

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

HELLEN MARÍLIA COUTO DE ABREU

**PROTEASES E QUALIDADE DA BEBIDA DE CAFÉS
CULTIVADOS EM REGIÕES
CLIMATOLOGICAMENTE DIFERENTES**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Hellen Marília Couto de Abreu
e aprovada pela Comissão Julgadora.

**Dissertação apresentada ao Instituto de
Biologia para a obtenção do Título de
Mestre em Biologia Vegetal.**

Orientador: Prof. Dr. Paulo Mazzafera.

2008

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

Ab86p

Abreu, Hellen Marília Couto de
Proteases e qualidade da bebida de cafés cultivados em
regiões climatologicamente diferentes / Hellen Marília Couto
de Abreu. – Campinas, SP: [s.n.], 2008.

Orientador: Paulo Mazzafera.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de
Campinas, Instituto de Biologia.

1. Café - Qualidade. 2. Protease. 3. Temperatura.
I. Mazzafera, Paulo. II. Universidade Estadual de
Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Título em inglês: Proteases and the quality of coffee from climatologically different regions.

Palavras-chave em inglês: Coffee - Quality; Protease; Temperature.

Área de concentração: Biologia Vegetal.

Titulação: Mestre em Biologia Vegetal.

Banca examinadora: Paulo Mazzafera, Marco Aurélio Zezzi Arruda, Pierre Marraccini.

Data da defesa: 06/06/2008.

Programa de Pós-Graduação: Biologia Vegetal.

Campinas, 06 de junho de 2008

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Paulo Mazzafera



Assinatura

Prof. Dr. Marco Aurélio Zezzi Arruda



Assinatura

Prof. Dr. Pierre Marraccini



Assinatura

Prof. Dr. Ana Maria M. A. Lagoa

Assinatura

Prof. Dr. Marcelo Jun Murai

Assinatura

Aos meus pais e meus irmãos, que das mais diversas formas sempre me apoiaram, me ensinando, talvez sem nem mesmo perceber, grandes valores como honestidade, humildade e persistência.

“Os nossos genes podem nos instruir a sermos egoístas, mas não somos necessariamente forçados a obedecê-los a vida toda.”

Richard Dawkins

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, ao Professor Paulo Mazzafera que me ajudou a crescer na pesquisa através de seus conhecimentos e incentivo pela busca de novas descobertas.

À Universidade Estadual de Campinas, em particular ao Programa de Pós Graduação em Biologia Vegetal, pela possibilidade da realização desta Dissertação de Mestrado.

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

A todos meus queridos amigos do Departamento de Fisiologia Vegetal, sem os quais o trabalho certamente teria sido muito monótono, e em especial aos babyssimos Gilberto, Flávia, Ronaldo e Igor que estiveram ao meu lado desde o começo da jornada.

Um agradecimento muito especial ao Milton, que muito me ajudou e que tornou possível a realização de grande parte dos experimentos bioquímicos e à Luciana, com a ajuda no HPLC.

Aos professores e técnicos do Departamento de Fisiologia Vegetal pela convivência agradável e ajuda sempre necessária.

Ao Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Recursos Genéticos Vegetais do Instituto Agrônomo de Campinas, em especial ao Professor Carlos Augusto Colombo pela possibilidade de realização de uma parte dos experimentos em seu laboratório.

Às queridas amigas do IAC por terem tornado a estadia em um laboratório desconhecido muito mais fácil. Agradecimento especial à Paula Lima e Paula Nóbile pela grande ajuda nos experimentos e análise dos resultados.

Ao Professor Marco Aurélio Zezzi Arruda e seu aluno Marcelo Oseas, do Instituto de Química, pela ajuda e plena disponibilização dos aparelhos para a realização dos géis de eletroferese 2-D.

Ao Pesquisador Marcio José da Silva, à Dani e Kiara, do CBMEG, pela realização do seqüenciamento de minhas amostras.

Às minhas grandes amigas da faculdade: Fernanda, Raquel, Roberta, Thaís Ferraz e Thaís Postali que sempre escutavam minhas reclamações nos momentos de sufoco e alegam minha vida com muitas conversas e boas risadas.

À minha família que, apesar de distante, sempre mostrou interesse em meu trabalho. Agradeço em especial à minha mãe que me socorria nos momentos de apertos financeiros e à minha irmã Ana, que me acolheu em sua casa e perdeu noites de sono desde que passei no vestibular há alguns anos atrás.

Agradeço ao Gustavo que, com seu carinho e paciência, tornou o último ano de mestrado bem menos estressante e mais fácil de chegar ao fim.

Agradeço também a todos os meus amigos e todas as pessoas que de alguma forma me incentivaram e agiram das mais diversas maneiras para o sucesso deste trabalho.

E finalmente, agradeço a Deus por me conceder saúde e força para continuar seguindo sempre em frente.

ÍNDICE

LISTA DE ACRÔNIMOS E ABREVIATURAS	i
RESUMO	ii
ABSTRACT	iii
1. INTRODUÇÃO	12
2. OBJETIVOS	21
3. MATERIAL E MÉTODOS	22
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
4.1 ANÁLISES BIOQUÍMICAS E ELETROFORESE BIDIMENSIONAL	29
4.2 EXPRESSÃO GÊNICA	45
5. CONCLUSÕES	54
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56
7. APÊNDICE I	64
8. APÊNDICE II	66
9. APÊNDICE III	72

LISTA DE ACRÔNIMOS E ABREVIATURAS

BLAST	Ferramenta básica de busca de alinhamentos locais, do inglês, <i>basic local alignment search tool</i>
BSA	Albumina de soro bovino, do inglês, <i>bovine serum albumine</i>
cDNA	DNA complementar, do inglês, <i>complementary DNA</i>
Da	Dalton (1 Da = $1,661 \cdot 10^{-24}$ g)
DNA	Ácido desoxirribonucléico, do inglês, <i>deoxyribonucleic acid</i>
DTT	1,4-ditiotreitol
EST	Etiqueta de seqüências expressas, do inglês, <i>expressed sequence tag</i>
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência, do inglês, <i>high performance liquid chromatography</i> .
MCW	Extração com solução de metanol, clorofórmio e água, do inglês, <i>methanol, chloroform and water</i> .
PCR	Reação de cadeia em polimerase, do inglês, <i>polymerase chain reaction</i>
pI	Ponto isoelétrico
PMSF	Fluoreto de fenilmetanosulfonila, do inglês, <i>phenylmethanesulphonyl fluoride</i>
PVPP	Polivinilpirrolidona
RNA	Ácido ribonucléico, do inglês, <i>ribonucleic acid</i>
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio, do inglês, <i>sodium dodecyl sulfate polyacrilamide gel electrophoresis</i>

RESUMO

O café é uma bebida apreciada pelo seu sabor e aroma característicos, sendo a qualidade final da bebida um dos aspectos mais relevantes para atender às demandas atuais do mercado. Neste trabalho objetivou-se estudar algumas características relacionadas ao metabolismo do nitrogênio, como conteúdo de aminoácidos, proteínas e atividade de proteases em cafés em diferentes estágios de maturação provindos de regiões com temperaturas distintas. Adamantina – região de temperatura mais elevada, e Mococa – região de clima mais ameno foram os locais escolhidos para as coletas das amostras devido às diferenças no clima e na qualidade da bebida. A qualidade de cafés cultivados em regiões mais quentes é sabidamente inferior a de regiões mais frias. Entre diversas análises, grande atenção foi dada ao estudo de proteases, que promovem a quebra de proteínas, liberando aminoácidos que estarão envolvidos na realocação de proteínas relacionadas ao aroma e sabor do café, diminuindo, na maioria das vezes, os atributos finais de uma bebida de boa qualidade. Ensaio qualitativo de aminoácidos em HPLC foram feitos, assim como análises quantitativas de aminoácidos, fenóis e dosagem de atividade de proteases, a partir de ensaios espectrofotométricos. A dosagem de proteases indica maior atividade destas enzimas em amostras verdes de Adamantina. Uma hipótese para este fato seria a influência da temperatura no metabolismo da planta que faz com que, aparentemente, proteínas sejam quebradas em peptídeos menores, alterando o perfil protéico intimamente relacionado ao aroma e ao sabor da bebida do café. Eletroforese bidimensional foi realizada para visualização das diferenças no perfil protéico das diferentes amostras. Genes que codificam para proteases foram isolados e análise de expressão gênica foi feita com utilização da técnica de PCR em Tempo-Real, corroborando os resultados obtidos nas análises bioquímicas e confirmando a provável interação entre conteúdo bioquímico, atividade enzimática, fatores climáticos e qualidade da bebida em café.

ABSTRACT

Coffee is appreciated due to its characteristic flavor and aroma, being the final quality of the beverage one of the most relevant aspects to answer to the growing market demand. The study of some features related to nitrogen metabolism in green and mature coffee from climatologically different regions, such as Adamantina – a region with high temperature means, and Mococa – not such a hot region, is the aim of this study. The quality of coffee cultivated in hot regions is considered inferior when compared to the ones cultivated in slightly colder regions. Among several analyses, a lot of attention was given to the study of proteases - proteins able to breakdown other proteins, releasing amino acids involved in the reallocation of proteins related to coffee flavor and aroma. Qualitative amino acids assays were done in HPLC as well as colorimetric assays for amino acids, phenolic compounds and protease activity determination. The proteases assay indicated higher activity of these enzymes in green samples from Adamantina, what might be explained by the influence of temperature in the plant metabolism, which apparently causes the break of some proteins in smaller peptides, changing the protein profile closely related to the formation of coffee flavor and aroma. Bi-dimensional electrophoresis was applied in the visualization of differences in the protein profile of the contrasting samples. Genes codifying for proteases were isolated and analysis of gene expression was done using Real Time PCR. The results corroborated the data obtained in the biochemical assays, confirming the probable interaction among biochemical content, enzymatic activity, climate factors and beverage quality in coffee grains.

1. INTRODUÇÃO

O fruto do cafeeiro é apreciado por produzir uma das bebidas mundialmente mais consumidas: o café. Conhecido pelo seu sabor e aroma característicos, o café exerceu forte influência econômica na história dos povos através dos tempos.

O café é um importante “commodity” internacional, sendo cultivado em mais de 80 países, ocupando terras numa extensão de aproximadamente 1.600 quilômetros ao Norte e ao Sul da linha do Equador (Marcone, 2004), sendo classificado entre as cinco maiores culturas mundialmente exportadas pelos países em desenvolvimento¹. Somente a exportação brasileira de café entre os meses de outubro de 2006 e setembro de 2007 foi de 28,7 milhões de sacas de 60 kg, o que faz com que o Brasil seja o maior produtor mundial de café, responsável por 26% da produção, seguido por Vietnã, Colômbia, Indonésia e México. A comercialização desta cultura é de grande importância, principalmente nos países em desenvolvimento, nos quais muitos produtores dependem da exportação de sua produção para sobrevivência. Além do mais, o capital gerado pelo comércio do café contribui para o desenvolvimento da infraestrutura de vários países, como na Uganda e Vietnã.

Um dos aspectos mais relevantes para atender às crescentes demandas atuais do mercado de café é a qualidade da bebida. Em vista disso, há uma preocupação cada vez maior com todos os aspectos da cadeia produtiva do café relacionados ao aumento de sua qualidade. Estudos nas mais diversas áreas, do manejo de cultura até o desenvolvimento de cultivares com características químicas diferenciadas, vêm tomando novo fôlego com foco comum para qualidade da bebida (Decazy *et al.*, 2003).

¹ Food and Agriculture Organization, disponível em <http://apps.fao.org>, visitado em 19/07/2007.

Os produtores têm se utilizado de novos processos durante as etapas de processamento e métodos mais modernos de armazenamento e exportação dos grãos, além de técnicas envolvendo biologia molecular para melhoraria no volume e qualidade da produção.

Estudos recentes realizados com o auxílio destas ferramentas de biologia molecular têm sido largamente utilizados na tentativa de um melhor entendimento desta cultura (Ben Amor *et al.*, 2003) para posterior melhoramento das práticas de cultivo e conseqüentemente, melhoramento na qualidade final da bebida. Apesar de sua importância econômica, são limitados os conhecimentos em níveis bioquímicos e moleculares acerca desta planta, dentre os quais podemos citar o trabalho de De Castro & Marraccini (2006). A grande maioria dos trabalhos empregando essas ferramentas é focada na via de biossíntese da cafeína, um dos principais compostos estudados em café (Agwanda *et al.*, 2003).

A produção comercial de café baseia-se principalmente em duas espécies da família Rubiaceae proximamente relacionadas, *Coffea canephora* e *Coffea arabica*, sendo responsáveis por aproximadamente 30% e 70% da produção mundial, respectivamente. Devido a diferenças consideráveis na qualidade da bebida gerada a partir destas duas espécies, os valores de comercialização apresentam grandes variações, sendo os preços para *C. canephora* consideravelmente menores que para *C. arabica*. A espécie *C. canephora* é diplóide ($2n = 2x = 22$), alógama e altamente polimórfica, vinda da África Central, enquanto *C. arabica* é tetraplóide ($2n = 4x = 44$), autógama, e provém de uma pequena região onde hoje se localiza a Etiópia (Wrigley, 1988). Devido à autofecundação, espera-se que *C. arabica* seja uma espécie geneticamente homogênea. No entanto, mutações espontâneas, produzindo algumas vezes características desejáveis, aconteceram ao longo do tempo, e foram mantidas naturalmente por autofecundação ou por meio de técnicas de cruzamento (Herrera *et al.*, 2004).

Após a floração, com o desenvolvimento do fruto de café, inicia-se a formação de um tecido, o endosperma, que somente terá as primeiras divisões mitóticas ao redor de 40 dias após o florescimento e representará mais de 95% da massa da semente madura (Mendes, 1941). O endosperma retirado do fruto maduro é o tecido torrado e usado para se produzir a bebida do café. Em relação a aspectos morfológicos, a maturidade do fruto é indicada pela perda de clorofila do pericarpo e sua substituição por pigmentos flavonóides amarelos em alguns cultivares ou, mais freqüentemente, por pigmentos vermelhos, do grupo das antocianinas (Lopes *et al.*, 1984). Nesta fase, os frutos são denominados “cereja”.

Uma ampla gama de compostos intermediários presentes no endosperma, além de outros compostos formados durante a torração e suas interações químicas (Clarke & Macrae, 1985) compõem a qualidade da bebida, sendo a junção de fenômenos extremamente complexos - ainda muito longe de ser totalmente compreendida - o que determina exatamente a qualidade final da bebida (Geromel *et al.*, 2006).

A planta do café produz seus melhores grãos quando cultivada em grandes altitudes, clima tropical, e em solos ricos em nutrientes. Além da localização de plantio, outros fatores afetam a qualidade e o sabor do café, como a variedade da planta, a composição química do solo e o clima, especialmente a quantidade de chuva e luz solar recebidas. Essas variáveis, combinadas com o modo com que os grãos são processados após a colheita, contribuem para as diferenças encontradas em café de regiões diferentes de todo o mundo. A combinação de fatores é tão complexa que até em uma mesma região de cultivo, é possível se encontrar variação marcante na qualidade da bebida².

O sabor e o aroma do café são produtos de uma complexa cadeia de transformações, podendo envolver mais de 800 compostos voláteis. Entre os precursores relacionados com a

² The National Coffee Association of the USA, disponível em <http://www.ncausa.org>, visitado em 14/08/2007.

formação desses compostos estão açúcares, aminoácidos, peptídeos, trigonelina, ácidos clorogênicos, ácidos orgânicos, lipídeos e carotenóides (Montavon *et al.*, 2003a).

Além da formação desses compostos, interações entre açúcares redutores e o grupamento amino de aminoácidos, peptídeos ou mesmo de proteínas durante a reação de Maillard, ocorrida no momento da torrefação, são tidas como essenciais nos processos envolvidos no desenvolvimento do sabor e do aroma (Reineccius, 1995). A reação de Maillard é tradicionalmente conhecida como sendo a responsável pela produção de aromas, assim como pela produção da coloração escura em diferentes tipos de alimentos, através da produção de diversos compostos como pirazinas, piridinas, furanos, entre outros. A maioria dos dados que hoje são conhecidos sobre o processo químico envolvido nesta reação foram determinados a partir da investigação acerca da interação entre açúcares redutores e aminoácidos livres (Ho *et al.*, 1993). Com base nessas informações, torna-se possível perceber a importância do estudo do perfil de aminoácidos livres e proteínas em grãos verdes de café, que contêm todos os precursores necessários para a geração do inconfundível sabor e aroma final da bebida (Montavon *et al.*, 2003b).

Em meio a todos os componentes responsáveis pela qualidade da bebida, as proteases têm se mostrado de grande relevância, promovendo a quebra de determinadas proteínas e liberando aminoácidos que estarão envolvidos na realocação e formação de novas proteínas relacionadas ao aroma e sabor (Ludwig *et al.*, 2000). McCarthy *et al.* (2007), em uma patente publicada nos Estados Unidos, defendem que se existem variações nos níveis de degradação de peptídeos e proteínas entre grãos de café com diferentes qualidades, muito provavelmente, estas variações podem ser causadas pela diferença nas atividades de proteases endógenas nestes diferentes grãos.

Essas enzimas são essenciais para a síntese de um grande número de proteínas, controlando a composição, o tamanho, a forma, a quebra e sua destruição final. A ação dessas

enzimas é altamente específica, sendo cada protease responsável pela quebra de determinadas seqüências em um conjunto particular de condições ambientais, estando intrinsecamente envolvidas em muitos aspectos da fisiologia e do desenvolvimento vegetal (Schaller, 2004).

A degradação seletiva de proteínas pode exercer várias funções durante o ciclo de vida das plantas. Durante a germinação da semente, a hidrólise de proteínas de reserva fornece aminoácidos para a síntese de novas proteínas, enquanto aminoácidos produzidos pela proteólise de proteínas vegetativas são os responsáveis pela formação dessas proteínas de reserva nas sementes (Palma *et al.*, 2002). Tem-se sugerido que a atividade de proteases levando à degradação de proteínas pode ser considerada um mecanismo regulatório nas plantas (Callis, 1995). Além disso, estudos realizados com sementes de cacau mostram que aminoácidos livres e oligopeptídeos, precursores essenciais dos componentes do aroma da fruta, são formados por quebra de proteínas da semente induzida por proteases endógenas (Voigt *et al.*, 1994).

A maioria das proteases age no interior das cadeias polipeptídicas (endopeptidases) ou na região terminal dessas cadeias (exopeptidases), iniciando o catabolismo de proteínas a partir da hidrólise de ligações peptídicas, responsáveis por ligarem os aminoácidos na cadeia polipeptídica. As exopeptidases diferenciam-se de acordo com a especificidade pelo substrato como sendo aminopeptidases, capazes de quebrar peptídeos na região N-terminal e carboxipeptidases, degradando peptídeos na região C-terminal (Palma *et al.*, 2002).

Já as endopeptidases, também denominadas proteinases, são classificadas de acordo com seu mecanismo catalítico, sendo sua classificação feita de acordo com o resíduo presente no sítio catalítico da enzima. Em plantas, quatro classes de endopeptidases são usualmente descritas: serino-proteinases, cisteína-proteinases, proteinases aspárticas e metalo-proteinases. Recentemente, uma nova classe de proteinases foi descrita, apresentando glutamato no lugar do ácido aspártico e sendo denominada proteinase-glutâmica (Schaller, 2004).

Devido à ação das endopeptidases se dar de acordo com o mecanismo catalítico e ao fato de estas enzimas agirem segundo o resíduo presente no sítio ativo da enzima, essas proteases apresentam maior especificidade do que as exopeptidases que agem tanto em regiões N-terminal como C-terminal das cadeias polipeptídicas. Assim sendo, as endopeptidases são as primeiras proteases a agirem, gerando peptídeos menores que serão hidrolisados a aminoácidos livres pela ação múltipla de exopeptidases (Callis, 1995).

Ainda não há evidências concretas de que proteínas de reserva das sementes de café possam agir como precursores de aroma e sabor através de sua degradação por proteases específicas (Montavon *et al.*, 2003b). Análises de eletroforese em duas dimensões com extratos protéicos de sementes de café mostraram claramente peptídeos de baixo peso molecular, sendo provavelmente produtos de degradação da subunidade α da proteína de reserva 11S por peptidases específicas (Rogers *et al.*, 1999a; Ludwig *et al.*, 2000). A proteína 11S é a proteína em maior quantidade nas sementes de café, sendo sua principal proteína de reserva, tendo como função a mobilização de aminoácidos e nitrogênio para o desenvolvimento da semente (Shimizu & Mazzafera, 2000), cujo endosperma será utilizado para produção da bebida.

Alguns trabalhos mostraram que juntamente com proteínas, aminoácidos e compostos fenólicos, a atividade diferencial de proteases pode explicar muito da variância observada em plantas cultivadas em regiões diferentes, sendo muito provavelmente influenciada por diversos fatores como, por exemplo, temperatura (Shimizu & Mazzafera, 2000; Silva *et al.*, 2005).

Estudos anteriores mostraram uma relação negativa entre a atividade de proteases e qualidade da bebida em cafés cultivados em regiões de clima quente, que apresentam bebida de qualidade inferior e clima mais ameno (Silva *et al.*, 2005). No entanto, essas mesmas enzimas podem ser as responsáveis pelo alto teor de aminoácidos normalmente detectado em

grãos de café que passaram por processamento úmido, apresentando qualidade da bebida superior à apresentada pelos grãos processados pelo método seco (Selmar *et al.*, 2001).

Acredita-se que esta diferença de qualidade encontrada em plantas de diferentes regiões esteja diretamente ligada, entre outros fatores, à temperatura, que pode influenciar os níveis de expressão de proteases e modificar o padrão de proteínas encontrado nos frutos (Silva *et al.*, 2005). Decazy *et al.* (2003), ao estudar a qualidade do café em diferentes ambientes em Honduras, mostraram que altas altitudes e índices pluviométricos abaixo de 1500 mm de chuva são fatores favoráveis à qualidade sensorial da bebida, promovendo a produção de grãos maiores, com maior conteúdo de lipídeos. Uma vez que altitude e temperatura são fatores inversamente relacionados, é de se esperar que as médias anuais de temperatura em cidades com menor altitude sejam superiores às de cidades mais elevadas e que estas diferenças climáticas influenciem o desenvolvimento dos grãos e conseqüentemente, a qualidade da bebida.

O café não tolera uma ampla faixa de temperatura e temperaturas menores que 16°C e maiores que 23°C não são adequadas para seu cultivo, sendo a temperatura ótima para o desenvolvimento adequado dos frutos e produção de bebida de alta qualidade entre 18°C e 22°C (Camargo *et al.*, 1992). Além disso, altas temperaturas também levam ao amadurecimento mais rápido dos frutos de café, sendo as sementes desses frutos menores, apresentando, no entanto, maior densidade (Silva & Mazzafera, comunicação pessoal).

Apesar da grande extensão do parque cafeeiro encontrado no Brasil, localizado nas mais diversas condições climáticas, poucos trabalhos associando a influência do local de cultivo à composição química do café e à qualidade final da bebida são encontrados na literatura. O trabalho de Ortolani *et al.* (2000) mostra que o gradiente de continentalidade e as variações de altitude, entre 400 e 1100m, nas principais regiões cafeeicultoras do Estado

resultam de múltiplas condições térmicas e hídricas. Essas combinações interferem na fenologia do cafeeiro e condicionam cinco classes de qualidade de bebida (Figura 1).

Por esta razão, focamos este trabalho na relação entre fatores climáticos, composição química e qualidade de bebida e para tanto, analisamos amostras provindas de Adamantina e Mococa, regiões localizadas em altitudes distintas que apresentam condições climáticas diferentes, assim como diferenças marcantes no sabor e aroma da bebida, como mostraram Ortolani *et al* (2000) e Silva *et al.* (2005).

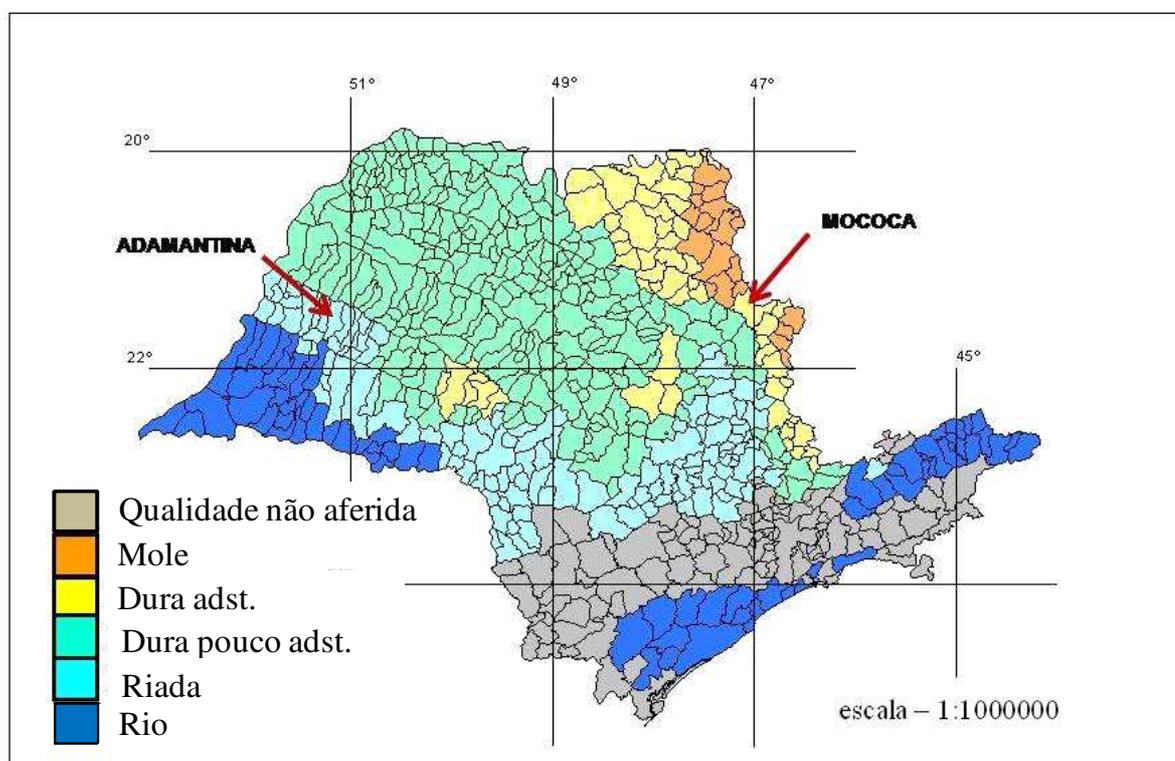


Figura 1: Mapa da distribuição regional da qualidade natural de bebida do café arábica (Ortolani *et al*, 2000).

Análises sensoriais mostraram que grãos de café cultivados em Adamantina, onde a temperatura média anual gira em torno dos 24°C, apresentam qualidade de bebida inferior que a produzida com grãos provindos de Mococa, onde a temperatura média anual de 22,5°C é mais próxima da considerada adequada para o cultivo da espécie.

Neste trabalho, foram avaliados aspectos quantitativos e qualitativos relacionados às proteínas, aminoácidos e atividade de proteases e tentou-se estabelecer uma relação entre proteases endógenas do café, a qualidade da bebida e procedência dos grãos. Compostos fenólicos foram analisados e genes de proteases foram isolados e tiveram sua expressão verificada nas sementes de Adamantina e Mococa.

2. OBJETIVOS

No presente trabalho, análises bioquímicas e moleculares foram conduzidas para se estudar a influência da ação de proteases no conteúdo e qualidade de substâncias nitrogenadas, como proteína e aminoácidos, em frutos de café e verificar a relação entre estes fatores e a qualidade final da bebida de cafés de duas regiões brasileiras sabidamente produtoras de café de diferente qualidade.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Amostras de café

Frutos verdes e frutos maduros foram colhidos de árvores adultas de *Coffea arabica* cv. Obatã, cultivadas sob irrigação e sob as recomendações do Boletim 100 do Instituto Agrônômico de Campinas (IAC), nas Estações Experimentais da cidade de Adamantina (21°41'07" sul e 51°04'21" oeste) e Mococa (21°28'04" sul e 47°00'17" oeste), localizadas no estado de São Paulo. Os frutos verdes foram coletados nos anos de 2004 e 2005, nos meses de janeiro e março, enquanto os frutos maduros foram coletados em abril (Adamantina) e julho (Mococa) dos mesmos anos. Após a coleta, os grãos foram imediatamente congelados em N₂ líquido e conservados em freezer à -80°C para posterior análise. O endosperma foi separado dos outros tecidos do fruto, sendo o único tecido utilizado nas análises.

3.2 Análise de aminoácidos

Para a determinação quantitativa de aminoácidos, o material foi previamente macerado em N₂ líquido e extraído em etanol 70% (50 mg/500 µl), por 1 h a 4°C, com ocasional agitação. O sobrenadante foi coletado após centrifugação (10.000 g/20 min) e os aminoácidos foram determinados por espectrofotometria (Cocking & Yemm, 1954).

A análise qualitativa de aminoácidos foi feita pela extração MCW (12:5:3, v/v/v) do macerado (100 mg/2 ml), com incubação em temperatura ambiente por 24 h e agitação constante. O sobrenadante foi coletado após centrifugação (10.000 g/15 min) e foram adicionados 1 mL de clorofórmio e 1,5 mL de água destilada, seguido de vigorosa agitação. Após nova centrifugação para separação de fases, a alíquota superior (fase metanólica-aquosa) foi coletada, seca, solubilizada em água e armazenada a -30°C. Estes extratos foram analisados por detecção fluorimétrica dos derivados de *o*-ftaldialdeído em HPLC (Jarrett *et al.*, 1986). Para

tanto, Uma coluna Supelcosil LC-18, 25 cm x 4,6 mm, 5 μ m foi utilizada, sendo a eluição feita de acordo com um gradiente formado pelo tampão A (50mM NaOAc, 50 mM Na₂HPO₄, 1,5 ml de HCl cncentrado, 20 ml de tetrahidrofurano e 20 ml de metanol em um volume final de 1000 ml) e gradativo aumento do tampão B (650 ml de metanol e 350 ml de água).

3.3 Atividade proteásica

Endospermas de frutos verdes e maduros foram macerados em N₂ líquido e a extração de proteínas foi feita com tampão fosfato de sódio 0,1 M (1g/7 ml), pH 7,0, contendo 1% ácido ascórbico e PVPP (1/10, m/v). As amostras foram centrifugadas (12.000 g/20 min, 4°C) e o sobrenadante coletado e dessalinizado em colunas PD-10 Sephadex G25 (GE HealthCare), pré-equilibradas com tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,0. A concentração de proteínas foi determinada com reagente de Bradford (GE HealthCare), segundo Bradford, 1976, tendo como padrão BSA. A atividade proteásica foi investigada após incubação por 1 h a 37°C de 100 μ g de proteína em tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,0, na presença de azocaseína a 0,1% (m/v) e DTT 5 mM, em um volume final de 1 mL. A reação foi paralisada com a adição de 500 μ L de ácido tricloroacético 5%, centrifugação (12.000 g/10 min) e coleta do sobrenadante. A leitura foi feita em espectrofotômetro em 280 nm, tendo sido utilizado como padrão uma reação controle não incubada.

Para a determinação da classe das proteases presentes no endosperma de café, 100 μ g de proteínas, extraídas como descrito no ensaio anterior, foram aplicadas em um gel de SDS-PAGE 10% (m/v) copolimerizado com BSA, usando um pente contínuo, e separadas por uma corrente contínua de 15 mA por 2h. Em seguida, o gel foi lavado em tampão Tris-HCl 0,1 M, contendo 1% Triton X-100, por 20 min para remoção do SDS, e depois em tampão Tris-HCl 0,1 M por mais 20 min. Então, o gel foi verticalmente dividido em tiras, que foram colocadas separadamente em tubos com tampa rosqueável e incubadas por 1 h a 37°C em tampão Tris-

HCl 0,1 M contendo inibidores específicos de protease (EDTA 10 mM para metaloproteases; iodo acetamida 15 μ M para proteases cisteínicas; pepstatina 1 μ M para proteases aspárticas e PMSF 1 mM para proteases serínicas). Em seguida, cada tubo recebeu DTT na concentração final de 5 mM. Após incubação durante a noite, as fatias de gel incubadas com os diferentes inibidores proteásicos acima citados foram coradas com Coomassie Blue R250 - 0,1% (v/v) em solução de 45% (v/v) metanol, 9% (v/v) ácido acético - e em seguida descoradas com solução de 7% (v/v) metanol e 5% (v/v) ácido acético. A atividade foi visualizada pela digestão da BSA presente no gel, ficando descorado onde a protease se posicionou.

3.4 Compostos fenólicos

Para a determinação dos compostos fenólicos, as amostras de endosperma foram extraídas em MCW, seguindo os mesmos procedimentos utilizados na extração de aminoácidos para análise qualitativa. A quantificação de fenóis totais foi feita com o reagente Folin Ciocalteu (Swain & Hillis, 1959).

3.5 Análise do perfil de proteínas por eletroforese bidimensional

200 μ g de proteínas de endospermas de frutos de café verdes e maduros foram liofilizadas, extraídas em tampão borato 100 mM, pH 8,0, contendo 50 mM DIECA (Dietilditiocarbamato), 50 mM EDTA, 300 mM NaCl, 114 mM ascorbato de sódio e PVPP (1:10, m/m) e solubilizadas em tampão de reidratação contendo 7 M de uréia, 2 M de tiouréia e 0,002% (m/v) de azul de bromofenol. Em seguida, foram aplicadas em fitas de gradiente de pH immobilizados na faixa de pH de 3-10 (Immobiline DryStrip ph 3-10 NL, 13 cm da GE Healthcare) (Berkelman & Stenstedt, 1998). Para a separação de proteínas por isoeletrofocalização (1ª dimensão), as fitas foram colocadas no sistema focalizador (Ettan Daltsix IPGphor II - GE Healthcare), seguindo o programa definido por Sussulini, 2007 para a

separação de proteínas: (1) 500 V até 500 V/h, (2) 1000 V até 800 V/h, (3) 10000 V até 11300 V/h e (4) 10000 V até 3000 V/h. As corridas duraram, em média, 4,5 h. A 2ª dimensão foi feita em 12,5% (m/v) SDS-PAGE e a separação feita em solução de Tris-HCl 25 mM, pH 8.3, contendo 192 mM de glicina e 0,1% (m/v) SDS. Os géis foram corados com Coomassie Blue GR250 (Coomassie coloidal), escaneados e analisados com o software ImageMaster 2-D Platinum 6.0 (GeneBio, Geneva, Switzerland).

3.6 Análises moleculares - Confirmação dos genes de proteases

Foram feitas buscas no banco de EST do projeto Genoma Café³ (Vieira *et al.*, 2006), usando as palavras protease e proteinase como palavras-chave. Mais de 450 “reads” retornaram da busca e entre esses foram selecionados, um a um, aqueles relacionados a sementes. As seqüências selecionadas foram, então, comparadas e agrupadas para formação de “contigs”. Os “contigs” formados foram comparados entre eles com utilização do programa Clustal W (Thompson *et al.*, 1994) e também com seqüências de ácidos nucléicos depositadas em bancos públicos, através do programa BLAST disponível no NCBI⁴. A partir dos “contigs” formados foram construídos os “primers” flanqueadores às seqüências analisadas (Tabela 1).

Tabela 1: Características dos *primers* para seqüenciamento desenhados para os genes de proteases. Asp: ácido aspártico; Cis: cisteína; Tm¹: temperatura de fusão do *primer forward*; Tm²: temperatura de fusão do *primer reverse*; Tam¹: tamanho, em número de bases, do produto de PCR gerado por cada par de *primers* (amplicons).

	Nome	Tm ¹	%GC	Primer Forward	Tm ²	%GC	Primer reverse	Tam ¹
Proteases	Asp 1	61	48	ACTCCACCTCAGAAGTTCACAGT	60	50	CATACTGCTTAGGGGTTAGCTC	1083
	Cis 5	61	50	GAGCATGGAGATCACAGAAAGAG	58	50	GGATCAATCTAGAGCTCGTC	857
	Cis 8	63	48	ACTACACAGTGCACTCTCAAGTCC	61	46	AGCCACAGATGAGACCATAGAATC	1141
	Cis 22	61	42	GTACAAGACCCGTTAATGATACGC	57	53	CTCTAGAACCATAGCCAC	927
	Cis 23	58	45	GGCTAGTGAAACATGGTAAGTC	61	48	TGTAGTGGTCTTACAGCATAACG	1091

³ Projeto Genoma Café, disponível em <http://www.lge.ibi.unicamp.br/cafe>, visitado em 19/03/2005.

⁴ The National Center for Biotechnology Information, disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, visitado em 25/03/2005.

Com a utilização desses pares de primers, foram feitas reações de RT-PCR com cDNA previamente preparado a partir de amostras de RNA total extraídas dos grãos verdes e “cereja” de café. Para esta extração do RNA total foi utilizado o reagente TRIzol[®] (Invitrogen), seguindo as orientações do fabricante, e a quantificação foi feita após leitura em 260 nm em espectrofotômetro. A concentração do RNA em µg/µL foi obtida a partir da aplicação dos valores da absorbância na fórmula: $RNA = (Abs\ 260 \times d) / 25$, onde “d” corresponde à diluição do RNA. A qualidade do RNA foi atestada em eletroforese em gel de agarose 1% (m/v) com brometo de etídio e visualização sob luz UV no fotodocumentador Gel Doc 2000 da BIO RAD. Para todas as amostras, quantidades iguais de RNA foram utilizadas na síntese da primeira fita de cDNA, que foi obtida com o uso da enzima AMV Reverse Transcriptase (Promega) e o primer B26. Anteriormente às reações de PCR, determinou-se a melhor temperatura de pareamento dos primers com reações feitas em um gradiente de temperatura variando de 56,4°C a 62,7°C, onde a temperatura de 58°C apresentou os melhores padrões de amplificação. Assim, foram feitas as reações de PCR com os pares de primers específicos nas seguintes condições: 94°C por 1 min, 58°C por 1 min, 72°C por 2 min, 94°C por 30 seg, 58°C por 30 seg, 72°C por 1 min.; repetição destes três últimos passos por 30 vezes e utilização de temperatura de extensão final a 72°C por 7 min. Após o término da reação, as amostras foram analisadas em eletroforese com gel de agarose 1% (m/v) e os fragmentos amplificados visualizados com brometo de etídio e em fotodocumentador sob luz UV. Os produtos destas amplificações foram inseridos em vetor pGEM[®]-T Easy (Promega), clonados em *Escherichia coli*, linhagem DH10B e seqüenciados usando o kit ABI PRISM[®] BigDye[™] Terminator Cycle Sequencing Ready (Applied Biosystems). As seqüências obtidas no seqüenciamento foram comparadas com as seqüências isoladas no banco de dados do EST-Genoma Café através de alinhamentos no programa Clustal W para verificação de similaridade e

confirmação de que os fragmentos amplificados realmente correspondiam às proteases isoladas.

Para a análise de similaridade dos genes estudados neste trabalho, foram selecionadas no GenBank seqüências com elevada similaridade às proteínas traduzidas a partir dos genes de proteases de café. As regiões de domínio das seqüências foram determinadas a partir dos resultados do BLASTp, e estas regiões de todas as seqüências selecionadas foram alinhadas utilizando-se o programa Clustal X1.83. O resultado deste alinhamento foi utilizado para obtenção de um dendrograma que melhor representasse as relações filogenéticas com utilização do algoritmo de "Neighbor-Joining" com valores de 1.000 "bootstrap".

3.7 Análise da expressão de genes de proteases

Primers apropriados para PCR em Tempo Real (Tabela 2) foram desenhados com a utilização do programa Primer Express (Applied Biosystems), sendo baseados nos mesmos "contigs" utilizados para a produção dos primers anteriormente citados. O gene de controle interno (normalizador) foi escolhido com base em um trabalho previamente realizado com café (Nobile *et al.*, 2007), no qual vários normalizadores foram testados, sendo o gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase (GPDH C), anteriormente descrito em tomate (Bovy *et al.*, 2002), considerado o mais estável.

Determinados os padrões e confirmada a amplificação do cDNA com os primers específicos, a análise de expressão diferencial com a utilização da técnica de PCR em tempo real foi realizada.

Em cada reação, 2 µL de cDNA (3 ng/µL), 0,15 mM de cada primer ("forward" e "reverse") e 6,25 µL de Syber Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) foram usados, em volume final de 12,5 µL. Cada amostra foi processada em triplicata, sendo considerada também uma reação sem cDNA (controle). Para as amplificações das reações foi utilizado o

equipamento ABI PRISM 7500 Sequence Detection System (Applied Biosystems), com o seguinte ciclo: 50°C por 2 min, 95°C por 10 min, 40 ciclos de 94°C por 15 seg e 60°C por 1 min.

Tabela 2: Características dos *primers* para PCR em Tempo-Real desenhados para os genes de proteases e constitutivos. Asp: ácido aspártico; Cis: cisteína; GPDH C: gliceraldeído-3-fosfato-dehidrogenase (tomate). Tm¹: temperatura de fusão do *primer forward*; Tm²: temperatura de fusão do *primer reverse*; Tam¹: tamanho , em número de bases, do produto de PCR gerado por cada par de *primers* (amplicons).

	Nome	Tm ¹	%GC	<i>Primer Forward</i>	Tm ²	%GC	<i>Primer reverse</i>	Tam ¹
Proteases	Asp 1	59	43	CTTTGGGCAGCATTTGTATTAGG	59	41	GAAGGAAGAGGAAATAGAGAACACACA	56
	Cis 5	58	38	GCTTTCCTTTTGGCTGTTGTATTG	59	55	GTCATAGCCGCCACTAAGATC	51
	Cis 8	60	65	CCGTCACCCCGTCAAA	60	39	CGAGTGACTCAAATGAAGCTAACAATAC	51
	Cis 22	59	44	GCAGAGTGATACATACAGCCACAAA	59	52	CATCAGACCTCCGCTTGTCAT	53
	Cis 23	59	52	TGTCCATCCTGAGCTACGGTAAC	59	52	TCCCACTGCCACTCGTCTTTA	51
	GPDH C	58	60	CAAGCAAGGACTGGAGAGGG	59	36	TGGGAATAATGTTAAATGAAGCAGC	58

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Análises Bioquímicas e Eletroforese Bidimensional

A qualidade final da bebida do café é influenciada pelos mais diversos fatores, como a composição química dos frutos e, principalmente, a quantidade de compostos voláteis. Os resultados acerca de aminoácidos, proteínas, atividade de proteases e compostos fenólicos obtidos neste trabalho, no qual foram utilizadas amostras de origem de cultivo diferentes, nos mostram que parece haver uma íntima ligação entre composição bioquímica e diversos fatores citados na literatura, como espécie/variedade dos grãos, condições edafoclimáticas durante o crescimento, armazenamento dos grãos, tempo e temperatura do processo de torrefação e equipamento usado neste processo.

As condições climáticas nas localidades onde foram coletados os frutos analisados, Adamantina e Mococa, nos anos de 2004 e 2005, apresentaram-se diferentes no que diz respeito aos índices pluviométricos e médias mensais de temperatura (Figura 2). Na cidade de Adamantina, em ambos os anos, a temperatura média anual em torno dos 24°C excedeu a temperatura considerada ótima para o cultivo do café, de 22°C (Camargo *et al.*, 1992), ultrapassando também a temperatura considerada tolerável para o cultivo da cultura, de 23°C. Já em relação aos índices pluviométricos, a cidade de Adamantina recebeu uma quantidade adequada de chuvas, não ultrapassando 1500 mm de chuva/ano, quantidade considerada limite para a produção de bebida de boa qualidade (Decazy *et al.*, 2003).

Mococa recebeu, em 2004, 1900 mm de chuva, ultrapassando consideravelmente o limite adequado de chuvas, apresentando, no entanto, temperaturas sempre dentro dos limites consideráveis ideais para produção de café, não ultrapassando 22,5°C.

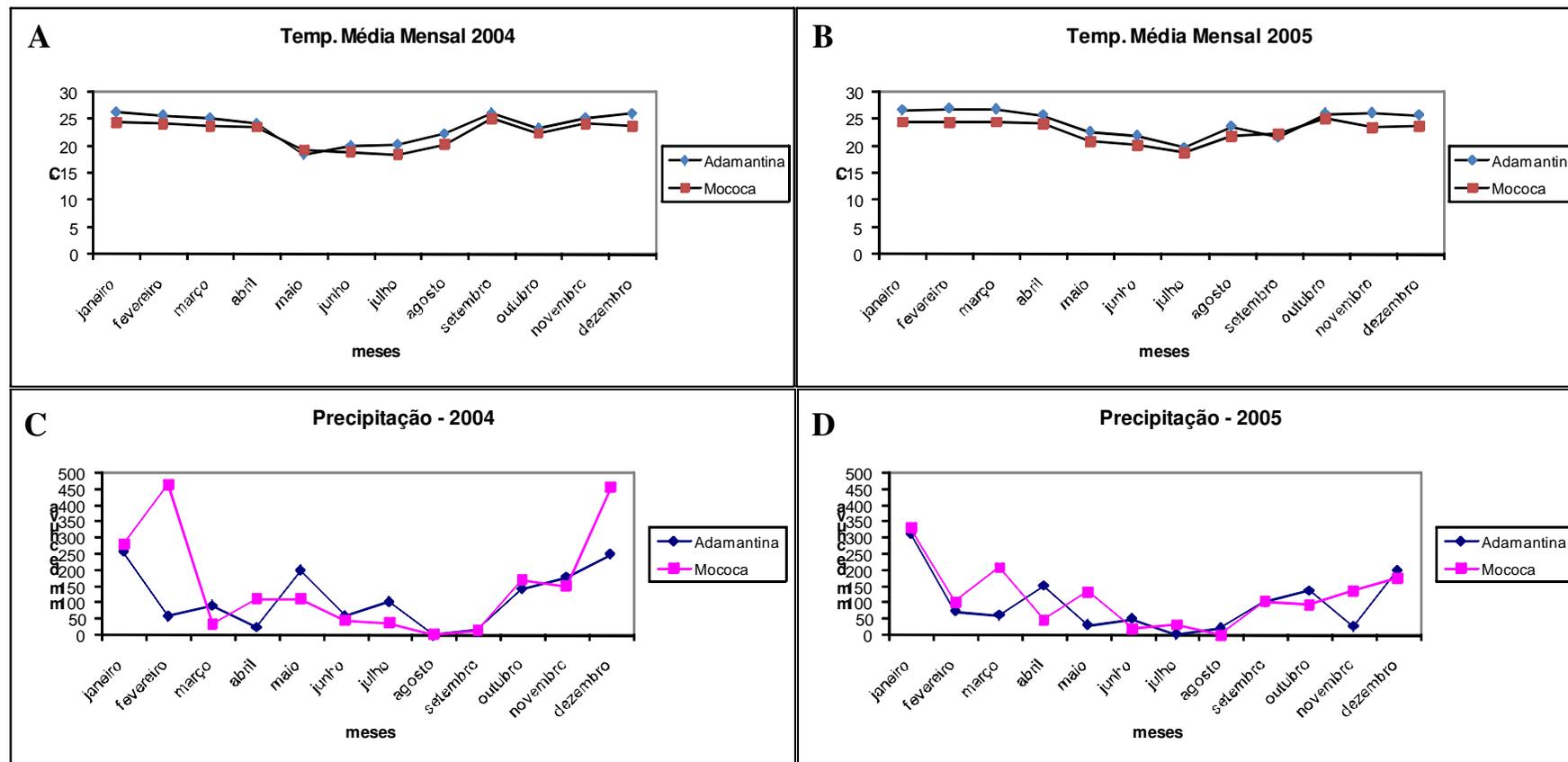


Figura 2: Médias mensais de temperatura nos anos de 2004 (A) e 2005 (B) e precipitação de janeiro a dezembro dos anos de 2004 (C) e 2005 (D).

Apesar de terem recebido quantidade de chuva maior que a considerada adequada, os grãos provindos de Mococa ainda produzem bebida de melhor qualidade que os coletados em Adamantina, onde a quantidade de chuvas foi adequada, porém a temperatura foi bastante discrepante à considerada ideal, como mostram Silva *et al* (2005) . Estes dados sugerem que um dos fatores mais relevantes para a produção de grãos que produzirão bebida de ótima qualidade, quando fatores como adubação e fertilização são controlados, é a influência da temperatura.

Os aminoácidos livres presentes em grãos verdes de café estão entre os compostos mais importantes no desenvolvimento da qualidade final da bebida (Macrae, 1985), reagindo com açúcares redutores durante o processo da reação de Maillard, no momento da torrefação, produzindo compostos relacionados ao aroma e sabor (Arnoldi, 2004). Nossas análises nos mostram que a maior concentração de aminoácidos livres foi encontrada em amostras de café verde de Adamantina (Figura 3), o que provavelmente se deve ao fato destas amostras ainda encontrarem-se em significativo crescimento, estando em um processo ativo de formação de proteínas que requer realocação de nitrogênio para os estádios posteriores. Assim como acontece em alguns frutos, como no feijão-da-china, soja e tabaco, as amostras maduras, por estarem em um estágio mais avançado de desenvolvimento, parecem ter a atividade de síntese de proteínas reduzida (Emmanuel, 1983), com conseqüente menor teor de aminoácidos livres (Sano & Kawashima, 1982). Em amostras de Mococa, apesar de os teores de aminoácidos encontrados terem sido maiores em amostras verdes do que em cerejas, a diferença não foi considerada estatisticamente diferente.

Estas análises quantitativas de aminoácidos indicaram maiores concentrações de aminoácidos livres em amostras de frutos verdes providas da cidade de Adamantina, que se localiza numa altitude menor que a cidade de Mococa (443 e 663 metros, respectivamente).

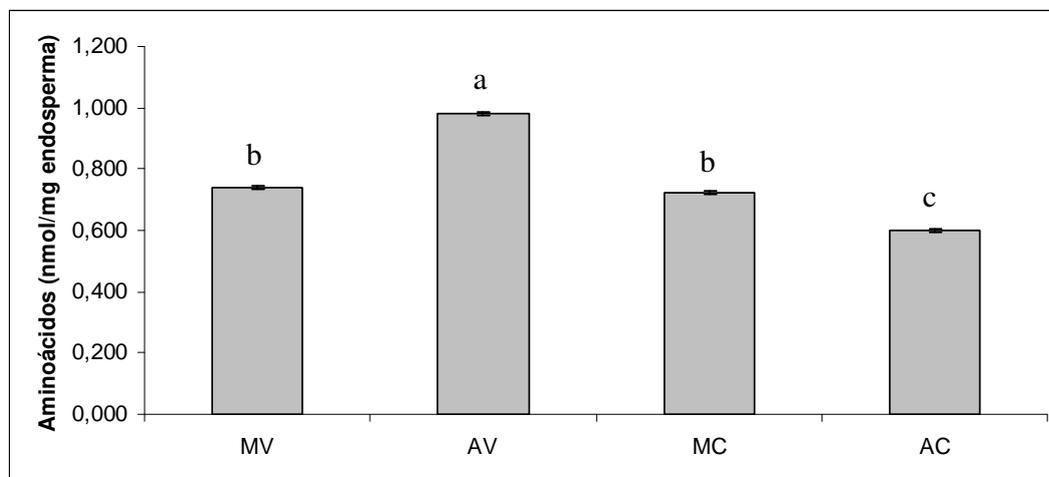


Figura 3. Quantidade de aminoácidos no endosperma de café de frutos verdes e maduros de Adamantina e Mococa. MV – Mococa fruto verde, AV – Adamantina fruto verde, MC – Mococa fruto cereja, AC – Adamantina fruto cereja. Médias de 5 repetições. Significância estatística representada por letras minúsculas diferentes, determinada segundo ANOVA (Tukey, $\alpha = 0,5\%$).

Uma vez que altitude e temperatura são fatores inversamente relacionados, é de se esperar que as médias anuais de temperatura em Adamantina sejam superiores às de Mococa, o que pôde ser verificado na Figura 2. Provavelmente, temperatura mais elevada e diferenças nas condições climáticas encontradas são fatores que influenciam a velocidade do amadurecimento dos frutos, fazendo então com que os frutos cultivados em Adamantina iniciem o amadurecimento mais cedo que os frutos de Mococa (Silva *et al.*, 2005). Isto certamente poderia ser a causa da menor quantidade de aminoácidos livres encontradas em frutos cerejas de Adamantina do que a observada em Mococa.

Um outro aspecto interessante está relacionado às diferenças no teor de aminoácidos entre as amostras verdes e maduras. Enquanto em Adamantina houve uma queda evidente da concentração de aminoácidos durante o amadurecimento, isto não ocorreu em Mococa. A explicação para isto poderia ser a velocidade de amadurecimento, ou mesmo o estágio de desenvolvimento em que os frutos foram coletados. Para um melhor entendimento, convém

explicar o processo de coleta. Este se deu quando os frutos apresentavam coloração vermelho intenso, o que aparentemente não significa que estivessem em estágio semelhante. Geromel et al. (2006) observaram que frutos coletados de cafeeiros na sombra e a pleno sol apresentavam diferenças no acúmulo de sacarose e atividade de sacarose sintase, ainda que tivessem sido coletados com coloração indicativa de maduros. Os frutos de plantas na sombra não teriam atingido maturação plena, ainda que a coloração da casca fosse semelhante a dos frutos coletados de plantas a pleno sol. Desta forma, um estudo mais detalhado sobre o acúmulo de aminoácidos em frutos dessas duas localidades poderia explicar as diferenças entre os frutos verdes e maduros.

Em relação à qualidade da bebida, os aminoácidos são considerados importantes, pois ao reagir com açúcares redutores durante o processo da reação de Maillard, no momento da torrefação, produzem compostos relacionados principalmente ao aroma (Arnoldi, 2004).

As proteínas participam desta reação devido à glicosilação de cadeias laterais reativas de lisina e arginina, em particular de lisina (Arnoldi, 2004), que é um aminoácido responsável pela formação de vários compostos voláteis (Reineccius, 1995). Outra reação da qual as proteínas participam é a desaminação espontânea de resíduos de asparagina e glutamina (Reineccius, 1995), sendo o primeiro aminoácido citado encontrado em maior quantidade tanto em amostras verdes quanto em amostras maduras de Adamantina (Figura 4). Na presença de calor, durante o processo de torrefação, a desaminação dessas aminas leva à formação dos ácidos aspártico e glutâmico, resultando na liberação de uma molécula de amônia. Essa amônia livre e reativa pode sofrer uma série de reações resultando na sua combinação com produtos de degradação de açúcares, levando à ligação de grupamentos carbonilas ao radical amino destes aminoácidos produzindo pirazinas (Ho *et al.*, 1993).

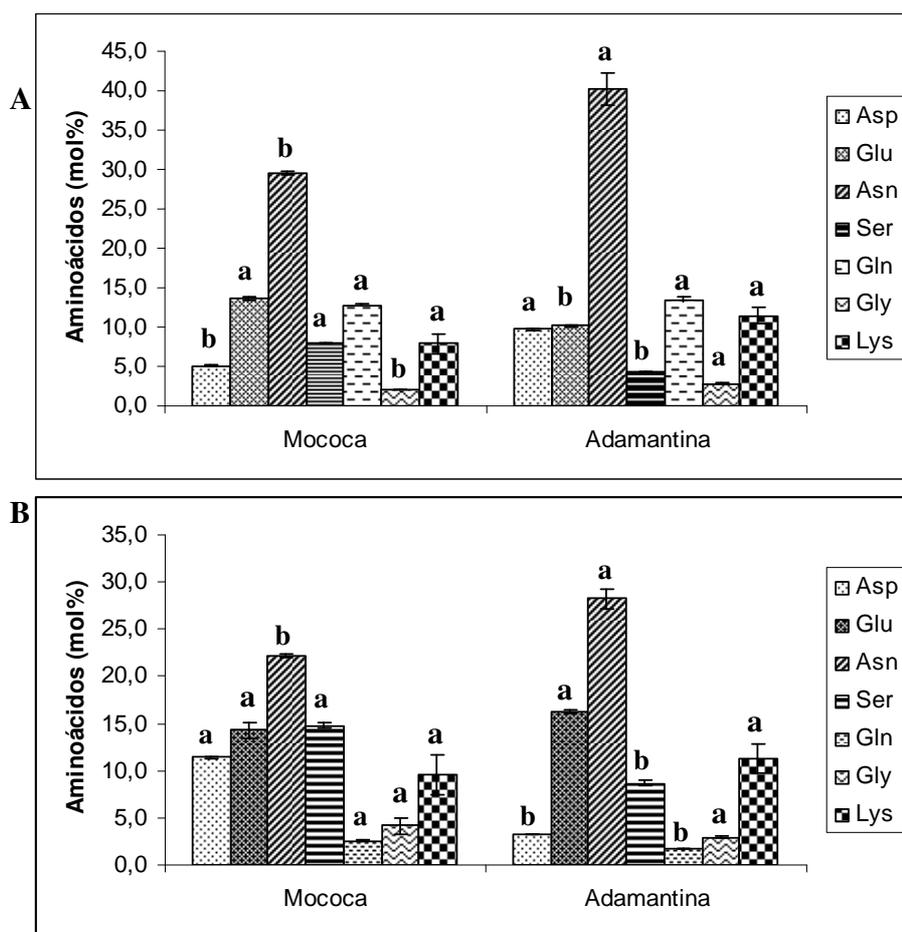


Figura 4: Análise dos principais aminoácidos (mol%) por HPLC no material verde (A) e cereja (B) de Mococa e Adamantina. Médias de 3 repetições. Significância estatística entre amostras de um mesmo estágio representada pelas letras minúsculas **a** e **b** para um mesmo aminoácido nas duas localidades determinada segundo ANOVA (Tukey, $\alpha = 0,5\%$).

As pirazinas são responsáveis pela formação do aroma torrado em café, que quando em grande quantidade, prejudica o sabor da bebida (Ho *et al.*, 1992). Na realidade, o aroma gerado por pirazinas é muito complexo, uma vez que a natureza deste aroma é alterada de acordo com a concentração destes compostos, além de que efeitos sinérgicos e antagônicos podem também exercer influência (Dart & Nursten, 1985).

Desta maneira, podemos especular que a significativa quantidade do aminoácido asparagina encontrada principalmente em amostras de Adamantina, em comparação às de

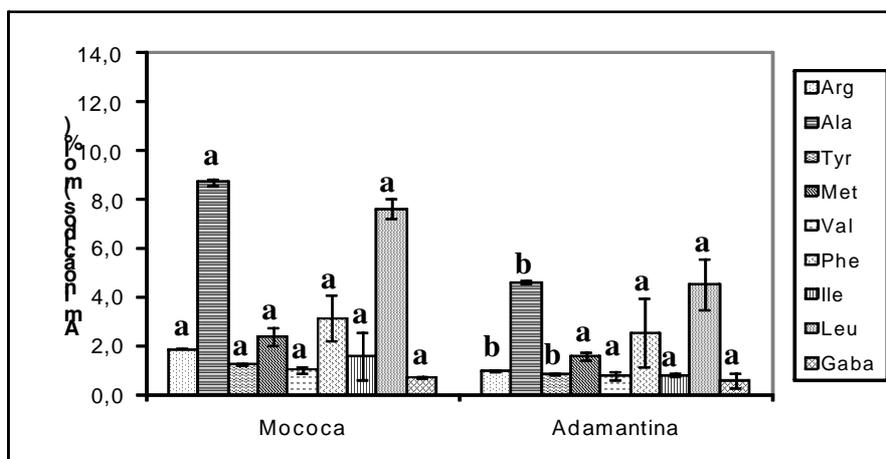
Mococa (Figura 4), poderia levar à formação de pirazinas, interferindo na qualidade da bebida desta região.

Um outro dado interessante obtido nas análises de aminoácidos por HPLC foi a porcentagem do aminoácido gama-aminobutírico (GABA) que pode ser verificada na Figura 5, juntamente com os aminoácidos que corresponderam por aproximadamente 35% dos aminoácidos nos frutos de café. Os valores encontrados foram de 0,7 e 0,5 mol% em amostras verdes de Mococa e Adamantina, e 0,9 e 4,5 mol% nas amostras cerejas de Mococa e Adamantina, respectivamente. Enquanto em amostras verdes praticamente não houve variação nas quantidades deste aminoácido, em amostras cerejas de Adamantina os valores encontrados chegaram a ser cinco vezes maior que a porcentagem deste aminoácido nas amostras de Mococa.

O GABA, um aminoácido não-protéico de quatro carbonos, tem sido largamente estudado devido a observações de que sua produção é altamente estimulada em condições de estresses bióticos e abióticos (Bouché & Fromm, 2004), como acontece em frutos de café que passam por processamento seco, vivenciando situações de seca (Bytof et al, 2004). Entre os diferentes tipos de estresses estudados (Kinnersley & Turano, 2000), o calor parece ser um fator capaz de causar um aumento considerável nas concentrações de GABA e pode explicar a maior concentração deste aminoácido encontrada nas amostras de Adamantina, conforme demonstrado em feijão caupi (*Vigna unguiculata*) sob temperaturas estressantes (Mayer et al., 1990).

Ainda a partir dos dados obtidos em HPLC, pode ser iniciada uma correlação entre qualidade da bebida e concentração de compostos fenólicos totais. De acordo com Taiz (2002), o aminoácido fenilalanina é precursor de compostos fenólicos, a partir da via do ácido chiquímico, que converte simples carboidratos, derivados da glicólise e da via pentose-fosfato, a aminoácidos aromáticos (Herrmann, 1995).

A



B

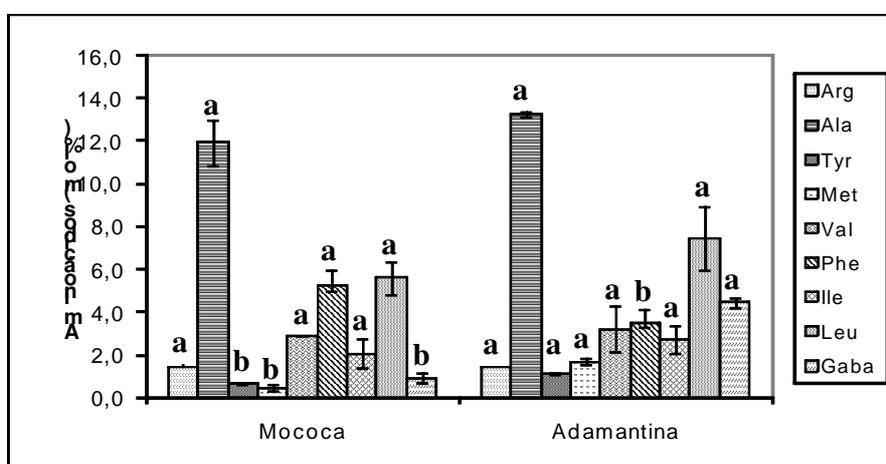


Figura 5: Análise dos aminoácidos presentes em menor porcentagem (mol%) nas análises de HPLC no material verde (A) e cereja (B) de Mococa e Adamantina. Médias de 3 repetições. Significância estatística entre amostras de um mesmo estágio representada pelas letras minúsculas **a** e **b** para um mesmo aminoácido nas duas localidades determinada segundo ANOVA (Tukey, $\alpha = 0,5\%$).

Diminuição na quantidade e alterações na qualidade dos compostos fenólicos estão relacionadas à superioridade da qualidade da bebida produzida por frutos de café arábica quando comparados ao café robusta, o que indica que estes compostos parecem exercer influência negativa na qualidade da bebida (Clifford, 1979). Além disso, os ácidos clorogênicos, um dos tipos de compostos fenólicos, contribuem para a acidez final da bebida, afetando seu sabor e provocando a produção de aromas amargos e adstringentes (Clifford & Kazi, 1987; Rogers *et al.*, 1999b). Aparentemente, os compostos nitrogenados e o status redox

dos ácidos clorogênicos atuam na produção do sabor, agindo na qualidade final da bebida (Montavon *et al.*, 2003a). Além do mais, pequenas variações no conteúdo de ácidos clorogênicos em frutos de café podem ser observadas devido a mudanças climáticas e nas práticas agrícolas (Farah & Donangelo, 2006). Condições climáticas severas tendem a aumentar o conteúdo de compostos fenólicos não só em sementes e plantas de café como também em outras plantas (Douglas, 1996; Materska & Perucka, 2005).

Assim, analisando as quantidades de fenilalanina observadas na Figura 5 (3,1 e 2,5 mol% em amostras verdes de Mococa e Adamantina, respectivamente e 5,2 e 3,5 mol% em amostras cereja de Mococa e Adamantina, respectivamente), observamos que a porcentagem deste aminoácido encontrada em frutos de Adamantina é menor que a verificada em Mococa, tanto em frutos verde como cereja, e pode-se sugerir que isso se deve à utilização deste aminoácido na formação de compostos fenólicos, presentes em maior quantidade em Adamantina, como mostrado na Figura 6, apesar de que para as amostras verdes, a diferença não foi considerada como estatisticamente significativa. Além disso, podemos observar também que a quantidade de fenilalanina é maior em frutos cerejas, visto que há uma queda na biossíntese de fenóis durante o processo de amadurecimento dos frutos.

As concentrações consideravelmente menores de compostos fenólicos nas amostras cerejas também nos permitiram observar que no final da maturação dos frutos há uma tendência à diminuição destes compostos. Mazzafera (1999) mostrou que amostras de café apresentando o defeito “café verde” (nas quais são encontradas sementes provenientes de frutos verdes) possuem maior teor de ácido 5-cafeoilquínico, o ácido clorogênico mais abundante em café.

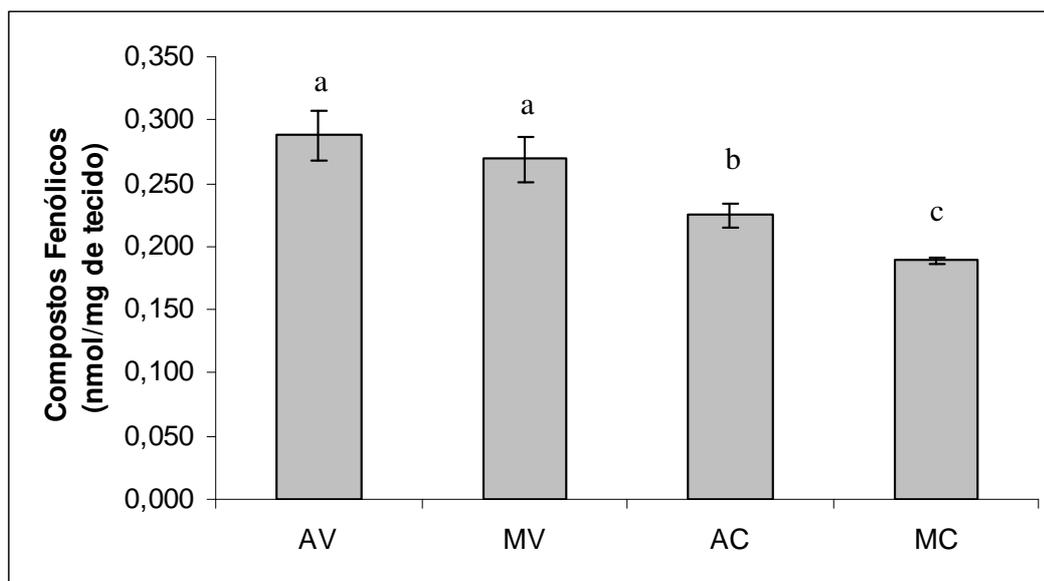


Figura 6: Quantidade de compostos fenólicos em nmol/mg de tecido nas amostras de Adamantina verde (AV) e cereja (AC) e Mococa verde (MV) e cereja (MC). Médias de 3 repetições. Significância estatística representada por letras minúsculas diferentes, determinada segundo ANOVA (Tukey, $\alpha = 0,5\%$).

A concentração de ácidos clorogênicos durante o desenvolvimento do fruto de café arábica é maior quando o peso dos frutos ainda está aumentando, no período de crescimento, entre 25 e 28 semanas após o florescimento (Clifford & Kazi, 1987). Após este período, ocorre queda na concentração destes compostos. Estes dados são de grande importância já que o status redox de grãos verdes de café antes do processo de torrefação pode controlar o desenvolvimento de subseqüentes reações de oxido-redução durante o processo. Sendo os fenóis compostos altamente sensíveis a essas reações, eles poderiam afetar drasticamente a qualidade final da bebida ao modificar o status redox da planta (Montavon & Bortlik, 2004).

Visto que a qualidade da bebida produzida em Mococa é superior à bebida produzida em Adamantina, como mostram Ortolani et al (2000), uma das hipóteses para a explicação desta observação, como sugerem De Castro & Marraccini (2006), com base nos dados de Silva (2004), seria a maior atividade das enzimas proteásicas nos frutos de Adamantina, que poderiam atuar na quebra de proteínas importantes para a produção final do aroma e sabor do

café. Adicionalmente, pode ainda haver alteração da composição dos aminoácidos que são precursores de vários compostos que contribuirão para a qualidade final da bebida.

Ensaio espectrofotométrico que determinaram a concentração de proteínas nas diferentes amostras foram realizados (Fig. 7) previamente à análise de atividade proteásica.

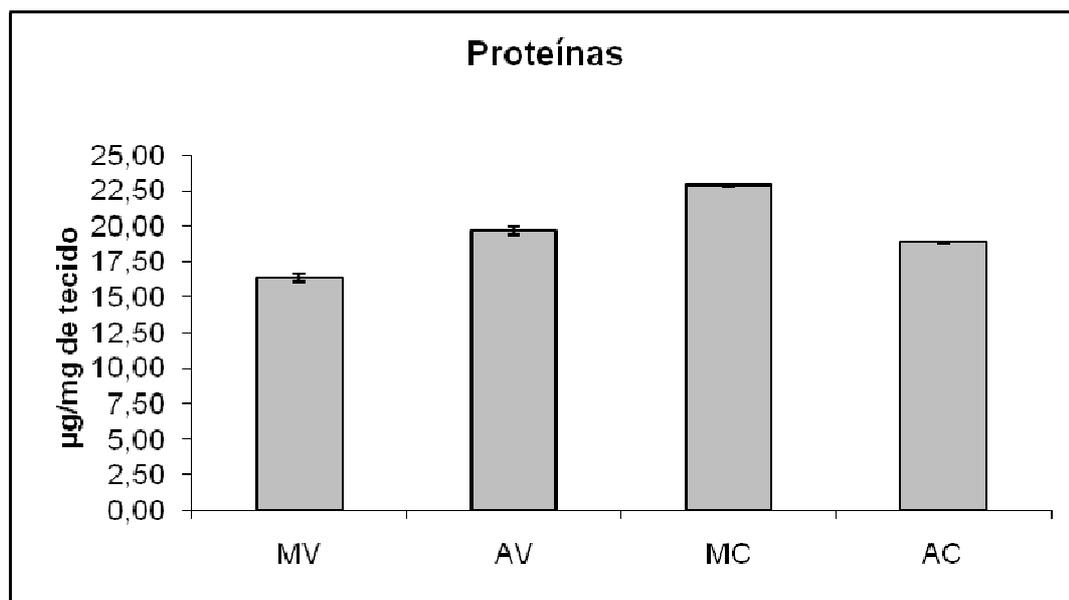


Figura 7: Quantidade de compostos fenólicos em $\mu\text{g}/\text{mg}$ de tecido nas amostras de Adamantina verde (AV) e cereja (AC) e Mococa verde (MV) e cereja (MC). Médias de 3 repetições.

Os ensaios de atividade proteásica nos mostraram uma maior atividade destas enzimas em endosperma de frutos verdes em comparação com frutos maduros (Fig. 8). Estes resultados podem explicar muito do observado nos ensaios acerca dos aminoácidos, onde uma maior quantidade de aminoácidos livres também foi encontrada em frutos verdes. Os resultados deste ensaio nos mostram que nos frutos de Adamantina há uma maior atividade deste tipo de enzimas em relação aos frutos de Mococa. Uma vez que as amostras utilizadas no estudo são de uma mesma variedade e as condições de plantio, cultivo e coleta seguem exatamente os mesmos padrões em ambos os locais, seria esperado um mesmo padrão de atividade das

proteases na diferentes amostras. Portanto, a diferença observada pode ser entendida como causa das influências ambientais, entre elas, a temperatura, que provavelmente foi a variável menos controlada.

A atividade proteásica em frutos maduros é muito semelhante em ambas as localidades e se apresenta bastante reduzida quando comparada à atividade dos frutos verdes. Isso ocorre provavelmente por estas amostras estarem em um estágio mais avançado de desenvolvimento, apresentando atividade de síntese de proteínas reduzida (Emmanuel, 1983) e conseqüentemente, menor atividade proteásica.

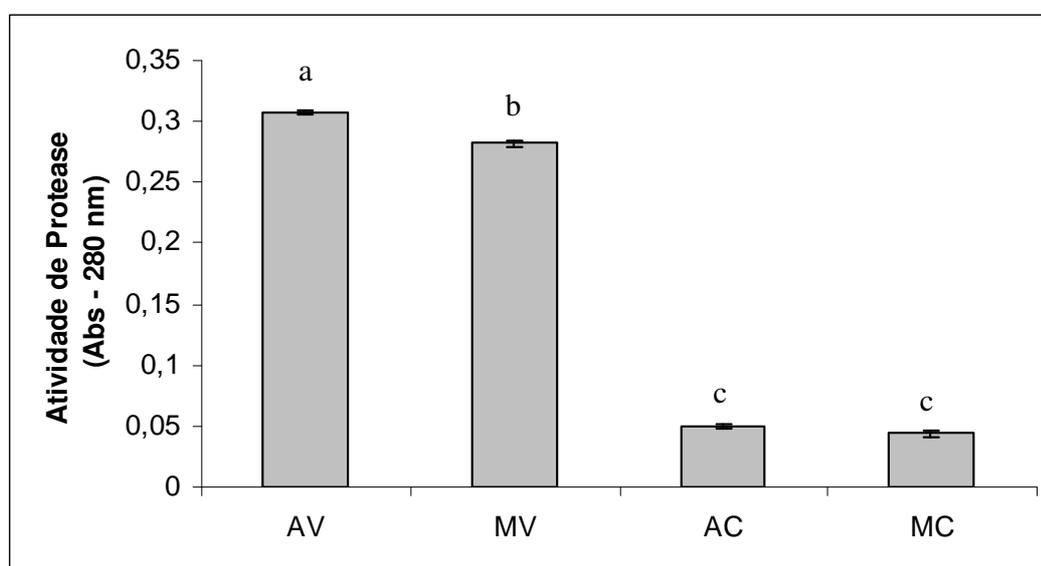


Figura 8: Atividade proteásica no endosperma de café de frutos verdes e maduros de Adamantina e Mococa. AV – Adamantina fruto verde, MV – Mococa fruto verde, AC – Adamantina fruto cereja, MC – Mococa fruto cereja. Médias de 5 repetições. Significância estatística representada por letras minúsculas diferentes, determinada segundo ANOVA (Tukey, $\alpha = 0,5\%$).

Em relação às classes de proteases, as endopeptidases são as primeiras proteases a agirem, gerando peptídeos menores que serão hidrolisados a aminoácidos livres pela ação múltipla de exopeptidases (Callis, 1995). Por essa razão, extratos protéicos foram analisados a fim de caracterizar as classes de endoproteases das amostras de café a partir de eletroforese em

géis de poliacrilamida co-polimerizada com BSA, incubados com inibidores específicos para cada tipo de protease: pepstatina A para proteases aspárticas, PMSF para proteases serínicas, EDTA para metaloproteases e iodoacetamida para proteases cisteínicas. DTT foi incluído em todas reações. A atividade enzimática foi identificada pela presença de bandas claras no gel, indicando que a BSA co-polimerizada havia sido degradada por ação enzimática e no local não se processou o desenvolvimento de cor com o Comassie Blue (Figura 9). Quando houve inibição da protease, causada pela ligação do inibidor ao sítio ativo da enzima, a BSA não foi degradada e ocorreu o desenvolvimento da coloração azul, indicando presença deste tipo de protease. De acordo com os resultados da Figura 8, e apoiados em dados da literatura que mostram que o conteúdo de endoproteases é muito baixo em sementes maduras (Dominguez & Cejudo, 1996), decidimos realizar os ensaios somente em frutos verdes.

As análises dos géis mostram que proteases cisteínicas são as encontradas em maior quantidade nas amostras, visto que entre os inibidores utilizados, o que apresentou maior inibição da atividade proteásica foi iodoacetamida, típico inibidor deste tipo de protease.

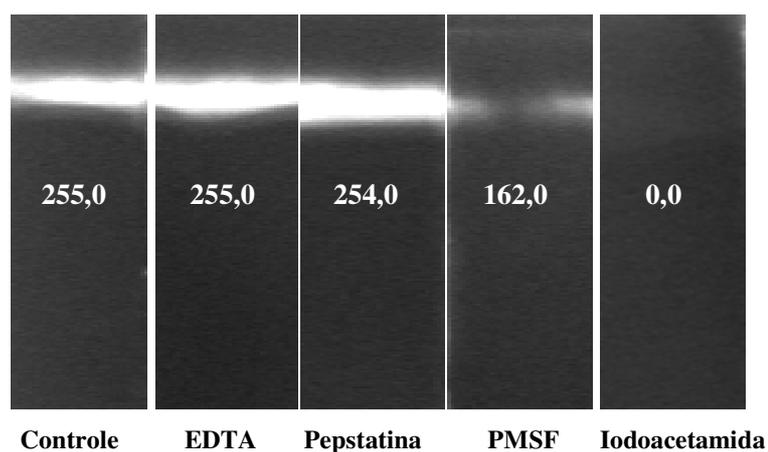


Figura 9: Gel de SDS-PAGE co-polimerizado com BSA. Os valores correspondem às densidades médias das bandas causadas pela ação dos inibidores.

Proteases serínicas foram o segundo tipo de proteases com maior atividade, demonstrada pela ação do PMSF que, segundo Zollner, 1999, age como inibidor competitivo de proteases serínicas, formando complexos com as enzimas e bloqueando, assim, seus sítios ativos. As proteases aspárticas apresentam-se em pouca quantidade, pois a inibição causada por seu inibidor específico, pepstatina, foi muito pequena. As metaloproteases estão praticamente ausentes, uma vez que não houve inibição alguma por EDTA, quando comparado ao controle.

Novos ensaios com diferentes substratos devem ser conduzidos a fim de se confirmar a atividade de outros grupos de proteases. É importante ressaltar que a inibição da atividade proteásica pode ser substrato-dependente, como observado para amostras de microorganismos (Coradi & Guimarães, 2006). O substrato protéico utilizado, BSA, pode não ser adequado para a detecção da inibição de atividade de algumas proteases, como as metaloproteases, por exemplo. Além disso, um estudo acerca da utilização de DTT como ativador de ação enzimática em frutos de café também seria de grande relevância, já que na ausência deste reagente, não ocorre atividade proteásica.

A fim de obtermos uma melhor visualização das diferenças no perfil protéico das amostras analisadas, realizaram-se análises de eletroferese em duas dimensões (2D-PAGE). Esta técnica separa as proteínas de acordo com duas propriedades diferentes: na primeira dimensão, a isoeletofocalização separa as proteínas de acordo com seus pontos isoelétricos e, na segunda dimensão, a SDS-PAGE separa as proteínas de acordo com suas massas molares (Berkelman & Stenstedt, 1998). Deste modo, cada ponto (*spot*) resultante no gel de 2D-PAGE corresponde a uma espécie protéica presente na amostra.

Ao analisar os eletroferogramas 2D-PAGE (Fig. 10), observou-se primeiramente que a maioria das proteínas apresenta-se na região de peso molecular entre 10 e 40 kDa, com ponto isoelétrico entre 5 e 7. Com base em trabalhos anteriores (Montavon et al, 2003a; Rogers et al,

1999a) é possível identificar algumas das proteínas nos géis da Figura 10, estando elas relacionadas à globulina 11S de café. Os spots possíveis de serem reconhecidos são os fragmentos (arms) α (seta 1 na Fig. 10) e β (seta 2), prováveis tetrâmeros do fragmento β (seta 3) e spots relacionados à degradação do fragmento α (seta 4). Também observou-se a presença de proteínas bastante grandes entre 30 e 45 kDa, sendo provavelmente, a diferença mais visível entre os géis. Montavon et al (2003a) estudaram o efeito da oxidação induzida por H_2O_2 em extratos de café, observando no perfil de proteínas provável formação de complexos poliméricos entre compostos fenólicos e proteínas, os quais podem ser visualizados nos géis 2-DE aproximadamente na mesma faixa de peso molecular que o fragmento α e também com PI baixo, próximo a 3 (seta 5 na Fig. 10). Com alta concentração de H_2O_2 era possível ver o desenvolvimento de coloração marrom nos extratos. A coloração positiva destas proteínas com o reagente de Folin-Ciocalteu, específico para fenóis, reforça a formação destes polímeros.

Assim, inicialmente poderíamos especular que as proteínas observadas no gel, nesta posição, poderiam ser resultantes da oxidação do extrato. No entanto, a presença das mesmas só ocorrem no extrato de Adamantina. Além disso, Montavon et al (2003b) sempre observaram em seus géis um arraste nesta posição do gel (denominada “curtain”), provavelmente devido aos diferentes graus de polimerização entre fenóis e proteínas, enquanto que em nosso caso os spots se mostraram bem definidos. Ainda estes autores observaram a formação desses polímeros em outras posições do gel, ou seja, na faixa de baixo ponto isoelétrico e abaixo de 20 kDa, portanto menores que o fragmento β . Tais proteínas também reagiram positivamente para Folin-Ciocalteu.

Desta forma, concluímos que existe a possibilidade de as proteínas indicadas na Figura 10 serem produtos de oxidação, devido provavelmente a um processo intrínseco nas amostras de Adamantina e não durante o processamento das amostras.

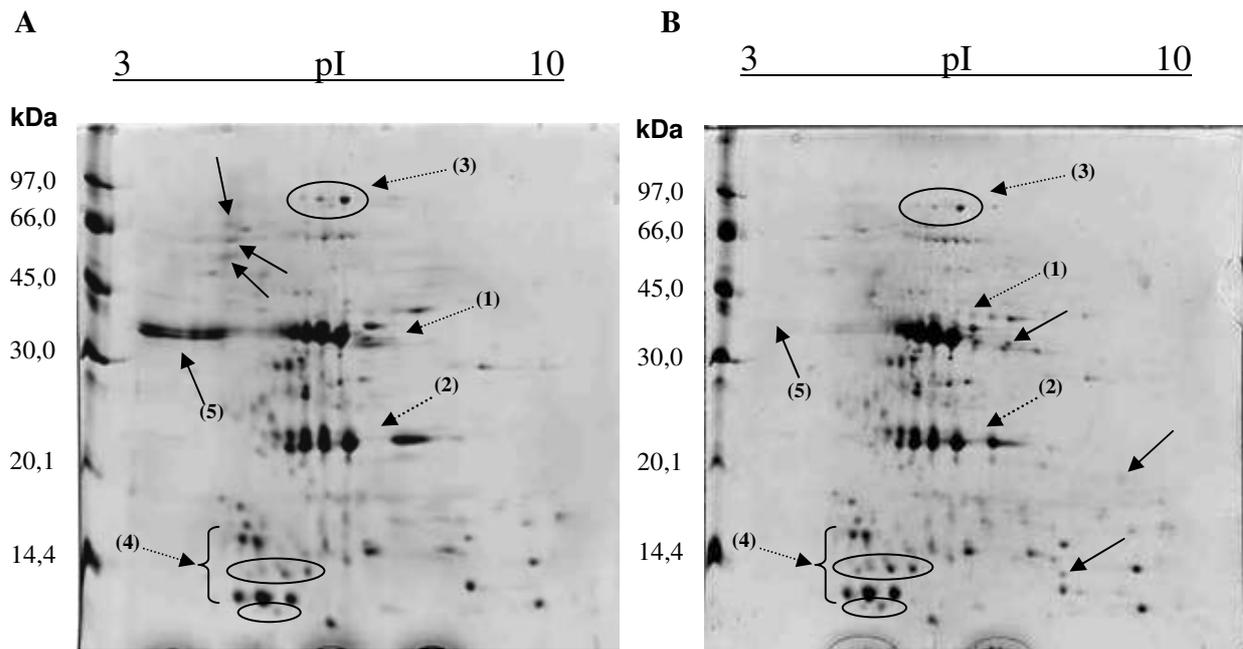


Figura 10: Eletroferogramas 2D-PAGE de 200 μg de proteínas de amostras de frutos verdes de café de Adamantina (A) e Mococa (B), em faixas de pI entre 3 e 10. Setas contínuas indicam *spots* diferentes entre os dois géis, setas fragmentadas indicam os fragmentos da proteína 11S, enquanto círculos indicam diferenças na intensidade dos *spots*. Eletroferogramas representativos de 3 géis realizados para cada amostra.

Ainda, podemos detectar, através das análises, uma diferença no número de *spots* nos géis. Foram encontrados uma média de 143 *spots* no gel referente a amostras de Adamantina e 190 *spots* no gel com amostras provindas de Mococa. Além disso, também foi detectada diferença na expressão de alguns *spots*, observada a partir da normalização de seus volumes, fornecida pelo programa de análise de imagens de gel *ImageMaster 2D Platinum* (GeneBio, Genebra, Suíça), versão 6.0, como demonstrado na Figura 11.

As diferenças apresentadas nos eletroferogramas não parecem tão significativas, o que certamente se deve ao fato de serem amostras de uma mesma espécie, mesma variedade e mesmo estágio, variando apenas seus locais de origem. No entanto, é sabido que a presença, ausência ou diferença de expressão de apenas uma única proteína é capaz de causar grandes mudanças no desenvolvimento e metabolismo de um organismo (Griffiths et al, 2002).

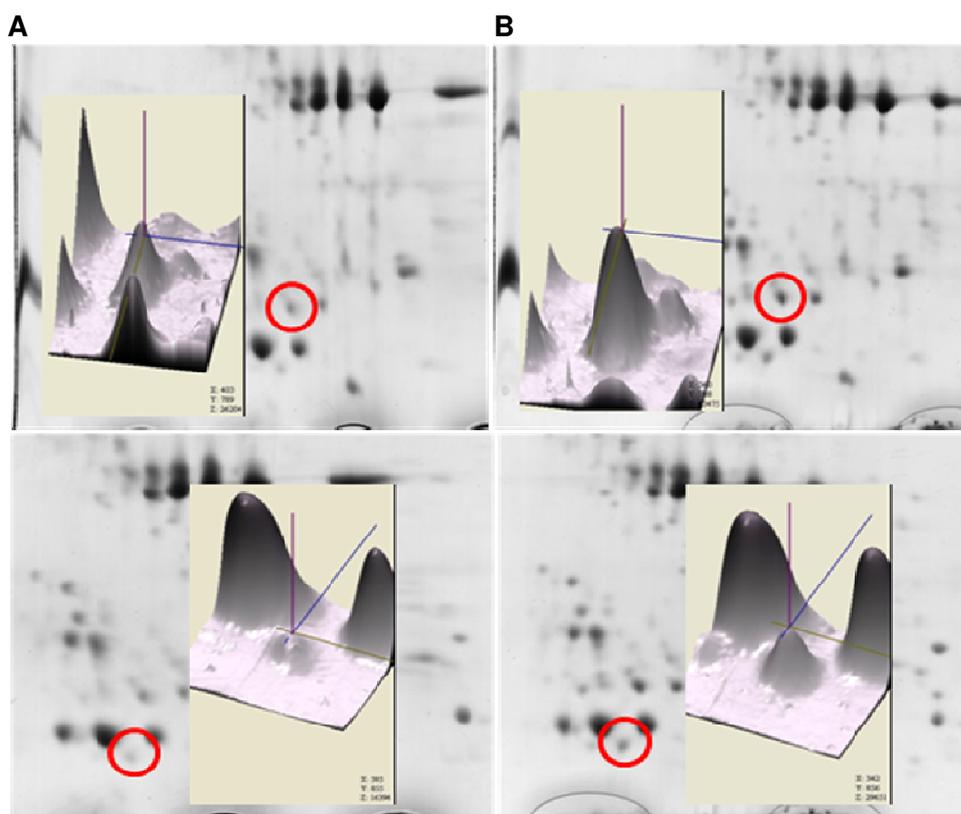


Figura 11: Eletroferogramas 2D-PAGE de 200 μ g de proteínas de amostras de frutos verdes de café de Adamantina (A) e Mococa (B), em faixas de pI entre 3 e 10, evidenciando a diferença de expressão entre alguns spots selecionados.

Assim, podemos inferir que condições ambientais, sobretudo temperatura, podem ser as principais causas responsáveis pela diferença no perfil de proteínas entre as duas amostras. Além disso, a partir destas análises, podemos sugerir também que a ação de proteases é a principal responsável pela degradação de proteínas, influenciando diretamente a formação do aroma e sabor do café.

4.2 Expressão Gênica

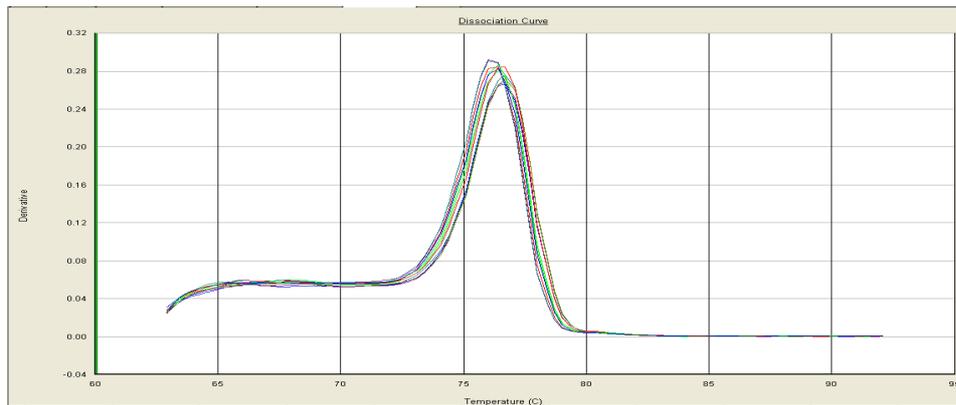
Com a finalidade de corroborar os ensaios bioquímicos, foram realizadas análises com ferramentas moleculares para a verificação do perfil de expressão de proteases nas diferentes amostras. McCarthy *et al* (2007) isolaram genes codificando para proteases cisteínicas, proteases aspárticas e inibidores de proteases cisteínicas a fim de demonstrar que, de fato,

existem diferenças na expressão destes genes em cafés que apresentam qualidade de bebida discrepantes, como cafés produzidos por grãos de café arábica e robusta. Neste trabalho, utilizou-se PCR em tempo real para avaliar a expressão diferencial de genes codificadores para proteases em amostras de frutos verdes e cereja (maduros) de cafés cultivados em Adamantina e Mococa. Esta técnica é empregada para simultaneamente amplificar e quantificar uma parte específica de uma dada molécula de DNA ou cDNA, permitindo a quantificação relativa da expressão de um determinado gene em um dado intervalo de tempo, ou em um tipo específico de célula ou tecido ou em outras diferentes variáveis (Gachon *et al.*, 2004).

Para tanto, foram feitas buscas para proteases no banco de EST do Projeto Genoma Café (Vieira *et al.*, 2006) e as seqüências (“reads”) encontradas foram comparadas para formação de seqüências consenso ou “contigs”. Estes “contigs” foram comparados com seqüências depositadas no banco de dados público do NCBI para identificação. Os “contigs” com maior número de seqüências provenientes de bibliotecas de frutos foram identificados como proteases cisteínicas - Cis5, Cis8, Cis22, Cis23 e como uma protease aspártica – Asp1 (apêndice I). Primers específicos foram desenhados para estas seqüências e foram feitas análises de RT-PCR para sua amplificação utilizando cDNAs produzidos a partir de RNA total extraído de frutos verdes. Uma vez que os primers utilizados apresentam alta especificidade, os produtos de amplificação destas reações foram diretamente clonados e seqüenciados para verificação da sua identidade. Foram confirmadas as identidades dos cinco genes de proteases.

Com a utilização de primers apropriados para a técnica de PCR em Tempo Real dos genes Cis5, Cis8, Cis22, Cis23 e Asp1 (Tabela 2 da seção Material e Métodos), construídos a partir das seqüências citadas acima com utilização do software Primer Express (Applied Biosystems), foram realizadas reações de PCR em Tempo Real. A especificidade dos produtos amplificados foi avaliada pela análise da curva de dissociação (Figura 12).

A



B

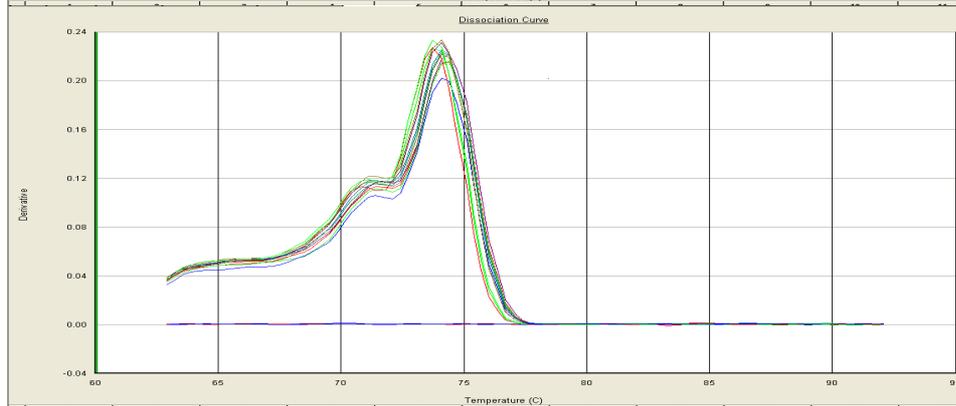


Figura 12: Curvas de dissociação das amplificações utilizando dois pares de *primers* do mesmo gene de ácido aspártico: (A) Asp 1B, com amplificação de um único pico referente ao produto específico; (B) Asp 1A, amplificando além do produto específico um pico secundário, provavelmente resultante da formação de estruturas secundárias do *primer*.

A expressão dos genes estudados foi comparada à expressão do gene normalizador GPDH C (Figura 13). Os resultados obtidos confirmam, em grande parte, os dados apresentados nos ensaios bioquímicos. As maiores diferenças de expressão dos genes Cis5, Cis8, Cis22 e Cis23 foram observadas entre os diferentes estádios de maturação, em frutos verdes e “cereja” (Tabela 3).

Dentre os frutos coletados em Mococa, nos frutos verdes, em geral, as proteases apresentaram-se mais expressas, assim como nos ensaios bioquímicos, sendo até 19,3 vezes mais expressas que em frutos “cereja”, como acontece, por exemplo, para o gene Cis 5. Por outro lado, essa diferença de expressão do gene Cis 5 não foi observada entre os dois estágios de maturação dos frutos de Adamantina, uma vez que apenas diferenças da ordem de duas

vezes foram consideradas como significativamente expressas de maneira diferente entre as amostras.



Figura 13: Plotagem dos dados de valor de *threshold cycle* (Ct) em função do valor de fluorescência (Rn) da amplificação (versão linear), ilustrando a expressão diferencial de duas amostras de café no estágio verde de maturação, uma oriunda da região mais quente (Adamantina) e a outra de clima ameno (Mococa), utilizando o *primer* Cis 5.

Um gene similar a Cis 5, *SH-EP*, encontrado a partir de busca por similaridade no banco de dados, codifica uma protease cisteínica envolvida na degradação de globulina de reserva em sementes em germinação e em frutos no estágio inicial do processo de amadurecimento em feijão-da-índia (*Vigna mungo*, Yamauchi *et al.*, 1992). Igualmente similar é o gene que codifica uma cisteína endopeptidase do tipo papaína (EC 3.4.22.2) da semente de mamona (*Ricinus communis* L.), que foi clonado devido a 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 endopeptidase cisteínica tem como função transferir os metabólitos de um tecido para outro emergente (Schmid *et al.*, 1998), mostrando que

realmente parece haver um padrão de expressão deste gene em tecidos mais jovens, em processo de desenvolvimento.

Tabela 3: Expressão diferencial de genes codificadores de proteases em frutos verdes e frutos “cereja” de *C. arabica* nas localidades estudadas, utilizando PCR em tempo real. *número demonstrativo de quantas vezes o loco de protease é mais expresso no fruto verde em relação ao fruto “cereja”. Valores negativos indicam que o gene foi mais expresso em frutos cerejas do que em frutos verdes em cada uma das localidades.

	Localidade	GPDH C*
Cisteína 5	Adamantina	1,3
	Mococa	19,3
Cisteína 8	Adamantina	12,9
	Mococa	9,1
Cisteína 22	Adamantina	-3,2
	Mococa	-1,3
Cisteína 23	Adamantina	3,4
	Mococa	1,3
Aspártico 1	Adamantina	1,5
	Mococa	-1,2

O gene Cis 8 foi mais expresso nos frutos verdes de ambas as localidades (Tabela 3). O gene Cis 22 apresentou uma menor taxa de transcrição em frutos verdes que em frutos “cereja” nas duas localidades avaliadas (Tabela 3). Estes dados mostram que, além da expressão destes genes ser influenciada pelas condições ambientais de cultivo, é altamente provável que a transcrição desses genes varie durante a maturação dos frutos do café.

Também foi avaliada a expressão diferencial das proteases comparando-se cada estágio de maturação entre as localidades (Tabela 4). Frutos maduros de Adamantina mostraram expressão do gene Cis 5 aproximadamente 6,5 vezes maior que frutos oriundos de Mococa. Porém, nos frutos verdes, a expressão de Cis 5 foi em média 2,5 vezes maior em Mococa. Este dado de maior expressão de um gene de protease em Mococa em relação à Adamantina é discrepante dos outros resultados obtidos no trabalho, e talvez mereça maior atenção em trabalhos futuros, uma vez que tanto em análises bioquímicas quanto em grande parte das

análises moleculares, a expressão destes genes é maior nas condições de stress enfrentadas no município de Adamantina.

Tabela 4: Expressão diferencial de genes codificadores de proteases em frutos de *C. arabica* em diferentes estágios de maturação cultivados em Adamantina e Mococa. *número demonstrativo de quantas vezes o loco de protease é mais expresso em Adamantina em relação à Mococa. Valores negativos indicam que o gene foi mais expresso em frutos coletados em Mococa do que em Adamantina em cada um dos diferentes estágios de maturação.

	Maturação	GPDH C*
Cisteína 5	Verde	-2,4
	Cereja	6,5
Cisteína 8	Verde	2,5
	Cereja	1,8
Cisteína 22	Verde	-1,1
	Cereja	1,3
Cisteína 23	Verde	2,9
	Cereja	1,1
Aspártico 1	Verde	1,5
	Cereja	-1,2

Houve um aumento na expressão dos genes Cis 8 e Cis 23, em frutos verdes, de aproximadamente três vezes em grãos de Adamantina em relação à Mococa (Tabela 4). Genes com elevada similaridade a estes dois últimos genes, segundo dados da literatura, têm sua expressão induzida em condições de stress, como o gene SaCysP, isolado da espécie *Aster tripolium*, similar a Cis 8 que, além de apresentar resposta tecido-específica em raízes e folhas, tem sua expressão aumentada em condições de estresse salino (Takeda *et al.*, 2004). O gene tdi-65, isolado em tomate e similar ao gene Cis 23, apresenta maior expressão em situações de estresse hídrico (Harrak, 2001).

É interessante notar que a análise de expressão foi feita para cada gene de protease separadamente e que por este motivo, em algumas análises os resultados moleculares diferem de alguma maneira dos dados de atividade enzimática, uma vez que os ensaios espectrofotométricos representam a ação de todas as proteases presentes nos grãos, incluindo

aquelas aqui isoladas e estudadas nos ensaios com PCR. De qualquer forma, as análises de atividade enzimática e de expressão gênica mostram que a ação de proteases parece ser bastante complexa. O fato de que algumas das proteases apresentam seqüências similares a proteases que são moduladas por estresses em outras plantas indica que estudos posteriores poderão definir o papel de cada enzima frente às variações ambientais que ocorrem durante o desenvolvimento e maturação do fruto de café.

A fim de obtermos um melhor entendimento acerca das relações entre as proteases estudadas, construiu-se um dendrograma incluindo os fragmentos da região do domínio peptidase isolados de café e outras seqüências com similaridade a proteases depositadas no NCBI (Figura 14 e apêndice II). As análises feitas a partir do dendrograma são bastante interessantes, pois cada gene estudado foi separado em um subgrupo, mostrando que apesar de todos apresentarem domínios de proteases da família das cisteínas, mais especificamente da subfamília C1A (proteases papaínicas), existem diferenças em outras regiões dos genes capazes de separá-los em grupos distintos. Um outro alinhamento feito a partir de algumas seqüências completas que apresentaram similaridade com seqüências de proteases de café nos permite uma melhor visualização destas regiões diferentes entre os genes (apêndice III).

Apesar de nem todas as seqüências disponibilizadas pelo banco de dados terem sua função determinada, é possível perceber que a grande maioria delas é expressa em sementes em germinação ou em desenvolvimento. Várias delas atuam na degradação de proteínas de reserva, assim como os frutos neste trabalho utilizados para o isolamento dos genes e posterior análise de expressão.

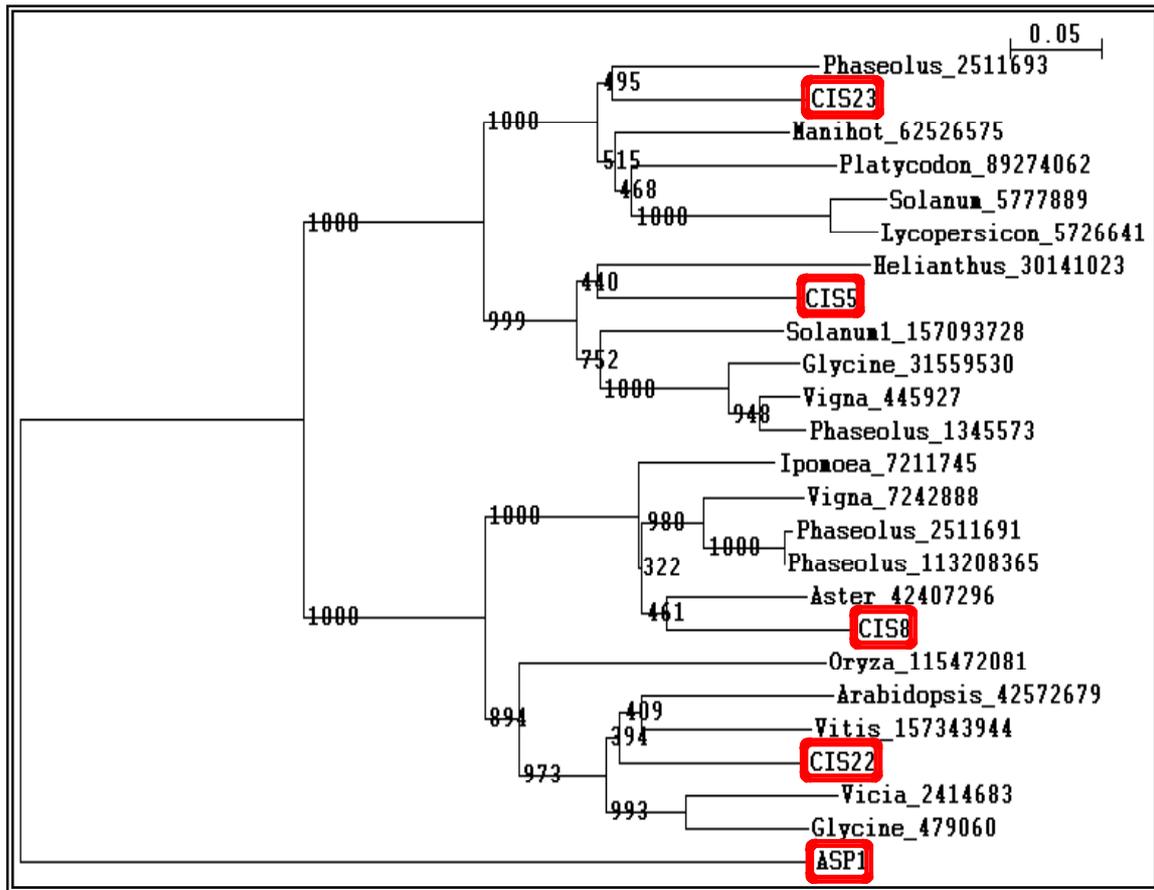


Figura 14: Árvore *NJ* gerada pelo ClustalX ilustrando as relações de similaridade entre diversas seqüências de aminoácidos da região conservada de diferentes proteases papaínicas, obtidas no banco de dados NCBI e as seqüências deduzidas de aminoácidos, correspondentes a região conservada, de *Coffea arabica* dos contigs Cis 5, Cis 8, Cis 22 e Cis 23. Valor de Bootstrap baseado em 1000 repetições. Os números após os nomes genéricos denotam o número de acesso do Banco de dados NCBI.

A família das papaínas apresenta uma vasta gama de atividades, incluindo endopeptidases de amplo espectro, como a papaína, aminopeptidases, peptidases dipeptídicas e enzimas com atividade tanto exo como endopeptidásica (Rawlings et al, 2008). Pela observação do dendrograma, nota-se que uma mesma espécie pode apresentar proteases de diferentes subgrupos, como acontece com *Phaseolus vulgaris*, *Vigna mungo*, *Vicia sativa* e *Glycine max*. Nesta última espécie, por exemplo, as proteases altamente similares aos genes Cis 5 e Cis 22 têm funções bastante diferentes. As homólogas à Cis 5 são ligadas à

senescência (Ling *et al.*, 2003) e as homólogas à Cis 22 são induzidas em condições de estresse hídrico (Nong *et al.*, 1995). Diversas seqüências analisadas estão diretamente ligadas a condições de estresse, como a isolada de *Aster tripolium*, que tem sua expressão aumentada em condições de estresse salino (Takeda *et al.*, 2004) e a isolada de *Lycopersicon esculentum*, que responde a estresse hídrico (Harrak H., 2001).

O grupo no qual se encontra o gene Cis 23 apresenta um domínio extra não apresentado pelos outros grupos, o domínio granulina (apêndice III). Este domínio pode apresentar diversas funções biológicas, sendo provavelmente ativado por processamento proteolítico pós-translacional. Ele é mais facilmente encontrado em representantes do reino Metazoa (Bhandari *et al.*, 1992). Em plantas, este domínio está geralmente associado à região C-terminal de proteases cisteínicas, pertencentes à subfamília da papaína.

Um fato interessante e que merece maior atenção em estudos futuros é a presença do peptídeo líder do operon histidina apresentado somente na seqüência do gene Cis 22, como pode ser visto no apêndice III. Este operon contém todos os genes responsáveis pela biossíntese de histidina e sua região 5' não traduzida apresenta características típicas de operons sintéticos de diversos aminoácidos (Delorme *et al.*, 1999).

CONCLUSÕES

Análises da composição química de frutos de café permitiram observar que a ação de proteases, enzimas que apresentam maior atividade em regiões de clima quente aparentemente por sofrerem forte influência das condições ambientais, é responsável por várias das alterações químicas detectadas em diferentes estágios dos frutos de café, principalmente em grão verdes. Estas alterações são responsáveis por modificações no conteúdo e perfil de aminoácidos e proteínas dos grãos, causando variações perceptíveis em análises de qualidade da bebida.

Dados de análises moleculares obtidos a partir de reações de PCR em Tempo Real confirmam a maior atividade de proteases no estágio inicial do desenvolvimento de frutos provindos de regiões que apresentam médias anuais de temperatura mais elevadas, corroborando os ensaios bioquímicos realizados.

Através da análise dos resultados de comparação de seqüências dos genes de proteases, níveis de expressão em diferentes amostras e suas funções mais conhecidas, conclui-se que a atividade proteásica parece ser realmente capaz de influenciar a qualidade final da bebida do café, alterando o modo como as proteínas são utilizadas. Estas variáveis estão também, aparentemente, ligadas a um outro fator: as condições climáticas dos locais de cultivo, dentre as quais, a temperatura parece ser de grande relevância.

Análises futuras mais detalhadas acerca de alguns dos genes de proteases estudados, como o Cis8 e o Cis5, com frutos de café de outras cultivares podem trazer dados extremamente interessantes para incrementar os resultados obtidos neste trabalho. Além disso, em próximos trabalhos focados na influência de proteínas na qualidade da bebida, novos ensaios de eletroforese bidimensional podem ser realizados, utilizando uma faixa mais restrita de pontos isoelétricos, de 4 a 7, por exemplo, e uma menor quantidade de amostra, levando a uma melhor visualização dos pontos, o que permitiria uma identificação mais precisa das

proteínas presentes, bem como o seqüenciamento das proteínas através da utilização de técnicas de espectrometria de massa traria grandes contribuições ao estudo da influência das proteínas na qualidade da bebida do café.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agwanda CO, Baradat P, Eskes AB, Cilas C, Charrier A (2003). Selection for bean and liquor qualities within related hybrids of Arabica coffee in multilocal field trials. *Euphytica* 131: 1-14.
- Arnoldi A (2004). Factors affecting the Maillard reaction. In: “Understanding and measuring the shelf-life of food”, Woodhead Publishing, Cambridge.
- Ben Amor M, Denis V, McCarthy J (2003). Molecular cloning and characterization of cDNAs encoding two proteinases and a proteinase inhibitor from *Coffea canephora* (Robusta). In: Proc. 7th International Symposium of Plant Molecular Biology ISPMB, Barcelona.
- Berkelman T, Stenstedt T (1998). 2-D Electrophoresis—Principles and Methods. Amersham Biosciences, London.
- Bhandari V, Palfree RG, Bateman A (1992). Isolation and sequence of the granulin precursor cDNA from human bone marrow reveals tandem cysteine-rich granulin domains. In: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 1715-1719.
- Billings PC, Habres JM (1992). A Growth-Regulated Protease Activity that is Inhibited by the Anticarcinogenic Bowman-Birk Protease Inhibitor. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 3120-3124.
- Bouché N, Fromm H (2004). GABA in plants: just a metabolite? Trends in Plant Science 9: 110-115.
- Bovy A, de Vos R, Kemper M, Schijlen E, Pertejo MA, Muir S, Collins G, Robinson S, Verhoeven M, Hughes S, Santos-Buelga C, Tunen A (2002). High-flavonol tomatoes resulting from the heterologous expression of the maize transcription factor genes LC and C1. *Plant Cell* 14: 2509-2526.

- Bradford MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.
- Bytof G, Knopp SE, Schieberle P, Teutsch I, Selmar D (2004). Influence of processing on the generation of γ -aminobutyric acid in green coffee beans. *European Food Research and Technology* 220 (3-4): 245-250.
- Callis J (1995). Regulation of Protein Degradation. *Plant Cell* 7: 845-857.
- Camargo AP, Santinato R, Cortez JG (1992). Aptidão Climática para qualidade da bebida nas principais regiões cafeeiras de Arábica no Brasil. In: *Anais do 18º Congresso Brasileiro de Pesquisas Cafeeiras Araxá, Minas Gerais*, 1: 70-74.
- Clarke RJ, Macrae R (1985). *Coffee*. Vol 1. Chemistry. Elsevier Applied Science Publishers LTD, London. 306p.
- Clifford MN (1979). Chlorogenic acids-Their complex nature and routine determination in coffee beans. *Food Chemistry* 4: 63-71.
- Clifford MN, Kazi T (1987). The influence of coffee bean maturity in the content of chlorogenic acids, caffeine and trigonelline. *Food Chemistry* 26: 59-69.
- Cocking EC, Yemm EW (1954). Estimation of amino acids by ninhidrin. *Biochemistry Journal* 58: 12-13.
- Coradi S, Guimarães S (2006). *Giardia duodenalis*: protein substrates degradation by trophozoite proteases. *Parasitology Research* 99: 131-136.
- Dart SK, Nursten HE (1985). Volatile Components. In: Clarke RJ, Macrae R (eds) “*Coffee*. Vol 1. Chemistry”. Elsevier Applied Science Publishers LTD, London, 223-265.
- De Castro RD, Marraccini P (2006). Cytology, biochemistry and molecular changes during coffee fruit development. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 18: 175-199.

- Decazy F, Avelino J, Guyot B, Perriot JJ, Pineda C, Cilas C (2003). Quality of different honduran coffees in relation to several environments. *Journal of Food Science* 68: 2356-2361.
- Delorme C, Ehrlich SD, Renault P (1999). Regulation of expression of the *Lactococcus lactis* histidine operon. *Journal of Bacteriology* 181: 2026-2037.
- Dominguez F, Cejudo FJ (1996). Characterization of the endoproteases appearing during wheat grain development. *Plant Physiology* 112: 1211-1217.
- Douglas CJ (1996). Phenylpropanoid metabolism and lignin biosynthesis: from weeds to trees. *Trends in Plant Science* 1: 171-178.
- Emmanuel OA (1983). Accumulation and quality of storage protein in developing cowpea, mung bean and soya bean seeds. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 34: 1351-1357.
- Farah A, Donangelo CM (2006). Phenolic compounds in coffee. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 18: 23-36.
- Gachon C, Mingam A, Charrier B (2004). Real-time PCR: what relevance to plant studies? *Journal of Experimental Botany* 55: 1445-1454.
- Geromel C, Ferreira LP, Guerreiro SMC, Cavalari AA, Pot D, Pereira LFP, Leroy T, Vieira LGE, Mazzafera P, Marraccini P (2006). Biochemical and genomic analysis of sucrose metabolism during coffee (*Coffea arabica*) fruit development. *Journal of Experimental Botany* 57: 3243-3258.
- Griffiths AJF, Miller JH, Suzuki DT, Lewontin RC, Gelbart WM (2002). *Introdução à Genética*. Guanabara Koogan S.A. Rio de Janeiro. 794p.
- Harrak H, Azelmat S, Baker EN, Tabaeizadeh Z (2001). Isolation and characterization of a gene encoding a drought-induced cysteine protease in tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Genome* 44: 368-374.

- Herrera JC, Combes MC, Cortina H, Lashermes P (2004). Factors influencing gene introgression into the allotetraploid *Coffea arabica* L. from its diploid relatives. *Genome* 47: 1053-1060.
- Herrmann KM (1995). The shikimate pathway as an entry to aromatic secondary metabolism. *Plant Physiology* 107: 7-12.
- Ho CT, Hwang HI, Yu TH, Zhang J (1993). An overview of the Maillard reactions related to aroma generation in coffee. In: Proceedings of the 15th Colloquium. ASIC, Montpellier. 519-527.
- Ho CT, Zhang Y, Oh YC, Shu CK (1992). Flavor Precursors. American Chemistry Society 1: 193-202.
- Jarrett HW, Cooksy KD, Ellis B, Anderson JM (1986). The separation of o-phthalaldehyde derivatives of amino acids by reversed-phase chromatography on octylsilica columns. *Analytical Biochemistry* 153: 189-198.
- Kinnersley AM, Turano FJ (2000). Gamma aminobutyric acid (GABA) and plant responses to stress. *Critical Reviews in Plant Sciences* 19: 479 – 509.
- Ling J, Kojima T, Shiraiwa M, Takahara H (2003). Cloning of two cysteine proteinase genes, CysP1 and CysP2, from soybean cotyledons by cDNA representational difference analysis. *Biochimica et Biophysica Acta* 1627: 129-139.
- Lopes CR, Musche R, Hec M (1984). Identificação de pigmentos flavonóides e ácidos fenólicos nos cultivares Bourbon e Caturra de *Coffea arabica* L. *Revista Brasileira de Genética* 7: 657-669.
- Ludwig E, Lipke U, Ulrike R, Anne J (2000). Investigations of peptides and proteases in green coffee beans. *European Food Research and Technology* 211: 111-116.
- McCarthy J, Amor MB, Petiard V, Tanksley SD, Lin C (2007). Modulation of coffee flavor precursor levels in green coffee grains. U.S. Patent 0022489/2007.

- Macrae R (1985). Nitrogenous Compounds. In: Clarke RJ, Macrae R (eds) "Coffee. Vol 1. Chemistry". Elsevier Applied Science Publishers LTD, London, 115-142.
- Marcone MF (2004). Composition and properties of Indonesian palm civet coffee (Kopi Luwak) and Ethiopian civet coffee. *Food Research International* 37: 901-912.
- Materska M, Perucka I (2005). Antioxidant activity of the main phenolic compounds isolated from hot pepper fruit (*Capsicum annuum* L.). *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 53: 1750-1756.
- Mayer RR, Cherry JH, Rhodes D (1990). Effects of heat shock on amino acid metabolism of cowpea cells. *Plant Physiology* 94: 796-810.
- Mazzafera P (1999). Chemical composition of defective coffee beans. *Food Chemistry* 64: 547-554.
- Mendes AJT (1941). Cytological observations in coffea. *American Journal of Botany* 28: 784-789.
- Montavon P, Bortlik K (2004). Evolution of robusta green coffee redox enzymatic activities with maturation. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 52: 3590-3594.
- Montavon P, Duruz E, Rumo G, Pratz G (2003a). Evolution of green coffee protein profiles with maturation and relationship to coffee cup quality. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 51: 2328-2334.
- Montavon P, Mauron AF, Duruz E (2003b). Changes in green coffee protein profiles during roasting. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 51: 2335-2343.
- Nobile PM, Yamamoto PY, Colombo CA (2007). Seleção de genes constitutivos para a normalização da PCR em tempo real em frutos de café. In: 4º Congresso Brasileiro de Melhoramento de Plantas. São Lourenço.
- Nong VH, Becker C, Müntz K (1995). cDNA cloning for a putative cysteine proteinase from developing seeds of soybean. *Biochimica Biophysica Acta* 1261: 435-438.

- Ortolani AA, Cortez JG, Pedro Junior MJ, Camargo MBP, Thomaziello RA, Alfonsi RR (2000). Clima e qualidade natural de bebida do café arábica no estado de São Paulo. In: 1º Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil. Poços de Caldas. Anais. Brasília: Embrapa-Café 1: 662-664.
- Palma JM, Sandalio LM, Javier CF, Romero-Puertas MC, McCarthy I, del Rio LA (2002). Plant proteases, protein degradation, and oxidative stress: role of peroxisomes. *Plant Physiology and Biochemistry* 40: 521-530.
- Rawlings ND, Morton FR, Kok CY, Kong J, Barrett AJ (2008). MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Research* 36: 320-325.
- Reineccius GA (1995). The Maillard reaction and coffee flavor. In: Proceedings of the 16th Colloquium (Kyoto). ASIC, Paris. 249-257.
- Rogers WJ, Bezard G, Deshayes A, Meyer I, Petiard V, Marraccini P (1999a). Biochemical and molecular characterization and expression of the 11S-type storage protein from *Coffea arabica* endosperm. *Plant Physiology and Biochemistry* 37: 261-272.
- Rogers WJ, Michaux S, Bastin M, Bucheli P (1999b). Changes to the content of sugars, sugar alcohols, myo-inositol, carboxylic acids and inorganic anions in developing grains from different varieties of Robusta (*Coffea canephora*) and Arabica (*C. arabica*) coffees. *Plant Science* 149: 115-123.
- Sano M, Kawashima N (1982). Changes in the contents of free and protein amino acids in tobacco seeds and placentae during maturation. *Plant and Cell Physiology* 23: 1245-1250
- Schaller A (2004). A cut above the rest: the regulatory function of plant proteases. *Planta* 220: 183-197.
- 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 SE (2001). New aspects of coffee processing. The relation between seed germination and coffee quality. In: Proceedings of the 19th Colloquium. ASIC, Paris.
- Shimizu MM, Mazzafera P (2000). Compositional Changes of proteins and amino acids in germinating coffee seeds. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 43: 259-265.
- Silva EA, 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. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 17: 229-238.
- Sussulini A (2007). Avaliação das alterações protéicas e metaloprotéicas em soja após o processo de modificação genética. Universidade Estadual de Campinas, Dissertação de Mestrado. 72p.
- Swain T, Hillis WE (1959). The phenolic constituents of *Prunus domestica*. The quantitative analysis of phenolic constituents. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 10: 63-68.
- Taiz L, Zeiger E (2002). *Plant Physiology*. 3rd edition, Sinauer Associates, California. 690p.
- Takeda M, Kuwata C, Uno Y, Kanechi M, Shibata D, Inagaki N (2004). Isolation and characterization of sea aster salt-stress responsive cysteine protease gene obtained by a hetero-probed macroarray. *Plant Biotechnology* 21: 127-133.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994). CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22 (22): 4673-4680.
- Ullah AHJ, Mullaney EJ (1996). Disulfide Bonds Are Necessary for Structure and Activity in *Aspergillus ficuum* Phytase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 227: 311-317.

- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology* 3 (7): 1-11.
- Vieira LGE, Andrade AC, Colombo CA, Moraes AHA, Metha Â, Oliveira AC, Labate CA, Marino CL, Monteiro-Vitorello CB, Monte DC, Giglioti É, Kimura ET, Romano E, Kuramae EE, Lemos EGM, Almeida ERP, Jorge ÉC, Albuquerque ÉVS, Silva FR, Vinecky F, Sawazaki HE, Dorry HFA, Carrer H, Abreu IN, Batista JAN, Teixeira JB, Kitajima JP, Xavier KG, Lima LM, Camargo LEA, Pereira LFP, Coutinho LL, Lemos MVF, Romano MR, Machado MA, Costa MMC, Sá MFG, Goldman MHS, Ferro MIT, Tinoco MLP, Oliveira MC, Van Sluys MA, Shimizu MM, Maluf MP, Eira MTS, Guerreiro Filho O, Arruda P, Mazzafera P, Mariani PDSC, Oliveira RLBC, Harakava R, Balbao SF, Tsai SM, Mauro SMZ, Santos SN, Siqueira WJ, Costa GGL, Formighieri EF, Carazzolle MF, Pereira GAG (2006). Brazilian coffee genome project: an EST-based genomic resource. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 18: 95-108.
- Voigt J, Voigt G, Heinrichs H, Wrann D, Biehl B (1994). In vitro studies on the proteolytic formation of the characteristic aroma precursors of fermented cocoa seeds: The significance of endoprotease specificity. *Food Chemistry* 51: 7-14.
- Wrigley G (1988). *Coffee*. Longman Scientific & Technical and John Wiley & Sons. New York. 639p.
- Yamauchi D, Akasofu H, Minamikawa T (1992). Cysteine Endopeptidase from *Vigna mungo*: Gene Structure and Expression. *Plant and Cell Physiology* 33: 789-797.
- Zollner H (1999). *Handbook of Enzyme Inhibitors*, 3rd edition, John Wiley & Sons, Weinheim. New York. 2316p.

APÊNDICE I

Cis5

CTTTGAAAAGTACCGCCTTTCTCCTTAATTTCTGATAAAAGATTACGTCAAGAAAAGTCTCGGCCATGACACAGTTTTTCGTGCTATGCAAAGAGAACCTAGAAATTTAGAAAAGCGGCTATATAA
ACCAAACATAGTTGCACACTAGCCAAAAATCGAGCGGTCTCTTACATCTTAAATCCTGATTTTTATAGATTTCGCTTTTCGTGAAGTTCAATCTTCGCAGTCGCTCACTACATTTGGTAGACA
TACTGCGATTATGAAAATGGGGAAGGCTTTCTTTTGTCTGTTGTATTGGCTGTGATCTTAGTGGCGGCTATCAGCATGGAGATCACAGAAAAGAGATTTGGCGTCTGAGGAAAGCTTGTGG
GACTTGTACGAAAAGATGGAGGAGCCATCATACTGTTTCTCGAGACCTTTCTGAGAAAACGAAAGCGCTTTAATGTTTTCAAGGCAAATGTCCATCATATTCACAAGGTGAACCAGAAGGACA
AGCCTTACAAGCTGAAAACCAACAGTTTCGCTGATATGACCAACCACGAGTTCAGGGAATTCTACAGTTCCTAAGGTGAAACATTACCGGATGCTCCATGGCAGCCGTGCTAATACTGGATT
TATGCATGGGAAGACTGAAAGTTTCCAGCCTCCGTTGATTGGAGAAAAGCAAGGAGCCGTGACTAGCGTCAAGAATCAAGGCAAATGTGGTAGCTGTTGGGCATTTTCAACTGTGGTTGGA
GTCGAGGGAATCAACAAAATCAAACTGGCCAATTAGTTTCCCTGTCCGAGCAAGAACTTGTGACTGTGAAACGGACAATGAAGGATGCAACGGAGGACTCATGGAGAATGCATACGAGT
TTATTAAGAAAAGTGGGGAATAACAACCTGAGAGGCTATATCCCTACAAGGGAAGAGATGGCAGCTGTGATTACATAAAGATGAATGCCCTGGTGTGACTATTGATGGGCATGAAATGGTA
CCGCAAACGATGAAAATGCCTTGATGAAAGCTGTTGCTACCCAGC

Cis8

ACTTATCCACGCAGGTAGGAGCACGACCACCGATTCTCGGTTTTCAAGGCTAACTTGCGCCGTGCTAAGCGCCACCAGCTCCTTGACCCTTCGCGCTCCACGGCGTTACTAAGTTCTCT
GACCTCACTCCGTCCGAGTTCCGGCGTAACCACCTCGGACTTAATAAGCACAAGCGACGGCTCAGACTCCCTGCCGATGCTAACAAGGCTCCGATCCTCCCTACCACCGATCTTCCTGCTG
ATTTTGACTGGCGTGACCATGGAGCCGTCACCCCGTCAAAAGATCAGGATTGTTAGCTTCATTTGAGTCACTCGTGAGTCTATTATAACGTTTTCGTCCGATTACTTTGACGGAGTTTGG
GTGTTTGTAGGGTTCCTGCGGATCATGCTGGTCCCTCAGTACAACCGAGCGTTGGAAGGAGCGCACTATTTGGCCACCAGAGAGCTAGTCAGCCTCAGCGAGCAGCAGCTTGTGGATTG
TGACCATGAGTGCGATCCAGCAGAAATATAATTCATGTGATTCTGGTTGTAATGGCGGATTAATGAACAATGCCTTCGAGTACATACTGAAATCTGGTGGAGTTGAACGTGAGCAAGATTAT
CCTTACACTGGCAGGGATGAGAAAATGTAATTTGATAAGAGCAAAATGCTGCTAAAGTGTCCAACCTCAGTGTGCTCCACCGACGAAGATCAGATTGCTGCAAACTGGTGAAGCATG
GCCCTCTTGCAGTTGCGATCAATGCAATCTGGATGCAGACATATATTGGAGGGTTTTCATGCCATACATTTGTTCAAAGAGCCAGGATCACGGGGTGCTTTTAGTTGGGTATGGTGTGCTGC
GGGCTACGCCCTATCCGGCTCAAGGACAAGCCTTACTGGATCATAAAGAACTCGTGGGGTAAAACTGGGGAGAGAGTGGCTACTACAAGTTCTGTAGGGCTGATCGCAATTTGTGCGGG
GTTGATTTCTATGGTCTCATCTGTGGCTGCCGTTACACATGAACTCAGTATTAAGTCATGAACCTTCATTTGGTGGTACTATCACACATCAACTCAGTATCAAGTCATTGATCTTCATTTG
TTGGTACTGTACTTAAATATGAACTTATTTGGGTATTGTGTATATAGGAACTACTTTCCATTAATGTATTCTAGAAGATGGTCTGTATGGTATCACCTCGAGGCTCCAACAAACATTCCTA
AAATGGTTTAAATTAGAACTCGACGTATATCAGAA

>C22

TGCAGATGATACATACAGCCACAAAAGATGATGATGATGACAAGCGGAGGTCTGATGCTAACCTGCACCCTGGCTGTTACCCTCTTATCCTGCGCACTCATCTTCAACCCTTTCCAACATG
AAATTCAGTATCCAATACAAGACCCGTTAATGATACGCAAGTCACTGACAATCACCACCACCGCCACCACCCAGGTAGGTCTTCTGCAAACCATCGTCTACTGGGCACCACCACAGAGCT
TCACTTCAAGTCCCTCATGGAGGAGTACGAGAAAAGTTACTCTACGCACGAGGAGTACGTGCACCGCTTGGGGATTTTTGCCAAGAACCCTCATCAAGGCCGCGGAGCACCAGGCCATGGAC
CCCTCCGCAATCCACGGCGTCACCCAGTTCTCTGATCTTACCGAGGAGGAGTTTGGAGCTACGTACATGGGCCTTAAAGGTGGCGCTGGAGTTGGTGGGACCACCAGCTGGGGAAAAGATG
ATGGGGATGAGAGTGCAGCAGAGGTGATGATGGATGTATCTGATTTGCCGGAGAGTTTTGATTGGAGAGAAAAGGTGCTGTGACCGAAGTCAAGACGCAGGGAAGATGTGGATCGTGTG
GGCTTTTAGTACAACCTGGAGCTATTGAAGGAGCTAATTTCACTACTTGTATAGAGGCAGGAGGTATAGAGGAGGAGGAAACCTATCCCTATACTGGGAAACCGCGGAGAATGCAAAAT
GACTGTGATGATGGATGCTCTGGAGGGCTAATGACAACCTGCTTTCACTACTTGTATAGAGGCAGGAGGTATAGAGGAGGAGGAAACCTATCCCTATACTGGGAAACCGCGGAGAATGCAAAAT
TCAATCTGAGAAAAGTTGCGGTGAAAGTGCAGAAATTCACAAAAATCCCTGCGGATGAGAGTCAAATGCTGCCAATGTAGTGCATAATGGCCCGCTTGAATTTGGATTGAATGCTGTATT
CATGCAAACTTACATCGGGGTGTGTCATGCTCTTATTTGTGACAAAAAGAGGATCAACCATGGTGTCTTCTTGTGGGCTATGGTCTAGAGGCTTCTCGCTCCTTAGGCTTGGCTAC
AAGCCATACTGGATTATCAAGAACTCATGGGGAAGCGTTGGGGCGAACATGGTTACTACCGGCTTTGTGAGGGCACAACATGTGTGGAATGAGCGCAATGGTTTCAGCTGTGGTGACAC

>C23

CGGCCCTCCGCCACAGAAAAGAAATCCCAAAACATGGCGACTCTTTTCGTTACTTCTCTTTGTTTTCTTTGCTTTCTTTTCGCATCAGCTCAGGACATGTCATCCTGAGCTACGGTAAACGCAA
 ACCATAAAGACGAGTGGCAGTGGGAGGACGGATGAAGAAGTATGGCCTTGTACGAGGAATGGCTAGTGAAACATGGTAAGTCGTACAACGGCCTGGGAGAGAAAAGATAAAAAGGTTTGAAAT
 TTTTAAAGGATAATCTTAGGTACATCGACGAAACAAAACAGCTTGCCCAACAGGACGTACCAGCTCGGGCTGAACCGGTTTGTGATCTGAGCAACGAGGAGTACCGTTCCACTTACTTTGGGA
 ACCCGCCTGATCCCAAAAAGGAGGTTGGCCAAGACTTCCAGCGATCGCTACCGTCCAAAAGTAGGTGATAGCCTGCCGAACCTCATTGACTGGAGAGAAAAGGTGCTGTTCTTCCGGTCA
 AAGATCAGGGAAGCTGTGGGAGTTGCTGGGCCTTCTCAGCAGTTGCTGCCGTGGAAGGGATCAACCAGATTGTGACTGGTGATTTGATCTCCCTGTCTGAGCAAGAAGTACTAGTGATTGTGA
 TACTTCTTATGATGAAGGCTGCAACGGTGGCCTCATGGACTATGCGTTTGTAGTTTCATCATCAACAATGGTGGCATTGATACTGAGGAGGACTATCCGTACAGAGGCAGGGACATGAGATGT
 GACACATACAGGAAAAATGCCAGGGTGGTACAATTGACGGCTATGAAGATGTAATTCCTATGATGAGAGGGCACTGCAGAAGGCCCGGCCAATCAACCCGTCAGTGTTGCCATTGAAG
 GTTCGAGCAGAGATTTCCAACCTCTATTTGAAAGGTGATTACCGGCAACTGTGGGACTGCATTAGATCACGGTGTGAATGTGGTTGGATACGGTACAGCAAACGGTAAGGATTATTGGAT
 CGTCAGAACTCATGGGGTGCAGAGTGGGGGAGGATGGCTACATCAGGATGGAGCGTAATGTCAAAGCAAACCTCAGGCCTATGTGGCATCACCAGTGAGCCCTCTTACCCTGTCAAGAAA
 GGCCAAAATCTCCCAATCCTGGTCTTCCCCTCCATCTCCAATCAAGCCTCCGGCAGCCTGTGATAATTACTATGAATGCCACAGGACAACACCTGCTGCTGCGTCTACGAGTTCTATG
 GCTCGTGCTTCGAATGGGGATGCTGCCCTCTAGAAGGTGCGTATGCTGTGAAGACCCTACAAGCTGCTGCCCCACGATTACCCCGTTTGCCATGTTTTCAGTCAGGCCTTGTCTACTTAG
 CAAGGACAACCCCTCTTGGAGTGAAGGTTATGAAGCACATGCTTGTAGGCCTATTAAGAGCATGAAGTCAGGCACGGAAGGAATGAAGAGCAGCTCTTAAAAAGACCTGATGACCAATCTG
 TAAGTGGTGGATAAAGGAAAAGGAAAAGGCAGAGGTTTATCACCTGTTTTCCATAGAGGCCTCTAGTCCACCCTGAAGTTACAGAATCCGATTGATGATTGATTAAAGATGATTAGACGGT
 CATCTGTATATAGGCTTTAAATATCTATCTAAAACTTCTATTTCGAGCAAAACAGAACAAGTAG

>Asp1

CTCTTTGCCAGTGGACCGTCTTCCGTCCAACAAAATACAAGTCTACTATCAAGCATAACCAACGATGGAGAGGAGGTACCTTTGGGCAGCATTGTATTAGGGGCGATTTGTGTCTCTCT
 ATTTCCCTCTTCCCTTCTGAAGGATTAAGCGAATTAGCCTGAAAAAACCCTTAGATATTCAAAGCATAAGAGCTGCCAAATTAGCTCATCTGGAGAGCACACATGGCGCTGGTAGGAAA
 GAGATGGACAACAATTTAGGCAGTTCCAATGAGGACATATTGCCTTTAAAGAATTACCTGGATGCCCAGTACTATGGAGAGATTGGAATTGGTACTCCACCTCAGAAGTTCACAGTTATAT
 TTGATACAGGCAGTTCCAACCTCTGGGTGCCATCGGCAAAAATGTTACTTCTCTATTGCCTGCTGGCTCCACTCCAAGTACAAGGCAAAGAAGTCAAGTACTTATACAGCCATAGGGAAATC
 TTGTTCAATTCGTTATGGTTCTGGATCAATTTCTGGATTCTCCAGTCAAGATAACGTTGAAGTTGGTGTATCTTGTGTCAAAGATCAAGTTTTTATTGAAGCTTACGAGAAGGAAGTCTT
 ACATTTGTAATTCGAAGTTTACCGGATACTTGGCCTTGGATTCCAGGAAATCGCTGTTGATAACATGGTCCAGTCTGGTATAATATGGTGGACCAAGGTCTCGTGGATGAGCAAGTAT
 TCTCTTTCTGGCTTAACCGGATCCAAATGCTGAAGACGGAGGTGAGCTTGTCTTTGGTGGTGTAGATACAAATCACTTCAAGGAAAAGCATAACATATGTTTCTGTAACCTCAGAAGGGATA
 CTGGCAATTTAAAAATGGGAGATTTTCTCATTGGGAACGCTCAACAGGCTTTTGTGAAGGAGGTTGTGCTGCTATTGTGGACTCTGGAACATCGTTGCTCGCTGGTCCAACCTACTGTTGTG
 ACTCAAATTAATCATGCCATTGGAGCTGAAGGAGTAGTTAGCACTGAATGTAAAGAAATTTTTCACAGTATGGTGAAGTACTTTGGGATCTCCTCGTATCAGGGGACTACCCGACAGAG
 TTTGTAAACAAGCTGGTTTATGTCCCTTTCGTGGTGTCTCAGCATGAGAATGCTTATATCAAGTCAGTCGTCGATGAGGAGAACAAGGAGGAAGCTTCTGTTGGTGAATCCCGATGTGTAC
 TGCTTGTGAAATGGCTGTTGTTTGGATGCAAAAACCAGCTGAAAACAGCAGGGAACCTAAGGAGAAAAGTGTCTCGCATATGTGAATCAGCTTTGTGAAAGCATAACCAAGTCCCATGGGAGAATCC
 ATCATTGACTGCAACAGTTTATCCACCCTGCCAAAATGTTTCATTACCATCGGAGGGAAAAAGTTTTGAGCTAACCCCTAAGCAGTATGTTCTTCAAACCTGGAGAAGGCTTTTGTGAAGTCT
 GCATCAGTGGATTTCATGGCTATGGATGTGCCCGCCTCGTGGTCCCATCTGGGTTCTGGGAGATGTGTTTCATGGGAGTGTACCACACCGTGTGTTGATTATGGTAATCTCCGGATGGGTTT
 CGCAAAAAGCTGCTTAGACAAGACTATTTATTTTCGTCTACTGTTTACGGTCTTAAGAGAAGCTATGAAGACGTGTAGTAGCTTGTAAATTAGGATTTTTAATGATGCTTGGCTGGCTTATT
 TAAGGGTGGTTGTGCTTTTAAATATTGGATTTTTATATGTAATGTAAATATCTATGCGGATATGCTACCTTTGTTCTAGAGTTTTCAAGGAAACTGCAGTATCTACTTTGGTCAAGAAATGGT
 GCCACTATCTAAAAA



Primers para seqüenciamento



Primers para real time



Sobreposição de primers

APÊNDICE II

Alinhamento feito no programa Clustal X1.83 da região do domínio Peptidase C1A das seqüências com alta similaridade a proteases de café, incluindo as sequencias Cis5, Cis8, Cis22, Cis23 e Asp1, proteases estudadas neste trabalho.

Phaseolus_1345573	-----PPSVDWRKKGAVTDVKDQGQC	21
Vigna_445927	-----PASVDWRKKGAVTDVKDQGQC	21
Glycine_31559530	-----PASVDWRKKGAVTDVKDQGHC	21
Solanum1_157093728	-----PPSIDWRKKGAVTPVKDQGQC	21
CIS5	-----PASVDWRKQGAVTGVKNQGKC	21
Helianthus_30141023	-----PPSIDWRTNGAVNPIKNQGRC	21
CIS23	-----PNSIDWREKGAFLPVKDQGSC	21
Phaseolus_2511693	-----PDSVDWRKEGAVVPVKDQASC	21
Lycopersicon_5726641	-----PESIDWREKGVLVGVKDQGSC	21
Solanum_5777889	-----PESVDWRDKGVLVGVKDQGSC	21
Platycodon_89274062	-----PESVDWRAKGAVAPIKDQGSC	21
Manihot_62526575	-----PDSVDWRKEGAVAEVKDQGSC	21
Glycine_479060	-----PENFDWREKGAITEVKLQGRC	21
Vicia_2414683	-----PENFDWREKGAITGIKTQGKC	21
CIS22	-----PESFDWREKGAITEVKTQGRC	21
Vitis_157343944	-----PESFDWREKGAITEVKMQGTC	21
Arabidopsis_42572679	-----PEDFDWREKGGVTEVKNQGAC	21
Oryza_115472081	-----PASFDWRDRGAVTDVKMQGAC	21
CIS8	-----	
Aster_42407296	-----PQDFDWRDKGAVTPVKNQGSC	21
Phaseolus_113208365	-----PKDFDWRDKGAVTNVKDQGSC	21
Phaseolus_2511691	-----PKDFDWRDKGAVTNVKDQGSC	21
Vigna_7242888	-----PKDFDWRDKGAVTNVKDQGAC	21
Ipomoea_7211745	-----PSDFDWRDRGAVTPVKNQGTG	21
ASP1	QYYGEIGIGTPPQKFTVIFDTGSSNLWVPSAKCYFSIACWLHSHKYKAKKSSTYTAIGKSC	60

Phaseolus_1345573	GSCWAFSTVVAVEGINQIKTNKLVSLSEQELVDCDKEE-----NQGCNGGLMESAFE	73
Vigna_445927	GSCWAFSTIVAVEGINQIKTNKLVSLSEQELVDCDKEE-----NQGCNGGLMESAFE	73
Glycine_31559530	GSCWAFSTVVAVEGINQIKTNKLVSLSEQELVDCDTEE-----NAGCNGGLMESAFQ	73
Solanum1_157093728	GSCWAFSTVVAVEGINQIKTKKLVSLSEQELVDCDTEE-----NQGCNGGLMDPAFD	73
CIS5	GSCWAFSTVVGVEGINKIKTGQLVSLSEQELVDCETD-----NEGCNGGLMENAYE	72
Helianthus_30141023	GSCWAFSTIVGVEGINKIKTNQLVSLSEQELVDCETD-----CEGCNGGLMENGYE	72
CIS23	GSCWAFSAVAAVEGINQIVTGDLISLSEQELVDCDTSY-----DEGCNGGLMDYAFE	73
Phaseolus_2511693	GSCWAFSAIGAVEGINKIVTGDLISLSEQELVDCDTGY-----NMGCNGGLMDYAFE	73
Lycopersicon_5726641	GSCWAFSAVAAMESINAIVTGNLISLSEQELVDCDRSY-----NEGCDGGLMDYAFE	73
Solanum_5777889	GSCWAFSAVAAMESINAIVTGNLISLSEQELVDCDKSY-----NEGCDGGLMDYAFE	73
Platycodon_89274062	GSCWAFSTVNAVEGINQIVTGELITLSEQELVDCDKSY-----NEGCDGGLMDYGF	73
Manihot_62526575	GSCWAFSTIAAVEGINKIVTGDLISLSEQELVDCDTSY-----NEGCNGGLMDYAFE	73
Glycine_479060	GSCWAFSTTGSIEGANFLATGKLVSLSEQQLLDKCDNKCDITEKTSCDNGCNGGLMTNAYN	81
Vicia_2414683	GSCWAFSTTGSIEGANFLATGKLVSLSEQQLVDCDNKCDIT-KTSCDNGCNGGLMTTAYD	80
CIS22	GSCWAFSTTGAIEGANFIATGKLLSLSEQQLVDCDHMCDLKEKDDCDDGCSGGLMTTAFN	81
Vitis_157343944	GSCWAFSTTGAVEGAHFISTKLLTLSEQQLVDCDHMT-----ACDSGCEGGLMTNAYK	75
Arabidopsis_42572679	GSCWAFSTTGAAEGAHFVSTGKLLSLSEQQLVDCDQACDPKDKKACDNGCGGGLMTNAYE	81
Oryza_115472081	GSCWAFSTTGAVEGANFLATGNLLDLSEQQLVDCDHTCDAEKKTECDSGCGGGLMTNAYA	81
CIS8	-----TTGALEGAHYLATRELVSLSEQQLVDCDHECDPAEYNSCDSGCNGGLMNNAFE	53
Aster_42407296	GSCWSFSTTGALEGSHFLQTGELVSLSEQQLVDCDHECDPAEYNSCDSGCNGGLMNNAFE	81
Phaseolus_113208365	GSCWSFSTTGALEGAHFLATGELVSLSEQQLVDCDHVCDPEEYGS CD SG CNGGLMNNAFE	81
Phaseolus_2511691	GSCWSFSTTGALEGAHFLATGELVSLSEQQLVDCDHVCDPEEYGS CD SG CNGGLMNNAFE	81
Vigna_7242888	GSCWSFSTTGALEGAHFLATGELVSLSEQQLVDCDHVCDPEEYGS CD SG CNGGLMNNAFE	81
Ipomoea_7211745	GSCWSFSTTGALEGANFLATGKLVSLSEQQLVDCDHECDPEEAGS CD SG CNGGLMNSAFE	81
ASP1	SIRYGSISISGFSSQDNVEVGDLVVKDQVFIASREGSLTFVIAKFDGILGLGFQEIADV	120
Phaseolus_1345573	FIK-----QKGGITTESNYPYKAQE-----	93
Vigna_445927	FIK-----QKGGITTESNYPYKAQE-----	93
Glycine_31559530	FIK-----QKGGITTESYYPYTAQD-----	93
Solanum1_157093728	FIK-----KRGGITTEERYPYKAED-----	93
CIS5	FIK-----KSGGITTERLYPYKARD-----	92
Helianthus_30141023	FIK-----ETGGVTTEQIYPYFARN-----	92
CIS23	FII-----NNGGIDTEEDYPYRGRD-----	93
Phaseolus_2511693	FII-----KNGGIDSEEDYPYKQVD-----	93
Lycopersicon_5726641	FVI-----KNGGIDTEEDYPYKERN-----	93

Solanum_5777889	FVI-----NNGGIDTEEDYPYKERN-----	93
Platycodon_89274062	FII-----NNGGIDTDKDYPYLGRD-----	93
Manihot_62526575	FII-----NNGGIDTEEDYPYLARD-----	93
Glycine_479060	YLL-----ESGGLEEESSYPYTGER-----	101
Vicia_2414683	YLM-----EAGGLEEETSYPYTGAQ-----	100
CIS22	YLI-----EAGGIEEEETYPYTGKR-----	101
Vitis_157343944	YLI-----EAGGLEEESSYPYTGKH-----	95
Arabidopsis_42572679	YLM-----EAGGLEEERSYPYTGKR-----	101
Oryza_115472081	YLM-----SSGGLMEQSAYPYTGAQ-----	101
CIS8	YIL-----KSGGVEREQDYPTGRD-----	73
Aster_42407296	YIL-----KAGGLQKEADYPYTGRD-----	101
Phaseolus_113208365	YLI-----GSGGVQREKDYPYTGRD-----	101
Phaseolus_2511691	YLI-----GSGGVQREKDYPYTGRD-----	101
Vigna_7242888	YIL-----GAGGVQREEDYPYAGRD-----	101
Ipomoea_7211745	YTL-----KAGGLMREEDYPYTGNL-----	102
ASP1	NMVPVWYNMVDQGLVDEQVFSFWLNRDPNAEDGGELVFGGVDTNHFKGKHTYVPVTQKGY	180
Phaseolus_1345573	-----GTC DASKVNDLAVS IDGHENVPAN-----	117
Vigna_445927	-----GTC DESKVNDLAVS IDGHENVPVN-----	117
Glycine_31559530	-----GTC DASKANDLAVS IDGHENVPGN-----	117
Solanum1_157093728	-----DKCDIQKRNTPVVS IDGHEDVPPN-----	117
CIS5	-----GSCDSSKMNAVAVT IDGHEMVPAN-----	116
Helianthus_30141023	-----GRCDISKRNSPVVKIDGFENVPAN-----	116
CIS23	-----MRCDTYRKNARVVT IDGYEDVIPY-----	117
Phaseolus_2511693	-----GRCDEYRKNAKVVS IDGYEDVNTY-----	117
Lycopersicon_5726641	-----GVCDQYRKNAKVVKIDS YEDVPVN-----	117
Solanum_5777889	-----DVCDQYRKNAKVVKIDS YEDVPVN-----	117
Platycodon_89274062	-----ARCDQYRKNAKVVT IDS YEDVPVN-----	117
Manihot_62526575	-----GRCDTYRKNAKVVT IDDYEDVPVN-----	117
Glycine_479060	-----GECKFDP-EKIAVKITNFTNIPAD-----	124
Vicia_2414683	-----GECKFDP-NKVAVRVS NFTNIPAD-----	123
CIS22	-----GECKFNP-EKVAVKVRNFTKIPAD-----	124
Vitis_157343944	-----GECKFKP-DRVAVRVVNFTEVPIN-----	118
Arabidopsis_42572679	-----GHCKFDP-EKVAVRVLNFTTIPLD-----	124
Oryza_115472081	-----GTCRFDA-NRVAVRVANFTVVAPPGGNDGDG-----	131

CIS8	-----EKCKFDK-SKIAAKVSNFSVVSTD-----	96
Aster_42407296	-----GTCKFDK-SKIAASVANFSVVSTD-----	124
Phaseolus_113208365	-----GTCKFDK-SKIAASVSNYSVISLD-----	124
Phaseolus_2511691	-----GTCKFDK-SKIAASVSNYSVISLD-----	124
Vigna_7242888	-----SSCKFDK-SKIAASVANYSVISLD-----	124
Ipomoea_7211745	-----QVCRFDK-TKIAAKVANFSVVSLD-----	125
ASP1	WQFKMGDFLIGNVSTGFCEGGCAAIVDSGTSLLAGPTTVVTQINHAIGAEGVVSTECKEI	240
Phaseolus_1345573	-----DEDALLKAVANQPVS	132
Vigna_445927	-----DENALLKAVANQPVS	132
Glycine_31559530	-----DENALLKAVANQPVS	132
Solanum1_157093728	-----DEDALLKAVANQPIS	132
CIS5	-----DENALMKAVANQPVS	131
Helianthus_30141023	-----DESAMLRAVANQPVS	131
CIS23	-----DERALQKAAANQPVS	132
Phaseolus_2511693	-----DELALKKAVANQPVS	132
Lycopersicon_5726641	-----NEKALQKAVAHQPVS	132
Solanum_5777889	-----NEKALQKAVAHQPVS	132
Platycodon_89274062	-----NEEALKKAVASQPVS	132
Manihot_62526575	-----SETALQKAVANQPVS	132
Glycine_479060	-----ENQIAAYLVKNGPLA	139
Vicia_2414683	-----ENQIAAYLVNHGPLA	138
CIS22	-----ESQIAANVVHNGPLA	139
Vitis_157343944	-----ENQIAANLVCHGPLA	133
Arabidopsis_42572679	-----ENQIAANLVRHGPLA	139
Oryza_115472081	-----DAQMRAALVRHGPLA	146
CIS8	-----EDQIAANLVKHGPLA	111
Aster_42407296	-----EDQIAANLVTHGPLA	139
Phaseolus_113208365	-----EEQIAANLVKNGPLA	139
Phaseolus_2511691	-----EEQIAANLVKNGPLA	139
Vigna_7242888	-----EDQIAANLVKNGPLA	139
Ipomoea_7211745	-----EDQIAANLVKNGPLA	140
ASP1	VSQYGELIWDLLVSGVLPDRVCKQAGLCPLRGAQHENAYIKSVVDEENKEEASVGESPMC	300

Phaseolus_1345573	VAIDAGGSDFQFYSEG-----VFTGD-CSTD-LNHGVAIVGYGTT-----VDG	173
Vigna_445927	VAIDAGGSDFQFYSEG-----VFTGD-CNTD-LNHGVAIVGYGTT-----VDG	173
Glycine_31559530	VAIDAGGSDFQFYSEG-----VFTGD-CSTE-LNHGVAIVGYGAT-----VDG	173
Solanum1_157093728	VAIDASGSQFQFYSEG-----VFTGE-CGTE-LDHGVAIVGYGTT-----VDG	173
CIS5	VAIDASGSDMQFYSEG-----VYTGDSGNE-LDHGVAVVGYGTA-----LDG	173
Helianthus_30141023	IAIDAGGLNFQFYSSQ-----VFNGA-CGTE-LNHGVAIVGYGTT-----QDG	172
CIS23	VAIEGSSRDFQLYLKG-----VFTGN-CGTA-LDHGVNVVGYGT-----ANG	172
Phaseolus_2511693	VAVEGGGREFQLYSSG-----VFTGR-CGTA-LDHGVVAVGYGT-----DNG	172
Lycopersicon_5726641	IALEAGGRDFQHYKSG-----IFTGK-CGTA-VDHGVVIAGYGT-----ENG	172
Solanum_5777889	IAIEAGGRDLQHYKSG-----IFTGK-CGTA-VDHGVVAAGYGS-----ENG	172
Platycodon_89274062	VGIEGGRAFQFYDSG-----IFTGK-CGTA-LDHGVNVVGYGT-----EKG	172
Manihot_62526575	VAIEAGGRDFQFYASG-----IFSGR-CGTQ-LDHGVAAVGYGT-----ENG	172
Glycine_479060	MGVN--AIFMQTYIGG-----VSCPLICSKRRLNHGVLLVGYGAKGFSI---LRLGN	186
Vicia_2414683	IAVN--AVFMQTYVGG-----VSCPLICSKRRLNHGVLLVGYNAEGFSI---LRLRK	185
CIS22	IGLN--AVFMQTYIGG-----VSCPLICDKKRINHGVLVGYGSRGFSL---LRLGY	186
Vitis_157343944	VGLN--AIFMQTYIGG-----VSCPLICPKRWINHGVLVGYGAKGYSI---LRFY	180
Arabidopsis_42572679	VGLN--AVFMQTYIGG-----VSCPLICSKRNVNHGVLLVGYGSKGFSI---LRLSN	186
Oryza_115472081	VGLN--AAYMQTYVGG-----VSCPLVCPRAWNVNHGVLLVGYGERGFAA---LRLGH	193
CIS8	VAIN--AIWMQTYIGG-----VSCP YICSKS-QDHGVLLVGYGAAGYAP---IRLKD	157
Aster_42407296	IGIN--AAWMQTYIGQ-----VSCP YICSKTKMDHGVLLVGYGSAGYAP---LRFKE	186
Phaseolus_113208365	VAIN--AVYMQTYVGG-----VSCP YICGKH-LDHGVLLVGYGEGAYAP---IRFKE	185
Phaseolus_2511691	VAIN--AVYMQTYVGG-----VSCP YICGKH-LDHGVLLVGYGEGAYAP---IRFKE	185
Vigna_7242888	VGIN--AVYMQTYIGG-----VSCP YICAKR-LDHGVQIVGYGESGYAP---IRFKE	185
Ipomoea_7211745	VAIN--AVFMQTYIGG-----VSCP YICSKR-LDHGVLLVGYGSAGYAP---IRMKE	186
ASP1	TACEMAVVWMQNQLKQQTKEKVLAYVNQLCESIPSPMGESI IDCNSLSTLPNVSFTIGG	360

Phaseolus_1345573	TNYWIVRNSWGPEWGEHGYIRMQRNIS-KKEGLCGIAMLPSYP-	215
Vigna_445927	TNYWIVRNSWGPEWGEQGYIRMQRNIS-KKEGLCGIAMMASYP-	215
Glycine_31559530	TSYWIVRNSWGPEWGE LGYIRMQRNIS-KKEGLCGIAMLASYP-	215
Solanum1_157093728	TKYWIVKNSWGAGWGEKGYIRMQRKVD-AEEGLCGIAMQPSYP-	215
CIS5	TKYW-----	177
Helianthus_30141023	TNYWIVRNSWGTGWGEQGYVRMQRGVN-VPEGLCGLAMDASYP-	214
CIS23	KDYWIVRNSWGAEWGEDGYIRMERNVKAN-SGLCGITSEPSY--	213
Phaseolus_2511693	HDFWIVRNSWGADWGEEGYIRLERNLGNRSRSGKCGIAIEPSYP-	215
Lycopersicon_5726641	MDYWIVRNSWGANWGENGYLRVQRNVA-SSSGLCGLAIEPSY--	213

Solanum_5777889	MDYWIVRNSWGAKWGEKGYLRVQRNVA-SSSGLCGLATEPSYP-	214
Platycodon_89274062	KDYWIVRNSWGSWGEAGYIRMERNLAGTSVGKCGIAMEPSYP-	215
Manihot_62526575	KDYWIVRNSWGKSWGGENGYLRMARSIN-SPTGICGIAMEASYP-	214
Glycine_479060	KPYWIIKNSWGEKWGEDGYKLCRG-----HGMCGINTMVS---	222
Vicia_2414683	KPYWTIKNSWGEQWGEKGYKLCRG-----HGMCGMNTMVS---	221
CIS22	KPYWIIKNSWGKRWGEHGYYRLCRG-----HNMCGMSAMVSAV-	224
Vitis_157343944	KPYWIIKNSWGKRWGEHGYYRLCRG-----HGMCGMNTMVSAV-	218
Arabidopsis_42572679	KPYWIIKNSWGKKGWGENGYKLCRG-----HDICGINSMVSAV-	224
Oryza_115472081	RPYWIIKNSWGKAWGEQGYRLCRG-----RNVCGVDTM-----	227
CIS8	KPYWIIKNSWGENWGESGYKFCRAD-----RNLCGVDSMVSSV-	196
Aster_42407296	KPYWIIKNSWGEDWGEDGYKLCSG-----YNACGMDTMVSAV-	224
Phaseolus_113208365	KPYWIIKNSWGENWGENGYKICRG-----RNVCGVDSMVSTV-	223
Phaseolus_2511691	KPYWIIKNSWGENWGGNGYKICRG-----RNVCGVDSMVSTV-	223
Vigna_7242888	KPYWIIKNSWGESWGENGYKICRG-----QNACGVDSMVSTV-	223
Ipomoea_7211745	KPYWIIKNSWGESWGENGYKICRG-----RNVCG-----	216
ASP1	KSFELTPKQYVLQTG-EGFAEVCIS-----GFMAMDVPPPRGP	397

APÊNDICE III

Alinhamento feito no programa Clustal X de seqüências completas com elevada similaridade com seqüências de café encontradas através de busca por similaridade no programa BLAST, no banco de dados do NCBI.

	1		130
C23		MATLSLLL LFSLLSFASA QDMSILSYGN ANLKTSGSG- ----- ----RTDEEV MALYEEWLVK HGKSYNGLGE KDKRFEIFKD NLRIDEQNS LPNRTYQLGL NRFADLSNEE	
Manihot_6		MMGL FGSSAAMFVL LFLSFTLSSA SDMSIISYDQ THA-TKSSW- ----- ----RTDDEV MAIYEEWLVK QGKVYNALGE REKRFQVFKD NLRIDEHNS -ENRTYKGL NGFADLTNEE	
Lycopersic		MAAH SSTLTISILL MLIFSTLSSA SDMSIISYDE THI----HR- ----- ----RTDDEV SALYESWLVK HGKSYNGLGE KDKRFQIFKD NLRIDEQNS VPNQSYKLGL TKFADLTNEE	
Solanum_57		MAAH SSTLTISLLL MLIFSTLSSA SDMSIISYDE THI----HH- ----- ----RSDDEV SALYESWLVK HGKSYNGLGE KDKRFQIFKD NLKYIDEQNS VPNQSYKLGL TKFADLTNEE	
C22		MMMTSGGLML TCTLAVTLLS CALISSTTFQ HEIQYPVQDP LMIRQVTDNH HRRHHPGRSS ANHRLLGTTT ELHFKSFMEE YEKSYSTHEE YVHRLGIFAK NLIKAAEHQA MDPSAIVH-GV TQFSDLTEEE	
Arabidopsi		MVAK---AL AQLITCIILF CHVV--ASVE DLTII--RQVT ADNRRIRPN- ----- ----LLGHTT ESKFRLFMSD YGKNYSTREE YIHRGIFAK NVLKAAEHQM MDPSAVH-GV TQFSDLTEEE	
Glycine_47		MEAKRGHAL MCLARVSLFL CALTLSAA-H GSTT--VQDI ARKLLKLDGN- ----- ----ELLR-T EKFKVFMEN YGRSYSTEE YLRRGIFAQ NMVRAAEHQA LDPTAVH-GV TQFSDLTEDE	
Vicia_2414		MVAKQNPPL TRYARVAIFL CALTSSSLH HETL--IQDV ARKLELKDN- ----- ----DLT-T EKFKLFMKD YSKKYSTEE YLLRGLGIFAK NMVRAAEHQA LDPTAIVH-GV TQFSDLSEEE	
Phaseolus_		M ARYTLCALLL FAAVAAAAGG GDTD--ADDI LIRQVPEGE VE----- ----DHLNA EHFSTFKAK FGKTYATKEE HDHRFVFKS NMRRARLHAQ LDPSAVH-GV TKFSDLTPAE	
C8			
C5		MKMGKAFLEFA VVLAVILVAA MSMEITERDL ASEESLWD-- ----- ----L YERWRSH HTVS-RDLSE KRKRFNVFKA NVHHIHKVNQ KD-KPYKLLK NSFADMTNHE	
C.canephora			Q KD-KPYKLLK NSFADMTNHE
	131		260
C23		YRSTYLGTRP -DPKRRLAK- -----TSSDR YRPKVGDSL NSIDWREKGA VLPVKDQGSC GSCWAFSAVA AVEGINQIVT GDLISLSEQE LVDCD----- --TSYDEGC NGGLMDYAFE FIINNGGIDT	
Manihot_6		YRSTYLGARG -GMKRNRLR- -----KTSR YAPRVGESLP DSDVWRKEGA VAEVKDQGSC GSCWAFSTIA AVEGINKIIVT GDLISLSEQE LVDCD----- --TSYNEGC NGGLMDYAFE FIINNGGIDT	
Lycopersic		YRSIYLGTKS SGDRKLSK- -----NKSDR YLPKVGDSL ESIDWREKGV LVGVKDQGSC GSCWAFSAVA AMESINAIVT GNLSLSEQE LVDCD----- --RSYNEGC DGGLMDYAFE FVIKNGGIDT	
Solanum_57		YRSIYLGTKS SGDRKLSK- -----NKSDR YLPKVGDSL ESDVWRDKGV LVGVKDQGSC GSCWAFSAVA AMESINAIVT GNLSLSEQE LVDCD----- --KSYNEGC DGGLMDYAFE FVIINNGGIDT	
C22		FEATYMLKGG GAGVGGTTQL GKDDGDESAA EVMDVSDLP ESFDWREKGA VTEVKTQGRG GSCWAFSTTG AIEGANFIAT GKLLSLSEQQ LVDCDHMCDL KEKDDCDDGC SGGLMTTAFN YLIEAGGIEE	
Arabidopsi		EKRMVTGVAD VGGSRGGTV- -----GAE APMVEVDGLP EDFDWREKGG VTEVKNQGC GSCWAFSTTG AEAGHFVST GKLLSLSEQQ LVDCDQACDP KDKKACDNGC GGGLMTNAYE YLMEAGGLEE	
Glycine_47		EKLYTGVNG GFPSNNA- -----GGI APPEVDGLP ENFDWREKGA VTEVKNQGC GSCWAFSTTG SIEGANFLAT GKLVSLSEQQ LLDCDNKCDI TEKTSKDCNGC NGGLMTNAYN YLESAGGLEE	
Vicia_2414		FERFYTGFKG GFPSN-AA- -----GGV APPLDVKGF ENFDWREKGA VTGIKTQGC GSCWAFSTTG SIEGANFLAT GKLVSLSEQQ LVDCDNKCDI T-KTSCDNGC NGGLMTTAYD YLMEAGGLEE	
Phaseolus_		HRKFLGLKP LRLPAH---- -----AQK APILPTNNLP KDFDWRDKGA VTNVKDQGSC GSCWAFSTTG ALEGAHFLAT GELVSLSEQQ LVDCDHVCDP EEYGCSDSGC NGGLMNNAFE YLIGSGVQR	
C8			G ALEGAHYLAT RELVSLSEQQ LVDCDHECDP AEYNSCSDSGC NGGLMNNAFE YLIGSGVQR
C5		REFYSSKVK HYRMLHGSR- -----ANTG FMHGKTESLP ASVDWRKQGA VTSVKNQGC GSCWAFSTVV GVEGINKIKT GQLVSLSEQE LVDCD----- --TDNEGC NGGLMENAYE FIKKSGGIT	
C.canephora		REFYSSKVK HYRMLHGSR- -----ANTG FMHGKTESLP ASVDWRKQGA VTGVKNQGC GSCWAFSTVV GVEGINKIKT GQLVSLSEQE LVDCD----- --TDNEGC NGGLMENAYE FIKKSGGIT	

