

ANÁLISE DE EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE PROTEASES EM SEMENTES DE *Coffea arabica*

Paula Yuri YAMAMOTO¹, E-mail: paulayamamoto@gmail.com.br; Paula Macedo NOBILE¹; Hellen Marília Couto de ABREU²; Paulo MAZZAFERA²; Carlos Augusto COLOMBO¹

¹Instituto Agronômico de Campinas - Genética, Campinas, SP; ²UNICAMP – Instituto de Biociências, Campinas, SP.

Resumo:

Cafés colhidos em regiões mais quentes apresentaram diferenças marcantes na qualidade da bebida ao mesmo tempo que níveis diferenciados de atividade de proteases. Diante dessas evidências observadas em nossos laboratórios, o presente estudo teve por objetivo estudar a expressão de genes envolvidos na produção de proteases em frutos de uma mesma variedade de café em diferentes estádios de desenvolvimento e de dois locais edafoclimaticamente distintos (Adamantina e Mococa). Cinco genes representando proteases do grupo asparagina e cisteína foram adotados para estudo de expressão diferencial em função de terem sido encontrados apenas em bibliotecas de fruto do banco de ESTs do Genoma café. Paralelamente, foram testados quatro genes constitutivos para serem utilizados como normalizadores da técnica de RT-PCR em frutos de café, tendo sido adotados GPDH C e CyP. As maiores diferenças de expressão foram observadas entre os diferentes estádios de maturação (frutos verdes e cerejas). Dentre os frutos coletados em Mococa, o verde expressou até 13,93 vezes mais que o cereja para o gene de Cis 5. Por outro lado, essa diferença de expressão não foi observada entre os dois estádios de maturação dos frutos de Adamantina. O gene Cis 8 de fruto verde foi mais expresso em ambas as localidades. O gene de Cis 22 apresentou menor taxa de transcrição no fruto verde que em fruto cereja, nas duas localidades avaliadas. Estes dados mostram que as transcrições desses genes variam durante a maturação dos frutos do café e provavelmente são influenciadas pelas condições ambientais de cultivo. Para avaliar a expressão diferencial das proteases em locais de cultivo que apresentam temperaturas contrastantes foram utilizados frutos em mesmo estágio de desenvolvimento, variando apenas a localidade. Três genes de cisteína revelaram valores significativos de diferença de expressão em Adamantina em relação a Mococa. No estágio cereja foi detectada uma diferença de expressão de protease aproximadamente 5 vezes maior em Adamantina em relação a Mococa para o gene Cis 5. Ao contrário, nos frutos verdes a expressão da Cis 5 foi em média três vezes maior em Mococa, onde a temperatura média anual é mais baixa do que em Adamantina. O gene similar a Cis 5, que codifica uma cisteína endopeptidase do tipo papaína do grão de mamona (*Ricinus communis* L.) possui a capacidade de processar o precursor da proteína *glyoxysomal malate dehydrogenase* e a literatura sugere que esta enzima tem como função transferir os metabólicos de um tecido para outro emergente. Apesar da influência das proteases na qualidade de bebida do café ainda dependa de análises bioquímicas e sensoriais, foi possível elucidar o estabelecimento de uma estreita relação na expressão dessas enzimas com fatores ambientais.

Palavras-chave: qualidade de bebida, nutrição, nutracêutico, café, RT-PCR

ANALYSES OF THE EXPRESSION PATTERN OF PROTEASE-CODING GENES IN *Coffea Arabica*

Abstract:

Coffee grains harvested from regions with warmer climates produce distinctly different coffee drinks and simultaneously, present differential levels of protease activity. Based on evidences from our work along this research line, the present study aimed to profile the expression of genes involved in protease production in fruits of a coffee variety along the developmental stages and cultivated under distinct edapho-climatic sites (Adamantina and Mococa). Five genes representing proteases from asparagines and cysteine group were chosen for the expression analyses due to the fact that the corresponding ESTs were fruit-specific in *Coffea* Genoma databases. Simultaneously, we have investigated four constitutively expressed genes as normalizers for RT-PCR assays in coffee grains and have adopted GPDH C and CYP. The most significant expression differences were observed between the fruit ripening stages (green and “cherry” stage). Among the fruits harvested in Mococa, green fruits had up to 13.93 times higher levels of Cis 5 gene expression than observed in “cherry” stage fruits. In contrast, the expression pattern from fruits harvested from Adamantina did not present the fore mentioned difference. Cis 8 gene was highly expressed in green fruits from both locations. Gene Cis 22 presented lower expression rates in green fruits in comparison to “cherry” fruits in both locations. Taken together, our data demonstrate that the expression rates of these genes is variable along fruit ripening and are likely to be influenced by environmental crop conditions. In order to evaluate the differential expression of proteases in distinct cultivation sites showing contrasting temperature conditions, we have investigated the expression patterns of these genes in fruits harvested at the same developmental stage harvested in distinct locations. Three cysteine genes presented significant differential expression patterns in Adamantina, in comparison to Mococa. At “cherry” stage, the difference between the expression of protease gene Cis 5 was approximately 5-fold higher in Adamantina in comparison to its expression in Mococa. In contrast, in green fruits the expression of Cis 5 was, on average, a 3-fold higher in Mococa, where the mean annual temperature is

lower than in Adamantina. A Cis 5-like gene that codes for a papain-type cysteine-endopeptidase from castorbean (*Ricinus communis* L.) is capable of processing the precursor of glyoxysomal malate dehydrogenase and it has been suggested that this enzyme functions in metabolite transfer from older to newly formed tissues. Although the determination of the influence of proteases on coffee drink needs further biochemical and sensorial analyses, it was possible to establish a close correlation between the expression of this enzyme and environmental factors.

Key words: cup quality, nutrition, nutraceutic, coffee, RT-PCR

Introdução

O termo protease inclui enzimas chamadas de proteinases ou endopeptidases, quando degradam proteínas intactas, e as denominadas exopeptidases, que degradam ligações peptídicas específicas, ou seja, que necessitam de uma posição terminal para gerar a especificidade (Barret, 1986). Estas últimas poderiam ser divididas ainda em carboxi ou amino peptidases, dependendo da posição terminal gerando a especificidade (Brzin & Kidric, 1995). Proteinases são classificadas em quatro grupos: serina, cisteína, aspártico e metaloproteinases. A classificação se dá em função da presença de um aminoácido específico ou de íon metálico no sítio catalítico da enzima (Barret, 1986). Na planta, os substratos das enzimas de cada grupo variam sobremaneira, sendo de difícil caracterização, sobretudo nos estudos *in vitro*, onde há a presença de exopeptidases. O controle do processo proteolítico é praticamente desconhecido e existem várias hipóteses de como ele pode ser desencadeado em nível celular, porém quase nada se conhece em nível molecular. A natureza dos estímulos celulares seria, por exemplo, influenciada pelo metabolismo de lipídeos no nível das proteínas de membrana, pela interação de proteínas com moléculas de pequena massa molecular que afetaria a suscetibilidade ao ataque por proteases, ao efeito do pH celular, íons inorgânicos, compartimentalização celular, etc (Feller, 1986; Brzin and Kidric, 1995). Em um modelo proposto por Hensel et al. (1993), a diminuição da fotossíntese e, conseqüentemente, de certos metabólitos fotossintéticos, atuam reprimindo genes associados com a senescência, desencadeando uma sequência de eventos, entre eles a proteólise em maior intensidade. Em café, o aroma pode ser formado por mais de 800 compostos voláteis e os precursores relacionados com a formação dos mesmos são açúcares, aminoácidos, peptídeos, trigonelina, ácidos clorogênicos, ácidos orgânicos, lipídeos e carotenóides (Clifford, 1985). Interações entre açúcares redutores e o grupamento amino de aminoácidos e peptídeos, ou mesmo de proteínas (reação de Maillard) é tida como essencial para o desenvolvimento de aroma. Além do conteúdo endógeno, outra fonte de açúcares para a ocorrência da reação de Maillard são os açúcares redutores formados durante a torração a partir da quebra da sacarose presente na semente e acumulada durante sua formação. Porém, segundo Montavon et al. (2003), não existe nenhuma evidência clara de que as proteínas de reserva poderiam atuar como precursoras de aroma ou sabor a partir da degradação das mesmas por proteases específicas. Selmar et al. (2001) destacam que alanina é um importante aminoácido no desenvolvimento de compostos durante a torração de café, através da reação de Maillard. Junto com asparagina, ácido glutâmico, ácido aspártico e serina, estes aminoácidos livres representam aproximadamente 80% da composição total em sementes de café (Arnold and Ludwig, 1996; Shimizu and Mazzafera, 2000). Por outro lado, alanina não está entre os aminoácidos mais abundantes na principal proteína de reserva em café (Rogers et al., 1999), como também não está entre os aminoácidos em maior quantidade quando analisada a constituição de aminoácidos no hidrolisado de proteínas totais da semente de café (Shimizu and Mazzafera, 2000). Segundo Ludwig et al. (2000), sementes de café apresentam atividade de protease. Recentemente, sementes de *C. arabica* cv. Obatã procedentes de localidades do estado de São Paulo com temperaturas médias anuais divergentes, ou seja, mais quente e mais amena, apresentaram níveis de atividade de proteases, de proteína total e amino ácidos contrastantes. Estes estudos foram realizados por Silva et al. (2005), sendo que a localidade de temperatura mais elevada (Adamantina) apresentou os maiores níveis dessas substâncias do que outras duas localidades, cujas temperaturas médias anuais são mais amenas (Mococa e Campinas), sugerindo que temperatura pode influenciar a composição de proteases em café. Diante dessas evidências, o presente estudo foi idealizado com o propósito de verificar se genes com elevada identidade com proteases de plantas e presentes no banco de ESTs do projeto nacional genoma do cafeeiro apresentam níveis de expressão diferenciados a partir da análise de frutos obtidos destas duas localidades.

Material e Métodos

Material vegetal

Frutos de *Coffea arabica* coletados em Mococa e Adamantina, ambos os municípios do estado de São Paulo e com temperatura média anual de 20 e 25°C, respectivamente, e em dois estádios de desenvolvimento do fruto, verde e cereja.

Extração de RNA e síntese de cDNA

O RNA total foi extraído utilizando o reagente TRIzol, *Invitrogen*, CA/EUA com a subseqüente síntese de cDNA (*ImProm-IITM Reverse Transcriptase*, *Promega*), com monitoramento por espectrofotometria de massa e em géis de agarose, visando refinada padronização na concentração de cDNA entre as amostras para a análise de expressão diferencial. Os cDNAs obtidos foram testados por meio de reação de PCR com os *primers* sintetizados (proteases e normalizadores) utilizando as mesmas condições exigidas para o PCR em tempo real.

PCR em Tempo Real

As reações foram realizadas a partir de 2µl de cDNA (diluição 1:40), 0,15mM de cada *primer* (*forward* e *reverse*) e 6,25 µl de *Syber Green PCR Master Mix* (*Applied Biosystems*), em um volume final de 12µl. Cada amostra foi processada em triplicata, considerando sempre uma reação sem cDNA (branco). As PCRs foram analisadas no equipamento *ABI PRISM 7500 Sequence Detection System*, da *Applied Biosystems*, com ciclo de amplificação: 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos, seguindo 40 ciclos de 94°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. A especificidade dos produtos amplificados foi avaliada pela análise da curva de dissociação gerada pelo equipamento (valores de Ct - *Cycle threshold*). Com a finalidade de calcular a quantidade relativa gerada do gene alvo em cada amostra, um valor específico de Ct foi criado. A média da triplicata do valor de Ct do gene alvo em uma amostra teste é subtraída pela média do Ct de um normalizador (controle endógeno) da mesma amostra (CT = CT alvo – CT normalizador). Para uma amostra usada como base comparativa dos resultados de expressão (calibrador) o cálculo é feito da mesma maneira, subtraindo do valor de Ct do gene alvo pelo Ct do normalizador em questão (CT = CT alvo – CT normalizador). A diferença entre os dois valores obtidos, da amostra teste e do calibrador é representada pela expressão: CT = .CT amostra teste – CT amostra calibrador, ou seja, $\Delta\Delta Ct$. Calculando-se $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak and Schmittgen, 2001) tem-se o número que indica quantas vezes a expressão do gene alvo se dá em uma amostra (teste) em relação à outra (calibrador), sendo considerada uma diferença significativa a partir de duas vezes. Como foram utilizados dois normalizadores para cada gene (GPDH C e CYP) a expressão diferencial só foi considerada significativa quando a média entre os dois normalizadores foi maior que 2 vezes. Os genes alvo do estudo foram protease do tipo cisteína (Cis 5, 8, 22 e 23) e ácido aspártico (Asp 1), respectivamente correspondentes aos primeiros *blast hits*: gi|2944446 (cysteine endopeptidase precursor de *Ricinus communis*), gi|18414611 (cysteine-type endopeptidase/ cysteine-type peptidase de *Arabidopsis thaliana*), [gi|17979125](#) (putative cysteine proteinase de *Arabidopsis thaliana*), [gi|109390302](#) (cysteine protease de *Hevea brasiliensis*), e [gi|82623417](#) (aspartic protease precursor-like de *Solanum tuberosum*).

Resultados e Discussão

As amplificações teste dos genes adotados para estudo produziram fragmentos robustos e de tamanho equivalente aos produtos esperados, exceto para ubiquitina, que foi excluído do estudo. Quatro genes foram testados como normalizadores: gliceraldeído-3-fosfato-dehidrogenase, citolítico (GPDH C), proteína ribossomal (S19), ciclofilina (Cyp) e actina (ACT). Duas e três fases do desenvolvimento endosperma e do perisperma dos frutos de café coletados, respectivamente, foram avaliadas quanto ao nível transcricional para determinar a estabilidade de expressão dos genes constitutivos. O perfil transcricional do RNA dos quatro genes constitutivos sofreu pequenas variações quando comparado cada gene nas diferentes amostras, mas fica claro que esta variação é maior quando comparado às amostras de diferentes tecidos (Figura 1). De acordo com Vandesompele *et al.* (2002), pelo menos dois ou três genes constitutivos devem ser utilizados com padrão interno para evitar erros relativamente grandes. Foi utilizada a análise estatística conhecida por *geNorm*, que permite escolher os melhores genes constitutivos. De acordo com Vandesompele *et al.* (2002), são definidos dois parâmetros para quantificar a estabilidade do gene constitutivo: M (média da estabilidade de expressão) e V (*pairwise variation*). Um baixo valor de M é indicativo de expressão mais estável e, por sua vez, quanto mais estável mais adequado como normalizador. Por este parâmetro os genes mais estáveis foram o GPDH C e o S19, para os diferentes estágios de maturação, tanto entre como dentro os tecidos, cujos menores valores de M encontram-se resumidos na Tabela 1. Foi encontrada uma diferença numérica nos cálculos $2^{-\Delta\Delta Ct}$ entre dois normalizadores utilizados para o estudo de expressão das proteases, diferença que está coerente com o padrão de expressão de cada amostra, sendo que, de um modo geral, o normalizador GPDH, que foi estabelecido como o gene mais estável, apresentou maiores diferenças de expressão que o CYP (Tabelas 2 e 3). Os valores médios entre eles fornecem maior consistência aos dados, por isto, foram adotados para a avaliação de expressão diferencial.

Foram realizados dois cálculos de expressão diferencial das proteases, um para avaliar o estágio de maturação dos frutos de *C. arabica* (verde e cereja) e o outro para as localidades que apresentam médias de temperaturas anuais contrastantes (Adamantina e Mococa). As maiores diferenças de expressão foram observadas entre os diferentes estágios de maturação, em frutos verdes e cerejas. Dentro os frutos coletados em Mococa, o verde expressou até 13,93 vezes mais expressão que o cereja para o gene de Cis 5 (Tabela 2). Por outro lado, essa diferença altamente significativa de expressão não foi observada entre os dois estágios de maturação de frutos de Adamantina. O gene Cis 8 do fruto verde foi mais expresso em ambas as localidades. O gene Cis 22 apresentou menor taxa de transcrição no fruto verde que no fruto cereja nas duas localidades avaliadas. Estes dados mostram que as transcrições desses genes variam durante a maturação dos frutos do café e também são influenciadas pelas condições ambientais de cultivo.

Para avaliar a expressão diferencial das proteases em locais de cultivo que apresentam temperaturas contrastantes foi avaliada a expressão diferencial entre frutos de mesmo estágio de desenvolvimento, variando apenas a localidade. Três genes de cisteína (5, 8 e 23) revelaram valores significativos de diferença de expressão em Adamantina em relação a Mococa (Tabela 3). Para o gene Cis 5 e no estágio cereja, foi detectada uma diferença de expressão de protease aproximadamente 5 vezes maior em Adamantina em relação a Mococa. Ao contrário, nos frutos verdes, a expressão da Cis 5 foi em média três vezes maior em Mococa, onde a temperatura média anual é mais baixa do que em Adamantina. O gene similar a Cis 5, que codifica uma cisteína endopeptidase do tipo papaína do grão de mamona (*Ricinus communis* L.) foi clonado devido sua capacidade de processar o precursor da proteína *glyoxysomal malate dehydrogenase* para a subunidade madura *in vitro* (Schmid *et al.*, 1998). Este gene é comum em tecidos de endosperma e cotilédones de outras plantas e os autores sugerem que esta cisteína endopeptidase tem como função transferir os metabólicos de um tecido para outro

emergente (Schmid *et al*, 1998). Para os genes Cis 8 e Cis 23 de frutos verdes houve uma diferença de expressão de um pouco mais de 2 vezes em Adamantina em relação a Mococa.

Figura 1. Teste de normalizadores em nível de transcrição do RNA, representado como média de valores do Ct em diferentes amostras. Os valores de Ct representam médias de três réplicas. Amostras: 1E - endosperma verde inicial; 2E - endosperma verde tardio; 3E - endosperma cereja (fruto maduro); 1P - perisperma verde inicial, e; 2P - perisperma verde tardio. Genes constitutivos: GPDH - gliceraldeído-3-fosfato-dehidrogenase (maçã); S19 - proteína ribossomal; CYP - ciclofilina, e; ACT - actina

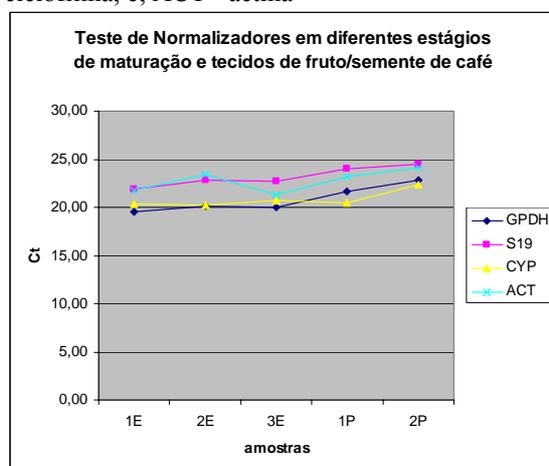


Tabela 2: Expressão diferencial de proteases em frutos de *C. arabica* de acordo com o estágio de desenvolvimento, avaliado em duas localidades distintas, utilizando PCR em tempo real.

Gene	Localidade	Normalizador*		Média*
		GPDH C	CYP	
Cisteína 5a	Adamantina	1,3	-1,4	-0,09
	Mococa	19,3	8,6	13,93
	Adamantina	12,9	7,2	10,07
Cisteína 8a	Mococa	9,1	4,0	6,58
	Adamantina	-3,2	-5,3	-4,23
Cisteína 22a	Mococa	-1,3	-3,4	-2,34
	Adamantina	-3,0	-1,7	-2,33
Cisteína 22b	Mococa	-2,1	-5,5	-3,78
	Adamantina	3,4	1,9	2,62
Cisteína 23a	Mococa	1,3	-1,7	-0,21
	Adamantina	1,5	-1,1	0,22
Ac Asp. 1b	Mococa	-1,2	-3,0	-2,07

*número demonstrativo de quantas vezes o loco de protease é mais expresso no fruto verde em relação ao cereja.

Tabela 1: Valores de M (média da estabilidade de expressão) para cada combinação de genes constitutivos: **A)** M obtida a partir da análise das amostras de endosperma e perisperma 1E, 2E, 3E, 1P e 2P. **B)** M obtida a partir da análise das amostras de endosperma 1E, 2E e 3E.

A	GPDH	S19	CYP	ACT
GPDH	-	0,455	0,826	0,911
S19	0,455	-	0,770	0,770
CYP	0,826	0,770	-	0,999
ACT	0,911	0,770	0,999	-
B	GPDH	S19	CYP	ACT
GPDH	-	0,240	0,316	1,036
S19	0,240	-	0,525	1,013
CYP	0,316	0,525	-	1,296
ACT	1,036	1,013	1,296	-

GPDH - gliceraldeído-3-fosfato-dehidrogenase (maçã); S19 - proteína ribossomal; CYP - ciclofilina, e; ACT - actina.

Tabela 3: Expressão diferencial de proteases em frutos de *C. arabica* de acordo com a localidade de cultivo, para frutos verdes e cereja, utilizando PCR em tempo real.

Gene	Maturação do Fruto	Normalizador*		Média*
		GPDH C	CYP	
Cisteína 5a	verde	-2,4	-3,9	-3,1
	cereja	6,5	3,2	4,9
Cisteína 8a	verde	2,5	1,6	2,1
	cereja	1,8	-1,1	0,3
Cisteína 22a	verde	1,0	-1,6	-0,3
	cereja	1,7	-1,2	0,2
Cisteína 22b	verde	-1,1	-1,6	-1,4
	cereja	1,3	-1,8	-0,2
Cisteína 23a	verde	2,9	1,8	2,3
	cereja	1,1	-1,8	-0,4
Ac Asp. 1b	verde	1,5	1,0	1,3
	cereja	-1,2	-2,8	-2,0

*número demonstrativo de quantas vezes o loco de protease é mais expresso em Adamantina (SP) em relação à Mococa (SP).

Conclusões

Muito embora a confirmação da influência das proteases na qualidade de bebida do café ainda dependa de análises bioquímicas e sensoriais, foi possível elucidar o estabelecimento de uma estreita relação na expressão dessas enzimas com fatores ambientais, além de detectar um diferencial de expressão entre frutos verde e cereja. Os resultados gerados serão confirmados a partir de novas coletas de frutos que estão sendo realizadas nos municípios de Adamantina e Ouro Fino (MG). Paralelamente, dados bioquímicos relativos às atividades de proteases também se encontram em fase de obtenção. Portanto, a confirmação dos dados obtidos poderá abrir uma nova perspectiva de estudo voltada para a super expressão ou nocauteamento dos genes focalizados no presente estudo e a associação dessas alterações de expressão com a qualidade de bebida. Além disso, uma nova perspectiva de estudo que relaciona a temperatura do local onde a cultura é mantida com a qualidade de bebida poderá ser bastante útil num futuro de médio ou longo prazo, considerando que a temperatura do planeta está em constante elevação.

Referências Bibliográficas

- Arnold U, Ludwig E (1996) Analysis of free amino acids in green coffee beans II. changes of the amino acid content in arabica coffees in connection with post-harvest model treatment. *Z. Lebensm Unters Forsch* 203: 379-384
- Barret, A. J. The classes of proteolytic enzymes. In *Plant Proteolytic Enzymes. Vol. I.*; M. J. Dalling, Ed.; CRC Press, Inc.: Boca Raton, 1986; pp 1-16.
- Brzin, J.; Kidric, M. Proeinases and their inhibitors in plants: role in normal growth and in responses to various stress conditions. *Biotechnol. Gen. Engin. Rev.* 1995, 13, 421-467.
- Clifford MN (1985) Chemical and physical aspects of green coffee and coffee products. In MN Clifford, KC Wilson, eds, *Coffee: Botany, Biochemistry and Production of Beans and Beverage*. AVI Publishing company, Inc., Westport, Connecticut, pp 305-374
- Feller, U. Proteolytic enzymes in relation to leaf senescence. In *Plant Proteolytic Enzymes. Vol. II.*; M. J. Dalling, Ed.; CRC Press, Inc.: Boca Raton, 1986; pp 49-68.
- Hensel, L. L.; Grbiae, V.; Baumgarten, D. A.; Bleecker, A. B. (1993) Developmental and age-related processes that influence the longevity and senescence of photosynthetic tissues in Arabidopsis. *Plant Cell* 5, 552-564
- Livak KJ, Schmittgen Td. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Method. *Methods*. 25: 402-408.
- Ludwig E, Lipke U, Raczek U, Jager A (2000) Investigations of peptides and proteases in green coffee beans. *Eur. Food Res. Technol.* 211: 111-116
- Montavon P, Duruz E, Rumo G, Pratz G (2003) Evolution of green coffee protein profiles with maturation and relationship to coffee cup quality. *J. Agric. Food Chem.* 51: 2328-2334
- Rogers WJ, Bézard G, Deshayes A, Meyer I, Pétiard V, Marraccini P (1999) Biochemical and molecular characterization and expression of the 11S-type storage protein from *Coffea arabica* endosperm. *Plant Physiol. Biochem.* 37: 261-272
- Schmid M, Simpson D, Kalousek F, Gietl C. (1998) A cysteine endopeptidase with a C-terminal KDEL motif isolated from castor bean endosperm is a marker enzyme for the ricinosome, a putative lytic compartment. *Planta* 206: 466-475.
- Selmar D, Bytof G, Knopp S-E (2001) New aspects of coffee processing: the relation between seed germination and coffee quality. In *ASId Café*, ed, XIX International Scientific Colloquium on Coffee, Vol CD rom. Association Scientifique International du Café, Helsinki.
- Shimizu, M.M., Mazzafera, P., 2000. Compositional changes of proteins and amino acids in germinating coffee seeds. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 43(3): 259-265.
- Silva EA da, Mazzafera P, Brunini O, Sakai E, Arruda FB, Mattoso LHC, Carvalho CRL, Pires RCM (2005) The influence of water management and environmental conditions on the chemical composition and beverage quality of coffee beans. *Braz. J. Plant Physiol.* 17 (1): 229-238.
- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F. (2002) Accurate normalization of realtime quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology*, 3 (7): <http://genomebiology.com/2002/3/7/research/0034.1>