



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA MOLECULAR**

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE PEPTÍDEOS
OPIOIDES PRESENTES NA FRAÇÃO PROTEICA DE
GRÃOS DE *Coffea arabica***

FELIPE VINECKY

ORIENTADOR: CARLOS BLOCH JÚNIOR

TESE DE DOUTORADO EM BIOLOGIA MOLECULAR

FELIPE VINECKY

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE PEPTÍDEOS
OPIOIDES PRESENTES NA FRAÇÃO PROTEICA DE
GRÃOS DE *Coffea arabica***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular do Instituto de Biologia, Departamento de Biologia Celular da Universidade de Brasília, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Biologia Molecular.

Área de concentração: Ciências Biológicas.

Orientador: Dr. Carlos Bloch Júnior

Brasília
2015

FELIPE VINECKY

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE PEPTÍDEOS
OPIOIDES PRESENTES NA FRAÇÃO PROTEICA DE
GRÃOS DE *Coffea arabica***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular do Instituto de Biologia, Departamento de Biologia Celular da Universidade de Brasília, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Biologia Molecular pela Comissão Julgadora composta pelos membros:

COMISSÃO JULGADORA

Prof. Dr. Isaac Roitman
Universidade de Brasília / Academia Brasileira de Ciências (Presidente)

Dr. Luis Antônio Barreto de Castro
Academia Brasileira de Ciências

Prof. Dr. Spartaco Astolfi Filho
Universidade Federal do Amazonas (UFAM)

Prof. Dr. Marcelo de Macedo Brígido
Universidade de Brasília (UnB)

Aprovada em: de março de 2015 às 13 horas.

Local da defesa: Auditório Central da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.
Brasília-DF

Dedico,
à minha esposa Michelle pela confiança
e apoio incondicional e aos meus filhos
Nina e Vitor por transformarem a
minha vida e a tornarem melhor.

Agradecimentos

Primeiramente agradeço à família que constituí durante o doutorado, minha esposa Michelle que me estimulou e me deu todo o apoio em todos os momentos, desde a graduação, no mestrado e principalmente durante o doutorado e pelo amor incondicional. Aos meus filhos Nina e Vitor que fizeram-me crescer mais, enxergar a vida com outros olhos e por cada sorriso diário.

Agradeço à minha família iniciando pela minha irmã Verônica que também me estimulou, ajudou, cuidou de minha saúde, sempre esteve presente e solícita e no final ajudou muito com a correção de português da minha tese!!! À minha mãe que esteve do meu lado quando precisei, encorajamento, ajudando com as crianças quando precisava, pelos nossos momentos de descontração (nazdraví) e apoio. Ao meu pai por me ensinar que na vida precisamos aprender, pelo estímulo, a credibilidade em mim, toda a estrutura que me proporcionou desde sempre. À minha irmã Bárbara (e família) que sempre ajudou quando precisei, em todos os sentidos e principalmente com as crianças.

Aos meus amigos, Eder que esteve presente em todos os momentos (inclusive antes do doutorado) desde a escrita do projeto, a execução e término do doutorado, às saídas de campo ora para pegar perereca mas também para pescaria, sinuca, foguinho... Minha amiga Mariana que esteve presente sempre, fazendo as coisas acontecerem, ajudando, trabalhando em equipe e sempre alegre! Meu amigo Zé (vulgo José de Lima) por participar das noites de "trabalho" que se tornavam diversão, pelas prosas e pela amizade! Ao amigo Daniel Sifú, que também participou do trabalho com ensinamentos e análises, pelas conversas e confiança. Aos amigos Yuri, André, Polyana, que mesmo de fora sempre foram solícitos, amigos de verdade. E tantos outros que não foram citados aqui, muito obrigado pela força.

Ao amigo agrônomo e remador Felipe pelas conversas e por ter a disposição em remar cedo da manhã e fazer as nossas vidas muito mais saudáveis.

A turma toda do LEM, Maú, Jorge, Eduardo, Luciana, Giselle, Ramada, Guil, Thiago, Bia e todos outros que fazem do laboratório um ambiente agradável de se estar.

À equipe do Laboratório de Toxinologia da UnB, professora Márcia, que cedeu a estrutura para a realização dos testes, à Karlinha auxiliando no planejamento e execução dessa parte do trabalho e Jacqueline pelo apoio com os animais.

Às meninas do LGM como Tati, Fernanda, Sinara, Michelle por auxiliar em algumas tarefas e estarem sempre dispostas a ajudar.

Ao Alan por auxiliar em parte da pesquisa e ceder a estrutura do laboratório para desenvolver parte do meu trabalho

Ao Pierre por fornecer as dicas tão valiosas e pela constante dedicação e disponibilidade em sanar dúvidas e ajudar.

Aos membros da banca examinadora Dr. Luiz, Dr. Spartaco, Dr. Isaac, Dr. Marcelo e Dra. Maura pela disponibilidade em participar da banca.

Ao meu orientador Carlos Bloch por todo o processo! Primeiramente por me instigar a fazer o doutorado, o que quase tinha desistido de fazer. Sempre mostrou que fazer ciência dá trabalho mas não é um martírio, mas sim uma diversão. Me fez uma pessoa mais feliz, aliás, MUITO mais feliz! Além de proporcionar um ambiente extremamente agradável, com muita liberdade e também equipamentos de ponta, guiou um trabalho muito gratificante e bonito. Me proporcionou passar momentos com minha família que jamais esquecerei. Por me lembrar que a vida sem saúde é mais insossa. E finalmente pela confiança e por mostrar que a vida é mais que aprender, é viver, ensinar, educar... Muito obrigado Bloch!

À todos que ajudaram direta ou indiretamente na execução desse trabalho.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular pela oportunidade de desenvolver o trabalho, à Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia pela estrutura e à CAPES pelo suporte financeiro.

Identificação e caracterização de peptídeos opioides presentes na fração proteica dos grãos de *Coffea arabica*

RESUMO

No que diz respeito à cafeicultura e ao processamento dos grãos de café, o conceito de qualidade do produto foi definido sob diferentes aspectos, como, por exemplo, qualidade de produção, níveis de torra, aroma. Acredita-se que muitos dos constituintes do grão influenciam diretamente nas características organolépticas apresentadas pela bebida. Entretanto, pouco se conhece a respeito de quais moléculas estariam desempenhando tais funções, principalmente, em relação a proteínas e peptídeos encontrados no endosperma da semente do café, uma vez que a maioria dos estudos relacionados focam moléculas não protéicas. Alguns peptídeos que são biologicamente ativos, ou seja, bioativos, estão encriptados em proteínas de origem animal e vegetal e podem ser encontrados com a realização de um screening de um banco de dados utilizando parâmetros pré-definidos. Uma das formas de obtenção de peptídeos bioativos é por meio da ingestão de alimentos que contenham proteínas precursoras e que sofram proteólise por enzimas digestivas. No presente trabalho, foi realizada uma avaliação da composição química de *Coffea arabica* que visou identificar os precursores de qualidade da bebida do café que estivessem associados a proteínas com possíveis sequências de peptídeos opioides como parte de suas estruturas primárias. Para isso foram realizadas análises *in silico* em bancos de dados internacionais e na base de dados do Genoma Café, buscando peptídeos que apresentassem a região N-terminal (YGG) similar a outros peptídeos opioides. Outra metodologia utilizada foi a digestão do extrato proteico de *Coffea arabica* var. Acauã com enzimas digestivas, seguido de fracionamento por HPLC e sequenciamento por Espectrometria de Massa. Os peptídeos encontrados estavam encriptados em uma família de proteínas chamada dehidrina. Esses peptídeos, identificados em ambos métodos, foram sintetizados utilizando-se a estratégia Fmoc/t-butila (9-fluorenilmetoxicarbonila) de síntese manual em suporte sólido e tiveram a atividade (opioides) avaliada em modelos *in vivo* que permitiram determinar suas funções. Os testes utilizados para avaliar a atividade opioide foram o da placa quente e o da retirada da cauda. Foi possível concluir que as metodologias utilizadas para desvendar os peptídeos encriptados mostrou-se ser eficiente, já que todos os peptídeos testados apresentaram atividade antinociceptiva em camundongos.

Palavras-chave: *Coffea arabica*, peptídeos opioides e antinocicepção.

Identification and characterization of opioid peptides in protein fraction of *Coffea arabica* grains

Abstract

Regarding to coffee and processing of coffee beans, the product quality concept has been defined in many different ways, for example, production quality, roasting levels, flavor. It is believed that many of the grain constituents directly influence the organoleptic characteristics of the beverage. However, little is known about the molecules performing such functions, especially concerning peptides and proteins found in the endosperm of the coffee seed, since most studies related to this topic focuses on non-protein molecules. Some peptides which are biologically active, ie bioactive, are encrypted in animal or vegetal proteins and can be found by a database screening, using default parameters. One way to obtain bioactive peptides is through the ingestion of foods containing precursor proteins susceptible to proteolysis by digestive enzymes. In the present study, an evaluation of the chemical composition of *Coffea arabica* was conducted which aimed identifying the coffee beverage quality precursors associated with proteins containing putative sequences of opioid peptides as part of their primary structures. As part of the investigation, *in silico* analyzes were performed using the international databases and the Coffee Genome database by searching peptides with N-terminal region (YGG) similar to other opioid peptides. Another methodology used was the digestion of protein extract of *Coffea arabica* var. Acauã with digestive enzymes, followed by HPLC purification and sequencing by Mass Spectrometry. The detected peptides were encrypted in a family of proteins called dehydrin. Those peptides identified in both methods were synthesized by using Fmoc/t-Butyl strategy (9-fluorenylmethoxycarbonyl) of manual synthesis on solid support, and their activity (opioid) was evaluated by *in vivo* models which allowed to determine their roles. The tests used to access the opioid activity were the hot plate and tail flick. It was concluded that the methodologies used to unlock the encrypted peptides have proved to be efficient since all of the tested peptides showed antinociceptive activity in mice.

Keywords: *Coffea arabica*. Opioid peptides. Antinociception.

Sumário

Lista de abreviaturas e siglas	7
INTRODUÇÃO	9
O café no mundo e sua origem	9
Estresse hídrico e qualidade no café	11
O café na saúde	13
Peptídeos no café	17
Café com opiáceos e nutracêuticos	20
OBJETIVOS	24
Objetivo geral.....	24
Objetivos específicos	24
JUSTIFICATIVA	25
MATERIAIS E MÉTODOS	28
Material vegetal	28
Verificação de proteínas em Minigel de Poliacrilamida	29
Digestão enzimática.....	30
Fracionamento/purificação de Peptídeos	30
Sequenciamento dos Peptídeos	31
Síntese manual de Peptídeos	32
Testes de antinocicepção	34
RESULTADOS	39
Presença de proteínas	39
Fracionamento do extrato bruto	39
Fracionamento do extrato digerido.....	41
Peptídeos sequenciados.....	42
Peptídeos advindos da Dehidrina	44
Testes nociceptivos	46
Biodisponibilização do PSLEM 12013 e Leu-encefalina.....	56
DISCUSSÃO	57

CONCLUSÃO.....	60
REFERÊNCIAS.....	62
ANEXOS	70

Lista de Figuras

Figura 1: Alinhamento de desidrinas de café. Regiões delimitadas por retângulos são peptídeos com possível atividade opioide. Números de acesso: <i>coffee dehydrin</i> CcDH1a (ABC55670); <i>coffee dehydrin</i> CcDH1b (ABC55671); <i>coffee dehydrin</i> CcDH2a (ABC55672); <i>coffee dehydrin</i> CaDHN1a (JP709195); <i>coffee dehydrin</i> CaDHN1b (JP709196); e <i>coffee dehydrin</i> CrDHN1 (JP709197). Figura adaptada de Santos e Mazzafera, 2012.....	19
Figura 2: Alinhamento dos peptídeos encontrados nas sequências das desidrinas. Em cinza, a porção conservada do N-terminal com YGG. As outras cores indicam diferenças entre os aminoácidos ou mutações na estrutura primária dos peptídeos.....	20
Figura 3: Receptores opioides sendo ativados por moléculas opioides, modificado de Fisher e colaboradores (2012).....	22
Figura 4: Placa Quente (AVS, Brasil) – Aparelho para teste de antinocicepção em camundongos.....	35
Figura 5: Teste de retirada da cauda (<i>Insight</i> , Brasil) – Aparelho para teste de antinocicepção em camundongos.....	36
Figura 6: Minigel de poliacrilamida a 16% de extrato bruto de proteínas de <i>C. arabica</i> var. Acauã. 1- Marcador de massa molecular <i>BenchMark™ Protein Ladder</i> (INVITROGEN); 2, 3 e 4- 1 µg, 2 µg, 4 µg de extrato bruto de proteína, respectivamente.....	39
Figura 7: Perfil cromatográfico do extrato proteico de <i>C. arabica</i> var Acauã, fracionado por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (utilizando coluna analítica C ₈ de fase reversa) em gradiente crescente de ACN variando de 5 a 65% em 60 min e fluxo de 1 mL.min ⁻¹	40
Figura 8: Perfil cromatográfico do extrato proteico de <i>C. arabica</i> var Acauã, fracionado por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (utilizando coluna analítica C ₁₈ de fase reversa) em gradiente crescente de ACN variando de 0 a 70% em 70 min e fluxo de 2,5 mL.min ⁻¹	40
Figura 9: Perfil cromatográfico do extrato proteico de <i>C. arabica</i> var Acauã digerido com pepsina por 4 horas, fracionado por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (utilizando coluna analítica C ₈ de fase reversa) em gradiente crescente de ACN variando de 5 a 65% em 60 min e fluxo de 1 mL.min ⁻¹	41

Figura 10: Perfil cromatográfico do extrato proteico de <i>C. arabica</i> var Acauã digerido com pepsina por 4 horas, fracionado por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (utilizando coluna analítica C ₁₈ de fase reversa) em gradiente crescente de ACN variando de 0 a 70% em 70 min e fluxo de 2,5 mL.min ⁻¹	42
Figura 11: Isoformas da dehidrina que continham a terminação YGG na região N-terminal do peptídeo. Em vermelho, as sequências dos peptídeos escolhidos para síntese e testes.....	44
Figura 12: A - Sequência da proteína dehydrin DH1a (Hinninger et al. 2006) e em negrito o peptídeo similar ao PSLEM 12013. B - Sequência do Contig 8867 (Santos e Mazzafera, 2012). Em A e B, as regiões diferenciadas por cores foram os peptídeos sequenciados.....	45
Figura 13: Espectro obtido por MS/MS para confirmação da identidade do PSLEM 12013 (YGGTAGAHGTY-COOH). A série y corresponde aos íons fragmentados no C-terminal e a série b, fragmentos no N-terminal.....	46
Figura 14: Índice de latência adquirido em diferentes tempos após a aplicação (i.p.) em camundongos do PSLEM11042 utilizando a placa quente por 120 minutos.	47
Figura 15: Índice de latência adquirido em diferentes tempos após a aplicação (i.p.) em camundongos do PSLEM11042 utilizando o teste da retirada da cauda por 120 minutos.	47
Figura 16: Índice de latência adquirido em diferentes tempos após a aplicação (i.p.) em camundongos do PSLEM 11043 utilizando o teste da retirada da cauda por 240 minutos. # - A partir de 20 minutos, Morfina > Salina P<0,05. * - A partir de 20 minutos PSLEM 11043 e Encefalina > Salina com P<0,05.	48
Figura 17: Índice de latência adquirido em diferentes tempos após a aplicação (i.p.) em camundongos do PSLEM 11043 utilizando a placa quente por 240 minutos. # - A partir de 60 minutos, Morfina > Salina P<0,05. ** - A partir de 20 minutos PSLEM 11043 e Encefalina > Salina com P<0,05.	49
Figura 18: Índice de latência adquirido em diferentes tempos após a aplicação (i.p.) em camundongos do PSLEM 11044 utilizando o teste da retirada da cauda por 240 minutos. # - A partir de 90 minutos, PSLEM 11044 > Salina P<0,05.....	50
Figura 19: Índice de latência adquirido em diferentes tempos após a aplicação (i.p.) em camundongos do PSLEM 11044 utilizando a placa quente por 240 minutos. . # - A partir de 90 minutos, PSLEM 11044 > Salina P<0,05. * - A partir de 180 minutos PSLEM 11043 e Encefalina+Naloxona interrompida > Salina com P<0,05.....	50
Figura 20: Índice de latência adquirido em diferentes tempos após a aplicação (i.p.) em camundongos do PSLEM 11045 utilizando o teste da retirada da cauda por 240 minutos. # - A partir de 120 minutos, PSLEM 11045 > Salina P<0,05.	51

Figura 21: Índice de latência adquirido em diferentes tempos após a aplicação (i.p.) em camundongos do PSLEM 11045 utilizando a placa quente por 240 minutos. # - A partir de 60 minutos, PSLEM 11045 > Salina P<0,05.	52
Figura 22: Índice de latência adquirido em diferentes tempos após a aplicação (i.p.) em camundongos do PSLEM 12013 utilizando o teste da retirada da cauda por 240 minutos. # - A partir de 150 minutos, PSLEM 12013 > Salina P<0,05.	52
Figura 23: Índice de latência adquirido em diferentes tempos após a aplicação (i.p.) em camundongos do PSLEM 12013 utilizando a placa quente por 240 minutos. # - A partir de 60 minutos, PSLEM 12013 e Encefalina > Salina P<0,05 e com 180 minutos PSLEM 12013+Naloxona e Enk+Naloxon Interrompida > Salina P<0,05.....	53
Figura 24: Área abaixo da curva para todos os experimentos no teste de placa quente. Os grupos marcados com (*) foram estatisticamente superiores ao grupo salina quando avaliados por <i>one way</i> anova e Teste de Tukey com P < 0,05. Os grupos marcados com (#) foram estatisticamente superiores ao respectivo grupo tratado com naloxona quando avaliados por <i>one way</i> anova e Teste de Tukey com P < 0,05.....	54
Figura 25: Área abaixo da curva para todos os experimentos no teste de retirada da cauda. Os grupos marcados com (*) foram estatisticamente superiores ao grupo salina quando avaliados por <i>one way</i> anova e Teste de Tukey com P < 0,05. Os grupos marcados com (#) foram estatisticamente superiores ao respectivo grupo tratado com naloxona quando avaliados por <i>one way</i> anova e Teste de Tukey com P < 0,05. Os grupos marcados por (\$) apresentaram maior área abaixo da curva que os demais avaliados por <i>one way</i> anova e Teste de Tukey com P < 0,05.....	55
Figura 26: Representação dos fragmentos do PSLEM 12013, obtidos nos diferentes tempos de incubação com a enzima tripsina. Análise realizada por espectrometria de massa, MALDI-TOF/MS. A: espectro obtido após 15 minutos de incubação; B: espectro obtido após 30 minutos de incubação; C: espectro obtido após 120 minutos de incubação; D: espectro obtido após 240 minutos de incubação; E: peptídeo controle (PSLEM 12013).	56
Figura 27: Representação dos fragmentos da Leu-encefalina, obtidos nos diferentes tempos de incubação com a enzima tripsina. Análise realizada por espectrometria de massa, MALDI. A: espectro obtido após 30 minutos de incubação; B: espectro obtido após 60 minutos de incubação; C: espectro obtido após 120 minutos de incubação; D: espectro obtido após 240 minutos de incubação; E: peptídeo controle (Encefalina-Leu).....	57

Lista de Tabelas

Tabela 1: Nome, sequência, massa teórica e o número de acesso no NCBI dos peptídeos sintetizados e testados em animais.	32
Tabela 2: Grau de substituição das resinas e as respectivas quantidades utilizadas na síntese dos peptídeos.	33
Tabela 3: Doses dos peptídeos aplicadas nos animais.	37
Tabela 4: Sequências de peptídeos do café verde oriundos do fracionamento em HPLC e sequenciados por sequenciamento <i>de novo</i> , a respectiva massa molecular e Busca de similaridade por <i>Blast_hit</i>	43
Tabela 5: Sequências de peptídeos do café torrado oriundos do fracionamento em HPLC e sequenciados por sequenciamento <i>de novo</i> , a respectiva massa molecular e Busca de similaridade por <i>Blast_hit</i>	43

Lista de abreviaturas e siglas

ACN	Acetonitrila
CaDHN	<i>Coffea arabica</i> Dehydrin
CcDH	<i>Coffea canephora</i> Dehydrin
CCK	Colecistoquinina
cDNA	DNA complementar
CHCA	α -cyano-hydroxycinnamic acid (ácido α -ciano-hidroxicianímico)
CIFC	Centro de Investigação das Ferrugens do Cafeeiro
CrDHN	<i>Coffea racemosa</i> Dehydrin
Da	Dalton
DCM	Diclorometano
DIPEA	N,N-Diisopropiletilamina
DMF	N,N-Dimetilformamida
ECA	Enzima Conversora de Angiotensina
EDT	1,2-etanoditiol
ESI	Electrospray Ionization (Ionização tipo electrospray)
ESTs	Expressed Sequence Tags (Etiquetas de Sequências Expressas)
Fmoc	Fluorenilmetiloxycarbonil
h	Hora
HPLC	High Performance Liquid Cromatography (Cromatografia Líquida de Alta Pressão)
IA	Índice de Antinocicepção
i.p.	Intraperitoneal
kg	Quilograma
KOR	Kappa Opioid Receptor (Receptores Opioides do tipo Kappa)
LC	<i>Locus Coeruleus</i>
LEA	Late Embryogenesis Abundant Proteins (Proteínas Abundantes na Embriogênese Tardia)
MALDI	Matrix Assisted Laser Desorption Ionization (Ionização por Dessorção de Laser Assisstida por Matrix)
mL	Mililitro
μL	Microlitro
μM	Micromolar
mM	Milimolar
min	Minuto
MOR	μ -Opioid Receptor (Receptor Opioide do tipo μ)
MS	Mass Spectrometry (Espectrometria de Massa)
MS/MS	Mass Spectrometry <i>in tandem</i> (Espectrometria de Massa <i>in tandem</i>)
NIRS	Near-Infrared Spectroscopy (Espectroscopia de Infravermelho Próximo)
nm	Nanômetro
ORL	Opioid Receptor-Like (Receptor do tipo Opioide)
PAG	Periaqueductal Gray (Região Periaqueductal Cinza)
PKA	Proteine Kinase A (Proteína Quinase A)
PSLEM	Peptídeo Sintético do Laboratório de Espectrometria de Massa
qPCR	quantitative real-time Polymerase Chain Reaction (Reação em Cadeia de Polimerase quantitativa em tempo real)
r.p.m	Rotações por minuto
RVM	Rostral Ventromedial Medulla (Medula Rostroventral)
s	Segundo
SBED	Sociedade Brasileira Para o Estudo da Dor
Sida	Síndrome da imunodeficiência adquirida
SNC	Sistema Nervoso Central

tBlastn	search translated nucleotide databases using a protein query (ferramenta de busca de alinhamento local básico a partir de sequência proteica em base de dados de nucleotídeos)
TBTU	Tetrafluoroborato de 2-(1-H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilurônio
TFA	Ácido Trifluoracético
TIS	Triisopropilsilano
TOF	Time-Of-Flight (Tempo de Voo)
VDI	Via Descendente Inibitória
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate (Dodecil Sulfato de Sódio)
Tmed	N,N,N',N' - Tetramethylethylenediamine (N,N,N',N' - Tetrametiletilenodiamina)

INTRODUÇÃO

O café no mundo e sua origem

Não há evidência real sobre a descoberta do café, mas há muitas lendas que relatam sua possível origem. Uma das mais aceitas e divulgadas é a do pastor Kaldi, que viveu na Absínia, hoje Etiópia, há cerca de mil anos. Ela conta que Kaldi, observando suas cabras, notou que elas ficavam alegres e saltitantes e que esta energia extra se evidenciava sempre que mastigavam os frutos de coloração amarelo-avermelhada dos arbustos existentes em alguns campos de pastoreio. O pastor percebeu que as frutas eram fonte de alegria e motivação e, somente com a ajuda delas, o rebanho conseguia caminhar por vários quilômetros por subidas infundáveis, ao passo que os animais que não se alimentavam de tais arbustos ficavam para trás (Neves, 1974).

De acordo com Oliveira (2004), Kaldi comentou sobre o comportamento dos animais a um monge da região que decidiu experimentar o poder dos frutos. O monge apanhou um pouco das frutas e levou-as consigo até o monastério. Ele começou a utilizar os frutos na forma de infusão, percebendo que a bebida o ajudava a resistir ao sono enquanto orava. Esta descoberta se espalhou rapidamente entre os monastérios, criando uma demanda pela bebida. As evidências mais aceitas, no entanto, são as que mostram que o café foi cultivado pela primeira vez em mesquitas, no Iêmen. A planta de café é originária do oeste da Etiópia, região central da África, e foi encontrada durante os pastoreios onde ainda hoje faz parte da vegetação natural. Porém, foi a Arábia a responsável pela propagação da cultura do café.

O nome café não é originário de Kaffa (antiga província da Etiópia), local de origem da planta, e sim da palavra árabe *qahwa*, que significa vinho. Por esse motivo, o café era conhecido como "vinho da Arábia" chegando à Europa no século XIV (ABIC, 2008). A propagação internacional do café foi feita pelos árabes, que eram os principais comerciantes no Mar Vermelho e o centro para o comércio no Oceano Índico. Há muitas histórias sobre as origens do café, as quais, na maioria das vezes, enfatizam o uso farmacológico do grão do café como estimulante. Mas o mito consiste no fato de que cabras, e não humanos, foram os descobridores do efeito estimulante do café (Wild, 2004).

Embora haja pelo menos nove espécies diferentes que são reconhecidas como "café", o primeiro e ainda mais utilizado é o *Coffea arabica*. A segunda espécie mais popular, *Coffea canephora*, vulgarmente conhecido como robusta, só se tornou popular no século XX. A espécie *C. arabica* apareceu pela primeira vez de forma nativa na Etiópia. O café era um santo sacramento utilizado pelos povos indígenas para homenagear o deus Waqa em cerimônias públicas. O povo Oromo, por exemplo, aceitou o presente de Waqa, que se assemelhava a um arbusto. Neste sentido, no início, o café não era apenas uma mercadoria, mas fazia parte da cultura do povo. Foi generosidade da natureza que seres humanos e outros animais pudessem apreciar tal dádiva (Topik, 2009).

A divulgação do café na Europa ocorreu em 1592 por meio do alemão Leonardo Rauwoff. No início do século XVII, os navios da Companhia das Índias Orientais já faziam o transporte de grande quantidade de café entre os países muçulmanos do oriente, e, em 1637, já era hábito o seu consumo na Alemanha e nos Países Baixos. Os holandeses foram cruciais na propagação do consumo do café como bebida por toda a Europa. No início do século XVIII, o café já era um importante produto nos mercados internacionais dos países do Ocidente, estimulando, desta forma, a sua utilização nas colônias europeias da América e da Ásia (Bragança, 2003).

O comércio mundial de café iniciou como um artefato dentre as especiarias, os primeiros produtos de mercado global. Desde o final dos anos 1500, o cultivo espalhou-se da África para a Arábia, a Ásia Oriental, a América Latina, de volta à África e para a Ásia Oriental. Hoje, é cultivado em todos os continentes, exceto na Antártica (Topik, S. 2009). O consumo também se espalhou por toda a Terra. Como uma droga social de uso global, o café está presente nas mais distintas castas sociais, identidades étnicas e religiosas, em rituais simbólicos, em diferentes complexos alimentícios e na cozinha.

O café é uma das bebidas mais consumidas no mundo e também uma das maiores *commodities*. Grande parte da fama se deve ao fato de a cafeína ser a droga lícita mais popular do mundo (droga legal) (Weinberg e Bealer 2001; Courtwright 2001). Entretanto, nem sempre foi assim; o café seguiu um caminho tortuoso entre a legalidade e a popularidade. O status do café, então, se deve tanto à sua função social, virtuosa e/ou perniciosa, mas também aos seus efeitos farmacológicos.

Estresse hídrico e qualidade no café

O café então se tornou uma *commodity* de muita visibilidade e foi bastante difundido comercialmente. O mundo passou a consumir a bebida em maior quantidade, fazendo do plantio do cafeeiro um bom investimento. Cafezais se espalharam pelo mundo, inclusive em regiões não recomendadas para o plantio; locais com problemas de seca, por exemplo.

Embora a cafeicultura seja fortemente afetada pela seca, a maior parte do café no mundo tem sido cultivada por pequenos agricultores em regiões onde o emprego da irrigação é uma exceção (DaMatta e Ramalho, 2006). Além disso, mudanças no clima global podem causar limitações no fornecimento de água para a produção cafeeira, assim como os recursos hídricos podem se tornar ainda mais escassos em várias regiões. Neste contexto, a seleção de cultivares tolerantes à seca que possuam rendimentos aceitáveis é de extrema importância. Todavia, seleções foram feitas, mas se conhece relativamente pouco sobre como os genótipos de café respondem morfológica e fisiologicamente ao estresse hídrico (DaMatta, 2004; DaMatta e Ramalho, 2006).

Para estudos de café relacionados com a tolerância à seca, Fazuoli *et al.* (2007) destacou a importância de se considerar a origem dos materiais genéticos utilizados. A cultivar de *C. arabica* Acauã apresenta formato de copa característico dos Sarchimores (grupo de cafeeiros denominado *Sarchimor*, germoplasma descendente do híbrido CIFC H 361/4, aquele resultante do cruzamento entre a cultivar *Villa Sarchi*, com Híbrido de Timor (CIFC 832/2)), ou seja, a planta é baixa, com a copa ligeiramente arredondada e compacta. Possui ramificação secundária abundante e alto grau de enfolhamento. Os frutos maduros são vermelho-escuros e as sementes de formato alongado. Apresenta boa produtividade, mas alta percentagem de sementes do tipo moca (única e ovalada ao invés de duas sementes). Nos ensaios de comportamento, a 'Acauã' tem apresentado boa tolerância à seca, mantendo-se bem enfolhada durante todo o ano. Como característica, a cv. Acauã apresenta frutos e sementes longas, o que facilita a sua identificação; a bebida é de boa qualidade e o ciclo de maturação dos frutos é tardio. É altamente resistente (imune) à ferrugem do cafeeiro e tolerante ao nematóide *Meloidogyne exigua*.

Para auxiliar no entendimento dos mecanismos moleculares do cafeeiro, o Projeto Genoma Café possibilitou a construção de um banco de dados contendo um Unigene (CAFEST) com mais de 33.000 genes distintos, a partir de 250 mil ESTs de *C. arabica*, *C. canephora* e *C. racemosa*. A informação básica disponível fornece uma rica fonte de informações para estudos da biologia e fisiologia das plantas de cafeeiro e, certamente,

facilita a identificação e caracterização de genes de interesse agrônômico para auxiliar e acelerar o melhoramento genético desta importante cultura para o país (Vieira et al., 2006; Vidal et al., 2010).

Análises *in silico* na base de dados do Projeto Genoma Café auxiliaram na identificação de genes candidatos para a tolerância à seca. De acordo com Vinecky e colaboradores (2005), após a realização de uma análise por *tBlastn* na Base de Dados do Genoma Café, utilizando-se um conjunto de sequências proteicas já caracterizadas como envolvidas na resposta aos estresses abióticos, foi possível a identificação de inúmeros ESTs presentes no conjunto Unigene-CAFEST, apresentando alta similaridade de sequências. Para avaliar as sequências nucleotídicas de café, também vale ressaltar o projeto *Cornell-Nestlé EST*, realizado por Mondego e colaboradores, em 2011.

Vinecky (2009), em estudos de genômica (análises *in silico*, macroarranjo de cDNA e PCR quantitativo em tempo real - qPCR), apresentou em seus resultados a presença de vários genes responsivos à seca quando a planta de café é submetida ao estresse hídrico. Dentre os genes avaliados, está presente a Dehidrina, que foi encontrada em bibliotecas de cDNA tanto de folha quanto de fruto (Vieira et al., 2013; Mondego et al., 2011). As Dehidrinas fazem parte do grupo de proteínas LEA (*Late Embryogenesis Abundant proteins*), que foram isoladas sob condições de estresse, resultando na desidratação celular, e assim classificadas em vários grupos (Allagulova et al., 2003; Santos e Mazzafera, 2013). As dehidrinas, pertencentes ao grupo II (Close, 1997) das proteínas LEA, são uma das mais abundantes proteínas vegetais produzidas durante a embriogênese tardia ou em resposta à seca, à baixa temperatura, e à salinidade (Close, 1996). Dehidrinas foram encontradas em várias espécies de plantas, incluindo *Arabidopsis*, trigo, cevada, e arroz (Close, 1997). As proteínas do grupo LEA e as chaperonas estão envolvidas também na manutenção da estrutura de outras proteínas (Zhu, 2001). Todos esses componentes podem também desempenhar a função de proteção dos tecidos vegetais contra danos celulares, como os causados pelo estresse oxidativo (Bray, 1993; Close, 1996; Koag et al., 2003), embora a exata função permaneça incerta por ser um grupo enorme de proteínas.

Marraccini e colaboradores (2011) avaliaram proteínas e genes diferencialmente expressos em genótipos tolerantes e sensíveis de *Coffea canephora* submetidos à seca. Utilizando diferentes abordagens, foram capazes de identificar vários genes candidatos para o estudo de aclimatação da planta de café ao estresse hídrico, estando o gene da dehidrina dentre os avaliados. Ainda no estudo sobre os diferentes mecanismos moleculares para a tolerância à seca em *C. canephora* var. conilon, Vieira et al. (2013) mostraram que existe uma elevada regulação dos genes que codificam uma dehidrina (CcDH3), a ascorbato

peroxidase (CcAPX1), a proteína do tipo peroxidase de hidrogenase (CcPDH1) e a hemoglobina não simbiótica (CcNSH1), sugerindo uma forte indução dos sistemas antioxidante e osmoprotetor nos clones de café tolerantes à seca em relação ao déficit hídrico.

As desidrinas são altamente expressas durante a falta de água em plantas de café. Santos e Mazzafera, em 2012, mostraram que, embora genes DHN (desidrinas) sejam induzidos pelo estresse hídrico, os padrões de expressão de cada gene da desidrina foram espacialmente (folhas e raízes) e temporalmente distintos (níveis de tensão diferenciado), assim como foi a intensidade das respostas nas plantas Arábicas, Apoatã, e MN/Apoatã. Os resultados sugeriram uma forte relação entre a expressão dos DHN e estresse hídrico em café.

Em análises de NIRS realizadas em parceria Embrapa/CIRAD, foi possível verificar que cafeeiros submetidos ao estresse hídrico produzem grãos que continham teores dos componentes principais (cafeína, trigonelina, lipídeos totais, ácidos clorogênicos, sacarose e água) e a relação destes desejáveis em bebidas de melhor qualidade (Vinecky et al., 2010).

De acordo com Brand et al. (2012), a utilização das informações genômica (a exemplo, o Projeto Genoma do Café) e fisiológica (com o experimento dos cafés submetidos à seca) de um dado gênero (*Coffea*) possibilita encontrar uma fonte interna de novos peptídeos bioativos, podendo representar uma alternativa para desvendar os peptídeos encriptados (que estão presentes em proteínas e podem ser liberados por hidrólise enzimática endógena ou por clivagem proteolítica durante o processo digestivo). E ainda transforma a tecnologia transgênica, uma vez que o material genético a ser utilizado pertence ao organismo em questão, e não a fontes exógenas.

O café na saúde

O *Coffea arabica* teve um relacionamento instável para com a humanidade, indo de especiaria a *commodity* e de uso corriqueiro ao uso habitual na vida social (Csikszentmihalyi e Appadurai, 1988). De fato, alguns historiadores da ciência têm sugerido que a descoberta de William Harvey sobre o sistema circulatório humano e a medicina moderna deve uma boa parte ao seu vício no café, pois pôde observar os efeitos de seu consumo sobre a circulação do sangue (Jacob, 1998).

Durante os cinco séculos de ciência do café ocidental, a relação café e saúde, em termos nutricionais e medicinais, tem sido muito explorada e opiniões positivas quanto à sua utilização têm predominado. O café tem sido tradicionalmente recomendado quase como uma panaceia para os mais diversos tipos de doenças, como infecções, doenças cardiovasculares, câncer e problemas nervosos. Apesar das controvérsias sobre o seu uso e abuso, levando a ondas de aprovação ou restrição da ingestão da bebida, a identidade de café, quando relacionado à saúde e à doença, tem sido, historicamente, ressignificada, e têm surgido novos horizontes positivos acerca das suas potencialidades farmacológica, nutricional e medicinal (Preedy, 2014).

Antes do pasteurianismo e dos medicamentos antimicrobianos, as doenças infecciosas eram a principal preocupação internacional de saúde. O café era um recurso auxiliar para lutar contra os grandes problemas de saúde pública. Devido às propriedades antissépticas e ajuda na recuperação da saúde, a partir da segunda metade do século XVII, o consumo do café foi recomendado contra febre e epidemias, como cólera e malária. Além disso, as propriedades antipiréticas do café, as formas de nitrogênio presentes em sua composição química e a capacidade de estimular os órgãos foram consideradas curativas (Wallace, 1908). Após o microbiologista francês Louis Pasteur (1822-1895) propor a teoria dos germes no final do século XIX, o café foi identificado como tendo uma atividade antipatogênica (Prozovorovski e Pazharova, 1893). Hoje em dia, as propriedades antibacteriana e antiviral do café são ferramentas promissoras contra infecções. Inúmeros trabalhos de pesquisa acerca do uso do café têm sido elaborados. Muitos apenas relatam o comportamento ou a resposta do organismo ao consumo de café em grupos de indivíduos que manifestam alguma doença, comparados a um grupo controle.

Somente em 1819 o segredo do grão foi desvendado; um alcalóide denominado cafeína ($C_8H_{10}N_4O_2$), descoberto por Friedlieb Ferdinand Runge. A cafeína é provavelmente uma das drogas mais estudadas. Courtwright (2009) a classifica como uma droga "psicoativa". Trata-se da droga lícita mais consumida no mundo e, por ser rica em alcalóides, possui as propriedades; venenosa e/ou curativa. A provável aparição dessa molécula se deu a partir da evolução das plantas como um mecanismo de defesa dos cafeeiros para protegê-los de bactérias e fungos. Embora a cafeína também esteja naturalmente presente em outras plantas, tais como chás, mate, nóz de cola e o cacau, o seu nome revela a sua íntima associação com *Coffea* (café), a partir do qual foi isolado pela primeira vez.

Atualmente, nos Estados Unidos, 70 por cento de toda a cafeína é derivado do café (Weinberg e Bealer 2001). Em outros países, no entanto, tem havido uma substituição de uma bebida com cafeína por outra. Embora as propriedades psicofisiológicas da cafeína

tenham induzido os seres humanos a degustarem o café, os aspectos que o relacionam a uma droga não justificam a causa da popularidade do café. Afinal, essa bebida, quando descafeinada, também é bastante popular. Mais especificamente, a pesquisa constata que apenas cerca de 15 por cento dos consumidores estão fisiologicamente viciados em cafeína. Rituais de café, especialmente o "acordar e sentir o cheiro do café", mas também: "café da manhã" e o "*coffee break*", "tomar café para espantar o sono", provavelmente explicam melhor o crescimento da popularidade do café.

O efeito fisiológico do café em humanos varia de pessoa para pessoa e depende da qualidade e da quantidade de café ingerido. O café é considerado uma das mais ricas fontes de compostos fenólicos da dieta ocidental, sendo que o composto fenólico mais abundante está contido nos ácidos clorogênicos, correspondendo a 12% da matéria seca do grão de café (Ky et al., 2001; Clifford, 1999). Estes ácidos apresentam um grande número de funções biológicas, incluindo anticarcinogênica e anti-inflamatória, isso devido à potencial atividade antioxidante (Murphy e Naidu, 2012). Dessa forma, os ácidos clorogênicos oferecem inúmeros benefícios para saúde e ainda são considerados um componente promissor para o uso em diversos tipos de terapia (Shan et al., 2009; Farah e Donangelo, 2006).

Entretanto, o café não contém apenas cafeína e ácidos clorogênicos. Como tem sido divulgado em diferentes instâncias, nele estão contidas concentrações consideráveis de compostos antioxidantes, lipídeos, proteínas e carboidratos. Encontram-se também no café cru, vitaminas, minerais, água e ácidos, como o cítrico e o fosfórico, por exemplo. A composição mineral do grão pode variar com o estado nutricional do cafeeiro e a quantidade de compostos orgânicos, como a celulose, a hemicelulose, os óleos, a trigonelina, o ácido clorogênico e os compostos nitrogenados; também depende do local de cultivo, da variedade do café, das adubações, entre outros fatores. O equilíbrio na combinação desses compostos para a formação do sabor e do aroma é importante para a obtenção da bebida de boa qualidade (Amorim, 1978; Carvalho et al., 1997).

A composição química do grão verde de café é bastante complexa. Durante o processo de torrefação, ocorrem, ainda, diversas reações químicas, por meio das quais se degradam e/ou formam-se inúmeros compostos. Estima-se que o grão de café torrado possua mais de 2000 compostos químicos, alguns destes com atividades biológicas conhecidas (adversas e/ou benéficas) (Smith et al., 1987; Illy e Viani, 2005). A torra resulta em alterações físicas e químicas complexas em grãos de café, que contribuem para as suas características organolépticas desejáveis. A torrefação acentuada forma as melanoidinas e diversos compostos aromáticos, mas também reduz outros constituintes importantes, tais

como sacarose, proteínas, aminoácidos, lipídeos, ácidos clorogênicos e polissacáridos. A cafeína permanece relativamente estável durante a torrefação. Deste modo, os efeitos do consumo de café irão depender da qualidade e da quantidade dos compostos químicos ingeridos, estando o consumo moderado normalmente descrito como a ingestão de 3 a 5 doses diárias de café (Fernandes et al., 1998; Schilter et al., 2001).

Proteínas, peptídeos e aminoácidos livres são potenciais fontes de nitrogênio e precursores de aromas em grãos de café verde. O desenvolvimento do aroma do café e do seu escurecimento é essencialmente considerado devido às consequências das reações de Maillard (durante a torra) (Maillard, 1912), que são iniciadas pela interação do grupo carbonil de um açúcar redutor e o grupo amino livre de um aminoácido, um peptídeo, ou mesmo de uma proteína. Depois de reações de condensação, os polímeros nitrogenados (coloração marrom), chamados melanoidina, são produzidos. Proteínas nos grãos de café verde, e a proteína de armazenagem 11S, em particular, (Rogers et al., 1999) representam um importante reservatório de aminoácidos livres e peptídeos. Os peptídeos são isolados a partir dos grãos verdes em quantidades que variam de 0,4% a 0,6% numa base de peso seco. Várias endopeptidases também foram identificadas (Ludwing et al., 2000). A contribuição desses peptídeos para o sabor do café foi sugerida por ensaios de modelos de torrefação.

Alguns componentes do grão de café, como diterpenóides, cafestol e kahweol, foram determinantes no aumento dos níveis de colesterol no sangue, o que representa, assim, possível ameaça para a saúde cardiovascular (Urgert e Katan, 1996) Em contrapartida, o cafezinho pode contribuir para a diminuição do risco de doenças coronárias cardíacas (CHD), pelo menos em consumidores que consomem moderadamente e metabolizam bem a cafeína (Cornelis et al., 2006).

Müller e colaboradores (2012) relataram que o consumo de café espresso no pós-operatório é uma forma barata e segura para ativar a motilidade intestinal após a cirurgia eletiva do cólon. Eles relatam que o café com cafeína estimula a atividade motora do cólon, com uma magnitude semelhante a de uma refeição; o efeito também foi 60% mais forte do que a água e 23% mais forte do que café descafeinado (em pessoas normais) (Rao et al., 1998). O café também estimula a contração da vesícula biliar, com prováveis efeitos sobre a atividade motora do cólon (Brown et al., 1990; Boekeman et al., 1990), e também é percebido que pôde amolecer fezes em grupos de indivíduos alemães (Müller et al., 2005). Além disso, foi demonstrado que a administração profilática de cafeína, para os usuários de cafeína, diminui a frequência de dor de cabeça durante o pós-operatório e encurta o tempo de recuperação, sem qualquer efeito indesejado (Weber et al., 1997).

Estudos sobre a perda de peso com a administração de café sugerem que o seu consumo pode ajudar no emagrecimento. Isso porque existe uma relação entre o consumo de café e o risco de obesidade, bem como potenciais efeitos de modulação do café na regulação do balanço energético: gasto de energia em relação ao consumo de energia (Acheson et al., 1980; Dulloo et al., 1989; Arciero et al., 1995; Arciero et al., 2000).

O aperfeiçoamento físico e o reforço mental, utilizando diferentes metodologias, são uma eterna busca da humanidade. Além do treinamento individual, o uso da cafeína desempenha um papel fundamental para melhorar o desempenho físico (Baron et al., 2007; Lieb, 2010). Em 1984, a cafeína foi adicionada à "Lista de Substâncias Proibidas" da Agência Mundial Anti-Doping (WADA). Desde 2004, a cafeína não tem sido mais considerada como uma substância proibida, no entanto, ainda é parte do monitoramento da "WADA" (WADA, 2013). Além disso, o café tem um papel importante nas funções cognitivas e na melhoria de desempenho. No passado, alguns famosos artistas produzindo sua arte (por exemplo, manuscritos e composições - Bach, Balzac, Voltaire) usavam enormes quantidades de café. O café é a "Droga" mais difundida no mundo de hoje por promover o ânimo, deixar o indivíduo desperto, e também por ser parte integrante da nossa cultura (Benowitz, 1990). No entanto, existem outras bebidas que contêm cafeína, incluindo as chamadas "bebidas energéticas", que são à base de cafeína.

As melanoidinas são polímeros marrons muito presentes no café torrado. Esses compostos podem auxiliar na regulação da microbiota intestinal, atuando como prebióticos, embora possam comportar-se como uma substância antimicrobiana (Rufián-Henares e Morales, 2008). A atividade antioxidante (Delgado et al., 2005) também foi demonstrada em ensaios *in vivo* e *in vitro* (Finot e Magnenat, 1981; Rufián-Henares e Morales, 2007a). Outros efeitos biológicos, tais como o anti-hipertensivo (Rufián-Henares e Morales, 2007b), o quelante (Rufián-Henares e Cueva, 2009), ou as atividades desintoxicantes (Reichardt et al., 2009) têm sido objeto de estudo. As melanoidinas de café podem ser utilizadas num futuro próximo como suplementos alimentares ou como ingredientes ativos de alimentos para a formulação de novos alimentos funcionais.

Peptídeos no café

As relações existentes entre os tecidos de perisperma, pericarpo e endosperma, as quais ocorrem durante o desenvolvimento dos frutos de café, são fundamentais para a elaboração das características finais destes grãos (De Castro e Marraccini, 2006).

Proteínas, glicídios redutores, e lipídios são os constituintes do café que desempenham funções importantes na proteção do endosperma aos estresses abióticos. Ainda ocorre uma cascata de fragmentação da proteína 11S, o que claramente favorece o desenvolvimento da alta qualidade no sabor do café, sendo encontrada também após a torra (Montavon et al., 2003).

A proteína 11S é uma globulina muito abundante que foi purificada a partir de tecidos do endosperma contidos no grão de café, extraídos de uma cultivar da Colômbia (*C. arabica*) (Acuña et al., 1999). Esta proteína é formada por duas subunidades, contendo 33KDa na parte ácida e 24KDa na subunidade básica. O conjunto dessas proteínas, dentre outras menos abundantes, é a principal fonte de peptídeos e aminoácidos, gerados durante a torrefação do café.

Acredita-se que muitos desses constituintes influenciam diretamente nas características organolépticas apresentadas pela bebida. Entretanto, pouco se conhece a respeito de quais moléculas estariam desempenhando tais funções, principalmente, no que diz respeito a proteínas e peptídeos encontrados no endosperma da semente do café, uma vez que a maioria dos estudos relacionados focam moléculas não proteicas e compostos secundários (Giorgini e Campos, 1992; Marraccini et al., 2001; Marraccini et al., 2005; Shimizu e Mazzafera, 2000).

Em uma revisão elaborada por Phillips e Guang (2009), é mostrado que existe um grande número de derivados de plantas e alimentos, os quais apresentam peptídeos inibidores da enzima conversora de Angiotensina I, que são, em sua maioria, sequências peptídicas curtas e não interagem com peptídeos maiores.

Yang e colaboradores (2001) descreveram dois peptídeos caracterizados após a digestão enzimática da proteína D-ribulose-1,5-bifosfato carboxilase/oxigenase (Rubisco), isolada de espinafre. Quando uma solução contendo os peptídeos foi aplicada, via oral, em ratos, as rubiscolinas presentes desencadearam um efeito antinociceptivo. Dessa maneira, seria natural supor que peptídeos opioides podem surgir na bebida do café por meio do processamento que o grão sofre até se transformar em bebida. Tais peptídeos seriam fragmentos de proteínas maiores, os quais atuariam no sistema nervoso central daqueles que consomem tal bebida, ativando receptores específicos no cérebro e podendo promover as sensações características que a bebida oferece.

É conhecido que as dehidrininas, pertencentes ao grupo II das proteínas LEA (Close, 1997), fazem parte das proteínas vegetais mais abundantes produzidas durante a embriogênese tardia, assim como em resposta aos estresses abióticos (Close, 1996). Tais

moléculas são distinguidas pela presença de uma ou mais regiões de resíduos de aminoácidos consenso (motivo) altamente conservados, ricos em resíduos de lisina e denominados segmentos K, os quais, especula-se que, poderiam formar α -hélices anfífilas (Dure, 1993; Close, 1996). Existem isoformas da dehidrina CcDH1a, CcDH1b (Hinninger et al., 2006), CaDHN1a, CaDHN1b e CrDHN1 que foram apresentadas por Santos e Mazzafera (2012) e nelas é notada a presença de peptídeos (Figura 1) com possível atividade similar a de opiáceos (que atuam nos receptores opióides neuronais e podem ser usados no tratamento de dores crônicas).

```

ABC55670.1|CcDH1a| MAQYGABYGNQKSQYDEYGNPVRQTDEYGNPARHGCTMGDYGTTGTTGA 49
JP709195.1|CaDHN1a|MAQYGABYGNQKSQYDEYGNPVRQTDEYGNPARHGCTMGDYGTTGTTGA 49
JP709197.1|CrDHN1| MAQYGABYGNQKSQYDEYGNPVRQTDEYGNPARHGCTMGDYGTTGTTGA 49
ABC55671.1|CcDH1b| MAQYGABYGNQKSQYDEYGNPVRQTDEYGNPARHGCTMGDYGTTGTTGA 49
JP709196.1|CaDHN1b|MAQYGABYGNQKSQYDEYGNPVRQTDEYGNPARHGCTMGDYGTTGTTGA 49
ABC55672.1|CcDH2a| M&DLRDEYGNPQLTDQYGNPVQLKDEYGNPQLSGVA---ITAGTASA 46
**: **** . *:*****: .***** : .* **:*.*

ABC55670.1|CcDH1a| YGCTTG---AHGTYATGTTGTTGTCAYATQPCTDVCKEHHGLGCM LHRSC 96
JP709195.1|CaDHN1a|YGCTTG---AHGTYATGTTGTTGTCAYATQPCTDVCKEHHGLGCM LHRSC 96
JP709197.1|CrDHN1| YGCTTG---AHGTYATGTTGTTGTCAYATQPCTDVCKEHRGLGCM LHRSC 96
ABC55671.1|CcDH1b| YGCTTG---AHGTYATGTTGTTGTCAYATQPCTDVCKEHRGLGCM LHRSC 99
JP709196.1|CaDHN1b|YGCTAG---AHGTYATGTTGTTGTCAYATQPCTDVCKEHHGLGCM LHRSC 96
ABC55672.1|CcDH2a| V-HSTG-----TGPTAATGTQQHQEQ-----LHRSS 71
::* **.*:*** : * ****.*

ABC55670.1|CcDH1a| SCSSSSSEDDGQGGRRRK-CMKERIKKELPGG-----HKEAQPQGEY 137
JP709195.1|CaDHN1a|SCSSSSSEDDGCHGRRRK-CMKERIKKELPGG-----HKEAQPQGEY 137
JP709197.1|CrDHN1| SCSSSSSEDDGQGGRRRK-CMKERIKKELPGG-----HKEAQPQGEY 137
ABC55671.1|CcDH1b| SCSSSSSEDDGQGGRRRK-CMKERIKKELPGG-----HKEAQPQGEY 140
JP709196.1|CaDHN1b|SCSSSSSEDDGQGGRRRK-CMKERIKKELPGG-----HKEAQPQGEY 137
ABC55672.1|CcDH2a| SSSSGSSEDDGQGGRRRKLKELKELKELTGRHKDRDDQEHIDDQHAHSA 122
*.*.*****:***** *:*****.* ** * : : .

ABC55670.1|CcDH1a| SSATAAPGYGGE---GVQHEKKGIMDKIKEKLPGGHNN- 172
JP709195.1|CaDHN1a|SSATAAPGYGGE---GEQHEKKGIMDKIKEKLPGGHNN- 172
JP709197.1|CrDHN1| SSATAAPGYGGE---GEQHEKKGIMDKIKEKLPGGHNN- 172
ABC55671.1|CcDH1b| SSATAAPGYGGE---GEQHEKKGIMDKIKEKLPGGHNN- 175
JP709196.1|CaDHN1b|SSATAAPGYGGE---GEQHEKKGIMDKIKEKLPGGHNN- 172
ABC55672.1|CcDH2a| SPPTTTTSGCTSTTVGGQQHEKKSMEKIMEKLPGGHNDTR 162
*.*:.* * . * *****:.* ** ** * .

```

Figura 1: Alinhamento de dehidrininas de café. Regiões delimitadas por retângulos são peptídeos com possível atividade opioide. Números de acesso: *coffee dehydrin* CcDH1a (ABC55670); *coffee dehydrin* CcDH1b (ABC55671); *coffee dehydrin* CcDH2a (ABC55672); *coffee dehydrin* CaDHN1a (JP709195); *coffee dehydrin* CaDHN1b (JP709196); e *coffee dehydrin* CrDHN1 (JP709197). Figura adaptada de Santos e Mazzafera, 2012.

Café com opiáceos e nutracêuticos

Em um trabalho realizado utilizando cérebro de ratos, Boublik e colaboradores (1983) relataram que componentes presentes nos pós de café instantâneo estariam competindo com a naloxona pela ligação a receptores opiáceos. A atividade de ligação ao receptor se assemelha à observada com antagonistas de opiáceos. Boublik et al. concluíram que estes dados sugerem que o consumo de café pode ser seguido por efeitos mediados via receptores de opiáceos, bem como os efeitos da cafeína.

Os peptídeos opioides são formados a partir de proteínas precursoras, ou pró-hormônios, os quais sofrem modificações pós-traducionais que levam à formação dos peptídeos com atividades biológicas características. Esses peptídeos podem ser classificados a partir da análise da região N-terminal. Existem três tipos de classificação: i) as terminações do tipo YGG representam encefalinas e dinorfinas, ii) quando do tipo YP são denominadas casomorfina (Brantl et al., 1979), morficeptinas (Chang et al., 1981), hemorfinas (Brantl et al., 1986), endomorfina (Zadina et al., 1997), e ainda iii) do tipo Y-D-isômero (Tyr-D-Ala ou Tyr-D-Met), relatadas como deltorfina (Erspamer et al., 1989; Kreil et al., 1989). Na Figura 2, pode-se visualizar as terminações YGG na região N-Terminal dos peptídeos.

```

ABC55670.1|CcDH1a| 50 YGGITG---AHGTY 60 ..... 146 YGGEVQ 152
JP709195.1|CaDHN1a|50 YGGITG---AHGTY 60 ..... 146 YGGEVQ 152
JP709197.1|CrDHN1| 50 YGGITG---AHGTY 60 ..... 146 YGGEVQ 152
ABC55671.1|CcDH1b| 50 YGGITGTAHAHGTY 63 ..... 149 YGGEVQ 155
JP709196.1|CaDHN1b|50 YGGTAG---AHGTY 60 ..... 146 YGGEVQ 152
          ****:*      *****          ***** *
  
```

Figura 2: Alinhamento dos peptídeos encontrados nas sequências das desidrininas. Em cinza, a porção conservada do N-terminal com YGG. As outras cores indicam diferenças entre os aminoácidos ou mutações na estrutura primária dos peptídeos.

Estudos sobre a atividade opioide têm contribuído para o aumento do número de peptídeos conhecidos pertencentes às famílias de opioides, bem como subsequente conhecimento de suas localizações e de seus papéis na modulação do processo nociceptivo (Millan, 2002). Entre os peptídeos opioides, podemos citar encefalinas, endomorfina, β -endorfinas, melanocortinas, nociceptina e nocistatina. As encefalinas medeiam suas ações na PAG e na amígdala via receptor δ , nas dinorfinas via receptor κ e nas β -endorfinas via receptor μ , evidenciando que o mecanismo de ação destes peptídeos ocorre via VDI (via descendente inibitória) (Fürst, 1999).

A encefalina é um peptídeo endógeno com ação agonista em receptores μ e δ opioides e se encontra em abundância nos neurônios da região periaquedutal cinza (mesencéfalo) e substância gelatinosa (medula espinhal) (Rang e Dale, 2011). As encefalinas são encontradas em altas concentrações nos tecidos endócrinos e cerebrais (Hughes et al., 1975). Em humanos, as encefalinas maduras resultam do processamento enzimático de um precursor que contém cópias de Met-encefalina e Leu-encefalina (Comb et al., 1982; Noda et al., 1982). A produção dos peptídeos bioativos a partir do processamento de proteínas mais longas pode ser por processamento endógeno enzimático ou mesmo por processos exógenos (Gutstein e Huda, 2006).

Os receptores opioides estão envolvidos na modulação de diversos mecanismos fisiológicos, que incluem: a antinocicepção, o humor do indivíduo, a regulação do sistema endócrino e as funções cognitivas. Esses receptores estão distribuídos no sistema nervoso central (SNC) e no trato gastrointestinal humano. Alguns neuropeptídeos (peptídeos opioides endógenos que atuam no SNC), como a β -endorfina, estão presentes no sistema límbico, a qual atua no controle da ansiedade e da depressão (Barfield et al., 2013; Holzer, 2009; Vieira e Zarate Jr., 2011).

Os opiáceos produzidos para inibir a dor são amplamente difundidos. Existem estudos que associam o componente opioide aos resíduos de aminoácidos que são liberados após uma clivagem enzimática. Fisher e colaboradores (2012) apresentaram um fármaco com uma porção de pró-fármaco da molécula que diminui a afinidade da molécula no receptor opioide, bem como a permeabilidade da molécula ao entrar no sistema nervoso central, resultando em efeitos opioides mínimos. O pró-fármaco permanece intacto quando o composto é administrado. Esses opioides BIO-MD são ativados como sistemas de entrega moleculares. Quando administrados por via oral, são submetidos à atividade enzimática da tripsina presente no trato gastrointestinal provocando a liberação da porção de aminoácidos da pró-droga e iniciando, assim, o processo de liberação do fármaco opioide (Figura 3). O perfil farmacocinético é controlado por uma reação subsequente dentro da própria molécula que libera o opiáceo livre.

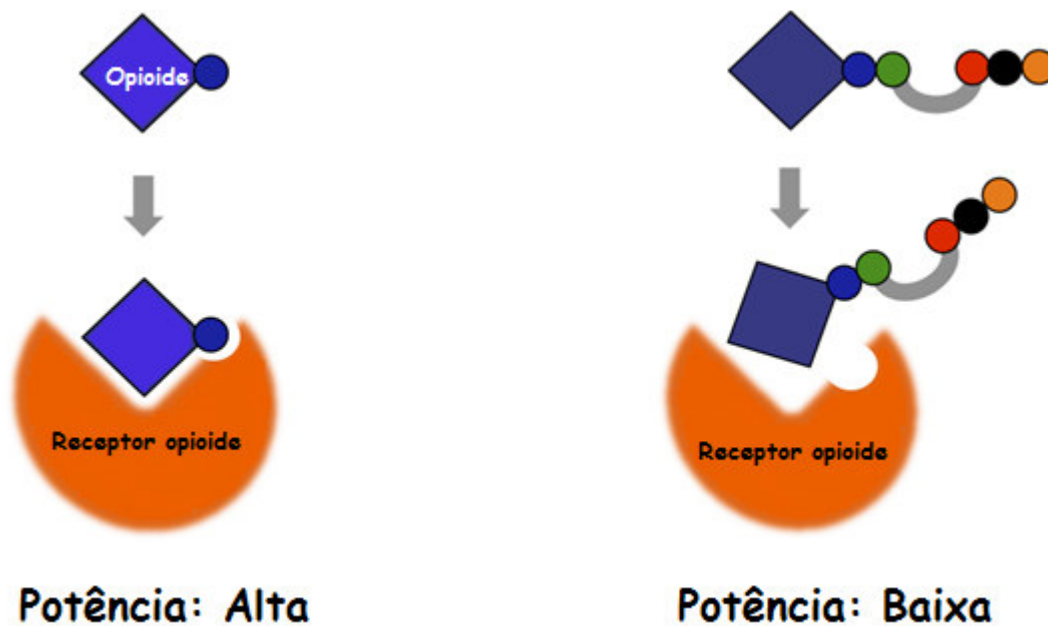


Figura 3: Receptores opioides sendo ativados por moléculas opioides, modificado de Fisher e colaboradores (2012).

Além do sistema límbico, alguns peptídeos opioides modulam os processos de neurotransmissão nas vias serotoninérgicas, dopaminérgicas, noradrenérgicas, que regulam fisiopatologias de desordens depressivas (Fichna et al., 2007). Dentre esses, a neurotransmissão de serotonina participa da regulação do estresse, do humor e do controle do apetite. A síntese de serotonina depende da concentração de seu aminoácido precursor que é o triptofano obtido por meio da ingestão de proteínas. A elevação dos níveis de serotonina promove melhora no humor e diminui a vontade de comer. (Peuhkuri et al., 2011).

Essas vias neurotransmissoras são consideradas alvos terapêuticos promissores para o tratamento de desordens associadas ao humor e os peptídeos opioides apresentam o potencial de agente terapêutico para o desenvolvimento de novos fármacos antidepressivos (Fichna et al., 2007).

Alguns dos peptídeos bioativos estão encriptados em proteínas de origem animal e vegetal podendo ser encontrados por meio de um *screening* em um banco de dados utilizando parâmetros pré-definidos (Brand et al., 2012). Uma das formas de se obter peptídeos bioativos é por meio da ingestão de alimentos que contenham proteínas precursoras e que sofram proteólise por enzimas digestivas. As principais enzimas presentes no trato gastrointestinal que realizam proteólise são a pepsina, no estômago, e as tripsina e quimotripsina, no intestino delgado; outras enzimas também participam da clivagem proteica. (Hartmann e Meisel 2007; Korhonen, 2009).

Os alimentos de origem animal que contêm peptídeos bioativos são: leite e seus derivados, carne, peixe, e de origem vegetal: soja, trigo. Um dos alimentos que ganha destaque nesse aspecto, por produzir peptídeos com múltiplas atividades, é o leite. A hidrólise de proteínas do leite por enzimas digestivas libera peptídeos bioativos os quais podem apresentar atividade opioide, hipotensora, antibacteriana. Esses peptídeos são oriundos principalmente das proteínas caseínas (α , β , κ), α -lactoalbumina, β -lactoglobulina e glicomacropeptídeo (Hartmann e Meisel, 2007; Korhonen, 2009; Meisel, 2005).

Os peptídeos bioativos além de contribuírem para o valor nutricional do alimento, também exercem seu efeito fisiológico. De forma resumida, após a ingestão de proteínas do leite, ocorre a absorção no trato gastrointestinal, onde enzimas promovem a hidrólise de proteínas precursoras, liberando os peptídeos com atividade biológica. No caso dos peptídeos opioides, estes são absorvidos pela corrente sanguínea e muitos podem atravessar a barreira hematoencefálica provocando respostas farmacológicas semelhantes à da morfina. As principais respostas são em relação ao bloqueio do estímulo da dor, a antinocicepção, efeitos no controle do humor e controle da saciedade (Peuhkuri et al., 2011; Wada e Lonnerdala, 2014).

Diversos estudos mostram que, dentre os macronutrientes presentes nos alimentos e utilizados como fonte de energia, as proteínas promovem maior saciedade do que os carboidratos e as gorduras (Van Kleeff et al., 2012).

Os mecanismos atribuídos à sensação de saciedade de proteínas e peptídeos incluem: **1-** a secreção de hormônios intestinais, anorexígenos que favorecem a diminuição de ingestão alimentar, como CCK (colecistoquinina) e GLP-1 (peptídeo semelhante ao glucagon) ou diminuem a secreção de hormônios intestinais orexígenos, que aumentam a ingestão alimentar, como a grelina. **2-** o aumento de energia para digerir proteínas quando comparado com carboidratos e gorduras. **3-** a alta concentração de aminoácidos no plasma. **4-** os peptídeos que são semelhantes aos neuropeptídeos e neurotransmissores que induzem saciedade via mecanismo central (Foltz et al., 2008; Nishi et al., 2003; Duraffourd et al., 2012).

OBJETIVOS

Objetivo geral

O presente estudo tem como objetivo encontrar peptídeos com atividade opioide no endosperma de café, sintetizar quimicamente tais peptídeos e determinar sua provável função biológica.

Objetivos específicos

Estudar a composição química de *Coffea arabica*, visando identificar os precursores de qualidade da bebida do café que estejam associados a proteínas que possuem possíveis sequências de peptídeos opioides como parte de suas estruturas primárias, os quais são encontrados no café verde e poderiam ser encontrados na bebida (após a torra do café).

Sintetizar os peptídeos com estrutura de opiáceos, purificá-los e avaliar a atividade de tais peptídeos em modelos, *in vivo*, que permitam determinar suas prováveis funções.

JUSTIFICATIVA

O café é uma das bebidas mais consumidas no mundo e também uma das maiores *commodities*. Grande parte devido ao fato de a cafeína ser a droga mais popular do mundo (droga lícita) (Weinberg e Bealer, 2001; Courtwright, 2001). O status do café se deve tanto à sua função social, virtuosa e/ou perniciosa, como aos seus efeitos farmacológicos. Em 1983, Boublik e colaboradores relataram que componentes dos pós de café estariam competindo com a naloxona pela ligação a receptores opiáceos nos ensaios com membranas de cérebro de rato, sem diferença significativa entre o café normal e o descafeinado. A atividade de ligação ao receptor se assemelha à observada com antagonistas de opiáceos. Uma caracterização preliminar revela que as possíveis moléculas têm um peso molecular (PM) na gama de 1.000 a 3.500 Da. Boublik e colaboradores relataram ainda que estes dados sugerem que o consumo de café pode ser seguido por efeitos mediados via receptores de opiáceos, bem como os efeitos da cafeína.

Em estudos preliminares, análises *in silico* na base de dados do Projeto Genoma Café auxiliaram na identificação de genes candidatos para a tolerância à seca. De acordo com Vinecky e colaboradores (2005), após a realização de uma análise por *tBlastn* na Base de Dados do Genoma Café, utilizando-se um conjunto de sequências proteicas já caracterizadas como envolvidas na resposta aos estresses abióticos, foi possível a identificação de inúmeros ESTs presentes no conjunto Unigene-CAFEST, apresentando alta similaridade de sequências. Em 2009, Vinecky apresentou em seus resultados a presença de vários genes responsivos à seca quando a planta de café é submetida ao estresse hídrico. Dentre os genes avaliados, está presente a Dehidrina, que foi encontrada em bibliotecas de cDNA de folha e de fruto também. Nas análises de NIRS realizadas em parceria Embrapa/CIRAD, foi possível verificar que cafeeiros submetidos ao estresse hídrico produziram grãos que continham teores dos componentes principais desejáveis em bebidas de melhor qualidade (Vinecky et al., 2010).

O efeito fisiológico do café em humanos varia de pessoa para pessoa e depende da qualidade e da quantidade de café ingerido. O café é considerado uma das mais ricas fontes de compostos fenólicos da dieta ocidental; o composto fenólico mais abundante está contido nos ácidos clorogênicos, correspondendo a 12% da matéria seca do grão de café (Ky et al., 2001; Clifford, 1999). Estes ácidos apresentam um grande número de funções biológicas, incluindo anticarcinogênica e anti-inflamatória, isso devido à potencial atividade antioxidante (Murthy e Naidu, 2012; Ramalakshmi et al., 2009). Dessa forma, os ácidos clorogênicos

oferecem inúmeros benefícios para saúde e ainda são considerados um componente promissor para o uso em diversos tipos de terapia (Shan et al., 2009; Farah e Donangelo, 2006).

Com dados apresentados pela Sociedade Brasileira Para o Estudo da Dor (SBED), estima-se que cerca de 30% das pessoas no Brasil sofram com dor crônica (SBED, 2000). A prevalência de dor crônica nos Estados Unidos é de 78 milhões e na Europa, chega a 75 milhões de pessoas, dados que refletem a preocupação mundial em terapias que auxiliem o tratamento da dor (Hanlon et al., 2011).

A morfina é o principal alcalóide isolado da papoula, *Papaver somniferum*, e é utilizada como droga no tratamento da dor por causa das propriedades analgésicas que apresenta (Law e Loh, 2004). Devido aos principais efeitos indesejáveis que a morfina pode provocar, tais como a diminuição da motilidade gastrointestinal, a depressão respiratória e a resistência, existe o interesse no estudo de novos compostos opioides que possam interagir com alvos específicos, produzindo poucos efeitos indesejáveis, baixo risco de resistência e com potência elevada (Goldberg, 2010; Gorzo et al., 2010).

Conforme mencionado anteriormente, alguns dos peptídeos bioativos estão encriptados em proteínas de origem animal e vegetal podendo ser encontrados por meio de um *screening* em um banco de dados utilizando parâmetros pré-definidos (Brand et al., 2012). Uma das formas de se obter peptídeos bioativos é por meio da ingestão de alimentos que contenham proteínas precursoras e que sofram proteólise por enzimas digestivas.

Dessa forma, com o auxílio de trabalhos prévios associados ao conhecimento disponível na literatura acerca de domínios proteicos específicos ou alvos moleculares (por exemplo, receptores, enzimas), alguns peptídeos foram caracterizados a partir de análises *in silico* e experimentos que envolveram a extração de proteínas do endosperma de café, a digestão enzimática, a purificação de peptídeos e a subsequente análise em espectrômetro de massa. O método utilizado na extração proteica possibilitou o isolamento de proteínas com diferentes massas moleculares, ao passo que a digestão enzimática dessas proteínas resultou na presença de diversas frações cromatográficas observadas na etapa de fracionamento. Uma busca realizada no banco de dados do genoma do café sugere que, dentre os peptídeos caracterizados, estão aqueles que são fragmentos de proteínas pertencentes à família das dehidrinas. Dentre estes, diversos peptídeos também apresentam na sua estrutura primária as características relacionadas àqueles da classe dos opioides, as terminações do tipo YGG (representados pelas encefalinas - Rang e Dale,

2012). Tais peptídeos foram, então, sintetizados quimicamente e tiveram sua atividade comprovada por meio de testes antinociceptivos em camundongos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Material vegetal

O material vegetal (*C. arabica* cv. Acauã) é proveniente de uma fazenda de produção de café, localizada na região de Planaltina – DF. O campo de produção é irrigado por meio de pivô central. Os frutos foram colhidos com aproximadamente 250 dias após o florescimento, na maturidade que corresponde a frutos maduros, com pericarpo vermelho chegando ao roxo e contendo o endosperma duro e branco. A colheita foi realizada no ano de 2010 e, após despulpamento por via úmida, os frutos foram secos ao sol.

Extração de proteínas

A extração proteica foi realizada a partir dos grãos de café verde e torrado, mediante extração ácida e precipitação com sulfato de amônio a 60%. O material precipitado foi dialisado contra água Milli-Q® utilizando membrana de diálise com poros de 7,5µm e submetido à liofilização sob vácuo para secagem do material.

Foram pulverizados 250 gramas de grãos de café verde (grãos de café antes da torra) utilizando nitrogênio líquido para o resfriamento. Em um béquer, foram adicionados três litros de tampão de extração a 0,1M HCl e 0,1M NaCl e o pó de café obtido da pulverização. Essa solução foi submetida à agitação a 4°C por 12 horas com posterior filtração em panos estéreis, com o auxílio de uma bomba de vácuo. A solução filtrada foi distribuída em tubos falcon de 50 mL e centrifugados a 10.000g por 20 minutos a 4°C. Após a centrifugação, o pélete foi descartado, o sobrenadante (resgatado em um béquer) teve o pH corrigido para 7 e ficou em repouso a 4°C por uma hora. A solução foi redistribuída nos tubos falcon que foram centrifugados novamente a 10.000g por 20 minutos a 4°C. O pélete foi descartado novamente e a fase líquida, transferida para outro béquer, foi submetida à precipitação do material proteico presente utilizando sulfato de amônio a 60% (884g de sulfato de amônio em 1334 mL de solução) e a solução final ficou na concentração de 5M. O material foi precipitado por 12 horas a 4°C sem agitação. O volume total foi redistribuído nos

tubos falcon e centrifugados a 10.000g por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o pélete contendo o material proteico foi ressuspendido em 10 mL de água Milli-Q®. Para eliminar o sal, o material proteico foi dialisado contra água destilada a 4°C sob agitação em câmara fria por 48 horas; a água foi trocada a cada 12 horas. A solução dialisada foi congelada em nitrogênio líquido e submetida à liofilização para secagem do material proteico.

Verificação de proteínas em Minigel de Poliacrilamida

Uma parte do material proteico foi destinada à verificação da presença de proteínas em Minigel de Poliacrilamida. A quantificação foi feita utilizando o método de Bradford (1976). Em um primeiro gel foram utilizados 60µg de proteína, porém não foi possível visualizar com nitidez, pois, devido à grande quantidade de proteína, formou-se um borrão no gel. Em outro Minigel foram aliquoteados 1µg, 2µg e 4µg onde foi possível visualizar as bandas no gel.

Foi preparado um tampão (*Thiourea rehydratation*) com ureia 7M, Thioures 2M, Chaps 2%, IPG Buffer 0,5%, Bromofenol blue 0,02% em água, que foi usado para ressuspender o pélete contendo as proteínas.

O Minigel de poliacrilamida foi preparado com acrilamida 50%, Tris-HCl pH8,8, água destilada, SDS 10%, Temed (6 µL), persulfato 10% e ao final foi adicionado butanol (0,5 mL) para a retirada das bolhas. Para o empacotamento do gel foi utilizada a solução contendo acrilamida 50%, Tris-HCl pH6,8 (159 µL), água destilada (1,61 mL), SDS 10%, Temed (2 µL) e persulfato 10%. Após colocar o gel no sistema de Minigel e esperar empacotar, as amostras foram aplicadas nas quantidades de 1 µg, 2 µg e 4 µg de extrato proteico bruto e o sistema foi submetido inicialmente a 80 Volts e posterior aumento para 130 Volts por 2 horas.

A coloração do gel foi realizada em 100 mL de solução de *Comassie Blue*. Foram misturados: água destilada, sulfato de amônia e *Comassie G250*. A solução, então, foi completada para 80 mL, e, posteriormente, foi adicionado metanol e ácido fosfórico 1M. A solução de *Comassie Blue* foi colocada junto com o gel em um recipiente e ficou sob agitação por 24 horas. Após coloração, o Minigel foi submetido a 3 lavagens em água, cada uma com duração de 20 segundos.

Digestão enzimática

A digestão enzimática das proteínas foi feita utilizando parte do material proteico que foi solubilizado e submetido à digestão com pepsina imobilizada em gel (Pierce), por um período de 4 horas a 37°C sob agitação. A digestão enzimática de proteínas foi realizada tanto em amostras “nativas”, quanto em amostras previamente reduzidas (com a utilização de DTT 50 mM) e/ou alquiladas (utilizando solução de Iodocetamida 50 mM).

Para a digestão enzimática com pepsina foi preparado um tampão de digestão de acetato de sódio trihidratado 20 mM em pH4,5 em água Milli-Q® e armazenado a 4°C. Para a lavagem e ativação da enzima, em um tubo falcon de 15 mL foram alicotados 250 µL da enzima imobilizada e 4 mL do tampão de digestão, após agitar e centrifugar a 1000g/5min o sobrenadante foi descartado (processo realizado duas vezes). Ao gel contendo a pepsina presente no fundo do tubo, foram adicionados mais 500 µL do tampão de digestão. Em um microtubo de 1,5 mL foram adicionados 10 mg do extrato proteico liofilizado, 1 mL do tampão de digestão (para eluir as proteínas) e 500 µL da enzima lavada. O microtubo foi incubado a 37°C por 4 horas sob agitação. Após a digestão, o microtubo foi centrifugado a 1000g/5min e o sobrenadante, contendo o material digerido, foi transferido para outro microtubo.

Fracionamento/purificação de Peptídeos

O fracionamento do extrato proteico digerido com pepsina foi realizado por meio da técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, HPLC (CLASS VP-10AT, Shimadzu, Japão), utilizando uma coluna semi-preparativa, em fase reversa (C₁₈, 10mm x 250mm, modelo 218TP510, Grace Vydac, Estados Unidos) e também uma coluna analítica, em fase reversa (C₈, 4,6mm x 250mm, modelo 208TP54, Grace Vydac, Estados Unidos). Para cada separação cromatográfica, foram injetados aproximadamente 0,2 mg de extrato proteico digerido com pepsina imobilizada (filtrado em filtro de 22µm) em 200 µL. As fases móveis utilizadas foram as seguintes: a fase móvel A, 0,1% em volume TFA/H₂O e a fase móvel B, 0,1% TFA/ACN em volume. O método utilizado foi por incrementos da solução B de 5% a 70% durante 60 min, em gradiente linear com um fluxo de 2,5 mL.min⁻¹ para C₁₈ (semi-preparativa) e 1 mL.min⁻¹ para C₈ (analítica) à temperatura ambiente. Os peptídeos foram

detectados nos comprimentos de onda de 216 nm e 280 nm. As frações foram coletadas manualmente.

A purificação dos peptídeos sintéticos foi realizada por meio da técnica de cromatografia líquida de alta eficiência, HPLC (*LC-10AT VP, Shimadzu, Japão*), utilizando uma coluna semi-preparativa, em fase reversa (C_{18} , 10mm x 250 mm, *modelo 218TP510, Grace Vydac, Estados Unidos*). Para cada separação cromatográfica, foram pesados aproximadamente 2 mg de peptídeo sintético bruto que foram diluídos em 2 mL de água Milli-Q®. Em seguida, a solução foi centrifugada por 15 min a 21.400g. As fases móveis utilizadas foram as seguintes: a fase móvel A, 0,1% TFA/H₂O em volume e a fase móvel B, 0,1% TFA/ACN em volume. As amostras foram injetadas com volume de 500 µL por cromatografia e, em seguida, eluídas por incrementos da solução B de 5% a 95% durante 60 min, em gradiente linear com um fluxo de 2,5 mL/min, à temperatura ambiente. Os peptídeos foram detectados nos comprimentos de onda de 216 nm e 280 nm. As frações foram coletadas manualmente.

Sequenciamento dos Peptídeos

Para análise por MALDI-TOF a preparação das amostras iniciou com uma alíquota da fração diluída em 100 µL de água Milli-Q® e homogeneizada. As amostras foram preparadas em uma proporção de 1:3 (v:v) em uma matriz de ácido alfa-ciano-4 hidroxicinâmico (5 mg) dissolvido em 200 µL de água Milli-Q®, 250 µL de ACN e 50 µL de solução aquosa de TFA a 3%. A placa de MALDI utilizada (*Bruker Daltonics, Alemanha*) foi do tipo maciça e polida, previamente lavada com água e metanol. Na placa foram aplicadas a solução calibrante e as amostras em triplicatas, para análise no método refletido positivo. Após concluir a aplicação de todas as amostras na placa, esperou-se cristalizar para o procedimento de análise e obtenção dos espectros (MALDI-TOF - *Ultraflex III, Bruker Daltonics, Alemanha*).

Para análise por ESI, a amostra foi preparada a partir de uma pequena quantidade do peptídeo seco que foi solubilizada em uma solução contendo acetonitrila, água Milli-Q® 1:1 (v:v) e 1% de ácido fórmico. Em seguida, o equipamento foi calibrado utilizando uma solução de calibrante externo *ESI-Tuning Mix (Agilent Technologies, Estados Unidos)* e a amostra foi analisada com uma pressão no capilar de 4,5kV e a varredura de massa foi de

m/z de 50 até 3000 no equipamento ESI-Q-TOF/MS (*microtof-Q II, Bruker Daltonics, Alemanha*).

A identidade dos peptídeos também foi verificada por meio de fragmentação do íon precursor para a obtenção dos espectros de MS/MS, no mesmo instrumento. A interpretação dos espectros foi realizada em modo manual com o auxílio do programa computacional *Compass Data Analysis (Bruker Daltonics, Alemanha)*.

Síntese manual de Peptídeos

Os peptídeos listados na tabela 1 foram sintetizados por meio de síntese química em fase sólida, utilizando a estratégia Fmoc. As resinas com o *linker* escolhido foram a F-moc-AA*(Trt) – *Wang Resin, (Peptides international, Kentucky, Estados Unidos)* (*-A denominação AA significa aminoácido, que foi diferente dependendo do resíduo presente na região C-terminal do peptídeo – H,Q,T,Y, A ou L).

Tabela 1: Nome, sequência, massa teórica e o número de acesso no NCBI dos peptídeos sintetizados e testados em animais.

Nome do Peptídeo	Sequência do Peptídeo	Massa do Peptídeo + H⁺	Número de acesso
PSLEM 11042	YGGTGAH-COOH	662,289 Da	-
PSLEM 11043	YGGEGVQ-COOH	709,315 Da	ABC55670.1
PSLEM 11044	YGGTTGT-COOH	656,289 Da	ABC55671.1
PSLEM 11045	YGGEGEQ-COOH	739,289 Da	JP709195.1
PSLEM 12013	YGGTAGAHGTY-COOH	1054,459 Da	JP709196.1
PSLEM 12027	YGGTAGA-COOH	596,268 Da	JP709196.1
PSLEM 12028	YGGTTGA-COOH	626,728 Da	JP709197.1
Leu-encefalina	YGGFL-COOH	556,277 Da	B61445

O grau de substituição das resinas está descrito na Tabela 2; a escala de síntese utilizada foi de 0,15 mM que é equivalente a quantidade de cada resina listada na Tabela 2. A síntese foi conduzida dentro de um dosador oral de 5 mL com filtro de polipropileno.

Tabela 2: Grau de substituição das resinas e as respectivas quantidades utilizadas na síntese dos peptídeos.

Peptídeo	Grau de substituição da resina	Quantidade de resina
PSLEM 11042	0,42mM/g	357,14mg
PSLEM 11043	0,50mM/g	300,00mg
PSLEM 11044	0,88mM/g	170,45mg
PSLEM 11045	0,50mM/g	300,00mg
PSLEM 12013	0,44mM/g	340,91mg
PSLEM 12027	0,62mM/g	241,94mg
PSLEM 12028	0,62mM/g	241,94mg
Leu-encefalina	0,33mM/g	454,54mg

Iniciou-se a síntese com a reação de acoplamento do penúltimo aminoácido (o último aminoácido presente no C-terminal do peptídeo já vem acoplado na resina). Primeiramente, foi feita a lavagem da resina com isopropanol e N,N-dimetilformamida (DMF) em um dosador oral, em seguida foi feita a desproteção do grupamento Fmoc (desprotegendo a porção N-terminal) utilizando uma solução de 4-metilpiperidina (Hachmann e Lebl, 2005) a 25% (v:v) em DMF durante duas etapas de 15 minutos, à temperatura ambiente, sob agitação. As duas reações (desproteção do grupamento Fmoc amino-terminal e ativação do grupo carboxila do Fmoc-aminoácido para a formação da ligação peptídica), e, então, utilizou-se 0,8 mM de derivado de aminoácido (Fmoc-AA-OH) com excesso molar de 4 vezes, o composto carboxilatetrafluoroborato de [benzotriazol-1-iloxi(dimetilamino) metilideno]-dimetilazânio (TBTU) foi adicionado na quantidade equimolar ao derivado de aminoácido a ser ativado, e o *N,N*-Diisopropylethylamine, DIPEA, na quantidade 255 μ L (1,5 mM) para desprotonar o grupo ácido carboxílico. A reação foi conduzida em DMF, 3,0 mL como solvente (Chan e White, 2000). Os acoplamentos foram conduzidos por 90 min, à temperatura ambiente, sob agitação.

Em seguida, foi feita a desproteção do grupamento Fmoc (desprotegendo a porção N-terminal) utilizando uma solução de 4-metilpiperidina (Hachmann e Lebl, 2005) a 25% (v:v) em DMF durante duas etapas de 15 minutos, à temperatura ambiente, sob agitação. As duas reações foram repetidas sucessivamente até a adição do último derivado de aminoácido e a última desproteção do grupamento Fmoc ligado ao grupo N-terminal de toda a cadeia peptídica. Entre uma reação de acoplamento e a reação de desproteção, foram feitas oito lavagens alternadas da resina com 2-propanol e DMF. Fez-se uma última lavagem com diclorometano (DCM), seguida de filtração a vácuo. (Chan e White, 2000).

Após terminar uma reação de desproteção ou acoplamento, foi conduzido o teste da Ninhidrina ou Kaiser (Chan e White, 2000). Caso não tenha ocorrido o acoplamento ou a desproteção, repetiu-se a respectiva reação. A etapa final do processo de síntese consistiu

na desproteção de todos os grupos protetores das cadeias laterais e da clivagem para a produção do peptídeo bruto que foi posteriormente clivado, purificado e caracterizado quimicamente.

A clivagem do resíduo C-terminal do peptídeo com a resina foi conduzida na presença de ácido trifluoroacético, TFA e reagentes nucleófilos (Howl, 2005), seguindo quantidades estabelecidas no protocolo da Novabiochem[®], 9,5 mL de ácido trifluoroacético (TFA), 250 µL de água e 250 µL de TIS para um volume final de 10 mL (Novabiochem, 2007). Os reagentes permaneceram sob constante agitação por 1 hora e 30 minutos, à temperatura ambiente, dentro de um tubo falcon (50 mL). Decorrido esse tempo, utilizou-se nitrogênio gasoso para a retirada completa do TFA e, em seguida, foram feitas precipitações com éter diisopropílico resfriado em nitrogênio líquido. O peptídeo foi separado da resina devido às lavagens com água:acetonitrila (1:1; v:v), por meio de filtração em funil de placa porosa. Terminada a filtração, transferiu-se o líquido que contém o peptídeo para tubos falcon e, após congelamento em nitrogênio líquido, foram liofilizados durante aproximadamente 72h. Para as lavagens foi necessário o uso do funil de placa porosa, bomba de vácuo e capela de exaustão.

Testes de antinociceção

Os ensaios biológicos *in vivo* para a determinação da atividade antinociceptiva foram realizados no Laboratório de Toxinologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, UnB. Os procedimentos foram realizados de acordo com o COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal) e foram submetidos ao comitê de ética da UnB juntamente com outros projetos que envolvem análises farmacológicas do Laboratório de Espectrometria de Massa (LEM) da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. A certificação do comitê de ética N^o 131758/2012 está em anexo.

Os animais utilizados foram camundongos *Mus musculus* da linhagem/raça Swiss, fêmeas, pesando entre 20-25 g, adquiridos do biotério do Laboratório de Toxinologia do Instituto de Biologia da Universidade de Brasília. Os animais experimentais permaneceram acondicionados em gaiolas e mantidos em condições controladas de luz (ciclo de 12 horas de claro/escuro), temperatura (23°C) e umidade (55%). Antes de todo o período experimental e em seu decorrer, os animais receberam água e ração *ad libitum*.

Os peptídeos foram avaliados em dois modelos clássicos de testes para atividade antinociceptiva o *Hot Plate* ou teste da placa quente (Figura 4) e *Tail Flick* (Figura 5) ou teste de retirada da cauda. Para o teste da placa quente os animais foram previamente selecionados, no entanto, apenas os animais que responderam ao estímulo em até 15 segundos foram utilizados no teste.

No teste da placa quente o animal é colocado no interior de um equipamento em que a superfície que fica em contato com as patas é aquecida a 55°C e as paredes são de acrílico (Figura 4). Assim que o animal é acondicionado na placa quente, um cronômetro é disparado e, quando o camundongo apresenta sinais de dor (saltar ou lamber as patas traseiras), ele é retirado e anota-se seu tempo de permanência no equipamento. Após 30 segundos, animais que não apresentam reação são retirados para que não ocorra lesão. Quando realizada a linha de base, os animais que não apresentam os sinais de dor, passados 30 segundos, são eliminados do teste.

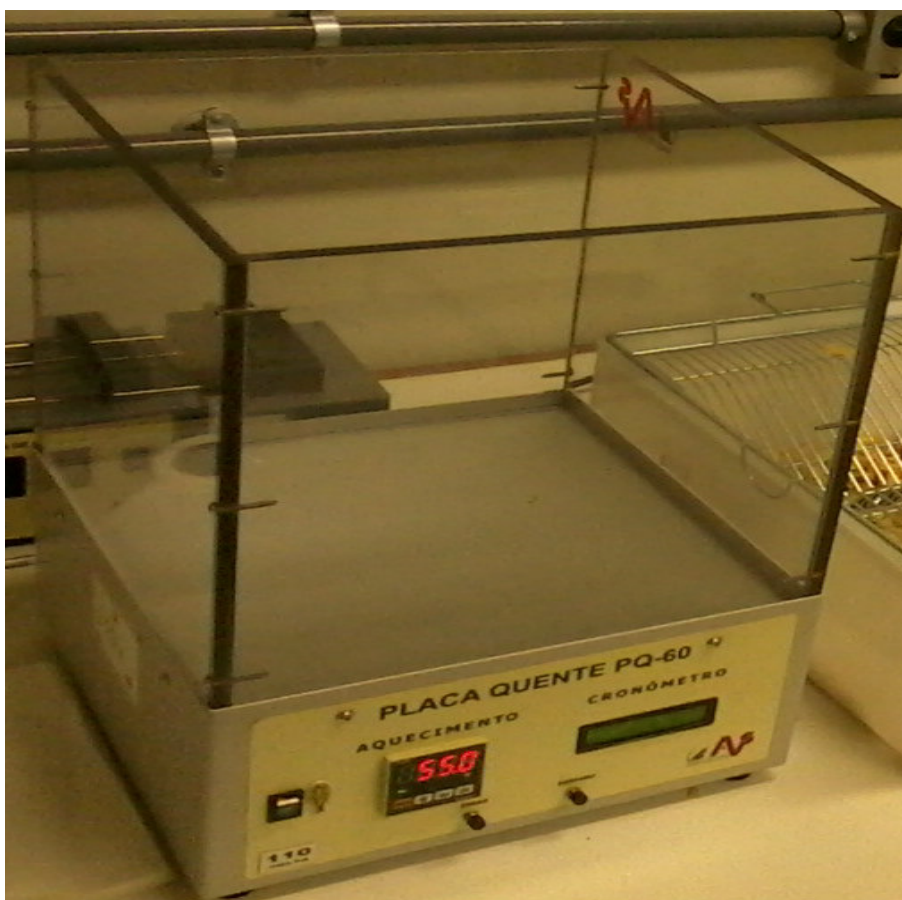


Figura 4: Placa Quente (AVS, Brasil) – Aparelho para teste de antinocicepção em camundongos. Foto: Felipe Vinecky

No teste de retirada da cauda, o animal é colocado na superfície de um equipamento e, sua cauda, acondicionada em uma resistência (Figura 5). Quando o animal para de se mexer, a resistência é acionada junto com um cronômetro e, quando o animal faz qualquer movimento com a cauda, um sensor do próprio equipamento acusa e registra o tempo de permanência da cauda na resistência e também a temperatura que o animal suportou antes de mexer a cauda. Caso o animal se movimente, ande, ou, ainda, se a cauda não estiver acomodada da maneira correta, o operador deve repetir o teste no mesmo instante.



Figura 5: Teste de retirada da cauda (*Insight*, Brasil) – Aparelho para teste de antinocicepção em camundongos. Foto: Felipe Vinecky

Ambos os modelos promovem estímulos térmicos e mensuram a latência, que é o tempo de resposta a partir desse estímulo (Berge, 2011). A antinocicepção é expressa a partir da comparação entre a latência média basal do animal, a qual é mensurada antes de iniciar a administração dos grupos controle e experimental. A latência teste foi obtida após administração dos grupos controles e experimentais e a latência máxima é determinada para minimizar o risco de lesão tecidual. Quantitativamente, o índice de antinocicepção (IA) é definido pela seguinte fórmula (Muñoz et al., 2012):

$$IA = \frac{(Latência\ teste - Latência\ média\ basal)}{(Latência\ máxima - Latência\ média\ basal)}$$

No teste da placa quente, o animal foi introduzido em uma placa metálica aquecida em torno de 50-55°C (AVS, Brasil), a partir daí foi observado quanto tempo o camundongo permaneceu até elicitare uma resposta cerebral que é representada pela ação de pular ou de lamber a pata traseira. Para o teste de retirada da cauda o camundongo foi colocado sobre um equipamento denominado analgesímetro (*Insight*, Brasil), de modo que sua cauda ficasse em contato com a resistência capaz de aumentar a temperatura até o animal retirar a cauda. Essa análise indica resposta medular (Le bars et al., 2001).

Os grupos eram compostos por 5-8 animais e a via de administração foi intraperitoneal (i.p.). As doses utilizadas foram baseadas na dose e molaridade da morfina (10 mg.kg⁻¹ de animal; 3, 48 µM), (Durántez et al., 2003; Li et al., 2011). Como controle positivo, foi utilizado além do sulfato de morfina (10 mg.mL⁻¹) (*Dimorf*, *Cristália*, Brasil) a Leu-encefalina, que foi sintetizada com o mesmo protocolo descrito para a síntese dos PSLEMs. Como controle negativo, foi utilizada solução fisiológica de cloreto de sódio, salina (0,9%) (*Equiplax*, Brasil).

No primeiro teste, foi utilizado o PSLEM 11042. Como referência para dose a ser utilizada, adotou-se a mesma concentração utilizada para a morfina (10 mg.kg⁻¹ de animal). Depois, verificou-se que a dose deveria ser equiparada com a molaridade da solução e não concentração. A dose usada nesse ensaio foi a metade da dose estipulada para os outros peptídeos.

As doses dos peptídeos calculadas para equiparar com a molaridade da morfina (3,48 µM) estão apresentadas na Tabela 3.

Tabela 3: Doses dos peptídeos aplicadas nos animais.

Nome do Peptídeo	Quantidade utilizada
PSLEM 11042	10 mg/kg
PSLEM 11043	24,8 mg/kg
PSLEM 11044	22,9 mg/kg
PSLEM 11045	25,8 mg/kg
PSLEM 12013	36,8 mg/kg
Leu-Encefalina	19,3 mg/kg

Foi utilizado também o antagonista de receptores opioides (δ, κ e μ), a naloxona, na forma de cloridrato de naloxona (0,4 mg.mL⁻¹) (*Narcan*, *Cristália*, Brasil) (Goldeberg, 2010; Kane et al., 2006), na dose de 4 mg.kg⁻¹ (1,13 mM), quantidade suficiente para provocar o antagonismo (Hao et al., 2011). O cloridrato de naloxona na concentração 0,4 mg.mL⁻¹ foi administrado em doses seriadas de hora em hora com o intuito de inibir a atividade da Leu-encefalina e dos peptídeos PSLEM 11043, PSLEM 11044, PSLEM 11045, PSLEM 12013.

No experimento da Leu-encefalina, a administração foi realizada em todos os tempos (tempo zero, 1h, 2h, 3h), mas nos experimentos dos peptídeos, apenas nos tempos zero, 1h, 2h para os dois modelos de testes.

O primeiro ensaio utilizando o PSLEM 11042 foi monitorado a cada 10 minutos no decorrer da primeira hora e, na segunda hora, a cada 20 minutos. Depois de verificar a necessidade de ampliar de duas para quatro horas de experimento, as avaliações foram feitas a cada 20 minutos na primeira hora e, a cada 30 minutos nas três horas restantes. Com a adequação do tempo e dos intervalos entre as leituras, outros peptídeos foram testados para avaliar a atividade antinociceptiva nos camundongos.

Após realização dos testes *in vivo*, foi realizada análise estatística com o programa *Graphpad Prism* (*Graphpad software*, Estados Unidos) para auxiliar na interpretação das mensurações do índice de antinocicepção (IA). Para a comparação entre os grupos experimentais e controles, foi utilizada a *two way* anova seguida de *Bonferroni* pós-teste, que determinou como a resposta do teste foi afetada de acordo com o tratamento no decorrer do tempo. Foi realizado o cálculo da área abaixo da curva utilizando o *one way* anova seguido do Teste de Tukey a 5%, que determinou o efeito acumulado dos grupos experimentais no ensaio.

RESULTADOS

Presença de proteínas

Em estudos com a finalidade de determinar o conteúdo proteico dos grãos de café, foram utilizadas estratégias conjuntas de gel de eletroforese bidimensional, biblioteca de cDNA e degradação de Edman para confirmação das proteínas (Rogers, et al., 1999; De Castro e Marraccini, 2006). Shewry (1995) e De Castro e Marraccini (2006) creditam 45% do conteúdo proteico dos grãos à proteína 11S, uma globulina de aproximadamente 55 kDa.

Para verificar a eficácia do protocolo de extração utilizado, uma amostra do extrato proteico foi analisada em gel de poliacrilamida a 16%. Dessa forma, foi constatado que o método utilizado na extração proteica possibilitou o isolamento de proteínas com diferentes massas moleculares, como pode ser observado na Figura 6.

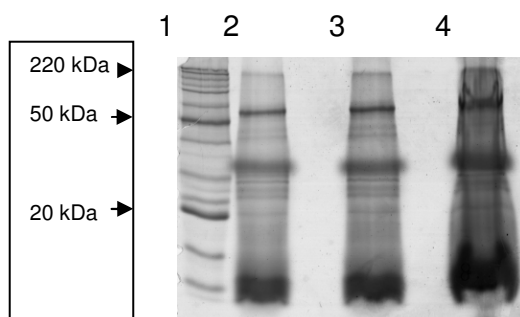


Figura 6: Minigel de poliacrilamida a 16% de extrato bruto de proteínas de *C. arabica* var. Acauã. 1- Marcador de massa molecular *BenchMark™ Protein Ladder* (INVITROGEN); 2, 3 e 4- 1μg, 2 μg, 4 μg de extrato bruto de proteína, respectivamente.

Fracionamento do extrato bruto

Após confirmada a presença de proteínas, foi realizado o fracionamento do extrato total de proteínas do café e constatada a possibilidade de isolamento de peptídeos por HPLC utilizando colunas de fase reversa como pode ser verificado na Figura 7, utilizando uma coluna analítica C₈ e na Figura 8, utilizando uma coluna semi-preparativa C₁₈.

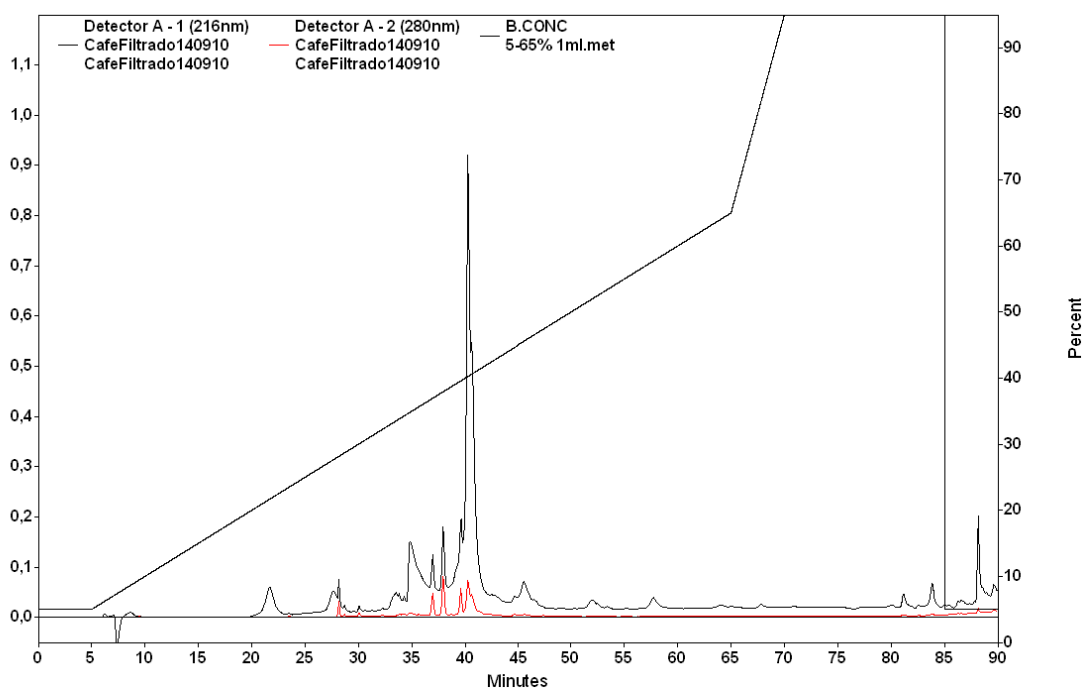


Figura 7: Perfil cromatográfico do extrato proteico de *C. arabica* var Acauã, fracionado por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (utilizando coluna analítica C₈ de fase reversa) em gradiente crescente de ACN variando de 5 a 65% em 60 min e fluxo de 1 mL.min⁻¹.

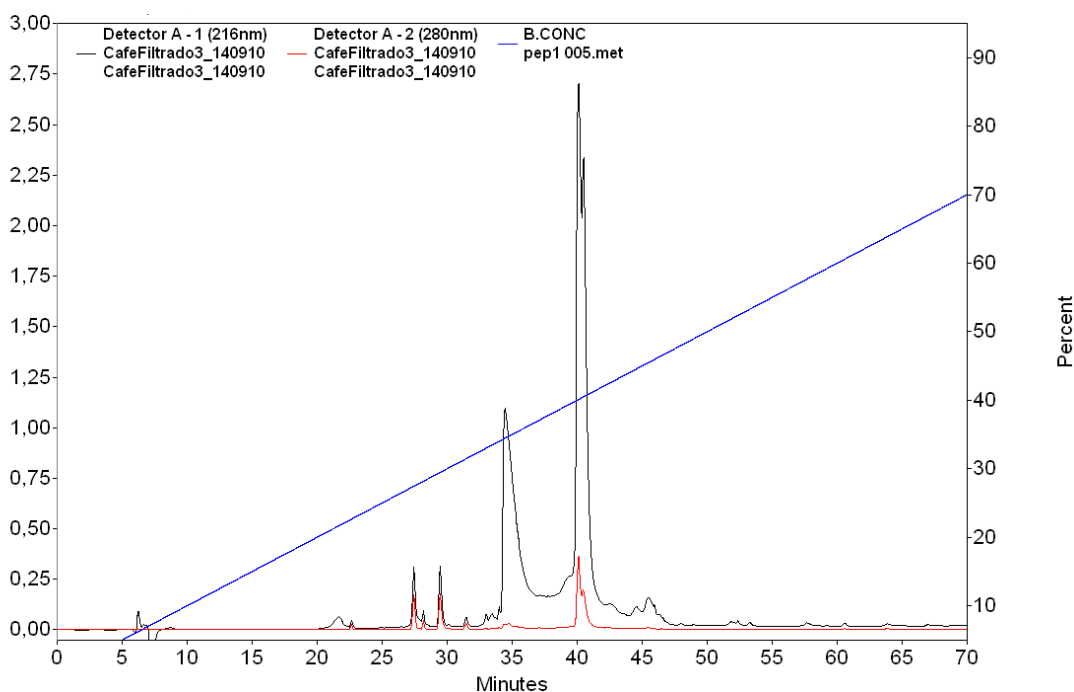


Figura 8: Perfil cromatográfico do extrato proteico de *C. arabica* var Acauã, fracionado por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (utilizando coluna analítica C₁₈ de fase reversa) em gradiente crescente de ACN variando de 0 a 70% em 70 min e fluxo de 2,5 mL.min⁻¹.

Fracionamento do extrato digerido

A digestão enzimática do extrato total com pepsina resultou em diversas frações cromatográficas obtidas em coluna analítica C_8 e em coluna semi-preparativa C_{18} (Figuras 9 e 10).

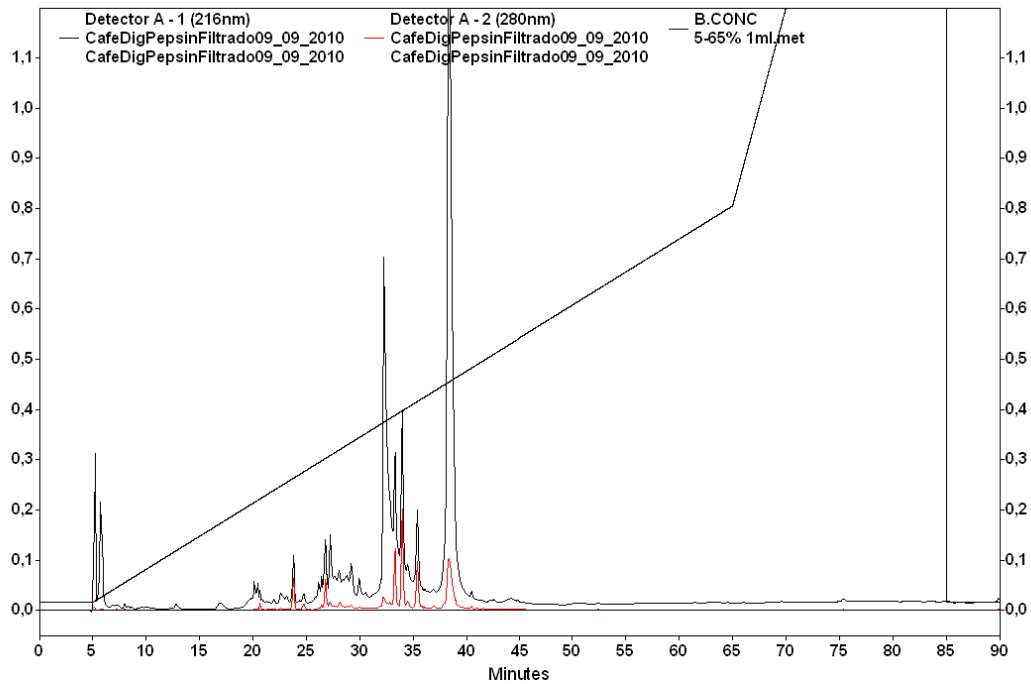


Figura 9: Perfil cromatográfico do extrato proteico de *C. arabica* var Acauã digerido com pepsina por 4 horas, fracionado por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (utilizando coluna analítica C_8 de fase reversa) em gradiente crescente de ACN variando de 5 a 65% em 60 min e fluxo de $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$.

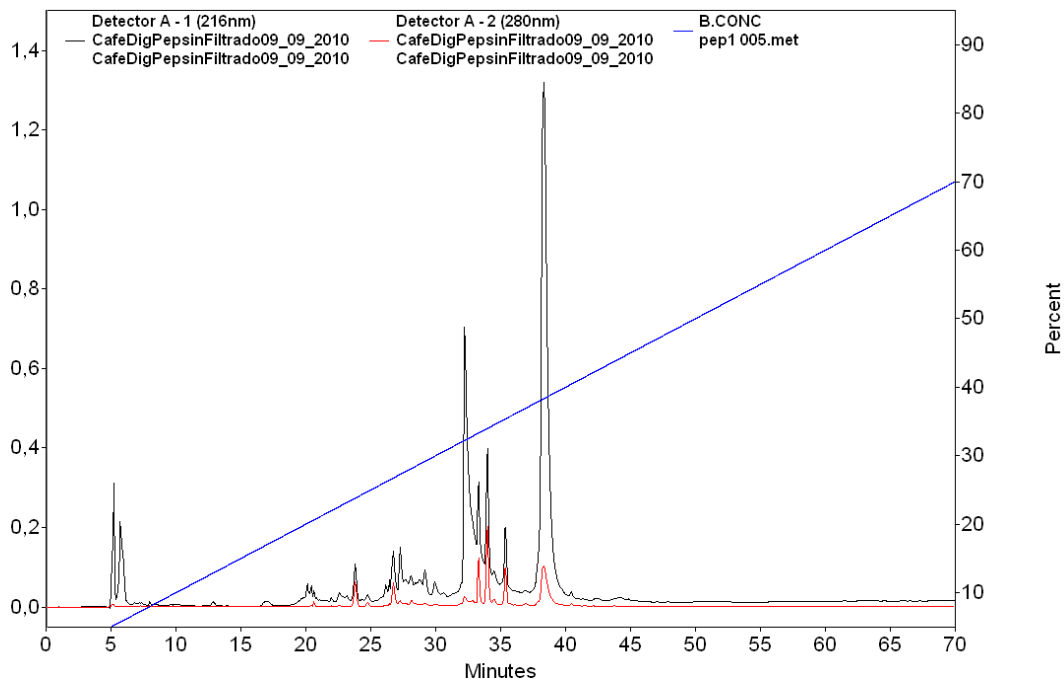


Figura 10: Perfil cromatográfico do extrato proteico de *C. arabica* var Acauã digerido com pepsina por 4 horas, fracionado por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (utilizando coluna analítica C₁₈ de fase reversa) em gradiente crescente de ACN variando de 0 a 70% em 70 min e fluxo de 2,5 mL.min⁻¹.

Nas duas metodologias, foram encontradas diversas frações que continham vários peptídeos. Apesar de os dois métodos terem apresentado cromatogramas similares, alguns peptídeos foram encontrados em um método e no outro, não.

Peptídeos sequenciados

As frações coletadas manualmente durante o fracionamento foram, então, liofilizadas e saturadas com matriz de CHCA e alíquotadas em placa maciça para a identificação de possíveis íons precursores em MALDI-TOF/MS e de sua fragmentação para posterior sequenciamento *de novo* dos peptídeos encontrados.

Uma busca realizada no banco de dados do genoma do café (Vieira et al., 2006) sugere que, dentre os peptídeos caracterizados, estão aqueles que são fragmentos de proteínas pertencentes à família da Dehidrina-CcDH1a e da Globulina 11S (Tabela 4).

Tabela 4: Sequências de peptídeos do café verde oriundos do fracionamento em HPLC e sequenciados por sequenciamento *de novo*, a respectiva massa molecular e Busca de similaridade por *Blast_hit*.

Sequência	Massa (Da)	<i>Blast_hit</i>
YGGTAGAHGTY	1054,5410	dehydrin DH1a [<i>Coffea canephora</i>]
YGNPVRQTD	1178,6240	dehydrin DH1a [<i>Coffea canephora</i>]
EDYGNPVRKTDE	1422,7630	dehydrin DH1a [<i>Coffea canephora</i>]
KIKEKLPGGHKEAR	2002,5000	dehydrin DH1a [<i>Coffea canephora</i>]
QLNNQQLAAEYQGQQQQ	2047,0900	hypothetical protein PPL_10786
YGNNGNGHENG	1075,5340	Hypoth. protein [<i>Sorghum bicolor</i>]
LKQGEOPYGKQGQKPQQQ	1999,1180	Hypoth. protein [<i>Sulfolobus tokodaii</i>]
YTCYRQSEE	1178,6390	glycosyl transferase, group 2 family protein
NPQQGGGKEGHQGGQQQ	1933,8170	11S storage protein [<i>Coffea arabica</i>]
(AG)QNPQQGGGKEGHQGGQQQ	1934,0390	11S storage globulin [<i>Coffea arabica</i>]
QNPQQGNKEGHKCKPLQ	1934,0630	11S storage globulin [<i>Coffea arabica</i>]
KLNNQTHWDGHQGGQQQ	2047,2442	11S storage protein [<i>Coffea arabica</i>]
QNPQQGGGKWHQGGKQHRNLF	2601,6799	11S storage protein [<i>Coffea arabica</i>]

Alguns peptídeos presentes na fração proteica de grãos de café torrado também foram fracionados e sequenciados. A metodologia utilizada foi a mesma da extração do café verde. Deve ser por esse motivo que poucos peptídeos foram encontrados (Tabela 5).

Tabela 5: Sequências de peptídeos do café torrado oriundos do fracionamento em HPLC e sequenciados por sequenciamento *de novo*, a respectiva massa molecular e Busca de similaridade por *Blast_hit*.

Peptídeo	Massa (Da)	<i>Blast_Hit</i>
AGNPKGELKGEHKGKK	1677	low temperature inducible SLT166 [Glycine max]
AGNPQQGGGKEGHQGGQQQ	1934	11S storage protein [<i>Coffea arabica</i>]
H(Dha)NKKY	758	-----

Peptídeos presentes em diversas proteínas foram sequenciados. Brand e colaboradores (2012) descreveram que para encontrar os peptídeos bioativos encriptados, esses precisam apresentar características pré-determinadas. Da mesma forma, o foco do trabalho foi encontrar peptídeos que apresentassem a terminação YGG na porção N-Terminal, que apresentassem a mesma terminação das encefalinas (Fürst, 1999). Milan, em 2002, realizou estudos sobre a atividade opioide e concluiu que têm contribuído para o aumento do número de peptídeos conhecidos pertencentes às famílias de opioides, bem como subsequente conhecimento de suas localizações e de seus papéis na modulação do processo nociceptivo.

Peptídeos advindos da Dehidrina

De acordo com a estratégia elaborada por Brand e colaboradores (2012), foi utilizado banco de dados do Genoma Café para localizar os peptídeos com características de opiáceos. Os peptídeos de interesse foram encontrados nas proteínas da dehidrina conforme Figura 11.

```
>gi|dehydrin DH1b [Coffea canephora]|  
MAQYGAEYGNQKSQYDEYGNPVRQTDEYGNPARHGGTMGDYGTTGTTGAYGGTTGTAGAHGTYATGTT  
GTTGTGAYATQPGTDVVGKERHGLGGMLHRSGSGSSSSSEDDGQGRRKKGMKEKIKEKLPGGHKEAQP  
GQEYSSATAAPGYGGEGEQHEKKGIMDKIKEKLPGGHRN
```

```
>gi|dehydrin DH1a [Coffea canephora]|  
MAQYGAEYGNQKSQYDEYGNPVRQTDEYGNPARHGGTMGDYGTTGTTGAYGGTTGAHGTYATGTTGTT  
GTGAYATQPGTDVVGKEHHGLGGMLHRSGSGSSSSSEDDGQGRRKKGMKEKIKEKLPGGHKEAQP  
YSSATAAPGYGGEVQHEKKGIMDKIKEKLPGGHNN
```

Figura 11: Isoformas da dehidrina que continham a terminação YGG na região N-terminal do peptídeo. Em vermelho, as sequências dos peptídeos escolhidos para síntese e testes.

Com a busca por peptídeos que apresentavam YGG nos três primeiros resíduos da região N-terminal do peptídeo (característico em peptídeo opioide), assim que o peptídeo PSLEM 12013 (Tabela 1) foi encontrado, o trabalho foi direcionado para as dehidrinas, pois esse peptídeo está presente na proteína JP709196.1|CaDHN1b| YGGTAGAHGTY (Santos e Mazzafera, 2012). A referência desta isoforma da dehidrina foi sequenciada a partir de plantas de *Coffea canephora*, porém o peptídeo que foi sequenciado (PSLEM 12013) apresentou uma alteração no quinto resíduo, a partir da região N-terminal, onde foi alterado de Treonina para Alanina. Essa alteração também foi encontrada por Santos e Mazzafera (2012) em sequências de cDNA de *C. arabica*.

A

```
>gi|dehydrin DH1a [Coffea canephora]  
MAQYGAEYGNQKSQYDEYGNPVRQTDEYGNPARHGGTMGDYGTTGTTGAYGGTTGAHGTYATGTTGTT  
GTGAYATQPGTDVGKEHHGLGGMLHRSGSGSSSSSEDDGQGRRKKGMKEKIKEKLPGGHKEAQPGE  
YSSATAAPGYGGEGVQHEKKGIMDKIKEKLPGGHNN
```

B

```
>gi|357256139|gb|JP709196.1| TSA: Coffea arabica Contig8867  
MAQYGAEYGNQKSQYDEYGNPVRQTDEYGNPARHGGTMGDYGTTGTTGAYGGTAGAHGTYATGTTGTT  
GTGAYATQPGTDVGKEHHGLGGMLHRSGSGSSSSSEDDGQGRRKKGMKEKIKEKLPGGHKEARPGQE  
YSSATTAPGYGGEGEQHEKKGIMDKIKEKLPGGHNN
```

Figura 12: A - Sequência da proteína dehydrin DH1a (Hinninger et al. 2006) e em negrito o peptídeo similar ao PSLEM 12013. B - Sequência do Contig 8867 (Santos e Mazzafera, 2012). Em A e B, as regiões diferenciadas por cores foram os peptídeos sequenciados.

Com os peptídeos definidos, foi realizada síntese manual, purificação e aferição da massa e da estrutura do peptídeo (Figura 13). As amostras contendo os peptídeos puros foram quantificadas para a realização dos testes em animais. Todos os peptídeos, inclusive a encefalina, foram dosados igualando à molaridade da dose de morfina, para manter o número de moléculas constante em todos os ensaios.

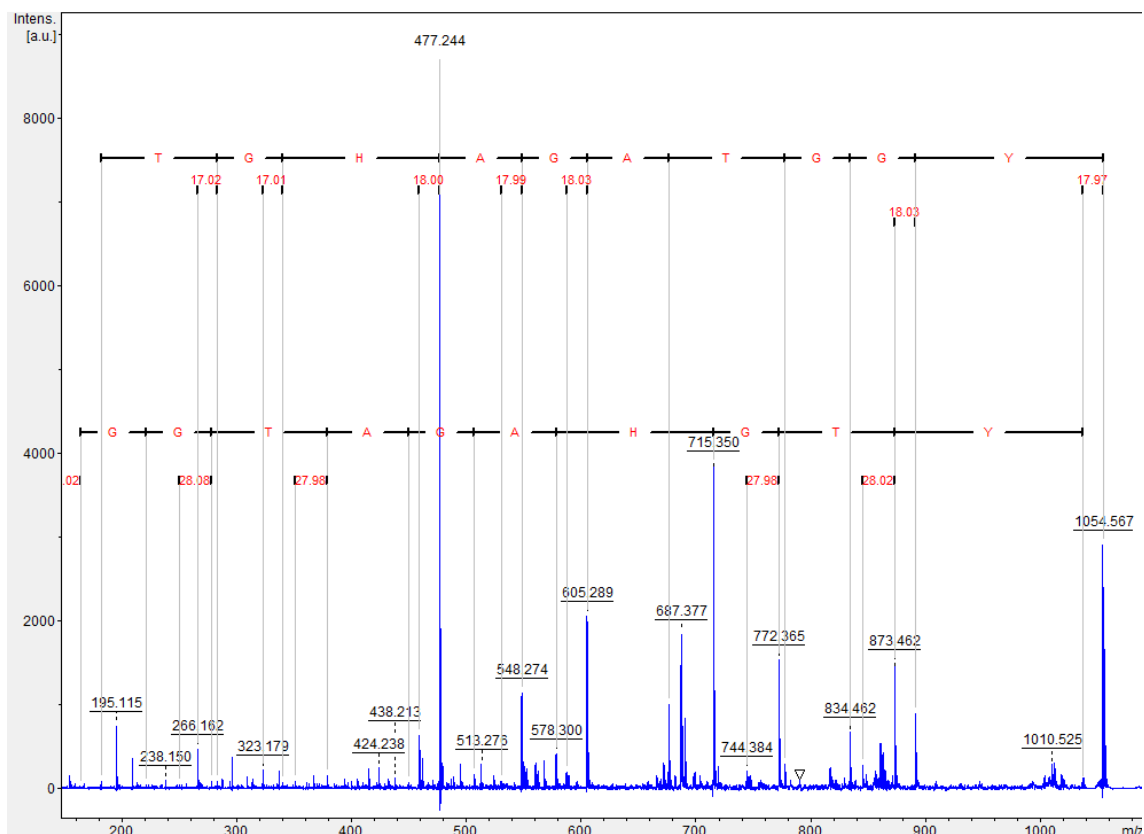


Figura 13: Espectro obtido por MS/MS para confirmação da identidade do PSLEM 12013 (YGGTAGAHGTY-COOH). A série y corresponde aos íons fragmentados no C-terminal e a série b, fragmentos no N-terminal.

Testes nociceptivos

Para iniciar os testes nociceptivos e verificar sua eficiência, foi realizado um experimento piloto utilizando o peptídeo PSLEM 11042 avaliando o comportamento dos animais no decorrer de duas horas. Após o fim do experimento de placa quente e teste de retirada da cauda (Figuras 14 e 15) foi avaliado que seria necessário realizar o teste por mais tempo, pois, na figura 14, a atividade do peptídeo apresentou-se tardia podendo ser prolongada.

Ressalta-se que ocorreu um erro (uma troca de aminoácidos) durante a síntese desse peptídeo (Tabela 1) e, apesar ser um análogo, apresentando a terminação YGG na região N-Terminal, ele não apresenta a sequência da desidrina. Outro fator que mostrou ser relevante foi a dose utilizada para esse peptídeo, a qual foi subestimada ao serem administrados 10 mg.kg^{-1} de animal (a dose correta seria $23,1 \text{ mg.kg}^{-1}$).

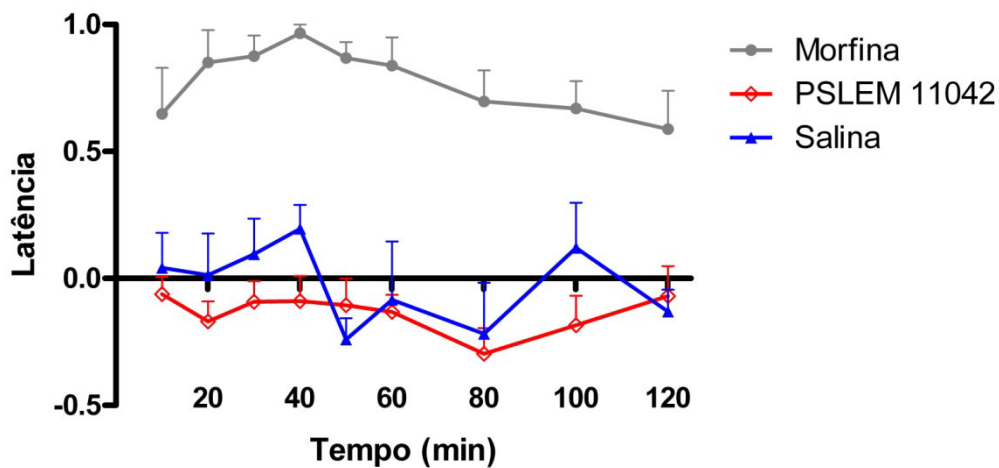


Figura 14: Índice de latência adquirido em diferentes tempos após a aplicação (i.p.) em camundongos do PSLEM11042 utilizando a placa quente por 120 minutos.

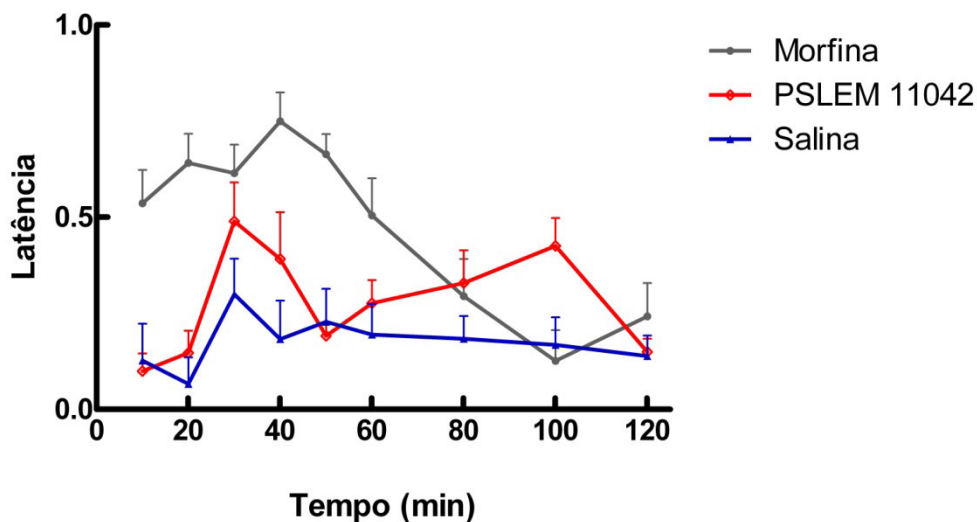


Figura 15: Índice de latência adquirido em diferentes tempos após a aplicação (i.p.) em camundongos do PSLEM11042 utilizando o teste da retirada da cauda por 120 minutos.

Ao realizar os testes com o PSLEM11042 seguindo os parâmetros adotados no Laboratório de Toxinologia (UnB), foi verificado que o intervalo entre as avaliações era muito próximo e que o período de duas horas de avaliação poderia mascarar os resultados. Foi decidido, então, que a duração dos testes fosse ampliada em duas horas, passando para 4 horas. As avaliações passaram de intervalos de 10 minutos na primeira hora para 20 minutos. No restante do tempo, os intervalos aumentaram de 20 para 30 minutos entre as avaliações.

Outra alteração realizada para o próximo ensaio foi a adição de outro controle além da morfina, também positivo, porém peptídico e não alcalóide. Então, como controle positivo, foi utilizada também a Leu-encefalina.

Com o prolongamento do tempo de experimento, os testes nociceptivos demonstraram que os peptídeos apresentaram atividade antinociceptiva. Como pode ser observado nas figuras 16 e 17, o PSLEM 11043 apresentou atividade tardia e prolongada na placa quente e no teste de retirada da cauda. Para verificar a atividade antinociceptiva do PSLEM 11043 a naloxona foi injetada nos animais nos tempos: 0; 60; 120.

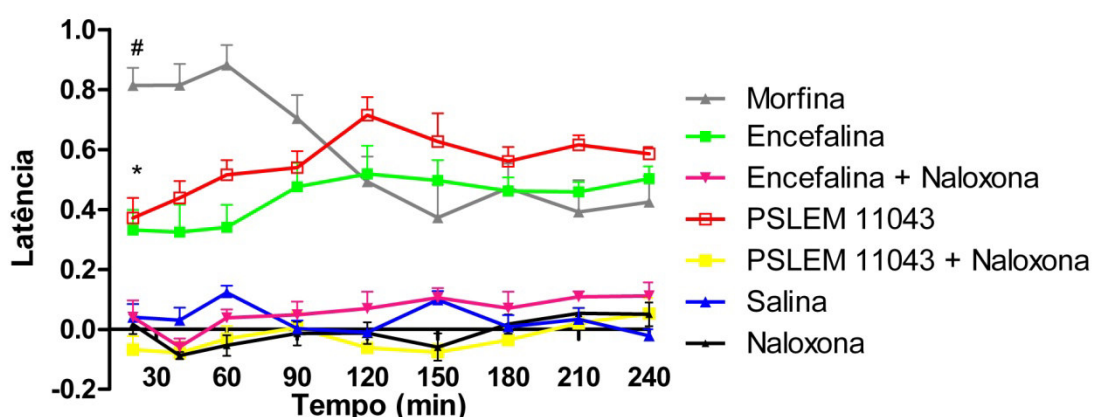


Figura 16: Índice de latência adquirido em diferentes tempos após a aplicação (i.p.) em camundongos do PSLEM 11043 utilizando o teste da retirada da cauda por 240 minutos. # - A partir de 20 minutos, Morfina > Salina $P < 0,05$. * - A partir de 20 minutos PSLEM 11043 e Encefalina > Salina com $P < 0,05$.

Com o experimento de retirada da cauda, a naloxona pôde inibir o efeito até o final do teste com PSLEM 11043 (Figura 16), não apresentando a volta da atividade depois da interrupção da naloxona no tempo 120 minutos. Já no ensaio de placa quente (Figura 17), foi possível verificar que a atividade antinociceptiva do PSLEM 11043 teve início com 120 minutos e durou até o final do experimento. O teste com naloxona só teve início com 150 minutos, pois sua administração foi interrompida com 120 minutos, liberando então os receptores do sistema nervoso para a ligação do peptídeo.

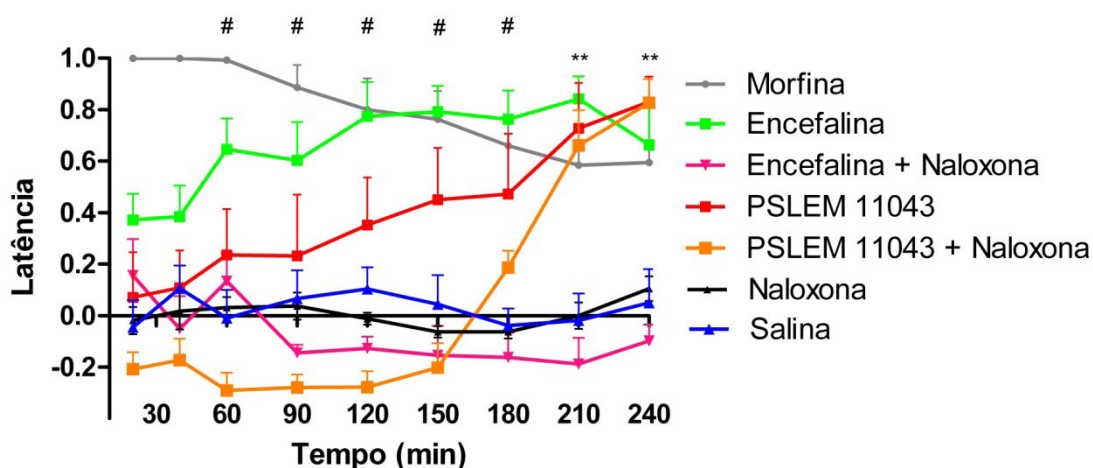


Figura 17: Índice de latência adquirido em diferentes tempos após a aplicação (i.p.) em camundongos do PSLEM 11043 utilizando a placa quente por 240 minutos. # - A partir de 60 minutos, Morfina > Salina $P < 0,05$. ** - A partir de 20 minutos PSLEM 11043 e Encefalina > Salina com $P < 0,05$.

Esse resultado mostra que a atividade de ligação do peptídeo é similar à da encefalina, pois, da mesma forma que o principal antagonista da morfina é a naloxona, que interage com receptores opioides (δ , κ e μ) (Goldeberg, 2010; Kane *et al*, 2006), também é antagonista do peptídeo. Por isso, a naloxona foi utilizada nos ensaios com os peptídeos sintéticos visando o antagonismo para confirmar a via que atuavam: a de receptores opioides.

Para a melhor visualização dos ensaios, o controle positivo morfina foi retirado dos gráficos (por manter o mesmo padrão) e foi mantida como controle positivo apenas a Leu-encefalina. Como foi observado na Figura 17, a naloxona, quando aplicada até o final do ensaio, inibiu o efeito da encefalina, e, por se manter constante nos outros testes, essa informação também foi omitida. Foram inseridos e mantidos os dados contendo o ensaio da encefalina com aplicação da naloxona até 120 minutos.

O peptídeo PSLEM 11044 apresentou efeito antinociceptivo nos camundongos seguindo uma tendência similar ao da encefalina. A atividade de antinocicepção do peptídeo pode ser observada nos gráficos obtidos a partir dos testes de placa quente e teste de retirada da cauda como pode ser observado nos gráficos das figuras 18 e 19. Neste experimento, não foi realizado o ensaio do peptídeo com a Naloxona.

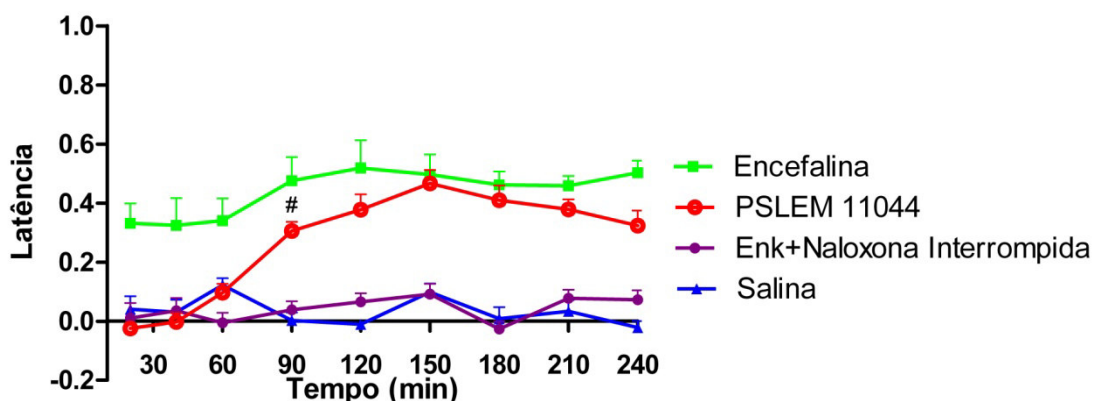


Figura 18: Índice de latência adquirido em diferentes tempos após a aplicação (i.p.) em camundongos do PSLEM 11044 utilizando o teste da retirada da cauda por 240 minutos. # - A partir de 90 minutos, PSLEM 11044 > Salina $P < 0,05$.

Para constatar que a naloxona se ligou ao receptor opioide, foi decidido realizar também a interrupção da naloxona com 120 minutos no ensaio com encefalina para verificar se, com a suspensão, o efeito antinociceptivo seria retomado (Figura 19). Diferentemente do ensaio da retirada da cauda, na placa quente, após a interrupção da naloxona, a atividade da encefalina inicia o efeito antinociceptivo.

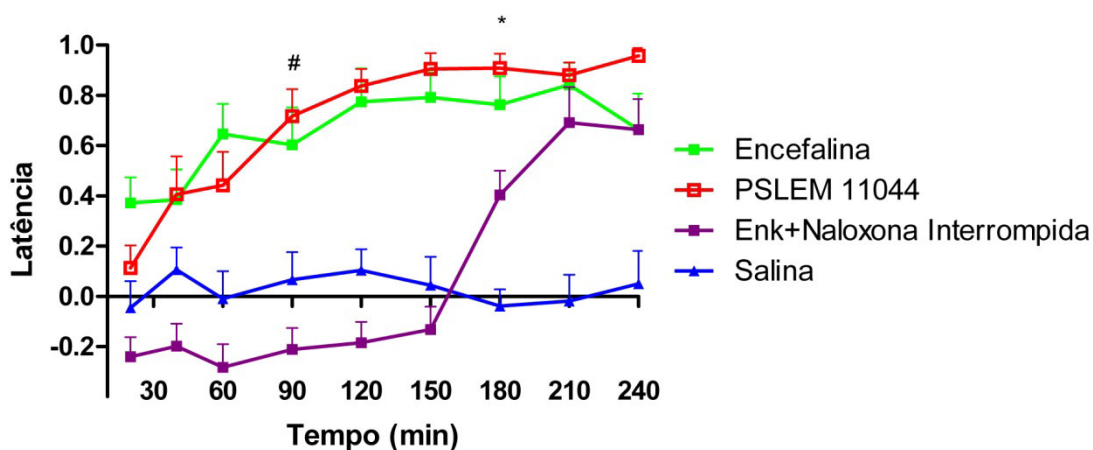


Figura 19: Índice de latência adquirido em diferentes tempos após a aplicação (i.p.) em camundongos do PSLEM 11044 utilizando a placa quente por 240 minutos. # - A partir de 90 minutos, PSLEM 11044 > Salina $P < 0,05$. * - A partir de 180 minutos PSLEM 11043 e Encefalina+Naloxona interrompida > Salina com $P < 0,05$.

Os testes realizados com o peptídeo PSLEM 11045 também apresentaram atividade antinociceptiva no teste de retirada da cauda (Figura 20). Novamente, a atividade da encefalina não foi retomada após a interrupção da administração de naloxona. Não foi realizado o ensaio com naloxona para esse peptídeo.

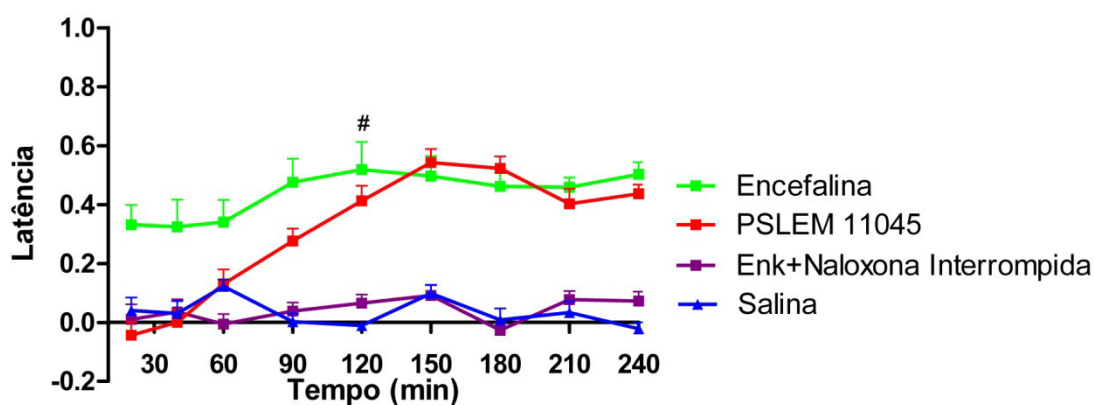


Figura 20: Índice de latência adquirido em diferentes tempos após a aplicação (i.p.) em camundongos do PSLEM 11045 utilizando o teste da retirada da cauda por 240 minutos. # - A partir de 120 minutos, PSLEM 11045 > Salina $P < 0,05$.

Nos testes de placa quente para o peptídeo PSLEM 11045, ele também configurou atividade antinociceptiva, tendo o início da atividade com 60 minutos, perdurando até o final do experimento.

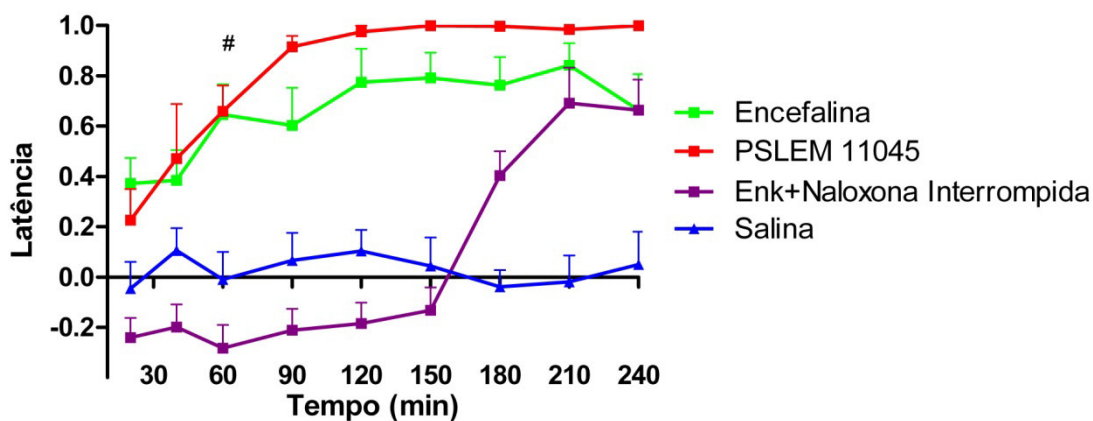


Figura 21: Índice de latência adquirido em diferentes tempos após a aplicação (i.p.) em camundongos do PSLEM 11045 utilizando a placa quente por 240 minutos. # - A partir de 60 minutos, PSLEM 11045 > Salina $P < 0,05$.

No teste de retirada da cauda, a atividade da encefalina e do PSLEM 12013 também mostrou um efeito prolongado, como pode-se visualizar na Figura 22, onde o início da antinocicepção ocorreu entre 60 e 90 minutos após a injeção com duração de 4 horas de experimento. A aplicação da naloxona fez com que os efeitos do PSLEM 12013 e da encefalina fossem inibidos ficando no mesmo nível da salina.

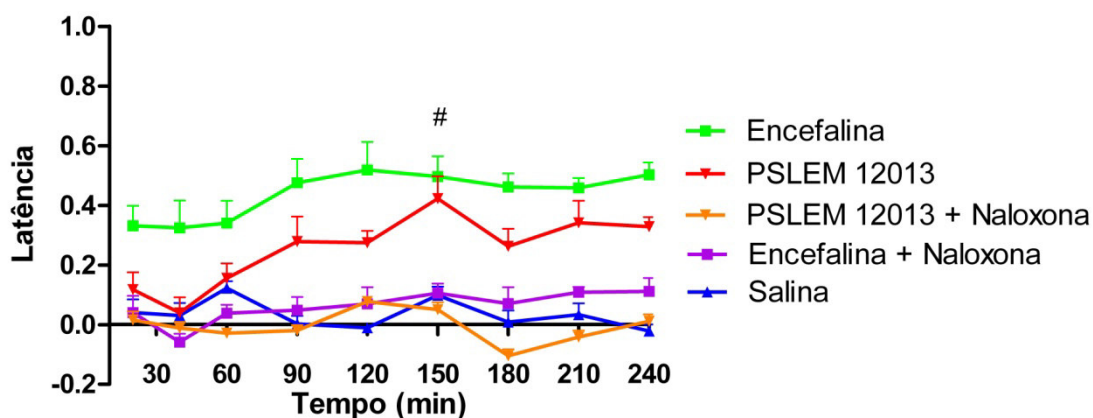


Figura 22: Índice de latência adquirido em diferentes tempos após a aplicação (i.p.) em camundongos do PSLEM 12013 utilizando o teste da retirada da cauda por 240 minutos. # - A partir de 150 minutos, PSLEM 12013 > Salina $P < 0,05$.

No outro teste de nocicepção, a atividade antinociceptiva da Leu-encefalina e do peptídeo PSLEM 12013 resultou em um efeito prolongado nos animais, como podemos visualizar na Figura 23, onde foram avaliadas 4 horas de experimento na placa quente. No período em que a naloxona foi aplicada (de zero a 120 minutos), o efeito do PSLEM 12013 foi antagonizado. A partir de 150 minutos, não foi mais injetada a naloxona e foi notada a atividade do peptídeo e da encefalina.

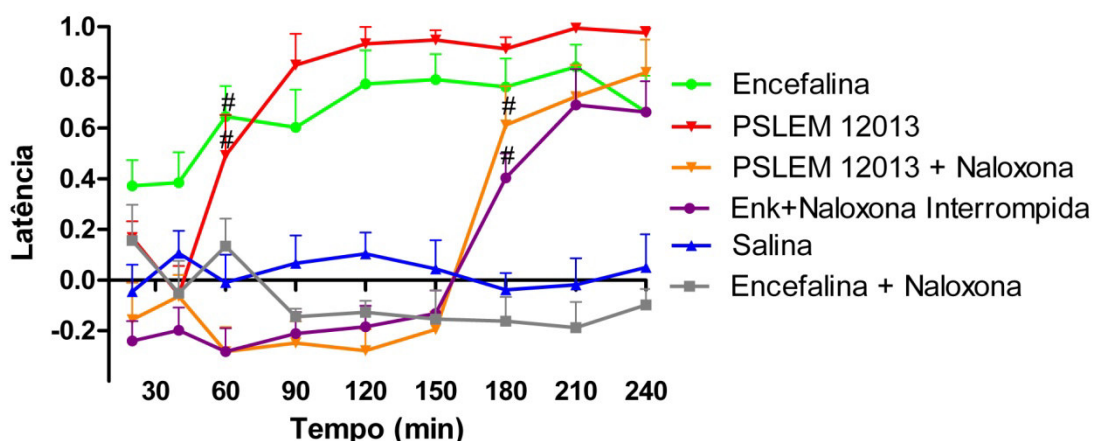


Figura 23: Índice de latência adquirido em diferentes tempos após a aplicação (i.p.) em camundongos do PSLEM 12013 utilizando a placa quente por 240 minutos. # - A partir de 60 minutos, PSLEM 12013 e Encefalina > Salina $P < 0,05$ e com 180 minutos PSLEM 12013+Naloxona e Enk+Naloxon Interrompida > Salina $P < 0,05$.

A área abaixo da curva no teste de placa quente (Figura 24) demonstra que os grupos dos PSLEMs, morfina e Leu-encefalina apresentaram o efeito acumulado estatisticamente significativo quando comparados à salina com o valor de $P < 0,05$ do Teste de Tukey. Os PSLEMs exibiram um efeito acumulado semelhante à Leu-encefalina, porque não houve diferença significativa (PSLEMs X Leu-encefalina) com valor de $P > 0,05$ (NS) durante todo o ensaio.

Foi possível verificar que a atuação dos peptídeos dá-se nos receptores de opioides, visto que, quando a aplicação da naloxona foi adotada, houve inibição da atividade antinociceptiva. Na Figura 20, é possível visualizar que a área abaixo da curva da Leu-encefalina e do PSLEM 12013 é significativamente maior com valor de $P < 0,05$ do Teste de Tukey, quando comparados aos respectivos ensaios com naloxona. Para o PSLEM 12013,

mesmo com a interrupção da administração da naloxona (que resultou na atividade antinociceptiva tardia), o efeito foi significativamente maior.

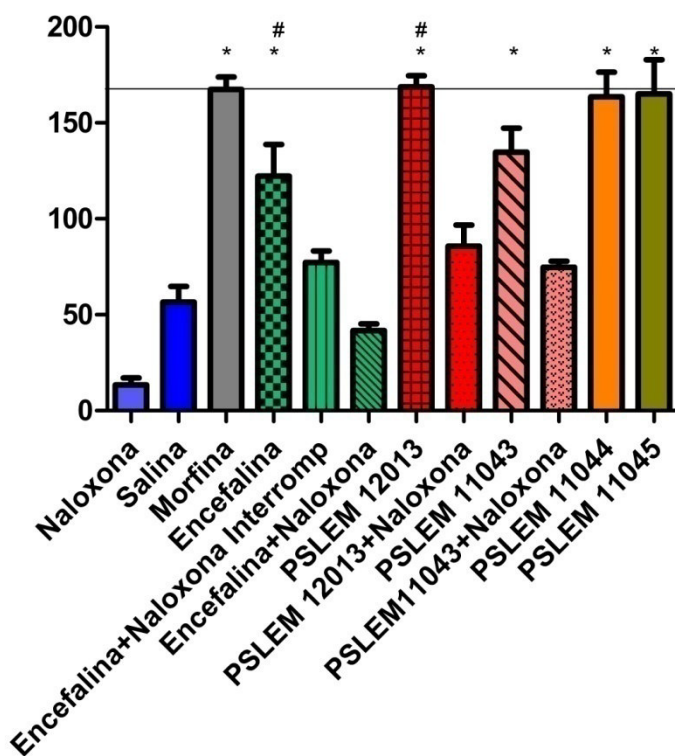


Figura 24: Área abaixo da curva para todos os experimentos no teste de placa quente. Os grupos marcados com (*) foram estatisticamente superiores ao grupo salina quando avaliados por *one way* anova e Teste de Tukey com $P < 0,05$. Os grupos marcados com (#) foram estatisticamente superiores ao respectivo grupo tratado com naloxona quando avaliados por *one way* anova e Teste de Tukey com $P < 0,05$.

Também foi possível verificar na Figura 24 que o PSLEM 12013 + naloxona teve um efeito acumulado estatisticamente significativo menor que no ensaio do PSLEM 12013 sem naloxona, pois esse atuou como antagonista no receptor opioide. A mesma situação foi observada no ensaio comparando a encefalina e encefalina + naloxona.

Na Figura 25, a área abaixo da curva do ensaio de retirada da cauda demonstra que os grupos dos PSLEMs, morfina e Leu-encefalina apresentaram o efeito acumulado estatisticamente significativo quando comparados à salina com o valor de $P < 0,05$ do Teste de Tukey. Os PSLEMs (exceto o PSLEM 11043) exibiram um efeito acumulado semelhante

a Leu-encefalina, porque não houve diferença significativa (PSLEMs X Leu-encefalina) com valor de $P > 0,05$ (NS) durante todo o ensaio.

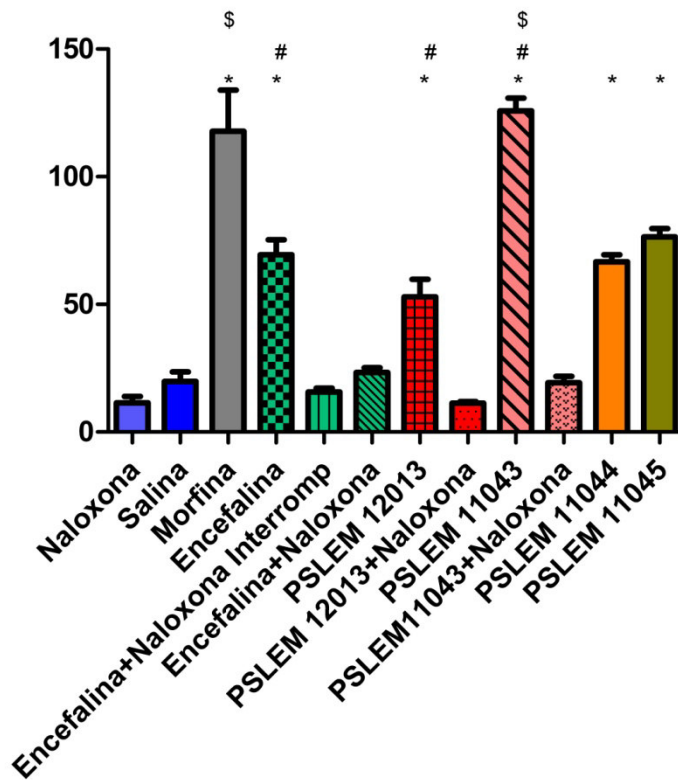


Figura 25: Área abaixo da curva para todos os experimentos no teste de retirada da cauda. Os grupos marcados com (*) foram estatisticamente superiores ao grupo salina quando avaliados por *one way* anova e Teste de Tukey com $P < 0,05$. Os grupos marcados com (#) foram estatisticamente superiores ao respectivo grupo tratado com naloxona quando avaliados por *one way* anova e Teste de Tukey com $P < 0,05$. Os grupos marcados por (\$) apresentaram maior área abaixo da curva que os demais avaliados por *one way* anova e Teste de Tukey com $P < 0,05$.

Avaliando a área abaixo da curva do grupo PSLEM 11043, foi possível verificar (Figura 25) que o referido grupo apresentou maior efeito acumulado que os demais grupos tendo o $P < 0,05$ estatisticamente significativo. Apenas quando comparado ao grupo da morfina, não apresentou diferença estatística significativa com $P > 0,05$. Os grupos dos PSLEM 12013, 11043 e da Leu-encefalina apresentaram uma diferença estatisticamente significativa exibindo maior valor acumulado que os respectivos grupos tratados com naloxona.

Biodisponibilização do PSLEM 12013 e Leu-encefalina

O peptídeo obtido por meio da digestão do extrato proteico de café com pepsina (PSLEM 12013) foi digerido utilizando tripsina imobilizada por um período de 4 horas, avaliando o índice de fragmentação nos tempos de 15 minutos, 30 minutos, 2 horas e 4 horas. Foi possível verificar (Figura 26) um acréscimo da intensidade dos íons de menor massa ao longo do tempo e o decréscimo do íon precursor.

Isso mostra que ao longo da incubação com a enzima tripsina, (enzima presente no trato gastrointestinal) o pico majoritário do PSLEM 12013 vai reduzindo sua intensidade. Por meio desse experimento, foi possível observar *in vitro* a digestão do peptídeo por meio da enzima presente no organismo.

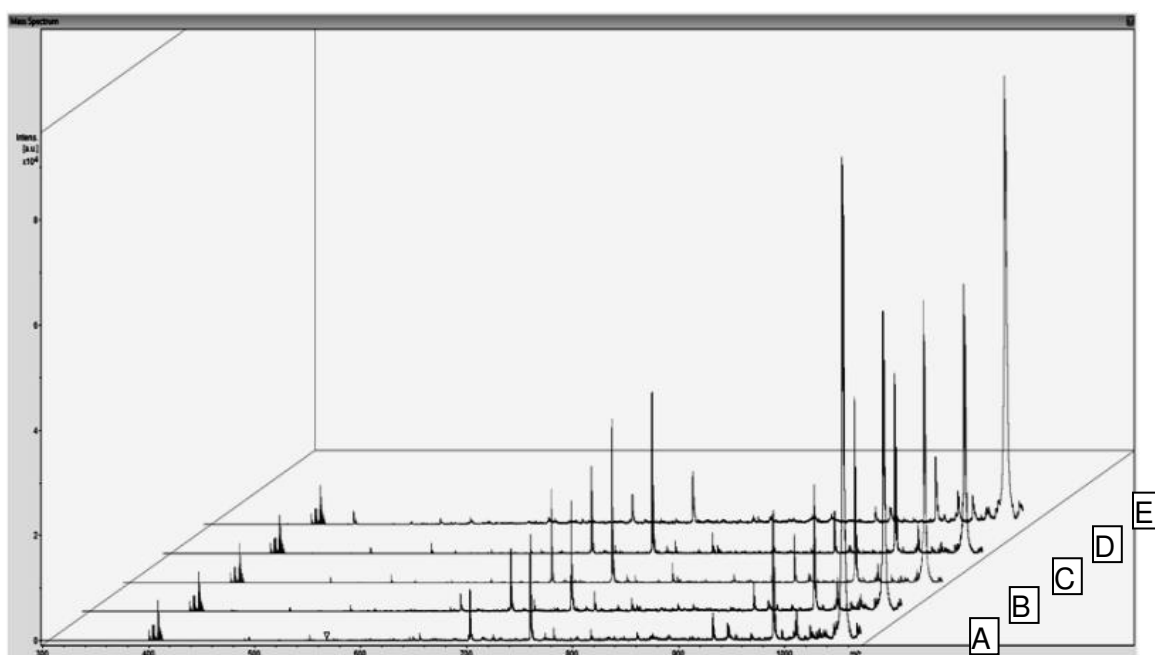


Figura 26: Representação dos fragmentos do PSLEM 12013, obtidos nos diferentes tempos de incubação com a enzima tripsina. Análise realizada por espectrometria de massa, MALDI-TOF/MS. A: espectro obtido após 15 minutos de incubação; B: espectro obtido após 30 minutos de incubação; C: espectro obtido após 120 minutos de incubação; D: espectro obtido após 240 minutos de incubação; E: peptídeo controle (PSLEM 12013).

A encefalina (Leu) foi digerida utilizando tripsina imobilizada por um período de 4 horas avaliando o índice de fragmentação nos tempos de 30 minutos, 1 hora, 2 horas e 4 horas. Foi possível verificar, na figura 27, o decréscimo do íon precursor ao longo do tempo.

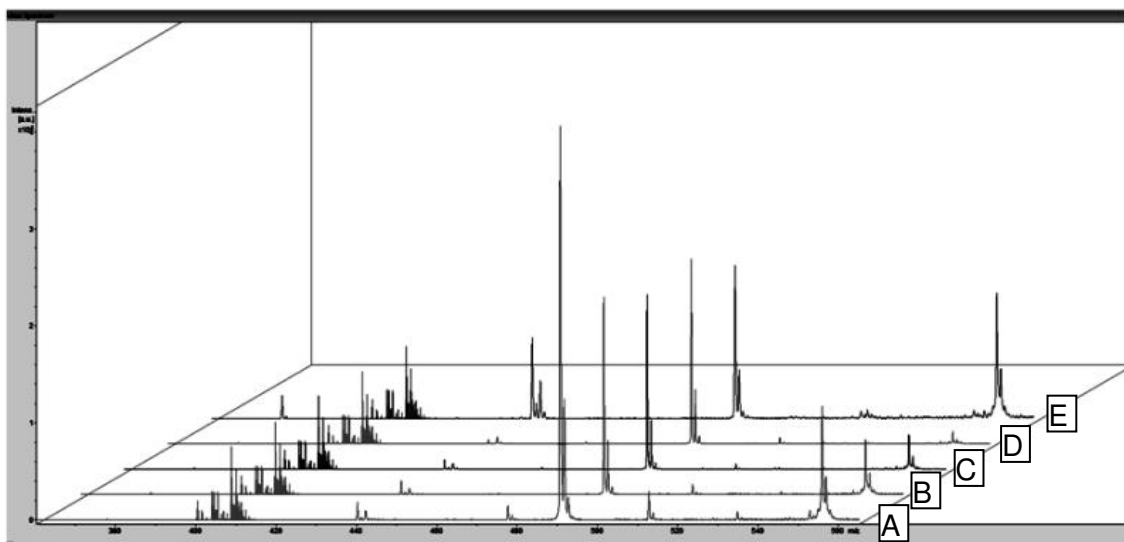


Figura 27: Representação dos fragmentos da Leu-encefalina, obtidos nos diferentes tempos de incubação com a enzima tripsina. Análise realizada por espectrometria de massa, MALDI. A: espectro obtido após 30 minutos de incubação; B: espectro obtido após 60 minutos de incubação; C: espectro obtido após 120 minutos de incubação; D: espectro obtido após 240 minutos de incubação; E: peptídeo controle (Encefalina-Leu).

Foi possível verificar, quando comparadas as figuras 26 e 27, que o íon majoritário (controle) do PSLEM 12013 apresentou menor degradação que o íon majoritário da Leu-encefalina, que com o passar do tempo teve a intensidade do pico reduzida. Esse fato pode ter ocorrido devido ao tamanho do peptídeo e sua conformação estrutural.

DISCUSSÃO

É possível realizar a determinação do conteúdo proteico dos grãos de café utilizando estratégias conjuntas de gel de eletroforese bidimensional, biblioteca de cDNA e degradação de Edman para confirmação das proteínas (Rogers et al., 1999; De Castro e Marraccini, 2006). Porém, esses autores creditam 45% do conteúdo proteico dos grãos à

proteína 11S (Shewry, 1995). Ao realizar a extração proteica dos grãos de café utilizando uma solução levemente ácida, foi possível verificar a presença de outras proteínas além da globulina (11S). E, principalmente, foi encontrada a dehidrina contendo os peptídeos com características de opioides.

Da mesma forma que Brand e colaboradores (2012) encontraram os peptídeos bioativos encriptados em proteínas de soja, no presente trabalho foi possível identificar os peptídeos bioativos como fragmentos dentro de proteínas, inspirados pela liberação peptídeo natural e ativação sob proteólise enzimática, realizada por meio da digestão enzimática da pepsina, mimetizando a digestão em humanos.

Os testes antinociceptivos mostram que os peptídeos apresentaram atividade opioide. Esses peptídeos contêm resíduos de aminoácidos, os quais conferem grupos farmacofóricos semelhantes aos da morfina. Os grupos farmacofóricos podem ser definidos como os grupos moleculares que permitem o reconhecimento pelo receptor e que são essenciais para a atividade desejada (Barreiro e Fraga, 2008).

Um fator importante na ação dos peptídeos é a organização da molécula no espaço tridimensional. Mesmo que esse não seja um dos objetivos do trabalho, podemos afirmar que os peptídeos se organizam de forma a permitirem a classificação como agonistas. A estrutura do antagonista de receptores opioides, a naloxona, possui os mesmos grupos farmacofóricos que a morfina, mas, quando interage com o receptor, promove o efeito contrário, de antagonismo. Isso ocorre devido a um impedimento estérico provocado por outro grupo OH que faz com que a amina da naloxona interaja em outro sítio do receptor, e não no mesmo sítio que a morfina (Goldeberg, 2010; Kane et al., 2006; Patrick, 2009).

A estrutura primária dos PSLEMs na região N-terminal (YGG) é característica em peptídeos opioides que apresentam afinidade maior para receptores do tipo μ -opioide. Ela possui atividade antinociceptiva e está localizada, principalmente, no mesencéfalo, *locus coeruleus*, no hipotálamo, substância gelatinosa e corno dorsal da medula espinhal. As endomorfina podem ser clivadas por peptidases (exo e endopeptidases) no meio extracelular e também no meio intracelular (Fichna et al., 2007). O que sugere que, após administração (i.p.), os peptídeos (PSLEM 11043, 11044, 11045 e 12013) também podem ser clivados antes de chegar próximo a barreira hematoencefálica ou após, considerando a possibilidade deles terem-na atravessado.

Com a descoberta de Boublik e colaboradores (1983), a hipótese é corroborada, pois foi relatado que componentes presentes nos pós de café instantâneo estariam competindo com a naloxona pela ligação a receptores opiáceos nos ensaios com membranas de cérebro

de rato, sem apresentar diferença significativa entre o café normal e o descafeinado. A atividade de ligação ao receptor se assemelha à observada com antagonistas de opiáceos. Uma caracterização preliminar ainda revelou que tem um peso molecular na gama de 1.000-3.500 Da, e a massa dos PSLEMs variam entre 600 e 1100 Da, aproximadamente. O grupo de Boublik ainda relatou que estes dados sugerem que o consumo de café pode ser seguido por efeitos mediados via receptores de opiáceos, bem como pelos efeitos da cafeína.

Poucos estudos relatam a atividade das endomorfina após administração intraperitoneal em camundongos. Li e colaboradores (2001), em estudos com ratos e aplicação i.p. para a dor visceral, observaram que a endorfina-1 apresentou atividade antinociceptiva que também foi revertida na presença da naloxona. Outros estudos identificaram a ação sinérgica desses peptídeos nas vias descendentes inibitórias para dor, provocando a liberação de serotonina (5-HT) e noradrenalina, o que sugere que as endomorfina possam agir também nos receptores 5-HT e alfa adrenoreceptores localizados no corno dorsal da medula espinhal. A endorfina-2 também pode liberar a Met-enkefalina para agir nos receptores delta provocando antinocicepção. (Ohsawa et al., 2000; Tseng, 2002). Com base nessas informações, a possibilidade de os PSLEMs também apresentarem efeito antinociceptivo associado a outros receptores não pode ser descartada.

A via de administração dos peptídeos foi intraperitoneal e não intracerebroventricular (i.c.v.). A via i.c.v. permite a administração do fármaco direto no cérebro sem passar pela barreira hematoencefálica (Cook et al., 2009). Assim, devido à administração intraperitoneal dos peptídeos, foi possível inferir que eles podem ter atravessado a barreira hematoencefálica; essa barreira é rica em enzimas e separa o cérebro da circulação sistêmica, sendo considerada uma barreira que impede a ação de drogas no sistema nervoso central (SNC) (Witt e Daves, 2006). Muitos trabalhos disponíveis na literatura relatam que apenas moléculas com baixa massa molecular passariam pela barreira hematoencefálica (Janecka et al., 2010; Sato et al., 2006; Shechter et al., 2010). Entretanto, os peptídeos com aproximadamente 1000 Da podem ter atravessado, de acordo com o comportamento observado no teste. Novamente, não é possível afirmar a maneira pela qual ocorreu esse processo; se foram os peptídeos com os 11 ou 7 resíduos ou apenas a região presente no N-terminal YGG.

Os ensaios com o antagonista naloxona foram necessários para confirmar que a atividade analgésica dos peptídeos era proveniente de mecanismos opioides, os quais visam o bloqueio da nocicepção, a antinocicepção. Os resultados obtidos mostram que, na presença da naloxona, não houve atividade, sugerindo que são peptídeos agonistas de receptores opioides. No modelo de teste da placa quente houve atividade após a interrupção

da administração da naloxona, sugerindo que os peptídeos poderiam estar localizados nas vias modulatórias para controle de inibição da dor (vias ascendentes e descendentes), e que, na ausência do antagonista competitivo, conseguiram interagir e promover a antinocicepção.

Também foram utilizados a Leu-encefalina como controle positivo, um peptídeo endógeno que atua sobre receptores opioides, e quando administrada por via i.p. conjugada com a glicose atravessa a barreira hematoencefálica por meio de difusão mediada pelo transportador para glicose (GLU-T1) (Li et al., 2012; Polt et al., 1994). A morfina, que é considerada o controle positivo padrão para os tipos de testes realizados, também foi utilizada (teste de retirada da cauda e teste da placa quente) (Rang e Dale, 2011; Shechter et al., 2010).

Com os dados obtidos por meio dos experimentos, pode-se notar que os peptídeos apresentaram um perfil de atividade mais tardio e duradouro, o que pode ser atribuído à sua farmacocinética, já que a absorção pode ser que mais lenta quando comparada com a da morfina, devido ao tamanho da molécula. No que se refere às outras fases da farmacocinética, como a distribuição, o metabolismo e a excreção, esses não podem ser correlacionados, pois essas propriedades não foram avaliadas especificamente. Outro ponto relevante é o tempo de ação prolongado que pode ser devido à biodisponibilidade que os peptídeos apresentaram durante o ensaio, a qual pode constituir-se em uma das maiores adversidades na utilização de peptídeos para o desenvolvimento de possíveis candidatos a fármacos (Liskamp et al., 2011; Mason, 2010; Sato et al., 2006).

Quando ingeridos, os peptídeos bioativos, além de contribuir para o valor nutricional do alimento, também exercem efeito fisiológico. No caso dos peptídeos opioides, eles são absorvidos pela corrente sanguínea e muitos podem atravessar a barreira hematoencefálica provocando respostas farmacológicas semelhantes às da morfina. As principais respostas são em relação ao bloqueio do estímulo da dor, à antinocicepção, aos efeitos no controle do humor e ao controle da saciedade. (Peuhkuri et al., 2011; Wada e Lonnerdala, 2014). Esse também pode ser o motivo pelo qual os animais não se alimentavam durante o experimento, o que sugere a possível produção de fármacos utilizados na inibição do apetite.

CONCLUSÃO

A estratégia de análise *in silico* para identificar os peptídeos com estrutura análoga aos peptídeos opioides mostrou ser uma ferramenta valiosa para a sondagem de peptídeos com características de opiáceos.

Os processos de extração proteica e de digestão, *in vitro*, com pepsina imobilizada, mimetizando a atividade do organismo, mostraram ser uma estratégia eficiente para extrair os peptídeos encriptados na dehidrina, presente na fração proteica do grão verde de *Coffea arabica*. Para o grão torrado é preciso realizar outros métodos de extração proteica e preparo das amostras.

O modelo adaptado de testes em animais para caracterizar os peptídeos foi modificado com sucesso, pois nos possibilitou avaliar, de maneira mais eficiente, o ensaio de antinocicepção.

A descoberta dos peptídeos presentes na fração proteica de endosperma de *Coffea arabica* aliada ao conhecimento da possível ligação dos peptídeos contendo YGG na região N-terminal nos permitiu concluir que a atividade dos peptídeos no organismo do animal tem um efeito retardado, porém, mais duradouro que o da morfina.

Com os resultados obtidos no trabalho foi possível desenvolver um memorial de patente que foi submetido pela Embrapa e UnB ao INPI (Anexo).

REFERÊNCIAS

ACHESON, K. J.; et al. Caffeine and coffee: Their influence on metabolic rate and substrate utilization in normal weight and obese individuals. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 33, p. 989–997, 1980.

ACUNA, R.; BASSU, R. Coffee seeds contain 11S storage proteins. **Physologia Plantarum**, v. 20, p. 122–131, 1999.

ALLAGULOVA, C. H. R.; GIMALOV, F. R.; SHAKIROVA, F. M.; VAKHITOV, V. A. The plant dehydrins: structure and putative functions. **Biochemistry**, New York, v. 68, n. 9, p. 945-951, Sept. 2003.

AMORIN, H. V. Aspectos bioquímicos e histoquímicos do grão de café verde relacionados com deterioração da qualidade. 1978. 85p, Tese de doutorado em Bioquímica – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 1978.

ARCIERO, P. J.; *et al.* Effects of caffeine ingestion on NE kinetics, fat oxidation, and energy expenditure in younger and older men. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 268, n. 6, p. E1192–1198, 1 jun. 1995.

ARCIERO, P. J.; *et al.* Influence of age on the thermic response to caffeine in women. **Metabolism**, v. 49, n. 1, p. 101–107, 1 jan. 2000.

BARFIELD, E. T.; *et al.* B-Endorphin Modulates the Effect of Stress on Novelty-Suppressed Feeding. **Frontiers in behavioral neuroscience**, v. 7, n. March, p. 19, 2013.

BARON, D. A; MARTIN, D. M.; ABOL MAGD, S. Doping in sports and its spread to at-risk populations: an international review. **World psychiatry: official journal of the World Psychiatric Association (WPA)**, v. 6, n. June, p. 118–123, 2007.

BENOWITZ, N.L. Clinical pharmacology of caffeine. **Annu Rev Med**;41:277–88. 1990.

BERGE, O.-G. Predictive validity of behavioural animal models for chronic pain. **British journal of pharmacology**, v. 164, p. 1195–206, 2011.

BOEKEMA, J. M.; SAMSOM, G. P. VAN BE, P. Coffee and Gastrointestinal Function: Facts and Fiction: A Review. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, v. 34, n. 230, p. 35–39, 8 jan. 1999.

BOUBLIK, J. H.; *et al.* Coffee contains potent opiate receptor binding activity. **Nature**, v. 301, p. 246–248, 1983.

BRAGANÇA, G. G. F. Poder de Mercado do Café Brasileiro nos EUA: Abordagem via Demanda Residual. 2003. Dissertação de mestrado. 2003.

BRAND, G. D.; *et al.* Probing Protein Sequences as Sources for Encrypted Antimicrobial Peptides. **PLoS ONE**, v. 7, n. 9, 2012.

BRANTL, V.; *et al.* Novel Opioid Peptides Derived from Casein (β -Casomorphins). I. Isolation from Bovine Casein Peptone. **Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie**, v. 360, n. 2, p. 1211–1224, jan. 1979.

BRANTL, V.; *et al.* Novel opioid peptides derived from hemoglobin: hemorphins. **European journal of pharmacology**, v. 125, n. 2, p. 309–10, 17 jun. 1986.

BRAY, E. A. Molecular Responses to Water Deficit. **Plant physiology**, v. 103, n. 4, p. 1035–1040, dez. 1993.

BROWN, S.R.; CANN, P.A.; READ, N.W. Effect of coffee on distal colon function. **Gut**; 31:450–3. 1990.

CARVALHO, V.; CHAGAS, S.; SOUZA, S. Fatores que afetam a qualidade do café. **Informe Agropecuário, Belo ...**, 1997.

CHAN, W. **Fmoc solid phase peptide synthesis a practical approach**. New York: Oxford University Press, 2000.

CHANG, K.-J.; *et al.* Morphiceptin (NH₄-Tyr-Pro-Phe-Pro-CONH₂): A Potent and Specific Agonist for Morphine (μ) Receptors. **Science**, v. 212, p. 76–77, 1 abr. 1981.

CLIFFORD, M. N. Chlorogenic acids and other cinnamates - nature, occurrence and dietary burden. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 79, n. 3, p. 362–372, 1 mar. 1999.

CLOSE, T. J. Dehydrins: Emergence of a biochemical role of a family of plant dehydration proteins. **Physiologia Plantarum**, v. 97, n. 4, p. 795–803, ago. 1996.

CLOSE, T. J. Dehydrins: A commonality in the response of plants to dehydration and low temperature. **Physiologia Plantarum**, v. 100, n. 2, p. 291–296, jun. 1997.

COMB, M.; *et al.* Primary structure of the human Met- and Leu-enkephalin precursor and its mRNA. **Nature**, v. 295, n. 5851, p. 663–666, 25 fev. 1982.

CORNELIS, M. C.; *et al.* Coffee, CYP1A2 genotype, and risk of myocardial infarction. **JAMA**, v. 295, n. 10, p. 1135–41, 8 mar. 2006.

COURTWRIGHT, D. T. **Forces of Habit: Drugs and the Making of the Modern World**. [s.l.] Harvard University Press, 2009. p. 288

CSIKSZENTMIHALYI, M.; APPADURAI, A. The Social Life of Things: Commodities in Cultural Perspective. **Contemporary Sociology**, v. 17, p. 223, 1988.

DAMATTA, F. M. Exploring drought tolerance in coffee: a physiological approach with some insights for plant breeding. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 16, n. 1, p. 1–6, abr. 2004.

DAMATTA, F. M.; RAMALHO, J. D. C. Impacts of drought and temperature stress on coffee physiology and production: a review. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 18, n. 1, p. 55–81, mar. 2006.

DE CASTRO, R. D.; MARRACCINI, P. Cytology, biochemistry and molecular changes during coffee fruit development. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 18, n. 1, p. 175–199, mar. 2006.

DELGADO-ANDRADE, C.; RUFÍAN-HENARES, J. A.; MORALES, F. J. Assessing the Antioxidant Activity of Melanoidins from Coffee Brews by Different Antioxidant Methods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 20, p. 7832–7836, 2005.

DULLOO, A.; *et al.* Normal caffeine consumption: influence on thermogenesis and daily energy expenditure in lean and postobese human volunteers. **Am J Clin Nutr**, v. 49, n. 1, p. 44–50, 1 jan. 1989.

DURAFFOURD, C.; *et al.* Mu-opioid receptors and dietary protein stimulate a gut-brain neural circuitry limiting food intake. **Cell**, v. 150, n. 2, p. 377–88, 20 jul. 2012.

DURÁNTEZ, E.R.; *et al.* Attenuation of acute and chronic effects of morphine by the imidazoline receptor ligand 2-(2-benzofuranyl)-2-imidazoline in rat locus coeruleus neurons. **British journal of pharmacology**. vol 138, p. 494-500, 2003.

DURE, L. A repeating 11-mer amino acid motif and plant desiccation. **The Plant Journal**, v. 3, n. 3, p. 363–369, 24 mar. 1993.

ERSPAMER, V.; *et al.* Deltorphins: a family of naturally occurring peptides with high affinity and selectivity for delta opioid binding sites. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 86, n. 13, p. 5188–92, jul. 1989.

FARAH, A.; DONANGELO, C. M. Phenolic compounds in coffee. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 18, n. 1, p. 23–36, mar. 2006.

FAZUOLI, L. C.; BRAGHINI, M. T.; MISTRO, J. C.; SILVAROLLA, M. B. Café robusta: uma nova opção para a cafeicultura paulista. **O Agrônômico**, Campinas, v. 59, n. 1, p. 71-74, jan. 2007.

Felipe Vinecky. Identificação e Caracterização de Genes Candidatos para a Tolerância à Seca em Cafeeiro. 2009. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras. 2009.

FICHNA, J.; *et al.* Antidepressant-like effect of endomorphin-1 and endomorphin-2 in mice. **Neuropsychopharmacology: official publication of the American College of Neuropsychopharmacology**, v. 32, n. 4, p. 813–21, 5 abr. 2007.

FINOT, P.A.; MAGNENAT, E. Metabolic transit of early and advanced Maillard products. **Prog Food Nutr Sci**; 5:193–207. 1981.

FISHER, D.; *et al.* First-in-man evaluation of PF329, a abuse-resistant prodrug of hydromorphone. **The Journal of Pain**, v. 13, n. 4, p. S76, 4 abr. 2012.

FOLTZ, M.; *et al.* Protein Hydrolysates Induce CCK Release from Enteroendocrine Cells and Act as Partial Agonists of the CCK1 Receptor. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 3, p. 837–843, 2008.

FÜRST, S. Transmitters involved in antinociception in the spinal cord. **Brain Research Bulletin**, v. 48, n. 2, p. 129–141, jan. 1999.

GIORGINI, J. F.; CAMPOS, C. A S. P. Changes in the content of soluble sugars and starch synthesis and degradation during germination and seedling growth of *Coffea arabica* L. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 4, n. 1, p. 11–15, 1992.

GOLDBERG, J. S. Stereochemical basis for a unified structure activity theory of aromatic and heterocyclic rings in selected opioids and opioid peptides. **Perspectives in medicinal chemistry**, v. 4, p. 1–10, jan. 2010.

GORZO, A.B.; *et al.* Increased morphine analgesia and reduced side effects in mice lacking the *tac1* gene. **British journal of pharmacology**. vol. 160, p. 1443-1452, 2010.

GUANG, C.; PHILLIPS, R. D. Plant Food-Derived Angiotensin I Converting Enzyme Inhibitory Peptides. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 12, p. 5113–5120, 2009.

Gustein, H. B. & Akil, Huda. Opioid analgesics, In: Goodman & Gilman's The pharmacological basis of therapeutics. 11^h. Ed, 2006. **The McGraw-Hill Companies**, Inc, New York. 2006.

HACHMANN, J.; LEBL, M. Alternative to piperidine in Fmoc solid-phase synthesis. **Journal of Combinatorial Chemistry**, v. 8, n. 2, p. 149, 2006.

HANLON, K. E.; *et al.* Novel peptide ligands with dual acting pharmacophores designed for the pathophysiology of neuropathic pain. **Brain research**, v. 1395, p. 1–11, 13 jun. 2011.

HAO, S.; *et al.* The role of TNF α in the periaqueductal gray during naloxone-precipitated morphine withdrawal in rats. **Neuropsychopharmacology: official publication of the American College of Neuropsychopharmacology**, v. 36, n. 3, p. 664–676, 2011.

HARTMANN, R.; MEISEL, H. Food-derived peptides with biological activity: from research to food applications. **Current opinion in biotechnology**, v. 18, n. 2, p. 163–9, abr. 2007.

HINNIGER, C.; *et al.* Isolation and characterization of cDNA encoding three dehydrins expressed during *Coffea canephora* (Robusta) grain development. **Annals of botany**, v. 97, n. 5, p. 755–65, 1 maio 2006.

HOLZER, P. Opioid receptors in the gastrointestinal tract. **Regulatory peptides**, v. 155, n. 1-3, p. 11–7, 5 jun. 2009.

HUGHES, J.; *et al.* Identification of two related pentapeptides from the brain with potent opiate agonist activity. **Nature**, v. 258, n. 5536, p. 577–579, 18 dez. 1975.

ILLY, A.; VIANI, R.; Espresso Coffee: the Science of Quality; 2nd ed., **Elsevier Academic Press**: London, p. 398. 2005.

JACOB, H. E. **Coffee: The Epic of a Commodity**. Trans. Eden and Cedar Paul. Short Hills, N.J.: Burford Books, 1935.

KANE, B. E.; SVENSSON, B.; FERGUSON, D. M. Molecular recognition of opioid receptor ligands. **The AAPS journal**, v. 8, n. 1, p. E126–37, jan. 2006.

KOAG, M.-C.; *et al.* The binding of maize DHN1 to lipid vesicles. Gain of structure and lipid specificity. **Plant physiology**, v. 131, n. 1, p. 309–16, 1 jan. 2003.

KORHONEN, H. Milk-derived bioactive peptides: From science to applications. **Journal of Functional Foods**, v. 1, n. 2, p. 177–187, abr. 2009.

KREIL, G.; *et al.* Deltorphin, a novel amphibian skin peptide with high selectivity and affinity for δ opioid receptors. **European Journal of Pharmacology**, v. 162, n. 1, p. 123–128, mar. 1989.

KY, C.-L.; *et al.* Caffeine, trigonelline, chlorogenic acids and sucrose diversity in wild *Coffea arabica* L. and *C. canephora* P. accessions. **Food Chemistry**, v. 75, n. 2, p. 223–230, nov. 2001.

LASHERMES, P.; *et al.* Molecular characterisation and origin of the *Coffea arabica* L. Genome. **Molecular and General Genetics**, v. 261, p. 259–266, 1999.

LAW, P.Y.; LOH, H. H. Opioid receptors. **Encyclopedia of biological chemistry**. vol.3, p. 167-171, 2004.

LE BARS, D.; GOZARIU, M.; CADDEN, S. W. Animal Models of Nociception. **Pharmacol. Rev.**, v. 53, n. 4, p. 597–652, 1 dez. 2001.

LI, J.-X.; ZHANG, Y.; WINTER, J. C. Morphine-induced antinociception in the rat: supra-additive interactions with imidazoline I₂ receptor ligands. **European journal of pharmacology**, v. 669, n. 1-3, p. 59–65, 1 nov. 2011.

LIEB, K. **Hirndoping. Warum wir nicht alles schlucken sollten**. Mannheim: Artemis & Winkler, 2010.

LUDWIG, E.; *et al.* Investigations of peptides and proteases in green coffee beans. **European Food Research and Technology**, v. 211, p. 111–116, 2000.

MAILLARD, L.C. Action des acides aminés sur les sucres; formation des mélanoidines par voie méthodique. **C R Acad Sci** 154: 66-68. 1912.

MARRACCINI, P.; *et al.* Molecular and biochemical characterization of endo- β -mannanases from germinating coffee (*Coffea arabica*) grains. **Planta**, v. 213, p. 296–308, 2001.

MARRACCINI, P.; *et al.* Biochemical and molecular characterization of alpha-D-galactosidase from coffee beans. **Plant physiology and biochemistry : PPB / Société française de physiologie végétale**, v. 43, n. 10-11, p. 909–20, jan. 2005.

MEISEL, H. Biochemical properties of peptides encrypted in bovine milk proteins. **Current, medicinal chemistry**, n. 12, p.1905-1919, 2005.

MEISEL, H.; BOCKELMANN, W. Bioactive peptides encrypted in milk proteins: Proteolytic activation and thropho-functional properties. **Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 76, p. 207–215, 1999.

MILLAN, M. J. Descending control of pain. **Progress in Neurobiology**, v. 66, n. 6, p. 355–474, abr. 2002.

MONDEGO, J. M.; *et al.* An EST-based analysis identifies new genes and reveals distinctive gene expression features of Coffea arabica and Coffea canephora. **BMC plant biology**, v. 11, n. 1, p. 30, jan. 2011.

MONTAVON, P.; *et al.* Evolution of green coffee protein profiles with maturation and relationship to coffee cup quality. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 51, n. 8, p. 2328–34, 9 abr. 2003.

MÜLLER, S. A.; *et al.* Randomized clinical trial on the effect of coffee on postoperative ileus following elective colectomy. **British Journal of Surgery**, v. 99, p. 1530–1538, 2012.

MÜLLER-LISSNER, S. A.; *et al.* The perceived effect of various foods and beverages on stool consistency. **European Journal of Gastroenterology & Hepatology**, v. 17, n. 1, 2005.

MUÑOZ, M.R.; *et al.* The Mu- opioid receptor and the NMDA receptor associate in PAG neurons: implications in pain control. **Nature neuropsychopharmacology**. vol.37, p. 338-349, 2012.

MURTHY, P. S.; NAIDU, M. M. Recovery of Phenolic Antioxidants and Functional Compounds from Coffee Industry By-Products. **Food and Bioprocess Technology**, v. 5, p. 897–903, 2012.

NEVES, C.A. – Estória do Café. Instituto Brasileiro do Café, Rio de Janeiro, 52p, 1974.

NISHI, T.; *et al.* The Soybean {beta}-Conglycinin {beta} 51-63 Fragment Suppresses Appetite by Stimulating Cholecystokinin Release in Rats. **J. Nutr.**, v. 133, n. 8, p. 2537–2542, 1 ago. 2003.

NODA, M.; *et al.* Isolation and structural organization of the human preproenkephalin gene. **Nature**, v. 297, n. 5865, p. 431–434, 3 jun. 1982.

NYLANDER, M.; *et al.* Stress-induced accumulation and tissue-specific localization of dehydrins in Arabidopsis thaliana. **Plant Molecular Biology**, v. 45, p. 263–279, 2001.

OLIVEIRA, J. T. de – HISTÓRIA DO CAFÉ no Brasil e no Mundo -Livro. 2^a Ed. Francisco Alves. 2004.

PEUHKURI, K., SIHVOLA, N., AND KORPELA, R. Dietary proteins and food related reward signals. **Food & Nutrition research**. N. 55 5955, 2011.

POLLAN, M. **The Botany of Desire: A Plant's-eye View of the World**. New York: Random House, 2002.

PREEDY, V. R. - Coffee in Health and Disease Prevention - **Academic Press** 1080p. 2014.

PRITCHARD, J. K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**, v. 155, n. 2, p. 945–959, 2000.

PROZOROVSKI, I.D.; POZHAROVA, A.V. The effect of coffee and of some of its substitutes upon the disease-producing lowest organisms. **St. Petersburg: A. V. Pozharova**; 1893.

RAMALAKSHMI, K.; *et al.* Bioactivities of low-grade green coffee and spent coffee in different in vitro model systems. **Food Chemistry**, v. 115, n. 1, p. 79–85, jul. 2009.

RANG, H.P.; DALE, M.M. Rang & Dale farmacologia. 7 ed. **Elsevier**, Rio de Janeiro, p. 503- 507, 2012.

RAO, S. S.; *et al.* Is coffee a colonic stimulant? **European journal of gastroenterology & hepatology**, v. 10, n. 2, p. 113–118, fev. 1998.

REICHARDT, N.; *et al.* Characterization of high molecular weight coffee fractions and their fermentation by human intestinal microbiota. **Molecular nutrition & food research**, v. 53, n. 2, p. 287–99, fev. 2009.

ROGERS, W. J.; *et al.* Biochemical and molecular characterization and expression of the 11S-type storage protein from *Coffea arabica* endosperm. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 37, n. 4, p. 261–272, abr. 1999.

RUFÍAN-HENARES, J. A.; DE LA CUEVA, S. P. Antimicrobial activity of coffee melanoidins—a study of their metal-chelating properties. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 57, n. 2, p. 432–8, 28 jan. 2009.

RUFÍAN-HENARES, J. A.; MORALES, F. J. Angiotensin-I converting enzyme inhibitory activity of coffee melanoidins. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 55, n. 4, p. 1480–5, 21 fev. 2007.

RUFÍAN-HENARES, J. A.; MORALES, F. J. Effect of in vitro enzymatic digestion on antioxidant activity of coffee melanoidins and fractions. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 55, n. 24, p. 10016–21, 28 nov. 2007.

RUFÍAN-HENARES, J. A.; MORALES, F. J. Antimicrobial activity of melanoidins against *Escherichia coli* is mediated by a membrane-damage mechanism. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 56, n. 7, p. 2357–62, 9 abr. 2008.

SANTOS, A. B.; MAZZAFERA, P. Dehydrins Are Highly Expressed in Water-Stressed Plants of Two Coffee Species. **Tropical Plant Biology**, v. 5, p. 218–232, 2012.

SCHILTER, B.; *et al.* Em Coffee: Recent Developments; Clarke, R. J.; Vitzthum, O. G., eds., **Blackwell Science**: London, 2001.

SHAN, J.; *et al.* Chlorogenic acid inhibits lipopolysaccharide-induced cyclooxygenase-2 expression in RAW264.7 cells through suppressing NF-kappaB and JNK/AP-1 activation. **International immunopharmacology**, v. 9, n. 9, p. 1042–8, ago. 2009.

SHEWRY, P. R.; NAPIER, J. A.; TATHAM, A. S. Seed storage proteins: structures and biosynthesis. **The Plant cell**, v. 7, n. 7, p. 945–56, jul. 1995.

SHIMIZU, M. M.; MAZZAFERA, P. A Role for Trigonelline During Imbibition and Germination of Coffee Seeds. **Plant Biology**, v. 2, n. 6, p. 605–611, nov. 2000.

SMITH, A. W. Em Coffee: Chemistry; Clarke, R. J.; Macrae, R., eds.; **Elsevier Applied Science Publishers**: London, vol. 1, 1987.

SPILLER, M. A. The chemical components of coffee. **Progress in clinical and biological research**, v. 158, p. 91–147, 1984.

TUCHSCHERER, M. “Yemen.” The Global Coffee Economy in Africa, Asia and Latin America: 1500–1989. Ed. William Clarence-Smith and Steven Topik. New York: **Cambridge University Press**. 2003.

TOPIK, S. Coffee as a Social Drug. **Cultural Critique**, v. 71, p. 81–106, 2009.

URGERT, R.; KATAN, M. B. The cholesterol-raising factor from coffee beans. **Journal of the Royal Society of Medicine**, v. 89, n. 11, p. 618–23, nov. 1996.

VAN KLEEF, E.; *et al.* Successful development of satiety enhancing food products: towards a multidisciplinary agenda of research challenges. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 52, n. 7, p. 611–28, 24 jan. 2012.

VIDAL, R. O.; *et al.* A high-throughput data mining of single nucleotide polymorphisms in Coffea species expressed sequence tags suggests differential homeologous gene expression in the allotetraploid Coffea arabica. **Plant physiology**, v. 154, n. 3, p. 1053–66, 1 nov. 2010.

VIEIRA, L. G. E.; *et al.* Brazilian coffee genome project: an EST-based genomic resource. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 18, n. 1, p. 95–108, mar. 2006.

VIEIRA, N. G.; *et al.* Different Molecular Mechanisms Account for Drought Tolerance in Coffea canephora var. Conilon. **Tropical Plant Biology**, v. 6, p. 181–190, 2013.

VIEIRA, R. M.; ZARATE JR, C. A. Proof of concept trials in bipolar disorder and major depressive disorder: a translational perspective in the search for improved treatments. **Depress anxiety**. vol. 28, p. 267-281, 2011.

VINECKY, F.; BRITO, K. M. de; SILVA, F. R. da; ANDRADE, A. C. Análise *in silico* de genes potencialmente envolvidos na resposta aos estresses abióticos, presentes na base de dados do Genoma Café. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 4., 2005, Londrina, PR. **Anais...** Brasília, DF: Embrapa Café, 2005. CD-ROM.

VINECKY F.; *et al.* Effects of water stress on bean biochemical composition of *Coffea Arabica* cv. Rubi. In: Association for Science and Information on Coffee ASIC (ed) **Proceedings** of the 23rd International Conference on Coffee Science, Bali, 2010.

WADA, Y.; LÖNNERDAL, B. Bioactive peptides derived from human milk proteins--mechanisms of action. **The Journal of nutritional biochemistry**, v. 25, n. 5, p. 503–14, maio 2014.

WALLACE, C.L.H. Cholera: its cause and cure. **The Herald of Health through Tea Coffee Trade J**; XIV:22. 1908.

WEBER, J. G.; *et al.* Prophylactic Intravenous Administration of Caffeine and Recovery After Ambulatory Surgical Procedures. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 72, n. 7, p. 621–626, 7 jul. 1997.

WEINBERG, B. A.; BEALER, B. K. **The World of Caffeine: The Science and Culture of the World's Most Popular Drug**. New York: Routledge, 2001.

WILD, A. Coffee: A Dark History. **New York: W. W. Norton**. 2004.

YANG, S.; *et al.* Rubiscolin, a δ selective opioid peptide derived from plant Rubisco. **FEBS Letters**, v. 509, n. 2, p. 213–217, 7 dez. 2001.

ZADINA, J. E.; *et al.* A potent and selective endogenous agonist for the mu-opiate receptor. **Nature**, v. 386, n. 6624, p. 499–502, 3 abr. 1997.

ZHU, J.-K. Cell signaling under salt, water and cold stresses. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 4, n. 5, p. 401–406, out. 2001.

Sites Visitados:

World Anti-Doping Agency (WADA): <http://www.wadaama.org/en/World-Anti-Doping-Program/Sports-and-Anti-Doping-Organizations/International-Standards/Prohibited-List/> accessed Feb. 2013.

[http://www.consorcioesquisacafe.com.br/index.php/component/content/article/40-fixo/490-acaua acessado em 21/12/2014](http://www.consorcioesquisacafe.com.br/index.php/component/content/article/40-fixo/490-acaua%20acessado%20em%2021/12/2014)

ABIC – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE CAFÉ. Disponível em: <www.abic.com.br>. Acesso em 13 Jul. 2014.

ANEXOS



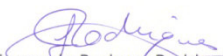
Brasília, 08 de janeiro de 2013.



DECLARAÇÃO

Declaramos que o projeto intitulado **"INVESTIGAÇÃO DOS EFEITOS FARMACOLÓGICOS IN VITRO, IN SITU E IN VIVO DE COMPOSTOS BIOATIVOS LIVRES OU ENCAPSULADOS EM NANOSSISTEMAS DE LIBERAÇÃO SUSTENTADA."**, UnBDOC n.º 131758/2012, sob responsabilidade do pesquisador Luciano Paulino da Silva foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília.




Prof. Fernando Pacheco Rodrigues
Vice-Coordenador da CEUA



Espaço reservado para o protocolo

Espaço reservado para a etiqueta

Espaço reservado para o código QR



INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL
Sistema de Gestão da Qualidade
Diretoria de Patentes

DIRPA	Tipo do Documento: Formulário	DIRPA	Página: 1/3
Título do Documento Depósito de Pedido de Patente		Código: FQ001	Versão 2
		Procedimento: DIRPA- PQ006	

Ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial:

O requerente solicita a concessão de um privilégio na natureza e nas condições abaixo indicadas

1. Depositante (71):

- 1.1 Nome: **Embrapa - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária**
- 1.2 Qualificação: **Empresa Pública**
- 1.3 CNPJ/CPF: **00.348.003/0001-10**
- 1.4 Endereço Completo: **PqEB Parque Estação Biológica - Edifício Sede - Final W/3 Norte - Brasília - DF**
- 1.5 CEP: **70770-901**
- 1.6 Telefone: **(61) 3448.4545**
- 1.7 Fax: **(61) 3348.4158**
- 1.8 E-Mail : **chefia.sne@embrapa.br**

continua em folha anexa

- 2. Natureza** Invenção Modelo de Utilidade Certificado de Adição