

# UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

**Clóvis Oliveira Silva**

## FORMAÇÃO E DEPOSIÇÃO DA PAREDE CELULAR EM SEMENTES DE CAFÉ DURANTE O DESENVOLVIMENTO DA SEMENTE

Este exemplar corresponde à redação final  
da tese defendida pelo(a) candidato (a)  
Clóvis Oliveira Silva  
e aprovada pela Comissão Julgadora.



Tese apresentada ao Instituto de  
Biologia para obtenção do Título de  
Doutor em Biologia Celular e Estrutural,  
na área de Biologia Celular.

Orientador: Prof. Dr. Marcos Silveira Buckeridge

**Campinas, 2006**

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL  
CÉSAR LATTES  
DESENVOLVIMENTO DE COLEÇÃO

UNIDADE DC  
Nº CHAMADA T/UNICAMP  
Si38f  
V \_\_\_\_\_ EX \_\_\_\_\_  
TOMBO BC/ 71350  
PROC 16.145-07  
C \_\_\_\_\_ D X  
PREÇO 11,00  
DATA 07-02-07  
BIB-ID 399247

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

Si38f	<p>Silva, Clovis Oliveira Formação e deposição da parede celular em sementes de café durante o desenvolvimento da semente / Clovis Oliveira Silva. -- Campinas, SP: [s.n.], 2006.</p> <p>Orientador: Marcos Silveira Buckeridge. Tese (doutoradç) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.</p> <p>1. Alfa-galactosidase. 2. Galactomanano. 3. Parede celular. 4. <i>Coffea arábica</i>. 5. <i>Coffea canephora</i>. I. Buckeridge, Marcos Silveira. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.</p> <p style="text-align: right;">(scs/ib)</p>
-------	--

**Título em inglês:** Cell wall formation and deposition in coffee seeds development.

**Palavras-chave em inglês:** Alpha-galactosidase; Galactomannan; Cell wall; *Coffea arábica*; *Coffea canephora*.

**Área de concentração:** Biologia Celular.

**Titulação:** Doutor em Biologia Celular e Estrutural.

**Banca examinadora:** Marcos Silveira Buckeridge, Paulo Mazzaffera, Emerson Alves Silva, Luiz Gonzaga Esteves Vieira, Carlos Alberto Labate.

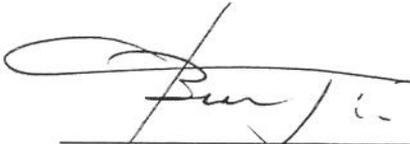
**Data da defesa:** 31/08/2006.

**Programa de Pós-Graduação:** Biologia Celular e Estrutural.

Campinas, 31 de agosto de 2006.

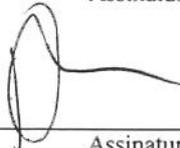
**BANCA EXAMINADORA**

Prof. Dr. Marcos Silveira Buckeridge (Orientador)



Assinatura

Prof. Dr. Paulo Mazzafera



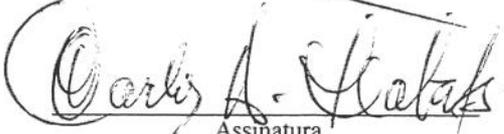
Assinatura

Prof. Dr. Luiz Gonzaga Esteves Vieira



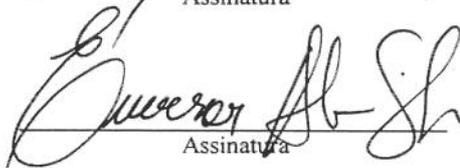
Assinatura

Prof. Dr. Carlos Alberto Labate



Assinatura

Prof. Dr. Emerson Alves da Silva



Assinatura

Profª. Dra. Marília Gaspar Maïs

Assinatura

Prof. Dr. Marco Aurélio Silva Tiné

Assinatura

Prof. Dr. Angelo Luiz Cortelazzo

Assinatura

200707720

## ÍNDICE

RESUMO .....	9
INTRODUÇÃO GERAL .....	11
Os carboidratos e a bebida do café.....	11
A formação e estrutura dos polissacarídeos do café.....	12
OBJETIVOS GERAIS.....	15
 <b>PARTE I PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UMA NOVA <math>\alpha</math> -D-GALACTOSIDASE ISOLADA DE ENDOSPERMA DE <i>COFFEA ARABICA</i> L. ...16</b>	
INTRODUÇÃO.....	17
<i>Coffea arabica</i> .....	19
A Parede Celular .....	21
Polissacarídeos de parede celular .....	22
Mananos e galactomananos: ocorrência e estrutura e funções.....	24
Biossíntese dos galactomananos .....	27
OBJETIVO.....	31
MATERIAL E MÉTODOS .....	32
Materiais Vegetal.....	32
Obtenção das membranas dos frutos de café .....	33
Isolamento da $\alpha$ -galactosidase .....	33
Purificação do manano de reserva de grãos de café.....	37
Imunolocalização da $\alpha$ -galactosidase .....	38

Sequenciamento N-Terminal.....	39
Sequenciamento da seqüências internas.....	39
Bioinformática.....	43
Clonagem do cDNA comprimento inteiro ('full-length') <i>CaGAL2</i> .....	44
Preparo das sondas.....	44
Análises do Northern e Southern-Blot.....	45
<b>RESULTADOS</b> .....	46
Purificação da $\alpha$ -galactosidase de endospermas de Grãos de Café.....	46
Separação das membranas celulares em gradiente de sacarose .....	52
Imunolocalização da $\alpha$ -galactosidase.....	56
Sequenciamento do N-terminal .....	58
Análise da seqüência do cDNA <i>CaGAL2</i> .....	58
As seqüências interna e N-terminal da proteína <i>CaGAL2</i> .....	60
Expressão do Gene <i>CaGAL2</i> .....	61
<b>DISCUSSÃO</b> .....	66
Purificação da $\alpha$ -galactosidase .....	66
Localização subcelular e função bioquímica da $\alpha$ -galactosidase do café.....	69
A $\alpha$ -galactosidase de café tem expressão específica no endosperma e é produto do gene <i>CaGAL2</i> .....	71
Importância fisiológica e biotecnológica da $\alpha$ -galactosidase de café .....	72
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS</b> .....	73
<b>PARTE II ESTUDO COMPARATIVO DA COMPOSIÇÃO DE POLISSACARÍDEOS DE SEMENTES DE CAFÉS VERDES DE <i>COFFEA CANEPHORA</i> E DE <i>COFFEA ARABICA</i> DE DIFERENTES VARIEDADES E PROCEDÊNCIAS</b> .....	85
<b>RESUMO</b> .....	86

<b>SUMMARY .....</b>	<b>86</b>
<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>86</b>
<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>88</b>
<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>91</b>
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....</b>	<b>103</b>
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>105</b>

## **Agradecimentos**

Ao Dr. Marcos Silveira Buckeridge cuja orientação, confiança permitiram a realização desse trabalho.

Ao Instituto de Botânica de São Paulo pela oportunidade de estagiar no Seção de Fisiologia e Bioquímica de Plantas.

Ao CNPq, pela ajuda financeira.

Ao Dr. Carlos Labate pela colaboração no trabalho de sequenciamento da proteína e pela oportunidade de estagiar no Departamento Genética da ESALQ, Piracicaba, SP.

Ao Dr. Pierre Marraccini do CIRAD, por sua colaboração na parte de biologia molecular.

Ao Dr. Luiz Gonzaga pela a oportunidade de estagiar no Departamento de Biotecnologia Vegetal do IAPAR.

Ao Alexander do Departamento Genética da ESALQ pelo auxílio no sequenciamento da proteína e pela amizade demonstrada.

A Lucia Ferreira pela ajuda com a parte de biologia molecular no Departamento de Biotecnologia do IAPAR, Paraná, e também sua amizade em Londrina.

As amigas Patrícia Pinho e Aline Cavalari pelos incontáveis auxílios técnicos e pela amizade demonstrada.

Ao Dr. Paulo Henrique Netto de Alcântara e Dr. Marco Aurélio Tiné pelo empenho e atenção a todas as solicitações.

Aos colegas Clóvis Fernandes, Claudia Alves, Ana Maria, Kelly, Minhoto, Cesar, Josimara, Liliana, João, Marabá, Marina, Amanda, Vanessa, Marília pelas sugestões e reflexões sobre os resultados obtidos.

Aos demais Colegas e funcionários do Seção de Fisiologia e Bioquímica de Plantas pelo auxílio durante as diversas etapas do trabalho.

Ao Departamento de Biologia Celular e Estrutural pela a oportunidade de participar do seu corpo discente.

Aos meus pais pelo exemplo de força e determinação.

Aos Amigos Elielson e Rose por toda ajuda e por apoio prestados.

Em especial a minha esposa Lucia, exemplo de companheirismo e dedicação e por sua paciência ao longo desses anos.

E Finalmente a Deus, por toda força motriz que me animou a concluir mais essa etapa na minha vida.

Aos meus filhos Mateus, Marcos e Bruno

Dedico

## RESUMO

Sabe-se que os açúcares de parede celular exercem influência direta na qualidade do café e que a proporção desses constituintes na parede celular do endosperma das sementes depende da espécie e também do estágio de maturação dos frutos. Grande parte da parede celular do café é insolúvel em água por ser constituída por um manano composto de uma cadeia principal de manose ligada beta (1,4) e que contém 1–2% de ramificações de galactose alfa (1,6) ligadas que formam aproximadamente 30% do peso seco de grãos dos cafés Arábica e Robusta. Sabe-se também que durante a maturação das sementes de café há um aumento da razão manose/galactose (M/G) do galactomanano entre 2:1 a 7:1 na 11ª semana após o florescimento para 7:1 a 40:1 na 31ª semana. Tais características poderiam ser explicadas através do controle genético da razão M/G do galactomanano por alteração nas enzimas de biossíntese dos polissacarídeos ou alternativamente por ação de enzimas editoras que alteram a estrutura do galactomanano ao fim do processo de maturação, produzindo a desramificação parcial do polímero por uma  $\alpha$ -galactosidase.

A partir dessas informações, a parte I deste trabalho, objetivou caracterizar o mecanismo de edição de galactomanano por uma  $\alpha$ -galactosidase durante o processo de síntese e deposição do manano em sementes de café. A atividade de  $\alpha$ -galactosidase das sementes em desenvolvimento atingiu o pico entre a 17ª e a 26ª semana após o florescimento. A  $\alpha$ -galactosidase purificada apresentou massa molecular de cerca de 40 kDa, sendo uma enzima com máxima atividade em pH 6,5 a uma temperatura entre 40 e 45°C. Ensaio *in vitro* mostraram que a  $\alpha$ -galactosidase purificada possui alta especificidade pelos galactomananos de café extraído durante o período de sua biossíntese e deposição. A enzima foi encontrada na fração microssomal e também solúvel de preparações de membrana, mostrando que a maioria é solúvel, mas uma pequena parte pode estar associada a vesículas de transporte. A seqüência N-terminal e mais quatro seqüências internas do polipeptídeo isolado permitiram deduzir a seqüência do cDNA *CaGAL2* presente no genoma do café. Utilizando sondas específicas, a

expressão de *CaGAL2* foi encontrada apenas no endosperma das sementes e apresentou um pico de expressão compatível com o pico de atividade enzimática. Utilizando um anticorpo anti- $\alpha$ -galactosidase de guar, a enzima foi localizada no citoplasma (e não na parede celular) de células do endosperma durante o período de máxima atividade e expressão gênica. Os dados sugerem que a *CaGAL2* seja uma enzima editora de galactomanano associada ao complexo biossintético ativo durante o processo de maturação das sementes.

Embora a composição dos polissacarídeos de grãos de café Arabica e Robusta sejam parecidas, ocorrem pequenas diferenças nas quantidades relativas de galactomanano e arabinogalactano presente nas duas espécies, (Redgwell, 2002). Desse modo a segunda parte do trabalho teve como objetivo comparar as composições dos polissacarídeos de parede celular de grãos de cafés verdes beneficiados das espécies *Coffea arabica* e *Coffea canephora* doados por uma indústria de café solúvel do Estado do Paraná, Brasil e de grãos obtidos a partir de espécimes *Coffea Canephora*, cultivares Apoatã, Conilon e Robusta e *Coffea Arabica*, cultivar Ouro Verde cedidas pelo Instituto Agronômico de Campinas (IAC). As diferenças na composição nos diferentes tratamentos alterar a qualidade final do produto.

Em conjunto, os resultados obtidos neste trabalho propiciam opções para a melhoria da qualidade do café através de busca de variedades de diferentes espécies com as características desejadas ou então a opção de poder efetuar alterações na estrutura e solubilidade do manano, alterando conseqüentemente o rendimento de extração para a industrialização de café solúvel.

## INTRODUÇÃO GERAL

### Os carboidratos e a bebida do café

Segundo os dados divulgados pelo Sindicato das Indústrias de café do Estado de São Paulo através de seu "site" ([www.sindicafesp.com.br/dload/pesq\\_tendencias\\_consumo\\_nov05.pdf](http://www.sindicafesp.com.br/dload/pesq_tendencias_consumo_nov05.pdf), data de acesso 26/06/2006), o consumo de café como bebida nas principais capitais brasileiras só perde para o consumo de água mineral. Todas as outras bebidas (sucos, leite, refrigerante etc.) perdem para o café conforme dados para o período entre os anos de 2003 a 2005).

A composição química dos grãos de café é caracterizada pela presença de vários constituintes voláteis e não voláteis como ácidos, aldeídos, açúcares, proteínas, aminoácidos, ácidos graxos, compostos fenólicos, entre outros (Sivetz, 1963). Dentre esses componentes, os açúcares estão em maior proporção nos grãos maduros de café. Além disso, os carboidratos também exercem influência direta nas características sensoriais do produto devido às complexas reações ocorridas durante a torrefação.

Os grãos de café possuem entre 48-60% de polissacarídeos sendo estes compostos predominantemente de celulose, arabinogalactanos e galactomananos (Redgwell et al. 2002). Além disso, foram também encontradas pequenas quantidades de xiloglucano conforme descrito por Ooesterveld et al. (2003). Os polissacarídeos de café não podem ser hidrolizados pelas enzimas de mamíferos e possuem assim um potencial para atuar como fibras dietéticas (Buckeridge e Tiné, 2000). Estudos têm sugerido que uma preparação rica em arabinogalactanos isolados de café poderia baixar o risco de câncer de colón (Rao et al., 1998).

O café coado é de longe o mais consumido no Brasil, correspondendo a mais de 90% da forma de consumo, sendo o coador de pano o mais usado. No entanto, entre 2003 e 2005 houve grande aumento no consumo de café preparado através de filtração direta em filtro de papel e preparado em cafeteira elétrica.

Enquanto o café coado é consumido principalmente no café da manhã, o café expresso é consumido preferencialmente fora de casa a qualquer hora (dados Sindicafesp).

Dependendo da forma de preparo, isto é, por exemplo: cafeteira elétrica, coador de papel ou expresso, os carboidratos (mono e polissacarídeos) podem se distribuir de forma distinta e produzir uma mistura de polímeros com diferentes pesos moleculares (Martins et al. 2005). Na bebida coada a partir de extração do pó (torrado e moído), a manose é o principal monossacarídeo componente de polissacarídeos, atingindo quase 50% do peso do pó utilizado. A manose é seguida de cerca de galactose (30%), arabinose (15%) e glucose (5%). Quando da confecção caseira do café por um dos métodos acima mencionados, os polissacarídeos podem chegar a um rendimento de extração de 25% do peso seco do pó, sendo que o café expresso é o que apresenta o maior teor de carboidratos por mililitro de bebida (45 mg/mL de bebida) contra somente 15 mg/mL de bebida para o café preparado em cafeteira elétrica (Martins et al. 2005). Conforme os dados divulgados pelo Sindicafesp citados acima, o consumo brasileiro nas capitais em 2005 foi de 1,64 xícaras de 25mL, o que equivaleria a um fluxo de cerca de 220 gramas de café por ano. No café preparado em cafeteira elétrica, no entanto, o peso molecular médio dos polissacarídeos é 4 vezes maior do que o expresso e estas fibras mais longas podem exercer uma ação benéfica (Rao et al. 1998) como fibra alimentar no consumo de longo prazo (Buckeridge & Tiné, 2001).

### **A formação e estrutura dos polissacarídeos do café**

Durante o crescimento e o desenvolvimento das sementes de café, na parede celular ocorrem mudanças progressivas em relação aos diferentes polissacarídeos e em suas características estruturais. Nos estágios iniciais da maturação, a celulose e o arabinogalactano parecem ser os produtos preliminares da síntese de parede celular. Durante os estágios seguintes a síntese da celulose parece cessar e há um aumento progressivo na síntese do galactomanano em

relação aos outros polissacarídeos da parede à medida que o grão se aproxima da maturidade (Fischer et al., 1999).

A solubilidade dos polissacarídeos de parede celular é fator de extrema importância tanto para as características físico-químicas e biológicas das sementes como para o produto produzido a partir destas. Os produtos primários são o café torrado e moído e o café solúvel e em ambos os casos a solubilidade dos componentes irá determinar, primariamente, o rendimento obtido e conseqüentemente o custo. A qualidade é um outro fator importante que será discutido abaixo. No fruto maduro de café, os polissacarídeos compartimentados na espessa parede celular do endosperma, podem ser extraídos através da utilização de água quente, extrações em soluções de álcali ou tratamento com enzimas (Bradbury, 2001). A ordem para liberar esses polímeros da parede celular é: arabinogalactano → galactomanano → celulose.

#### Os arabinogalactanos

Embora até a presente data a estrutura do arabinogalactano em café ainda não esteja confirmada, estudos apresentados por Bradbury (2001) indicam a presença de arabinogalactano do tipo I formado por uma cadeia de resíduos de galactose ligado  $\beta(1,3)$  e ramificações com várias combinações de resíduos de arabinose e galactose na posição 0-6. Os arabinogalactanos de café podem ser solubilizados em água quente (Bradbury, 2001). Esta facilidade na solubilização pode ser atribuída à forma helicoidal da cadeia principal e às freqüentes e irregulares cadeias laterais. Apesar da alta solubilidade do arabinogalactano em grãos de café, este não é completamente extraído das paredes celulares apenas com água quente o que sugere que o polímero pode está ligado a outros componentes. Redgwell et al. (2002) concluíram que todos ou quase todos os arabinogalactanos de café são de fato arabinogalactano-proteínas (AGPs). Esses mesmos autores relataram que o AGPs são uma mistura extremamente heterogênea que contém entre 6-10% de ácido glucurônico com peso molecular médio em torno de 650 kDa. A heterogeneidade do polímero foi dessa forma

relacionada ao seu grau de ramificação e a composição dos monossacarídeos de suas cadeias laterais.

### Os Galactomananos

Os galactomananos são os principais componentes da parede celular dos grãos de café e representam cerca de 50% dos polissacarídeos da parede celular das células endospermicas. Estes carboidratos são compostos por uma cadeia principal de manano ligado  $\beta(1\rightarrow4)$  e ramificações de galactose ligadas  $\alpha(1\rightarrow6)$ . A solubilização dos galactomananos é um fator crítico para as indústrias de café solúvel em relação ao rendimento do produto extraído. Um dos principais fatores determinantes da baixa solubilização dos galactomananos em café está no fato de a cadeia principal de manano possuir poucos resíduos de galactose ligada, o que influenciaria diretamente na razão galactose/manose (G/M). Deste modo, grande parte dos polissacarídeos é perdida como borra, que segundo Buckeridge (comunicação pessoal) é composta de cerca de metade em manose e metade em glucose, sugerindo que se tratam de manano e celulose, respectivamente. A borra é normalmente descartada como material de baixo valor comercial e com poucas aplicações biotecnológicas.

Devido às características físico-químicas dos principais polissacarídeos das sementes de café, que lhes conferem diferentes graus de solubilidade em água, qualquer estratégia biotecnológica que vise aumentar a produtividade (maior extração de sólidos solúveis) e/ou a qualidade (melhoria do corpo, aroma etc) deverá envolver, mesmo que parcialmente, os carboidratos do café.

De fato, acredita-se que os arabinogalactanos estejam envolvidos com o aroma, uma vez que durante a torrefação, as reações entre açúcares e aminoácidos formam uma série de compostos intermediários que compõem o aroma final do café. No caso dos galactomamanos, acredita-se que estes polímeros estejam envolvidos com o corpo da bebida, uma vez que são polissacarídeos conhecidos por aumentar a viscosidade de soluções e já são, há muito tempo, utilizados na indústria de alimentos para tal (Buckeridge et al., 2000).

Todas as observações feitas acima mostram que o café é uma bebida complexa e sugerem que os carboidratos, quantitativamente e também qualitativamente, são de extrema importância uma vez que se trata de uma bebida de alto consumo mundial e, portanto, de grande importância econômica e alimentar para a maioria dos seres humanos.

Nesse sentido, o foco deste trabalho foi contribuir com dois estudos relacionados aos polissacarídeos do café. Um deles mostra uma série de resultados sobre os mecanismos envolvidos na formação do galactomanano nas sementes de café e mostra a purificação, localização e propriedades de uma enzima editora do polímero que altera drasticamente a sua solubilidade, uma propriedade que tem impacto direto no rendimento do café no momento do consumo. Neste trabalho também são mostrados resultados da clonagem do cDNA que codifica para a enzima  $\alpha$ -galactosidase e a expressão deste gene nos diferentes tecidos do café. Um segundo trabalho mostra uma comparação entre a composição dos polissacarídeos de grãos de café Arabica e Canephora preparados de diferentes formas. É mostrado que, essencialmente, a composição é muito similar, mas há nuances de diferenças que, em larga escala, podem alterar consideravelmente o produto final e, portanto alterar o rendimento e qualidade do café.

### **Objetivos Gerais**

Com vista a fornecer subsídios que auxiliem na melhoria da tecnologia de produção do café solúvel, o presente trabalho teve como objetivos analisar comparativamente a composição e a solubilidade dos polissacarídeos de parede celular de grãos de cafeeiros Arábica e Canephora e purificar a  $\alpha$ -galactosidase do processo de biossíntese dos galactomananos nas paredes celulares durante o desenvolvimento dos grãos de café.

**PARTE I**

**Purificação e caracterização de uma nova  $\alpha$ -D-galactosidase  
isolada de endosperma de *Coffea arabica* L.**

## INTRODUÇÃO

A planta selvagem de café, *Coffea arabica*, foi encontrada primeiramente crescendo na Etiópia (Chinnapa et al., 1981). Embora existam algumas divergências quanto a esta afirmação, parece certo que a África foi o berço da espécie *Coffea arabica* e ao povo árabe cabe o crédito de serem os disseminadores da espécie em seu processo expansionista por todo o mundo conhecido em sua época. É por esse motivo que é uma das espécies mais conhecidas e cultivadas comercialmente hoje em dia, a primeira a ser descrita pelos árabes e ao chegar ao continente europeu, tenha sido justamente denominada *Coffea arabica*.

De acordo com Carvalho (1946), as primeiras referências botânicas incluem o café inicialmente como pertencente à família Celasteraceae, passando ainda por outras famílias (Rutaceae e Oleaceae). Foi somente no ano de 1753 que Linneu a descreveu como *Coffea arabica* pertencente à família Rubiaceae.

A partir de uma série de trabalhos publicados, sendo o último publicado em 1947, o botânico francês Auguste Chevalier apresentou as bases para uma nova classificação do gênero *Coffea*. São 66 espécies, separadas em quatro seções: *Eucoffea*, *Mascaracoffea*, *Paracoffea* e *Argocoffea*. A mais importante destas é a *Eucoffea*, que compreende cinco subseções: *Erythrocoffea*, *Pachycoffea*, *Nanocoffea*, *Melanocoffea* e *Mozambicoffea*. Dessas, as de maior interesse são a *Erythrocoffea* e a *Pachycoffea*, que abrangem as espécies mais cultivadas, todas por sua vez, originárias da África: *Coffea arabica* L., *Coffea canephora* Pierre, e *Coffea liberica* Bull&Hiern. As espécies do gênero *Coffea* diferenciam-se quanto ao porte, crescimento e forma. De todas elas, somente as espécies *Coffea arabica* L. e a *Coffea canephora* Pierre são cultivadas no Brasil para a produção comercial do café e respondem respectivamente por aproximadamente 75 e 25% da produção mundial (Berthaud & Chavier, 1988). Destas, apenas a *Coffea arabica* L. produz bebida de qualidade fina, reunindo um bom número de variedades, algumas das quais bastante conhecidas em todos os países tradicionalmente produtores de café.

No Brasil o café foi introduzido no ano de 1727, pelo sargento-mor Francisco de Melo Palheta, trazido de Caiena, na Guiana Francesa, para Belém, capital do estado do Pará. Ainda em meados daquele mesmo século, a cultura foi levada para o estado do Rio de Janeiro por João Alberto Castelo Branco, de onde se espalhou até chegar ao estado de São Paulo. O sucesso da implantação da nova cultura teve como motivação à crise na produção de açúcar, que naquela época sofria com a grande competição das colônias européias da América central. Um outro fator determinante para o sucesso do café em solo brasileiro foi à captação dos recursos das outras atividades exploratórias em crise (açúcar, algodão e mineração) unida a fácil colocação do novo produto no mercado internacional que demandava cada vez mais por uma bebida barata.

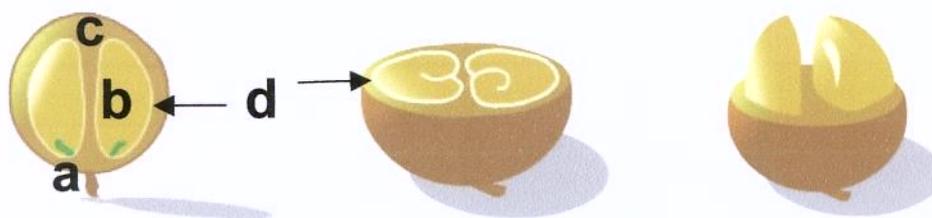
Desde os anos 50, a importância do café para a economia brasileira tem decrescido sensivelmente. A participação do café nas exportações do país diminuiu em meados dos anos 70. O valor das exportações de manufaturados ultrapassou o do café, que, desde o início dos anos 80, responde por cerca de 10% do valor total das exportações brasileiras.

Atualmente, o Brasil ainda é o maior produtor mundial respondendo por um terço do total das sacas de café produzidas. Entretanto, a posição brasileira de líder produtor isolado vem enfrentando desgastes nas últimas duas décadas, devido à ação das demais nações produtoras de café, em especial a Colômbia. A cafeicultura colombiana, através de uma forte política nacional de melhoria qualitativa do grão exportado e otimização da colheita, obtida com a uniformização dos cafezais a partir de espécimes de tamanho adequado a facilitar a operação da captação do fruto, alta produtividade e melhor qualidade, operando com baixo custo de mão de obra e com uma agressiva e intensa campanha publicitária no exterior, tem conseguido excelente desempenho nas exportações, aumentando significativamente sua parcela no total produzido mundialmente. O café colombiano é hoje sinônimo de um café de alta qualidade, com aroma e sabor marcante, independente de sua origem interna.

## ***Coffea arabica***

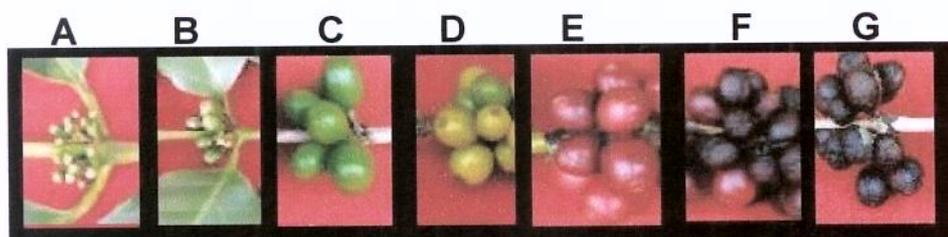
A planta, oriunda de uma semente, é um arbusto de até 4 m de altura, caule reto de casca cinzenta e rugosa e raiz pivotante profunda e amplamente ramificada nas primeiras camadas do solo (Graner & Godoy-Junior, 1967). O cafeeiro apresenta copa cônica com ramos laterais pendentes. Folhas onduladas nos bordos e de coloração verde-acinzentada quando jovens e verde-brilhante posteriormente. Possui flores brancas aglomeradas e aromáticas ao longo dos ramos. A espécie é autocompatível, multiplicando-se predominantemente por autofecundação, de acordo com Lashermes et al., 1999, é a única espécie tetraploide do gênero *Coffea* ( $2n=44$ ).

O fruto do café pode ser definido como uma drupa de formato ovóide, verde passando a vermelho e tornando-se preto de acordo com as fases de maturação. Este contém normalmente duas sementes elípticas, plano-convexas, possuindo um sulco longitudinal sobre a superfície plana (figura 1). Uma cereja de café é constituída por exocarpo, mesocarpo e endocarpo. O exocarpo é representado por uma única camada de células, que corresponde à epiderme do ovário. No estado maduro, o mesocarpo é uma região formada por mais de 20 camadas de células parenquimatosas ricas em tanino, açúcares, gomas e mucilagens, responsáveis pela consistência suculenta do fruto maduro. O endocarpo é formado por cerca de cinco a sete camadas de células, as quais formam o pergaminho da semente. O envoltório da semente, denominado película prateada, origina-se a partir de um único integumento do óvulo, a primina (perisperma). O endosperma, que constitui quase que todo o grão de café é de natureza triploide (Mendes, 1941; Medina, 1964; Medina, 1965), o embrião, pequeno é localizado na base da semente, na sua face convexa, é representado por um hipocótilo e dois cotilédones cordiformes (Dedecca, 1957).



**Figura 1.** Esquema dos diferentes componentes e um fruto maduro de café. Cortes longitudinal e transversais. Em **a**, **embrião**; em **b**, a semente composta por endosperma e a película prateada ou perisperma (parte mais externa), **c** o mesocarpo ou polpa, em **d**, o endocarpo ou pergaminho.

O crescimento e o desenvolvimento dos frutos de *C. arábica* segue o padrão de uma curva sigmoidal dupla (Gómez, 1977). Durante as 5<sup>a</sup> e 6<sup>a</sup> semanas posteriores à antese, os frutos não apresentam crescimento visível sendo denominados chumbinhos (Womer & Njunguna, 1966). Nesta fase, os frutos não podem ser caracterizados como dormentes, porque apresentam alta taxa respiratória (Cannel, 1971), mobilizam metabólicos e exibem divisão celular (Mendes, 1942). A partir da 7<sup>a</sup> semana os frutos expandem-se rapidamente atingindo tamanho máximo em torno da 16<sup>a</sup> semana. Nessa época o perisperma ocupa totalmente os lóculos, mas são gradativamente substituídos pelo endosperma entre a 12<sup>a</sup> e 20<sup>a</sup> semanas seguintes à antese. Os frutos do cafeeiro arábica amadurecem por volta da 32<sup>a</sup> semana após a abertura das flores. A figura 2 apresenta diferentes estádios de desenvolvimento dos frutos do cafeeiro.



**Figura 2.** Fotografia do fruto de cafeeiro coletados em diferentes estádios de maturação. (A) Chumbinho; (B) Chumbão); (C) Verde; (D) verde Cana; (E) Cereja; (F) Passa e (G) Seco.

## A Parede Celular

A parede celular é uma estrutura extremamente dinâmica que é capaz de modificar-se nos diferentes estádios de desenvolvimento da planta e permitir assim a ocorrência de vários eventos fisiológicos como a germinação das sementes, desenvolvimento por expansão celular, abscisão das folhas e flores e amadurecimento de frutos, (Campbell & Braam, 1999).

No modelo clássico, a parede celular primária é constituída por duas fases, uma microfibrilar e outra matricial (Cosgrove, 1999). A fase microfibrilar distingue-se da matricial pelo alto grau de cristalinidade visível ao microscópio eletrônico e por possuir uma composição química relativamente homogênea. A fase microfibrilar é composta por estruturas longas e finas designadas microfibrilas, constituídas por moléculas de celulose associadas entre si por pontes de hidrogênio e alinhadas paralelamente ao longo as microfibrilas. Juntamente às zonas cristalinas encontram-se nas microfibrilas de celulose, zonas amorfas nas quais as fibras de celulose não têm orientação regular. A fase matricial consiste em uma variedade de polissacarídeos, glicoproteínas e compostos fenólicos, variando a sua composição com as diferentes camadas da parede, tipos de células e diferentes fases do ciclo celular.

As fases iniciais do desenvolvimento celular são caracterizadas por possuírem uma parede primária, extremamente fina e semi-rígida, que permite o crescimento da célula. Ao término do crescimento celular, esta continua a depositar novos materiais na parede levando à formação da parede secundária. A parede secundária resulta do engrossamento da parede primária ou da deposição de novas camadas de parede com diferente composição. A forma e a composição da parede celular encontra-se intimamente relacionada com a função de cada tipo especializado de célula.

Diversas funções são atribuídas à parede celular como: definir a forma e o tamanho da célula, conferir resistência mecânica aos tecidos, controlar a expansão celular, atuar sobre o transporte intracelular, participar da sinalização e reconhecimento entre as células, armazenar compostos de reserva e moléculas

reguladoras e sinalizadoras que controlam diversos processos fisiológicos celulares, além de participar de mecanismos de proteção contra microorganismos (Carpita & Gibeaut, 1993). Uma outra função da parede celular é de extrema importância como um produto natural em biotecnologia, que está ligada à economia. Componentes da parede celular vegetal são usados comercialmente para fabricação de papel, manufaturas têxteis, fibras como algodão, linho, frutos e outros. Assim, a compreensão da estrutura química, bem como do metabolismo de síntese e degradação dos polissacarídeos que compõem as fibras, pode levar ao desenvolvimento de novas tecnologias para produzi-los, melhorá-los e comercializá-los de forma a obter o maior benefício possível para o homem (Buckeridge, & Tiné, 2001).

Os carboidratos constituintes da parede celular são divididos em três diferentes domínios segundo a sua forma de extração: celulose, pectina, e hemiceluloses. Desta forma, a solubilidade é fator importante para distinguir os carboidratos da parede celular que são relativamente inertes no que concerne à sua reatividade química e apresentam diferentes graus de solubilidade. O quadro abaixo resume a ordem para dissolver os polissacarídeos da parede celular.

Solúveis em água	Pectinas
<b>Solúveis em álcali fraco</b>	<b>Hemiceluloses fracamente ligadas</b>
<b>Solúveis em álcali forte</b>	<b>Hemiceluloses fortemente ligadas</b>
<b>resíduo</b>	<b>Celulose</b>

## Polissacarídeos de parede celular

### Celulose

A celulose constitui entre 20 e 30% das paredes celulares primárias (McNeil *et al.*, 1984) e 40% das paredes celulares secundárias, sendo o composto orgânico mais abundante no mundo (Fry, 1988). Ela ocorre em todas as partes dos vegetais formando polímeros lineares, cujos milhares de monômeros de glucose se unem por ligações glicosídicas  $\beta(1,4)$ . As longas cadeias de celulose dispõem -

se lado a lado formando micelas, com estrutura quase cristalina, cuja integridade é mantida por ligações de pontes de hidrogênio entre os numerosos grupos OH-adjacentes.

## Pectinas

As pectinas são polissacarídeos ácidos de elevado peso molecular, constituídos principalmente por unidades de ácido D-galacturônico. As pectinas ocorrem praticamente em todas as plantas superiores e se encontram principalmente na matriz celular e na lamela média, localizando-se entre a parede celular primária, onde são responsáveis por regular a adesão entre as células (Mohnen, 1999), propiciando rigidez aos diferentes órgãos, incluindo os frutos verdes (Crookes & Grierson, 1983). As pectinas são degradadas durante a maturação devido à sua solubilização e despolimerização da parede (Sheery et al., 1988; Smith et al., 1988; Giovanonni et. al., 1989; Fisher & Bennett, 1991). Dessa forma, estudos relativos à alterações importantes durante o amadurecimento dos frutos tem se concentrado nas alterações desse domínio durante a desmontagem da parede celular.

Vários polímeros podem participar da composição desse domínio, sendo que os três componentes quantitativamente mais importantes das pectinas são os homogalacturonanos (HGA) e os ramnogalacturonanos I (RG I) e II (RG II). As estruturas dos polissacarídeos pécticos são as seguintes (Buckeridge et al., 2006):

**HGA:** homogalacturonano: polissacarídeo com resíduos de ácido galacturônico  $\alpha(1,4)$ , ligados. A cadeia principal do HGA pode apresentar blocos metilesterificados (neutros) alternados a blocos não-metilesterificados (negativos).

**RG I:** possuem na cadeia principal resíduos de Gal  $\alpha(1,4)$  ligados podendo ser metilados e intercalados por resíduos de ramnose ligados no C2 com polissacarídeos neutros como arabinanos, galactanos e arabinogalactanos do tipo I.

**RG II:** possuem na cadeia principal gal  $\alpha(1,4)$  ligados, com ramificações laterais formadas por ligações glicosídicas de vários tipos, incluindo algumas ligações raras, como ácido acético e apiose.

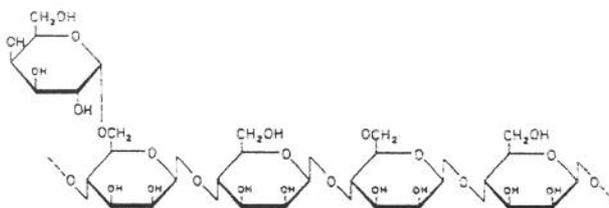
## Hemiceluloses

As hemiceluloses são polissacarídeos que estão intimamente associados à celulose, definindo as propriedades estruturais na parede além de desempenhar funções na regulação do crescimento e desenvolvimento das plantas. Os xiloglucanos (Xg) e os galactomananos (Gm) são hemiceluloses presentes tanto em parede primária desempenhando função estrutural, como em parede de reserva em sementes de algumas espécies com a função de reserva de carbono, sendo completamente degradados após a germinação da semente e os seus produtos são utilizados para o crescimento inicial das plântulas.

Como os mananos são os principais polissacarídeos que constituem a semente de café, neste trabalho será feita uma revisão mais aprofundada sobre estes polissacarídeos.

## Mananos e galactomananos: ocorrência e estrutura e funções

Os mananos (figura 3) são definidos como contendo mais de 90% de manose formando uma cadeia linear do tipo  $\beta(1,4)$  sem ramificações, podendo ou não o restante estar ramificado com galactose através de ligações  $\alpha(1,6)$ .



**Figura 3.** Estrutura do galacto(manano) de reserva mostrando a cadeia principal de  $\beta$ -D-1,4 manose e as ramificações de galactose unidas a esta por ligações do tipo  $\alpha$ -1-6.

Abaixo de 10% de ramificação, os mananos tornam-se insolúveis e precipitam rapidamente em solução aquosa (Dea et al., 1986). Assim, os mananos são estruturalmente relacionados aos galactomananos, apenas apresentando um grau menor de ramificação com galactose. Os mananos também apresentam alto grau de interatividade intermolecular, formando cristais na parede celular, o que confere dureza e diminui sua solubilidade. Os mananos são encontrados em endospermas de sementes de espécies de monocotiledôneas (por exemplo *Phoenix dactylifera* e *Phytelephas macrocarpa*) e dicotiledôneas (*Coffea arabica*) (Reid, 1985).

A germinação de sementes de *Phoenix dactylifera* foi estudada por Sachs (1862) e, mais tarde, por Keusch (1968). Nestas sementes, um pequeno embrião de forma cônica se desenvolve lentamente. Seus cotilédones são transformados em haustórios, os quais absorvem os produtos de degradação das reservas do endosperma durante a germinação. Nessas sementes, uma endo- $\beta$ -mananase e uma  $\beta$ -manosidase foram detectadas na zona de dissolução próxima ao haustório. Foi proposto (Keusch, 1968) que as enzimas são produzidas no endosperma, mas suas células necessitam de um sinal proveniente do haustório.

Mananos como compostos de reserva já foram detectados em sementes de espécies como pimenta (Watkins et al., 1985), aipo (Jacobsen & Pressmann, 1979), tomate (Groot et al., 1988), alface (Halmer & Bewley, 1979) e café (Wolfron et al., 1961), sendo que em todas elas já foi observada a presença de atividade de endo- $\beta$ -mananase. Estas espécies apresentam endospermas mais finos em relação às palmeiras e sua presença têm sido correlacionadas com a restrição mecânica para a protrusão da radícula. Na maioria dos casos, a degradação do manano pode ser induzida por ácido giberélico, que promove a germinação e, em alguns casos é inibida por ácido abscísico (Potomati e Buckeridge, 2002).

Bewley et al. (1997) clonaram o gene que codifica para uma endo- $\beta$ -mananase de sementes de tomate. Estes autores encontraram baixa homologia com mananases de fungos (28-30%) e observaram que sua expressão é exclusiva do endosperma, sendo ausente em outras partes da planta. A posse de tal

seqüência gênica é uma ferramenta valiosa para estudar o controle da produção da endo- $\beta$ -mananase e, mais especificamente, compreender como a giberelina e o ácido abscísico afetam o catabolismo dos mananos.

Paralelamente, outros autores afirmam que os mananos presentes em endosperma de sementes de tomate (Toorop et al., 1996) e de café (Takaki & Dietrich, 1980; Giorgini & Comoli, 1996) são completamente degradados após a germinação, sendo, portanto, correto considerá-los como compostos de reserva.

Os primeiros estudos com espécies que armazenam galactomananos em suas sementes foram realizados por Nadelmann em 1890, incluindo uma espécie tropical, *Schizolobium* sp. Os galactomananos de reserva ocorrem tipicamente em endospermas de sementes de leguminosas, mas eles também estão presentes em sementes de espécies de outras famílias como Compositae e Convolvulaceae (Dea & Morrison, 1975; Guzmán & Hernandez, 1982).

A mobilização de galactomananos foi estudada em algumas espécies de leguminosas (Reid & Meier, 1972; McCleary & Matheson, 1976; Buckeridge et al., 1995a; Buckeridge & Dietrich, 1996), sendo detectada a presença de três enzimas hidrolíticas ( $\alpha$ -galactosidase, endo- $\beta$ -mananase e  $\beta$ -manosidase), confirmando que a mobilização do galactomanano ocorre através da hidrólise. Em todos os casos estudados, o polissacarídeo é desmontado até seus monossacarídeos constituintes (manose e galactose) ao mesmo tempo em que há produção de sacarose (Buckeridge et al., 2000). Aparentemente, a sacarose é o açúcar de transporte que levará os produtos da mobilização da reserva até o embrião em crescimento.

Além do papel de reserva, o galactomanano influencia no fluxo de água devido a sua maior solubilidade nos primeiros estágios da germinação. Este polissacarídeo absorve, proporcionalmente, grande quantidade de água e a distribui ao redor do embrião. Os endospermas embebidos protegem o embrião contra perda de água através de um efeito conhecido como “tampão de água”, durante períodos de seca pós-embebição (Reid & Bewley, 1979). Outras leguminosas tropicais (*Dimorphandra mollis* e *Sesbania virgata*) apresentam um

comportamento similar (Buckeridge et al., 1995a; Buckeridge & Dietrich, 1996; Zpevak, 1999).

O grau de ramificação dos mananos define suas relações estrutura-função. Quanto menos ramificado maior a indicação de que a função biológica está relacionada com a dureza e proteção do embrião. Isso pode ser visto claramente em *Palmae*. Por outro lado, quanto maior o grau de ramificação, mais solúvel o polissacarídeo e maior a participação deste em funções como as relações hídricas. No entanto, não se sabe ao certo qual dessas funções é a primária em paredes do endosperma: reserva, dureza ou relações hídricas. É certo, por outro lado, que os mananos e galactomananos são moléculas multifuncionais, desempenhando suas funções durante fases distintas do crescimento e desenvolvimento das plantas (Buckeridge et al. 2000).

Tem sido sugerido que os carboidratos das sementes (presentes em maior proporção no endosperma) de café (*Coffea arabica*) têm importância no desenvolvimento da qualidade da bebida (Clifford, 1985). A fração de polissacarídeo de grãos de café consiste de galactomanano, arabinogalactano e celulose, sendo que esta fração compreende quase metade de seu peso seco e estão incrustados à parede celular do endosperma. A maior parte dessa fração é uma suspensão insolúvel em água constituída de um galactomanano que forma aproximadamente 30% do peso seco de grãos dos cafés *Arábica* e *Robusta* (Bradbury & Halliday, 1990).

Uma das características mais importantes no que concerne à comparação entre galactomananos de diferentes origens é a proporção entre os resíduos de manose e galactose (M/G). Esta proporção é importante porque ela caracteriza a solubilidade do galactomanano em água. Sendo assim, quanto maior a proporção de galactose (ou seja, menor a razão M/G), mais solúvel é o polímero.

## **Biossíntese dos galactomananos**

Em 1890, Nadelman sugeriu que mucilagens presentes em endospermas de *Colutea breviata* *Indigofera hirsuta*, *Tetragonolobus purpureus* e *Trigonella*

*foenum graecum* (que hoje sabemos ser galactomananos) eram formadas primeiramente nos vacúolos e posteriormente depositadas na parede celular do endosperma.

Durante a deposição do galactomanano em sementes de *Trigonella foenum-graecum* a razão manose:galactose (M/G) do polímero se mantém constante. No entanto, Dey (1972), observou que esta razão aumentou em sementes de diferentes espécies de Leguminosae. Em *Gleditsia triacanthos*, uma pequena variação na substituição com galactose (de 41% para 35%) foi vista durante a deposição do galactomanano. No entanto, em uma espécie do mesmo gênero (*Gleditsia ferox*) a razão se manteve constante. Durante a deposição do galactomanano estudada em *Trigonella foenum-graecum* foi observado que a síntese de galactomanano está associada com os espaços entre as cisternas do retículo endoplasmático rugoso e são posteriormente secretadas para a parede celulares via complexo de Golgi. Edwards et al. (1989) reportaram que preparações enzimáticas particuladas (de membrana) isoladas de endosperma de *T. foenum-graecum* e guar (*Cyamopsis tetragonolobus*) em desenvolvimento eram altamente efetivos na formação de polissacarídeo a partir de GDP-manose ou por uma mistura de GDP-manose e UDP-galactose. No entanto, a atividade de galactosiltransferase (**Galtran**) não foi observada sem a presença de GDP-manose, indicando que a Galtran é dependente da formação da cadeia principal. Esses autores realizaram experimentos demonstrando que o grau de ramificação do galactomanano pode ser manipulado *in vitro* pela variação nas concentrações de GDP-manose no meio de incubação, em condições de saturação de concentração de UDP-galactose.

Com o intuito de estudar como o processo biossintético durante o desenvolvimento pode resultar em galactomananos com diferentes razões manose:galactose (razão M/G), Edwards et al. (1992) efetuaram estudos comparativos com sementes em desenvolvimento de *T. foenum-graecum* (M/G=1,1), guar (M/G=1,6) e *Senna occidentalis* (M/G=3,3). Eles acompanharam as atividades de manosiltransferase (**Mantran**) e Galtran durante a maturação das sementes das três espécies e descobriram que ambas as enzimas apresentavam

um pico de atividade quando a velocidade de formação do galactomanano era máxima. Enquanto as razões M/G para *T. foenum-graecum* e guar eram constantes durante todo o período de desenvolvimento, em sementes de *S. occidentalis* a razão M/G aumentou de 2,3 para 3,3. Esse aumento na razão M/G foi associado com o aumento concomitante de uma  $\alpha$ -galactosidase no endosperma. Com base nesses resultados, os autores concluíram que em *T. foenum-graecum* e guar, o controle genético da razão M/G em galactomananos é baseado apenas no mecanismo de biossíntese, enquanto em *S. occidentalis* o galactomanano produzido seria um resultado do mecanismo de biossíntese mais um processo de desramificação parcial do polímero por uma  $\alpha$ -galactosidase.

A  $\alpha$ -galactosidase é uma enzima amplamente encontrada em microorganismos, animais e plantas (Dey & Pridham, 1972) na clivagem de resíduos de ligação terminal  $\alpha$ -1,6 de uma grande variedade de substratos, incluindo oligossacarídeos e polissacarídeos lineares ou ramificados, bem como substratos sintéticos como *p*-nitrophenil- $\alpha$ -D-galactopiranosídeo. Em plantas, essa enzima vem sendo detectada especialmente em sementes durante a germinação (Corchete & Guerra, 1987; Bhaskar et al., 1990; Guimarães et al., 2001), em folhas (Smart & Pharr, 1980), raiz (Bom et al., 1988) e em frutos (Gao & Schaffer, 1999). Múltiplas formas de  $\alpha$ -galactosidases ocorrem em plantas, apresentando diferenças em suas propriedades bioquímicas e cinéticas e em suas massas moleculares e exibindo especificidades diferentes por substratos naturais e sintéticos (Dey & Pridham, 1972; Kim et al., 2002). Em estudos de germinação de sementes, tem sido apontado que a  $\alpha$ -galactosidase está envolvida na mobilização dos carboidratos de reserva como a rafinose e a estaquiose (Dey & Pridham, 1972; Buckeridge & Dietrich, 1996).

O galactomanano, principal polissacarídeo encontrado em sementes de café, é totalmente hidrolisado e mobilizado através da ação da  $\alpha$ -galactosidase que ainda requer uma endo- $\beta$ -mananase que cliva a cadeia principal e uma  $\beta$ -manosidase ou exo- $\beta$ -mananase, que retira unidades de manose do terminal não redutor de oligossacarídeos após a ação das outras duas enzimas. A maioria das atividades enzimáticas, especialmente a da  $\alpha$ -galactosidase, aumenta com a

embebição e germinação das sementes (Corchete & Guerra, 1987; Kontos & Spyropoulos, 1996; Guimarães et al., 2001). Além do envolvimento fisiológico na germinação de sementes, as  $\alpha$ -galactosidases apresentam potencial para diversas aplicações biotecnológicas, como no branqueamento da polpa de celulose na indústria de papel, na mudança de propriedades físico-químicas dos galactomananos (Bulpin et al., 1990) e na hidrólise de oligossacarídeos não-digeríveis presentes em produtos de soja (Guimarães et al., 2001).

Apesar de se conhecer a composição dos carboidratos em frutos de café, pouco se sabe como estes são acumulados durante a formação das sementes. Porém, Redgwell et al. (2003) utilizaram análises estruturais dos polissacarídeos extraídos durante a maturação das sementes de café e observaram que estas sintetizam primeiramente um galactomanano que é transformado em manano (M/G=40/1) durante o processo de maturação. Os autores sugeriram que tal processo envolve a ação de uma  $\alpha$ -galactosidase que atacaria o polímero nos moldes propostos para *Senna occidentalis* por Edwards et al. (1992). Os autores, no entanto, não detectaram a presença de tal enzima e fizeram apenas ensaios com uma  $\alpha$ -galactosidase obtida comercialmente e demonstraram que tal enzima é capaz de modificar o galactomanano de café.

Em recente trabalho, Marraccini et al., (2005), monitoraram o desenvolvimento dos frutos de *Coffea arabica* e caracterizaram ao longo da maturação a atividade da  $\alpha$ -galactosidase. No trabalho os autores demonstraram que atividade de  $\alpha$ -galactosidase não era identificada em grãos formados apenas pelo perisperma, entretanto com o desenvolvimento do endosperma ao longo da maturação do fruto, a atividade da enzima aumentava gradativamente alcançando um pico aproximadamente 30 semanas após a floração. Este fato coincidia com a total deposição do galactomamanano nas paredes celulares do endosperma. No mesmo trabalho os autores encontram duas isoformas da  $\alpha$ -galactosidase. Estas proteínas foram distinguidas em gel 2D, a partir dos extratos proteicos de grãos maduros de café e de uma preparação de uma  $\alpha$ -galactosidase comercial, com peso molecular estimado de 40 kDa e pls de aproximadamente 5.5 e de 5.7 cada uma. As preparações também continham três proteínas que co-purificaram com a

proteína de café conhecida. Como nenhuma homologia convincente dessas seqüências pode ser encontrada nos bancos de dados públicos de proteínas e pela falta de conhecimento das suas funções biológicas essas proteínas foram denominadas “UP”, para proteínas não identificadas (do inglês *undidentified protein*). Após análise da seqüência do N-terminal, os autores obtiveram as seqüências para a UP1 e UP2, porém nenhuma seqüência foi obtida para a UP3. Como nenhuma homologia convincente dessas seqüências foram encontradas nos bancos de dados públicos, essas proteínas permanecem como não identificadas.

## **Objetivo**

Tendo em vista que os conhecimentos da presença e da atividade da  $\alpha$ -galactosidase são bastante conhecidos em sementes da espécie em estudo, o presente trabalho teve como objetivo, purificar e caracterizar a enzima  $\alpha$ -galactosidase atuante durante a deposição do galactomanano de reserva em grãos de *Coffea arabica*.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Materiais Vegetais

#### Análises bioquímicas

Frutos de *Coffea arabica* cv. Mundo Novo foram coletados na área experimental do Instituto Agronômico de Campinas (IAC) a cada 15 dias após a floração a partir de dezembro de 2003 até julho de 2004. Os frutos foram congelados em nitrogênio líquido e transportados até o Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Plantas do Instituto de Botânica de São Paulo onde foram armazenados a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Apenas o endosperma foi utilizado após a separação do perisperma e da polpa.

#### Análise com biologia molecular

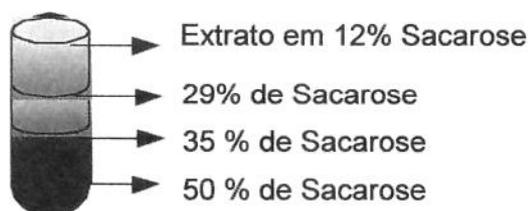
Frutos de *Coffea arabica* cv. Sarchimor IAPAR 59 (Sera, 2001), foram coletados de plantas da área experimental do Instituto Agronômico do Paraná (IAPAR) mensalmente após a floração durante o período que compreendeu os meses de setembro de 2002 a maio de 2003. Os tecidos dos frutos foram separados (endosperma, perisperma e polpa) e utilizados independentemente para a extração do RNA total conforme a metodologia descrita por Roges et al., 1999. Amostras de folhas, raízes, flores e caules, também foram coletados da plantas da cultivar IAPAR59

Frutos de *Coffea racemosa* também foram coletados para os experimentos de expressão. Neste caso o material foi de colhido entre 08/11/04 e 03/01/05 (floração [20-24]/ 10/ 04)

## Obtenção das membranas dos frutos de café

A metodologia utilizada para a obtenção de frações ricas em complexo de golgi, retículo endoplasmático, mitocôndrias e membranas, foi adaptada para frutos de café a partir do protocolo original descrito por Carpita & Gilbeut (1994).

Endospermas isolados de frutos de café em maturação foram coletadas e colocadas em um almofariz previamente resfriado e mantido a 4°C em câmara fria. Os tecidos foram inseridos em tampão HEPES-KOH 10 mM pH 7.6 contendo KCl 40 mM, sacarose 12%, albumina de ovo 0,1%, ácido ascórbico 10 mM, b-mercaptoetanol 28 mM e DDT 2 mM. Após maceração, o material homogeneizado foi filtrado em nylon (40 mm). Em um tubo de centrifuga foi feito um gradiente composto por solução de sacarose a 50% (7 mL) pipetada no fundo do tubo, sendo em seguida depositadas soluções de sacarose 35%(7 mL), 29%(7 mL) e o extrato sacarose a 12% filtrado em nylon até o preenchimento do tubo como mostrado no esquema a seguir..



O tubo foi centrifugado a 100.000xg por 1 hora e as membranas nas interfaces foram retiradas com uma pipeta Pasteur e transferidas para tubos Eppendorf e matidas a 4°C em câmara fria

## Isolamento da $\alpha$ -galactosidase

Endospermas de sementes de *C. arabica* coletados entre a 17<sup>a</sup> e a 26<sup>a</sup> semana após o florescimento foram previamente separados da casca, polpa e perisperma para o preparo do extrato bruto.

Preparação do extrato bruto: Cerca de 50 gramas de endosperma foi fatiado por meio de um estilete e as pequenas fatias foram trituradas em homogeneizador modelo Ultra Turrax em presença de 500 mL do tampão fosfato de sódio 50 mM pH 5,0 com 100 mM de NaCl. No momento de homogeneizar foram adicionados 10 gramas de Polivilpolipirrolidona. A mistura foi mantida em câmara fria por 1 hora para permitir a difusão das proteínas. Após esse tempo o material foi filtrado em pele de nylon e o material filtrado foi submetido à centrifugação a 13000 xg por 20 minutos. O sobrenadante recolhido foi considerado o extrato.

Fracionamento com sulfato de amônio: Ao extrato bruto foi adicionado sulfato de amônio até a saturação de 60%. O extrato foi mantido em repouso a 5°C, que após o tempo de 30 minutos foi centrifugado a 13.000 xg por 15 minutos. O precipitado foi ressuspenso no menor volume possível de tampão Tris HCl pH 7,2 20 mM e a solução foi dialisada contra o mesmo tampão a ser utilizado nos experimentos seguintes.

Cromatografia em DEAE-Celulose: O extrato enzimático do precipitado obtido do sulfato de amônio foi submetido à cromatografia de troca aniônica (DEAE-celulose/Sigma) equilibrada com o tampão Tris HCl pH 7,2 20 mM. Após a passagem do extrato, a coluna foi eluída com o mesmo tampão, sendo posteriormente eluídas com um gradiente de 0 a 0,5M de NaCl onde foram coletadas frações até que o ponto em que a leitura da absorbância no comprimento de onda 280 nm ficasse constante ou próximo de zero.

Cromatografia em CM-Celulose: As frações que apresentaram maior atividade da enzima foram reunidas, dialisadas contra o tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,0 e aplicadas em cromatografia de troca catiônica em CM-celulose (Sigma) equilibrada com o mesmo tampão. Após a passagem do extrato, a coluna foi eluída com o mesmo tampão seguido de coleta de frações até que o ponto em que a absorbância (280 nm) ficasse constante ou próximo de zero.

Cromatografia em Sephacryl S-200: O extrato enzimático obtido a partir da reunião das frações que apresentaram maior atividade de  $\alpha$ -galactosidase após a passagem em CM-Celulose, foi dialisado contra o tampão acetato de amônio 50 mM, pH 5,0 e foi aplicado em coluna com leito de Sephacryl S-200 (cromatografia de peneira molecular). As proteínas do extrato foram eluídas com fluxo de  $0,8 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  em frações de 1,5 mL e a detecção das proteínas foi feita acompanhando a leitura das absorbâncias a 280 nm. A coluna foi calibrada com Ribonuclease (15,7 kDa), Ovoalbumina (47,9 kDa), BSA (68,3 kDa) e Alcool Desidrogenase (180 kDa) como padrões de pesos moleculares adquiridos da Sigma Chem. Co., EUA e o peso aproximado da proteína detectada na coluna foram calculados empregando-se a equação da reta destes padrões, obtida de um gráfico dos volumes de eluição contra os logaritmos dos pesos moleculares.

Dosagem das proteínas: O conteúdo de proteínas das frações das cromatografias dos extratos enzimáticos foi estimado pela leitura da absorbância a 280 nm, em espectrofotômetro da série UV-1201 (Spectroscopic Instruments Division, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão). As quantidades de proteínas nos extratos foram determinadas por reação com Coomassie Blue e posterior leitura da absorbância a 595nm, utilizando uma curva padrão albumina soro bovina de acordo com metodologia descrita por Bradford (1976).

Focalização Isoelétrica de Proteína: Os extratos enzimáticos, limpos de fenóis e polissacarídeos através da cromatografia de peneira molecular em Sephacryl S-200 foram submetidos à focalização isoeletrica preparativa. Ao extrato foram adicionados 3 mL de solução de anfolinas (BioRad) que cobria a faixa de pH de 3 a 10, completando-se o extrato com água até 60 mL de volume. O extrato foi aplicado em sistema Rotofor da BioRad. A corrida da eletrofocalização foi realizada com potência constante entre 10 a 20 W, com equipamento refrigerado e monitoramento da voltagem até a estabilização da mesma, fato que acontecia em cerca de três horas de corrida, após a estabilização da voltagem, mantinha-se o

equipamento funcionando por mais uma hora para permitir uma boa focalização. Após a coleta das frações, o pH era medido e em seguida a atividade da  $\alpha$ -galactosidase era determinada.

Quantificação das galactoses livres em diferentes substratos: A quantificação das galactoses liberadas pela ação da  $\alpha$ -galactosidase foi feita enzimaticamente (galactose desidrogenase). Inicialmente, 190 mg de amostra [25 mM estaquiose, 25 mM rafinose, 25 mM lactose, 25 mM pNP- $\alpha$ -galactopiranosídeo, 25 mM pNP- $\beta$ -galactopiranosídeo, solução a 0,1% de LBG (Locust Bean Gum – galactomanano pouco galactosilado de sementes de *Ceratonia siliqua*) e solução a 0,1% de Manano de Café] foram incubados com 50  $\mu$ l de enzima, 10  $\mu$ l de tampão citrato fosfato 50, mM pH 6,5 por 20 horas a 30°C, para a liberação da galactose pela ação da  $\alpha$ -galactosidase. Em seguida foi feita uma segunda incubação para determinar o conteúdo de galactose liberado utilizando-se 200  $\mu$ l de tampão tris-HCl 20 mM pH 7,8, 20  $\mu$ l de galactose desidrogenase e 30  $\mu$ L de NAD. A quantidade de galactose liberada foi determinada pela leitura da absorbância a 340 nm utilizando uma curva padrão de 0,25 a 1 mM de galactose.

pH ótimo: Para a determinação do pH ótimo da  $\alpha$ -galactosidase de *C. arabica* foi conduzidas reações em solução tampão citrato fosfato 50 mM. Para isso os extratos eram incubados por 20 minutos a 45°C em tampão com pH de 2,5 a 10,0 com acréscimo sempre de 0,5 ponto.

Curvas de  $K_m$  e  $V_{max}$ : Os ensaios para determinação de  $K_M$  e  $V_{max}$  aparentes foram realizados com utilização do extratos enzimáticos da S-200 e diferentes concentrações de pNP- $\alpha$ -d-galactospiranosídeo a uma temperatura de 45°C por 20 minutos de incubação. As concentrações usadas variaram de 1,1 a, 45,5 mM. Os valores de  $K_M$  e  $V_{max}$  aparentes foram calculados por meio da curva de velocidade e pela equação do duplo recíproco de Lineweaver & Burke.

Ensaio enzimático de  $\alpha$ -galactosidase: Nos ensaios de  $\alpha$ -galactosidase foi empregado o pNP- $\alpha$ -D-galactopiranosídeo (Sigma Chem. Co., EUA), extrato enzimático e tampão acetato de amônio 50 mM, pH 6,5 [10 $\mu$ L:20 $\mu$ L:20mL]. A mistura era incubada em banho maria a 45°C e após 20 minutos a reação interrompida pela adição de 1 mL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0.05M. A leitura de absorbância era feita a 405 nm e as atividades enzimáticas calculadas a partir do coeficiente de extinção molar de 18.400 para o p-nitrofenol.

### **Purificação do manano de reserva de grãos de café**

Foram utilizados na obtenção do manano de café apenas os endospermas dos frutos coletados da variedade arábica com sua maturação completa, que foram secos a 60°C e moídas em moinho de bolas. Cerca de 500 mg do pó dos grãos de café foram submetidos à remoção de açúcares solúveis com 50mL de etanol 80% e mantidos a 80°C por 20 minutos, que em seguida eram centrifugados e descartados o sobrenadantes. Esse procedimento se repetiu 4 vezes. Após a remoção dos açúcares solúveis o material foi seco em estufa a 60°C por 24 horas

Ao material foram adicionados 50 mL de uma solução de oxalato de amônio 0,5%, pH 7, a 100° C por 1 h (2 X), sendo os resíduos coletados por centrifugação a 2700 g por 15 minutos a 25° C. Os resíduos dessa extração foram submetidos à extração (2 X cada) com 50 mL de hidróxido de sódio 8M resultando na fração solúvel em álcali forte. Estas frações também foram dialisadas, liofilizadas e analisadas quanto à presença dos monossacarídeos por cromatografia de troca aniônica de alta performance com detector de pulso amperométrico (HPAEC/PAD) em sistema Dionex DX/ 500, coluna Carbo-Pac PA 1, em eluição isocrática com NaOH 20 mM por 80 minutos

## Imunolocalização da $\alpha$ -galactosidase

Sementes de *C. arabica* foram coletadas durante a maturação nos estádios chumbão, verde e cereja, e fixados em solução de Karnovsky (2% de paraformaldeído, 2,5% de glutaraldeído em solução tampão de cacodilato de sódio 0,1M pH 7,4) segundo Karnovsky (1965). O material fixado foi mantido sob vácuo por aproximadamente 30 minutos permanecendo, posteriormente, por no mínimo 48 horas na geladeira (4°C). Após esse prazo, o material foi hidratado a partir de etanol 70%, segundo a série alcoólica etílica decrescente, permanecendo ao final 24 horas em água destilada. Em seguida foram mantidas em estufa a 60°C em Polietilenoglicol 20% (PEG 20%), cuja concentração, após cerca de 48 horas de estufa, foi atingindo o nível de 100%, quando os materiais foram emblocados em PEG puro (Richter 1981).

As sementes emblocadas foram seccionadas transversalmente em micrótomo de deslize, com espessura de aproximadamente 15 $\mu$ m, sendo parte das secções obtidas com auxílio de fita adesiva transparente do tipo durex (Richter 1981). Após a retirada do PEG com água destilada, as secções foram submetidas à técnica de imunolocalização através da peroxidase, adaptada de Buckeridge et al. (2005).

Dessa forma, as secções foram incubadas por 3 horas em solução de bloqueio contendo 0,1% de gelatina, 1% de BSA em tampão fosfato salino (PBS) 0,1M pH 7,0, contendo algumas gotas de Tween 20. Posteriormente, foram incubadas durante uma noite em solução contendo anti- $\alpha$ -galactosidase de guar diluído 1:200 em PBS. O anticorpo foi preparado em coelhos contra  $\alpha$ -galactosidase de sementes de guar e cedido pelo Professor John S. Grant Reid, do Department of Biological Sciences da University of Stirling, Escócia.

Depois da incubação com o anticorpo anti- $\alpha$ -galactosidase de guar, as membranas foram lavadas com Tris-HCl 50mM pH 7,4 quatro vezes, dez minutos cada e então incubadas uma hora em solução contendo anti-imunoglobulina de coelho retirado de cabra, conjugado com peroxidase, diluído 1:200 em PBS. Após a incubação as membranas foram novamente lavadas com Tris-HCl 50mM pH 7,4 quatro vezes, dez minutos cada.

Após a lavagem, foi adicionado diaminobenzidina – DAB (0,05g em 100 ml Tris-HCl 50mM pH 7,4) seguido pelo peróxido de hidrogênio 0,03%, sendo a reação interrompida com adição de água nas secções. A reação, caracterizada por granulação de cor escura (amarronzada) no tecido, indica a presença da enzima  $\alpha$ -galactosidase.

Como controle, algumas secções passaram pelo processo de bloqueio, porém foram incubadas somente em anti-imunoglobulina, seguido pela adição de diaminobenzidina e peróxido de hidrogênio, para detecção de possíveis ligações não específicas do segundo anticorpo. Outras secções foram submetidas à mesma técnica, porém sem nenhum anticorpo, substituindo-se a incubação do mesmo por incubação em solução de bloqueio, visando detectar possível autoreação no material.

As secções foram visualizadas em fotomicroscópio marca Jena-Zeiss, obtendo-se fotomicrografias para montagem manual da prancha.

## **Sequenciamento N-Terminal**

Para o sequenciamento da sequência N-terminal da  $\alpha$ -galactosidase de endosperma de café, a proteína pura correspondente a apenas uma banda em SDS-PAGE, foi transferida por eletroforese para uma membrana de PVDF e após coloração com comassie, a banda correspondente à enzima foi recortada e enviada para sequenciamento para o Prof. Lewis Greene, da USP-Ribeirão Preto.

## **Sequenciamento da seqüências internas**

Digestão das proteínas: A região do gel, contendo as proteínas obtidas em Sphacryl S-200 foi extraída, com um bisturi, cortadas em segmentos de 1 mm, colocadas em tubos eppendorf e armazenados na temperatura de 4°C.

Diferentes concentrações (5, 10, 20 e 40 ng. $\mu$ L<sup>-1</sup>) da proteína BSA (soro albumina bovina) foram utilizadas como controle positivo para verificar a eficiência

do método de digestão e eluição dos peptídeos. Quantidades (0,15, 0,3, 0,6 e 1,2  $\mu\text{g}$ ) de BSA foram submetidas à corrida de eletroforese em gel de poliacrilamida (12,5%), coradas conforme descrito no item (3.5), digeridas e ressuspensas em 30  $\mu\text{L}$  de tampão (1% ácido fosfórico e 5% acetonitrila). Posteriormente diferentes tempos (6, 9, 12 e 18 horas) de digestão em gel de poliacrilamida foram avaliados, usando 10  $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$  de BSA.

A digestão das proteínas em gel foi realizada conforme PARKER et al., (1998) com modificações, descrito abaixo:

Remoção do corante: Os segmentos de gel contendo as proteínas foram lavados em água MilliQ, descorados por três vezes na solução contendo 50 % de acetonitrila (ACN) e 25 mM de bicarbonato de amônio (AMBIC) por 30 min, desidratados duas vezes em 100% ACN por 10 min. A acetonitrila foi removida e o resíduo remanescente do gel foi deixado para evaporar à temperatura ambiente.

Redução e alquilação: Os fragmentos de gel contendo as proteínas foram reidratados e reduzidos em DTT (20 mM DTT / 50 mM AMBIC) a 60°C por 40 minutos e alquilados com iodoacetamida (55 mM IAA / 50 mM AMBIC) no escuro por 30 minutos. A iodoacetamida foi removida e os fragmentos foram lavados em 25 mM AMBIC e posteriormente desidratados em 100% de acetonitrila. A acetonitrila foi descartada e o resíduo remanescente no gel foi deixado evaporar à temperatura ambiente.

Digestão das proteínas: Os fragmentos de gel contendo as proteínas de interesse foram então reidratados com 15  $\mu\text{L}$  de solução contendo 150 ng tripsina em 25 mM de bicarbonato de amônio e mantidas a 37°C por 12 horas. A ação da tripsina foi interrompida com adição de 15  $\mu\text{L}$  de solução bloqueada (50 % acetonitrila e 5 % ácido fórmico).

Extração dos peptídeos: Os peptídeos foram eluídos da acrilamida com três lavagens de 15 minutos com solução de eluição (60% metanol e 1% ácido

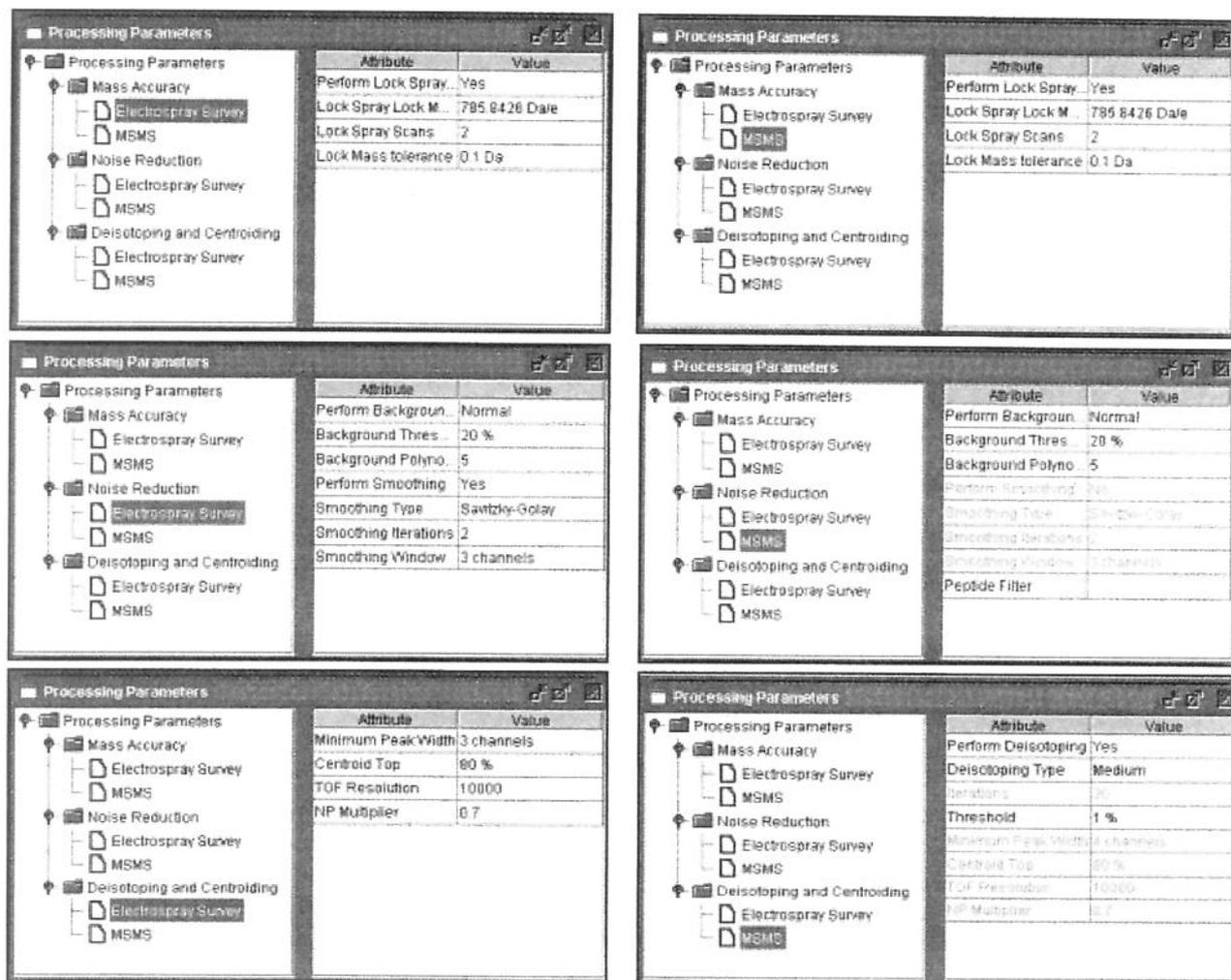
fórmico) a 45°C sob sonicação. O aparelho de sonicação usado foi o ULTRA-SOM (Thornton-INPEC Eletrônica LTDA) modelo G/T, tipo T7, com 40 KHz de frequência fixa e potência de 30 W. A solução contendo os peptídeos extraídos foi submetida a secagem em Speed Vac (Eppendorf) à temperatura ambiente, por 2-3 horas. Os peptídeos foram ressuspensos em 1% ácido fórmico e seqüenciados por espectrometria de massas.

Seqüenciamento das proteínas: As proteínas foram seqüenciadas por um espectrômetro de massas Q-TOF-Ultima API (ESI-MS/MS quadrupole/aceleração orthogonal time-of-flight) da Micromass acoplado a um sistema on-line de HPLC capilar, CapLC (Waters®).

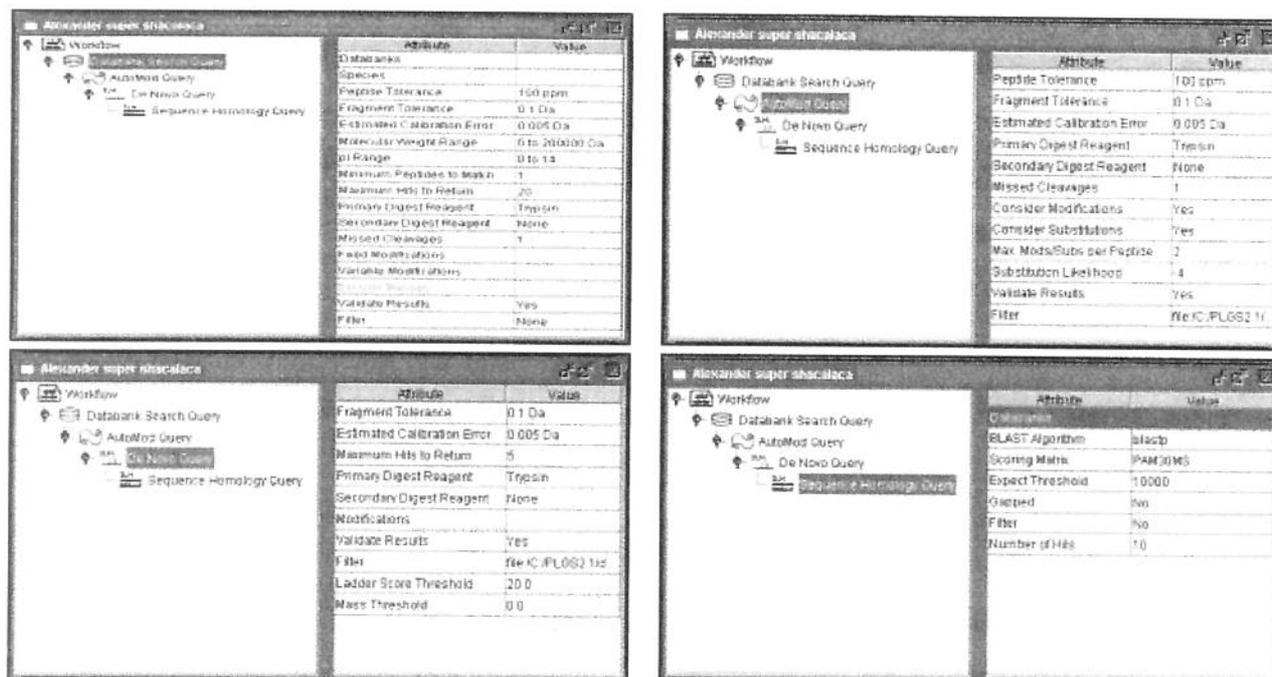
A separação dos peptídeos foi realizada usando-se uma Pre-Column C18 (Sentry™ Guard Column C18 Waters®) seguida por uma coluna de fase reversa C18 (Symmetry® C18 5 µm 0,32 x 150 mm Waters®). Os peptídeos foram eluídos através da variação do gradiente do tampão A (95% H<sub>2</sub>O, 5 % acetonitrila e 0,1% ácido fórmico) e do tampão B (95% acetonitrila, 5% H<sub>2</sub>O e 0,1% ácido fórmico) a um fluxo de 5 µL.min<sup>-1</sup>. A variação de gradiente do tampão B foi de 10 % a 15% em 5 min, de 15% a 35% em 20 min, de 35% a 45% em 5 min, 45% a 80% em 5 min, mantido por 5 min em 80% e os últimos 5 minutos em 10%.

A ionização das moléculas por electrospray foi realizada com uma voltagem fixa de 3000 V, temperatura de 90°C sob 50 psi de Nitrogênio. Os espectros foram adquiridos em modo MS/MS automaticamente com um limiar de 25 counts, dentro de uma amplitude de 50 a 2000 m/z. As aquisições foram realizadas simultaneamente com o peptídeo padrão GFP através do sistema Nanolock Spray da Micromass, para corrigir as variações que ocorrem ao longo do tempo.

Análise das informações: Os espectros de massas das amostras foram analisados e processados, conforme a figura 4 e 5 usando os programas MassLynx NT BioLynx V 4.0 e ProteinLynx V 2.1 da Micromass e submetidas para sua identificação a dois bancos de dados SWISS-PROT (BAIROCH et al., 2005) e GENOLYPTUS (<http://www.genolyptus.ucb.br>), através do programa Blast (ALTSCHUL et al., 1997).



**Figura 4.** Parâmetros de processamento usados pelo programa ProteinLynx V 2.1 na interpretação dos espectros de massa.



**Figura 5.** Parâmetros usados pelo ProteinLynx V 2.1 na identificação das proteínas pelo SWISS-PROT. “SWISS-PROT é um banco de anotações de seqüências de proteínas, criado em 1986 pelo Departamento de Bioquímica Médica da Universidade de Genebra e EMBL. Atualmente são mantidos pelo Swiss Institute of Bioinformatics (SIB) e EBI/EMBL. Este banco mantém um alto nível de anotações, como a descrição e a função da proteína, estrutura dos seus domínios, modificações pós-tradução, além de ter uma estrutura que facilita o acesso computacional a diferentes campos de informações.

## Bioinformática

A primeira etapa após a obtenção da seqüência N-terminal teve início com a utilização dos recursos operacionais disponibilizados pela bioinformática no banco de dados do Genoma Café (web site: [www.lge.ibi.unicamp.br/cafe/](http://www.lge.ibi.unicamp.br/cafe/)). Através desses dados foram realizadas pesquisas a fim de que genes relacionados à maturação do fruto do café fossem encontrados e posteriormente os genes de interesse fossem selecionados. Ainda no banco de dados foram selecionadas algumas seqüências (reads) dos genes da  $\alpha$ -galactosidase para que através do programa ClustalW, do Genoma Café, as seqüências pudessem ser analisadas e agrupadas de acordo com sua similaridade.

A etapa final consistira na clonagem caracterização e identificação molecular dos genes.

### **Clonagem do cDNA comprimento inteiro ('full-length') *CaGAL2***

O cDNA do *CaGAL2* foi amplificado por RT-PCR utilizando-se o RNA isolado total (2µg) do endosperma do *C. arabica* IAPAR59 a 147 DAF. A primeira fita de cDNA foi feita de acordo com o protocolo (Invitrogen, USA) e subseqüentemente tratado pela reação 3' RACE RT PCR usando o AGAL1 5' ACAGCTTGTTAGCCTTTACAATTT 3' e os primers AUAP (Invitrogen). O primer AGAL1 foi desenhado a partir do CONTIG deduzido da pesquisa do Brazilian EST Coffee Genome project com a seqüência N-terminal da proteína  $\alpha$ -galactosidase. As condições do PCR foram executadas usando o Termociclador PTC-100 (MJ Research, USA) usando a Advantage2 *Taq* DNA polymerase de acordo com o fornecedor (BD Biosciences Clontech, USA) sob as condições a seguir: a desnaturação inicial a 94°C, por um minuto; seguida de 40 ciclos de 94°C por 30 segundos; 68 °C por 3 minutos e o passo final extensivo de 68°C por 6 minutos.

Um fragmento de aproximadamente 1,4 kb foi obtido, ligado no TOPO2.1 (Invitrogen, USA) e amplificado em células de *E. coli* TOP10 (Invitrogen, USA). Um plasmídeo recombinante foi selecionado, purificado usando o Qiafilter extraction Kit (Qiagen, USA) e a dupla-fita seqüenciada com universal utilizando-se os primers internos (não mostrados).

### **Preparo das sondas**

A sonda  $\alpha$ -GAL2-específica foi amplificada por PCR, usando como um molde 10ng do plasmídeo clonado com cDNA *CaGAL2*, os primers AGAL1 e AGAL2 (5' ATTCTTGGCTATACTTGTACAAGT 3') sendo as condições do PCR descritas anteriormente. Antes do PCR, a sonda foi purificada com precipitação por etanol na presença de 1/10 v/v NaAc pH 5.2 e ressuspendido em água e

quantificado. Posteriormente 50ng foram marcados pelo random-priming com 50 $\mu$ Ci do [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP (Amersham Pharmacia Biotech, UK) de acordo com Sambrook et al. (1989).

## **Análises do Northern e Southern-Blot**

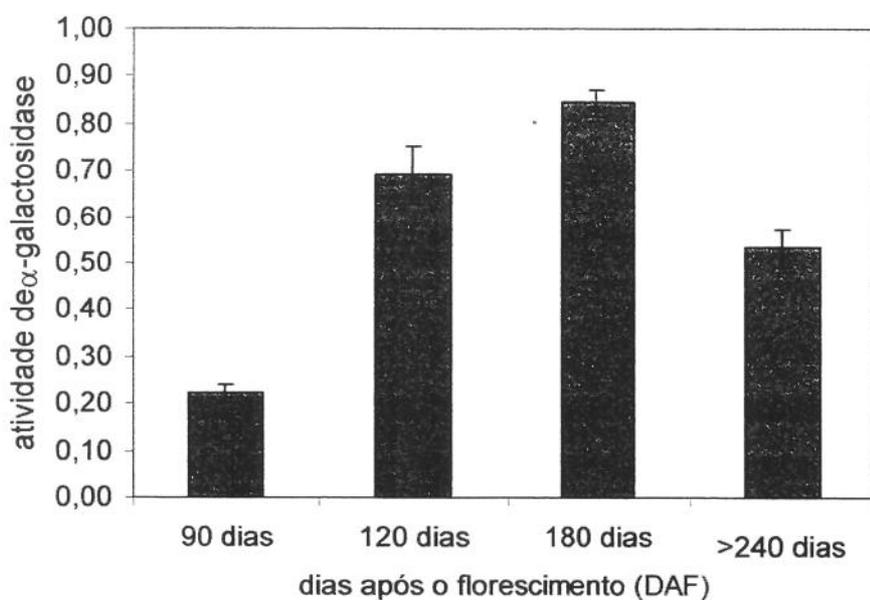
Os tecidos do café foram coletados do campo de crescimento, imediatamente congelados em nitrogênio líquido e estocados a  $-80^{\circ}\text{C}$  antes de extração do RNA de acordo com protocolo descrito por Rogers et al., 1999. Todo o RNA (15 $\mu$ g) foi desnaturado em 12.55 M formamida, 2.2 M formaldeído e tampão 20 mM 3-(*N*-morpholino)-propanesulfonic acid (MOPS), pH 7.0 (também contendo 5 mM Na-acetato e 0.1mM EDTA) a  $65^{\circ}\text{C}$  por 5 minutos e fracionado a 1.2% (p/v) de gel de agarose contendo 2.2 M formaldeído em tampão MOPS. A hibridização e os estágios de purificação foram feitos como descrito no uso de Ultrahyb™ buffer (Ambion, USA). Para assegurar-se de que quantidades iguais de todo o RNA fossem carregadas, colorações com brometo de etídio dos géis foram apresentadas em cada Northern.

Na análise do Southern-blot, o DNA genômico foi extraído de grãos de café fresco como descrito por Paillard et al., 1996, posteriormente digeridos (10  $\mu$ g) com as enzimas de restrição *DraI*, *EcoRI* e *HinDIII* independentemente, separado em um gel de agarose a 0.8% e finalmente transferido para as membranas Hybond N+ (Amersham Pharmacia Biotech, UK). A hibridização e a purificação foram realizadas como descrito por Marraccini et al., 2001.

## RESULTADOS

### Purificação da $\alpha$ -galactosidase de Endospermas de Grãos de Café

O primeiro passo a ser dado para o isolamento da  $\alpha$ -galactosidase de endosperma de café foi a coleta de frutos de plantas de *C. arabica* cv. Mundo Novo, entre 12, 17, 22, 25, 28, 30, 32, 36 e 38 semanas após o florescimento. A atividade de  $\alpha$ -galactosidase foi monitorada nos estádios correspondentes a 12<sup>a</sup>, 17<sup>a</sup>, 25<sup>a</sup> e 32<sup>a</sup> semanas, e o seu pico de maior atividade foi observado entre a 17<sup>a</sup> e a 25<sup>a</sup> semana após o florescimento como mostrado na figura 6. Estes dados permitiram inferir o ponto ideal de coleta de material a ser usado na purificação da enzima.

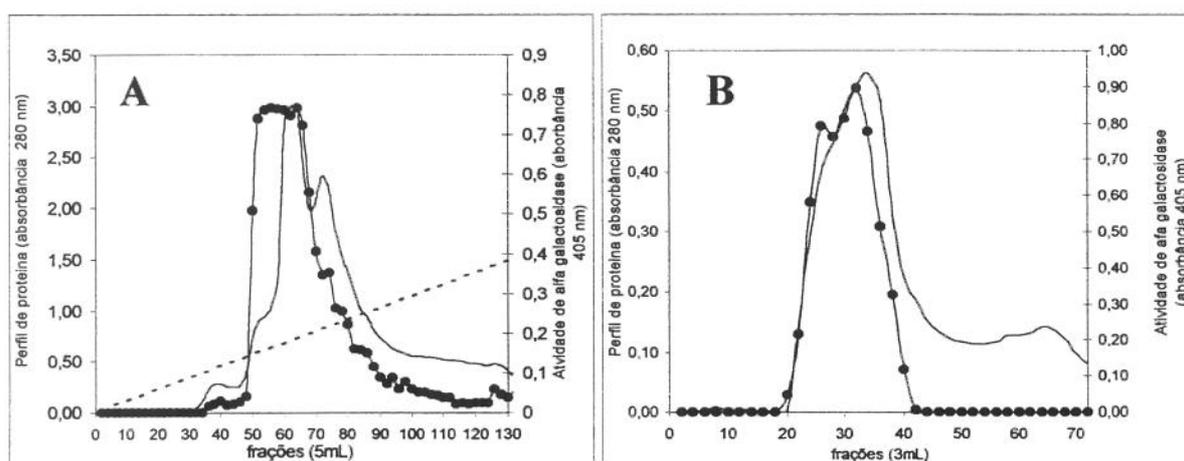


**Figura 6.** Atividade de  $\alpha$ -galactosidase em diferentes estádios de maturação do fruto. Aos 90 DAF, fruto chumbão; aos 120 DAF e 180 DAF, dias fruto verde e acima de 240 DAF, fruto cereja.

**Extrato bruto:** A etapa inicial para o isolamento da  $\alpha$ -galactosidase de endosperma de café, consistiu primeiramente na coleta dos frutos no estágio que apresentava pico de máximo de atividade (17a e a 25a semana após o florescimento). Foi utilizado para o preparo do extrato bruto protéico apenas o endosperma dos frutos coletados, após a separação da polpa, da casca e do perisperma.

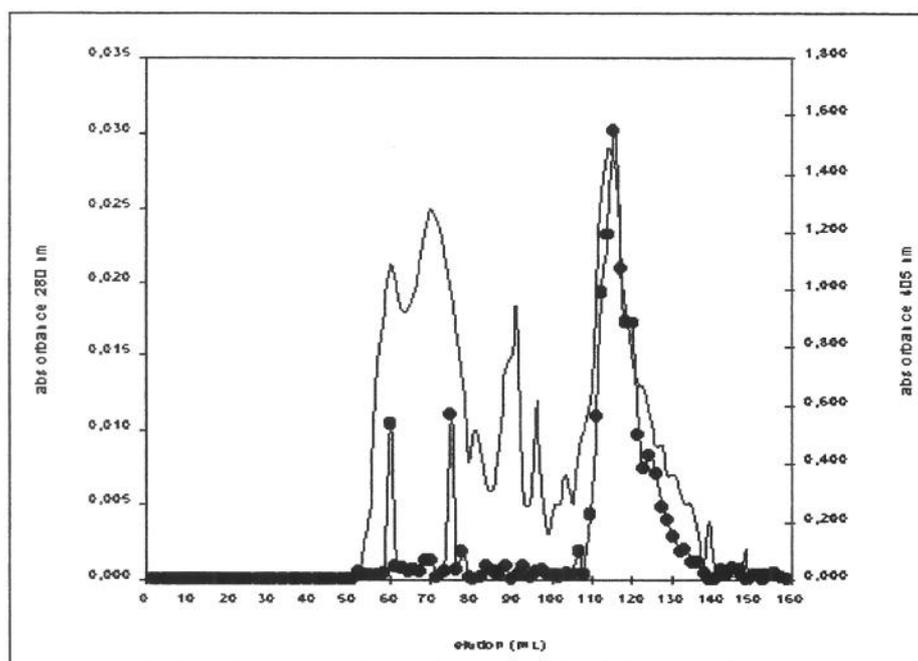
**DEAE-celulose:** O precipitado saturado de sulfato de amônio e re-suspenso em tampão Tris-HCl pH 7,8 20 mM foi aplicado na coluna (42x2.8 cm), que após a passagem deste na coluna, um gradiente de NaCl (0 – 0,5 M) permitiu a concentração da  $\alpha$ -galactosidase que eluiu como um único pico largo. O perfil de atividade nas frações obtidas mostrou que a enzima é retida na coluna naquelas condições (Figura 7A).

**CM-celulose:** As frações ricas em  $\alpha$ -galactosidase, eluídas da coluna de DEAE-celulose, foram reunidas e aplicadas em coluna de CM-celulose equilibrada em tampão acetato de sódio pH 5,0 50 mM após diálise por 16 horas contra o mesmo tampão. A simples passagem de tampão após a entrada do extrato na coluna permitiu que a enzima fosse eluída em pico coincidente com o pico de proteínas sendo essa purificada 2,89 vezes dos contaminantes em relação ao extrato bruto (figura 7B e tabela 1).



**Figura 7.** Perfil de eluição das cromatografias de troca aniônica em DEAE-Celulose (A) e catiônica em CM-Celulose (B). Teor de proteína 280 (—);  $\alpha$ -galactosidase 405 nm (—●—) e gradiente de 0 - 0,5 M de NaCl (.....)

**Sephacryl S-200** - As frações provenientes da coluna de CM-celulose foram reunidas e dialisadas contra o tampão acetato de amônio 50 mM, pH 5,0 e aplicadas em coluna de Sephacryl S-200 equilibrada contra o mesmo tampão e previamente calibrada com marcadores de peso molecular conhecidos. Durante o experimento notou-se que houve separação da  $\alpha$ -galactosidase de outras proteínas. Observa-se na figura 8, que a atividade de  $\alpha$ -galactosidase eluiu em um único pico de proteína sem a adição de qualquer proteína contaminante no volume correspondente ao peso molecular de 40 KDa. As frações equivalentes ao topo do pico de atividade de  $\alpha$ -galactosidase foram analisadas por SDS-PAGE e coradas por Comassie (Figura 15).



**Figura 8.** Perfil de eluição da cromatografias de filtração em gel em Sephacryl S-200. Teor de proteína 280 nm (—);  $\alpha$ -galactosidase abs 405 nm (—●—)

Durante os procedimentos adotados para a purificação da  $\alpha$ -galactosidase, a enzima foi purificada 12,81 vezes com rendimento de 2.3% (Tabela 1). O

processo de purificação da enzima teve como a principal etapa a cromatografia em Sephacryl S-200, considerando o extrato inicial com um alto conteúdo de proteínas contaminantes, esta última etapa contribuiu com um excelente ganho da atividade específica da  $\alpha$ -galactosidase.

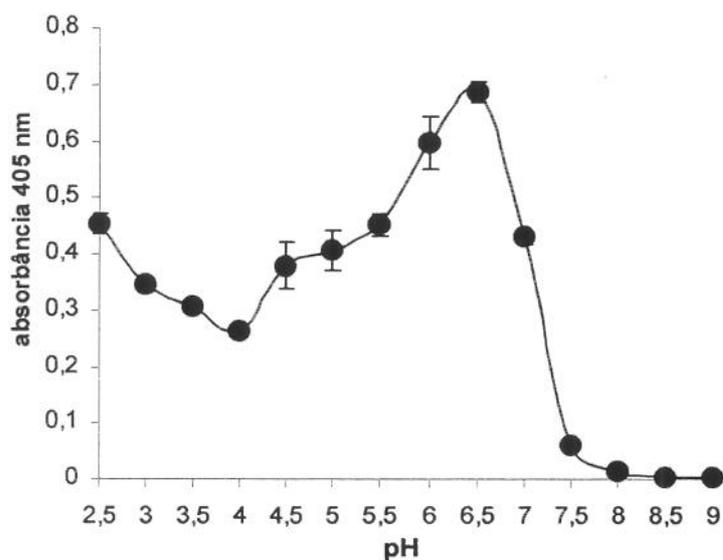
**Tabela 1:** tabela de purificação da enzima  $\alpha$ -galactosidase de grãos verdes de *Coffea arabica*

Etapas	Volume Total (mL)	Proteína ( $\mu\text{g/ml}$ )	Proteína Total ( $\mu\text{g}$ )	Atividade Específica ( $\mu\text{moles.m}^{-1}.\text{mg prot}^{-1}$ )	Fator de Purificação	Rendimento (%)
Extrato Bruto	455	302,7	302729,3	0,19		100,0
Sulfato de Amônio 60%	100	91,4	91379,8	0,25	1,34	40,4
DEAE-Celulose	65	53,2	53202,0	0,27	1,45	25,5
CM-Celulose	47	27,7	27705,3	0,55	2,89	26,4
Sephacryl S-200	31,5	0,5	543,7	2,43	12,81	2,3

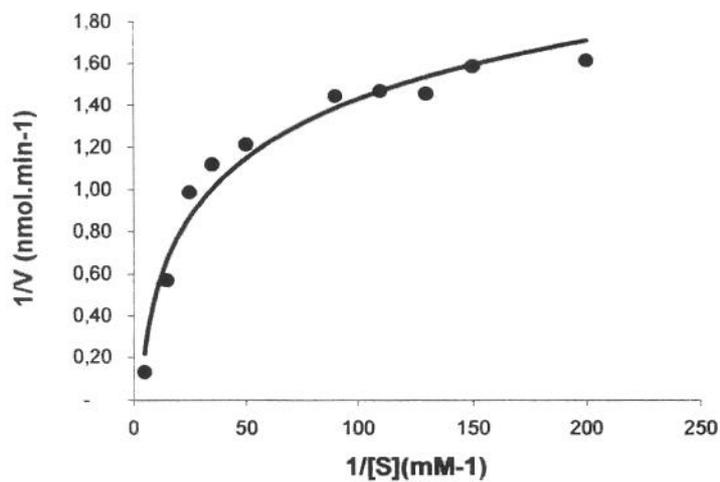
#### pH Ótimo e curvas de $K_m$ e $V_{max}$

Durante as primeiras etapas deste trabalho, procurou-se padronizar os ensaios de atividade enzimática utilizando o substrato sintético  $p\text{NP-}\alpha\text{-D-galactopiranosídeo}$  em incubações com o extrato bruto e demais frações obtidas nas diferentes etapas da purificação da  $\alpha$ -galactosidase. Os dados indicaram que a  $\alpha$ -galactosidase apresenta pH ótimo em 6.5. Deste ponto em diante, a enzima perde atividade rapidamente (Figura 9).

A análise cinética da atividade de  $\alpha$ -galactosidase permite verificar que o valor de  $K_m$  da enzima é de  $0,44 \mu\text{M}$  e sua  $V_{max}$  é de  $1,73 \mu\text{mol.min}^{-1}$ , determinados para as condições dos ensaios, realizados a uma temperatura de incubação de  $40^\circ\text{C}$  por 20 minutos. Os dados da cinética da  $\alpha$ -galactosidase em diferentes concentrações de substratos estão resumidos na figura 10.

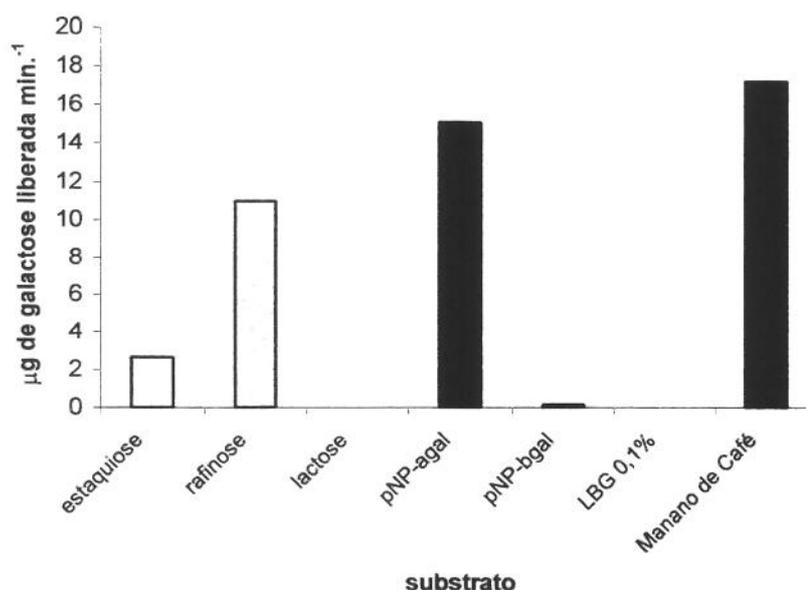


**Figura 9.** Efeito do pH sobre as atividades enzimáticas dos extratos de diferentes estádios de desenvolvimento. Incubação a 45°C por 20 minutos em tampão de Mcllvaine.



**Figura 10.** Efeito das concentrações do substrato pNP- $\alpha$ -D-Galactopiranosídeo na velocidade de hidrólise do mesmo pelos extrato da  $\alpha$ -galactosidase de endosperma de *C. arábica*.

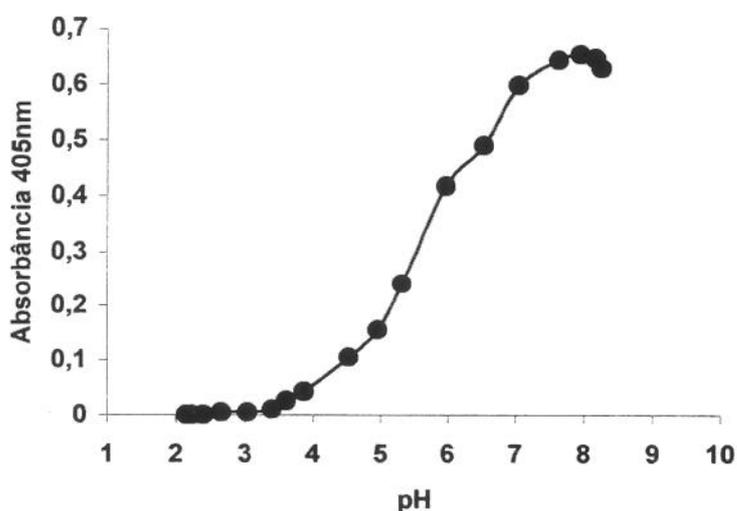
Os ensaios de especificidade de substrato estão dispostos na figura 11. A atividade da  $\alpha$ -galactosidase foi testada empregando-se  $\rho$ NP- $\alpha$ -galactopiranosídeo estaquiose, rafinose, lactose,  $\rho$ NP- $\beta$ -galactopiranosídeo, LBG e Manano de Café como substratos. A enzima purificada dos endospermas do café é capaz de liberar a galactose em maior quantidade do  $\rho$ NP- $\alpha$ -galactopiranosídeo e Manano de Café, apresentado ainda uma menor atividade sobre a rafinose e baixíssima atividade sobre a estaquiose. A  $\alpha$ -galactosidase é capaz ainda de hidrolisar algumas ligações de  $\rho$ NP- $\beta$ -galactopiranosídeo. A ligação  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) da lactose e substratos como o LBG com razão manose/galactose 3.8:1 não foram hidrolisados pela enzima.



**Figura 11.** Ação da  $\alpha$ -galactosidase sobre diferentes fontes de galactose como substrato. Os ensaios enzimáticos foram realizados em pH 6,5 a 30<sup>o</sup>C/20h. Os dados estão expressos em  $\mu$ g de galactose liberada em relação ao total de galactose disponível nos substratos. (estaquiose, rafinose, lactose,  $\rho$ -NP- $\alpha$ -D-galactopiranosídeo e  $\rho$ -NP- $\beta$ -D-galactopiranosídeo concentrações em 25 mM), (LBG e manano de café, soluções a 0,1%)

## Focalização Isoelétrica

Os dados anteriores indicaram que a  $\alpha$ -galactosidase apresenta pH ótimo em 6,5. Este pH ótimo está mais próximo do perfil de enzimas que atuam no citoplasma (e não na parede celular, as quais têm normalmente pH entre 4 e 5) com relevante atividade durante o período de maturação final do fruto de café. O material rico em atividade de  $\alpha$ -galactosidase foi submetido a focalização isoeletrica preparativa em Rotofor. Neste experimento as frações formaram um único pico de atividade e indicaram que o pI da enzima está em torno de 8 (figura 12).



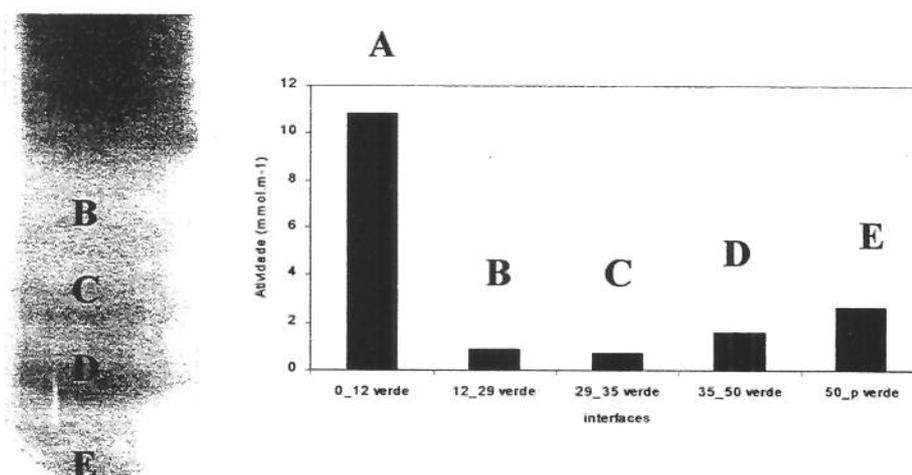
**Figura 12.** Distribuição da  $\alpha$ -galactosidase de café em relação ao pH após focalização isoeletrica em Rotofor (BioRad).

## Separação das membranas celulares em gradiente de sacarose

A partir das informações obtidas do experimento em diferentes pHs, passamos a especular que  $\alpha$ -galactosidase purificada do endosperma de café, que é ativa sobre o manano da parede celular do próprio endosperma, pudesse

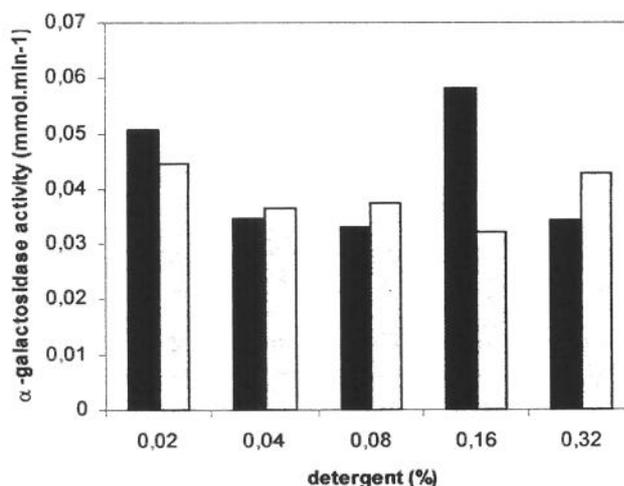
estar associada a vesículas de transporte ou no Complexo de Golgi e, portanto, no citoplasma e não na parede celular. Para avaliar tal possibilidade, optou-se por mais dois experimentos buscando a localização da enzima: 1) em membranas separadas por ultracentrifugação em gradiente de sacarose dos frutos verdes e 2) a imunolocalização da  $\alpha$ -galactosidase em tecidos de endosperma durante o desenvolvimento.

O fracionamento celular das sementes de frutos verdes, no entanto, mostrou atividade em uma fração de material de alto coeficiente de sedimentação, ou seja, consegue atravessar uma fração de sacarose 50% (figura 13). Devido à indisponibilidade de reagentes para dosagem de enzimas marcadoras das diferentes organelas, não foi possível identificar as organelas presentes em cada interface e por isto foi assumido, seguindo Buckeridge et al. 1999, que as frações corresponderiam a mitocôndrias na interface 12\_29% (B), complexo de Golgi na interface 29\_35% (C), retículo endoplasmático em 35\_50 (D) e por fim vesículas e fragmentos de parede no pelet (E).



**Figura 13.** Fracionamento celular de frutos verdes. As membranas foram fracionadas em função da densidade em um gradiente descontínuo de sacarose (E. pelet em 50% (vesículas/fragmentos de parede); D. 35\_50% (retículo endoplasmático) C. 29\_35% (complexo de Golgi); B. 12\_29% (mitocôndrias) e A, material sobrenadante). A atividade de  $\alpha$ -galactosidase foi medida nas diferentes frações.

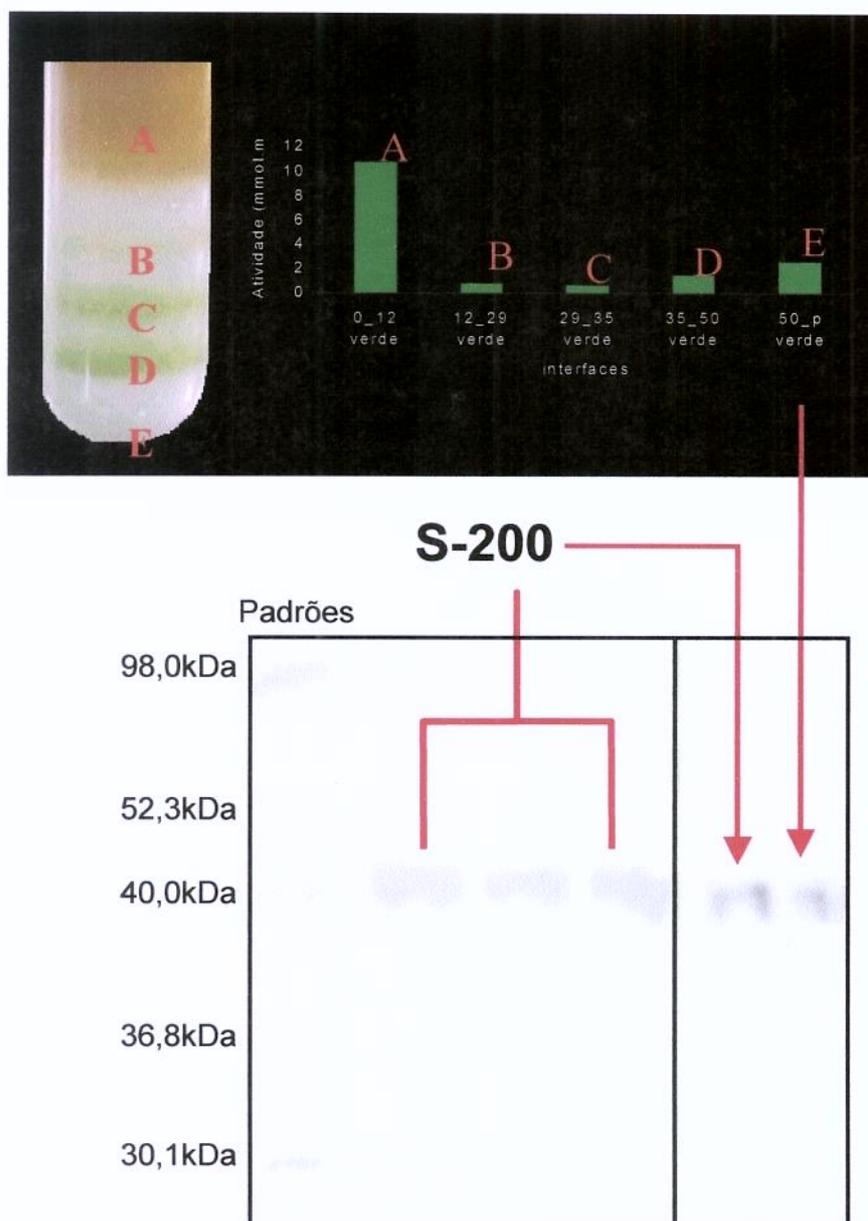
Observou-se que a maior parte da atividade enzimática ocorre na fração solúvel (A na figura 14). As outras frações também apresentam alguma atividade, mas esta foi maior na fração E. Tal atividade do material oriundo da fração E, supostamente membranas de pequenas vesículas, não foram solubilizada em dois tipos de detergentes; Triton 100 que é um detergente iônico e Nonidet que é um detergente não-iônico (figura 14).



**Figura 14.** Perfil de atividade de  $\alpha$ -galactosidase em diferentes concentrações de detergente. No ensaio foi utilizado o sedimento. Triton 100, (■) e Nonidet, (□).

Em relação à figura 8, as frações reunidas da Sephacryl S-200 foram reunidas e analisadas por SDS-PAGE e ao corar com Comassie Brilliant Blue, a revelação mostrou duas bandas bem próximas (figura 15), embora o perfil de eluição das frações obtidas da Sephacryl apresente apenas um pico de atividade em pH 6,5 com peso molecular em torno de 40 kDa. A indicação da revelação com o Comassie mostrou que a banda que cora mais forte foi a banda referente a 40 kDa confirmando assim o isolamento e a informação sobre seu peso molecular (figura 8). Um *Western Immunoblotting* utilizando o material da interface "E" (vesículas) do fracionamento celular (figura 15) com anticorpo contra  $\alpha$ -galactosidase de guar (cedido pelo Prof. J.S. Grant Reid, da Universidade de

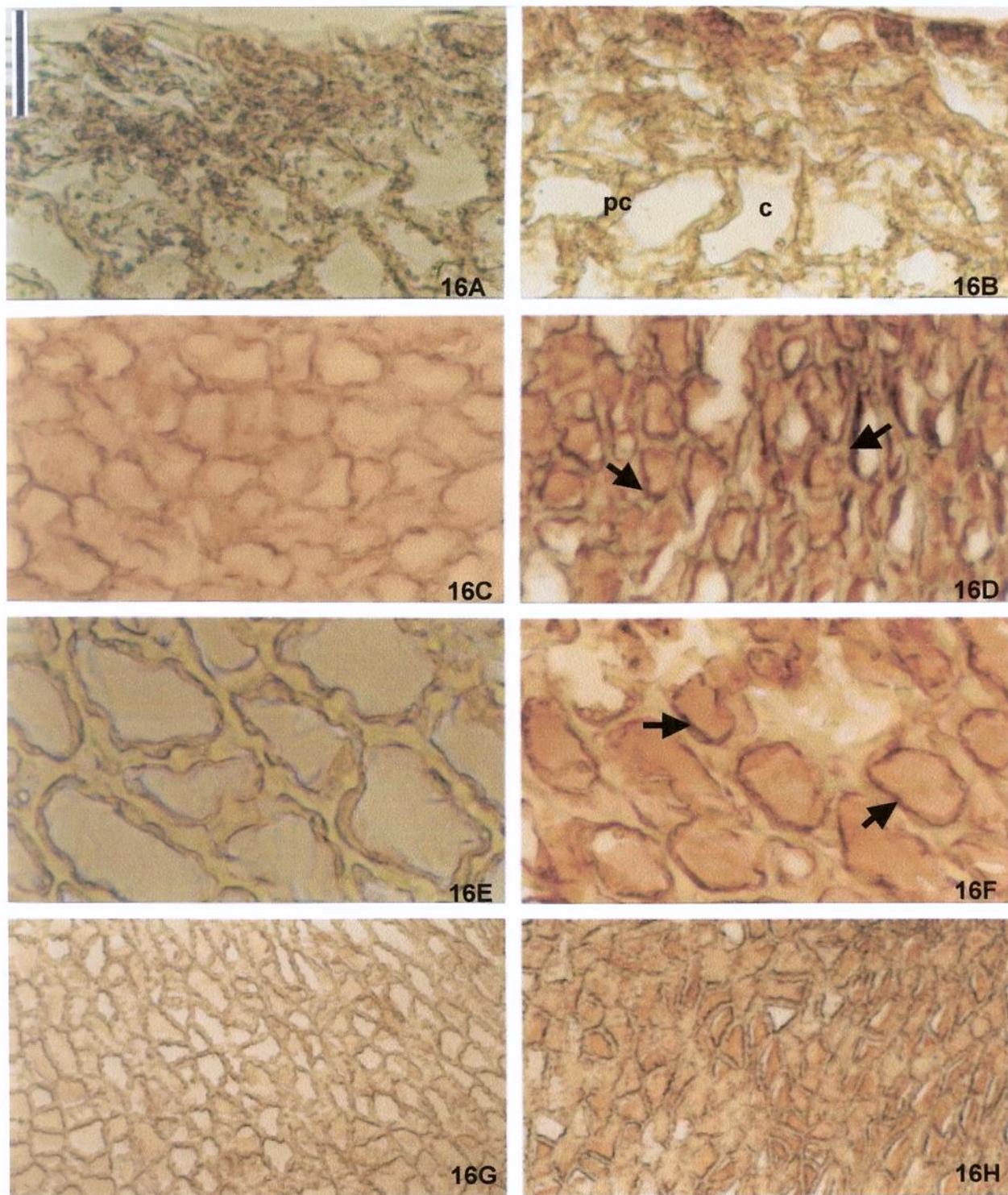
Stirling, Escócia) mostrou uma banda na mesma posição da enzima purificada (figura 15).



**Figura 15.** Fracionamento celular de frutos verdes e ImunoBlotting com anticorpo anti- $\alpha$ -galactosidase. As organelas foram separadas em um gradiente descontínuo de sacarose (50, 32, 28, 19 e 8%) e a Atividade de  $\alpha$ -galactosidase foi medida nas diferentes frações. As proteínas da fração E e a fração com maior atividade da Sephacryl S-200 foram analisadas por SDS-PAGE e as proteínas foram transferidas para uma membrana de nylon e hibridizadas com anticorpo anti- $\alpha$ -galactosidase. A proteína purificada em S-200 possui as mesmas propriedades da proteína encontrada na fração insolúvel do fracionamento celular.

## Imunolocalização da $\alpha$ -galactosidase

Com base nas características referentes à atividade da enzima ao longo da maturação do fruto e ao seu pH ótimo, alguns estudos histológicos foram feitos a fim de certificar quanto a localização da  $\alpha$ -galactosidase ao nível celular. Para isso a atividade de  $\alpha$ -galactosidase foi monitorada através da técnica de imunolocalização, adaptada de Buckeridge & Reid (1994). O trabalho foi realizado utilizando-se sementes de *C. arabica* coletadas durante a maturação nos estádios chumbinho, verde e cereja, e fixados em solução de reagente de Karnovsky. A reação cruzada da enzima  $\alpha$ -galactosidase do café com o anticorpo anti- $\alpha$ -galactosidase de guar é caracterizada pela cor amarronzada no tecido estudado. No tratamento referente ao estágio chumbão da maturação do fruto do café (90 DAF), não foi detectada a presença da enzima no material, a não ser na camada que se encontra mais externa desse tecido, presente por todo o citoplasma da célula, reação essa não observada no controle (figura 16A e 16B). Esta pequena reação da enzima na camada mais externa do endosperma corrobora a baixa atividade enzimática encontrada neste estágio de desenvolvimento dos frutos (figura 6). Contudo, no estágio verde em relação ao controle, a enzima foi localizada por todo o endosperma presente no citoplasma das células, com maior intensidade nas regiões próximas a parede celular (figura 16C e 16D e 16E e 16F), o que coincide com o pico de atividade mostrado na figura 8. A queda de atividade enzimática no ponto cereja em relação ao estágio verde observada ainda na figura 6, foi também confirmada através da imunolocalização da enzima nos frutos cerejas (figura 16G e 16 H), devido a uma reação menos intensa entre o anticorpo e  $\alpha$ -galactosidase em relação ao estágio verde do fruto.



**Figura 16.** Imunolocalização da  $\alpha$ -galactosidase em secções transversais de endospermas de sementes de *Coffea arabica* em diferentes fases da maturação. Tratamento com dois anticorpos. 16A e 16B Estádio chumbão da maturação. Fig. 16 C, D, E e F. Estádio verde da maturação. 16 G e 16 H Estádio cereja. (pc = parede celular; c = citoplasma; a seta indica a reação que caracteriza a presença da  $\alpha$ -galactosidase).

## Sequenciamento do N-terminal

Na Tabela 2 é apresentada a sequência N-terminal obtida por degradação de Edman no laboratório do Prof. Lewes Greene e José César Rosa de Ribeirão Preto. O teor de glicina no primeiro ciclo (236pmol) e o restante da seqüência a partir do 5ºciclo ao redor de 15-20 pmol indicam que se trata de contaminação por glicina. Pequenos peptídeos contaminantes não seria separadas e encontrados junto com bandas de maior peso molecular em eletroforese SDS-PAGE, a qual foi utilizada para separar a proteína de interesse e transferida para PVDF. Duas seqüências concomitantes dariam até o 20ºciclo dois sinais de aminoácidos, o que não ocorreu, portanto a banda de proteína eletrotransferida pode ser considerada pura, embora a porção N-terminal esteja "mascarada" com glicina. Portanto, pode-se considerar que a banda transferida para o nylon estava pura e apresenta uma seqüência N-terminal homogênea.

**Tabela 1:** tabela de purificação da enzima  $\alpha$ -galactosidase de grãos verdes de *Coffea arabica*

<b>Ciclos</b>	1º	2º	3º	4º	5º	6º	7º	8º	9º	10º
<b>Aminoácidos</b>	G	G	G	X	N	L	F	T	G	K
<b>pmol</b>	236	23	15	-	19	12	10	19	6	6
<b>Ciclos</b>	11º	12º	13º	14º	15º	16º	17º	18º	19º	20º
<b>Aminoácidos</b>	W	V	V	D	S	(S)	F	P	(P)	Y
<b>pmol</b>	3	8	9	16	6	6	3	3	5	3

## Análise da seqüência do cDNA *CaGAL2*

A seqüência N-terminal (NLFTGKVVVDSSFP) foi usada para fazer um blastX no Banco de Dados do Projeto Genoma do Café, que foram identificados vários "reads" (mais de 60) com similaridade, principalmente no banco de cDNA

de *Coffea racemosa*. Usando essa informação foram designados primers específicos (AGAL1 e AGAL2), o primeiro usado para amplificar o cDNA inteiro por RT-PCR e o segundo para preparar a sonda específica GAL2 usada no northern e southern blots. O gene foi denominado **CaGAL2**, onde Ca indica *Coffea* arábica e GAL2 ( $\alpha$ -galactosidase) porque este não possui nenhuma homologia com as seqüências já descritas de  $\alpha$ -galactosidase de café por Marraccini (2005) e que foram chamadas CaGAL1 (de *C. arabica*) e CcGAL1 (de *C. canephora*) seja de proteínas ou de cDNA.

Todo o comprimento do cDNA *CaGAL2* de 1437pb contém uma região 5'UTR de 93-pb, uma seqüência codante de 1095-bp e uma região 3'UTR de 246-pb incluindo uma repetição terminal poli A de 23 resíduos de adenosina (dados não apresentados). O que deduz que a proteína possui 365 aa(aminoácidos) com um peso molecular teórico de 41,2 kDa e um pI estimado de 7,34 na sua forma nativa (dados não apresentados). Com a seqüência N-terminal obtida (NLFTGKVVVDSSFP), é possível localizar o peptídeo sinal dos resíduos de aminoácidos 1 a 47, que deve conduzir a forma madura de 318 resíduos de aminoácidos com um peso molecular teórico de 36,1 kDa e um pI estimado em 6,91.

Quando a proteína nativa (365aa) esta foi usada para fazer uma busca no banco de dados ([www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) and blastP program), a proteína *CaGAL2* do café mostrou um sítio conservado descrito DUF 231, que também é encontrado em muitas proteínas de plantas e caracterizado como um sítio único da família de proteínas *Arabidopsis* de função desconhecida (ver pfam03005.11), mas que não apresenta nenhuma função biológica conhecida.

A pesquisa do blastP mostrou que a *CaGAL2* do café apresentou similaridade com muitas proteínas de plantas (principalmente com *Arabidopsis thaliana* e *Oryza sativa*), como é caso do alto score (e-value  $2e-133$ ) obtido com a proteína AAM20296 de *A. thaliana* codificada pelo gene At1g29050. Os contigs obtidos tiveram 59% de identidade e 71% de homologia quando a forma nativa da proteína (365aa) foi usada e 65% de identidade e 82% de homologia com a forma madura da proteína (319 aa). Isso demonstra que a homologia da proteína de café

com a proteína AAM20296 de *A. thaliana* é alta na sua forma nativa e as maiores diferenças estão localizadas no primeiro aa, que reforça a idéia que este realmente corresponde a um peptídeo sinal.

### **Seqüências interna e N-terminal da proteína CaGAL2**

A seqüência N-terminal da  $\alpha$ -galactosidase putativa (CaGAL2) é NLFTGKWWVDSSFP e as seqüências internas YAWKPDSNVSSPR, TSAVSAVLLRWVSVAFSK, WAGPSSREPDGDAY e YAWKPDSRVCKPA foram também obtidas e posicionadas na seqüência de 365 aminoácidos da proteína CaGAL2. Essas seqüências foram também comparadas com aquelas obtidas na seqüência N terminal das proteínas não identificadas (UP1 e UP2) presentes na preparação comercial da  $\alpha$ -GAL da Boehringer e com a  $\alpha$ -GAL comum como descritas por Marraccini et al. (2005). A seqüência (GGGENLFQGKKVVD[S]) foi obtida das extremidades N-terminal das proteínas UP1 e UP2. As seqüências das UP1 e UP2 foram também obtidas R/KGNDA; R/KGLSTXAQXVNXVVS, (onde X é o resíduo de aminoácido não identificado), porém a seqüência da UP3 não foi obtida.

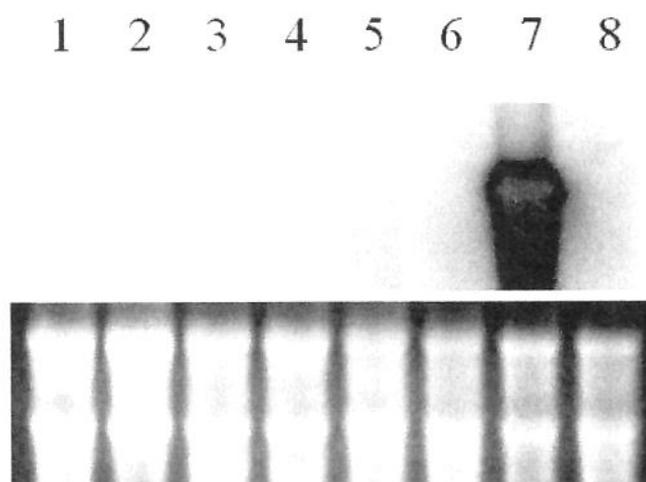
Essas seqüências estão localizadas na proteína CaGAL2. Isso pode ser observado na seqüência GGGENLFQGKKVVD[S] das proteínas UP1 e UP2 e na extremidade N-terminal da CaGAL2 sobreposta, ou seja os resíduos de aminoácidos 1 a 47 realmente constituem uma seqüência de peptídeo sinal ausente na forma madura da CaGAL2. Como mencionado anteriormente, as diferenças entre aminoácidos são observadas entre essas seqüências sugerindo que elas originaram-se de problemas durante o sequenciamento da proteína. Portanto, isso demonstra que as proteínas UP1/UP2 e CaGAL2 são realmente as mesmas proteínas.

As seqüências internas da nova forma CaGAL2 (YAWKPDSNVSSPR e YAWKPDSRVCKPA) parecem ser muito similares e também apresentam alta homologia com a proteína CaGAL1 mesmo se diferenças forem encontradas.

Foi muito difícil encontrar homologia na proteína CaGAL2 na seqüência terminal TSAVSAVLLRWVSVAFSK. Foi identificada uma pequena região de homologia (5aa) que também está na junção com a seqüência interna R/KGLSTXAQXVNQXXVS das proteínas UP1 e UP2. Além disso, nenhuma homologia foi encontrada entre a seqüência interna WAGPSSREPDGDAY da CaGAL1 e a proteína CaGAL2. De qualquer forma, a pequena seqüência R/KGNDA da UP1 e da UP2 foi identificada.

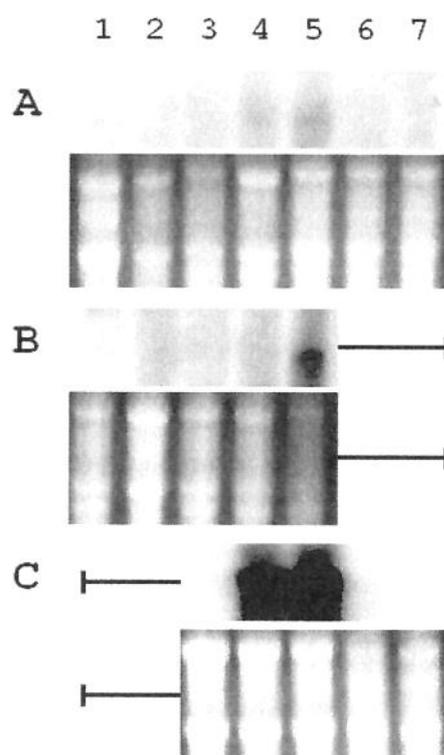
## **Expressão do Gene *CaGAL2***

**Expressão em diferentes tecidos de cafeeiro:** A expressão do gene *CaGAL2* foi primeiramente monitorada nos diferentes órgãos da planta de *C. arabica*. Para isso foram efetuadas coletas no campo experimental do IAPAR, Londrina - Pr, flores jovens e flores maduras, folhas novas (2 cm de comprimento), folhas distais e folhas sombreadas (ambas com 10 cm de comprimento), ramos e frutos cerejas inteiros (pericarpo, perisperma e endosperma) a 147 DAF (onde tem também há uma forte detecção da atividade enzimática). Elevada expressão do gene que codifica para a  $\alpha$ -GAL foi observada em frutos inteiros, sendo que nenhuma expressão foi detectada em outros tecidos nesse experimento de northern blot (figura 17)



**Figura 17.** Expressão do gene *CaGAL2*. O RNA total foi extraído de botões florais (1), flores maduras (2), folhas iluminadas de 10 cm de comprimento (3), folhas sombreadas de 10 cm de comprimento (4), folhas jovens de 2 cm de comprimento (5), caule (6), fruto inteiro a 147 DAF após o florescimento (7) e raízes (8) de *C. arabica* cv IAPAR 59. rRNAs coloridos por brometo de etídeo, foram usadas para monitorar as aplicações iguais das amostras de RNA.

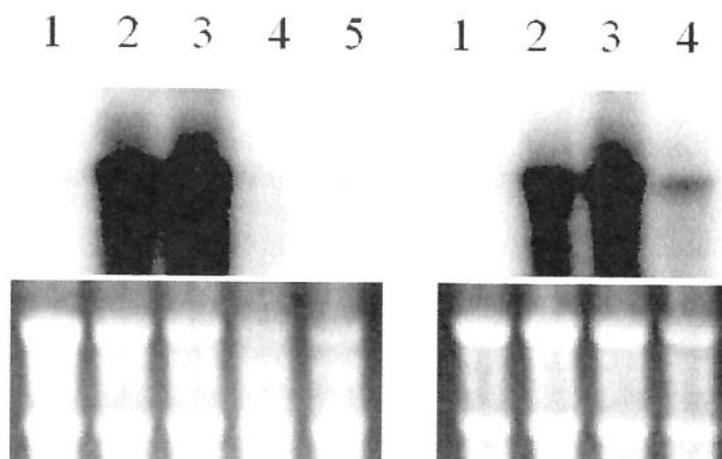
**Expressão de *CaGAL2* em diferentes tecidos do fruto do café:** Os grãos de *C. arabica* cv. IAPAR 59 foram coletados em diferentes estádios de seu desenvolvimento, de 30 DAF a 234 DAF, e o RNA total foi extraído separadamente dos tecidos: polpa, perisperma e endosperma. Exceto por uma fraca expressão a 176 DAF (figura 18), o gene *CaGAL2* não foi expresso durante o desenvolvimento da polpa de *C. arabica*. No tecido perisperma nenhuma expressão foi observada entre 60 e 147 DAF, porém uma fraca expressão parece ser detectada em 176 DAF. No endosperma, a expressão de *CaGAL2* não foi detectada em 118 DAF, apareceu muito alta entre 147 e 176 DAF e desapareceu nos últimos estádios (205 e 234 DAF) de maturação (figura 18).



**Figura 18.** Expressão do *CaGAL2* durante os diferentes estádios de desenvolvimento do fruto de café *C. arabica* cv. IAPARA 59. Total RNA isolado (15µg) a partir dos diferentes tecidos do fruto. Polpa (A), Perisperma (B) e Endosperma (C) em regular estádios de desenvolvimento (linha 1, 60 DAF; 2, 89 DAF; 3, 118 DAF; 4, 147 DAF; 5, 176 DAF; 6, 205 DAF e 7, 234 DAF). rRNAs coloridos por brometo de etídeo, foram usadas para monitorar as aplicações iguais das amostras de RNA

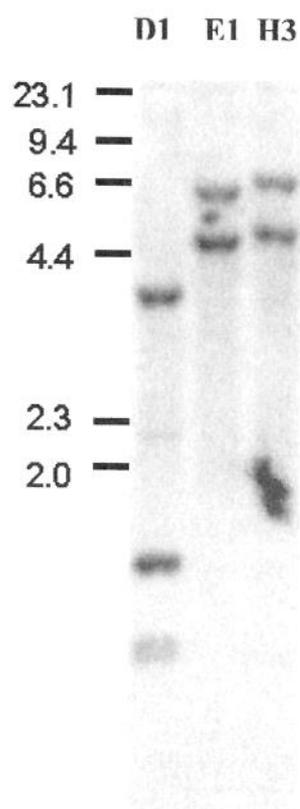
Como muitos reads codificando pelo cDNA *CaGAL2* foram encontrados no banco de cDNA de *C. racemosa* no projeto genoma café, a expressão do gene *CaGAL2* também foi testada no endosperma desta espécie. Nenhuma expressão foi observada em 18 DAF, aumentando em 42 DAF para alcançar um pico em 56 DAF. Um resíduo de expressão foi detectado em 70 DAF o que corresponde ao estágio do grão maduro nesta espécie, (figura 19).

Também é muito interessante notar que entre os 76 ESTs previamente identificados durante a pesquisa do Projeto Genoma Brasileiro do Café, 68 deles (representando 89,5%) foram encontrados na biblioteca de cDNA de fruto, principalmente em *C. racemosa* (63 ESTs), mas também em *C. arabica* (5 ESTs).



**Figura 19.** Comparação da expressão do gene *CaGAL2* durante o desenvolvimento do endosperma em frutos de *C. arabica* var. Sarchimor Iapar59 (esquerda) e *C. racemosa* (direita). Estágios de desenvolvimento do endosperma: (A) *C. arabica* (linha 1, 118 DAF; 2, 147 DAF; 3, 176 DAF; 4, 205 DAF e 5, 234 DAF) e (B) *C. racemosa* (linha 1, 28 DAF; 2, 42 DAF; 3, 56 DAF e 4, 70 DAF). rRNAs coloridos por brometo de etídeo, foram usadas para monitorar os depósitos iguais das amostras de RNA

**Análise de Southern blot:** Para avaliar o número de genes de *CaGAL2* codificados no genoma do *C. arabica*, a análise de Southern-blot foi realizada utilizando-se o cDNA *CaGAL2* como sonda específica (figura 20). A seqüência do gene *CaGAL2* é desconhecida, mas o mapa de restrição de seu correspondente cDNA revela a presença de restrição para *DraI* e *HindIII* ambos localizados no final 3' do cDNA, enquanto nenhum sitio de restrição foi encontrado para *EcoRI*. Duas bandas foram hidridizadas na digestão com *HindIII* (5.0 e 6.6 kb). Por outro lado, três bandas foram observadas quando o DNA genômico foi digerido com a enzima de restrição *DraI*. Juntos, esses resultados sugerem que o gene *CaGAL2* é provavelmente único no genoma do *C. arabica*.



**Figura 20.** Análise por Southern-blot do DNA genômico de *Coffea arabica* cv. IAPAR 59. Quinze microgramas de DNA genômico foram digeridos com as enzimas de restrição *DraI* (D1), *EcoRI* (E1) and *HindIII* (H3) separados por eletroforese em gel de agarose (0,8 %), e transferidos para membrana de nylon. Hibridizações foram realizadas com fragmento de de PCR (1394 pb) correspondente a amplificação do cDNA CaGAL2 pelos primers AGAL1 e AGAL2. Padrões de peso moleculares (DNA bacteriophage  $\lambda$  digerido por *HindIII*) são indicados a esquerda em kilobases.

## DISCUSSÃO

### Purificação da $\alpha$ -galactosidase

Embora se tenha uma considerável contribuição na literatura da ocorrência e importância da importância da  $\alpha$ -galactosidase durante a mobilização de reservas em sementes e na disponibilização de substrato para manutenção do crescimento inicial de plântulas, vários trabalhos têm sido realizados procurando estabelecer um vínculo dessa enzima durante as várias etapas de desenvolvimento do fruto do café, levando-se em conta a estrutura do polissacarídeo (vista como fator de influencia na qualidade da bebida do café) depositado nas paredes celulares.

Considerando os conhecimentos existentes sobre a presença e a atividade da  $\alpha$ -galactosidase em sementes de café, o presente trabalho teve como objetivo, contribuir com o conhecimento a respeito da  $\alpha$ -galactosidase e a sua importância durante a deposição do manano de reserva em grãos de café.

O protocolo de purificação da  $\alpha$ -galactosidase de *C. arabica* foi precedido da separação da casca, polpa e perisperma e a utilização apenas do endosperma, rico em atividade da enzima para o preparo do extrato bruto. Após a precipitação, do extrato bruto com sulfato de amônio, o extrato passou por cromatografias de troca aniônica e catiônica, sendo ainda necessária uma etapa de cromatografia peneira molecular. Desse modo o protocolo de purificação mostrou-se eficiente com uma purificação 12,8 vezes e um rendimento de 2,3%. A aplicação do extrato nas duas primeiras colunas respondeu por uma grande perda no teor de proteína. Durante estas etapas foram separados materiais celulares como fragmentos de paredes celulares e também polissacarídeos em solução. De fato esta prática pode ter contribuído com a exposição e interação da proteína à coluna de Sphacryl S-200 o que resultou em um excelente ganho da atividade específica da  $\alpha$ -galactosidase na etapa final de purificação. A coluna de S-200 ainda contribui com a confirmação do peso molecular, mostrando que a  $\alpha$ -galactosidase possui

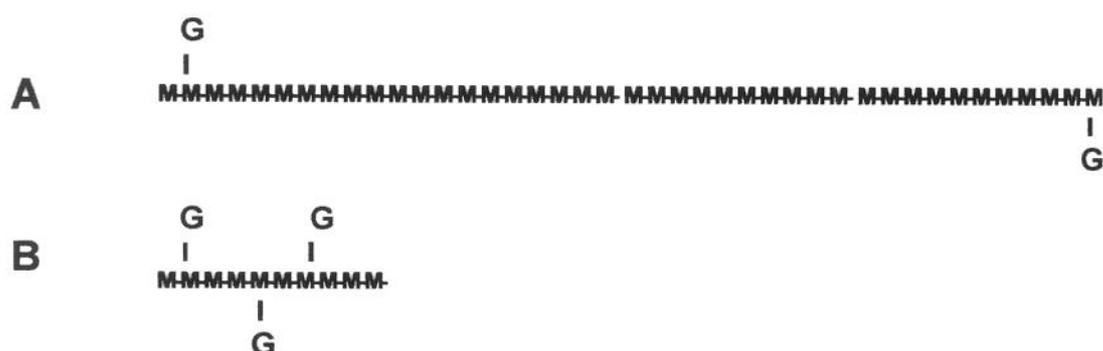
peso estimado de 40 kDa o que a coloca na faixa descrita por Marraccini et al. (2005).

A atividade da  $\alpha$ -galactosidase de *C. arabica* CaGAI2 apresenta seu melhor desempenho em pH 6,5. Este resultado confronta o que foi encontrado para outras  $\alpha$ -galactosidase de parede celular. McCleary (1983), encontrou um pico de atividade desta enzima purificada a partir de endosperma de sementes de *Cyamopsis tetragonolobus* (guar), que quando submetida a eletrofocalização apareceram bandas que diferiam entre pI 3,9 e 5,5. Em um outro experimento com sementes de alfafa, este mesmo autor detectou uma outra  $\alpha$ -galactosidase cujo o pI equivalente era 4,6. Em sementes da palmeira *Phoenix dactylifera* L., extratos do endosperma apresentaram atividade de três  $\alpha$ -galactosidases. Estas possuem pIs de 4,4; 4,6 e 4,9 segundo Sekhar et al., 1990. No entanto, o pH ótimo da  $\alpha$ -galactosidase de *C. arabica* enzima aqui isolada, pode estar relacionado quanto à sua localização dentro da célula e compartimentada em vesículas de transporte da rede trans do Complexo de Golgi. Desse modo a  $\alpha$ -galactosidase pode ser considerada como responsável por desenvolver um papel crucial no controle do tráfego interno da célula e a deposição do galactomanano nas paredes celulares do endosperma do café (Bewley, 1997)

Com relação ao estudo de especificidade da enzima ensaiada sobre diferentes substratos, esta mostrou-se bastante ativa sobre o substrato sintético pNP- $\alpha$ -galactopiranosídeo. A enzima é também ativa sobre a rafinose, apresentando ainda uma menor atividade sobre a estaquiose. Segundo Buckeridge & Reid (1994) exo-hidrolases de parede celular podem apresentar atividade sobre oligossacarídeos, mas como estes não estão presentes normalmente na parede celular, tais detecções de atividade possivelmente não têm significado biológico.

A  $\alpha$ -galactosidase isolada do endosperma de café tem alta especificidade sobre o manano extraído deste mesmo tecido. Porém a enzima não apresentou atividade sobre o galactomanano comercial (LBG). Embora a enzima tenha se mostrado capaz de degradar os diferentes substratos fontes de galactose, o motivo para a diferença no grau de ataque sobre o LBG e o manano de café esteja

relacionado com o grau ramificação destes dois polímeros. O galacto(manano) *Ceratonía siliqua* (LBG) apresenta três manoses para cada galactose enquanto que em manano de café para cada 40 manoses ocorre apenas uma galactose (figura 20). Em geral, nos dois tipos de (galacto)mananos, parece existir uma relação inversa entre a quantidade de galactose ligada e o nível de hidrólise pela  $\alpha$ -galactosidase. Baseado nestas diferenças de hidrólise pode-se sugerir que, de alguma forma a ramificação do polímero modula a ação catalítica da  $\alpha$ -galactosidase de café purificada em coluna de Sephacryl S-200. É possível que a presença de outras ramificações com galactose apresentem interferência no reconhecimento do substrato. De forma análoga, isto foi demonstrado, por exemplo, por Alcântara et al. (1999) para o ataque da  $\beta$ -galactosidase de sementes de *Copaifera langsdorffii* sobre oligossacarídeos de xiloglucano.



**Figura 20.** Esquema dos galacto(mananos) de endosperma de café coletado a partir do fruto cereja (A) e de galactomanano de *Ceratonia siliqua* (LBG), um polímero comercial.

## Localização subcelular e função bioquímica da $\alpha$ -galactosidase do café

Durante o experimento utilizando a separação das membranas celulares em gradiente de sacarose dos frutos verdes com sementes de café durante a maturação, foi detectada a atividade de uma  $\alpha$ -galactosidase presente na fração de material de alto coeficiente de sedimentação que não foi solubilizado com nenhum detergente, seja ele iônico ou não-iônico. Conforme reportado para sementes de milho, as frações entre 29 e 35% de sacarose geralmente contêm membranas do complexo de Golgi (Buckeridge et al. 1999). Como não houve detecção de atividade em nenhuma das interfaces, mas somente na fração solúvel e na fração microssomal, pode-se supor que a  $\alpha$ -galactosidase não esteja ligada à membrana mas seja uma enzima citoplasmática. A análise do material precipitado em 50% de sacarose e as frações reunidas da coluna de Sephacryl S-200 através do gel de eletroforese em SDS-PAGE, corroboram com a proteína estimada de 318 resíduos de aminoácidos com um peso molecular estimado de 36,1 kDa. O anticorpo anti  $\alpha$ -galactosidase de guar possibilitou a detecção de uma banda na mesma posição em que foi encontrada uma banda de reação cruzada em *Western Immunoblotting* nas diferentes preparações enzimáticas, ou seja, extraída diretamente do endosperma e purificada por vias solúveis ou a fração microssomal obtida após ultracentrifugação.

Percebe-se que a atividade da  $\alpha$ -galactosidase CaGAI2 é maior na faixa de pH entre 6,0 e 7,0, apresentando um melhor desempenho em pH 6,5. com base nas características referentes ao seu pH ótimo. Estes dados sinalizavam para uma enzima presente em vesículas de transporte ou complexo de Golgi. Na posse dessa informação e a fim de certificar quanto à localização da  $\alpha$ -galactosidase, foram realizados experimentos a localização da enzima ao nível celular. Para isso a  $\alpha$ -galactosidase foi monitorada através da técnica de imunolocalização. Em relação ao controle, o método permitiu observar a presença de  $\alpha$ -galactosidase no citoplasma das células do endosperma, com uma maior intensidade nas regiões

citoplasmáticas próximas à parede celular e com marcação mais intensa nos estágios verde e cereja. No entanto, não foi observada a presença da enzima ativa na parede celular em nenhum dos estádios de desenvolvimento do endosperma.

Redgwell et al. (2003) propôs um modelo de deposição do galactomanano em grãos de café em que o polímero seria bastante ramificado nos primeiros estádios de frutificação e posteriormente desramificado por uma  $\alpha$ -galactosidase. Nossos dados corroboram a proposição destes autores e sugerem que a  $\alpha$ -galactosidase parece ser ativa quando o galactomanano ainda está presente no citoplasma, provavelmente associado ao posicionamento das vesículas da trans-golgi network, mas não transmembrânicos. Estas descobertas denotam um sistema de edição do galactomanano após a sua biossíntese no complexo de Golgi pela Galtran e a Mantran. De fato, os dados obtidos nesse trabalho corroboram uma hipótese similar de que os  $\beta$ -glucanos de ligação mista em sementes de milho, já nas vesículas de transporte prestes a serem fundidas à membrana plasmática para inclusão na parede celular, podem ser editados por uma  $\beta$ -glucosidase específica (Kim et al., 2000).

A  $\alpha$ -galactosidase isolada no presente trabalho também apresentou atividade enzimática específica para o polímero de galactomanano de café extraído durante o processo de maturação das sementes, quando o manano ainda possui grau relativamente alto de  $\alpha$ -galactosilação. O fato de a enzima apresentar atividade sobre alguns oligossacarídeos também poderia significar que a  $\alpha$ -galactosidase isolada poderia estar relacionada ao metabolismo de outros açúcares que não o galactomanano. Tal possibilidade só poderá ser descartada quando efetuada a localização do galactomanano nascente (recém sintetizado) principalmente na face citoplasmática do complexo de Golgi, situação em que o polímero ramificado estaria exposto à ação enzimática, que foi localizada no citoplasma das células endospermicas.

## **A $\alpha$ -galactosidase de café tem expressão específica no endosperma e é produto do gene *CaGAL2***

Utilizando a sequência N-terminal e mais 4 seqüências internas obtidas por fragmentação proteolítica da  $\alpha$ -galactosidase purificada, foi possível deduzir uma seqüência de nucleotídeos que pode ser encontrada no banco de dados de café (Genoma Café). Tal seqüência, denominada *CaGAL2* foi analisada através de comparações em bancos de dados genômicos e também de análise de proteínas. Tais análises mostraram que a seqüência obtida neste trabalho não corresponde a qualquer  $\alpha$ -galactosidase conhecida. Os dados sugerem que a enzima isolada a partir do endosperma das sementes de café durante o desenvolvimento e deposição da parede celular é uma proteína ainda desconhecida. Para confirmar que a proteína purificada e a seqüência encontrada são as mesmas de fato será necessário realizar a expressão heteróloga da proteína e subsequentemente verificar sua ação como uma  $\alpha$ -galactosidase com características similares àquelas observadas para a enzima purificada. Tais experimentos estão em andamento.

A análise por Southern blot mostrou que *CaGAL2* corresponde a um único gene em café, o que ajuda a explicar a dificuldade de encontrar similaridade com outras  $\alpha$ -galactosidases conhecidas.

Os níveis de expressão gênica da *CaGAL2* foram medidos em frutos e nos diferentes estádios de desenvolvimento em que o endosperma substituiu o perisperma. Uma vez que os dados referentes ao Northern foram realizados com *Arábicas* diferentes (Sarchimor IAPAR59) daqueles obtidos em bioquímica (Mundo Novo), a expressão de *CaGAL2* se sobrepõe com os dados de atividades enzimáticas mostrados na figura 5. Durante esse estádio de desenvolvimento do fruto, a parede celular do endosperma se torna espessa devido ao aparecimento do galactomanano depositado (Redgwell et al, 2003). Quanto à quantidade de *reads* encontrados em *C. racemosa* não surpreende tanto, uma vez que se trata de uma planta de ciclo curto de maturação (cerca de 3-4 meses). Ocorre que a

planta necessita sintetizar de forma rápida o galactomanano e em um período relativamente curto em relação ao Arabica e ao Robusta (8 meses e 10 meses respectivamente), para que o polímero seja desgalactosilado e colocados da parede celular.

### **Importância fisiológica e biotecnológica da $\alpha$ -galactosidase de café**

Uma possível explicação para a colocação e subsequente retirada das galactoses no galactomanano durante sua biossíntese é que o sistema tenha que evitar o colapso das cadeias de manano quando ainda estão sendo sintetizadas no Golgi, uma vez que cadeias desgalactosiladas são pouco solúveis e altamente interativas entre si e com celulose (Redgwell et al. 2003). A presença da galactose poderia ter o papel de afastar as cadeias de mananos durante a sua biossíntese, até que as vesículas se aproximem da membrana plasmática para serem secretadas à parede celular. O fato de não termos detectado a enzima na parede celular pode significar ainda que a interação entre as cadeias de mananos desgalactosilados pela  $\alpha$ -galactosidase ocorra quando o polímero ainda se encontra no citoplasma. Neste momento, a ausência da galactose seria fundamental para permitir forte interação entre as cadeias de manano e formação de uma parede celular rígida, característica das sementes de café. Todas estas explicações ainda são especulativas e dependem de experimentos especificamente desenhados para compreender estes fenômenos ao nível celular. Considerando que o conhecimento da existência de uma suposta  $\alpha$ -galactosidase editora de galactomananos possibilita a obtenção de certo nível de controle sobre a solubilidade de um dos principais polissacarídeos presentes na bebida do café, nossos resultados parecem ter produzido um avanço considerável no sentido de construir ferramentas biotecnológicas úteis para alterar da qualidade da bebida do café e a produtividade e rendimento da bebida.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALCÂNTARA, P.H.N., DIETRICH, S.M.C. & BUCKERIDGE, M.S. (1999). Xyloglucan mobilisation and purification of a (XLLG/XLXG) specific  $\beta$ -galactosidase from cotyledons of *Copaifera langsdorffii* Desf. (Leguminosae). *Plant Physiology & Biochemistry* 37(9): 653-663.

ALTSCHUL, STEPHEN F., THOMAS L. MADDEN, ALEJANDRO A. SCHAFFER, JINGHUI ZHANG, ZHENG ZHANG, WEBB MILLER, DAVID J. LIPMAN (1997). "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402.

BAIROCH, A., APWEILER, R., WU, C.H., BARKER, W.C., BOECKMANN, B., FERRO, S., GASTEIGER, E., HUANG, H., LOPEZ, R., MAGRANE, M. (2005). The Universal Protein Resource (UniProt). *Nucleic Acids Res.* 33:D154-D159.

BEWLEY, J.D., BURTON, R. A., MOROHASHI, Y. & FINCHER, G. B. (1997) Molecular cloning of a cDNA encoding a (1-4)- $\beta$ -mannan endohydrolase from the seeds of tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Planta*, 203:454-459,.

BERTHAUD., J., CHARRIER, A. (1988) In: genetic resources of coffee, vol 4, CLARKE, R.J.; MACRAE, R., eds. Elsevier, London

BOM, I.; WASSENAAR, D.; BOOT, J. (1998) Hybrid affinity chromatography of alpha-galactosidase from *Verbascum thapsus* L. *Journal of Chromat.*, Oxford, v.808, (1):133-139.

BRADBURY A.G.W. (2001) Carbohydrates. In: Clarke RJ. Vitzthum OG (ed), *Coffee Recent Developments*, pp1-17. Blackwell Science, Oxford.

BRADBURY, A.G.W., HALLIDAY, D.J., (1990) Chemical structures of green bean polysaccharides. *J. Agric. Food. Chem.*, 38:389-392,.

BRADFORD, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.

BHASKAR, B., RAMACHANDRA, G., VIRUPAKSHA, T.K. (1990) Alpha galactosidase of germinating seeds of *Cassia sericea* Sw. *J. of F. Bioch.*, 14:45-59.

BUCKERIDGE, M. S., CAVALARI, A., SILVA, C. O., TINÉ, M. A. S. (2006) Relevância dos processos de biossíntese de polissacarídeos da parede celular para a biotecnologia de frutos. In Lajolo FM, Menezes EW (Eds.). "Composicion, estructura, propiedades biológicas de carbohidratos y su utilizacion em alimentos, Projeto CYTED XI.6. Editora da Universidade de São Paulo, pp149-169

BUCKERIDGE, M.S., HUTCHEON I. & REID, J.S.G. (2005) The role of exo-(1-4)- $\beta$ -galactanase in the mobilisation of polysaccharides from the cotyledonary cell walls of *Lupinus angustifolius* L. following germination. *Annals of Botany* 96:435-444

BUCKERIDGE, M.S. & TINÉ, M.A.S. (2001) Composição Polissacarídica: Estrutura da Parede Celular e Fibra Alimentar. In.: Lajolo FM, Saura-Calixto F, Wittig de Penna E, Menezes EW (Eds.) Fibra dietética em Iberoamérica: Tecnologia y Salud. Obtención, caracterización, efecto fisiológico y aplicación en alimentos. Projeto CYTED XI.6. Varela, São Paulo, pp 43-60.

BUCKERIDGE, M.S., SANTOS, H.P. & TINÉ, M.A.S. (2000) Mobilisation of storage cell wall polysaccharides in seeds. *Plant Physiology and Biochemistry*, 38:141-156,.

BUCKERIDGE, M.S., VERGARA, C.E., CARPITA, N.C. (1999) The mechanism of synthesis of a cereal mixed-linkage (1-3),(1-4)- $\beta$ -D-glucan: Evidence for multiple sites of glucosyl transfer in the synthase complex. *Plant Physiology* 120 (4):1105-1116

BUCKERIDGE, M.S. & DIETRICH, S.M.C. (1996) Mobilisation of the raffinose family oligosaccharides and galactomannan in germinating seeds of *Sesbania marginata* Benth. (Leguminosae-Faboideae). *Plant Science*, 117:33-43,.

BUCKERIDGE, M.S., PANEGASSI, V.R., ROCHA, D.C. & DIETRICH, S.M.C. (1995) Seed galactomannan in the classification and evolution of the Leguminosae. *Phytochemistry*, 38:871-875.

BUCKERIDGE, M.S. & REID, J.S.G. (1994) Purification and properties of a novel  $\beta$ -galactosidase or exo- $\beta$ -(1,4)-galactanase from the cotyledons of germinated *Lupinus angustifolius* L. seeds. *Planta*, 192:502-511.

BULPIN, P.V.; GIDLEY, M.J.; JEFFLOAT, R.; UNDERWOOD, D.R. 1990 Development of a biotechnological process for the modification of galactomanann polymers with plant alpha-galactosidase. *Carbon Polymers*, 12:155-168.

CAMPBELL, P., BRAAM, J., (1999) Xyloglucan endotransglucosylases: diversity of genes, enzymes and potential wall-modifying functions. *Trends in Plant Sci.* 4(9): 361-366.

CANNEL, M.G.R. (1971) Changes in the respiration and growth rates of developing fruits of *Coffea arabica* L. *J. Hort. Sci.* 46:263-272

CARPITA, N.C., GIBEAUT, D.M. (1993) Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of walls during growth. *Plant J.* 3: 1-30.

CARPITA, N.C., GIBEAUT, D.M. (1994) Improved recovery of (1,3),(1,4)- $\beta$ -D-glucan synthase activity from Golgi apparatus of *Zea mays* (L.) using differential flotation centrifugation. *Protoplasma* 180:92-97.

CARVALHO, A. (1946) Distribuição geográfica e classificação botânica do gênero *Coffea* com referencial espécies arábica. *Bol. Sup. Serv. Café (Secret. Fazenda)*, 21(229): 127-130.

CHEVALIER, A. (1947) *Les cafiers du globe, fasc. III. Systematique des cafiers et faux cafiers, maladies et insectes nuisibles*, Encyclopedie Biologique, Paul Chevalier, Paris.

CHINNAPPA, C.C., WARNER, B.G. (1981) Pollen morphology in the genus *Coffea* (Rubiaceae) and its taxonomic significance. *Bot. J. Linnean Soc.* 83, 221.

CLIFFORD, M.N. (1985) Chemical and physical aspects of coffee and coffee products. In: *Coffee: Botany, biochemistry and Production of Beans and Beverage* (M.N. Clifford and K.C. Willson, eds), 1st edition, American Edition, Westport, Connecticut, pp. 305-374.

CORCHETE, M.P.; GUERRA, H. (1987)  $\beta$ -galactosidase activities during germination of lentil seeds. *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 25, p. 105-109,.

COSGROVE, D.J. (1999) Enzymes and other agents that enhance cell wall extensibility. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50:391-417.

CROOKES, P.R. & GRIERSON, D. (1983) Ultrastructure of tomato fruit ripening and the role of polygalacturonase isoenzymes in cell wall degradation. *Plant Physiology*, 72:(4):1088-1093.

DEA, I.C.M., CLARK, A.H., McCLEARY, B.V. (1986) Effect of galactose substitution-pattern on the interaction properties of galactomannans. *Carbohydrate Research*, 147:275-294.

DEA, I.C.M. & MORRISON, A. (1975) Chemistry and interactions of seed galactomannans. *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, 31:241-312.

DEDEDA, D. M. (1957) Anatomia e desenvolvimento ortogenético de *Coffea arabica* L. var. *Typica* Cramer. *Bragantia*, Campinas, 16, 315-366.

DEY P.M. & Pridham JB. (1972)  $\alpha$ -galactosidase from *Bacillus stearothermophilus* NUB3621; cloning, *Biochemistry of  $\alpha$ -galactosidases*. *Adv Enzymol*;36:91-130.

EDWARDS, M.E., SCOTT, C., GIDLEY, M.J., REID, J.S.G. (1992) Control of mannose/galactose ratio during galactomannan formation in developing legume seeds. *Planta*, 187: 67-74.

EDWARDS, M.; BULPIN, P.V.; DEA, I.C.M. & REID, J.S.G. (1989) Biosynthesis of legume-seed galactomannans in vitro. *Planta* 178:41-51.

FISCHER, L. R. & BENNETT, A.B. (1991) Role of cell wall hydrolases in fruit ripening. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant. Mol. Biol.* 42: 675-703.

FISHER, M. REIMANN, S., TROVATO, V.; REDGEWELL, R. J., (1999) Structural aspects of polysaccharides from Arabica Coffee. In: *Proceed. 18th ASIC Colloquium, Helsinki*, pp.91-94

FRY, S.C., The structure and function of xyloglucan. (1988) *J. Exp. Bot.* 40: 1-11.

GAO, Z. & SCHAFFER, A. A. (1999) A novel alkaline  $\alpha$ -galactosidase from melon fruit with a substrate preference for raffinose. *Plant Physiol.* 119, p. 979-987.

GIORGINI, J.F.; COMOLI, E. (1996) Effect of embryo and exogenous GA3 on endospermic endo- $\beta$ -mannanase activity of *Coffea arabica* L. during germination and early seedling growth. *Braz. J. of Plant Physiol.* 8:43-49.

GIOVANNONI, J.J. (1989) Expression of a chimeric polygalacturonase gene in transgenic (ripening inhibitor) tomato fruit results in polyuronide degradation but not fruit softening. *Plant Cell*, 1:53-63.

GOMEZ-GOMEZ, L. (1977) Influencia de los factores climáticos sobre la pericidad de crecimiento del cafeto. *Cenicafé* 28 (1): 3-17.

GRANER, E.A. & GODOY-JUNIOR, C. (1967) Histórico. In: *Manual do cafeicultor*. Editora da Universidade de São Paulo, pp 8-16.

GROOT, S.P.C., KIELISZEWSKAROKICKA, B.; VERMEER, E.; KARSSSEN, C.M. (1988) Gibberellin-induced hydrolysis of endosperm cell walls and gibberellin-deficient tomato seeds prior to radicle protrusion. *Planta*, 174:500-504.

GUIMARÃES, V.M., REZENDE, S.T., MOREIRA, M.A., BARROS, E.G., FELIX, C.R. (2001) Characterization of  $\alpha$ -galactosidase from germinating soybean seed and their use for hydrolysis of oligossacharides. *Phytochemistry*, Oxford, 58:67-73,

GUZMÁN, J.M. & HERNANDEZ, G.L. (1982) Anatomía de la semilla y germinación de *Turbina corumbosa* (L.) Raf., Convolvulaceae. *Fyton*, 42:1-8.

HALMER, P. & BEWLEY, J.D. (1979) Mannanase production by the lettuce endosperm: control by the embryo. *Planta*, 144:333-340.

JACOBSEN, J.V. & PRESSMANN, E.A.; (1979) Structural study of germination in celery (*Apium graveolens* L.) seed with emphasis on endosperm breakdown. *Planta*, 144:241-248.

KARNOVSK, M.J. (1965) A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *Journal of Cell Biology* 27:137-13

KEUSCH, L., (1968) Die mobilisierung des reservemannans im keimenden Dattelsamen. *Planta*, 78:321-350.

KIM, Y. S.; PARK, J. Y.; KIM, K.S.; KO, M. K.; CHEONG, S.J.; OH, B. (2002) A thaumatin-like gene in nonclimateric pepper fruits used as molecular marker in disease resistance, ripening, and sugar accumulation. *Plant Mol. Biol.* 49, 125-135.

KIM, J.B., OLEK, A. T., CARPITA, N. C. (2000) Plasma membrane and cell wall exo- $\alpha$ -D-glucanases in developing maize coleoptiles. *Plant Physiol.* 123: 471-485

KONTOS, F. & SPYROPOULUS, C.G. (1996) Effect of linoleic, linolenic and jasmonic acid on the production of  $\alpha$ -galactosidase and endo- $\beta$ -mannanase in the endosperms of carob and fenugreek seeds. *J. of Plant Physiol.*, 149:629-632.

LASHERMES P, COMBES MC, ROBERT J, TROUSLOT P, D'HONT A, ANTHONY F, CHARRIER A (1999) Molecular characterisation and origin of the *Coffea arabica* L. genome. *Mol. Gen. Genet.* 261: 259-266.

MARRACCINI P., ROGERS WJ, CAILLET V., LAUSANNE F, (2005) Biochemical and molecular characterization of  $\alpha$ -D-galactosidase from coffee beans Plant Physiol. And Biochem. 213: 296-308

MARRACCINI P., ROGERS W.J., ALLARD C., ANDRÉ M.L., CAILLET V., LACOSTE N., LAUSANNE F., MICHAUX S. (2001) Molecular and biochemical characterization of endo- $\beta$ -mannanases from germinating coffee (*Coffea arabica*) grains. Planta 213: 296-308

MARTINS, M.C.M., VIEIRA, C.J., SILVA, C.O., BUCKERIDGE, M.S. (2005) Análise de carboidratos na bebida do café preparada sob diferentes processos de extração. Revista Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos 25(2):382-386,

McCLEARY, B.V. (1983) Enzymic interactions in the hydrolysis of galactomannan: the role of exo- $\beta$ -mannanase. Phytochemistry, 22:649-658.

McCLEARY, B.V.; MATHESON, N.K., (1976) Galactomannan utilisation in germinating legume seeds. Phytochemistry, 15:43-47.

MCNEIL, M., FRY, S.C., DARVILL, A.C.; ALBERSHEIM, P. (1984). Structure and function of the primary cell wall of plants. Ann. Rev. Biochem., Palo Alto, 53: 625-663

MENDES A.J.T (1942) Observações citológicas em *Coffea*. VI Desenvolvimento do embrião e do endosperma em *Coffea arabica* L. Bragantia 2 (4):115-128.

MENDES A.J.T (1941) Cytological observations in *Coffea* VI. Embryo and endosperm development in *Coffea arabica* L. Am J Bot 28: 784-789.

MEDINA DM (1964) O endosperma de café como material para estudos citológicos. *Bragantia* 23: 179-186.

MEDINA DM (1965) Novas observações citológicas no endosperma de café. *Bragantia* 24: 369-384.

MOHNEN, D. (1999) Biosynthesis of pectins and galactomannans. In: *COMPREHENSIVE NATURAL PRODUCTS CHEMISTRY ELSEVIER SCIENCE*, Amsterdam.

NADELMANN, H. (1890) Über die Schleimendosperme der Leguminosen. *Pringsheims Jahrb. Wiss. Bot.*, (21):1-83.,.

OOSTERVELD A, HARMSSEN JS, VORAGEN AGJ, SCHOLS HA (2003) Extraction and characterisation of polysaccharides from and characterisation of polysaccharides from green and roasted *Coffea arabica* beans. *Carbohydr. Polym.* 52:285-296.

PAILLARD, M., LASHERMES, P., PETIARD, V. (1996). Construction of a molecular linkage map in coffee. *Theor. Appl. Genet.* 93: 41-47

PARKER MH, CASJENS S, PREVELIGE PE JR. (1988) Functional domains of bacteriophage P22 scaffolding protein. *J Mol Biol.* 7;281(1):69-79.

POTOMATI, A. & BUCKERIDGE, M.S. (2002) Effect of abscisic acid on the mobilisation of galactomannan and embryo development of *Sesbania marginata* Benth. (Leguminosae-Faboideae). *Rev. Bras. de Bot.* 25(3) 303-310

REDGWELL R.J., CURTI D., ROGERS J., NICOLAS P. e FISCHER M. (2003) Changes to the galactose/mannose ratio in galactomannans during coffee bean (*Coffea arabica* L.) development: implications for in vivo modification of galactomannan synthesis. *Planta* 217: 316–326

REDGWELL RJ, CURTI D, FISCHER M, NICOLAS P, FAY LB (2002) Coffee bean arabinogalactans: Acidic polymers covalently linked to protein. *Carbohydr. Res.* 337:239-253.

REID, J.S.G. (1985) Structure and function in legume-seed polysaccharides. In: BRETT, C. *Biochemistry of the plant cell walls*. Cambridge, Cambridge Univ. Press., p.259-268

REID, J.S.G. & BEWLEY, J.D. (1979) A dual role for the endosperm and its galactomannan reserve in the germinative physiology of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) an endospermic leguminous seed. *Planta*, 147:145-150.

REID, J.S.G. & MEIER, H. (1972) The function of the aleurone layer during galactomannan mobilization in germinating seeds of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.), crimson clover (*Trifolium incarnatum* L.): a correlative biochemical and ultrastructural study. *Planta*, 106:44-60.

RICHTER, H.G. (1981) Wood and bark anatomy of Lauraceae. I. Aniba Aublet. *IAWA Bulletin n.s.* 2:79-87.

RAO, C.V., CHOU, D., SIMI, B., HERCHING, K, REDDY, B.S. (1998), prevention of colonic aberrant crypt foci and modulation of large bowel microbial activity by dietary coffee fiber, inuli and pectin. *Carcinogenesis*, 19: 1815-19

ROGERS W.J., BÉZARD G., DESHAYES A., MEYER I., PÉTIARD V., MARRACCINI P. (1999) Biochemical and molecular characterization and expression of the 11S-type storage protein from *Coffea arabica* endosperm. *Plant Physiol Biochem* 37: 261-272

SACHS, J. (1862) Zur Keimungsgeschichte der Dattel. *Botanische Zeitung*, 20:241-246.

SEKHAR, K.N.C. & DEMASON, D.A, (1990) Identification and immunocytochemical localization of  $\alpha$ -galactosidase in resting and germinated date palm (*Phoenix dactylifera* L.) seeds. *Planta* 134:209-221

SERA T (2001) Coffee genetic breeding at IAPAR. *Crop Breed Appl Biotechnol* 1:179-199

SHEERY, R.E.; KRAMER, M., HIATT, W.R. (1988) Reduction of polygalacturonase activity in tomato fruit by antisense RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci, USA*, v.85, p.8805-8809.

SIVETZ, M. (1963) Coffee processing. Westport:Connect, AVI, v.2: 349p

SMITH, C.J.S.; (1988) Antisense RNA inhibitor of polygalacturonase gene expression in transgenic tomatoes. *Nature*, 334:724-726.

SMART, E.L.; PHARR, D.M. (1980) Characterization of  $\alpha$ -galactosidase from cucumber leaves. *Plant Physiology*, 66:731-734.

TAKAKI, M. & DIETRICH, S.M.C. (1980) Effect of GA<sub>3</sub> and light on polysaccharide levels and metabolism in germinating coffee seeds. *Journal of Experimental Botany*, 31:1643-1649.

TOOROP, P.E.; BEWLEY, J.D., HILHORST, H.W.M. (1996) Endo-mannanase isoforms are present in the endosperm and embryo of tomato seeds, but are not essentially linked to the completion of germination. *Planta*, 200:153-158.

WATKINS, J.T.; CANTLIFFE, D.J.; HUBER, D.J. & NELL, T.A. (1985) Gibberellic acid stimulated degradation of endosperm in pepper. *Journal of Am. Soc. Hort. Sci.*, 110:61-65.

WOLFRON, M.L.; LAVER, M.L. & PATIN, D.L. (1961) Carbohydrates of the coffee bean. II. Isolation and characterization of mannan. J. of Org. Chem. 26:4533-4531.

WOMER, T.M.; NJUNGUNA, S.G. (1966) Bean size and shape as quality factors in Kenia coffee. Kenia Coffee 31:397-405

ZPEVAK, F.A. (1999) Efeitos de diferentes condições hídricas na embebição, germinação e crescimento inicial de *Dimorphandra mollis* Benth. UFSCar, 120p. (Tese de doutorado).

**Parte II****ESTUDO COMPARATIVO DA COMPOSIÇÃO DE POLISSACARÍDEOS DE SEMENTES  
DE CAFÉS VERDES DE *Coffea canephora* e de *Coffea arabica* DE DIFERENTES  
VARIEDADES E PROCEDÊNCIAS**

Artigo submetido à revista "Brazilian Journal Of Food Technology

Clovis Oliveira Silva<sup>1</sup>, Terezinha J.G. Salva<sup>2</sup> & Marcos S. Buckeridge<sup>1</sup>

”

\*

<sup>1</sup>Departamento de Botânica, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo  
Rua do Matão, 277, Caixa Postal CEP , São Paulo, SP, Brasil

<sup>2</sup>Centro de Café 'Alcides Carvalho', Instituto Agrônomo, Campinas-SP

\*autor para correspondência: [msbuck@usp.br](mailto:msbuck@usp.br)

**RESUMO** – No presente trabalho são efetuadas comparações entre a composição dos polissacarídeos de parede celular de grãos verdes de café colhidos de variedades diferentes de *Coffea arabica* e *C. canephora* em que os frutos foram colhidos em um estágio específico de maturação (somente frutos avermelhados) com grãos verdes de cafés denominados conilon e arábica que são diretamente utilizados como matéria prima para a produção de café solúvel. Observou-se que no caso dos grãos colhidos em um estágio específico, as diferenças entre os conteúdos de pectinas e hemiceluloses são mínimas, enquanto para os grãos utilizados na indústria há maior rendimento de polissacarídeos (hemiceluloses) como um todo e há também uma diferença entre conilon e arábica. Uma vez que se sabe que esta composição varia ao longo do processo de desenvolvimento do fruto, especula-se que o modo de colheita, que para no café colhido no campo inclui certa parcela de grãos verdes juntamente com frutos maduros, possa influenciar na composição final dos polissacarídeos nas sementes de café.

**SUMMARY** - In the present work, comparisons among the composition of cell wall polysaccharides of green coffee seeds were made with material collected from varieties of *Coffea arabica* and *Coffea canephora* in which fruits were harvested at the same developmental stage (red fruits) with green coffee beans from two varieties (arabica and conilon) used as raw material for production of soluble coffee. We observed that for seeds collected from red fruits, the differences found between pectins and hemicelluloses were minimal, whereas for the seeds used as raw material for industry conilon and arabica differed. As it is known that cell wall composition varies in the seeds during fruit development, it is speculated that the harvesting mode, which in the field includes green beans along with the red mature fruits, might influence the final composition of the polysaccharides in coffee seeds.

## INTRODUÇÃO

O gênero *Coffea* apresenta aproximadamente 100 espécies, mas apenas cinco são consumidas, e dentre estas, *Coffea arabica* L. (café arábica) e *C. canephora* Pierre (café robusta ou conilon) são as únicas com expressão no comércio mundial. Sabe-se que há diferenças tanto na qualidade da bebida quanto na composição dos grãos verdes de cafés das diferentes espécies. Os cafés arábicas têm concentrações mais elevadas de carboidratos, lipídeos e trigonelina, e suas bebidas têm qualidade superior. Já os cafés das variedades de *C. canephora* possuem maiores teores de cafeína e compostos fenólicos, e fornecem bebidas neutras (Illy & Viani, 1995).

Os principais componentes do café verde e torrado são polissacarídeos provenientes das paredes celulares das sementes, e constituem a metade do peso seco do grão. Thaler (1968) e Wolfrom (1961) identificaram hemiceluloses e celulose como os polissacarídeos presentes em grãos verdes e torrados de café. A maior parte dos polissacarídeos não-celulósicos constitui uma fração insolúvel em água formada por galactomanano, um polissacarídeo composto por cadeia linear de unidades de manose ligadas entre si por ligações do tipo  $\beta(1,4)$ . Ao longo desta cadeia, ligam-se resíduos de galactose ao O-6 das unidades de manose. O galactomanano constitui, aproximadamente, 20-30% do peso seco de grãos de cafés arábica e robusta, enquanto os arabinogalactanos constituem outro grupo de polissacarídeos presentes em grãos de café (Redgwell et al. 2002). Estes últimos pertencem à classe das pectinas e possuem uma cadeia principal de galactose com ligações do tipo  $\beta(1,3)$ , à qual se ligam unidades de galactose e arabinose por ligações do tipo  $\beta(1,6)$ . Os galactomananos são pouco solúveis e, geralmente, formam parte significativa da borra de café após a extração. Com isto, grande parte deste polissacarídeo é perdida após a produção de cafés torrado-e-moido e também do solúvel, sendo descartada como material de baixo valor comercial, com poucas aplicações. Os arabinogalactanos, por sua vez, são mais solúveis, e, por isso uma maior proporção desses polissacarídeos é obtida nos extratos (Martins et al. 2005). A composição da porção polissacarídica dos grãos de café

verde, definem assim, o rendimento dos processos de solubilização tanto na indústria de café solúvel quanto no preparo diário pelo consumidor.

Redgewell et al. (2002) menciona que embora a composição dos polissacarídeos de grãos de café de *C. arabica* e de *C. canephora* sejam semelhantes, parece que ocorrem pequenas diferenças nas quantidades relativas de galactomanano e arabinogalactano nas duas espécies. Redgewell et al. (2003) acompanharam o acúmulo de açúcares na forma de polissacarídeos no endosperma de café entre a 11<sup>a</sup> e 37<sup>a</sup> semanas após o florescimento, observando uma diminuição da proporção entre galactose e manose no galactomanano a partir do estágio verde até o estágio cereja, o que, possivelmente confere maior rigidez à semente e menor solubilidade ao polissacarídeo no final do processo de maturação dos frutos.

Com a finalidade de averiguar o potencial de exploração de variedades de cafés robustas e arábica na fabricação de cafés solúveis, neste trabalho comparou-se as composições de carboidratos da grãos de café da variedade Ouro Verde da espécie *C. arabica* e das variedades Apatã, Conilon e Robusta da espécie *C. canephora*. Estes foram comparados com a composição de grãos verdes de cafés denominados conilon e arábica que são utilizados na indústria de café solúvel.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

**Material Vegetal:** As amostras de café foram colhidas em 2000 (Conilon e Apatã) e 2001 (Ouro Verde e Robusta) por derriça no pano, e lavadas em água corrente. Numa escolha posterior, foram selecionados apenas os frutos completamente vermelhos e visualmente sadios. Os cafés selecionados, foram secos ao sol, em bandejas com fundo de tela, numa relação de 8 kg fruto/m<sup>2</sup>, até cerca de 11% de umidade. Os cafés secos foram mantidos em casca dentro de sacos de papel, a  $22 \pm 3^{\circ}\text{C}$ , em ambiente seco e, protegidos da luz direta. O

beneficiamento das amostras foi efetuado apenas no momento de serem empregadas nas análises químicas. Amostras do café beneficiado foram moídas. Grãos verdes de cafés denominados conilon e arábica que são utilizados na produção de café solúvel, foram gentilmente cedidos pela Cia Iguaçu de Café Solúvel. Estes foram grãos verdes previamente beneficiados segundo a informação da indústria, já preparados para o uso direto no processo de produção. Segundo informações da época, são grãos de café colhidos em várias regiões do Brasil e designados pelos produtores com as variedades indicadas (conilon ou arábica). Não é, portanto, possível saber precisamente a forma de colheita, mas segundo as informações disponíveis, o padrão é de colheita dos frutos dos ramos quando pelo menos 60% destes estão no estágio de maturação completamente avermelhados. A comparação feita neste trabalho não pretendeu levar em conta a precisão deste tipo de colheita do material para processamento industrial, mas comparar diretamente o material que chega para ser processado pela indústria com grãos provenientes de frutos colhidos precisamente no mesmo estágio de maturação.

**Remoção de açúcares solúveis e compostos fenólicos:** A cerca de 500 mg de grãos de café verde moído foram adicionados 50mL de etanol 80%. Essa mistura foi mantida a 80oC por 20 minutos e, então, centrifugada a 13.000 g por 5 minutos. Após 4 extrações nas mesmas condições, o material decantado foi seco em estufa a 60oC por 24 horas.

**Remoção de amido:** os resíduos da extração alcoólica, foram homogeneizados em 1,5 mL de dimetil sulfóxido (DMSO) 90% e mantidos em agitação por 24 horas para a extração do amido. Após este período, o material foi centrifugado a 13.000 g por 15 minutos, e o sobrenadante descartado. O precipitado foi lavado 4 vezes com água destilada. Após a centrifugação nas mesmas condições para eliminação da última água de lavagem, o resíduo foi seco em estufa a 60oC por 24 horas. Este resíduo foi considerado a parede celular bruta.

**Fracionamento da parede celular:** À parede celular bruta das amostras foram adicionados 50 mL de uma solução de oxalato de amônio 0,5%, a pH 7. Após manutenção a 100°C por 1 h, os resíduos foram coletados por centrifugação a 2.700 g por 15 minutos a 25°C. Este tratamento com oxalato de amônio foi repetido uma vez mais e os sobrenadantes dos dois tratamentos foram reunidos e dialisados. Dosagens de carboidratos foram feitas no sobrenadante dialisado. Denominou-se fração oxalato de amônio o sobrenadante dessa extração, dialisado e liofilizado. Os resíduos dessa extração foram submetidos à dupla extração com 50 mL de NaOH 0,1 M por 1 hora à temperatura ambiente, resultando, após centrifugação a 13.000 g por 15 minutos, em um sobrenadante, que é a fração solúvel em álcali fraco. O novo resíduo foi tratado duas vezes com 50 mL de NaOH 4 M por 1 hora à temperatura ambiente, e depois com NaOH 8M 1 hora à temperatura ambiente para a obtenção das frações solúveis em álcali forte. Estas frações também foram dialisadas, analisadas quanto ao teor de carboidratos e liofilizadas. Após a extração com NaOH 8M, o resíduo foi lavado com água destilada, liofilizado e pesado. O rendimento do processo foi calculado através dos pesos secos das frações.

**Quantificação de ácidos urônicos:** A quantificação de ácidos urônicos livres ou ligados foi feita pelo método do m-hidroxibifenil (Filisetti-Cozzi & Carpita, 1991), empregando-se uma curva padrão de ácido galacturônico (Sigma) construída para as concentrações de 0; 2,5; 5,0; 7,5 e 10 mg/mL. 100 mg/ mL como padrão.

**Análise de monossacarídeos por Cromatografia Iônica de Alta Performance com Detecção por Pulso Amperométrico HPAEC/PAD:** Cinco miligramas das frações de paredes celulares oxalato de amônio, NaOH 0,1; 4,0 e 8,0 M e também do resíduo, obtidos após o fracionamento foram pré-hidrolisados por tratamento com 100 mL de ácido sulfúrico a 72%, e manutenção em banho de água a 30°C por 45 minutos, em tubos cônicos graduados. Após a adição 1,7 mL de água destilada às amostras pré-hidrolisadas, estas foram autoclavadas por 1 hora a 121°C e, em seguida, após resfriamento, alcalinizadas por adição de 60 mL

NaOH 50%. Os hidrolisados de ambos os materiais foram analisados quanto à presença de monossacarídeos neutros por HPAEC utilizando uma coluna Carbo-Pac PA 1 empregando detector de pulso amperométrico (PAD) em sistema Dionex modelo DX500. A eluição foi isocrática com NaOH 20 mM por 80 minutos com sistema de injeção por pós-coluna com NaOH 200 mM. A identificação dos monossacarídeos foi feita com base nos tempos de retenção comparados com os de padrões comerciais obtidos de vários fabricantes.

**Quantificação de amido:** Para a quantificação de amido foi utilizado o método enzimático modificado de Bruce & Dickison (1979). Foram adicionados a 10 mg de grãos de café moídos, 2,8 mL de água destilada e 0,1 mL de  $\alpha$ -amilase termoestável. Após incubação a 75oC por 30 minutos, adicionou-se mais 0,1 mL da enzima. Foram, então, acrescentados, em seqüência 1,0 mL de tampão acetato de sódio 100 mM a pH 4,8 e 1,0 mL de amiloglicosidase em solução tampão de acetato de sódio 100 mM a pH 4,8. Após incubação a 50oC por 30 minutos, foram retiradas alíquotas de 500 mL, às quais foram acrescentados 500 mL de ácido perclórico para interromper a reação. A dosagem de glicose resultante da hidrólise foi feita em alíquotas de 200 mL de extrato às quais foram adicionados 150 mL das enzimas glucose oxidase e peroxidase, além dos reagentes 4-aminoantipirina e fenol (GODPOD - Glicose PAP Liquiform/CENTERLAB). Após incubação por 15 minutos a 30oC, o teor de glucose foi determinado em leitor de ELISA a 490nm. As concentrações de glucose foram calculadas a partir de uma curva padrão feita com glucose (SIGMA) nas concentrações de 0; 2,5; 5,0; 7,5 e 10 mg/mL.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Segundo Redgwell (2002), as frações solúveis em oxalato de amônio e NaOH 0,1 M são compostas de pectinas, que incluem os arabinogalactanos. A fração solúvel em NaOH 1 M é composta por 50% de hemiceluloses, que incluem os

galactomananos, e 50% de pectinas e as frações solúveis em NaOH 4,0 e 8,0 M são constituídas essencialmente de hemiceluloses.

Considerando-se todas as frações, a maior extração de polissacarídeos ocorreu na variedade Conilon, da qual se extraiu 93,6 mg (9,3%) de polissacarídeos por grama de parede celular. A mesma massa de parede celular de grãos de café Ouro Verde forneceu 51,6 mg de polissacarídeos (Tabela 1).

De acordo com os resultados da Tabela 1, o café Ouro Verde contém menos polissacarídeos extraíveis nas soluções de NaOH 0,1 e 1,0 M e de oxalato de amônio do que os robustas, revelando-se portanto com menos pectinas do que estes.

A extração de polissacarídeos em solução de oxalato de amônio a 0,5% foi maior do que nas soluções com diferentes concentrações de NaOH. Além disso, cerca de 64% das pectinas extraídas da parede celular do café da variedade Ouro Verde, 72% das do café da variedade Robusta, 62% das da variedade Conilon e 63% das da variedade Apoatã se encontraram na fração de oxalato de amônio a 0,5%, o que revela alta solubilidade do material.

Tabela 1. Composição polissacarídica da parede celular de café verde de variedades de *C.canephora* e *C. arabica* em mg/g de parede celular bruta.

Fração	Variedade			
	Apoatã	Conilon	Robusta	Ouro vede
Oxalato de Amônio	34,8	41,4	29,6	22,6
NaOH 0,1M	14,6	19,0	9,0	9,2
NaOH 1,0M	11,4	12,0	5,0	7,4
NaOH 4,0M	14,6	10,8	12,0	7,0
NaOH 8,0M	10,2	10,4	3,2	5,4
TOTAL	85,6	93,6	58,8	51,6

A parede celular dos grãos de café Ouro Verde é composta de 3,5% de pectinas e 1,6% de hemiceluloses (Tabela 2). No café Conilon, essas proporções são iguais a 6,6 e 2,7%, no Robusta a 4,1 e 1,8% e no Apoatã a 5,5 e 3,1%. Essas relações resultam em poucas diferenças nas proporções pectinas/hemiceluloses, ou seja, independentemente da espécie ou variedade, as paredes celulares dos grãos de café contêm cerca de 70% de pectinas e 30% de hemiceluloses. Esses resultados confirmam os resultados publicados por Fisher et al. (2001), de que cerca de 2/3 da parede celular é composto de material insolúvel, mesmo quando concentrações de 4 e 8 M de NaOH são usadas. De fato, segundo Thaler (1968) o tipo de polissacarídeo e a quantidade encontrada em amostras de grãos verdes de café de quatro variedades diferentes (Columbia, Haiti, Santos e Quenia) são muito similares.

Mesmo sem grandes diferenças na relação pectina/hemicelulose, do ponto de vista de processamento para café solúvel a variedade conilon seria a mais indicada para obter maior produção, pois ela apresentou a maior concentração de polissacarídeos de parede (9,36%) e, além disso, 70,9% deles são pectinas, e, portanto de mais fácil solubilização.

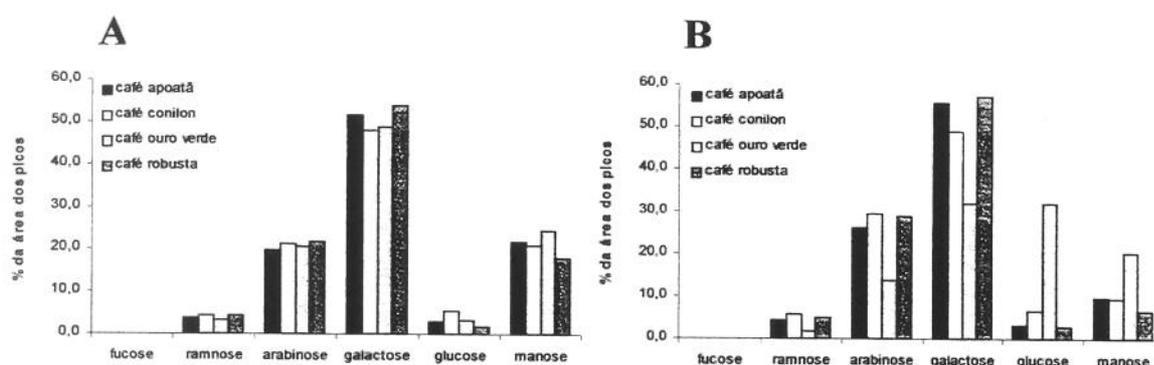
Os resultados da tabela 2 mostram também que as hemiceluloses de Apoatã são mais solúveis do que as das demais variedades estudadas.

**Tabela 2.** Distribuição de hemiceluloses e pectinas em variedades de *C. canephora* e *C. arabica*. Os valores expressos em mg/g foram obtidos a partir da Tabela 1. Para as pectinas, foram somadas as frações oxalato de amônio, NaOH 0,1M e metade da fração NaOH 1M e, para as hemiceluloses utilizaram-se as frações NaOH 4 e 8M e metade da fração NaOH 1M.

Componente	Variedade			
	Apoatã	Conilon	Robusta	Ouro Verde
Pectinas	55,1 (64,4%)	66,4 (70,9%)	41,1 (69,9%)	35,5 (68,8%)
Hemiceluloses	30,5 (35,6%)	27,2 (29,1%)	17,7 (30,1%)	16,1 (31,2%)

As frações solúveis em oxalato de amônio e em NaOH 0,1M são compostas principalmente de galactose, arabinose e manose (Figuras 1A e 1B). As elevadas concentrações relativas de galactose e arabinose, com grande prevalência do primeiro açúcar, são coerentes com a extração de arabinogalactano em soluções alcalinas fracas, enquanto que a presença de manose, glucose e ramnose indicam a extração de hemiceluloses juntamente com as pectinas, principalmente em solução de oxalato de amônio.

Embora no extrato de oxalato de amônio a composição polissacarídica do café arábica se assemelhe à dos robustas, ela é bastante diferente da deles no extrato de NaOH 0,1M. Neste observou-se menor concentração de galactose e arabinose no arábica, o que indica extração quase que completa dos polissacarídeos já com oxalato de amônio e confirma o discutido sobre as Tabelas 1 e 2, de que os cafés arábicas contêm principalmente hemiceluloses, como se explica pelo maior teor relativo de manose nos 2 extratos.

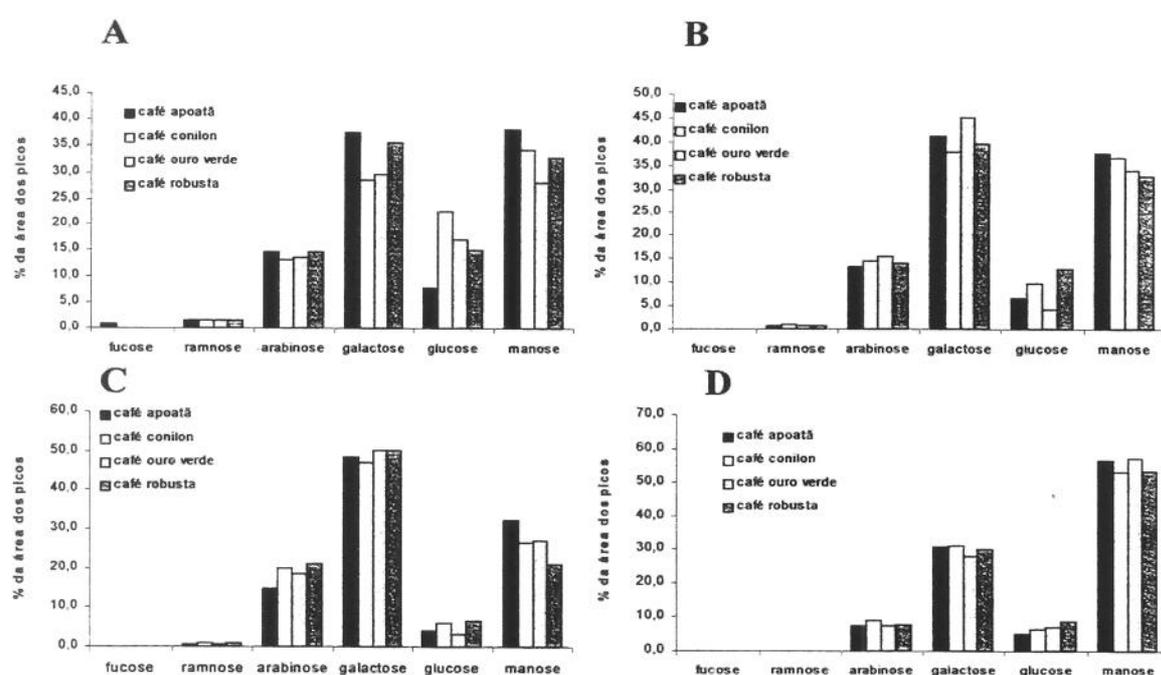


**Figura 1.** Análise por HPAEC-PAD dos monossacarídeos encontrados nas paredes celulares das variedades apoatã, conilon, robusta (*C. canephora*) e ouro verde (*C. arabica*) após hidrólise ácida dos extratos resultantes do fracionamento da parede celular por (A) oxalato de amônio 0,5 % e (B) NaOH 0,1 M.

Segundo os resultados das análises de monossacarídeos nas frações de oxalato de amônio e de álcali fraco, o café da variedade robusta tem mais galactose do que o conilon para a mesma quantidade de arabinose, o que sugere

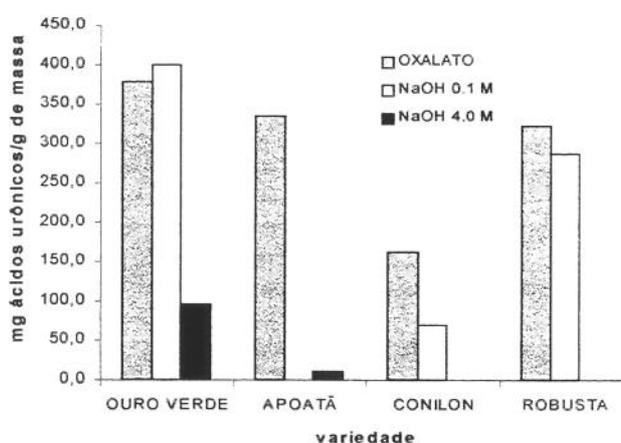
a existência de menor frequência de ramificações do arabinogalactano ou, então, menor concentração de pectina.

Todas as variedades de café analisadas apresentaram arabinose, galactose e manose como principais monossacarídeos, tanto no resíduo quanto nos extratos. Pequenas quantidades de ramnose nos extratos NaOH 1,0 e 4,0 M, e traços de fucose em NaOH 1,0 M foram obtidos após a hidrólise ácida (figura 2), o que indica a presença de pectinas do tipo ramnogalacturonano II. Os resultados não mostraram nenhuma diferença significativa entre as variedades de *Canephora* (Apoatã, Conilon e Robusta) e a variedade *Arabica* (ouro verde), bem como qualquer diferença entre as variedades de *Canephora* (Apoatã, Conilon e Robusta).



**Figura 2.** Análise por HPAEC-PAD dos monossacarídeos encontrados nas paredes celulares das variedades Apoatã, Conilon, Robusta (*C. canephora*) e Ouro Verde (*C. arabica*) após hidrólise ácida dos extratos resultantes do fracionamento da parede celular por NaOH 1,0 M (A), 4,0 M (B) e 8,0 M (C) e o resíduo (D) do fracionamento.

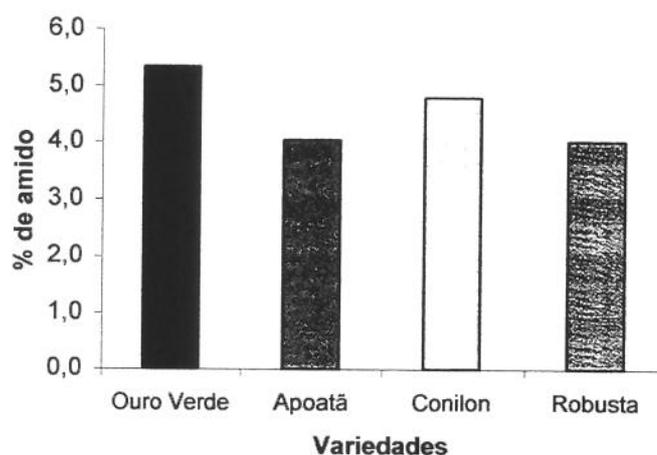
Foram ainda detectados nessas frações teores mais elevados de ramnose do que aqueles encontrados nas outras etapas do fracionamento. Isso indica a presença de pectinas, o que está de acordo com os valores de ácidos urônicos mostrados na Figura 3, e confirma as observações de Redgewell et al. (2002), que determinaram as estruturas químicas dos polímeros das pectinas de café, sugerindo a presença de um ramnogalacturonano, devido às proporções entre ramnose e galactose.



**Figura 3.** Quantificação de ácidos urônicos nas variedades Apoatã, Conilon e Robusta (*C. canephora*) e Ouro Verde (*C. arabica*) após o fracionamento da parede celular com oxalato de amônio 0,5 % e NaOH 0,1 M.

Os teores de arabinose para todas as variedades estudadas indicam a presença de arabinagalactanos que possivelmente estão ligados ao ramnogalacturonano (ver também Redgewell et al. 2002 para dados sobre outras variedades). Uma comparação dos teores de ácidos urônicos nas quatro variedades estudadas no presente trabalho, mostrou que em Apoatã conteúdo de pectinas menor na fração NaOH 0,1M mas isto não ocorreu nas análises quantitativas das frações. Isto seria compatível com um conteúdo de pectinas menor na fração NaOH 0,1M.

Celulose e amido representam em vegetais superiores polissacarídeos de grande importância (Fry, 1988). Porém as células parenquimáticas do endosperma como em espécies do gênero *Coffea*, não apresentam este domínio clássico em proporções representativas tanto para celulose quanto para amido, devido ao seu baixo teor de glucose (Ouguerram, 1989). Neste trabalho os baixos teores de glucose encontrados nas diferentes etapas do fracionamento (figuras 1 e 2), podem indicar a presença de celulose que estaria em associação com arabinogalactanos e galactomananos acumulados nas paredes celulares de sementes de café. É possivelmente nesta associação à parede celular que está a dificuldade na solubilização desses materiais durante toda as etapas do fracionamento. Uma exceção foi a variedade Ouro Verde, em que teores mais altos de glucose foram encontrados nas frações NaOH 0,1M, sugerindo a presença de amido. Observa-se na figura 4, que foi extraído mais amido das sementes desta variedade. É possível que este amido tenha interagido com as pectinas durante as preparações, dificultando a sua retirada com DMSO. A possibilidade de que esta glucose esteja relacionada à presença de amido é reforçada pela observação de que o teor de amido foi maior na variedade ouro verde (figura 4). Os resultados aqui apresentados (figura 4) mostram que o modo de coleta de frutos homogêneos não afetou diferencialmente a quantidade deste componente dentre as variedades Apatã, Conilon, Ouro Verde e Robusta, uma vez que não foi verificada nenhuma diferença significativa entre estas. O teor de amido encontrou-se entre 4 e 5% do peso seco das sementes, valores semelhantes aos observados por Silva et al., 2005.



**Figura 4.** Teores de amido em grãos verdes de cafés *Canephora* (Aboatã, Conilon e Robusta) e *Arabica* (Ouro Verde) coletados uniformemente no estágio cereja.

O fracionamento da parede celular de sementes de cafés arábica e conilon empregadas industrialmente na produção de café solúvel resultou nos rendimentos apresentados nas Tabelas 3 e 4. Eles revelam maior extração dos polissacarídeos nas sementes dessas variedades do que as apresentadas e já discutidas para Aboatã, Conilon Robusta e Ouro Verde. Os resultados das Tabelas 2 e 4 mostram uma relação de 108,6 vs 66,4 mg/g para os robustas e 78,9 vs 35,5mg/g para arábicas, industriais e não industriais. Porém, contrariamente ao observado nessas variedades, a maior porção dos polissacarídeos nas sementes de uso industrial é de hemiceluloses, o que indica que, potencialmente, elas produzem mais borra do que as não empregadas industrialmente. Essa maior perda de polissacarídeos na borra pode ser compensada, no entanto, pela maior massa de pectinas extraídas comparativamente aos não empregados industrialmente.

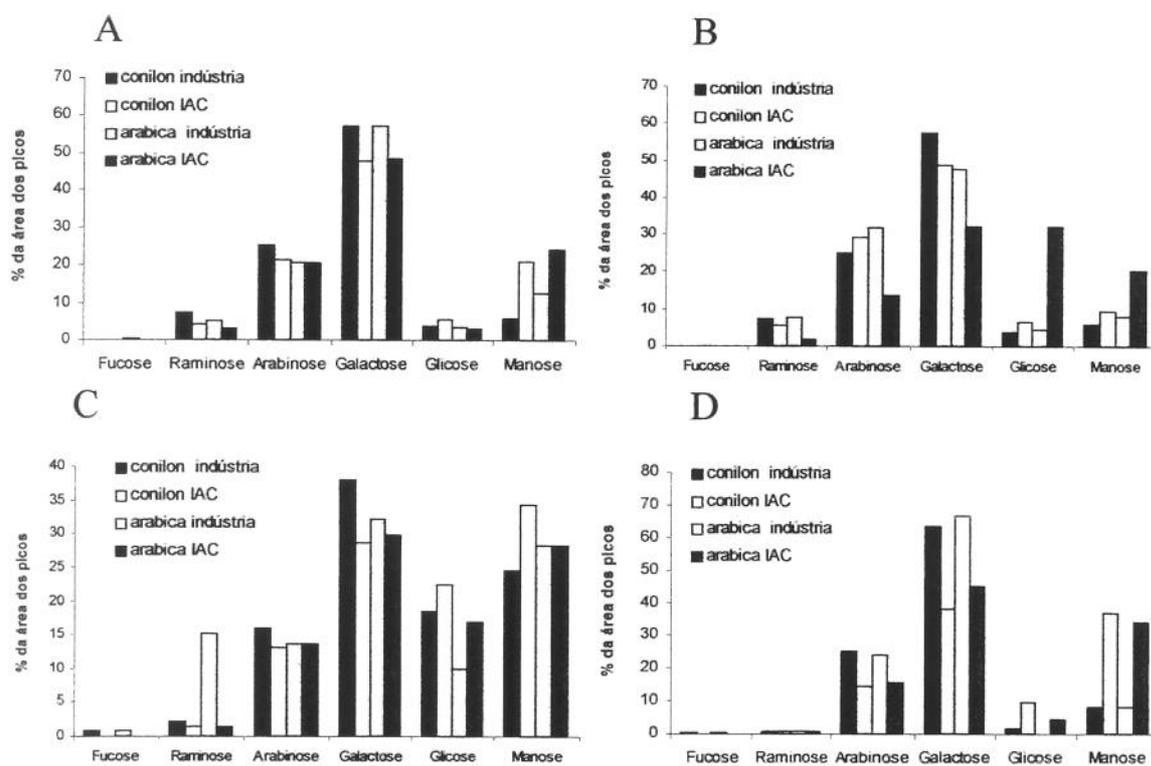
**Tabela 3.** Rendimento em mg/g de massa das frações de material da parede celular isolado de grãos de cafés Conilon e Arabica destinados a indústria de café solúvel.

Fração	Variedades	
	Conilon	Arábica
Oxalato de amônio	63,1	41,4
NaOH 0,1M	29,2	19,3
NaOH 1,0M	32,5	36,5
NaOH 4,0	174,5	264,7

**Tabela 4.** Distribuição de pectinas e hemiceluloses em cafés denominados Conilon e Arabica utilizados na indústria de café solúvel. Os valores foram obtidos a partir da tabela 2 (em mg/g). Para as pectinas, foram somadas as frações oxalato de amônio, NaOH 0,1M e metade da fração NaOH 1M (esta fração apresenta uma distribuição 50/50% de pectinas e hemiceluloses) e para as hemiceluloses utilizaram-se as frações NaOH 4 e metade da fração NaOH 1M.

Domínio	Conilon	Arábica
Pectinas	108,6 (30,8%)	78,9 (16,8%)
Hemiceluloses	190,8 (69,2%)	282,9 (83,2%)

A Figura 6 mostra uma comparação entre as composições de monossacarídeos de paredes celulares de cafés Conilon e Arábica utilizados e não utilizados pela indústria de café solúvel. Há indicações de que os galactomananos dos cafés não empregados industrialmente são mais solúveis, como se observa pelas maiores concentrações de manose em oxalato de amônio, em NaOH 0,1 e 0,4 M, que são mais elevadas do que nos de uso industrial. Quanto mais ramificado menos cristalino e mais solúveis são os galactomananos.



**Figura 6.** Análise comparativa por HPAEC-PAD dos monossacarídeos encontrados nas paredes celulares entre os grãos de cafés Conilon e Arabica de diferentes origens após hidrólise ácida dos extratos resultantes do fracionamento da parede celular por oxalato de amônio 0,5 % (A) e NaOH 0,1 M (B), 1,0 M (C) e 4,0 M (D).

Uma observação importante na figura 6 quando se pensa em produção em larga escala e, já discutida em outra oportunidade, é que Conilon apresenta nas frações extraídas com NaOH 4M uma proporção menor de arabinose e galactose e maior de manose. Isto indica que as pectinas são mais solúveis em Conilon do que arábica e talvez esta seja uma diferença importante na composição do café solúvel, a qual hipoteticamente poderia ser alterada se os frutos e sementes fossem tratados de maneiras distintas.

Algumas das principais conclusões que se podem tirar dos dados apresentados são que a relação hemicelulose/pectinas em cafés de emprego

industrial é maior do que nos que não são empregados industrialmente. Os cafés de emprego industrial contêm mais polissacarídeos de parede do que os não empregados industrialmente. Os cafés arábica e robusta de emprego industrial contêm mais hemiceluloses do que pectinas enquanto os não empregados industrialmente contêm mais pectina do que celulose. A elevada proporção de hemicelulose nos de uso industrial é compensada pelo maior teor de polissacarídeos. A se considerar apenas os polissacarídeos de parede celular, mesmo conteúdo maior proporção de pectinas do que as variedades de uso industrial, a variedades Conilon, Apotã, Ouro verde e Robusta, podem não apresentar vantagens, pois elas contêm menos polissacarídeos de parede.

Uma diferença sutil, mas importante quando se pensa em produção em larga escala, é que conilon apresenta nas frações extraídas com NaOH 4M uma proporção menor de arabinose e galactose e maior de manose. Isto indica que as pectinas seriam mais solúveis em conilon do que arábica e talvez esta seja uma diferença importante na composição do café solúvel, a qual hipoteticamente poderia ser alterada se os frutos e sementes fossem tratados de maneiras distintas.

Estudos bioquímicos de biossíntese da parede celular indicam diversas modificações relacionadas com as pectinas, hemiceluloses e celulose. As mudanças que ocorrem na parede celular são causadas pela ação de enzimas que são ativadas ou sintetizadas durante o desenvolvimento e o amadurecimento do fruto alteram as moléculas dos polissacarídeos da parede e lamela média (Buckeridge et al. 2006). Descobertas recentes têm demonstrado que os polissacarídeos, já nas vesículas de transporte prestes a serem fundidas à membrana plasmática para inclusão na parede celular, podem ser editados por hidrolases (Kim et al., 2000). Tal fenômeno foi observado em sementes de café por Redgewell et al. (2003) e em experimentos com sementes de café durante a maturação. Os resultados apresentados pelos autores sugeriam uma desgalactosilação do (galacto)manano no momento em que o polímero é sintetizado, provavelmente pela ação de uma  $\alpha$ -galactosidase presente nas vesículas do complexo de Golgi. Os resultados descritos no capítulo I confirmaram

esta hipótese, com o isolamento de uma nova  $\alpha$ -galactosidase responsável pela edição dos galactomananos durante o processo de biossíntese.

Sabe-se que os açúcares de parede celular exercem influência direta na qualidade do café; e que a proporção desses constituintes na parede celular, depende da espécie cultivada e também do estágio de maturação dos frutos, sendo esses, substratos de complexas reações ocorridas durante a torração e que influirão nas características sensoriais do produto final.

No Brasil, o tipo de colheita predominante é por derriça no chão e desta operação obtém-se um produto heterogêneo em relação aos estágios de maturação dos grãos. Segundo Teixeira (1990), nesse tipo de colheita encontram-se misturados frutos verdes, verde-amarelados, cereja, passa e secos da planta. Esse autor afirma que a presença de grãos verdes têm sido responsáveis por sérios prejuízos na qualidade do produto. Admite-se que os grãos de cereja recolhidos na planta têm máximo potencial de qualidade da bebida, avaliada por meio de testes rápidos e análise sensorial. Considera-se que os cafés arábica e conilon utilizados nas indústrias, são submetidos as diferentes praticas usuais de colheita e de processamentos que por via natural e por via úmida, este último leva a um café de melhor qualidade que o processado na forma natural. As indústrias de torrefação encontram dessa maneira, dificuldades na preservação das características relacionadas ao padrão de qualidade do produto final direcionado ao consumo.

Ainda que não se possa ter certeza de que tipo de processamento tenha sido feito para as amostras cedidas pela indústria, pode-se especular que os dados apresentados no presente trabalho sugerem que o estágio de maturação dos frutos parece alterar a proporção entre polissacarídeos e conseqüentemente deve alterar a qualidade final do produto, seja solúvel ou torrado e moído.

**AGRADECIMENTOS:** Os autores agradecem ao CNPq pelas bolsas para C.A.S. e M.S.B. Agradecimentos também para a Cia. Iguaçu de Café Solúvel por ter gentilmente fornecidos grãos verdes para as análises.

**REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS**

- BUCKERIDGE, M.S., CAVALARI, A. A. , SILVA, C.O., TINÉ, M.A.S. Relevância dos processos de biossíntese de polissacarídeos da parede celular para a biotecnologia de frutos In: Lajolo FM & Menezes EW (Eds.) Fibra dietética em Iberoamérica: Tecnologia y Salud. Obtención, caracterización, efecto fisiológico y aplicación en alimentos. Projeto CYTED XI.7. Edusp, São Paulo, 2006.
- FILISSETTI-COZZI, T.M.C.C.; CARPITA, N.C. Measurement of uronic acids without interference from neutral sugars. *Analytical Biochemistry*. 197: 157-162, 1991.
- FISHER, M.; REIMANN, S.; TROVATO, V.; REDGEWELL, R. J., polysaccharides of green and robusta coffee beans. *Carbohydrate Research* 330: 93-101, 2001
- FRY, S.C The structure and function of xyloglucan. *Journal of Experimental Botany* 40: 1-11, 1988.
- ILLY, A.; VIANI, R. Espresso coffee: the chemistry of quality. San Diego: Academic Press, 1995.
- KIM, J.B.; OLEK, A. T.; CARPITA, N. C., Plasma membrane and cell wall exo- $\alpha$ -D-glucanases in developing maize coleoptiles. *Plant Physiology* 123: 471-485, 2000.
- MARTINS, M.C.M.; VIEIRA, C.J.; SILVA, C.O.; BUCKERIDGE, M.S. Análise de carboidratos na bebida do café preparada sob diferentes processos de extração. *Revista Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos* 25(2):382-386, 2005.

- OUGUERRAM, A. Formation et digestion des parois cellulaires de réserves à mannanases du café (*coffea arabica* L.). *Ann. Sci. Nat. Bot.* 10: 111-133, 1989.
- REDGWELL R.; CURTI D.; FISCHER M.; NICOLA P.; FAY L. Coffee arabinogalactans: Acidic polysaccharides covalently linked to proteins. *Carbohydrate Research* 337:239-253, 2002.
- REDGWELL R.J.; CURTI D.; ROGERS J.; NICOLAS P.; FISCHER M. Changes to the galactose/mannose ratio in galactomannans during coffee bean (*Coffea arabica*L.) development: implications for in vivo modification of galactomannan synthesis. *Planta* 217: 316–326, 2003.
- SILVA, E. A.; MAZZAFERA, P.; BRUNINI, O.; SAKAI, E.; ARRUDA, F.B.; MATTOSO, L.H.C.; CARVALHO, C.R.L.; PIRES, MRC.M. The influence of water and environmental conditions on the chemical composition and beverage quality of coffee beans. *Brazilian Journal Plant Physiology* 17(2):229-238, 2005.
- TEIXEIRA, A. A. A qualidade do café que o mercado quer comprar. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, 16., 1990, Espírito Santo do Pinhal. Resumos. São Paulo: Faculdade de Agronomia e Zootecnia “ Manuel Carlos Gonçalves”, p.13-14, 1990.
- THALER., H.; ARNETH., W. Z. *Lebensm. Unters. Forsch.* 138:26–35, 1968.
- WOLFRON, M.L.; LAVER, M.L.; PATIN, D.L. Carbohydrates of the coffee bean. II. Isolation and characterization of mannan. *Journal of Organic Chemistry*, 26:4533-4531, 1961.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os dois trabalhos apresentados abordam a parede celular do endosperma de café. O primeiro versando sobre como controlar a estrutura os galactomananos e o segundo uma visão geral da composição dos polissacarídeos de sementes de das espécies *Coffea arabica* e *Coffea canephora*.

Os resultados obtidos no primeiro trabalho corroboram a hipótese de que os mananos que são detectados nas sementes maduras de café são sintetizados, na realidade, como galactomananos e depois desramificados. Apesar de os dados apresentarem um bom nível de coerência interna, ainda será necessário realizar um experimento de expressão heteróloga da CaGAL2 em bactéria, isolar a enzima e demonstrar que o produto do gene é o mesmo polipeptídeo que foi purificado a partir das sementes em desenvolvimento. Além disso, as descobertas apresentadas também não fecham a questão da hipótese da edição, pois ainda será necessário, por exemplo, realizar experimentos de super expressão ou silenciamento do gene *CaGAL2* para confirmar seu papel in vivo. Mesmo assim, o trabalho apresentado na parte I representa um avanço científico interessante e abre algumas possibilidades de aplicações biotecnológicas. O controle da expressão de *CaGAL2* em café poderá ser utilizado para diminuir a atividade da  $\alpha$ -galactosidase até um nível tal que aumente discretamente a solubilidade do manano, aumentando assim o rendimento de extração do café.

Há a opção de fazer plantas de café transgênicas, mas atualmente tal opção não é muito bem aceita em muitos mercados. No entanto, é importante lembrar que a descoberta da existência de *CaGAL2* permite que se utilize técnicas clássicas de melhoramento genético, através da busca de indivíduos que apresentem menor expressão gênica de *CaGAL2* e procedendo a técnicas de cruzamento que levem à estabilização deste padrão e, conseqüentemente à produção de variedades com grãos de café com polissacarídeos (galactomananos) mais solúveis.

Nesse sentido, há duas conseqüências de interesse. Uma é obviamente a econômica, em que um aumento de produtividade traria mais divisas para o país e ao mesmo tempo as conseqüências ambientais de um aumento de produtividade podem ser interessantes para diminuir a área de plantio e conseqüentemente abrir espaço para a regeneração de florestas no Estado de São Paulo e Minas Gerais, por exemplo. No caso de São Paulo, terceiro maior produtor do país com projeção de produção de 4500 sacas para o período 2006/2007 (Dados do Conab – Conselho Nacional de Abastecimento do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento), o nível de devastação da Floresta Estacional Semidecidual é enorme e como o café é uma cultura importante e ocupa área considerável um aumento de produtividade com manutenção de preços de mercado poderia diminuir a área de plantio. No caso dos dois maiores produtores atuais que são Minas Gerais (projeção de 22 mil sacas) e Espírito Santo (projeção de 9300 sacas) e sendo estados que nível melhor de preservação ambiental que São Paulo, um aumento de produtividade seria bastante benéfico (dados do Conab). Neste sentido, nossas descobertas aumentam o potencial de sustentabilidade ambiental das plantações de café, uma vez que têm o potencial de aumentar a produtividade e até diminuir a área de plantio.

No segundo trabalho da tese, os resultados produzidos sugerem que a coleta de frutos na fase de cereja produz um padrão de polissacarídeos indistinguível entre variedades de Arabica e Canephora. A comparação com os cafés utilizados na indústria de café solúvel, comprados como conilon e arábica mostrou que estes últimos apresentam diferenças consideráveis no balanço entre os polissacarídeos mais solúveis (pectinas) e os menos solúveis (mananos). É discutível a possibilidade de que tais diferenças levem a modificações importantes na qualidade, mas é certo que os rendimentos mudam, com conilon sendo uma opção melhor do que arábica por possuir maior proporção de polissacarídeos mais solúveis. Muitos outros aspectos terão que ser avaliados, como por exemplo, substâncias não relacionadas aos carboidratos, mas que são determinantes no aroma, mas os dados apresentados neste trabalho são um bom indicador de que

a forma de coleta dos frutos e o grau de maturação destes têm influência no resultado final do balanço de açúcares no café.

Em conjunto os resultados obtidos nos dois trabalhos oferecem algumas opções para futuros projetos biotecnológicos que venham a produzir variedades de café com maior produtividade e maior qualidade. Os trabalhos também oferecem um avanço científico básico importante, pois este é um dos primeiros trabalhos a apresentar demonstrações mais profundas sobre a importância da ação de exo-hidrolases como enzimas editoras durante a biossíntese e deposição de polissacarídeos da parede celular vegetal.

