

O CONTEÚDO PROTÉICO SOLÚVEL EM ÁGUA DO ENDOSPERMA DE CAFÉ É AMPLAMENTE DIGERÍVEL POR TRIPSINA

José de Lima Cardozo Filho¹ e Carlos Bloch Jr.²

¹ Bolsista de Pós-doutorado, DSc, Embrapa CENARGEN – Brasília-DF, cardozo.filho@gmail.com

² Pesquisador, PhD, Embrapa CENARGEN – Brasília-DF, carlos.bloch@embrapa.br

RESUMO: O presente estudo tem por objetivo principal investigar o perfil proteico do endosperma de *Coffea canephora* solúvel apenas em água destilada por meio de sua caracterização cromatográfica, das assinaturas dos tempos de retenção de suas proteínas intactas e dos seus respectivos padrões de digestão triptica, bem como o sequenciamento de alguns peptídeos derivados da tripsinólise, para uma inequívoca identificação de procedência do material proteico extraído. Os dados obtidos demonstram que os componentes proteicos do endosperma de *C. canephora* solúvel em água possui uma significativa quantidade de proteínas, ou seja, a partir de 10 gramas de endosperma seco, foram obtidos 400 mg de um concentrado proteico. Duas amostras desta fração proteica solúvel, uma intacta e outra submetida a proteólise, foram fracionadas por meio de cromatografia líquida de alta eficiência, utilizando-se coluna analítica de fase reversa (RP-HPLC). O produto da digestão triptica separado por RP-HPLC foi analisado por espectrometria de massa do tipo MALDI-TOF/MS e sequenciado a partir dos dados de experimentos de fragmentação do tipo MS/MS. O conjunto de resultados apresentados neste trabalho evidencia, com elevado grau de segurança, que a fração proteica do endosperma de *C. canephora* solúvel tão-somente em água destilada e desprovida de qualquer tratamento físico ou químico desnaturante, apresenta um amplo grau de digestibilidade por tripsina, uma enzima do sistema digestório de animais monogástricos.

PALAVRAS-CHAVE: *Coffea canephora*; endosperma, proteínas, peptídeos.

WATER-SOLUBLE PROTEIN CONTENT FROM COFFEE BEANS IS THOROUGHLY DIGESTED BY TRYPSIN

ABSTRACT: The present research focus on the protein fingerprinting of the water-soluble extraction of *Coffea canephora* endosperm content obtained by reverse phase chromatography (RP-HPLC) separations and by mass spectrometry analyses. The applied extraction methodology yielded a significant amount of water-soluble protein (10 gr of dried endosperm produced 400 mg of protein) from which intact and trypsin digested aliquots were submitted to RP-HPLC. The resulting chromatographic fractions were mass analyzed by MALDI-TOF/MS and the most intense ions observed were fragmented by MS/MS experiments in order to determine their amino acid sequences and, therefore, their unambiguous origin. Our data strongly suggest that the water soluble protein fraction from *C. canephora* endosperm, prior to any physical and/or chemical denaturing process, show a thorough trypsin proteolytic profile that could be comparable to an *in vivo* monogastric digestion.

KEY WORDS: *Coffea canephora*; endosperm, protein, peptides.

INTRODUÇÃO

No apagar das luzes do século XVII, precisamente em 1699, Antoine Galland publicou um pequeno livro que inaugura a abordagem de um gigantesco tema de interesse para a agricultura e economia atuais: “*DE L’ORIGINE ET DU PROGRES DU CAFÉ – Sur un Manuscrit Arabe de la Bibliotheque du Roy*” (Galland, 2011). Conforme relatos do próprio autor, a obra teve por base um manuscrito árabe depositado na biblioteca do rei da França, bem como seu conhecimento da língua árabe, de como o café era preparado, servido e bebido em Constantinopla, no Cairo e em Áden, entre outras cidades do oriente que o autor teria visitado naquele período. Em poucas linhas, Galland deixa claro que foram as propriedades estimulantes intrínsecas presentes na bebida que a fizeram suplantarem barreiras culturais e todo tipo de preconceito religioso e/ou tribal para, enfim, tornar-se o que hoje conhecemos como a bebida mais cosmopolita de que o mundo tem registro. Desde o “*Da origem e propagação do café*” até os tempos atuais, muito se estudou sobre sua composição, manejo, doenças, influências ambientais, qualidade da bebida, processamento dos grãos e até mesmo os genomas das principais espécies. Tudo visando o maior entendimento possível de uma planta que, além de revelar-se uma das mais importantes fontes de riqueza do mercado mundial, igualmente impõe desafios científicos e tecnológicos

significativos para atender uma crescente demanda, sempre exigente e qualificada. Entretanto, pode-se especular que nada disso seria possível se a característica estimulante da bebida, como relatada por Galland, não fosse o seu principal atrativo para os humanos. É, portanto, precisamente este o principal foco do presente estudo, resumível em uma única pergunta: *Que valor de mercado poderia ter o café se nele não existissem as moléculas que tanto valorizam a bebida?* Tomando a hipotética ausência de princípios ativos estimulantes no café como premissa fundamental, nossa pesquisa avalia o conteúdo proteico da fração solúvel em água extraída do endosperma de sementes maduras de *Coffea canephora* como principal fonte de valor nutritivo, a exemplo do que se faz para outras dicotiledôneas como a ervilha, a lentilha, o feijão, a soja, entre outras, além de apresentarmos o seu perfil proteolítico resultante de uma tripsinólise controlada, como uma forma de mimetizar aspectos de digestibilidade em monogástricos.

MATERIAL E MÉTODOS

O extrato proteico da semente seca de café (*Coffea canephora*, cedido pelo Lisimetro Incaper) foi obtido de 10 gramas de sementes pulverizadas em moedor Kruper (modelo F203) imediatamente após congelamento daquelas em nitrogênio líquido (N_{2(l)}). O pó obtido passou por uma etapa de delipidação, primeiro em etanol por 15 minutos e depois em eter de petróleo por 5 minutos. A mistura foi deixada para a precipitação das partículas por aproximadamente 5 minutos, período após o qual a fase etérea foi removida. Um volume de 100 mL de água destilada foi adicionado ao material particulado delipidado e a mistura foi mantida a aproximadamente 60 °C durante 15 minutos. A mistura foi centrifugada a 2000 g, o respectivo sobrenadante foi congelado em N_{2(l)} e liofilizado em seguida. O extrato liofilizado foi recuperado em uma solução de água:metanol (1:5, v:v) em torno de 0 °C e posteriormente mantida a -20 °C por 12 horas. Após esse período, as amostras foram imediatamente centrifugadas a 12000 g durante 30 minutos sob refrigeração (4 °C). O precipitado foi recuperado em 25 mL de água, congelado em N_{2(l)} e liofilizado. O extrato proteico (10 mg) foi submetido a uma incubação com tripsina imobilizada (Thermo) (100 µL) em bicarbonato de amônio (50 mM) por 12 horas, a 37 °C. A mesma quantidade de extrato proteico, também recuperada em bicarbonato de amônio (50 mM) e mantida por 12 horas a 37 °C, foi utilizada como controle experimental da digestão triptica. O resultado da digestão foi avaliado por espectrometria de massa mediante aquisição de espectros em equipamento MicroFlex (Bruker Daltonics), operado em modo positivo conforme configuração eletrônica apropriada para análise na faixa de massa de 1000 Da a 20000 Da. As análises cromatográficas das amostras foram procedidas por RP-HPLC em um cromatógrafo Shimadzu equipado com coluna µRPC C2/C18 ST (4,6/100). A eluição de peptídeos e proteínas foi obtida conforme método otimizado. Cada fração eluída foi monitorada tanto a 216 nm quanto a 280 nm. As frações cromatográficas eluídas foram coletadas manualmente, congeladas em N_{2(l)} e liofilizadas. O conteúdo de cada fração foi recuperado em 25 µL de água, misturado a uma solução de α-ciano-hidroxicinâmico (ACHC) na proporção 1:1 (v:v, amostra:ACHC) e depositado em placa de MALDI. A análise espectrométrica de cada fração foi procedida em equipamento Ultraflex III (Bruker Daltonics), primeiro no modo MS positivo, depois em modo positivo MS/MS, etapa em que íons relativos aos fragmentos tripticos do extrato proteico de café foram fragmentados com vistas à elucidação das sequências primárias dos peptídeos. As sequências peptídicas assinaladas obtidas foram submetidas ao algoritmo Protein Blast a fim de se identificar as proteínas a partir de cada fragmento triptico encontrados.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O concentrado de proteínas obtido da semente de café robusta (*Coffea canephora*), cuja solubilidade em soluções aquosas foi facilmente comprovada nas etapas da análise do próprio extrato, exhibe composição geral (**Figura 1**, **Figura 2** e dados não mostrados) semelhante àquela relatada por literatura especializada (De Castro e Marracini, 2006), ainda que haja divergências maiores ou menores quanto à metodologia de extração, por exemplo. A digestibilidade desse concentrado posta à prova mediante ação enzimática da tripsina, resultou na modificação da natureza proteica do extrato sem qualquer prejuízo ao seu elevado grau de solubilidade em sistema aquoso inicial (**Figura 1** e **Figura 2**). O próprio perfil cromatográfico do extrato proteico de café digerido (**Figura 1**), embora carente de pormenores, evidencia alterações ligadas à degradação enzimática das proteínas se comparado ao controle (o extrato proteico não processado por tripsina). Entre 6 e 12 minutos no cromatograma, pode ser observada uma elevação da linha de base do traço cromatográfico relativo ao extrato de café digerido (traço descontínuo), o que é típico para produtos de degradação de materiais proteicos. Também, a análise espectrométrica posterior das frações oriundas de proteólise coletadas nesse período (espectros MS não mostrados) revelaram presença de peptídeos não detectados no controle, não submetido a tripsinólise. Comparativamente, ainda, o registro espectrofotométrico da eluição após 14 minutos de análise, dá sinais da redução do conteúdo proteico daquela fração. Nos tempos seguintes, entre 15 e 17 minutos, pode ser percebido um aumento da intensidade do sinal registrado referente ao extrato digerido em relação ao controle. Isso pode ser devido a alguns fatores, por exemplo uma alteração do comportamento absorvivo de fragmentos maiores, em virtude de eventual clivagem enzimática e consequente maior exposição de grupos cromóforos de aminoácidos que antes estavam menos acessíveis à radiação UV. Contudo, o espectro obtido (**Figura 2**) após a incubação do extrato com a tripsina constitui evidência clara da digestão do extrato, constando ali detectada uma quantia substancial de íons relativos aos fragmentos peptídicos gerados a partir das proteínas do concentrado proteico do café. A estrutura primária de alguns desses fragmentos peptídicos foi elucidada pela interpretação de espectros MSMS para comprovar, sem qualquer ambiguidade,

a origem da proteína parental, ou seja, das proteínas solúveis de endosperma de *Coffea canephora*, tal como exemplificado na **Figura 3**, e algumas de suas respectivas sequências primárias estão apresentadas na **Tabela 1**. Vale observar que o sequenciamento completo de todas os fragmentos proteolíticos obtidos a partir da metodologia acima descrita não fazem parte dos objetivos principais do presente estudo. Os poucos exemplos aqui apresentados nos servem apenas como evidências experimentais que corroboram com maior exatidão a robustez da hipótese principal.

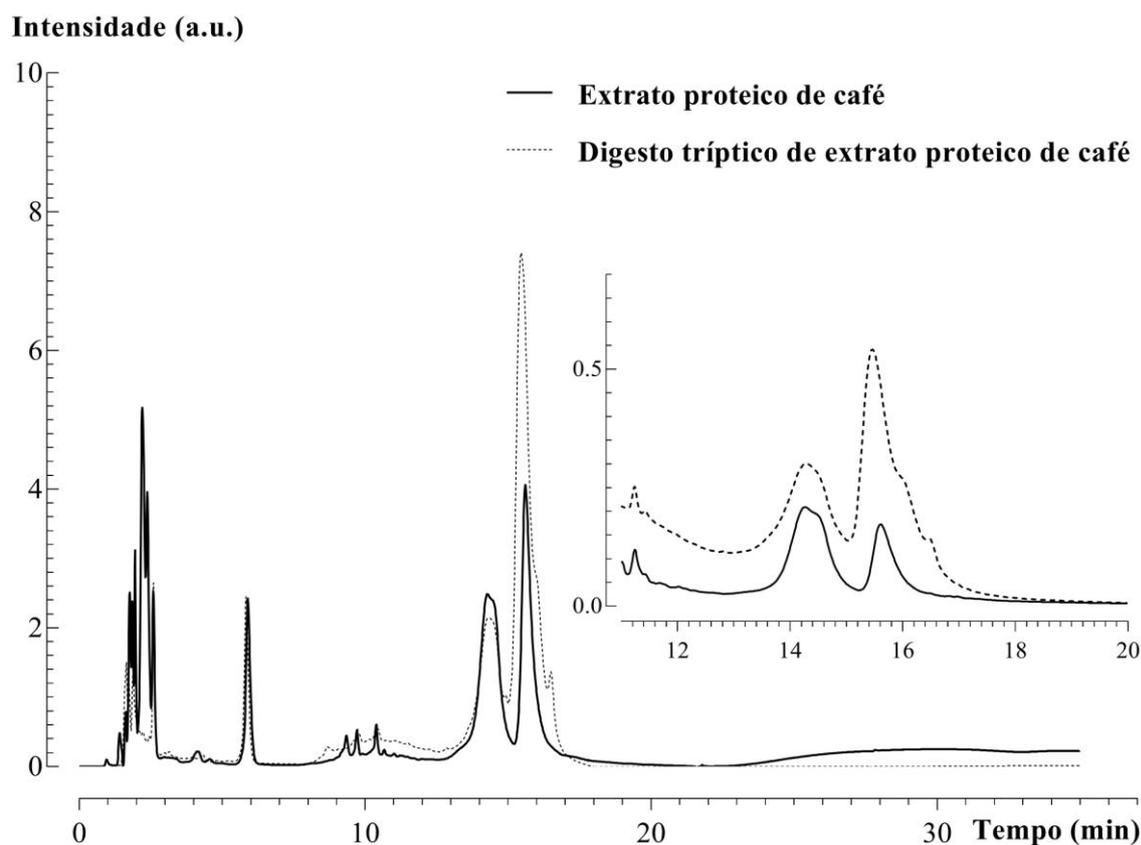


Figura 1 Cromatogramas (traços correspondentes ao monitoramento em 216 nm) sobrepostos do extrato proteico de café (traço contínuo) e do mesmo extrato após digestão por tripsina (traço descontínuo). A eluição dos componentes não resolvidos nos primeiros 5 minutos foi realizada mediante aplicação de gradiente variando a concentração de acetonitrila do eluente de 5% a 75% (70%) em 20 minutos (de 5 a 25 minutos). Na porção final da análise (de 25 a 35 minutos), elevou-se a concentração de acetonitrila do eluente para 95% visando a remoção de eventuais ligantes remanescentes. O inserto acima e à direita detalha o traço do monitoramento em 280 nm das frações eluídas entre 11 e 20 minutos.

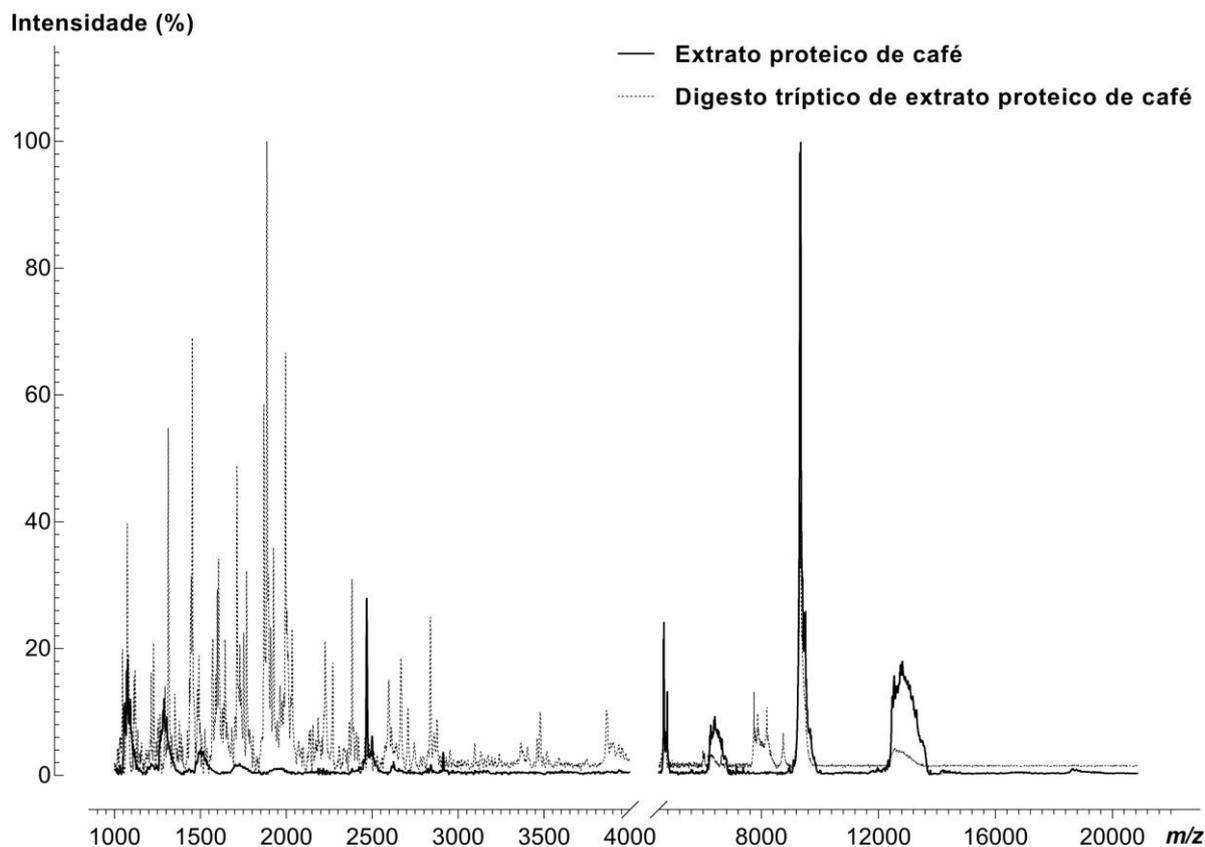


Figura 2 Espectros MALDI-TOF/MS sobrepostos do extrato proteico de café (traço contínuo) e do mesmo extrato após digestão por tripsina (traço descontínuo). Os espectros contemplam faixa de massa entre 1000 Da e 2000 Da. O gráfico foi segmentado de modo a ampliar a faixa de massa compreendida entre 850 Da e 4000 Da, em que se pode verificar maior concentração de íons relativos à fragmentação trípica do conteúdo proteico do extrato. O segundo seguimento mostra as alterações ocorridas na faixa de massa entre 4000 Da e 20000 Da em decorrência da digestão por tripsina.

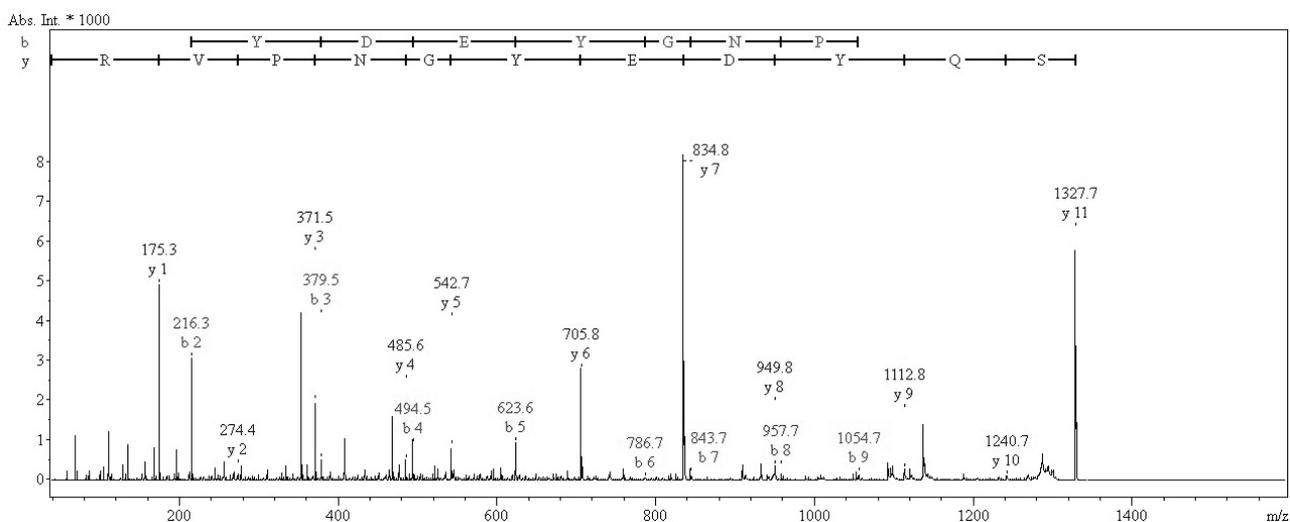


Figura 3 Espectro de MALDI-TOF/TOF/MS demonstrando a fragmentação do íon correspondente ao fragmento trípico ftCcanPh#002 (Tabela 1) e demonstração do sequenciamento *de novo*. Estão assinalados os íons das séries b e y utilizados para a interpretação do espectro e consequente elucidação da sequência do peptídeo.

Tabela 1 Lista de quatro sequências primárias obtidas por sequenciamento *de novo* dos fragmentos peptídicos liberados de proteínas do concentrado proteico de *C. canephora* pela ação enzimática de tripsina. A tabela apresenta ainda informações referentes à fração cromatográfica na qual cada peptídeo foi detectado, bem como suas respectivas proteínas de provável origem, identificadas por meio de análise em algoritmo *blastp*.

Identificação	Sequência	Fr (Rt)	Origem (proteína; N° de acesso)
ftCcanPh#001	R . QTDEYGNPAR	Fr03 (2,55 min)	Dehidrina DH1b; ABC55671.1
ftCcanPh#002	K . SQYDEYGNPVR	Fr06 (8,37 min)	Dehidrina DH1b; ABC55671.1
ftCcanPh#003	EPAGEEQQQTQQK	Fr03 (2,55 min)	2S Protein-like; XP_027127517
ftCcanPh#004	K . LSENGLPQEADVFNPR	Fr11 (12,51 min)	Proteína 11S; AAC61881.1

CONCLUSÃO

Uma vez que os dados aqui apresentados e discutidos demonstram que o significativo conteúdo proteico extraído de endosperma de *C. canephora*, solúvel apenas em água destilada, apresenta um expressivo grau de digestibilidade quando submetido a incubação com tripsina *in vitro*, conclui-se que a resposta para a nossa hipótese inicial de trabalho, elaborada na forma de uma pergunta - *Que valor de mercado poderia ter o café se nele não existissem as moléculas que tanto valorizam a bebida?* - pode ser respondida favoravelmente ao menos sob o aspecto nutricional. É que admitindo-se um fictício cenário evolutivo, no qual as espécies de café existentes fossem desprovidas de todos os componentes do metabolismo secundário responsáveis pelo consagrado valor da bebida, mesmo assim o café ainda poderia ser utilizado como fonte de proteínas, facilmente extraídas em água e digerida por mamíferos e outros animais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

GALLAND, A. (2011) *Da origem e propagação do café*. Editora Octavo Ltda. São Paulo, SP. DE CASTRO, R.D.; MARRACINI, P. *Cytology, biochemistry and molecular changes during coffee fruits development*. Brazilian Journal of Plant Physiology, 18, 177-199. National Center for Biotechnology Information (NCBI)[Internet]. *Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information*. Disponível em: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins>. Acessado em: 19/07/2019.