



INSTITUTO DE BIOLOGIA

METABOLISMO DE CAFEÍNA EM ESPÉCIES DE CAFÉ

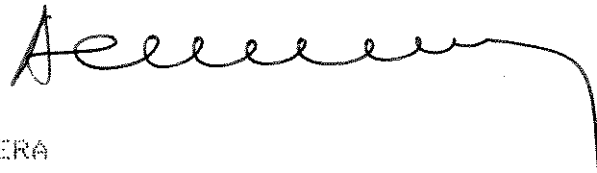
(Coffea L.)

Paulo Mazzafera

M456m

12152/BC

Este exemplar corresponde à
revisão final da tese defendida pelo
candidato Paulo Mazzafera, e aprovada
pela comissão julgadora.



PAULO MAZZAFERA

METABOLISMO DE CAFEÍNA EM ESPÉCIES DE CAFÉ (*Coffea* L)

Tese apresentada ao Instituto
de Biologia da Universidade Es-
tadual de Campinas, para a ob-
tenção do título de DOUTOR EM
CIÊNCIAS

ORIENTADOR: PROF. DR. ANTONIO
CELSO NOVAES DE MAGALHÃES

Campinas - SP

1990

AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar minha sincera gratidão àquelas pessoas que direta ou indiretamente me apoiaram durante o desenvolvimento desta tese.

Prof. Dr. Antonio Celso Novaes de Magalhães pela orientação e apoio durante todo o desenvolvimento deste trabalho.

Prof. Dr. Alan Crozier, Do Departamento de Botânica da Universidade de Glasgow, Escócia, pelo fornecimento da cafeína tritiada, pelo imprescindível auxílio na realização das análises em cromatografia líquida de alta eficiência, e pela amizade e incentivos oferecidos.

Sr. Paulo Lauro C. de Oliveira, Chefe da Divisão de Controle de Qualidade da Companhia Cacique de Café Solúvel S.A., pelo auxílio na realização de análises em cromatografia líquida de alta eficiência.

Dr. Alcides Carvalho pela amizade e apoio e, principalmente, por ter despertado o meu interesse pelo assunto aqui estudado e por ter colocado o material do banco de germoplasma da Seção de Genética do Instituto Agrônomo a minha disposição.

Prof. Dr. Sharapin Nikolai, do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas e Biológicas na Agricultura, pelo auxílio nas análises preliminares em cromatografia líquida de alta eficiência.

Prof. Dr. Ana Maria Bacellar Monteiro pelo constante incentivo e auxílio nas análises em cromatografia líquida de alta eficiência.

Prof. Dr. Ladaslav Sodek pelas valiosas sugestões.

Dr. Ediomar Angelucci, do Instituto de Tecnologia de Alimentos, Campinas, pelo fornecimento dos padrões de teobromina, teofilina e

xantina; à Coopers do Brasil S.A., Divisão da Wellcome, pelo fornecimento de alopurinol em sua forma pura; e à Prof. Dr. Yoko Bomura Rosatto pelo fornecimento do inóculo de Sacharomyces cerevisiae.

Professores, funcionários e alunos da pós-graduação do Departamento de Fisiologia Vegetal pela amizade e incentivos.

"Café sem cafeína parece alguma coisa como homem sem alma, mulher sem graça, pimenta sem ardor, vinho sem álcool. Algo para enganar os sentidos, sem possuir a sua própria realidade íntima".

"Não se pede ao café somente o gosto, mas o estímulo do seu elemento essencial, o vigor que a cafeína infunde no sistema nervoso."

Austragésilo de Athayde

INDICE

I. Introdução.....	1
II. Revisão Bibliográfica.....	5
1. Metabolismo da Cafeína.....	5
2. Controle da Síntese da Cafeína.....	21
III. Material e Métodos.....	27
1. Material Vegetal.....	27
2. Extração e Dosagem Espectrofotométrica da Cafeína.....	29
3. Extração e Dosagem de Substâncias do Metabolismo da Cafeína por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....	30
4. Síntese e Isolamento de S-adenosilmetionina.....	31
5. Extração e Purificação do Padrão de Teacrina.....	34
6. Incubação de Frutos Verdes com S-adenosilmetionina, Teobromina, Teofilina, Alopurinol e Cafeína Tritiada.....	35
IV. Resultados e Discussão.....	39
1. Acúmulo de Matéria Seca em Cafeeiros com Diferentes Ciclos de Desenvolvimento.....	39
2. Teor de Cafeína em Folhas e Sementes de Cultivares e Espécies de Café.....	40
3. Incubação de Frutos Imaturos com S-adenosilmetionina.....	45
4. Incubação de Frutos Imaturos com Teobromina.....	51
5. Incubação de Frutos Imaturos com Cafeína Tritiada.....	52
6. Incubação de Frutos Imaturos com Cafeína Tritiada e Alopurinol e de Cafeína Tritiada e Teofilina.....	58

V. Conclusões.....	62
VI. Resumo.....	64
VII. Referências Bibliográficas.....	69

I. INTRODUÇÃO

Lendas que relatam sobre a descoberta do cafeeiro citam o efeito estimulante da infusão preparada com sementes torradas e moídas dessa planta. Somente em 1820 é que o químico alemão Ferdinand Runge conseguiu isolar o alcalóide que era o responsável por este efeito e que foi denominado cafeína (LEBLOND, 1883).

Por sua vez, Oudry, em 1827, isolou em chá uma substância com efeito semelhante, que denominou teína. Jobat e Mulder, em 1837, identificaram ser a teína a mesma substância que era encontrada em sementes de café, cuja composição química já havia sido desvendada por Pfaff e Liebig, em 1832, tratando ser um derivado de purina, ou melhor, 1,3,7-trimetilxantina (LEBLOND, 1883).

Tão logo descobriu-se o efeito estimulante da cafeína, ela passou a ser extraída de sementes de café e incluída na prescrição de remédios contendo drogas neuro-depressoras. Desta forma, devido à relação estabelecida entre a cafeína e seu emprego farmacêutico, as primeiras pesquisas sobre esse alcalóide foram voltadas à área médica, em particular a seus efeitos fisiológicos em animais e no ser humano.

Desde que somente em 1861 conseguiu-se sintetizar a cafeína, a partir da metilação da teobromina (3,7-dimetilxantina) extraída de sementes de cacau, a principal fonte do alcalóide foram as sementes de café, a partir da descafeinação com solventes orgânicos. Consequentemente, em 1905, Ludwig Roselius e Karl Wimmer, da firma Kaffee H.A.G., na Alemanha, inventaram e patentearam o primeiro processo de remoção da cafeína do café, colocando no mercado o primeiro isento de cafeína com o nome de Kaffee Hag (KATZ, 1985).

Ao mesmo tempo que as pesquisas na área médica avançavam, também procurava-se a melhoria tecnológica dos equipamentos utilizados para a descafeinação, assim como um solvente mais adequado para o processo, que permitisse a maximização da taxa de extração do alcalóide e a minimização da extração de outras substâncias importantes para o desenvolvimento do aroma e sabor do produto final (KATZ, 1980; KING, 1980).

Já em 1963, Sivetz (1963) listou 103 patentes de descafeinação. Segundo Sylvain (1967), o grande número de pesquisas nessa área tecnológica seria devido aos problemas relativos à perda de sabor e aroma ocasionados pelos solventes orgânicos empregados. Atualmente, as indústrias de descafeinação têm empregado, principalmente, o diclorometano, em função de sua alta seletividade para cafeína (KATZ, 1980). Algumas poucas indústrias que têm lançado mão do emprego da água como solvente, apresentam determinados inconvenientes quanto a seletividade e o custo de extração (MAZZAFERA & CARVALHO, 1989).

Entretanto, decorrente das pesquisas médicas quanto ao papel fisiológico da cafeína e quanto ao resíduo de diclorometano no café descafeinado, criou-se uma grande controvérsia no mercado do café descafeinado.

Como citado anteriormente, desde a descoberta da cafeína muitos estudos referentes a possíveis efeitos nocivos sobre o ser humano, foram realizados. Entretanto, não se conseguiu provar ainda que a cafeína do café possa trazer algum malefício ao ser humano (SIVETZ, 1979; ULRICH, 1982). MAZZAFERA & CARVALHO (1989), que fizeram um ampla revisão sobre o assunto, também concluíram que nada se comprovou até o momento que pudesse indicar que o consumo moderado de café levase a al-

gum distúrbio grave na saúde humana.

Apesar disso, a observação feita por VON BERNEGG (1938) explica muito bem o fato do aumento do consumo do café descafeinado, em função da propaganda sobre possíveis efeitos nocivos da cafeína: "Dum lado a cafeína é extraída do café como nociva à saúde, e de outro lado é acrescentada a bebidas inofensivas, tão inextirpável é a predileção dos homens pelos estimulantes. Num e noutro caso a propaganda consegue seus adeptos".

Da mesma forma que a propaganda contra a cafeína conseguia seus adeptos, alguns estudos indicavam que no café descafeinado havia resíduo de diclorometano, podendo causar prejuízos à saúde humana. Porém, tal qual para o alcalóide do café, estudos exaustivos comprovaram que o nível residual desse solvente orgânico é tão baixo no café descafeinado, que não chega a causar nenhum dano à saúde (DECAFFEINATION..., 1983; EXTENSIVE NCA..., 1983; NOUVELLE ATTAQUE..., 1986). Porém, isto não impediu que novas tecnologias fossem desenvolvidas e, desde que as mesmas têm sido implantadas por firmas de grande porte (ex: General Foods Corporation - descafeinação por CO₂ supercrítico), com perspectiva de amortização a longo prazo, pode-se supor que a expectativa no mercado de café descafeinado é do aumento do consumo (KATZ, 1980).

Em face ao exposto anteriormente e devido ao fato de que o Brasil, o maior produtor mundial de café, importou US\$3,6 milhões em cafeína pura de 1985 a 1987, MAZZAFERA & CARVALHO (1989) concluíram que, a obtenção de cafeeiros produtores de sementes com alto teor, ou com ausência de cafeína, poderia resultar em uma grande fonte de divisas para o país. No primeiro caso, sementes de café com alto teor de ca-

feína poderiam servir como fonte para obtenção da droga pura e o produto descafeinado para a comercialização nos centros consumidores desse tipo de café. No segundo, a obtenção de sementes "naturalmente" isentas do alcalóide poderia significar uma expressiva conquista do mercado do café descafeinado pois, além de não possuir o alcalóide, não apresentaria resíduos de solvente. Outro fato importante a considerar é que o custo da produção agrícola seria o mesmo do que o atual para a condução de uma lavoura de café.

O presente trabalho teve como objetivo estudar o metabolismo da cafeína em espécies de café, a fim de ampliar os conhecimentos sobre o metabolismo desse alcalóide, que foi praticamente todo estabelecido em estudos com a espécie Coffea arabica. Foram estudadas espécies e variedades de café, que variam em relação ao conteúdo de cafeína em suas sementes, com a finalidade de gerar subsídios que possam vir a serem utilizados na obtenção, através de melhoramento genético, de um cafeeiro produtor de sementes isentas ou com alto teor de cafeína.

II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. Metabolismo da Cafeína

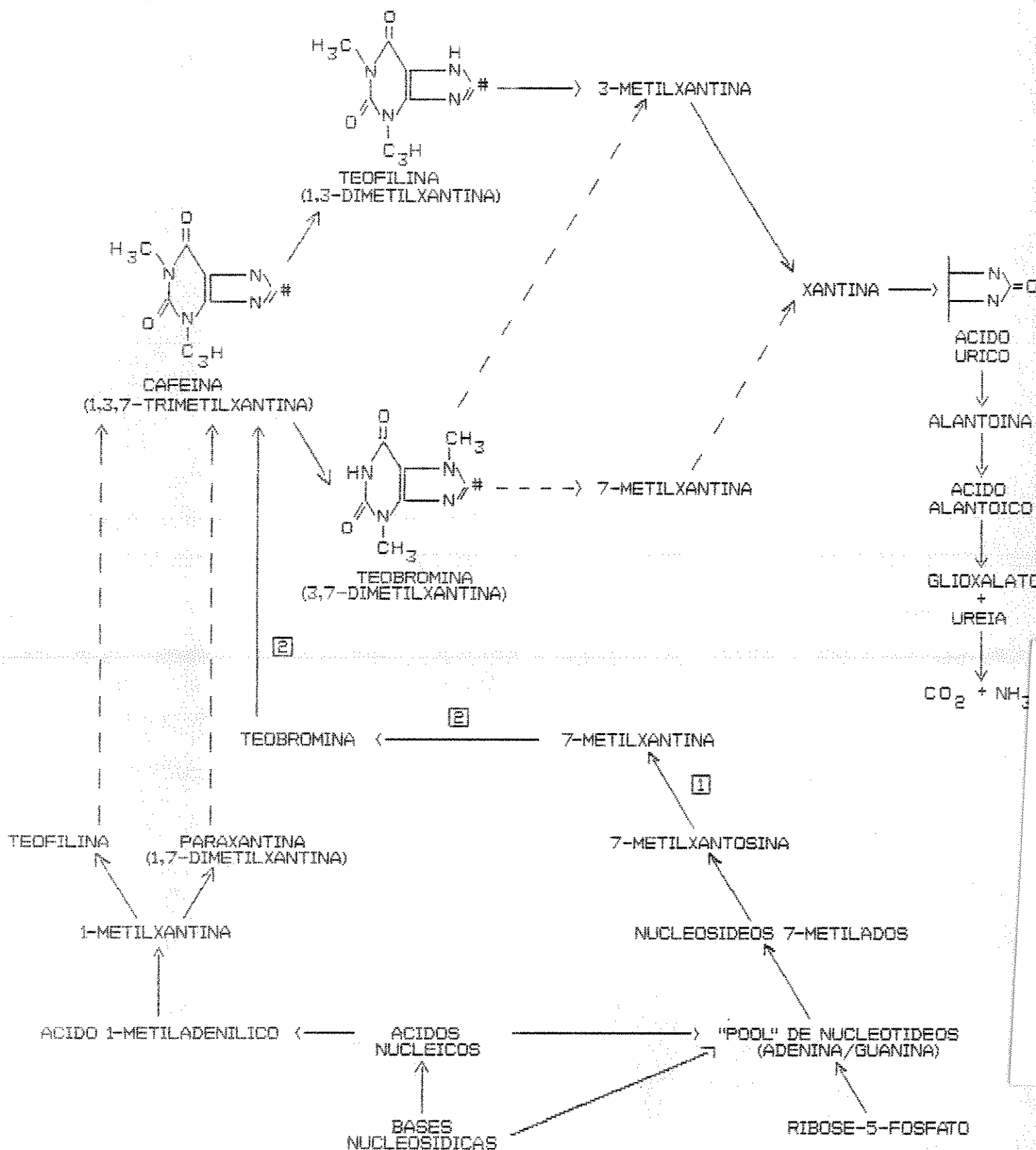
A elucidação da via metabólica da cafeína no cafeeiro está intimamente relacionada com os estudos realizados em chá (*Cammelia sinensis*), que tinham a mesma finalidade. Muitas das conclusões com chá serviram de base para os estudos com o cafeeiro. Como resultado final do conhecimento acumulado sobre o metabolismo da cafeína em chá e café, a sua via metabólica pode ser representada pelo esquema 1.

Praticamente o primeiro trabalho que deu início ao estudo mais aprofundado sobre a cafeína no cafeeiro foi o de ANDERSON & GIBBS (1962), que administraram ^{14}C -1-glicina, ^{14}C -2-glicina, $^{14}\text{CO}_2$, ^{14}C -3-serina, HC^{14}HO (formaldeído), $\text{HC}^{14}\text{O}_2\text{Na}$ (formato de sódio), $^{14}\text{CH}_3\text{OH}$

ionina à folhas de *C. arabica* na luz e no tenebre. Observou-se a clivagem do anel de xantina da cafeína se dava formato. Concluiu-se, também, que ocorria a formação de 3-metilxantina, teobromina e portanto, que a formação do anel de xantina era a mesma rota que a das bases purínicas.

Na degradação da cafeína, KALBERER (1965) administrou ^{14}C ou ^{15}N em diferentes posições da molécula (7-metil), à folhas de *C. arabica*. Através de uma delgada e posterior revelação com filme de raio X, foram identificados 3-metilxantina e/ou 7-metilxantina, alantoina, ácido alantóico, e uréia como produtos da degradação da cafeína.

ESQUEMA 1 - VIA METABOLICA DA CAFEINA



- - - - = ROTA NAO COMPROVADA
 # = CARBONO 8 TRITIADO
 1 = 7-METIL-N⁹-NUCLEOSIDEOS HIDROLASE
 2 = METILTRANSFERAS(S)

na. Outras três substâncias contendo radioatividade foram também separadas porém, não identificadas. O autor também não detectou ácidos úricos mono ou dimetilados, produtos da degradação da cafeína em animais (PAOLETTI & CANTALUPPI, 1982).

Atenção para o metabolismo da cafeína no fruto do cafeeiro começou a ser dada a partir dos trabalhos de Lehmann e Martinod, em 1965, e de Franske et al., em 1967 (apud TABÁK et al., 1969), que encontraram teobromina e teofilina além de cafeína.

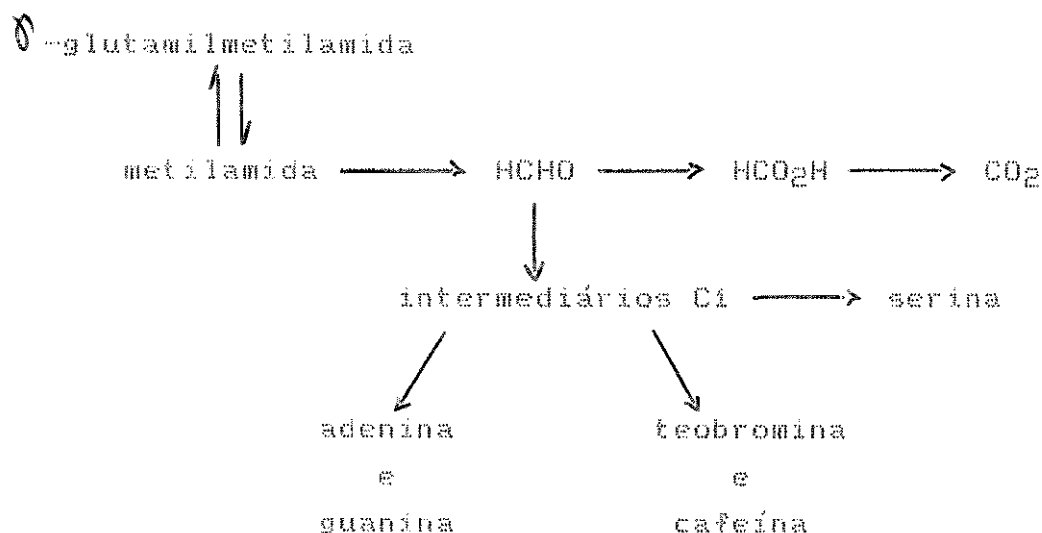
Utilizando-se da cultura de tecido de folhas de chá, OGUTUGA & NORTHCOTE (1970a) desenvolveram estudos a fim de melhor compreender o metabolismo da cafeína nessa planta. Através da incorporação de determinadas substâncias ao meio de cultura, tais autores observaram que formato de amônio promovia maior síntese de cafeína do que formato de sódio e cloreto de amônio, adicionados separadamente ao meio de cultura. Metionina e RNA (sal de Na) de fermento, quando adicionados juntos a meio de cultura contendo calos autolizados, promoveram maior síntese do alcalóide do que quando separados.

Em outro estudo, OGUTUGA & NORTHCOTE (1970b), também valendo-se da cultura de tecidos com folhas de chá, averiguaram se o anel purínico da cafeína era diretamente originado de um "pool" de precursores de purina ou se surgia da quebra de nucleotídeos pré-formados. Para isto, calos foram cultivados em meio de cultura contendo $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$, L-[^{14}C -metil]-metionina, 7-metilxantina e 7-metilxantosina e, após um período nesses meios, alguns calos foram transferidos para meios sem determinada substância. Com os resultados obtidos, OGUTUGA & NORTHCOTE (1970) propuseram duas rotas de biosíntese da cafeína. Uma delas teria início

na degradação de ácidos nucleicos, formando um "pool" de purinas, e daí sendo sintetizados ácido 7-metilguanílico, 7-metilguanosina, 7-metilxantosina, 7-metilxantina, teobromina e, finalmente, cafeína. Na outra via proposta haveria formação direta de xantina, vindo em seguida 3-metilxantina, teofilina e cafeína. Os autores consideraram que a via envolvendo teofilina seria a mais provável, pela metilação preferencial de seus carbonos.

KONISHI et al. (1972a), estudando o papel de γ -glutamilmetilamida em folhas de plântulas de chá, observaram haver relação entre tal composto e a síntese de cafeína, quando a primeira substância era administrada contendo ^{14}C . Na continuação dessa pesquisa KONISHI et al. (1972b), além de fornecerem a γ -glutamilmetilamida marcada, também forneceram ^{14}C -metilamida a plântulas de chá, observando que 26-55% do ^{14}C administrado era incorporado nos três grupos metil de cafeína, e que também havia incorporação em carbonos do anel purínico. O RNA extraído das plântulas foi fracionado e apresentou guaninamonofosfato e adeninamonofosfato com alta radioatividade, quando comparadas com uridina e citosinamonofosfato. Concluiu-se que os dados eram fortes evidências da incorporação do anel purínico na molécula da cafeína.

Por outro lado, em estudo que foi conduzido paralelamente aos dos autores anteriores, SUZUKI (1973) propôs que a incorporação de ^{14}C proveniente de γ -glutamilmetilamida em cafeína seguia o esquema abaixo.



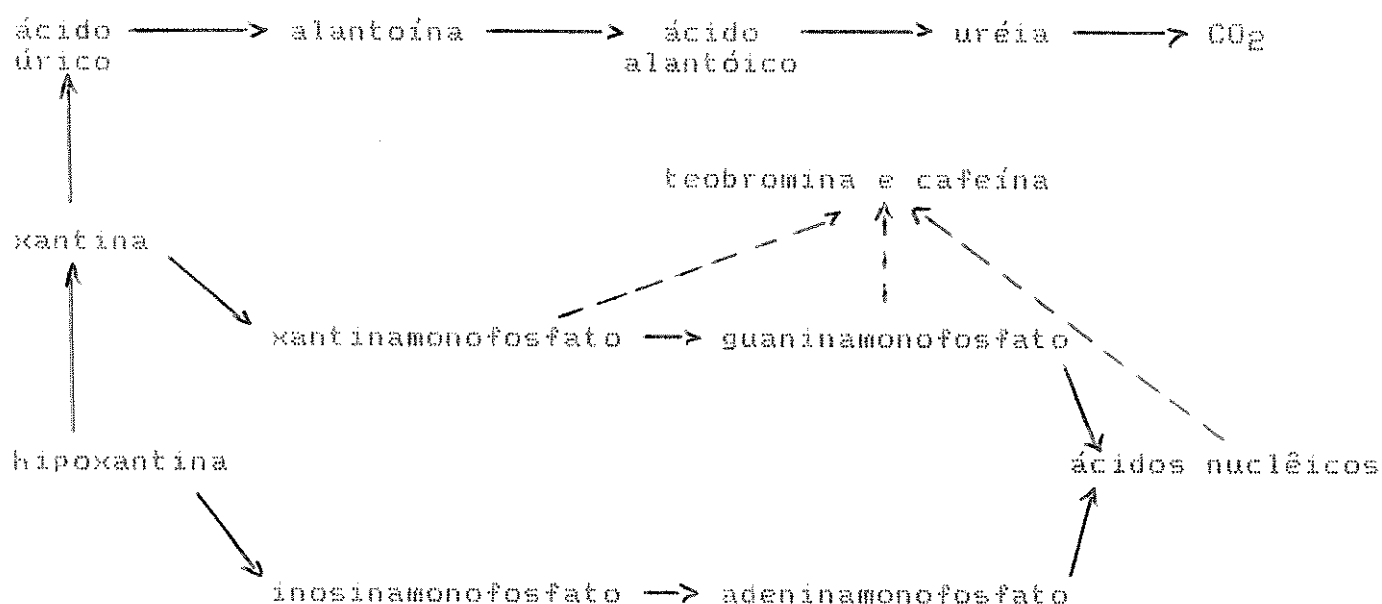
Apesar das conclusões de SUZUKI (1973) serem, de modo geral, bastante diferentes daquelas de OGUTUGA & NORTHCOTE (1970b), houve confirmação de que teobromina poderia ser um provável precursor de cafeína em folhas de chá.

Infiltrando discos de folhas de *C. arabica* simultaneamente com L-[1⁴C-metil]-metionina e com supostos precursores de cafeína, LOSSER et al. (1974) concluíram que, certamente, teobromina, 7-metilxantina e 7-metilxantosina seriam compostos anteriores ao alcalóide na sua via metabólica. A princípio, estes resultados confirmariam a segunda rota proposta por OGUTUGA & NORTHCOTE (1970b), a qual teria início com a metilação de N7 de guanina. Entretanto, LOSSER et al. (1974) também realizaram experimentos com 7-metilguanosina e com metionina marcada, constatando uma baixa taxa de incorporação de radioatividade em cafeína, quando comparada com experimentos realizados com 7-metilxantosina.

No entanto, não descartaram a hipótese de serem os produtos da degradação dos ácidos nucleicos pudessem ser precursores diretos de cafeína.

Sabendo que hipoxantina e xantina são metabolizados pela via de recuperação de purinas (salvage pathway), que a conversão da primeira substância em inosinamonofosfato e da segunda em xantinamonofosfato são catalizadas pela mesma enzima em animais (MURRAY, 1971), e que hipoxantina é um precursor mais eficiente de cafeína do que xantina (Konishi & Oishi, 1973, apud SUZUKI & TAKAHASHI, 1975a), SUZUKI & TAKAHASHI (1975a) averiguaram a hipótese de que, em chá, a cafeína poderia surgir da quebra de nucleotídeos pré-formados, ao invés de xantina. Através do emprego de hipoxantina, teobromina, xantina, metionina e glicina marcadas com ^{14}C , tais autores observaram que: a) na região apical de plantas de chá houve intensa síntese "de novo" de bases purínicas; b) houve grande incorporação de radioatividade em guaninamonofosfato e cafeína, e pouca em adeninamonofosfato, quando foi fornecida hipoxantina marcada; c) muito pouca radioatividade foi incorporada nessas substâncias quando foi fornecida ^{14}C -xantina; d) ácido alantóico, alantoína e uréia foram marcadas com ^{14}C quando folhas de chá foram incubadas com ^{14}C -xantina e ^{14}C -teobromina, separadamente; e) a incorporação de radioatividade de ^{14}C -hipoxantina foi maior em teobromina e cafeína, sendo que inicialmente era maior na primeira substância, diminuindo com o tempo à medida que aumentava a de cafeína.

Com base nesses resultados, SUZUKI & TAKAHASHI (1975a) propuseram o esquema abaixo, presumindo que, face às evidências de trabalhos com o cafeeiro, tais reações também ocorreriam nessa planta.



Em um importante trabalho posterior, também em chá, SUZUKI & TAKAHASHI (1975b) mostraram que extratos de folhas livres de células continham atividade de metiltransferases, que catalizariam a transferência de radicais metil, provenientes de S-adenosilmetionina, de 7-metilxantina para teobromina e desta para cafeína. Neste estudo observou-se que paraxantina era o mais eficiente aceitador de metil na formação de cafeína, entretanto, a formação dessa substância a partir de 1-metilxantina era muito baixa e, a partir de 7-metilxantina, praticamente nula. Isto indicava que era pouco provável que a síntese de cafeína a partir de paraxantina fosse importante "in vivo". Outra informação obtida foi que teofilina era formada de 1-metilxantina e não de 3-metilxantina, como havia sido proposto por OGUTUGA & NORTHCOTE (1970b). SUZUKI & TAKAHASHI (1975b) também observaram que todos os grupos metil do anel purina são provenientes diretamente de S-adenosil-

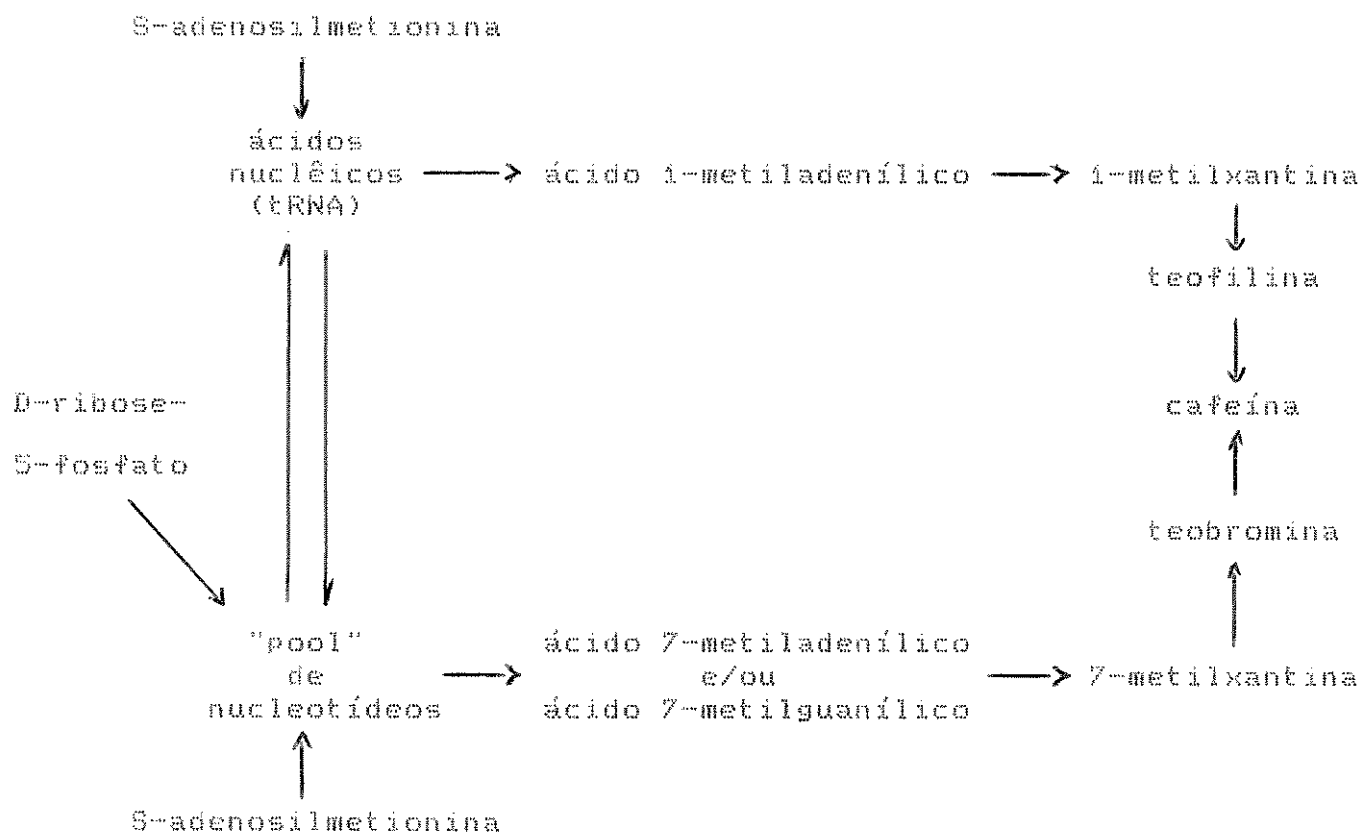
7-metilxantina e que, a via de síntese do alcalóide provavelmente era 7-metilxantina $\rightarrow$ teobromina $\rightarrow$ cafeína.

Dando continuidade às investigações sobre o metabolismo da cafeína em chá, SUZUKI & TAKAHASHI (1976a) estudaram a participação de adenina e guanina através do fornecimento das formas marcadas com ^{14}C no carbono 8. Entre os resultados, mais uma vez confirmou-se que 7-metilxantina e teobromina seriam precursores de cafeína. Outros resultados indicaram que os nucleotídeos purínicos seriam sintetizados a partir da via de recuperação e que a origem do anel purínico de cafeína seria a partir de um "pool" desses nucleotídeos, e não diretamente de ácidos nucleicos. Entretanto, apesar de ter sido observado que ^{14}C -adenina era metabolizada mais rapidamente e com maior intensidade (em 7-metilxantina, teobromina, cafeína, adeninamonofosfato e guaninamonofosfato de RNA) do que ^{14}C -guanina (em teobromina, cafeína, guaninamonofosfato de RNA), os autores tiveram cautela em concluir qual seria o principal nucleotídeo na síntese de cafeína em chá.

Ainda em relação ao trabalho acima citado, SUZUKI & TAKAHASHI (1976a) concluíram que, a transformação de adenina e guanina em hipoxantina e xantina e dessas substâncias em inosinamonofosfato e xantinamonofosfato, respectivamente, teriam pouca importância no metabolismo de cafeína em chá, devido a não marcação de hipoxantina, xantina e nucleosídeos de purina com ^{14}C .

Com o intuito de confirmar definitivamente a exclusão do papel dos ácidos nucleicos na síntese da cafeína, SUZUKI & TAKAHASHI (1976b) seguiram em chá a incorporação de L- ^{14}C -metil-metionina em folhas de chá e, além de atingir o objetivo desejado, propuseram as seguintes

alternativas na biosíntese da cafeína:



Quanto ao esquema proposto, SUZUKI & TAKAHASHI (1976b) comentaram que a passagem de ácido 7-metiladenílico/guanílico para 7-metilxantina não pode ser confirmada devido à pouca radioatividade encontrada nessa substância em comparação com aquela que foi detectada em teobromina. Segundo os autores, isto estaria seguramente relacionado com a rápida taxa de transformação de 7-metilxantina em metionina. Quanto a rota envolvendo teofilina, concluiu-se que a transformação em cafeína seria catalisada pela mesma enzima que atuaria sobre teobromina mas, que a taxa seria baixa e de pouca importância em chá.

No trabalho anteriormente citado (SUZUKI & TAKAHASHI, 1976b), uma das informações obtidas foi que muito da L-[^{14}C -metil]-metionina aplicada em folhas de chá foi incorporada em tRNA e, após a hidrólise dos ácidos nucleicos, foi detectada radioatividade em seis produtos, sendo maior na fração que continha 1-metiladenina. Os outros cinco produtos não foram identificados. Tal fato permitiu aos autores especularem que poderia haver uma provável ligação entre essa substância e a síntese de cafeína.

Em função dessas informações, SUZUKI & TAKAHASHI (1976c), realizaram novas pesquisas através do fornecimento de L-[^{14}C -metil]-metionina à plântulas de chá e analisando folhas, cotilédones e raízes, a fim de verificar a significância dessas informações. Como resultados, observaram que a teofilina era sintetizada do ácido 1-metiladenílico, produto derivado de ácidos nucleicos, via formação de 1-metilxantina.

Como citado anteriormente, LOOSER et al. (1974) haviam afirmado que teobromina, 7-metilxantina e 7-metilxantosina estariam envolvidas na biosíntese da cafeína em folhas de café. A fim de confirmar o nucleosídeo 7-metilxantosina como precursor do alcalóide BAUMANN et al. (1978) marcaram essa substância com ^{14}C no carbono 2 e a forneceram à folhas de *C. arabica*, recuperando grande quantidade de radioatividade em cafeína. Discutindo os resultados obtidos, os autores especularam sobre o possível precursor desse nucleosídeo.

Dois importantes trabalhos com cafeeiro foram realizados por ROBERTS & WALLER (1979) e WALLER et al. (1980), que demonstraram que a via metabólica da cafeína nessa planta era muito semelhante a que ocorre em chá. Partindo do conhecimento de que o conteúdo de cafeína

em sementes de café aumentava bastante dos 2,5 aos 4 meses de idade, e que no pericarpo ele se mantinha constante durante o período de formação das sementes, que era de sete meses, tais autores incubaram frutos maduros (7 meses) e imaturos (2 a 3 meses) com ^{14}C -S-adenosilmetionina e, também, estudaram o papel de enzimas em extratos livres de células, provenientes de plântulas, de frutos imaturos e maduros.

Para frutos imaturos, o que se observou foi uma grande incorporação do metil marcado em cafeína, e que a transferência se processava mais rapidamente nesses frutos do que em maduros. Por outro lado, a incubação de frutos maduros com paraxantina ou teobromina, na presença de ^{14}C -S-adenosilmetionina, levou ao aumento da formação de cafeína, indicando que poderia existir uma restrição no fornecimento de substratos (dimetilxantinas) nesse estágio de desenvolvimento. O fornecimento adicional de cafeína e teofilina pareceram inibir um pouco a síntese do alcalóide.

Quanto aos extratos livres de células, somente o proveniente de frutos imaturos mostraram atividade de metiltransferase, através da incorporação do ^{14}C -metil de S-adenosilmetionina em cafeína, tendo como substratos paraxantina, teobromina e teofilina. A maior incorporação ocorreu quando paraxantina era o substrato e a menor com teofilina. Com base em tais resultados e empregando ^{14}C -S-adenosilmetionina, ROBERTS & WALLER (1979) e WALLER et al. (1980) estudaram também: a) o efeito do tempo e da concentração da enzima na formação de teobromina e cafeína, usando 7-metilxantina e teobromina como substratos, respectivamente b) a estabilidade da enzima c) o pH ótimo d) o efeito de inibidores e) a especificidade e a concentração de substratos na ati-

vidade da enzima. Desses estudos, os resultados mais expressivos, além, logicamente, da constatação de atividade de metiltransferases nos extratos livres de células, foram os referentes a especificidade de substratos, que são resumidos na tabela em seguida.

<u>Substrato</u>	<u>Produto</u>	<u>% Relativa de metilação</u>
7-metilxantina	teobromina	79
3-metilxantina	---	---
1-metilxantina	teofilina	4,5
teobromina	cafeína	100
teofilina	cafeína	3,6
paraxantina	cafeína	138
xantina	---	---
hipoxantina	---	---
xantosina	---	---
7-metilxantosina	teobromina	6,1

Semelhante aos resultados obtidos com extratos livres de células em chá (SUZUKI & TAKAHASHI, 1975b), paraxantina foi o substrato mais ativo na formação de cafeína, tendo como referência a quantidade de teobromina transformada em cafeína. Entretanto, paraxantina não poderia ser considerada como o precursor direto de cafeína "in vivo", desde que a sua formação a partir de 1-metilxantina foi muito baixa e de 7-metilxantina não detectável.

As sínteses de teofilina, a partir de 1-metilxantina, e a de cafeína, a partir de teofilina, foram baixas, confirmando, de certa forma, os dados de SUZUKI & TAKAHASHI (1976b) para folhas de chá, isto é, de que se esta passagem ocorre nos frutos do cafeeiro, teria importância secundária.

As passagens de 7-metilxantina para teobromina e desta para cafeína levaram ROBERTS & WALLER (1979) E WALLER et al. (1980) a suspeitarem do envolvimento de duas metiltransferases atuando no metabolismo da cafeína. A transformação de 7-metilxantosina para 7-metilxantina indicaria, também segundo os autores, a presença de uma ativa 7-metil-N⁹-nucleosídeo hidrolase. Além disso, os resultados obtidos confirmaram a rota 7-metilxantosina → 7-metilxantina → teobromina → cafeína, sendo S-adenosilmetionina o doador de grupos metil.

Estudos sobre a influência de diferentes concentrações de 7-metilxantina, teobromina, paraxantina e S-adenosilmetionina em extratos de frutos imaturos livres, também foram realizados por ROBERTS & WALLER (1979). Os valores de Km para 7-metilxantina e S-adenosilmetionina na produção de teobromina, calculados pela curva de Lineweaver-Burk, foram 0,2 e 0,01mM, respectivamente. Na formação de cafeína os valores de teobromina e S-adenosilmetionina foram 0,2 e 0,01mM, e de paraxantina e S-adenosilmetionina 0,07 e 0,01mM, respectivamente. Observou-se também que, apesar do experimento em que se fez a incubação de frutos com teobromina ter indicado uma possível inibição da síntese de cafeína por esta dimetilxantina, o aumento de 100 vezes na sua concentração nos extratos de células não teve efeito inibitório. A adição de cafeína para a concentração final de 10mM, também não alterou a sua

taxa de formação. ROBERTS & WALLER (1979) concluíram que seria possível que teobromina e cafeína inibissem a síntese de enzimas ao invés das atividades.

Juntando esforços, SUZUKI & WALLER (1984a) estudaram a rota de degradação da cafeína em frutos de *C. arabica*, que variavam de 0,3 a 8 meses de idade, utilizando cafeína e teobromina marcadas com ^{14}C no carbono 8. Constatou-se que teobromina tanto era precursor imediato de cafeína como também, conjuntamente com teofilina, aparecia como produto direto da degradação desse alcalóide. Desde que também foi observado que o nível de teofilina era 20 a 25 vezes maior em frutos maduros do que em imaturos, SUZUKI & WALLER (1984a) concluíram que a degradação de cafeína ocorria preferencialmente via teofilina. Do ponto de vista do controle do conteúdo da cafeína em frutos de café, estes autores afirmaram que, tendo sido lenta a transformação de cafeína para dimetilxantinas, a etapa de degradação do alcalóide poderia ser um passo limitante. Por outro lado, a rápida degradação de xantina para uréia, via ácido úrico, alantoína e ácido alantóico, observada em chá (SUZUKI & TAKAHASHI, 1975b), foi confirmada para café.

Para definitivamente estabelecer a via metabólica da cafeína no cafeeiro arábica SUZUKI & WALLER (1984b) realizaram um trabalho bastante completo sobre a síntese e a degradação do alcalóide, demonstrando que as reações envolvidas em tais processos ocorreriam mais rapidamente em frutos imaturos (3-4 meses) do que em maduros (6-7 meses). Para tal afirmação, SUZUKI & WALLER (1984b) lançaram mão da incubação de frutos com xantina, adenina guanina, metionina, teofilina e cafeína marcadas com ^{14}C .

Quanto à degradação da cafeína, SUZUKI & WALLER (1984b) chegaram a conclusão de que era mais rápida em frutos imaturos, através da administração de cafeína, teofilina e xantina, observando, posteriormente, menor radioatividade em produtos como alantoína, ácido alantóico e uréia. Para a biosíntese de cafeína foram fornecidas, separadamente, guanina e metionina, sendo detectada radioatividade somente em 7-metilxantina, teobromina e cafeína. A incorporação de radioatividade de metionina em cafeína e teobromina foi maior em frutos imaturos. Constatou-se ainda que, assim como em chá (SUZUKI & TAKAHASHI, 1976a), adenina foi o mais efetivo precursor de cafeína. No entanto, os autores afirmaram que não foi possível determinar, decisivamente, qual nucleotídeo purínico exerceria papel mais importante na biosíntese da cafeína.

Desde que SUZUKI & WALLER (1984b) haviam constatado que frutos maduros de café possuíam maior conteúdo de teofilina do que frutos imaturos, e que a degradação de teofilina e xantina era maior em frutos imaturos, concluiu-se que, à medida que os frutos de café amadurecem há uma queda no catabolismo de teofilina.

Como conclusões finais desse trabalho, SUZUKI & WALLER (1984b) afirmaram que a biosíntese da cafeína em café ocorreria, principalmente, durante o desenvolvimento inicial do fruto, através da metilação de 7-metilxantina e teobromina, e que a biodegradação ocorreria através de teofilina, que se acumularia depois do fruto ter atingido seu maior tamanho e começado a amadurecer.

Apesar da via metabólica ter sido praticamente toda estabelecida para o cafeeiro, com base em estudos nos frutos e nas folhas de C.

arabica, CITROREKSOKO et al. (1977), DECHSLIN et al. (1975) e PETERMANN & BAUMANN (1983) começaram a estudar a relação entre o metabolismo da cafeína e o de ácidos metilúricos em folhas de cafeeiros das espécies *Coffea liberica*, *Coffea arnoldiana* e *Coffea deweyrei* cultivares Excelsa e Aruwimiensis, nos quais WANNER et al. (1975) e PETERMANN et al. (1977) haviam identificado dois ácidos metilúricos em um total de 26 plantas analisadas. As substâncias identificadas foram ácido O(2),1,9-trimetilúrico e ácido 1,3,7,9-tetrametilúrico, que passaram a ser denominados de liberina e teacrina, respectivamente. As concentrações de liberina e teacrina nas folhas desses cafeeiros variaram de 0,01 a 0,2%, dependendo da idade da folha, e nos frutos de *C. arnoldiana* onde se constatou a presença dessas substâncias, as concentrações das mesmas variaram ao redor de 0,1% a 2%.

Entretanto, o estudo mais elucidativo sobre a interação desses ácidos metilúricos e cafeína foram efetuados por PETERMANN & BAUMANN (1983) com *C. deweyrei* cv. Excelsa, *C. liberica* e *C. abenokutae*, quando discos de folhas de plantas com 8 a 16 pares de folhas foram infiltradas à vácuo com teobromina, cafeína e teacrina marcadas com ^{14}C . Todas as três espécies converteram tais substâncias para os mesmos produtos, porém, dependendo do estágio de maturação da planta (número de pares de folhas), o padrão de acumulação de uma determinada substância variou. Assim, PETERMANN & BAUMANN (1983) observaram que houve a transformação direta de cafeína para teacrina e desta para liberina. Outro composto detectado em baixas concentrações, denominada metilliberina (ácido O(2),1,7,9-tetrametilúrico), seria, provavelmente, um precursor de liberina.

Em estudo posterior, KAFELLER & BAUMANN (1985) identificaram os três ácidos metilúricos acima citados em amostras de café não maduro do cultivar Robusta de *C. canephora* e de um híbrido dessa espécie com *C. arabica*, denominado de Arabusta.

Pelo exposto anteriormente pode-se notar que, com poucas exceções, praticamente todos passos do metabolismo de cafeína foram estabelecidos através de pesquisas realizadas com a espécie *C. arabica*. Entretanto, nada foi feito no sentido de esclarecer se o mesmo ocorre em outras espécies de café, qual a razão da variação do teor de cafeína entre espécies e até mesmo entre variedades de *C. arabica*, como é o caso da variedade Laurina que apresenta metade do teor de cafeína que outras variedades.

Desde que existem espécies de café que apresentam em suas sementes teores de cafeína bastante superiores ou bastante inferiores aos encontrados nos cafeeiros arabica e que as mesmas, por outras características, têm sido amplamente empregadas em programas de melhoramento do cafeeiro arabica em vários centros de pesquisa no mundo, acredita-se que o conhecimento dos fatores que controlam o teor desse alcalóide em sementes de café poderia melhor orientar a seleção de cafeeiros produtores de sementes que forneçam boa bebida e com alto ou baixo teor de cafeína.

O próximo item dessa revisão bibliográfica procura mostrara variabilidade intra e interespecífica no gênero *Coffea* quanto ao teor de cafeína e sua potencialidade não só em estudos bioquímicos assim como na seleção de cafeeiros.

2. Controle Genético da Síntese da Cafeína

Da classificação proposta por CHEVALIER (1947) para o gênero *Coffea* até o momento, quando muitas revisões foram feitas em função da descoberta de novas espécies em Madagascar e no oeste da África, a Seção Mascarocoffea tem sido mantida sem modificação na sua posição dentro do gênero, conservando como principal característica a de agrupar cafeeiros que não contém cafeína em suas sementes (CHARRIER, 1978; CHARRIER & BERTHAUD, 1985). Faz exceção dentro dessa Seção a espécie *C. mauriliana*, com 0,08% de cafeína em suas sementes, valor considerado muito baixo (d'ORNANO et al, 1965; CAFÉ SIN CAFEÍNA..., 1979).

Como para todas as espécies de café, com exceção de *C. arabica* que é tetraplóide ($2n=44$ cromossomos), os cafeeiros da Seção Mascarocoffea são diplóides (LOUARN, 1972) e originários de Madagascar, Ilhas Mascarenhas e Arquipélago de Comores (CHARRIER, 1978).

Apesar da importante característica "ausência de cafeína" nas sementes, tais cafeeiros apresentam limitações bastante sérias quanto a sua exploração agrícola comercial. Além da falta de vigor e da baixa produtividade das plantas, a bebida obtida a partir das sementes desses cafeeiros é excessivamente amarga, devido a presença de uma substância denominada cafamarina (CHARRIER, 1975; d'ORNANO et al., 1967; ROSTOLAN, 1971; ROSTOLAN & POISON, 1969).

CHARRIER (1976, 1978) fez cruzamentos controlados entre cafeeiros da Seção Mascarocoffea e cafeeiros amplamente cultivados, como *C. arabica* e *C. canephora*, observando que os híbridos triplóides do cruzamento com a primeira espécie eram estéreis e apresentavam meiose irre-

gular, enquanto que os híbridos do segundo cruzamento tinham um comportamento meiótico anormal, reduzida produção de pólen viável e esterilidade caracterizada pela não diferenciação de gemas florais. Como conclusão CHARRIER (1976, 1978) ressaltou que o sucesso na transferência da característica "ausência de cafeína" de cafeeiros de *Mascarocoffea* para os de espécies cultivadas dependeria da quebra de fortes barreiras genéticas e, conseqüentemente, da restauração da fertilidade dos híbridos da primeira geração.

Por outro lado, uma série de trabalhos relatando resultados de análises do teor de cafeína em cafeeiros de *C. arabica* e *C. canephora*, demonstraram uma grande variabilidade no conteúdo do alcalóide. Apesar dos limites inferiores dessa variação não atingirem valores não muito mais baixos do que 1%, eles indicaram a possibilidade da realização de um programa de melhoramento visando reduzir o conteúdo de cafeína em sementes de café.

Desta forma, CARVALHO et al. (1983) determinaram que *C. canephora* apresentava uma variação de 1,84% (cv. Kouillou) a 2,49% (cv. Laurenti). Para a mesma espécie, CHARRIER & BERTHAUD (1975) determinaram para o cultivar Robusta a existência de cafeeiros produzindo sementes com 1,16% a 3,27% em cafeína.

Para *C. arabica*, TANGO & TEIXEIRA (1961) analisaram cafeeiros do cultivar Mundo Novo, observando variações entre 1,073 a 1,296% de cafeína.

Para outras espécies como *Coffea eugenoides* e *Coffea racemosa*, CARVALHO et al. (1983), CHARRIER (1978) e CHARRIER & BERTHAUD (1975) determinaram valores de 0,23 a 0,5% e de 0,5 a 1,2% de cafeína, res-

pectivamente.

Híbridos de gerações avançadas de cruzamentos de *C. arabica* com *C. canephora*, conhecidos como cultivar Icatu, foram analisados por CARVALHO et al. (1983), sendo encontrados valores intermediários aos das plantas matrizes. Tal característica entre descendentes de cruzamentos interespecíficos também foi observada por CAPOT (1972a,b), Louarn (1975, apud LE PIERRES, 1987) e BERTHAUD (1977).

BERTHAUD & BERTHOU (1977) estudaram a variabilidade quanto ao teor de cafeína em populações naturais de cafeeiros diplóides. Os resultados obtidos são apresentados abaixo, em porcentagem de peso seco, assim como outros valores levantados por BERTHAUD & BERTHOU (1977) na literatura.

<u>espécie</u>	<u>média</u>	<u>variação</u>	<u>literatura</u>
<i>C. eugenioides</i>	0,53	0,35 a 0,77	0,23 a 0,51
<i>C. liberica</i>	1,18	0,52 a 1,80	0,97 a 1,81
<i>C. stenophylla</i>	1,29	0,80 a 1,86	1,60 a 1,85
<i>C. canephora</i>	2,76	1,91 a 3,64	1,40 a 4,00
<i>C. arabica</i>	1,20	0,77 a 1,90	0,60 a 1,30

LE PIERRES (1987) realizou três experimentos a fim de estudar os fatores genéticos que controlam o teor de cafeína. Dois experimentos foram conduzidos com o cultivar Robusta de *C. canephora* e, basicamente, consistiram de cruzamentos dialélicos entre cafeeiros com baixo ($\pm 1,6\%$), médio ($\pm 2,0\%$) e alto ($> 3,0\%$) de cafeína nas sementes. No terceiro experimento foram cruzadas plantas de *C. arabica*, com 1 a 1,5%

de cafeína, com um cafeeiro de *C. canephora* com 3%, e com cafeeiros de *C. liberica*, com 1,12% e 1,37%.

Em um dos experimentos envolvendo cruzamentos dialélicos, LE PIERRES (1987) observou que os descendentes dos cruzamentos de cafeeiros com baixo teor de cafeína possuíam o alcalóide em maior quantidade do que os parentais. Nos cruzamentos de cafeeiros com baixo teor com aqueles de médio teor ocorreu o mesmo, e nos cruzamentos com os de alto teor os descendentes apresentavam valores intermediários aos dos parentais. Valores intermediários aos das plantas matrizes foram observados nos descendentes de cruzamentos de plantas com médio e alto teor. Nos cruzamentos de plantas com alto teor, o nível de cafeína se manteve.

No terceiro experimento, os híbridos do cultivar Robusta com cafeeiros arabica produziram sementes com valores intermediários de cafeína, e nos cruzamentos desses últimos cafeeiros com os liberica ocorreu o mesmo, porém, com valores inferiores aos híbridos com Robusta.

Como conclusões LE PIERRES (1987) afirmou que a) genes com efeito aditivo influenciariam o teor de cafeína em *C. canephora*; b) que o teor de cafeína seria uma característica de alta herdabilidade; c) que o grão de pólen influenciaria o teor de cafeína, como também alterações no pólen, decorrentes do ano e do local, poderiam afetar o conteúdo de cafeína; d) e que o teor de cafeína nesse cafeeiro seria uma característica independente da produção, do vigor e do tamanho das sementes.

A conclusão de LE PIERRES (1987) de que genes com efeito aditivo atuariam na determinação do conteúdo de cafeína nas sementes do cafeeiro somente veio confirmar o trabalho de CHARRIER (1976), que trabalhou com hibridações interespecíficas entre cafeeiros da Seção Mascarooffeea e das espécies *C. canephora*, *C. arabica* e *C. eugenioides*. Ambos os trabalhos não possibilitaram a identificação de um modelo genético para o estudo da herança do teor de cafeína.

Somente em *C. arabica* é que houve a possibilidade da realização de um estudo nesse sentido, em função do aparecimento de uma mutação simples na variedade Bourbon, originando a variedade Laurina que, na condição homozigota recessiva (*lrlr*), confere 0,6 a 0,7% de cafeína em suas sementes (CARVALHO et al., 1965). Posteriormente, estes dados foram confirmados por MONACO et al. (1975).

Entretanto, o fator genético "*lr*" do cafeeiro Laurina tem um pronunciado efeito pleiotrópico, afetando o porte da planta, a conformação dos frutos e das sementes (KRUG et al., 1939) e, também, a produtividade desse cafeeiro pode ser considerada baixa, o que afeta expressivamente a decisão de sua exploração comercial (CARVALHO et al., 1987). A avaliação da produção de cafeeiros F_2 , provenientes de híbridos entre a variedade Laurina e o cultivar Mundo Novo, indicaram que algumas plantas com características morfológicas de Laurina apresentavam produção satisfatória em relação ao outro parental, que é um cultivar de alta produtividade (CARVALHO et al., 1987).

Outro fato que torna mais interessante ainda o metabolismo da cafeína nesse cafeeiro é que a manifestação da condição homozigota recessiva parece ocorrer somente no endosperma da semente pois, folhas,

caules e raízes apresentam níveis do alcalóide semelhantes aos encontrados em outras variedades, que possuem, comparativamente, maior teor do mesmo no endosperma (FOBÉ & CARVALHO, 1965).

Por sua vez, d'ORNAND et al. (1968) estudaram a presença, ou ausência, de cafeína nas folhas de 24 espécies de Madagascar, através de cromatografia de papel. Apesar da não quantificação do teor do alcalóide, os autores puderam observar que em certos casos a teobromina parecia ser encontrada em maior quantidade do que a cafeína. Na maioria das espécies estudadas, visualizou muito pouca teobromina e cafeína.

III. MATERIAL E MÉTODOS

1. Material Vegetal

Todo material vegetal utilizado no presente trabalho foi coletado das coleções de espécies e variedades da Seção de Genética do Instituto Agronômico de Campinas. Mesmo sabendo-se, através da literatura, do conteúdo de cafeína de alguns cafeeiros, julgou-se conveniente a análise desse alcalóide nos representantes legítimos do banco de germoplasma do I.A.C. Assim, com exceção de frutos da espécie Coffea mauritiana, fez-se a análise de cafeína nas folhas e no endosperma de sementes de frutos dessas espécies e variedades. O material analisado é listado no quadro 1.

Com exceção de C. mauritiana, pertencente à Seção Mascarocoffea, todas as outras espécies desse gênero são incluídas na Seção Eucoffea.

Decidiu-se incluir as espécies de Paracoffea devido ao fato das mesmas terem sido anteriormente classificadas por CHEVALIER (1947) como representantes do gênero Coffea, Seção Paracoffea. Somente a pouco tempo é que LEROY (1980), através de estudos morfológicos, as classificou em um gênero separado. Outro fato que levou à inclusão dessas espécies no presente estudo, e que de certa forma contraria a nova classificação proposta por LEROY (1980), é que MAZZAFERA et al. (1987) observaram que tais espécies eram infectadas pelo fungo Hemileia vastatrix, agente causal da ferrugem alaranjada das folhas, parasita obrigatório do gênero Coffea.

Quanto à espécie Psilanthus manii, decidiu-se pela sua inclusão

Quadro 1. Relação de espécies e variedades de café, e de gêneros afins, nas quais o teor de cafeína foi analisado em folhas e endosperma de sementes.

<u>C. arabica</u>	cultivar	Mundo Novo
"	"	Nacional
"	"	Catuaí
"	variedade	Laurina

<u>C. canephora</u>	cultivar	Robusta
"	"	Laurenti
"	"	Kouillou
"	"	Guarini

<u>C. deweyrei</u>	cultivar	Excelsa
"	"	Abeokutae
"	"	Dibowskii

<u>C. congensis</u>	cultivar	Uganda
"	"	Bangalan

Híbrido 387 (C. arabica × C. canephora)

C. buxobensis

C. kaeakata

C. eugeniioides

C. stenophylla

C. salvatrix

C. racemosa

C. liberica

C. mauritiana

C. brevipes

C. klainii

Paracoffea ebracteolata

P. bengalensis

P. travancorensis

Psilanthus manii

por ser bastante próxima ao gênero *Coffea*, tendo sido inclusive denominada por CHEVALIER (1947) como representante do grupo dos falsos cafeeiros.

Quando da coleta das folhas e frutos, verdes ou maduros, coletaram-se ramos inteiros, que foram acondicionados em sacos plásticos umidecidos internamente com água. Todas as coletas foram feitas na parte da manhã, nunca depois das 8:00 horas.

Em laboratório, as folhas foram previamente lavadas em água corrente e depois colocadas para secar em estufa a 80°C. Os frutos foram cortados ao meio e, com auxílio de uma espátula, os endospermas foram retirados e colocados para secar em estufa. Após uma semana de secagem, os materiais foram moídos em moinho tipo Wiley ou de bolas e armazenados em dessecador até uso posterior.

2. Extração e Dosagem Espectrofotométrica da Cafeína

A extração e dosagem da cafeína por espectrofotometria seguiram os métodos utilizados por LOPES (1971) e para cada amostra foram feitas seis repetições. À cada amostra de 60mg de material vegetal foram adicionadas quatro gotas de NH_4OH e, após uma hora de repouso, adicionaram-se 8ml de clorofórmio e a mistura permaneceu sob refluxo por 30 minutos. Depois do resfriado, o extrato foi filtrado, o volume com-

pletado a 12 ml com clorofórmio e, para uma alíquota de 0,3ml adicionava-se 2,7ml de clorofórmio. Nesse extrato final foram feitas leituras de absorbância em 257, 277 e 297nm, cujos valores foram aplicados na fórmula abaixo:

$$\text{Cafeína \%} = \frac{M' - 1/2 (A' + D')}{M - 1/2 (A + D)} \times 2$$

onde: A', D', e M' = valores de absorbâncias do extrato em 257, 277 e 297nm.

A, D, e M = valores de absorbância de solução 0,001% de cafeína pura em 257, 277 e 297nm.

3. Extração e Dosagem de Substâncias do Metabolismo da Cafeína por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

A extração da cafeína e de substâncias envolvidas na sua via metabólica seguiu, basicamente, a metodologia de PETERMANN & BAUMANN (1983) e de SUZUKI & WALLER (1984).

Amostras de 200mg de material vegetal foram extraídos, por 30 minutos, com solução aquosa de H₂SO₄ 0,0125N a 95°C. Aos extratos ainda quentes foram adicionados 2,0g de MgO e, após o resfriamento, os mesmos foram centrifugados a 12.000rpm por 20 minutos. Os sobrenadantes foram, então, extraídos por três vezes com 10ml de clorofórmio, com um espaço de tempo de 24 horas entre cada extração, permanecendo os frascos em agitador rotatório. Os extratos clorofórmicos de cada amostra foram combinados e secos em banho-maria a 35°C e armazenados em 18°C..

Nessa fração esperava-se encontrar cafeína, teobromina e teofilina e, na fração aquosa, monometilxantinas e outros compostos solúveis em água. Aliquotas das frações aquosas, que foram purificadas em cartuchos Sep-Pak C18 (Waters Associates), também foram secas em banho-maria e armazenadas em 18°C.

Na realização das análises em CLAE as frações clorofórmicas e aquosas armazenadas foram ressuspensas em pequeno volume (0,25 a 1,0ml) de água destilada a 80°C.

Para todas as cromatografias desenvolvidas utilizaram-se colunas do tipo C18 e gradiente de metanol e água. No entanto, como as condições do desenvolvimento das cromatografias em CLAE variaram em função dos tratamentos a que foram submetidos os frutos de café, optou-se pela indicação das mesmas nas tabelas correspondentes do item Resultados e Discussão.

4. Síntese e Isolamento de S-adenosilmetionina

S-adenosilmetionina foi sintetizada através do cultivo da linhagem YM 0754 de Sacharomyces cerevisiae. Para o cultivo da levedura foi utilizado o meio enriquecido com metionina proposto por SCHLENK & DE-PALMA (1957), onde para um litro de água destilada adicionaram-se 4g de KH_2PO_4 , 2g de K_2HPO_4 , 4g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2g de citrato de sódio, 0,6g de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,2g de $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,2g de CaCl_2 , 0,2g de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 30g de glicose e 1,5g de L-metionina. A solução acima foi colocada em erlenmeyer de dois litros, juntamente com alguns pequenos pedaços de cerâmica, e esterilizada em autoclave a 120°C por 20 minutos. Em câma-

ra asséptica adicionou-se a levedura, e os frascos, devidamente selados, permaneceram em agitador rotatório por 72 a 96 horas a 25°C.

Após este período, os frascos permaneceram em repouso por quatro horas para sedimentação da levedura e, cuidadosamente, retirou-se o máximo possível do meio, por sifonamento com uma mangueira flexível que possuía uma agulha de seringa na extremidade de coleta. O restante foi transferido para tubos de ensaio e centrifugado a 174000xg por 30 minutos a 4°C por duas vezes, com lavagem do precipitado com água destilada entre elas. O precipitado livre de meio de cultura foi armazenado em freezer a -18°C.

A extração de S-adenosilmetionina do precipitado de levedura foi feita segundo (SHAPIRO & EHNINGER, 1966). Ao precipitado adicionou-se, aproximadamente, quatro vezes o volume com ácido perclórico 1,5N com 2-mercaptoetanol (2-ME) na concentração de 5mM. Após a mistura de extração ter permanecido a 4°C por uma hora com ocasional agitação, foi centrifugada a 17400xg por 30 minutos e o sobrenadante obtido foi neutralizado a pH6-7, com a adição de KHCO_3 sólido, e novamente centrifugado.

O sobrenadante neutralizado foi então cromatografado em coluna de troca iônica Dowex 50W (XB, forma Na^+), preparada segundo SHAPIRO & EHNINGER (1966). A S-adenosil-homocisteína (SAH), as bases nucleicas e os aminoácidos foram eluídos da coluna com NaCl 0,1M, até que o eluato apresentasse absorbância menor do que 0,020 em comprimento de onda de

256nm. S-adenosilmetionina foi eluído com H_2SO_4 6N, sendo coletadas frações de 8ml até que a absorbância em 256nm fosse menor que 0,020. As soluções eluentes continham 2-ME na concentração de 5mM.

Para o cálculo da concentração de S-adenosilmetionina nos eluatos considerou-se que o coeficiente de extinção molar (Em) desse composto em 256nm é de 14700 em H_2SO_4 6N (SHAPIRO & EHNINGER, 1966). Assim, os eluatos de maior concentração em S-adenosilmetionina ($\pm 40 \times 10^{-6}\text{M}$) foram reunidos e armazenados a -18°C . No momento do uso o pH dos mesmos foi elevado a seis com KHCO_3 sólido, seguido de filtração em Whatman nº1.

A fim de averiguar possíveis contaminações com SAH e outros compostos nitrogenados, foram corridas placas cromatográficas de camada delgada de celulose com os eluatos contendo S-adenosilmetionina. Placas preparadas segundo GRIPPO et al. (1965) foram desenvolvidas com n-butanol:ácido acético:água (60:15:25 v/v/v), e observadas em ultravioleta e reveladas com ninhidrina.

Para a extração de S-adenosilmetionina do material vegetal procedeu-se de acordo com a metodologia modificada de SHAPIRO & EHNINGER (1966), proposta por SUZUKI (1973). O material vegetal previamente congelado a -18°C , foi rapidamente pesado e extraído a 4°C com 5-6 volumes de ácido perclórico 1,5N, 5mM 2-ME, e com igual peso de polivinilpirrolidona (PVPP). Após repouso de uma hora com agitações ocasionais, o homogenato foi centrifugado por 30 minutos a $17400 \times g$ a 4°C , e o sobrenadante, após ter o pH elevado ao redor de seis ou sete com KHCO_3 sólido, foi centrifugado novamente. Em seguida, o sobrenadante foi aplicado à coluna cromatográfica Dowex 50W (X8, forma Na^+), a qual foi eluída com NaCl 0,1M, 5mM 2-ME, para retirada de impurezas, e com

H₂SO₄ 6N, 5mM 2-ME, para a retirada de S-adenosilmetionina. Frações foram coletadas a cada 8ml e as absorbâncias determinadas em espectrofotômetro a 256nm. Para o cálculo de S-adenosilmetionina, através de seu Em, somente foram consideradas as absorbâncias cujos valores foram acima de 0,100.

5. Extração e Purificação do Padrão de Teacrina

Em face à não disponibilidade comercial de teacrina (ácido 1,3,7,9-tetrametilúrico), a substância foi extraída e purificada de fontes vegetais para servir como padrão nas análises em CLAE.

Para a extração de teacrina, folhas de plântulas das espécies C. liberica e C. deweyrei var Excelsa, com 4 meses de idade (2 a 3 pares de folhas), foram secas a 80°C e extraídas conforme o método descrito no item Extração e Dosagem de Substâncias do Metabolismo de Cafeína por CLAE, proposta por PETERMANN & BAUMANN (1983) e por SUZUKI e WALLER (1984). Assim, a fração final de clorofórmio após ter sido seca, foi resuspensa em um pequeno volume do mesmo solvente e aplicada longitudinalmente em placas de cromatografia de camada delgada de sílica GF₂₅₄. As placas foram desenvolvidas em acetona:clorofórmio:n-butanol:amônia (3:3:4:1 v/v/v/v), utilizando-se como substâncias referências cafeína, teobromina e teofilina (WANNER et al., 1975). A visualização da substância nos cromatogramas foi feita em ultra-violeta (254nm) e com aplicação de revelador de iodina (SENANAYAKE & WIJESEKERA, 1968) em faixas laterais das placas. Também foram comparados os R_f's das substâncias visualizadas com os determinados por WANNER et al. (1975).

A área central de cada cromatograma relativa à teacrina foi removida, eluída com clorofórmio e recromatografada. Depois da localização em ultra-violeta, as manchas dos novos cromatogramas foram removidas, eluídas com água destilada 80°C com posterior centrifugação, e o espectro de absorção em ultra-violeta (230-350nm) determinado para confirmação da natureza do produto (WANNER et al., 1975). A concentração da teacrina foi determinada de acordo com seu ϵ em 292nm (WANNER et al. 1975) e pureza atestada em CLAE.

6. Incubação de Frutos Verdes de Café com S-adenosilmetionina, Teobromina, Teofilina, Alopurinol e Cafeína Tritiada

As incubações foram feitas com frutos ainda verdes, o que se justifica pelo fato de que SUZUKI & WALLER (1984a,b) haviam observado que frutos de *C. arabica* nesse estágio de desenvolvimento apresentavam um metabolismo mais intenso de cafeína.

Devido a diferenças na velocidade de desenvolvimento e de maturação dos frutos das espécies estudadas, a coleta e incubação de frutos de alguns cafeeiros (*C. deweyrei*, *C. stenophylla*, *C. salvatrix* e *E. bengalensis*) foram feitas em épocas distintas de outros (*C. arabica* cv. Mundo Novo e Laurina, *C. eugeniolides*, *C. canephora* cv. Kouillou), porém, quando ambos os grupos apresentavam o interior do fruto com aspecto leitoso e opaco, o que, segundo MENDES (1941) e CARVALHO (Comunicação pessoal), é uma característica marcante da presença de endosperma nas sementes dos frutos de café.

Os frutos de cafeeiros do primeiro grupo citado acima foram coletados entre sete a oito meses após a florada, e do segundo grupo com quatro a quatro meses e meio após a florada.

Entretanto, houve também a preocupação em demonstrar que as épocas de coleta dos frutos dos dois grupos correspondiam em relação ao acúmulo de matéria seca. Para isto foram coletados frutos do cultivar Mundo Novo de *C. arabica* e de *C. deweyrei* em vários estádios de desenvolvimento e determinado o acúmulo de matéria seca em função do tamanho do fruto. Desta maneira, obteve-se maior segurança na comparação dos resultados obtidos com as incubações realizadas.

Na incubação com S-adenosilmetionina os frutos foram destacados dos ramos e sofreram um pequeno corte na região de inserção do pedúnculo. Com esta parte voltada para baixo, os frutos foram parcialmente imersos em placas de petri com solução H_2SO_4 6N contendo S-adenosilmetionina ($\pm 40 \times 10^{-6} M$), que teve seu pH elevado a seis com $KHCO_3$ sólido. As placas de petri foram colocadas em caixas gerbox transparentes e deixadas em laboratório a 25°C sob luz contínua. Após 24 horas os frutos foram seccionados no meio e os endospermas, retirados com auxílio de uma espátula, ou foram secos em estufa a 80°C, para determinação de cafeína e metabólitos por espectrofotometria e CLAE, respectivamente, ou armazenados a -18°C para posterior determinação de S-adenosilmetionina. Os controles foram imersos em soluções H_2SO_4 6N, cujo pH foi ajustado a seis com $KHCO_3$ sólido.

Para a infiltração de frutos verdes com cafeína tritiada no carbono 8 (cafeína- $3H$), estes sofreram um pequeno corte na região do pedúnculo e, com esta face voltada para cima, foram fixados em massa de

modelar, que havia sido previamente untada com lanolina, dentro de caixas transparentes de germinação (gerbox). Dentro dos gerbox foram colocados pedaços de algodão embebido com água, recobrendo praticamente todo o fundo, permanecendo o mesmo a 25°C, sob luz contínua. Com uma microseringa, volumes determinados (1 a 2 µl) de cafeína-3H (2,2 Mdpm/µl), em solução água:etanol (9:1), foram colocados no local de corte na região do pedúnculo. O espaço de tempo entre uma e outra aplicação foi determinado em função da total absorção da gota anterior. Após a aplicação da cafeína-3H os frutos passaram a receber gotas de água destilada a pH 6. Comprovou-se que tanto a cafeína-3H como a água estavam sendo absorvidos e não evaporados, através da colocação de gotas de 1 µl de água em vários pontos no fundo do gerbox, não ocorrendo evaporação durante o período de incubação, que durou 24 horas.

Após a incubação os frutos foram seccionados ao meio, os endospermas retirados e colocados para secar a 80°C para posterior análise de cafeína e metabólitos por espectrofotometria e CLAE, segundo os itens 2 e 3, respectivamente, deste Material e Métodos. As análises em CLAE foram realizadas de duas maneiras para a identificação de compostos marcados. Na primeira delas foram coletadas as frações eluídas a cada minuto da coluna cromatográfica e, após adição de líquido de cintilação, a radioatividade foi determinada em cintilômetro. Na segunda, as análises foram realizadas em aparelho com cintilômetro acoplado. As especificações de cada análise são apresentadas no item Resultados e Discussão.

A incubação com teobromina foi feita a fim de se averiguar, indiretamente, a atividade de N-metiltransferase(s) que catalisa(riam) a

reação de formação de cafeína a partir dessa dimetilxantina (ROBERTS & WALLER, 1979, WALLER et al. 1981). Este experimento foi realizado porque as tentativas de dosar a(s) atividade(s) dessa(s) enzima(s) em quatro espécies de café foram infrutíferas.

Para a incubação com teobromina o procedimento adotado foi o mesmo que para cafeína3H, sendo que a quantidade recebida pelos frutos de cada espécie variou e, portanto, são indicadas no texto de Resultados e Discussão. Após a incubação por 24 horas os endospermas foram retirados dos frutos e secos a 80°C para análise de cafeína e metabólitos, por espectrofotometria e CLAE.

Para outros dois experimentos em que se fez incubação de frutos de café, a metodologia empregada foi a mesma que a descrita acima, entretanto, foram aplicadas duas substâncias ao mesmo tempo em cada experimento. Em um deles aplicou-se inicialmente alopurinol, uma substância inibidora da transformação de xantina em ácido úrico em soja (FUJIHARA & YAMAGUCHI, 1978) e em café (MAZZAFERA, 1989) e, após um intervalo de duas horas, aplicou-se cafeína3H. No outro experimento, forneceu-se inicialmente teofilina e em seguida cafeína3H, com o mesmo espaço de tempo entre uma aplicação e outra. As quantidades aplicadas de cada substância também são indicadas em Resultados e Discussão.

Para todos os tratamentos acima descritos as incubações foram feitas com pelo menos quinze frutos que, após terem sido secos em estufa a 80°C, foram armazenados em freezer -18°C até uso posterior.

IV. RESULTADOS e DISCUSSÃO

1. Acúmulo de Matéria Seca em Plantas com Diferentes Ciclos de Desenvolvimento

A maior parte dos resultados apresentados é proveniente de estudos realizados com oito cafeeiros pertencentes a sete espécies, e que se dividem segundo o tempo de amadurecimento de seus frutos. Entre aqueles com período mais curto de maturação (7 a 8 meses) estão *C. arabica* cv. Laurina e cv. Mundo Novo, *C. canephora* cv. Kouillou e *C. eugeniolides*. As espécies *C. deweyrei* cv. Excelsa, *C. stenophylla*, *C. salvatrix* e *E. bengalensis* pertencem ao grupo cujo período de amadurecimento dos frutos é maior do que um ano.

O acompanhamento do acúmulo de matéria seca de um representante de cada grupo, o cultivar Mundo Novo de *C. arabica* e *C. deweyrei* cv. Excelsa, mostrou que na época da coleta dos frutos o acúmulo de matéria seca foi semelhante nos dois cafeeiros (figuras 1 e 2), o que permitiu, a princípio, a comparação dos resultados apresentados a seguir.

Desde que a grande maioria dos estudos deste trabalho foi feita com frutos imaturos, logo no início procurou-se identificar a presença ou não de endosperma. Isto porque o endosperma quando seco representa o produto de importância econômica no café. Sendo assim, também acompanhou-se o acúmulo de matéria seca do endosperma dos dois cafeeiros citados acima (figuras 1 e 2).

Na época da coleta os frutos já tinham praticamente atingido o tamanho máximo, enquanto que os endospermas ainda não tinham iniciado

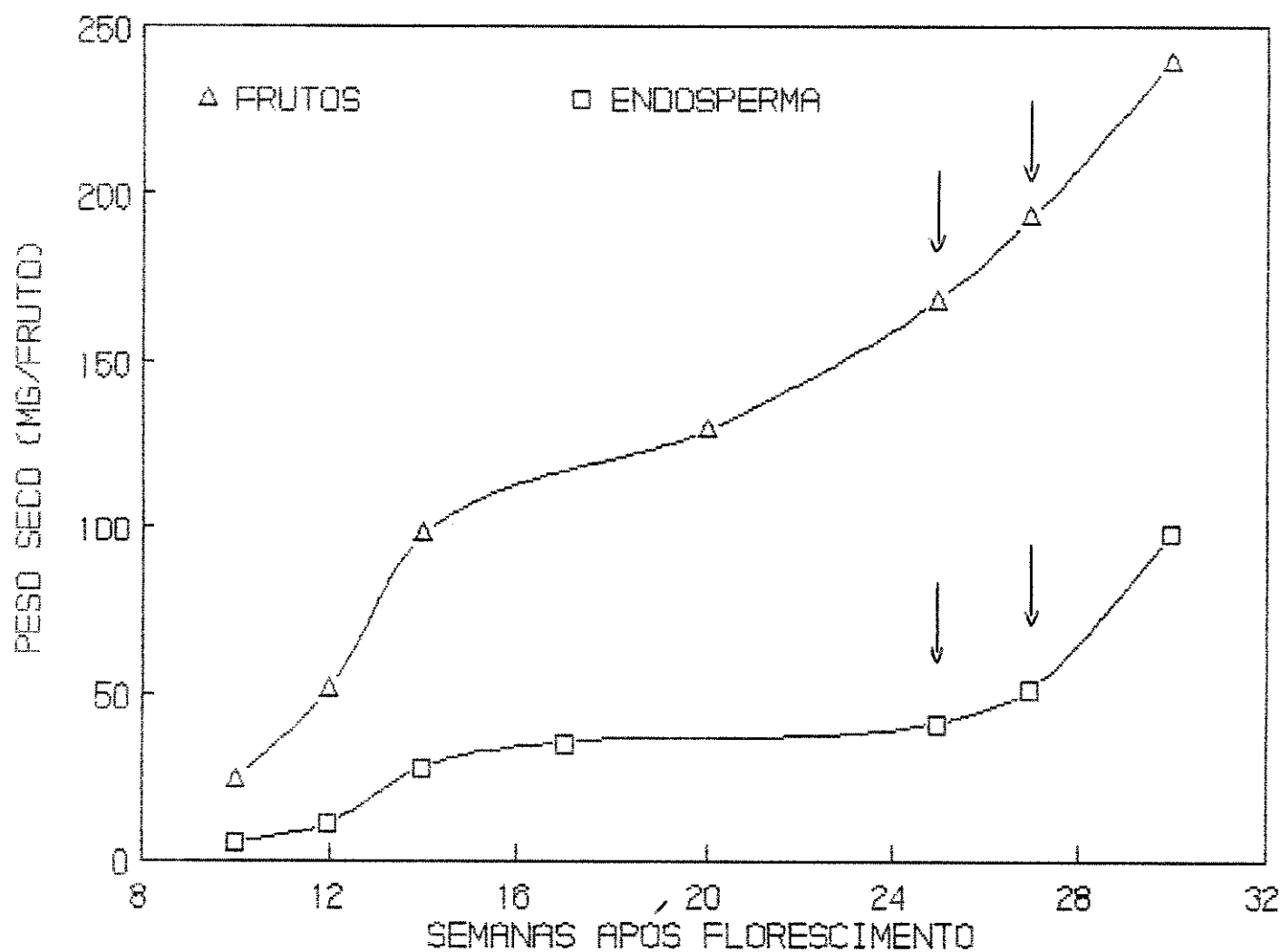


Figura 1 - Acúmulo de matéria seca em frutos inteiros e nos endospermas de sementes de frutos inteiros de *C. arabica* cv Mundo Novo. As setas indicam o estágio de crescimento dos frutos em que foram feitas as coletas para os estudos sobre a cefeína.

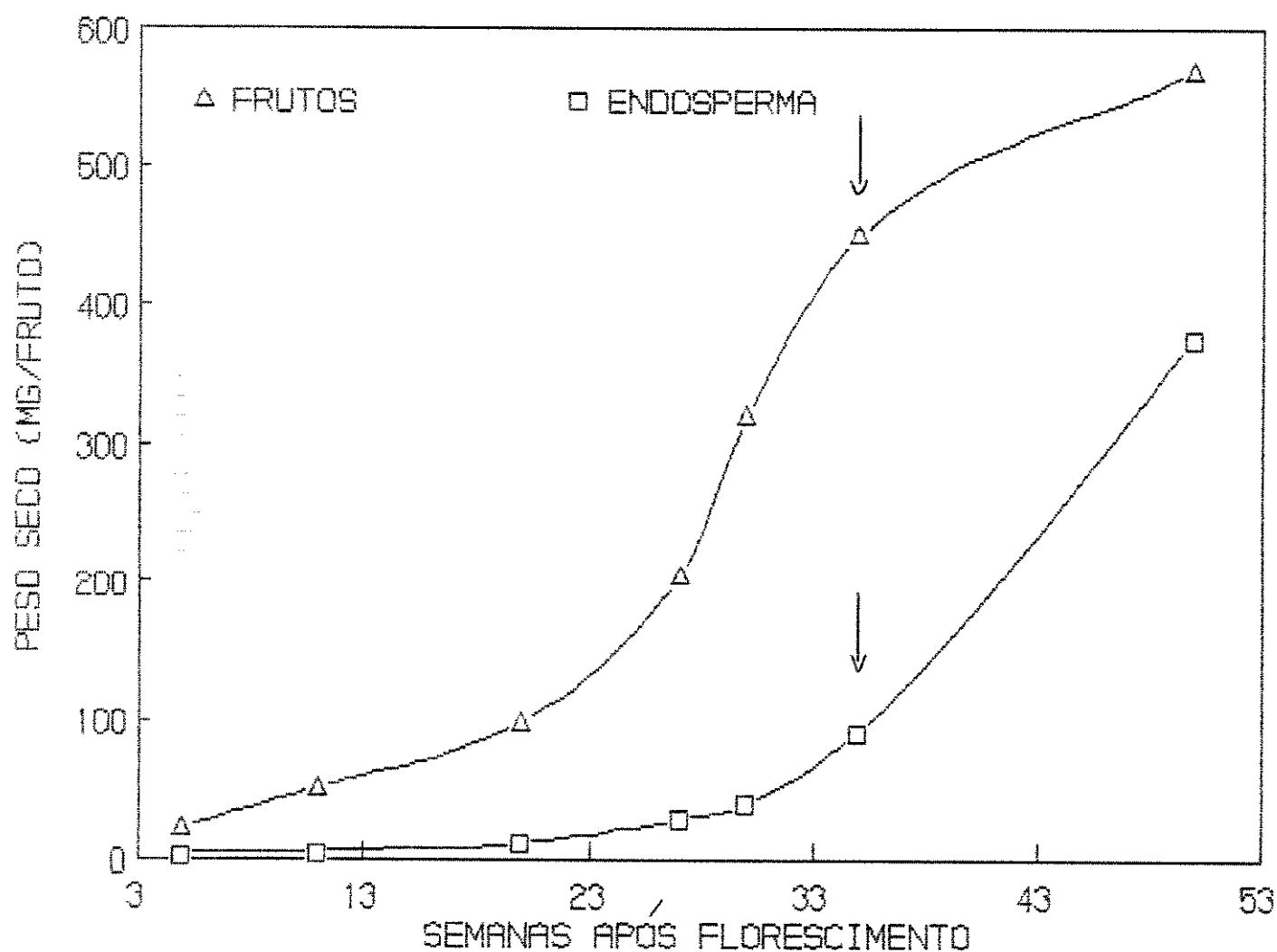


Figura 2 - Acúmulo de matéria seca em frutos inteiros e nos endospermas de sementes de frutos de *C. deweyana* cv. Excelsa. As setas indicam os estádios de crescimento dos frutos em que foram feitas as coletas para os estudos sobre a cafeína.

a perda acentuada de água, que resulta no endurecimento das sementes (PUSCHMANN, 1975). Entretanto, o interior dos frutos apresentava-se com aspecto opaco e leitoso, o que é característico da presença do endosperma (MENDES, 1941, Carvalho, comunicação pessoal). A preocupação em verificar este aspecto foi devido ao fato de que, antes da formação do endosperma, o interior dos frutos é repleto de um perisperma transitório, formado pela rápida multiplicação das células do integumento, que é um tecido materno, e portanto, diplóide (MENDES, 1941). No presente estudo este aspecto assume grande importância, pois sendo o endosperma um tecido triplóide, poderiam haver diferenças metabólicas devido ao número de cromossomos.

2. Teor de Cafeína em Folhas e Sementes de Cultivares e Espécies de Café

Como ponto inicial deste trabalho foi proposta a análise do teor de cafeína em sementes e folhas de uma série de cultivares e espécies de café, a fim de possibilitar a seleção de um menor número de cafeeiros para a utilização nos estudos posteriores. Os resultados apresentados na tabela 1 e também o interesse do emprego do cultivar ou da espécie no programa de melhoramento do cafeeiro da Seção de Genética do Instituto Agrônomo de Campinas, foram os motivos adotados para a escolha desses cafeeiros.

Antes de os dados serem analisados convém salientar que, com raras exceções, o coeficientes de variação das determinações de cafeína ultrapassaram o valor de 4%.

Tabela 1 - Conteúdo de cafeína e teacrina em folhas e nos endospermas de sementes de frutos imaturos e maduros, determinados por espectrofotometria e/ou CLAE⁽¹⁾.

	cafeína(0/o)						teacrina(0/oo)		
	espectrofotometria ^(2,3)			CLAE ⁽⁴⁾			CLAE		
	fl.	fr. ima.	fr. mad.	fl.	fr. ima.	fr. mad.	fl.	fr. ima.	fr. mad.
<u>C. arabica</u>									
cv. Mundo Novo	0,978	1,186	1,110	0,99	1,13	1,08	ND	ND	ND
cv. Nacional	0,885	---	1,054	--	--	--	--	--	--
cv. Catuai	0,929	---	1,343	--	--	--	--	--	--
cv. Laurina	0,721	0,753	0,618	0,68	0,77	0,62	ND	ND	ND
<u>C. canephora</u>									
cv. Robusta	0,456	---	1,710	--	--	--	--	--	--
cv. Kouillou	0,954	3,649	2,358	0,93	3,51	2,45	ND	ND	ND
cv. Guarani	0,248	---	2,359	--	--	--	--	--	--
cv. Laurenti	1,173	---	2,454	--	--	--	--	--	--
<u>C. dewevrei</u>									
cv. Excelsa	0,021	0,078	1,205	ND	0,25	1,17	ND	0,45	0,18
cv. Abeokuta	0,097	---	1,322	--	--	--	--	--	--
cv. Dibowski	ND	---	0,779	--	--	--	--	--	--
<u>C. congensis</u>									
cv. Uganda	0,145	---	1,930	--	--	--	--	--	--
cv. Bangalan	0,320	---	2,038	--	--	--	--	--	--

(continua)

(continuação tabela 1)

	cafeína(0/o)						teacrina(0/oo)		
	espectrofotometria(2,3)			CLAE(4)			CLAE		
	fl.	fr.ima.	fr.mad.	fl.	fr.ima.	fr.mad.	fl.	fr.ima.	fr.mad.
<u>C. liberica</u>	0,021	---	1,360	--	--	--	--	--	--
<u>C. mauritiana</u>	ND	---	---	ND	--	--	ND	--	--
<u>C. brevipes</u>	ND	---	0,731	--	--	--	--	--	--
<u>C. klainii</u>	0,300	---	0,947	--	--	--	--	--	--
<u>Híbrido 387</u>	0,000	---	1,161	--	--	--	--	--	--
<u>C. buxobensis</u>	0,959	---	2,251	--	--	--	--	--	--
<u>C. kapakata</u>	ND	---	0,715	--	--	--	--	--	--
<u>C. eugenoides</u>	ND	0,509	0,401	ND	0,40	0,41	ND	ND	ND
<u>C. stenophylla</u>	0,030	1,710	1,650	ND	1,77	1,71	ND	1,52	0,90
<u>C. salvatrix</u>	0,014	0,509	0,715	--	--	--	--	--	--
<u>C. racemosa</u>	0,031	1,348	0,829	ND	1,30	0,81	ND	0,09	--
<u>P. ebracteolata</u>	0,059	---	0,022	--	--	--	--	--	--
<u>P. travancorensis</u>	0,056	0,104	0,053	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<u>P. bengalensis</u>	0,152	0,142	0,039	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<u>Psilanthus manii</u>	0,036	---	---	--	--	--	--	--	--

(1) - "---" = análises não realizadas; ND = não detectado; CLAE = cromatografia líquida de alta eficiência

(2) - Médias de seis repetições

(3) - fl. = folhas; fr.ima. = frutos imaturos; fr.mad. = frutos maduros.

(4) - Condições cromatográficas: AUFs = 0,1, coluna μ bondapak C18, fase móvel metanol/água (30/70), fluxo 1ml/min, monitor UV em 272nm para cafeína e 292nm para teacrina.

Pela tabela 1 pode-se notar, através das análises realizadas por espectrofotometria, que existiu uma grande variação entre o teor de cafeína nas sementes de frutos maduros dos cafeeiros analisados, porém, na maioria dos casos o teor de cafeína nas folhas foi maior do que o da semente. Entretanto, relativamente a cada parte analisada, folhas e sementes, foi possível observar até quatro níveis de grandeza no teor de cafeína em cada uma delas. Assim, cafeeiros como *C. canephora* cv. Kouillou e cv. Laurenti apresentaram alto teor de cafeína nas sementes, enquanto que *C. arabica* cv. Nacional, cv. Mundo Novo e cv. Catuai apresentaram teor médio, sendo que *E. travancorensis* e *E. bengalensis*, embora não incluídos no gênero *Coffea* (LEROY, 1980), praticamente não apresentaram cafeína nas sementes de frutos maduros. Cafeeiros como *C. racemosa*, *C. eugenioidea* e o cultivar Laurina de *C. arabica* poderiam ser incluídas em um quarto grupo, com valores intermediários entre os dois últimos acima citados.

Quanto ao teor de cafeína nas folhas, o grupo com alto teor incluiria, por exemplo, os cultivares Laurenti e Kouillou de *C. canephora* e todos os cultivares de *C. arabica*. Em seguida, outro grupo seria formado por *C. consensia* cv. Bangelan, *C. klainii* e *C. canephora* cv. Robusta, e um terceiro grupo incluiria *C. canephora* cv. Guarini, *E. bengalensis* e *C. consensia* cv Uganda. No último grupo estariam cafeeiros com ausência de cafeína nas folhas, como por exemplo, *C. kapakata*, *C. brevipes* e *C. eugenioidea*.

Caso fossem feitas combinações entre os quatro grupos identificados para o teor de cafeína nas folhas e nas sementes dos cafeeiros analisados, seria possível obter 16 combinações. Entretanto, consideran-

do-se os motivos para a escolha dos cafeeiros que seriam utilizados em estudos posteriores, foram selecionados *C. canephora* cv. Kouillou, *C. arabica* cv. Mundo Novo e cv. Laurina, *C. eugenoides*, *C. stenophylla*, *C. salvatrix*, *C. deweyrei* cv. Excelsa, *C. mauritiana*, *C. racemosa* e *E. bengalensis* e *E. travancorensis*. Ainda assim, algumas dessas espécies não foram incluídas em todos os estudos, ou porque não produziram frutos em número adequado para os experimentos, como no caso de *C. mauritiana* e *E. travancorensis*, ou porque o ciclo fenológico dificultou a realização de um acompanhamento mais cuidadoso do desenvolvimento do fruto, como foi o caso de *C. racemosa*, cujo período de maturação é de quatro meses a partir do florescimento.

Decidida a escolha desses cafeeiros, foram feitas análises em CLAE do teor de cafeína e teacrina nas folhas e nos endospermas de sementes de frutos imaturos e maduros, além de cafeína, por espectrofotometria, nos de frutos imaturos (tabela 1).

A primeira observação que pode ser feita com tais resultados foi que não existiu correlação entre os teores de cafeína dos endospermas de sementes de frutos maduros e de folhas. Isto veio confirmar para outras espécies o que FOBÉ & CARVALHO (1965) haviam constatado para variedades de *C. arabica*.

Para a maioria dos casos, sendo exceção os endospermas de sementes de frutos imaturos de *C. deweyrei* cv. Excelsa, as análises realizadas por espectrofotometria, após extração com clorofórmio (LOPES, 1971), foram concordantes com aquelas realizadas por CLAE, onde a extração de cafeína foi realizada com água quente (MAZZAFERA e OLIVEIRA, 1989).

Observou-se também que, com exceção de *C. deweyrei* cv. Excelsa e *C. salvatrix*, todas as análises dos endospermas de sementes de frutos imaturos, realizadas por espectrofotometria ou por CLAE, apresentaram valores maiores do que aquelas realizadas nos endospermas de sementes de frutos maduros. De certa forma, isto confirma os resultados obtidos SUZUKI e WALLER (1984b), que relataram que em frutos imaturos o metabolismo de cafeína seria mais intenso, havendo, portanto, maior conteúdo do alcalóide.

Aparentemente *C. deweyrei* cv. Excelsa *C. salvatrix*, que não seguiram este padrão, possuiriam taxa de degradação muito maior do que a de síntese. Outra hipótese, mais remota, seria que em frutos imaturos haveria uma baixa taxa de síntese, a qual se elevaria com o amadurecimento do fruto. SUZUKI e WALLER (1984a,b) relataram que, em *C. arabica*, o metabolismo da cafeína diminuía com a maturação dos frutos.

Os resultados contidos na tabela 1 mostram também que, via de regra, os valores de cafeína encontrados por CLAE foram menores do que os obtidos por espectrofotometria. Muito provavelmente, a explicação para este fato seria de que no primeiro método ocorre a interferência de outras xantinas presentes no extrato, particularmente teobromina e teofilina, que por possuírem espectro de absorção semelhante ao da cafeína em luz ultravioleta, levariam a uma super-estimativa de cafeína. Tal interferência seria excluída nas análises em CLAE. Tal fato já havia sido observado por KAZI (1980), que comparou análises realizadas por CLAE e por outros métodos.

As análises realizadas em CLAE para a detecção de teacrina indicaram a presença dessa substância nos endospermas de sementes de fru-

tos imaturos e maduros de *C. deweyrei* cv. Excelsa e *C. stenophylla*. Em *C. racemosa* teacrina foi detectada somente nos endospermas de sementes de frutos imaturos (tabela 1).

PETERMANN e BAUMANN (1983) observaram o aparecimento de teacrina em folhas de plântulas de *C. deweyrei* cv. Excelsa, que seria formada a partir da degradação da cafeína contida nas sementes.

WANNER et al. (1975) isolaram teacrina de folhas de *C. liberica*, *C. arnoldiana* e *C. deweyrei* cv. Excelsa e cv. Aruwimiensis, e no pericarpo de *C. arnoldiana*.

Considerando que estas referências foram as únicas levantadas na revisão bibliográfica deste trabalho, pode-se afirmar que a detecção de teacrina em *C. stenophylla* e *C. racemosa* são inéditas, o mesmo acontecendo nos frutos de *C. deweyrei* cv. Excelsa. Outro fato é que o teor de teacrina foi maior nos endospermas de sementes de frutos imaturos e, desde que esta substância foi confirmada como um produto da degradação de cafeína (PETERMANN e BAUMANN, 1983), os dados obtidos indicam que tal via de degradação da cafeína também ocorre nesses cafeeiros, parecendo ser mais intensa em frutos imaturos.

Em função da diferença observada no teor de cafeína entre endospermas de frutos imaturos e maduros, a razão entre a taxa de degradação e de síntese nos frutos imaturos de *C. deweyrei* cv. Excelsa e *C. salvatrix* seria maior do que nos outros cafeeiros estudados, justificando o menor teor do alcalóide nos endospermas de sementes de frutos imaturos (tabela 1). Considerando esta hipótese correta, o

maior teor de teacrina nos frutos imaturos desse cafeeiro seria esperado. Entretanto, existe a exceção de *C. stenophylla*, que apresentou níveis maiores de cafeína nos endospermas de sementes de frutos imaturos.

3. Incubação de Frutos Imaturos com S-adenosilmetionina

A síntese de S-adenosilmetionina a partir do cultivo da levedura *Sacharomyces cerevisiae* mostrou-se um método eficiente para a obtenção de tal substância. A figura 3 mostra a concentração de S-adenosilmetionina em frações eluídas de coluna Dowex 50W (X8, forma Na) com H_2SO_4 6N. Cromatografias em camada delgada de celulose desses eluatos mostraram a ausência de contaminantes reativos com ninhidrina.

Os resultados das análises em endospermas de sementes de frutos imaturos incubados com S-adenosilmetionina são indicados na tabela 2. Nesta também são mostrados os teores de cafeína, determinados por espectrofotometria e por CLAE, e os teores de teobromina e teofilina, também determinados por CLAE. Os resultados das análises espectrofotométricas de cafeína são médias de seis repetições, não apresentando coeficiente de variação maior que 4,5%. Os resultados de CLAE são médias de duas repetições e os das dosagens de S-adenosilmetionina, também.

Para os cafeeiros *C. arabica* cv. Mundo Novo e cv. Laurina, *C. eugenioides* e *C. canephora* cv. Kouillou, houve um aumento no conteúdo de S-adenosilmetionina e, com exceção do cultivar Laurina, também no teor

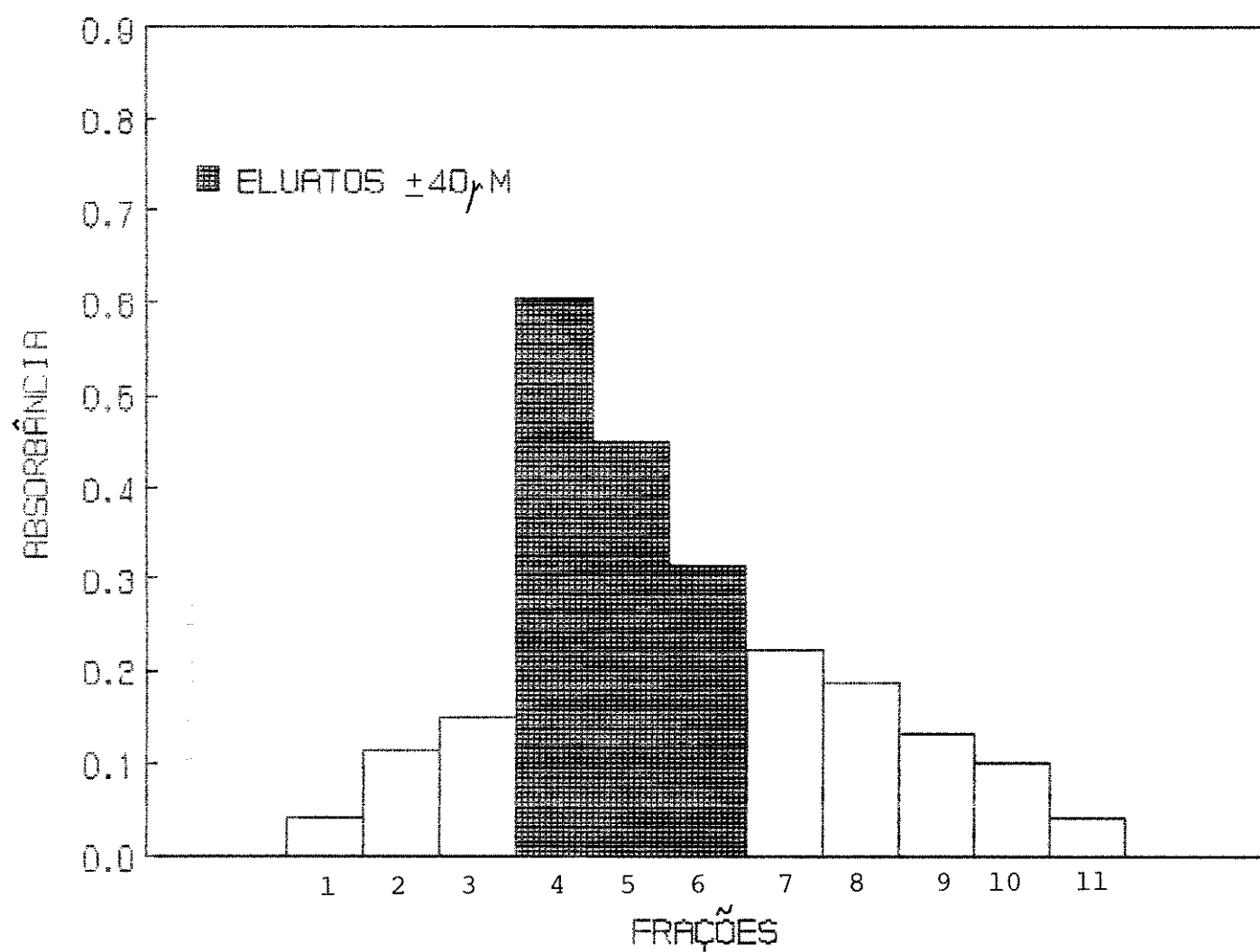


Figura 3 - Concentração de S-adenosilmetionina em eluatos de extratos de Sacharomyces cerevisiae cromatografados em coluna de troca iônica.

Tabela 2 - Conteúdo de cafeína, teobromina e teofilina, determinadas por espectrofotometria e CLAE, e S-adenosilmetionina nos endospermas de sementes de frutos imaturos incubados com S-adenosilmetionina⁽¹⁾.

	espectrofotometria ^(2,3)		CLAE ⁽⁴⁾		SAM ⁽⁵⁾ (µM/g p.f.)
	cafeína (%)	cafeína (%)	teobromina (%)	teofilina (%)	
<u>C. arabica</u>					
cv. Mundo Novo	1,820	1,870	0,003	0,020	401,4
controle	1,414	1,330	0,003	0,020	349,2
cv. Laurina	0,941	1,120	0,001	0,004	5,8
controle	0,872	1,080	0,002	0,002	2,2
<u>C. canephora</u>					
cv. kouillou	3,347	3,770	0,005	0,002	12,0
controle	2,906	3,270	0,008	0,010	7,2
<u>C. dewevrei</u>					
cv. Excelsa	ND	0,140	0,218	0,011	23,3
controle	ND	0,200	0,166	0,014	29,3
<u>C. eugenoides</u>					
	0,187	0,090	0,002	0,050	15,7
controle	0,136	0,070	0,001	0,030	8,9
<u>C. stenophylla</u>					
	0,322	0,660	0,364	0,013	13,3
controle	0,838	1,150	0,352	0,019	23,5
<u>C. salvatrix</u>					
	0,430	0,400	0,275	0,005	88,7
controle	0,505	0,450	0,197	0,004	106,0
<u>P. bengalensis</u>					
	ND	0,052	0,003	ND	13,8
controle	0,017	0,020	0,003	ND	18,7

(1) - ND = não detectado; CLAE = cromatografia líquida de alta eficiência; SAM = S-adenosilmetionina.

(2) - Médias de seis repetições.

(3) - Para as dosagens espectrofotométricas, com exceção de C. dewevrei, todas as outras espécies diferiram do respectivo controle pelo teste de Duncan a 5%.

(4) - Condições cromatográficas: AUFs = 0,1, coluna μ bondapak C18, fase móvel metanol/água (30/70), fluxo 1ml/min, monitor ultravioleta em 272nm.

(5) - Médias de duas repetições.

de cafeína. Para as outras substâncias analisadas por CLAE, houve somente um pequeno aumento de teofilina em *C. eugenioides*, e de teobromina em *C. deweyrei* cv. Excelsa.

E. bangalensis também teve um pequeno incremento no teor de cafeína, apesar da concentração de S-adenosilmetionina ter sido maior no tratamento controle. Quanto às espécies *C. deweyrei* cv. Excelsa, *C. salvatrix* e *C. stenophylla* foi observada uma diminuição no teor desse alcalóide e no de S-adenosilmetionina. Entretanto, o aumento no conteúdo de teobromina em *C. deweyrei* cv. Excelsa e *C. salvatrix* foi expressiva. Tal fato também ocorreu em *C. stenophylla* porém, com menor intensidade.

Segundo CANTONI (1975) e TABOR e TABOR (1984), S-adenosilmetionina é o principal doador de metil em metilações biológicas.

Com referência à transmetilação de S-adenosilmetionina, é geralmente aceito que um dos produtos formados é S-adenosil-homocisteína, e uma típica característica dessas reações é que elas são fortemente inibidas por baixas concentrações deste produto, ocorrendo inibição de natureza competitiva (POULTON, 1985). POULTON e BUTT (1975) já haviam sugerido que, em *Beta vulgaris*, as transmetilações poderiam ser controladas pelo nível de S-adenosilmetionina e S-adenosil-homocisteína. A significância da inibição de S-adenosil-homocisteína nas reações de transmetilação foi sugerida, principalmente, pela observação de que os níveis celulares dessa substância, apesar de baixos, eram da mesma magnitude que aqueles de S-adenosilmetionina. S-adenosil-homocisteína poderia, ainda, ser clivada pela enzima S-adenosil-homocisteína-hidrolase, que também catalisa a síntese reversiva de adenosina e S-adenosil-

sil-homocisteína. Desde que o equilíbrio é em favor da síntese, a manutenção dos níveis de S-adenosilmetionina seriam bastante dependentes da atividade da enzima.

Em chá, Suzuki (1972, apud SUZUKI, 1973) demonstrou a importância de S-adenosilmetionina nas reações de metilação na síntese de cafeína. Em café, ROBERTS e WALLER (1979), trabalhando com extratos enzimáticos de frutos verdes livres de células, demonstraram que o Km para S-adenosilmetionina na reação de metilação de 7-metilxantina para a formação de teobromina, era igual àquele da síntese de cafeína a partir de teobromina ou paraxantina, que foi de 0,01M. Estes autores concluíram que na transformação de 7-metilxantina em teobromina e desta em cafeína, poderiam estar envolvidas duas metiltransferases.

Utilizando as metodologias de ROBERTS e WALLER (1979) e WALLER et al. (1980), foram feitas tentativas para a dosagem da(s) atividade(s) dessa(s) metiltransferase(s) em *C. arabica* cv. Laurina e cv. Mundo Novo, *C. eugenioides* e *C. canephora* cv. Kouillou. Apesar de todos os passos metodológicos terem sido estritamente seguidos, com exceção do emprego de substratos marcados com ^{14}C , não se obteve sucesso na detecção da(s) atividade(s) dessa(s) enzima(s). É provável que a não utilização de substrato marcado (teobromina) pudesse explicar a razão do insucesso. Com efeito, ROBERTS e WALLER (1979) e WALLER et al. (1980) mostraram que a atividade da enzima não era alta e que a mesma se mostrava bastante instável. Assim, para a detecção de baixos níveis

de atividade seria exigido uma metodologia com maior sensibilidade, o que poderia ser satisfeito com o emprego de substrato marcado com ^{14}C .

Desta maneira, a infiltração de S-adenosilmetionina teve como objetivo conseguir indicações indiretas da atividade de metiltransferase e especular sobre uma possível relação com a limitação no fornecimento de grupamentos metil.

Os resultados obtidos para os cultivares Mundo Novo e Laurina de *C. arabica*, cultivar Kouillou de *C. canephora* e *C. eugenioides*, demonstram que esta relação parece não existir, porém, sugere que o controle do nível de cafeína nesses cafeeiros seria muito mais dependente da taxa de síntese do que de degradação.

Para a discussão dessa hipótese deve-se considerar, inicialmente, que foi observado aumento no conteúdo de S-adenosilmetionina nos endospermas de sementes de frutos imaturos desses cafeeiros. Entretanto, o mais importante é que o aumento no teor de cafeína manteve a mesma ordem de magnitude do que a concentração encontrada no controle de cada cafeeiro, uma modulação de atividade enzimática. Assim, o que se notou foi que, para um maior aumento no conteúdo de S-adenosilmetionina, como encontrado no Laurina, não houve correspondência com o aumento de cafeína. Assim, não seria pela limitação de S-adenosilmetionina que a maior síntese de cafeína não teria ocorrido, ou melhor, a limitação na síntese do alcalóide parece ser dependente do controle de enzimas.

A não detecção do aumento do teor de teobromina nesses cafeeiros também seria coerente com tal hipótese, desde que se admitiu que a síntese de cafeína ocorreria em alta taxa. Quanto ao acúmulo de teofi-

lina, SUZUKI e WALLER (1984b) observaram em *C. arabica* que a concentração dessa dimetilxantina foi 20 a 25 vezes maior em frutos maduros do que em imaturos, provando que sua degradação era rápida neste estágio de desenvolvimento. No metabolismo de cafeína o fator limitante seria sua própria transformação à teofilina, o que explicaria o maior teor do alcalóide em frutos imaturos. Desta forma, desde que a atuação de S-adenosilmetionina é anterior à cafeína e que a ordem de magnitude do seu aumento nos frutos incubados foi proporcional àquela dos controles, concluiu-se que os teores do alcalóide nos cultivares Mundo Novo e Laurina de *C. arabica*, cultivar Kouillou de *C. canephora* e *C. eugenioides* seriam controlados pela via de síntese, através de mecanismos de modulação enzimática.

C. bengalensis talvez pudesse ser incluído neste grupo, entretanto, os resultados não são concordantes com o que foi discutido anteriormente pelo fato de S-adenosilmetionina ter diminuído em relação ao controle.

Para *C. deweyrei* cv. Excelsa, *C. stenophylla* e *C. salvatrix* o controle do teor de cafeína nos endospermas de sementes de frutos parece estar relacionado com o processo de degradação. Com exceção das análises em CLAE no cultivar de *C. deweyrei*, o que se notou foi uma redução no teor de cafeína e no de S-adenosilmetionina, quando frutos imaturos foram incubados com S-adenosilmetionina. Com o cultivar Laurina observou-se justamente o contrário do que ocorreu para *C. stenophylla*. Por outro lado, o teor de teobromina se manteve constante para *C. stenophylla* e aumentou para *C. deweyrei* e *C. salvatrix*.

Para *C. deweyrei* cv. Excelsa e *C. stenophylla*, cujos teores de cafeína nos endospermas de sementes de frutos maduros foram bem maiores do que àqueles de frutos imaturos (tabela 1), foi aventada a hipótese de que a taxa de degradação desse alcalóide seria bastante superior do que a de síntese. Os resultados obtidos com a infiltração de S-adenosilmetionina em frutos imaturos desses cafeeiros não confirmaram esta hipótese, no entanto, parecem ter indicado que, de alguma forma, S-adenosilmetionina afetou o metabolismo de cafeína, fazendo com que ocorresse acúmulo de teobromina e alto consumo de S-adenosilmetionina. Assim, considerando a via metabólica da cafeína proposta para cafeeiros arabica (esquema 1), é possível que nestas duas espécies a síntese de teobromina foi estimulada, e sua transformação para cafeína foi inibida quando o fruto ainda é imaturo ou, alternativamente, a degradação do alcalóide foi intensa nesse estágio de desenvolvimento e ocorre, além da via por teofilina, lentamente via teobromina. As taxas dessas transformações em *C. salvatrix* ocorreriam com menor intensidade.

C. stenophylla foi o cafeeiro que apresentou maior teor de teobromina, não alterando a sua concentração com a incubação com S-adenosilmetionina, enquanto houve diminuição do alcalóide e de S-adenosilmetionina. Tais dados não permitem, entretanto, especular se ocorreu inibição da síntese de cafeína ou estímulo à sua degradação. De alguma forma a incubação com S-adenosilmetionina interferiu com o metabolismo da cafeína.

4. Incubação de Frutos Imaturos com Teobromina

Os resultados das análises em CLAE dos endospermas de sementes de frutos imaturos incubados com teobromina são mostrados na tabela 3, e são médias de duas repetições.

Os dados demonstram que os únicos cafeeiros que apresentaram aumento no teor de cafeína foram o cultivar Mundo Novo de *C. arabica*, o cultivar Kouillou de *C. canephora* e as espécies *C. deweyrei* cv. Excel-sa, *C. salvatrix* e *C. stenophylla*. Considerando-se a porcentagem do aumento de cafeína em relação aos controles e em função da quantidade de teobromina fornecida aos frutos (em ug/g matéria seca), os valores resultantes são, respectivamente, 4,01, 0,84, 9,11, 0,51 e 1,54%. Isto demonstra que a melhor conversão de teobromina em cafeína ocorreu no cultivar de *C. deweyrei*. Entretanto, se os outros cafeeiros transformaram pouco teobromina em cafeína, seria esperado encontrar maior teor da dimetilxantina, pois esta foi fornecida em quantidades razoavelmente altas, e também porque, apesar dela se encontrar na rota de degradação da cafeína, esta transformação foi considerada de baixa intensidade por SUZUKI e WALLER (1984a,b). No entanto, vale a ressalva de que os resultados obtidos por aqueles pesquisadores foram referentes a *C. arabica*.

A possibilidade de que a teobromina aplicada nos frutos não tivesse chegado ao endosperma, onde foram feitas as análises, parece pouco provável pois, cinco dos oito cafeeiros tiveram aumento no teor de cafeína. Ainda, no estágio de desenvolvimento em que os frutos foram incubados, os vasos condutores de seiva provavelmente já estariam

Tabela 3 - Conteúdo de cafeína, teobromina e teofilina, determinadas por CLAE, nos endospermas de sementes de frutos imaturos incubados com teobromina (1).

	teobromina ⁽²⁾ (µg/g m.s.)	cafeína (%)	CLAE ⁽³⁾ teobromina teofilina (%) (%)	
<u>C. arabica</u>				
cv. Mundo Novo	6,19	1,81	0,004	0,020
controle		1,45	0,005	0,020
cv. Laurina	5,46	1,03	ND	0,002
controle		1,09	0,001	0,005
<u>C. canephora</u>				
cv. kouillou	12,50	4,42	0,008	0,010
controle		4,00	0,010	0,020
<u>C. dewevrei</u>				
cv. Excelsa	10,98	0,40	0,177	0,014
controle		0,20	0,166	0,014
<u>C. eugenioides</u>	35,00	0,08	0,002	0,040
controle		0,11	0,001	0,037
<u>C. stenophylla</u>	15,25	1,42	0,269	0,007
controle		1,15	0,352	0,019
<u>C. salvatrix</u>	47,67	0,56	0,254	0,006
controle		0,45	0,197	0,004
<u>P. bengalensis</u>	21,39	0,02	ND	0,005
controle		0,02	0,003	ND

- (1) - ND = não detectado; CLAE = cromatografia líquida de alta eficiência.
 (2) - Quantidade de teobromina fornecida por gramo de matéria seca.
 (3) - Condições cromatográficas: AUFs = 0,1, coluna µbondapak C18, fase móvel metanol/água (30/70), fluxo 1ml/min, monitor UV em 272nm.

formados (LEON e FOURNIER, 1962) e, o desaparecimento das gotículas depositadas na pequena incisão próxima ao pedúnculo não foi devido à evaporação, pelo fato de que gotas no fundo das caixas gerbox não evaporaram durante o período de incubação. Além disso, de tempo em tempo o fruto recebeu gotículas de água para não ressecar, de forma que havia contínuo umedecimento da substância previamente aplicada.

Desde que BAUMANN e WANNER (1972) demonstraram que ocorria intensa translocação de cafeína do pericarpo para o endosperma, o que poderia ter ocorrido é que a teobromina tivesse estimulado a síntese de cafeína no pericarpo e esta translocado para a semente imatura. Por outro lado, não se conhece qual a taxa de translocação de teobromina do pericarpo para o endosperma.

Assim como para a incubação com S-adenosilmetionina, os aumentos observados no teor de cafeína mantiveram a magnitude em relação aos controles, indicando que o controle da síntese da cafeína não ocorreria por restrição no suprimento de substrato e sim pela atividade de enzimas envolvidas. Sobre isto poder-se-ia especular sobre a afinidade de metiltransferases das diferentes espécies estudadas ao substrato teobromina.

5. Incubação de Frutos Imaturos com Cafeína Tritiada

A cafeína utilizada neste experimento apresentava trítio ligado ao carbono 8 e, pelo esquema 1, observa-se que na degradação do alcalóide a possibilidade de detecção de substâncias marcadas com o trítio vai de cafeína até xantina, passando por teobromina, teofilina, 3 e

7-metilxantina.

A tabela 4 apresenta os resultados do experimento onde foram incubados frutos imaturos com cafeína^{3H} e analisados por CLAE, utilizando-se duas metodologias conforme citado no item "Material e Métodos". A tabela 4 apresenta, em valores percentuais, a radioatividade total recuperada em função da quantidade de radioatividade fornecida, e a distribuição da radioatividade de cada substância em função da radioatividade total recuperada.

Antes de serem feitas considerações mais específicas sobre os dados da tabela 4, julgou-se necessário fazer notar que na mesma são indicadas três substâncias, X1, X2 e X3, que, apesar de não terem sido identificadas por falta de padrões específicos, merecem considerações. Somente foi possível a separação de X1 e X2 com a metodologia em que se empregou um cintilômetro diretamente acoplado à CLAE. Por esta razão, os dados sobre as substâncias X1 e X2 obtidos com a metodologia em que foram coletados os eluatos a cada minuto foram apresentados conjuntamente.

Por terem sido eluídas praticamente só com a fase aquosa do gradiente, as substâncias X1 e X2 podem ser consideradas mais polares em comparação à substância X3. Entre elas, X1 seria mais polar, pois eluiu praticamente junto com a frente de corrida, desde que o volume interno da coluna e dos condutores de solvente teriam, aproximadamente, 3ml e que o fluxo do solvente foi de 1ml/min. Aos cinco minutos, quando da eluição da substância X2, a porcentagem de metanol na fase móvel seria ao redor de 3% e, aos 15 minutos, quando eluiu X3, a porcentagem seria de 19%.

Tabela 4 - Recuperação e distribuição de radioatividade entre substâncias do metabolismo de cafeína, em frutos imaturos incubados com cafeína tritiada⁽¹⁾.

	radioatividade		distribuição da radioatividade recuperada (%)					
	fornecida (Mdpm/g m.s.)	recuperada (%)	cafeína	teobromina	teofilina	X1	X2	X3
<u>C. arabica</u>								
cv. Mundo Novo	18,55	34,81 (25,60)	100,00 (99,60)	-- --	-- --	-- (0,20)	-- (0,20)	--
cv. Laurina	16,35	34,34 (22,60)	100,00 (99,20)	-- (0,40)	-- --	-- (0,40)	--	--
<u>C. canephora</u>								
cv. Kouillou	37,40	34,62 (24,52)	100,00 (99,00)	-- (0,15)	-- (0,20)	-- (0,25)	-- (0,40)	--
<u>C. dewevrei</u>								
cv. Excelsa	16,50	3,99	7,96	53,56	--	33,66.....		4,82
<u>C. eugenoides</u>	146,70	15,97 (14,13)	87,52 (73,30)	6,16 (13,10)	1,08 (2,60)	0,58..... traço	--	4,67 (11,00)
<u>C. stenophylla</u>	15,40	3,30	60,64	15,38	9,86	--	--	14,12
<u>C. salvatrix</u>	26,95	2,43	100,00	--	--	--	--	--
<u>P. bengalensis</u>	31,70	4,00	72,64	13,10	4,21	2,56.....		7,49
Test. extração	0,47	29,37 (26,83)	100,00 (100,00)	-- --	-- --	-- --	-- --	-- --

(1) - Os valores fora dos parenteses são os resultados de análises em CLAE, em que os eluatos foram coletados a cada minuto e, após adição de líquido de cintilação, avaliada a radioatividade em cintilômetro (Condições cromatográficas: coluna ODS Hypersil 5µm 150x4,6, fase móvel: solvente A - tampão acetato de sódio 50µm pH5, solvente B - metanol, gradiente 0 - 40%B em 25 minutos, fluxo 1ml/min). Os valores entre parenteses são os resultados de análises em CLAE, em que foi utilizado um cintilômetro acoplado diretamente ao cromatógrafo (Condições cromatográficas: coluna ODS Hypersil 5µm 150x4,6, fase móvel: solvente A - tampão acetato de sódio 50µm pH5, solvente B - metanol, gradiente 0 - 40%B em 25 minutos, fluxo 1ml/min, monitor de radioatividade em modo homogêneo (líquido cintilação/eluyente = 3/1), líquido de cintilação Ailex.

Entretanto, desde que havia sido determinado, em monitor de ultravioleta em 272nm, que o tempo de eluição do padrão de xantina foi ao redor de dez minutos, e sabendo-se que tal substância é mais polar do que monometilxantinas, concluiu-se que a substância X3 poderia ser 3 ou 7-metilxantina.

KALBERER (1965), que realizou um dos primeiros trabalhos sobre o metabolismo da cafeína utilizando ^{15}N e ^{14}C -cafeína, já havia detectado a presença de substâncias de natureza desconhecida em extratos de folhas de *C. arabica*. SUZUKI e TAKAHASHI (1975a, 1976) também observaram substâncias desconhecidas em chá.

Utilizando frutos imaturos de *C. arabica*, SUZUKI e WALLER (1980a, b) também separaram substâncias que foram marcadas com ^{14}C , que foram consideradas contaminantes, isto é, substâncias que teriam captado o ^{14}C resultante da total degradação de ^{14}C -cafeína e que não estariam relacionadas com o metabolismo do alcalóide.

Nestes quatro trabalhos citados acima, a separação das substâncias foi feita empregando-se cromatografia de papel e solventes polares. As substâncias desconhecidas mostraram baixos R_f 's em todos os casos, indicando sua polaridade. No entanto, acreditamos ser pouco provável que tais substâncias sejam as mesmas do que as aqui detectadas, pelo fato de que nos trabalhos acima citados o isótopo radioativo era ^{14}C .

Quando SUZUKI e WALLER (1984a,b) forneceram ^{14}C -cafeína a frutos imaturos de *C. arabica*, afirmaram ter observado tanto a formação de 3-metilxantina como de 7-metilxantina, apresentando, porém, os resultados de radioatividade conjuntamente. Quando forneceram ^{14}C -teofilina

observaram somente a formação de 3-metilxantina. Infelizmente, tais autores não apresentaram o esquema das cromatografias e os Rf's dessas substâncias, impossibilitando a discussão dos resultados referentes à substância X3.

Pela tabela 4 pode-se notar que os cafeeiros Mundo Novo, Laurina *C. deweyrei* e *C. stenophylla* receberam praticamente a mesma quantidade de cafeína-3H (dpm/g matéria seca), e Kouillou, *C. salvatrix* e *E. bengalensis* o dobro dessa, e *C. eugenioides* aproximadamente dez vezes mais. Observando-se também a porcentagem de radioatividade recuperada das testemunhas de extração (adicionou-se uma quantidade conhecida de cafeína-3H a uma certa quantidade de uma amostra não incubada do cultivar Mundo Novo e procedeu-se a extração como para as amostras de frutos que foram incubados com cafeína-3H) pode-se afirmar que *E. bengalensis* e *C. salvatrix* metabolizaram cafeína-3H mais intensamente do que os outros cafeeiros. Em seguida, em ordem decrescente, estariam *C. stenophylla*, *C. deweyrei* cv. Excelsa, o cultivar Kouillou de *C. canephora* e os cultivares Mundo Novo e Laurina de *C. arabica*. *C. eugenioides* parece ter sido o cafeeiro que mais metabolizou cafeína-3H, pois foi o que recebeu a maior quantidade de radioatividade, recuperando-se apenas 15% dela.

As considerações acima se baseiam no total de radioatividade recuperada, não levando em conta a distribuição da mesma entre as cinco possíveis substâncias, incluindo cafeína, que poderiam ser marcadas com o trítio. Quando analisada a porcentagem de cafeína-3H no total da radioatividade recuperada, observa-se que o cultivar de *C. deweyrei* foi a espécie que mais metabolizou cafeína em si, sendo que a maior

parte da radioatividade recuperada se concentrava em teobromina e na substância X3. *C. eugeninoides*, *C. stenophylla* e *C. bengalensis*, que foram incluídas entre as espécies que mais metabolizaram cafeína-3H em função da radioatividade total recuperada, também estão entre as que mais metabolizaram cafeína-3H, apresentando, relativamente às outras espécies, quantidades apreciáveis de teobromina, teofilina e a substância X3. Nos cafeeiros Laurina, Mundo Novo, Kouillou e *C. salvatrix*, praticamente só foi observada cafeína-3H, sendo que somente o primeiro e o terceiro cafeeiros apresentaram alguma radioatividade em outras substâncias.

Considerando-se que SUZUKI e WALLER (1984a,b) haviam demonstrado que, em frutos imaturos de *C. arabica* era lenta a passagem de cafeína à dimetilxantinas, podendo ser este um passo limitante, e que havia rápida degradação a partir de teofilina e xantina, observamos que tais conclusões foram, pelo menos em parte, confirmadas pelos resultados obtidos com Mundo Novo, Laurina, Kouillou e *C. salvatrix*.

Em relação ao cultivar Laurina, que possui em suas sementes meta-de do teor de cafeína do que o outro cultivar estudado de *C. arabica*, não foi notada nenhuma diferença quanto às taxas de degradação de cafeína-3H. Para os dois cafeeiros, a quantidade de cafeína-3H fornecida foi semelhante, assim como também o foi a porcentagem de cafeína recuperada. Com isto, pode-se concluir que, muito provavelmente, a razão do menor teor de cafeína no Laurina é devido aos passos metabólicos relacionados com a síntese do alcalóide, fato que ainda pode ser fundamentado nos resultados obtidos com a infiltração de frutos imaturos dessa variedade com S-adenosilmetionina (tabela 2) e com teobromina

(tabela 3), onde o aumento do teor de cafeína praticamente não ocorreu.

Por outro lado, esta afirmativa não seria válida para *C. eugeninoides*, *C. stenophylla* e *E. bengalensis*, pois neles foi observada a presença de teofilina. Mais importante ainda foi o fato de que nesses três cafeeiros, o teor de teobromina foi sempre maior do que de teofilina e, relacionado a isto, ocorreu o aparecimento da substância X3. Supondo que também para estes cafeeiros seja válido o esquema 1, poderíamos dizer que, a degradação de cafeína não precisaria ser necessariamente via teobromina. A degradação do alcalóide poderia ocorrer "naturalmente" via teofilina, que ainda se degradaria com maior taxa para 3-metilxantina e depois à xantina e que teobromina teria baixa taxa de conversão para essa monometilxantina, acumulando-se e sendo fonte constante para a formação da mesma, o que justificaria sua detecção.

Quanto à *C. deweyana*, a taxa de transformação de teofilina seria mais intensa do que nos cafeeiros *C. eugeninoides*, *C. stenophylla* e *E. bengalensis*. Outra prova da alta taxa metabólica desse cafeeiro é que as substâncias X1 e X2, desde que consideradas contaminantes, apresentaram alto conteúdo de radioatividade. Esta alta taxa metabólica explicaria o porque de frutos imaturos dessa espécie terem apresentado maior teor de cafeína do que frutos maduros (tabela 1), dando maior consistência à hipótese de que, em frutos nesse estágio de desenvolvimento, a taxa de degradação da cafeína seria proporcionalmente maior do que a de síntese.

O resultado de radioatividade recuperada como teobromina em *C. deweyrei*, *C. stenophylla* e *C. salvatrix* confirmam os teores observados em análises anteriores da substância não marcada (tabelas 2 e 3). Entretanto, *C. bengalensis* representa uma exceção.

6. Incubação de Frutos Imaturos com Cafeína Tritiada e Alopurinol e com Cafeína Tritiada e Teofilina.

O objetivo dos experimentos de infiltrações de cafeína-³H com alopurinol ou com teofilina foi estudar melhor o processo de degradação de cafeína nos cafeeiros que anteriormente apresentaram radioatividade em teobromina. Não foi incluída a espécie *C. bengalensis* devido à falta de sementes em número suficiente.

A tabela 5 apresenta os resultados obtidos nestes experimentos, onde pode-se notar que os dados referentes às incubações somente cafeína-³H, que foram realizadas como controles, são concordantes com aqueles do experimento anterior (tabela 4). Outro fato é que, em relação a radioatividade recuperada, os controles parecem ter seguido o mesmo padrão que aquele do experimento anterior, apesar das pequenas variações encontradas entre as diferentes amostras.

Quando frutos imaturos desses cafeeiros foram incubados com alopurinol e cafeína-³H foi detectada radioatividade em xantina, que apesar de baixa, demonstrou que tal substância bloqueia a transformação de xantina à ácido úrico, como haviam demonstrado MAZZAFERA (1989), para plântulas de café, e FUJIHARA e YAMAGUCHI (1978), para plântulas de soja. Provavelmente, a razão para a baixa radioatividade encontrada

Tabela 5 - Recuperação e distribuição de radioatividade entre substâncias do metabolismo de cafeína, em frutos imaturos incubados com cafeína tritiada e teofilina, e com cafeína tritiada e alopurinol.

	radioatividade ⁽¹⁾		distribuição da radioatividade recuperada (%)					
	fornecida (Mdpm/g m.s.)	recuperada (%)	cafeína	teobromina	teofilina	xantina	X1/X2	X3
<u>C. dewevrei</u> ^(2,3)								
Alo + Cf3H	26,95	5,23	6,37	72,55	1,95	3,19	0,90	15,02
Cf3H	26,79	3,58	--	48,86	--	--	41,12	10,00
Tf + Cf3H	28,97	11,76	21,41	23,33	17,42	0,89	31,93	5,01
<u>C. salvatrix</u>								
Alo + Cf3H	44,63	11,54	98,36	0,83	--	0,81	--	--
Cf3H	37,50	4,03	96,49	3,51	--	--	--	--
Tf + Cf3H	35,71	4,95	100,00	--	--	--	--	--
<u>C. stenophylla</u>								
Alo + Cf3H	12,53	5,47	53,16	21,19	6,42	4,74	--	14,49
Cf3H	10,94	1,31	15,88	13,51	--	--	57,70	13,02
Tf + Cf3H	12,09	25,84	94,51	2,98	2,50	--	--	--
Test. extração	0,47	31,06	100,00	--	--	--	--	--

(1) - Eluatos foram coletados a cada minuto e, após adição de líquido de cintilação, avaliada a radioatividade em cintilômetro. Condições cromatográficas: coluna ODS Hypersil 5µM 150x4,6, fase móvel: solvente A - tampão acetato de sódio 50µM pH5, solvente B - metanol, gradiente 0 - 40%B em 25 minutos, fluxo 1ml/min.

(2) - As quantidades de alopurinol e teofilina (µg/g peso seco) fornecidas à C. dewevrei, C. salvatrix e C. stenophylla foram, respectivamente, 176 e 724, 276 e 813, 116 e 330.

(3) - Alo = alopurinol; Cf3H = cafeína tritiada no carbono 3; Tf = teofilina.

em xantina é o fato de que a transformação da mesma para ácido úrico ocorre com alta intensidade, através da ação da enzima xantina oxidase (SUZUKI & WALLER, 1984b).

Ainda pela tabela 5 pode-se observar a detecção de maior radioatividade em cafeína, teobromina, teofilina e X3 nas espécies *C. deweyrei* cv. Excelsa e *C. stenophylla*. Por outro lado, houve diminuição das substâncias X1 e X2 em *C. deweyrei* e o desaparecimento em *C. stenophylla*, indicando que as mesmas estariam envolvidas em reações posteriores à produção de xantina e dando apoio a hipótese de que são contaminantes.

Segundo o esquema 1, que foi baseado principalmente nos trabalhos de SUZUKI e WALLER (1984a,b), a passagem de teobromina a 3 e/ou 7-metilxantina ainda não foi comprovada. Na suposição de que isto realmente venha a ocorrer, o aumento em teofilina e teobromina causado por alopurinol poderia ter levado ao aparecimento de uma outra "substância desconhecida", que não X3. Entretanto, o que houve foi o aumento dessa substância, que por este fato e por suas características em relação à polaridade e tempo de eluição, permite afirmar que a mesma seria uma monometilxantina.

A prova da ocorrência ou não de degradação de teobromina por 7-metilxantina poderia ser conseguida através do emprego de furafilina e idrocilamida, derivados de xantina que inibem a desmetilação do carbono 3 de cafeína em ratos, impedindo a formação de paraxantina (1,7-dimetilxantina) (SEGURA e TARRUS, 1984; TARRUS et al., 1987a,b). Caso tais substâncias fossem ativas em vegetais, elas impediriam a formação de 7-metilxantina a partir de teobromina.

O tratamento de incubação de frutos verdes com teofilina e cafeína-3H teve por finalidade auxiliar na compreensão dos dados anteriores. Supondo-se que um excesso de teofilina pudesse causar a inibição da transformação da cafeína, haveria um desvio metabólico por teobromina e, a partir desta, a formação de 3 e/ou 7 metilxantina.

O que se observou foi que, para *C. deweyrei* e *C. stenophylla* houve inibição da desmetilação da cafeína em dimetilxantinas, fato este observado pelo grande acúmulo de cafeína, principalmente na segunda espécie citada. A única explicação para a marcação de teofilina, principalmente em *C. deweyrei*, é que esta substância quando fornecida aos frutos imaturos pudesse afetar não só sua taxa de síntese a partir de cafeína como também a de teobromina. Assim, haveria ainda maior acúmulo de cafeína. Desta forma, a enzima que catalisasse as duas desmetilações poderia ser a mesma, porém, mais efetiva na remoção do grupamento metil do carbono 7 de cafeína.

Ainda em relação a *C. deweyrei* e *C. stenophylla*, os dados referentes ao acúmulo de teofilina associados àqueles obtidos com a incubação com alopurinol e cafeína-3H, confirmam a hipótese de que nessas espécies a degradação de cafeína por teofilina é maior do que por teobromina, que acumulou grande quantidade de radioatividade.

Quanto à substância X3, os dados com a incubação com teofilina vêm confirmar, mais uma vez, que se trata de uma monometilxantina e que, muito provavelmente, esta seria 7-metilxantina. O fornecimento de teofilina aos frutos imaturos de *C. deweyrei* e *C. stenophylla* ao mesmo tempo que levou ao acúmulo de cafeína, também ocasionou a redução no teor de X3 na primeira espécie e desaparecimento na segunda. Em *C.*

deweyrei ainda houve diminuição de xantina e de X1 e X2.

Para C. salvatrix as evidências que levaram às conclusões acima não foram tão fortes. No experimento com alopurinol foi observado um pequeno aumento no teor de cafeína, assim como foi possível observar radioatividade em xantina. Entretanto, não é compreensível a redução de radioatividade em teobromina em relação ao controle, enquanto que a mesma aumentou significativamente nas outras duas espécies. Parece pouco provável que não tenha havido efeito de alopurinol, pois este cafeeiro foi o que recebeu a maior quantidade do inibidor.

Quanto ao experimento com teofilina, pouco pode ser comentado, porém, comparando-se os controles de C. deweyrei e C. stenophylla com o de C. salvatrix pode-se notar nessa última espécie que o teor de teobromina é menor, mas é maior o de cafeína. Provavelmente, este fato indicaria que C. salvatrix transforma pouco cafeína em teobromina, e que a taxa de degradação de cafeína se daria preferencialmente através de teofilina.

Por outro lado, a maior evidência do intenso metabolismo de cafeína em C. salvatrix seria que esta espécie foi a que recebeu as maiores quantidades de cafeína-3H, teofilina e alopurinol.

V. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos permitem concluir que o controle do nível de cafeína nas diferentes espécies estudadas parece ser função da proporção entre a taxa de síntese e a de degradação. Assim, em *C. deweyrei* cv. Excelsa e *C. stenophylla* o nível do alcalóide seria determinado por uma alta taxa de degradação. Para os outros cafeeiros ocorreria o inverso.

Para todos os cafeeiros estudados a degradação ocorre preferencialmente via teofilina mas, para alguns casos parece ocorrer um "desvio" por teobromina, cuja degradação seria lenta em relação àquela por teofilina. Isto foi observado principalmente em *C. deweyrei* cv. Excelsa e *C. stenophylla*, que foram cafeeiros que mostraram controle diferente dos demais com relação ao nível de cafeína no endosperma.

Os resultados também indicaram que, com a maturação dos frutos, aqueles cafeeiros com maior teor de cafeína em frutos imaturos teriam diminuída a taxa de síntese e, conseqüentemente, reduzido o nível do alcalóide no endosperma. Para aqueles em que o teor de cafeína foi menor em frutos imaturos, o amadurecimento levaria à uma redução na taxa de degradação, havendo acúmulo do alcalóide.

Os ensaios com incubação de teobromina e S-adenosilmetionina indicaram que a síntese de cafeína não sofreria restrição desses substratos em todos os cafeeiros estudados, mostrando que diferenças quanto ao teor desse alcalóide nas sementes, como por exemplo dos cultivares Laurina e Mundo Novo de *C. arabica*, podem ser devidas a variações nas modulações enzimáticas. Esta conclusão baseia-se no fato de que,

quando frutos imaturos desses cafeeiros foram incubados com teobromina e S-adenosilmetionina, os aumentos nos teores de cafeína foram proporcionais aos teores observados para os respectivos tratamentos controle.

No ensaio em que se forneceu teofilina e cafeína tritiada a frutos imaturos de *C. deweyrei*, *C. stenophylla* e *C. salvatrix*, os resultados indicaram que, pelo menos para os dois primeiros cafeeiros citados, as enzimas responsáveis pela desmetilação de cafeína à teobromina e a teofilina poderiam ser consideradas como uma só, pois as duas vias foram afetadas pelo excesso de teofilina. Caso esta hipótese seja verdadeira, a desmetilação de cafeína ocorreria preferencialmente pelo carbono 7.

VI. RESUMO

No presente trabalho estudou-se o metabolismo da cafeína em folhas e, principalmente, no endosperma de sementes de frutos imaturos de vários cafeeiros, de diferentes cultivares pertencentes a diferentes espécies de café.

De um total de 23 cafeeiros e de quatro espécies de gêneros afins (Paracoffea e Pailanthus), que tiveram o teor de cafeína determinado em suas folhas e no endosperma de frutos maduros, foram escolhidos alguns para a continuidade dos estudos. Selecionados tais cafeeiros, determinou-se cafeína no endosperma de sementes de frutos imaturos e frutos neste estágio de desenvolvimento foram incubados com S-adenosilmetionina, teobromina, cafeína tritiada no carbono 8 (cafeína³H), cafeína³H e teofilina, e cafeína³H e alopurinol, um inibidor de xantina oxidase, que catalisa a degradação de xantina à ácido úrico.

As análises para a determinação de cafeína foram realizadas ou por método espectrofotométrico ou por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), e as análises dos metabólitos de cafeína foram realizadas por CLAE.

Os resultados do presente trabalho foram os seguintes:

Para as espécies inicialmente estudadas, o teor de cafeína no endosperma de frutos maduros e em folhas variou bastante, sendo possível a formação de 16 classes de cafeeiros, se considerados quatro níveis de cafeína tanto em folhas como no endosperma de frutos maduros. Não foi observada relação alguma entre o teor de cafeína nas folhas e nos endospermas de sementes de frutos.

Análises do conteúdo de cafeína realizadas por CLAE nos endospermas de sementes de frutos imaturos e maduros e em folhas das espécies *C. arabica* cv. Mundo Novo e cv. Laurina, *C. canephora* cv. Kouillou, *C. eugenoides*, *C. deweyrei*, cv. Excelsa, *C. salvatrix*, *C. stenophylla*, *C. racemosa*, *E. bengalensis* e *E. travancorensis*, indicaram valores semelhantes, porém sempre inferiores àqueles obtidos por CLAE. Tal dado confirma a interferência de teobromina e teofilina neste último método, por apresentarem espectro de absorção em luz ultravioleta semelhante ao de cafeína.

Com exceção de *C. deweyrei* cv. Excelsa e *C. salvatrix*, todos os outros cafeeiros citados acima apresentaram maior teor em cafeína no endosperma de frutos imaturos do que no de maduros. Isto seria indicativo de que a atividade metabólica da via da cafeína seria alta em frutos neste estágio de desenvolvimento. Quanto às duas outras espécies citadas, o menor teor do alcalóide em frutos imaturos indicaria que a via de degradação teria taxa superior àquela de síntese.

Por CLAE, detectou-se teacrina em concentrações bastante baixas nos endospermas de sementes de frutos imaturos e em folhas de *C. deweyrei* cv. Excelsa e *C. stenophylla*, e nos endospermas de sementes de frutos imaturos de *C. racemosa*.

A incubação de frutos imaturos com S-adenosilmetionina levou ao aumento de cafeína em *C. arabica* cv. Mundo Novo, *C. canephora* cv. Kouillou e *C. eugenoides*, redução em *C. stenophylla* e *C. salvatrix*, e manutenção do mesmo nível em *C. deweyrei* cv. Excelsa, *E. bengalensis* e no cultivar Laurina de *C. arabica*. O conteúdo de S-adenosilmetionina aumentou nos cultivares de *C. arabica*, *C. canephora* cv. Kouillou, *C.*

eugeníoides e reduziu nos outros. Por outro lado, o teor de teobromina aumentou em C. deweyrei cv. Excelsa e C. salvatrix. Concluiu-se que S-adenosilmetionina não seria limitante à síntese de cafeína e que as variações de respostas entre os cafeeiros estudados provavelmente seriam devido à variações das taxas metabólicas de síntese e de degradação do alcalóide.

Quando frutos imaturos foram incubados com teobromina houve aumento de cafeína, em diferentes intensidades, nos endospermas de sementes de frutos imaturos de C. arabica cv. Mundo Novo, C. canephora cv. Kouillou, C. deweyrei cv. Excelsa, C. stenophylla e C. salvatrix. Em C. eugeníoides e P. bengalensis, os níveis do alcalóide se mantiveram nos mesmos patamares que os respectivos controles. O teor de teobromina aumentou em C. deweyrei e C. salvatrix, e reduziu em C. stenophylla, assim como o de teofilina. Concluiu-se que em C. deweyrei cv. Excelsa, C. stenophylla e C. salvatrix a taxa de degradação de cafeína seria mais intensa do que a de síntese. O controle de cafeína nos outros cafeeiros seria dependente de modulação enzimática da síntese da cafeína.

As hipóteses levantadas com os experimentos de incubação com teobromina e S-adenosilmetionina foram confirmadas por experimentos em que frutos imaturos de C. arabica cv. Mundo Novo e cv. Laurina, C. canephora cv. Kouillou, C. eugeníoides, C. deweyrei, cv. Excelsa, C. salvatrix, C. stenophylla e P. bengalensis foram incubadas com cafeína marcada com trítio no carbono 8 (cafeína³H). Os resultados mostraram que C. deweyrei, C. stenophylla, C. eugeníoides e P. bengalensis metabolizavam cafeína muito mais rapidamente do que os outros cafeeiros, e

que grande parte do alcalóide era transformada em teobromina. Entretanto, a pouca marcação de teofilina com trítio indicou que tais cafeeiros ainda degradariam cafeína principalmente via essa substância.

Nos cafeeiros Laurinas e Mundo Novo de *C. arabica*, Kouillou de *C. canephora* e *C. salvatrix* quase não foi detectada teobromina marcada, indicando que se a degradação também ocorre por esta via, ela seria tão rápida quanto a de teofilina, para a qual também não foi detectada nenhuma radioatividade.

Em outros experimentos conduzidos somente com as espécies *C. demareei*, *C. stenophylla* e *C. salvatrix*, frutos imaturos foram incubados com cafeína-³H e teofilina e com cafeína-³H e alopurinol. Observou-se que a degradação de cafeína em *C. demareei* ocorria em grande intensidade, confirmando de que o menor teor em frutos imaturos seria devido a uma alta taxa de degradação. Com a maturação isto se deixaria de ocorrer, havendo acúmulo de cafeína. Tal degradação ocorreria principalmente via teofilina, porém, havendo um "desvio" por teobromina, conclusão oriunda do grande acúmulo de radioatividade nesta dimetilxantina. Uma substância (X3), que não foi identificada por falta de padrões específicos, mas que muito provavelmente seria 3-metilxantina, também acumulou radioatividade quando empregou-se alopurinol.

Quando frutos imaturos desses mesmos cafeeiros foram incubados com cafeína-³H e teofilina, observou-se que o excesso dessa substância afetava a degradação de cafeína via teobromina. Isto indicaria que, muito provavelmente, a desmetilação de cafeína à teobromina e à teofilina poderia ser feita por uma mesma enzima mas, que teria diferente eficiência para o carbono a ser desmetilado. Nesse caso a desmetilação

preferencial ocorreria no carbono 7.

Desta forma, como conclusão final, pode-se afirmar que em *C. arara* cv. Mundo Novo e cv. Laurina, *C. canephora*, *C. eugeniolides*, *C. racemosa*, *P. travancorensis* e *P. bengalensis*, o teor de cafeína é controlado pela maior taxa de síntese em relação à de degradação. Nas espécies *C. demareei* e *C. salvatrix* a taxa de degradação seria maior.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Anderson, L.E. e Gibbs, M. The biosynthesis of caffeine in the coffee plant. J. Biol. Chem. 237:1941-1944, 1962.
- Baumann, T.W. e Wanner, H. Untersuchungen iiber den transport von kaffein in der Kaffeepflanze (Coffea arabica). Planta (Berl.) 108:11-19, 1972.
- Baumann, T.W., Looser, E.D. e Wanner, H. 7-methylxantosine - An intermediate in caffeine biosynthesis. Phytochemistry 17(12):2075-2076, 1978.
- Bernegg, S. von. Plantas tropicais e subtropicais da economia mundial. O café. Edição do Departamento Nacional do Café. pp 255-273, 1938.
- Berthaud, J. Caractéristiques comparées des hybrides interspécifiques tétraploids et hexaploids Coffea arabica L. x C. canephora Pierre. 8^e ASIC Colloquium on Coffee pp393-397, 1977.
- Berthaud, J. e Berthou, F. Analyse de la variabilité des populations naturelles des caféiers diploides (Coffea spp). Observations sur le teneur en caféine et sur le polymorphisme enzymatique. 8^e ASIC Colloquium on Coffee pp385-391, 1977.
- Café sin cafeína. Turrialba 19(2):155, 1979.
- Cantoni, G.L. Biological Methylation: Selected aspects. Ann. Rev. Biochem 44:435-451, 1975.
- Capot, J. L'Amélioration du caféier en Côté d'Ivoire. Les hybrides "Arabusta". Café Cacao Thé 16(1):3-17, 1972a.
- Capot, J. L'Amélioration du caféier Robusta en Côté d'Ivoire. Café Cacao Thé 21(4):233-242, 1972b.

- Carvalho, A., Tango, J.S. e Monaco, L.C. Genetic control of the caffeine content of Coffee Nature 205:314, 1965.
- Carvalho, A., Sondahl, M.R. e Sloman, C. Teor de cafeína em seleções de café. In 10º Congresso Brasileiro de Pesquisas Cafeeiras, resumos, pp 111-113, 1983.
- Carvalho, A., Fazuoli, L.C. e Mazzafera, P. Melhoramento do cafeeiro. XLII. Produtividade de progênies derivadas de hibridação dos cultivares Laurina e Mundo Novo. Bragantia 47(2):213-222, 1987.
- Castilho, Z.J. e Parra, H.J. Exploracion en el contenido de cafeína, grasas y solidos solubles en 113 "introducciones" de cafe. Cenicafé 24(1): 3-22, 1973.
- Charrier, A. Contribution a l'étude genetique des Mascarocoffea. 7º ASIC Colloquium on Coffee pp 483-495, 1975.
- Charrier, A. The genetic structure of wild coffee trees in the Madagascar region (Mascarocoffea). Their relationships with African Coffee trees (Eucoffea). Thèse de Doctorat d'état, Université Paris-Sud-Orsay (France), 1976.
- Charrier, A. L'obtention et les caractéristiques des hybrides F_1 entre les Mascarocoffea et les Eucoffea. In La structure génétique des caféiers de la région Malgache (Mascarocoffea). Leurs relations avec les caféiers d'origine africaine (Eucoffea). Mémoires ORSTOM nº 87 pp 141-161, 1978.
- Charrier, A. e Berthaud, J. Variation de la teneur en caféine dans le genre Coffea. Café Cacao Thé 19(4): 251-264, 1975.

- Charrier, A. e Berthaud, J. Botanical classification of coffee. In M.N. Clifford and K.C. Wilson (eds), *Coffee: Botany, biochemistry and production of beans and beverage* Avi Publishing Company, Inc, Westport, Connecticut, pp 13-471, 1975.
- Chevalier, A. Les caféiers du globe. III. Systématique des caféiers et faux caféiers. Maladies et insectes nuisibles. In *Encyclopedie Biologique* 28, Fascicule III, P. Lechevalier (Ed), Paris.
- Citroreksoko, P.S., Petermann, J. Wanner, H. e Baumann, T.W. Detection of trace amounts of methylated uric acids in crude caffeine from different sources. 89 ASIC Colloquium on Coffee pp 143-145, 1977.
- Decaffeination process: No risk involved in use of MeCl_2 . *Tea Coffee Trade J.* 155(1):50-51, 1987.
- Duarte, C. Sur les teneurs en eau et en caféine des cafés de îles de S. Tomé et du Prince. *Anais Inst. Sup. Agron. (Lisboa)* 4: 1-10, 1930.
- Extensive NCA studies show methylene chloride is safe decaf coffee. *World Coffee and tea* 23(9): 58-59, 1983.
- Fobé, L.A. e Carvalho, A. Caffeine content in the different parts of coffee trus in correlation with genetic characteristics. First Session Technical Working Party on Coffee Production and Protection, Brazil, Mimeog., 1965.
- Fujihara, S. e Yamaguchi, M. Effects of allopurinol [4-hydroxypyrazolo (3,4-d)Pyrimidine] on the metabolism of allantoin in soybean plants. *Plant Physiol.* 62:134-138, 1978.

- Grippo, P.; Iaccarino, M; Rossi, M. e Scarano, E. Thin-layer chromatography of nucleotides, nucleosides and nucleic acid bases. *Biochim. Biophys. Acta* 95:1-7, 1965.
- Hagborg, W.A.F. A device for injecting solutions and suspensions into thin leaves of plants. *Can. J. Bot.* 48:1135-1136, 1970.
- Herndlhofer, E. A distribuição das proteínas, da cafeína dos mono-amino-ácidos e dos di-amino-ácidos no cafeeiro e as variações da porcentagem destas substâncias no percurso de um anno. *Boletim de Agricultura-Secretaria da Agricultura, Indústria e Comércio do Estado de São Paulo*: 34ª Série, número único. 163-251, 1933.
- Kalberer, P. Breakdown of caffeine in the leaves of Coffea arabica L.. *Nature* 205:597-598, 1965.
- Kapeller, A.W. e Baumann, T.W. Purine alkaloid pattern in coffee beans. 119 ASIC Colloquium on Coffee, pp 273-279, 1985.
- Katz, S.N. Decaffeination of coffee. 99 ASIC Colloquium on Coffee pp 295-302, 1980.
- Katz, S.N. Decaffeination of coffee. In *Coffee Vol 2: Technology*, R.J. Clarke & R. Macrae (Eds), Elsevier Applied Science, London, New York, pp 59-71, 1985.
- Kazi, T. Determination of caffeine and other purine alkaloids in coffee and tea products by high performance liquid chromatography. 119 ASIC Colloquium on Coffee, pp 227-244, 1985.
- Keller, H.; Wanner, H. e Baumann, T.W. Kaffeinsynthese in Fruchten und gewegekulturen von Coffea arabica. *Planta* 108:339-350, 1972.

- King, C.J. The utility of chemical engineering principles in coffee processing technology. 9^o ASIC Colloquium on Coffee. pp 237-250, 1980.
- Konishi, S.; Ozasa, M. e Takahashi, E. Metabolic conversion of N-methyl carbon of γ -glutamylmethanamide to caffeine in tea plants. Plant Cell Physiol. 13:365-375, 1972a.
- Konishi, S., Inoue, T. e Takahashi, E. Localization of the carbon in caffeine biosynthesized from N-methyl carbon γ -glutamylmethanamide in tea plants. Plant Cell Physiol. 13: 695-702, 1972b.
- Krug, C.A., Mendes, J.E.T. e Carvalho, A. Taxonomia de Coffea arabica L.. Descrição de Variedades e formas encontradas no Estado de São Paulo. Instituto Agronômico de Campinas, Boletim Técnico n^o 62, 1939.
- Le Prieres, D. Influence des facteurs génétiques sur le contrôle de la teneur en caféine du café. 12^o ASIC Colloquium on Coffee, pp 468-475, 1987.
- Leblond, E. Etude physiologique et thérapeutique de la caféine. O. Doin (ed) Paris, 173pp, 1983.
- Leon, L. e Fournier, L. Crecimiento y desarrollo del fruto de Coffea arabica L. Turrialba 12:65-74, 1962.
- Leroy, J.F. Evolution et taxogenèse chez les caféiers (Coffea L., Esilanthus Hook. f. et Nostolachma Durand). Hypothèse sur leur origine. C.R. Acad. Sc. Paris t.291, série D, 593-596, 1980.
- Looser, E.; Baumann, T.W. e Wanner, H. The biosynthesis of caffeine in the coffee plant. Phytochemistry 13:2515-2518, 1974.

- Lopes, M.H. Teor de cafeína em cafés espontâneos de Moçambique. 5^o ASIC Colloquium on Coffee, pp 63-69, 1971.
- Louarn, J. Introduction à l'étude génétique des Mascarocoffea: Nouvelles determinations de leurs nombres chromossomiques. Café Cacao thé 16(4): 312-316, 1972.
- Mazzafera, P. Estudo sobre o papel da cafeína em plântulas de café (Coffea arabica L.). Rev. Bras. Bot. (no prelo)
- Mazzafera, P. e Carvalho, A. A importância de novos estudos sobre a cafeína do café. O Agrônômico (no prelo)
- Mazzafera, P. e Eskes, A.B. Comparação de dois métodos para infiltração de substâncias no mesófilo de cafeeiros. In 14^o Congr. Bras. Pesq. Cafeeiras e 1^o Cong. Latinoamericano de Tecnologia Cafeeira, resumos, pp 113-114, 1987.
- Mazzafera, P. e Oliveira, P.L.C. Determination of caffeine metabolites in coffee fruits by HPLC. Trabalho enviado para apresentação no 3^o Congresso Latino-Americano de Cromatografia, a ser realizado em São Pedro (SP) em março de 1990.
- Mazzafera, P.; Carvalho, A.; Fazuoli, L.C. e Levy, F.A. Infecção por Hemileia vastatrix em espécies e variedades de café com diferentes níveis de ploidias e em espécies de gêneros afins. In 14^o Congr. Bras. Pesq. Cafeeiras e 1^o Cong. Latinoamericano de Tecnologia Cafeeira, resumos, pp 99-100, 1987.
- Mendes, A.J.T. Cytological observations in Coffea. VI. Embryo and endosperm development in Coffea arabica L. Am. L. Bot. 28:784-789, 1941.

- Monaco, L.C., Melo, M. e Carvalho, A. Controle genético da síntese de cafeína. Ciênc. Cult. (São Paulo), Suplemento, 27(7): 255, 1975.
- Murray, A.W. The biological significance of purine salvage. Ann. Rev. Biochem. 40:811-826, 1971.
- Novelle attaque contre le chlorure de méthylène. Café Cacao Thé. 30(4): 296, 1986.
- Dechslin, M., Baumann, T.W. e Wanner, H. Die Verteilung von coffein und methylierten harnsauren in den blättern von Coffea liberica 7^o ASIC Colloquium on Coffee pp 221-223, 1975.
- Ogutuga, D.B.A. e Northcote, D.H. Caffeine formation in tea callus tissue. J. Exp. Bot. 21(67258-273, 1970a.
- Ogutuga, D.B.A. e Northcote, D.H. Biosynthesis of caffeine in tea callus tissue. Biochem. J. 117:715-720, 1970b.
- d'Ornano, M., Chassevent, F. e Pougneaud, S. Composition et caractéristiques chimiques de Coffea sauvages de Madagascar. I. Recherches préliminaires sur leur teneur en caféine et isolement de la cafamarine. 2^o ASIC Colloquium on coffee pp 131-144, 1965.
- d'Ornano, M., Chassevent, F. e Pougneaud, S. Composition et caractéristiques chimiques de Coffea sauvages de Madagascar. II Recherche de la caféine et d'autres méthylxanthines dans les feuilles et les graines de caféiers sauvages et cultivés. III. Cafamarine et trigonelline contenues dans les graines de trois caféiers sauvages. Café Cacao Thé 11(3): 235-249, 1967.

- d'Ornano, M., Chassevent, F. e Pougneaud, S. Composition et caracteristiques chimiques de *Coffea* sauvages de Madagascar. V. Caféine et autres méthylxanthines présents dans les feuilles de vingt-quatre caféiers sauvages avant et après greffage sur caféiers cultivés. *Café Cacao Thé* 12(2): 144-156, 1968.
- Paoletti, R. e Cantaluppi, S. New trends in the pharmacology of caffeine. II. 10th ASIC Colloquium on Coffee, pp 319-332, 1982.
- Petermann, J.B. e Baumann, T.W. Metabolic relations between methylxanthines and methyluric acids in *Coffea* L.. *Plant Physiol.* 73: 961-964, 1983.
- Petermann, J.; Baumann, T.W. e Wanner, H. A new tetramethyluric acid from *Coffea liberica* and *C. deweyrei*. *Phytochemistry* 16:620-621, 1977.
- Poulton, J.E. Transmethylation and demethylation reactions in the metabolism of secondary plant products In The biochemistry of plants, vol 7, Secondary plant products, E.E. Conn (Ed), Academic Press, pp 667-723, 1981.
- Poulton, J.E. e Butt, V.S. Purification and properties of S-adenosyl-L-methionine: Caffeic acid O-methyltransferase from leaves of spinach beet (*Beta vulgaris* L.). *Biochem. Biophys. Acta* 403:301-314, 1975.
- Puschmann, R. Características bioquímicas do fruto do cafeeiro (*Coffea arabica* L.) durante a maturação. Tese de Mestrado, Univ. Fed. Viçosa, Viçosa (MG), 1975, pp35.
- Raju, K.I. e Gopal, N.H. Distribution of caffeine in arabica and robusta coffee plants. *J. Coffee Res.* 9(4):83-90, 1979.

- Roberts, M.F. e Waller, G.R. N-Methyl-transferases and 7-methyl- N⁹-nucleoside hydrolase activity in Coffea arabica and the biosynthesis of caffeine. *Phytochemistry* 18: 451-455, 1979.
- Rostolan, J. de . Composition et caractéristiques chimiques de Coffea sauvages de Madagascar VI. Recherche et dosage de la cafamarine e d'autres substances voisines dans quelques caféiers sauvages ou cultivés. 52 ASIC Colloquium on Coffee pp 149-153, 1971.
- Rostolan, J. de e Poisson, J. Structure partielle de la cafamarine. 49 ASIC Colloquium on Coffee, 1969.
- Schlenk, F e De Palma, R.E. The preparation of S-Adenosylmethionine. *J. Biol. Chem.* 229:1051-1057, 1957.
- Segura, J. e Tarrus, E. Severe inhibition of caffeine metabolism by xanthine derivatives. In *Proceedings 2nd European Congress Biopharmaceutics Pharmacokinetics*, pp520-528, 1984.
- Senanayake, U.M. e Wijesekera, R.O.B. A rapid micro-method for the separation, identification and estimation of the purine bases: Caffeine, theobromine and theophylline. *J. Chromat.* 32:75-86, 1968.
- Shapiro, S.K e Ehninger, D.J. Methods for the analysis and preparation of adenosylmethionine and adenosylhomocysteine. *Anal. Biochem.* 15:323-333, 1966.
- Sivetz, M. Coffee processing technology. Vol 2 Westport, Connecticut, AVI Publishing Company pp 379, 1963.
- Sivetz, M. Coffee and its influence on consumers. Physiological effects of coffee and caffeine. In M. Sivetz and N.W. Desrosier (eds) *Coffee Technology*, AVI Publishing Company, Inc., Westport, Connecticut, pp 575-621, 1979.

- Six to eight companies planning construction of decaffeinating plants. World Coffee and Tea 24(11):26-27, 1984.
- Suzuki, T. Metabolism of methylamine in the tea plant (Itea sinensis L.). Biochem. J. 132:753-763, 1973.
- Suzuki, T. e Takahashi, E. Metabolism of xanthine and hypoxanthine in the tea plant. Biochem. J. 146:79-85, 1975a.
- Suzuki, T. e Takahashi, E. Biosynthesis of caffeine by tea-leaf extracts. Enzymic formation of theobromine from 7-methylxanthine and of caffeine from theobromine. Biochem. J. 146:87-96, 1975b.
- Suzuki, T. e Takahashi, E. Caffeine biosynthesis in Camellia sinensis. Phytochemistry 15:1235-1239.
- Suzuki, T. e Takahashi, E. Metabolism of methionine and biosynthesis of caffeine in the tea plant (Camellia sinensis L.). Biochem. J. 160:171-179, 1976b.
- Suzuki, T. e Takahashi, E. Further investigation of the biosynthesis of caffeine in tea plants (Camellia sinensis L.). Methylation of transfer ribonucleic acid by tea leaf extracts. Biochem. J. 160:181-184, 1976c.
- Suzuki, T. e Waller, G.R. Biosynthesis and biodegradation of caffeine, theobromine, and theophylline in Coffea arabica L. fruits. J. Agric. Food Chem. 32: 845-848, 1984a.
- Suzuki, T. e Waller, G.R. Biodegradation of caffeine: Formation of theophylline and theobromine from caffeine in mature Coffea arabica fruits. J. Sci. Food Agric. 35: 66-70, 1984b.
- Sylvain, P.G. El problema del contenido de cafeina en el cafe. Café (Peru) 8(3): 2-11, 1967.

- Tabak, S.; De-1-Acqua, A.; Ribeiro, M.L. e Dias, L.P. Xantinas metiladas do café. I. Teofilina. Anais Acad.Bras. Ciências 41(1):59-62, 1969.
- Tabor, C.W. e Tabor, H. Methionine adenosyltransferase (S-adenosylmethionine synthetase) and S-adenosylmethionine decarboxylase. Adv. Enzymology 56:251-282.
- Tango, J.S. e Teixeira, G.C. Teor de cafeína em progênies de café. Bol. Super. Serv. Café (São Paulo) 416:6-10, 1961.
- Tarrus, E.; Garcia, I.; Roberts, D.J.; e Segura, J. An animal model for the detection of drug-induced inhibition of caffeine metabolism. Meth. Find. Exptl. Clin. Pharmacol. 9(5):311-316, 1987a.
- Tarrus, E.; Cami, J.; Roberts, D.J.; Spickett, R.G.W.; Calduran, E. e Segura, J. Accumulation of caffeine in health volunteers treated with furafylline. Br. J. Clin. Pharmacol. 23:9-18, 1987b.
- Ulrich, R. Neue aspekte der kaffee-physiologie. 10^o ASIC Colloquium on Coffee pp 293-307, 1982.
- Waller, G.R., Suzuki, T. e Roberts, M.F. Cell-free metabolism of caffeine in Coffea arabica. 9^o ASIC Colloquium on Coffee pp 627-635, 1980.
- Wanner, H.; Fiesaková, M.; Baumann, T.W.; Charubala, R.; Guggisberg, A.; Hesse, M. e Schmid, H. O(2),1,9-trimethyluric acid and 1,3,7,9-tetramethyluric acid in leaves of different Coffea species. Phytochemistry 14:747-750, 1975.
- Wilbaux, R. Recherches sur la préparation du café par voie humide. Publ. INEAC, Serv. Techn. 21: 1-45, 1938.