

ANÁLISES INTEGRADAS DE PROTEÔMICA E METABOLÔMICA ASSOCIADAS À QUALIDADE DO CAFÉ

Vladimir C. SILVA, E-mail: vladimir@cenargen.embrapa.br; Jorge A. T. MELO; Eder A. BARBOSA; Luciano P. da SILVA; Carlos BLOCH JR; Alan C. ANDRADE

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia-NTBio, Brasília, DF.

Resumo:

A recente introdução de tecnologias proteômicas e metabolômicas na análise e pesquisa da qualidade de alimentos inaugura uma nova era de caracterização e identificação molecular. A pesquisa com café, em particular, experimenta um incrível desenvolvimento nas áreas de caracterização de sabor, aroma e qualidade de frutos. O presente estudo demonstra os benefícios da integração de estratégias proteômicas e metabolômicas para avaliar dois tipos de grãos de café pré-selecionados por critérios de seleção sensoriais. Os resultados até agora claramente indicam a existência de proteínas diferenciais e pequenas moléculas que podem ser utilizadas na identificação de marcadores moleculares associados à qualidade.

Palavras-chave: Espectrometria de Massa, Proteína, Cromatografia Líquida, Cromatografia Gasosa, Qualidade e *Coffea*.

Abstract:

The recent introduction of proteome and metabolome technologies into food quality research and analysis inaugurate a new era of molecule screening and characterization. Coffee research, in particular, experienced a massive boost in the areas of taste, flavor and fruit quality characterization. The present work demonstrates the benefits of integrating proteome and metabolome strategies to evaluate two types of pre-selected coffee beans by sensorial quality criteria. The results so far clearly indicate differential proteins and small molecules that may be used to produce molecular fingerprints relevant to quality control.

Key words: Mass Spectrometry, Proteins, Liquid Chromatography, Gas Chromatography, Quality and *Coffea*.

Introdução

Relevantes alterações quantitativas e qualitativas acompanham o desenvolvimento do fruto de café, ilustrando a importância do seu estudo para melhor compreender as características finais dos grãos. Essas alterações morfológicas são acompanhadas também por mudanças bioquímicas que contribuem para determinar a qualidade do produto final, que é o café servido comercialmente (De Castro et al., 2006).

Atualmente os mercados procuram plantas e grãos de café com características peculiares que as distinguem dos demais (maior ou menor quantidade de cafeína, presença de metabólitos que atuam como antioxidantes, etc.) que são definidos como padrões de qualidade (Farah et al., 2006). Contudo, é necessário o estudo detalhado dos compostos presentes nas diversas fases de desenvolvimento do fruto de café para conhecermos as moléculas que estão direta ou indiretamente relacionadas à obtenção de um café de boa ou de má qualidade. Para estudar essas mudanças e suas conseqüências a análise de proteínas e metabólitos presentes no grão de café são fundamentais para distinção dos tipos e qualidades dos grãos de café (De Castro et al., 2005).

Com o avanço de métodos analíticos como cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massa, é possível a identificação de várias moléculas em misturas complexas oriundas de animais ou plantas (Vaast et al., 2006). A partir de um banco de dados de informações do genoma de determinada espécie é possível caracterizar sua composição protéica por meio da extração, purificação e seqüenciamento de peptídeos e proteínas presentes na mistura.

Hoje já é possível contar com um vasto banco de informações oriundas do projeto genoma do café brasileiro que dispõe de mais de 200 mil seqüências de ESTs de *Coffea spp.*, o que possibilita o cruzamento de informações do genoma para identificação de proteínas que são expressas no fruto em diferentes fases de formação (Vieira et al., 2006). A partir dessas informações é possível identificar e localizar onde determinadas proteínas estão em maior ou menor concentração e em que tecido elas são produzidas, gerando assim uma metodologia poderosa para os estudos de genômica funcional do café, através da integração de informações de seu proteoma e metaboloma.

Material e Métodos

Amostras de frutos em diferentes estágios de desenvolvimento e grãos de café foram pulverizadas em nitrogênio líquido e passaram por processo de extração de proteínas em 50% ACN. As mesmas foram concentradas em centrífuga a vácuo (SpeedVac, LabConco) e resuspensas em água acidificada para separação por cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa (RP-HPLC) em cromatógrafo da marca Shimadzu (Shimadzu Co, Japan) com uma coluna semipreparativa C18 218TP54 (4,6 x 250 mm; Grace-Vydac, USA) com fluxo de 2 mL/min e um gradiente de acetonitrila:TFA (99.9:0.1) de 0 a 100% em 60 minutos. As frações obtidas na separação foram analisadas em espectrometro de massa MALDI-TOF/TOF UltraFlex II (Bruker Daltoniks) para identificação das massas

moleculares. Para caracterização de estrutura e função as proteínas foram submetidas a redução em 50mM de ditioneio (DTT) e alquilação em 50 mM de iodoacetamida para posterior digestão com tripsina (Promega, wt_wt 1:50). Os peptídeos tripticos foram fragmentados e seqüenciados para posterior confronto com o banco de dados do genoma do café brasileiro.

Para a análise por GC/MS as amostras de grão verde foram pulverizadas em nitrogênio líquido. Em seguida pesou-se 1,0 g de cada amostra em um tubo falcon de 15 mL, adicionou-se 7,0 mL da solução de extração (água/metanol e acetato de etila, metanol puro e n-hexano), com agitação overnight. Em seguida o sobrenadante ($\pm 5,0$ mL) foi coletado e separado em outro tubo falcon e evaporado com um fluxo de gás nitrogênio, para redução de volume. Após a evaporação, o resíduo foi dissolvido em n-hexano e centrifugado a 12.000 rpm. Foram injetados 2,0 μ L da amostra no GC/MS Shimadzu modelo QP-2010 (Shimadzu Co, Japan) equipado com um injetor do tipo split-splitless e ionização por impacto de elétrons. A coluna utilizada foi uma Rtx-5MS de sílica (30 m x 0,25 mm; Restek, USA), utilizando hélio como gás de arraste (1 mL/min). A temperatura do forno foi programada de 50° a 295° C com uma rampa de 8° C/min.

Resultados

As diversas frações proteicas separadas por RP-HPLC são mostradas em cromatograma da figura 1 onde está em evidência o peptídeo de massa 1327,88 Da, fragmento da proteína mostrado em espectro de massa na figura 2.

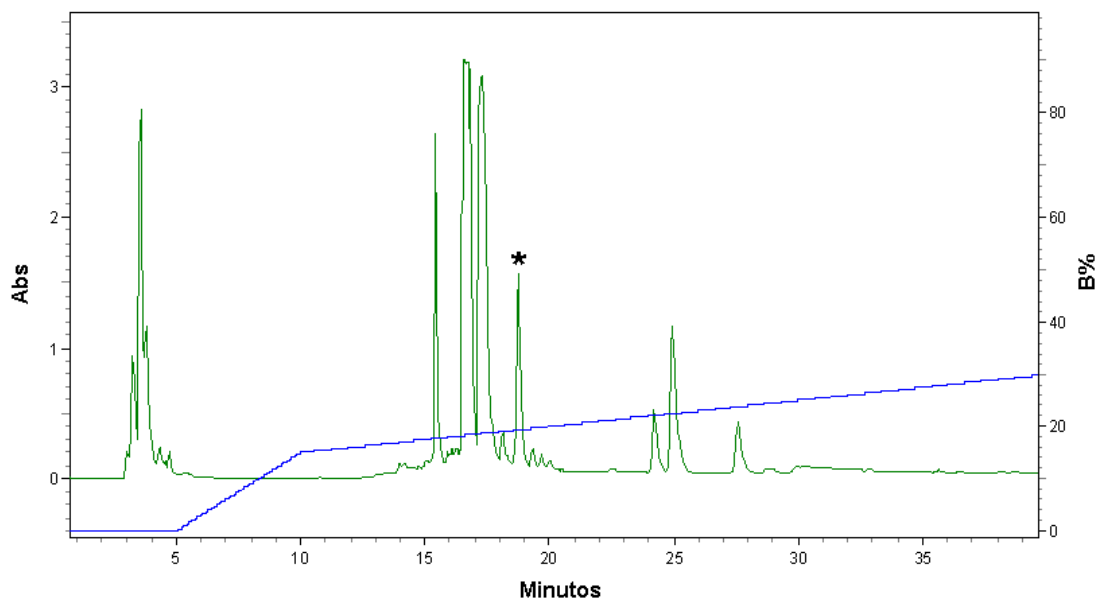


Figura 1: Cromatograma de RP-HPLC de extrato protéico digerido de grão verde de café mostrando em asterisco a fração correspondente a peptídeo 1327,88 Da .

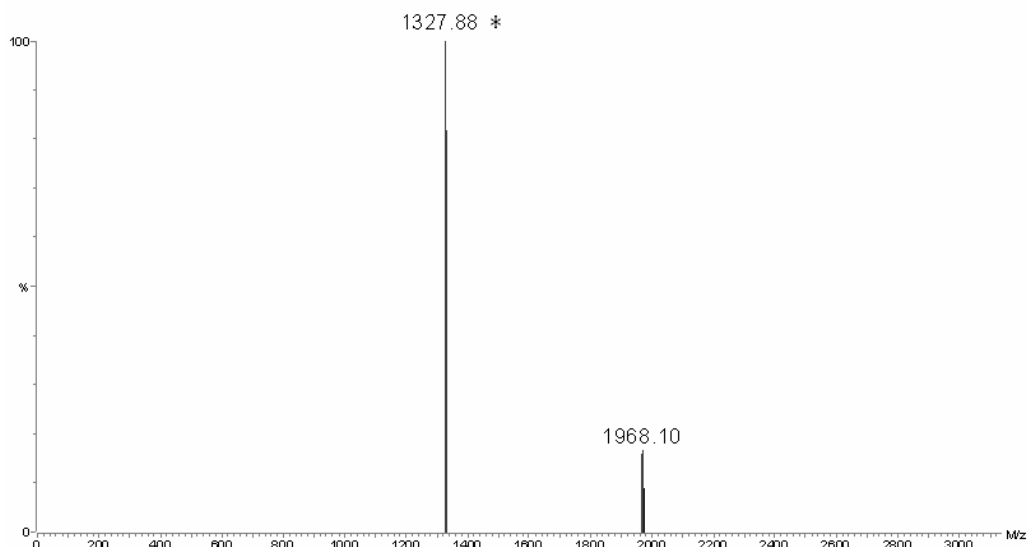


Figura 2: Espectro de massa de MALDI-TOF/TOF MS mostrando a massa molecular da peptídeo em evidência no cromatograma da figura 1 (fração em asterisco).

Com a digestão das frações protéicas separadas do extrato de endosperma de grão de café foi possível a fragmentação por espectrometria de massa em tandem (MS/MS) e o sequenciamento dos peptídeos como ilustra a figura 3.

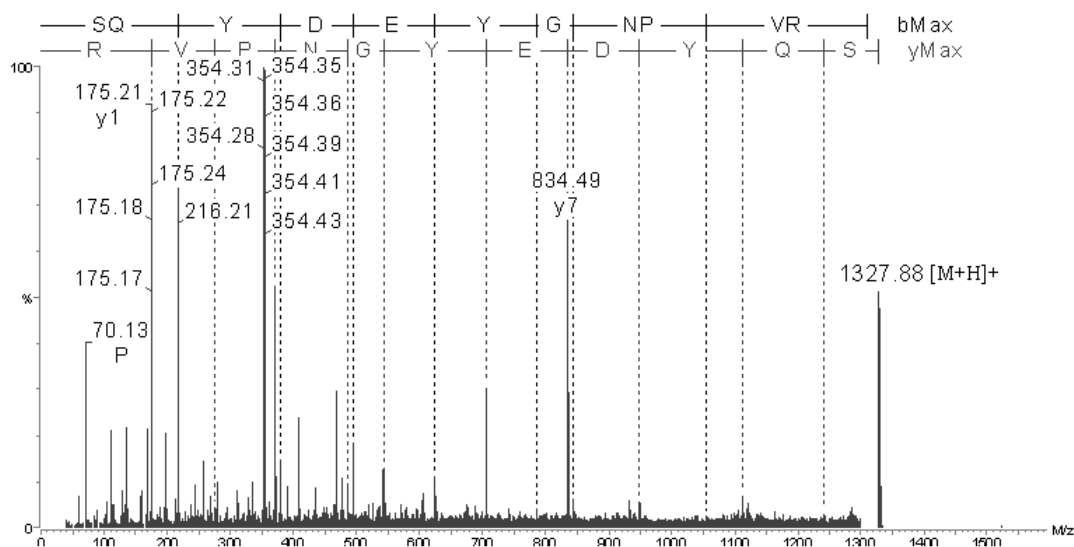


Figura 3: Espectro de MS/MS com seqüência de peptídeo triptico de proteína da família das *dehydrins*.

As figuras 4 e 5 representam os cromatogramas obtidos no sistema de LC/MS, com a análise em triplicata de uma amostra de grão verde. Neste experimento avaliou-se qualitativamente a presença dos metabólitos secundários não voláteis.

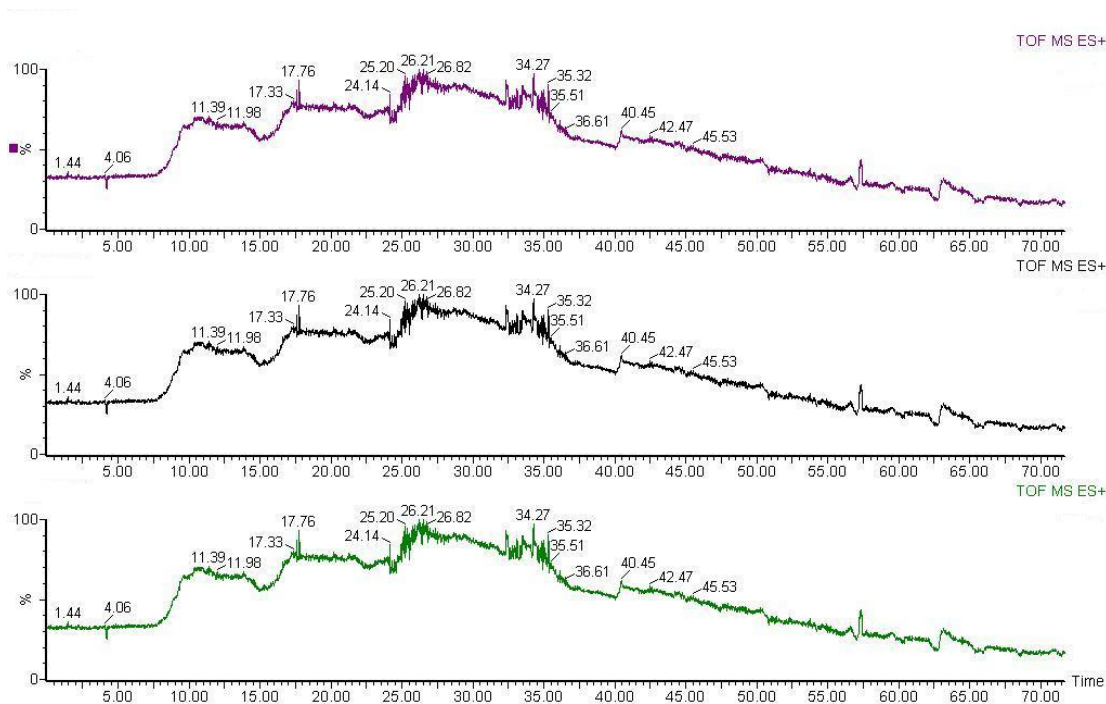


Figura 4: Cromatograma de LC/MS com análise em triplicata para uma amostra de café de boa qualidade.

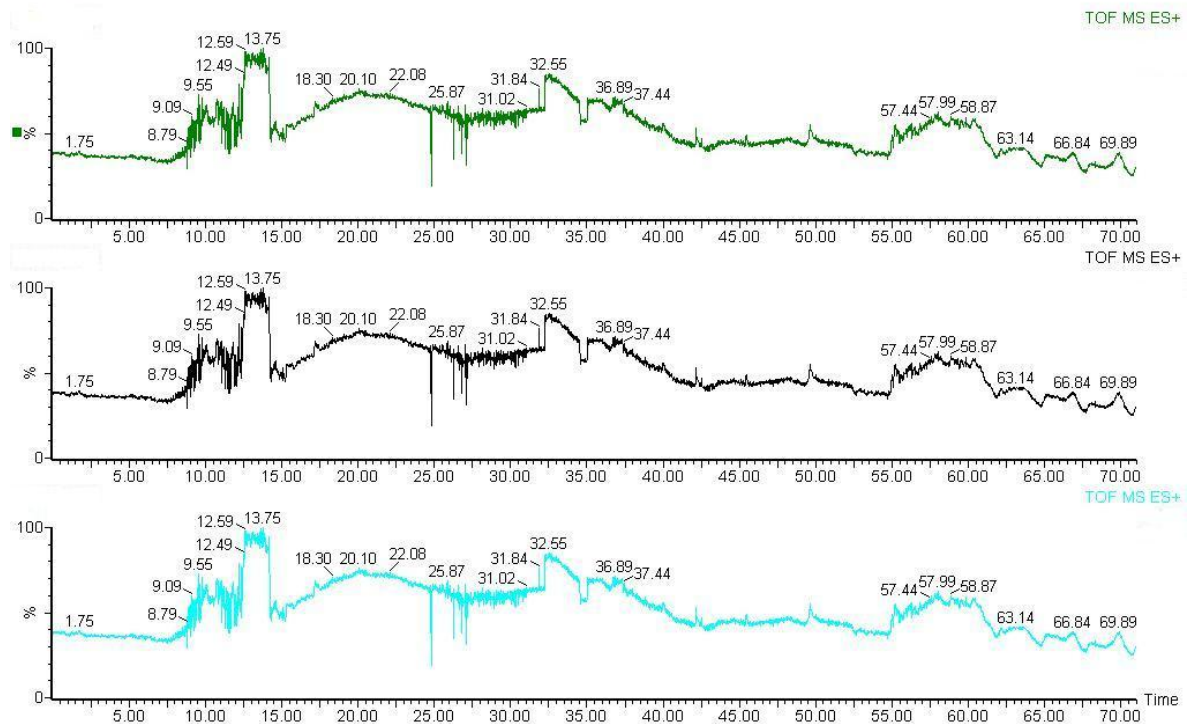


Figura 5: Cromatograma de LC/MS com análise em triplicata para uma amostra de café de qualidade inferior.

Para cada tipo de solvente utilizado nos procedimentos de extração, estão listadas as figuras com os respectivos cromatogramas comparativos entre as mesmas amostras (Figuras 1 e 2).

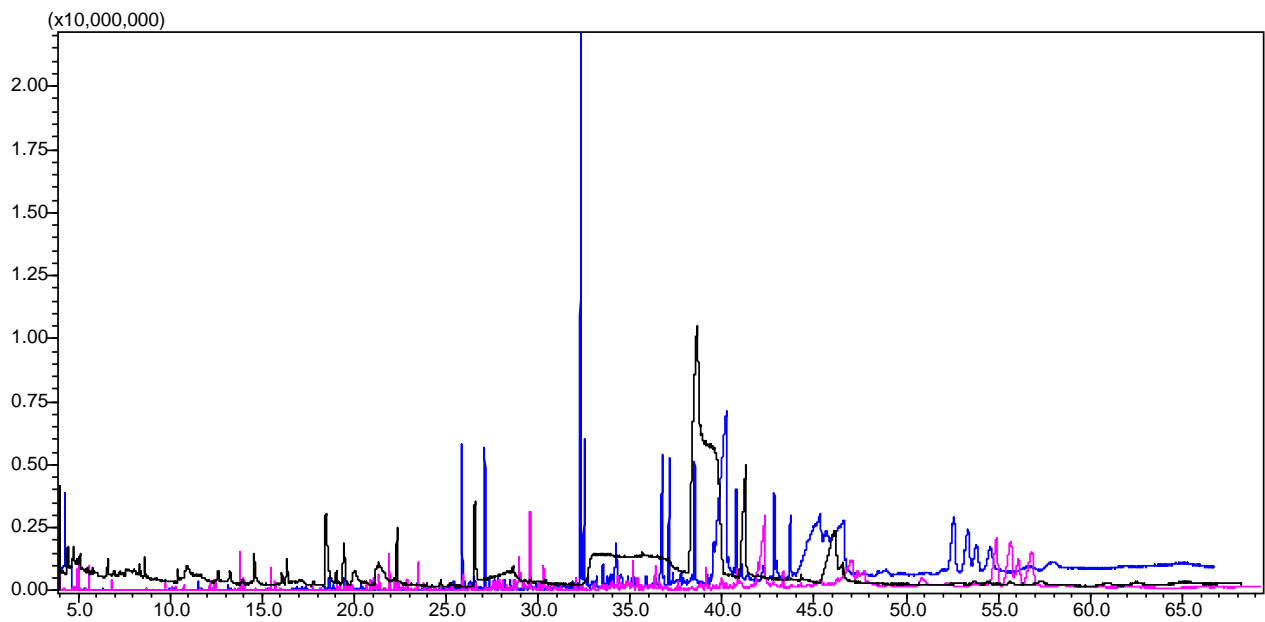


Figura 6: Sobreposição dos cromatogramas para a amostra de grão riado. Traço Preto: extração com metanol; Traço Azul: extração com água/metanol e acetato de etila; e Traço Rosa: extração com n-hexano.

Observando-se os perfis cromatográficos das amostras de café riado (Fig.6), mas com a utilização dos diferentes solventes de extração pode-se constatar significativas diferenças, principalmente relacionadas à quantidade de frações presentes.

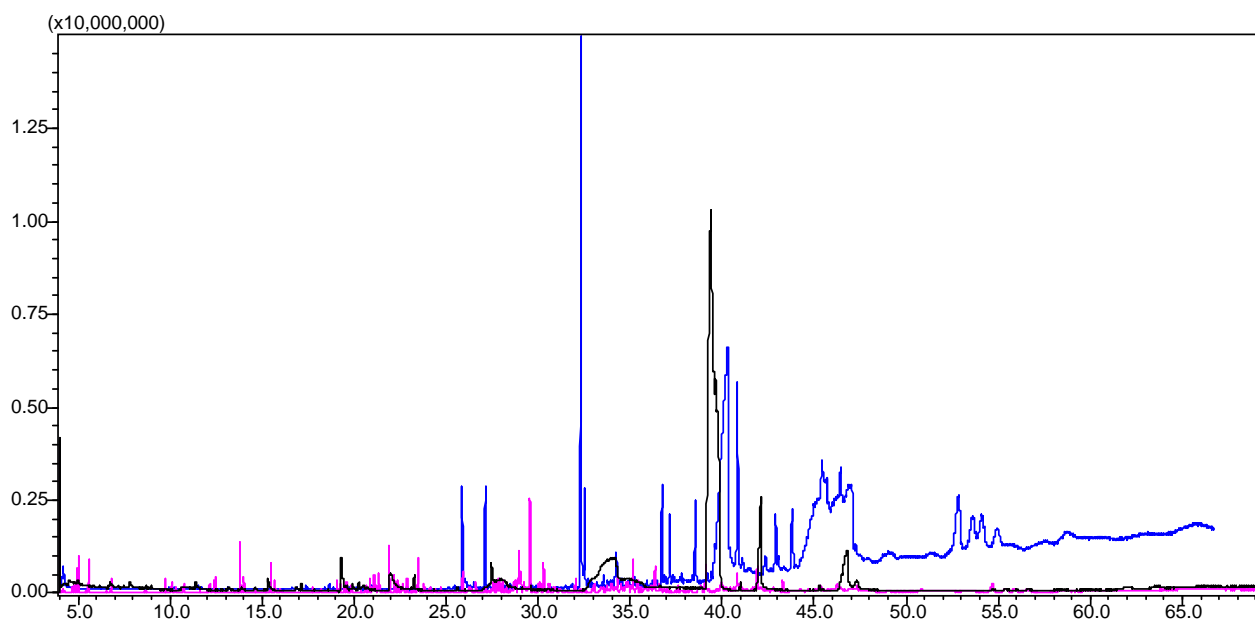


Figura 7: Sobreposição dos cromatogramas para a amostra de grão estritamente mole. Traço Preto: extração com metanol; Traço Azul: extração com água/metanol e acetato de etila; e Traço Rosa: extração com n-hexano.

Discussão e Conclusão

A metodologia utilizada nas análises de caracterização do perfil protéico de grãos de café permitiu a detecção e caracterização de vários fragmentos tripticos presentes no extrato protéico das amostras. Os resultados do sequenciamento *De novo* desses peptídeos por MS/MS permite a identificação da proteína correspondente através de análises de tBlastn na Base de Dados do Genoma Café.

As análises do perfil de metabólitos não voláteis, utilizando-se a espectrometria de massa por LC-MS, foram eficientes em detectar diferenças significativas entre amostras de grãos de café com qualidade diferenciada.

Dos três solventes utilizados nas extrações para as análises do perfil de metabólitos voláteis por GC-MS, o que apresentou melhor rendimento no processo de extração foi o n-hexano, em um nível intermediário o metanol, e com resultado mais satisfatório a mistura de água/metanol e acetato de etila. Pela comparação dos perfis cromatográficos entre as amostras de grãos de café com qualidade diferenciada (riado *v.s* estritamente mole) pode-se observar algumas frações diferenciais entre as amostras.

As análises integradas do proteoma e do metaboloma de café apresentam grande potencial de aplicação nos estudos de genômica funcional para a identificação e caracterização de macromoléculas associadas e/ou determinantes da qualidade nos diferentes estágios de desenvolvimento do fruto. Entretanto, verifica-se ainda a necessidade de aprimoramento da metodologia, com a pesquisa de novos métodos de extração, purificação e análises com vistas à permitir a identificação inequívoca do maior número de proteínas e metabólitos que possam estar direta ou indiretamente envolvidos com a qualidade dos grãos de café.

Agradecimentos

Este projeto é financiado pelo Consórcio Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento do Café (CBP&D-Café) e FINEP.

Referências Bibliográficas

- De Castro, RD and Marraccini P (2006). Cytology, biochemistry and molecular changes during coffee fruit development. *Braz. J. Plant Physiol.*, 18(1):175-199.
- Vieira, LGE; Andrade, CA; Colombo, CA, Pereira GAG, et al., (2006). Brazilian coffee genome project: an EST-based genomic resource. *Braz. J. Plant Physiol.*, 18(1): 95-108.
- Vaast P, Bertrand B, Perriot JJ, Guyot B, Génard M (2006). Fruit thinning and shade improve bean characteristics and beverage quality of coffee (*Coffea arabica* L.) under optimal conditions. *J. Sci. Food Agric.* 86: 197-204.
- De Castro RD, Estanislau WT, Carvalho MLM, Hilhorst HWM (2005). Functional development and maturation of coffee (*Coffea arabica*) fruits and seeds. *Proceedings of the 20th International Scientific Colloquium on Coffee*, Bangalore, International Scientific Association on Coffee, Paris, pp.619-635.
- Farah A, Monteiro MS, Calado V, Franca AS, Trugo LC (2006). Correlation between cup quality and chemical attributes of Brazilian coffee. *Food Chemistry* 98: 373-380.