 2003.

SOUZA, M. C. M.; SAES, M. S. M.; OTANI, M. N. Pequenos agricultores familiares e sua inserção no mercado de cafês especiais : uma abordagem preliminar. **Informações econômicas**, São Paulo, v. 32, n. 11, nov. 2002.

SOUZA, S. M. S. de. **Secagem de café com qualidade III** : secagem. Lavras: EPAMIG, 2000. 4 p. (Circular técnica, 118).

TEIXEIRA, A. A.; HASHIZUME, H.; NOBRE, G. W.; CORTEZ, J. G. Efeito da temperatura de secagem na caracterização dos efeitos provenientes dos frutos colhidos verdes. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, 7., 1979, Araxá. **Resumos...** Rio de Janeiro: IBC/GERCA, 1979. p. 353-357.

TOSELLO, A. Colheita, preparo por via seca e armazenamento de café. In: NETTO, J. E. de P. **Primeiro curso de cafeicultura**. 3. ed. São Paulo: Instituto Agrônômico do Estado de São Paulo, 1956. p. 247-257.

TOSELLO, A. Ensaio sobre a secagem dos produtos agrícolas pelo ar quente. **Bragatia**, Campinas, v. 6, n. 2, p. 39-109, fev. 1946.

VINCENT, J. C. Green coffee processing. In: CLARKE, R. J.; MACRAE, R. (Ed.). **Coffee** : chemistry. London, New York: Elsevier, 1985. p. 1-33.

VILLELA, T. C. **Qualidade do café despulpado, desmucilado, descascado e natural, durante o processo de secagem**. 2002. 66 p. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

WATSON, B. S; ASIRVATHAM, V. S; WANG, L.; SUMNER, L. W. Mapping the proteome of barrel medic (*Medicago truncatula*). **Plant Physiology**, v. 131, n. 3, p. 1104–1123, Mar. 2003.

WEBSTER, K. A.; MURPHY, B. J. Regulation of tissue-specific glycolic isozyme genes : coordinate response to oxygen availability in myogenic cells. **Canadian Journal Zoology**, Canada, v. 66, n. 5, p. 1046-1058, May 1988.

WEBSTER, K. A. Regulation of glycolic enzyme RNA transcriptional rates by oxygen availability in skeletal muscle cells. **Molecular Cell Biochemistry**, v. 77, n. 1, p. 19-28, Mar. 1987.

WESTERMEIER, R.; NAVEN, T. Part II : course manual, Step 9: In-gel digestion. In: WESTERMEIER, R; NAVEN, T. (Ed.). **Proteomics in practice**. Weinheim: Wiley-VCH, 2002. p. 318.

WIJK, K. L. van. Challenges and prospects of plant proteomics. **Plant Physiology**, v. 126, n. 2, p. 501-508, June 2001.

WILBAUX, R. **Agricultural engineering**. Rome, Italy: FAO Online Catalogues, 1963. 293 p.

WILDGRUBER, R.; REIL, G.; DREWS, O.; PARLAR, H.; GORG, A. Web-based two dimensional database of *Saccharomyces cerevisiae* proteins using immobilized pH gradient from pH 6 to pH 12 and matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry. **Proteomics**, Weinheim, Germany, v. 2, n. 6 p. 727-732, June 2002.

WILKINS, M. R.; HOCHSTRASSER, D. F. **Thinking bigproteome studies in a post genome era**. 1996. Disponível em: <<http://www.abrf.org/Proteome.html>> Acesso em: 07 fev. 2007.

WILKINS, M. R. J. C.; SANCHEZ, A. A.; GOOLEY, R. D. ; APPEL, R. D.; HUMPHERY-SMITH, I.; 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**, Sydney, Australia, v. 13, p.19–50, 1996.

YAN, J. X.; WAIT, R.; BERKELMAN, T.; HARRY, R. A.; WESTBROOK, J. A.; WHEELER, C. H.; DUNN, M. J. A modified silver staining protocol for visualization of proteins compatible with matrix-assisted laser desorption/ionization and electrospray ionization-mass spectrometry. **Electrophoresis**, Weinheim, Germany, v. 21, n. 17, p. 3666–3672, Nov. 2000.

YUFFA, A. M.; DE GARCIA, E. G.; SEGURA NIETO, M. Comparative study of protein electrophoretic patterns during embryogenesis in *Coffea arabica* cv. Catimor. **Plant Cell Report**, v.13, n. 3/4, p. 197–202, Jan. 1994.

ZHANG, W.; CHAIT, B. T. Profound : an expert system for protein identification using mass spectrometric peptide mapping information. **Analytical Chemistry**, v.72, n. 11, p.2482-2489, June 2000.