

LUCIANA BENJAMIM BENATTI

**“Atributos bioquímicos e fisiológicos de AC1, um cafeeiro
naturalmente descafeinado”**

**CAMPINAS
2012**



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

LUCIANA BENJAMIM BENATTI

**Atributos bioquímicos e fisiológicos de AC1, um cafeeiro
naturalmente descafeinado**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
LUCIANA BENJAMIM BENATTI
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Instituto
de Biologia para a obtenção
do Título de Doutora em
Biologia Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Mazzafera

CAMPINAS,
2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
MARA JANAINA DE OLIVEIRA – CRB8/6972
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

B431a Benatti, Luciana Benjamim, 1978-
Atributos bioquímicos e fisiológicos de AC1: um
cafeeiro naturalmente descafeinado / Luciana Benjamim
Benatti. – Campinas, SP: [s.n.], 2012.

Orientador: Paulo Mazzafera.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de
Campinas, Instituto de Biologia.

1. *Coffea arabica*. 2. Cafeína. 3. Café
descafeinado. 4. Bebida café - Análise. I. Mazzafera,
Paulo, 1961-. II. Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em Inglês: Biochemical and physiological attributes of AC1: a naturally decaffeinated coffee

Palavras-chave em Inglês:

Coffea Arabica

Caffeine

Decaffeinated coffee

Beverage coffee - Analysis

Área de concentração: Biologia Vegetal

Titulação: Doutora em Biologia Vegetal

Banca examinadora:

Paulo Mazzafera [Orientador]

José Laércio Favarin

Claudia Regina Baptista Haddad

Emerson Alves da Silva

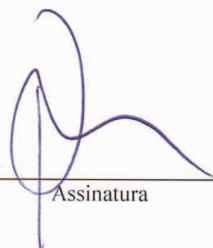
Sara Adrián López Andrade

Data da defesa: 29-11-2012

Programa de Pós Graduação: Biologia Vegetal

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Paulo Mazzafera (Orientador)

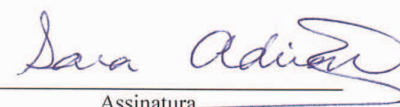


Assinatura

Profª. Dra. Marlene Aparecida Schiavinato


Assinatura

Dra. Sara Adrián López de Andrade




Assinatura

Prof. Dr. José Laércio Favarin



Assinatura

Dr. Emerson Alves da Silva



Assinatura

Profª. Dra. Cláudia Regina Baptista Haddad



Assinatura

Dra. Alexandra Christine Helena Frankland Sawaya

Assinatura

Dra. Marília Gaspar

Assinatura

Dedico este trabalho aos meus pais Cleonice Benjamim Benatti e Luiz Carlos Benatti (*in memoriam*), e as minhas filhas Beatriz e Luiza

AGRADECIMENTOS

À Deus pelas bênçãos em minha vida;

Ao meu orientador, Paulo Mazzafera, por compartilhar seu conhecimento e pela paciência durante o doutorado;

As minhas duas filhas, amores da minha vida, Beatriz e Luiza;

À minha mãe, Cleonice, por todo apoio, amor e dedicação, tanto a mim quanto as minhas filhas; ao meu pai Luiz Carlos pelo amor e por ter sempre acreditado em meu potencial e à minha irmã Jacqueline que sempre morará no meu coração;

Ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) pela concessão da bolsa de doutorado;

Ao departamento de Biologia Vegetal da Universidade Estadual de Campinas por todo o suporte necessário para realização da minha tese;

Ao Centro de Café Alcides Carvalho do Instituto Agrônomo de Campinas;

À banca examinadora pela criteriosa leitura da tese;

Aos professores do antigo departamento de Fisiologia Vegetal por toda a atenção durante o meu mestrado e doutorado;

Aos técnicos do antigo departamento de Fisiologia Vegetal, em especial a Dulcinéia, pela ajuda em procedimentos laboratoriais;

À pesquisadora Maria Bernadete Silvarolla, do Centro de Café Alcides Carvalho do Instituto Agrônomo de Campinas, pelo material biológico e a ótima companhia durante as coletas;

À pesquisadora Miriam Maluf, pelos primers utilizados em experimentos de biologia molecular;

À Vanessa e a Jullyana pela ajuda nos experimentos de biologia molecular, ao Thiago nos experimentos de eletroforese e ao Thomaz nos experimentos de atividade antioxidante;

Às minhas duas queridas amigas Nathália Luiza Andreazza e Ilka Nassif Abreu pelos ótimos momentos juntas;

Aos meus queridos amigos do Instituto de Botânica de São Paulo;

À Julia Klaczko, amiga irmã de toda uma vida.

RESUMO

Em 2004, Silvarolla e colaboradores descobriram três plantas (AC1, AC2 e AC3) de *Coffea arabica*, provenientes da Etiópia, com baixa quantidade de cafeína nas sementes. Esta pequena concentração (0,76 mg/g) em AC1, quando comparada com grãos de *C. arabica* com cafeína (em torno de 12 mg/g), foi verificada ser de origem constitutiva da planta, sendo esta denominada como naturalmente descafeinada. Neste trabalho a planta de AC1 foi estudada, já que esta é a mais adequada para a transferência genética do traço “sem cafeína” para cultivares com alta produtividade. Ao analisar o desenvolvimento das sementes de AC1, foi observado que endospermas maduros da planta com baixas quantidades de cafeína perderam menos massa do que os de Mundo Novo (MN) e que estes, no final do desenvolvimento, eram maiores do que os de AC1. Entretanto, apesar deste fato, os conteúdos de aminoácidos, açúcares solúveis, ácidos orgânicos, ácidos clorogênicos e trigonelina foram similares nas sementes de frutos de MN e AC1. Foi constatado que em todos os estádios fenológicos as sementes de AC1 apresentaram baixas quantidades de cafeína. Além disso, foi observado que não só sementes e folhas apresentaram esta característica, mas também flores e internódios. Experimentos com o fornecimento de [2-¹⁴C] adenina e análises enzimáticas de teobromina sintase e cafeína sintase nas sementes de AC1 confirmaram que, assim como em folhas, a síntese de cafeína é bloqueada na metilação de teobromina a cafeína, acumulando altas taxas de teobromina. Experimentos de análise de expressão gênica indicaram que, apesar dos genes responsáveis pela síntese das três metiltransferases envolvidas na síntese de cafeína serem expressos nos endospermas de AC1, suas

expressões são menores se comparadas com o controle MN, principalmente ao analisar a expressão do gene CCS1, que codifica para a cafeína sintase. Os compostos fenólicos apresentaram valores próximos ao longo de todo o desenvolvimento do endosperma, sendo que a quantidade equivalente encontrada nestes grãos parcialmente explica a atividade antioxidante similar encontrada nos grãos maduros de MN e AC1. Análises de proteínas de reserva em endospermas maduros foram similares em MN e AC1.

SUMMARY

In 2004, Silvarolla and co-workers discovered three plants (AC1, AC2 and AC3) of *Coffea arabica*, originated from Ethiopia, with low amount of caffeine in the seeds. This low concentration (0,76 mg/g) was found to be constitutive plant origin, this being referred to as naturally decaffeinated. In this work only the seeds of AC1 were studied, since this plant has shown to be the most suitable for gene transfer trace "without caffeine" for cultivars with high productivity. By analyzing the development of the seed AC1, it was observed that the mature endosperm of the plant with low amounts of caffeine lost less weight than those of MN, and also at the end of development, they were greater than those of AC1. However, despite this fact, the contents of amino acids, organic acids, chlorogenic acids and trigonelline were similar to MN and AC1 seeds and fruits. Soluble sugars were also similar in most part of the development despite the sucrose in the endosperm AC1 cherry stage, having it's significantly less than the one found in the endosperm MN at the stage. It was found that in all growth stages seeds AC1 presented low amounts of caffeine. Furthermore, it was observed that not only seeds and leaves showed this characteristic, but also flowers and internodes. Experiments with the supply of [2-¹⁴C] adenine and enzymatic analyzes of theobromine synthase and caffeine synthase in AC1 seeds confirmed that as leaves, caffeine synthesis are blocked in the methylation of theobromine to caffeine, accumulating high levels of theobromine. Experiments of the gene's expression analysis indicated that, although the genes responsible for the synthesis of the three methyltransferases involved in caffeine synthesis be expressed in AC1 endosperm, presented minor expressions compared to the control MN, especially

when analyzing the expression of the gene CCS1, that synthesizes caffeine synthase. Phenolic compounds had similar values throughout the development of the endosperm, the equivalent amount found in these grains partly explains the similar antioxidant activity found in the MN and AC1 mature grains. The reserve proteins assays of mature endosperms were also similar in both endosperms.

ÍNDICE

RESUMO	VI
SUMMARY	VIII
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. O MERCADO NACIONAL E MUNDIAL DE CAFÉ.....	1
1.2. CICLO FENOLÓGICO E DESENVOLVIMENTO DE FRUTOS DE <i>C. ARABICA</i>	2
1.3. ALCALÓIDES PURÍNICOS E CONTROLE METABÓLICO DA BIOSÍNTESE DE CAFEÍNA.....	3
1.4. PAPEL ECOLÓGICO DOS ALCALÓIDES PURÍNICOS.....	12
1.5. EFEITOS FISIOLÓGICOS E COMPORTAMENTAIS DE CAFEÍNA E TEOBROMINA EM SERES HUMANOS	14
1.6. OCORRÊNCIA DE METILXANTINAS EM PLANTAS.....	17
1.7. ESPÉCIES DO GÊNERO <i>COFFEA</i> COM BAIXAS CONCENTRAÇÕES DE CAFEÍNA.....	18
1.8. PROCESSOS DE DESCAFEINAÇÃO DE GRÃOS	21
1.9. COMPOSTOS RELACIONADOS AO SABOR E AROMA DO CAFÉ	22
1.10. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	27
1.11. O CAFÉ NATURALMENTE DESCAFEINADO.....	28
2. OBJETIVOS.....	30
3. MATERIAIS E MÉTODOS	31
3.1. MATERIAL VEGETAL.....	31
3.2. MASSAS FRESCAS E SECAS DURANTE O DESENVOLVIMENTO DOS FRUTOS.....	33
3.3. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (HPLC).....	34
3.3.1. <i>Extração de endospermas, perispermas, pericarpos, folhas, flores, internódios e raízes</i>	34
3.3.2. <i>Quantificação de compostos</i>	34
3.3.2.1. Metilxantina e trigonelina	34
3.3.2.2. Açúcares (glicose, frutose e sacarose) em endospermas	35
3.3.2.3. Aminoácidos livres em endospermas	36
3.3.2.4. Ácidos clorogênicos em endospermas	37
3.3.2.5. Ácidos orgânicos em endospermas	38
3.4. ANÁLISES COLORIMÉTRICAS.....	38
3.4.1. <i>Quantificação de compostos fenólicos</i>	38
3.4.2. <i>Quantificação de aminoácidos livres totais</i>	39
3.4.3. <i>Atividade antioxidante por 2,2-difenil-picrilidrazil (DPPH)</i>	39
3.5. ANÁLISE DE PROTEÍNAS DE RESERVA POR ELETROFORESE DESNATURANTE	40
3.6. ANÁLISES DE EXPRESSÃO GÊNICA	41
3.6.1. <i>Extração de RNA total e tratamento com DNase</i>	41
3.6.2. <i>Síntese de cDNA</i>	41
3.6.3. <i>Análise qualitativa por RT-PCR</i>	41
3.6.4. <i>Análise semi-quantitativa por RT-PCR</i>	42
3.7. ATIVIDADE DAS ENZIMAS CAFEÍNA SINTASE E TEOBROMINA SINTASE.....	44
3.8. METABOLISMO DE [¹⁴ C]ADENINA E [¹⁴ C]CAFEÍNA EM FOLHAS E FRUTOS	45
3.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	47
4. RESULTADOS.....	48
4.1. ACÚMULO DE MASSAS FRESCAS E SECAS EM FRUTOS.....	48

4.2.	ANÁLISES DE CAFEÍNA E TEOBROMINA	51
4.2.1.	<i>Variação na quantidade de cafeína e teobromina em raízes, internódios e primeiros pares foliares.....</i>	<i>52</i>
4.2.2.	<i>Variação das quantidades de cafeína e teobromina em endospermas.....</i>	<i>55</i>
4.3.	VARIAÇÃO DA QUANTIDADE DE CAFEÍNA EM FOLHAS, FLOR, PERICARPO E PERISPERMA DE FRUTOS	56
4.4.	QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS RELACIONADOS AO AROMA E SABOR DO CAFÉ.....	58
4.4.1.	<i>Trigonelina em endospermas.....</i>	<i>58</i>
4.4.2.	<i>Glicose, frutose e sacarose em endospermas</i>	<i>59</i>
4.4.3.	<i>Quantificação de aminoácidos livres em endospermas</i>	<i>62</i>
4.4.4.	<i>Ácidos orgânicos em endospermas</i>	<i>67</i>
4.4.5.	<i>Ácidos clorogênicos em endospermas.....</i>	<i>68</i>
4.5.	COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS EM ENDOSPERMAS.....	72
4.6.	AMINOÁCIDOS TOTAIS EM ENDOSPERMAS MADUROS	73
4.7.	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE ENDOSPERMAS	74
4.8.	ANÁLISE DE PROTEÍNAS DE RESERVA POR ELETROFORESE DESNATURANTE (SDS-PAGE).....	75
4.9.	ATIVIDADES DE TEOBROMINA SINTASE E CAFEÍNA SINTASE	76
4.10.	ANÁLISES DE EXPRESSÃO GÊNICA POR RT-PCR	77
4.11.	METABOLISMO DE [¹⁴ C]ADENINA E [¹⁴ C]CAFEÍNA EM FRUTOS E FOLHAS.....	79
5.	DISCUSSÃO	82
5.1.	DESENVOLVIMENTO DO FRUTO	82
5.2.	CAFEÍNA EM RAÍZES, FLORES, INTERNÓDIOS	83
5.3.	CAFEÍNA EM PERICARPO E PERISPERMA DE FRUTOS	84
5.4.	METABOLISMO DE METILXANTINAS EM ENDOSPERMAS	85
5.5.	METABOLISMO DE METILXANTINAS EM FOLHAS	89
5.6.	COMPOSTOS RELACIONADOS AO SABOR E AROMA DO CAFÉ EM GRÃOS VERDES	91
5.7.	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	99
6.	CONCLUSÕES	100
7.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	101
8.	LITERATURA CITADA	102

1. INTRODUÇÃO

1.1. O mercado nacional e mundial de café

Coffea arabica tem sua origem na Etiópia e difundiu-se mundialmente como bebida revigorante devido a seu princípio ativo, a cafeína. Esta planta só chegou ao Brasil em 1727, através da Guiana Francesa, e foi uma questão de tempo para que o cultivo se espalhasse por quase todas as regiões do país. Atualmente o Brasil é o maior produtor agrícola mundial de café, sendo que em 2011 foram produzidas 43,5 milhões de sacas de 60 kg, o equivalente a 33% da produção mundial. Do total produzido no país, neste mesmo período, 77% do montante foi exportado, sendo que o maior consumidor do café brasileiro, tanto solúvel quanto torrado e moído, foram os Estados Unidos (EUA), com o consumo de 14 t de café solúvel e 1,56 t de torrado e moído no ano de 2011. Novamente os EUA, seguidos pela Alemanha, foram os maiores importadores de café verde neste período, com respectivamente 397,59 e 361,67 t (Associação Brasileira da Indústria do Café). O segundo maior país produtor foi o Vietnã, que produziu no mesmo período 18,5 milhões de sacas de 60 kg. Em seguida ficaram Colômbia, Indonésia, Índia, Etiópia, Honduras, Peru e Guatemala (Associação Brasileira da Indústria do Café).

São praticamente duas as espécies de *Coffea* que dominam o mercado mundial. A principal é *C. arabica*, também conhecida como Arábica, sendo a espécie mais cultivada no mundo, com aproximadamente 70% do mercado. Os 30% restantes são ocupados quase que em sua totalidade pela produção de *C. canephora*, também chamada de café Robusta (Ashihara & Suzuki, 2004).

O consumo de café cresce a cada ano, assim como a procura pelo café descafeinado. Em 1990, no Brasil, o consumo foi de 2,7 kg/habitante, enquanto que em 2011 este valor atingiu 4,8 kg/habitante (ABIC). Segundo pesquisa de tendências de estudo de café feito exclusivamente para ABIC e para o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, em 2003 aproximadamente 1% da população brasileira consumiu café descafeinado. Entretanto, em 2010, foi observado um aumento para 1,4%. Apesar de ser consumido preferencialmente pela classe A, foi verificado um aumento no consumo deste tipo de café pelas classes C e D. Dados obtidos na década de 90 nos EUA indicaram que o consumo deste tipo de café foi maior entre mulheres, aproximadamente 12%, e pessoas com idade acima de 60 anos, com consumo de 24% (Spiller, 1998). Dados mais atuais indicam que no mesmo país 20% da venda de café em cafeterias referem-se ao descafeinado e que, para pessoas acima de 60 anos esta porcentagem subiu para 55% (Shahid , 2003).

1.2. Ciclo fenológico e desenvolvimento de frutos de *C. arabica*

O café Arábica completa sua fase juvenil de frutificação após dois anos. Camargo e Camargo (2001) esquematizaram este ciclo com base no clima brasileiro subdividindo-o em seis partes que se iniciam no mês de setembro. A primeira fase é a vegetativa, que vai de setembro a março; na segunda fase, também vegetativa, há a indução de gemas vegetativas para gemas reprodutivas no período de abril a agosto; na terceira fase, de setembro a dezembro, é observada a florada e expansão dos frutos; a quarta fase é caracterizada pela granação dos frutos e ocorre entre

janeiro e março; na quinta fase ocorre a maturação dos frutos, após a florada principal.

Da sétima até a décima/décima primeira semanas ocorre um rápido crescimento dos frutos, sendo que este coincide com o desenvolvimento do perisperma. Este tecido, que se desenvolve a partir do nucelo do óvulo, logo após a fecundação, apresenta intensa divisão celular nos primeiros estádios de crescimento. Nas semanas seguintes o endosperma, um tecido triplóide de origem não esporofítica, cresce gradativamente e ocupa o lugar anteriormente ocupado pelo perisperma. Com o amadurecimento do fruto, o perisperma torna-se uma fina camada de aproximadamente 70 μm que circunda o endosperma, sendo que esta camada de células também é nomeada película prateada ou pergaminho (Castro & Marraccini, 2006).

1.3. Alcalóides purínicos e controle metabólico da biossíntese de cafeína

A maioria dos alcalóides é derivada de aminoácidos e apresenta um ou mais átomos de nitrogênio inseridos em um anel heterocíclico. A rota de biossíntese dos alcalóides purínicos é uma exceção, sendo derivada de nucleotídeos purínicos, mas ainda assim apresentam átomos de nitrogênio em anel heterocíclico, atividade biológica marcante e distribuição restrita. Outros já classificam estes compostos como pseudoalcalóides porque apresentam caráter anfótero, ou seja, comportam-se como ácido ou base e não são derivados de aminoácidos (Simões et al., 2007).

Cafeína, teobromina e teofilina são os alcalóides purínicos mais conhecidos, mas seus respectivos ácidos metilúricos também são classificados como alcalóides

purínicos (fig.1). Estruturalmente as metilxantinas possuem até três radicais metil ligados ao anel purínico nas posições 1, 3 e 7. Destes alcalóides o composto mais conhecido é a 1,3,7-trimetilxantina, a cafeína, que foi isolada de chá e de café nos meados de 1820 (Ashihara et al., 2008; Mazzafera et al. 2009). Teobromina (3,7-dimetilxantina) e teofilina (1,3-dimetilxantina) também são encontradas em chá e café. Teobromina está presente em maior quantidade em cacau. Em plantas novas de *C. liberica* foi possível observar os ácidos metilúricos liberina e teacrina (fig.1) como produto do catabolismo de cafeína presente na semente. Outras espécies do grupo 'liberio-excelsoides', como *C. dewevrei* De Wild et Durand var *excelsa*, também apresentaram os mesmos ácidos metilúricos em suas folhas (Petermann & Baumann, 1983).

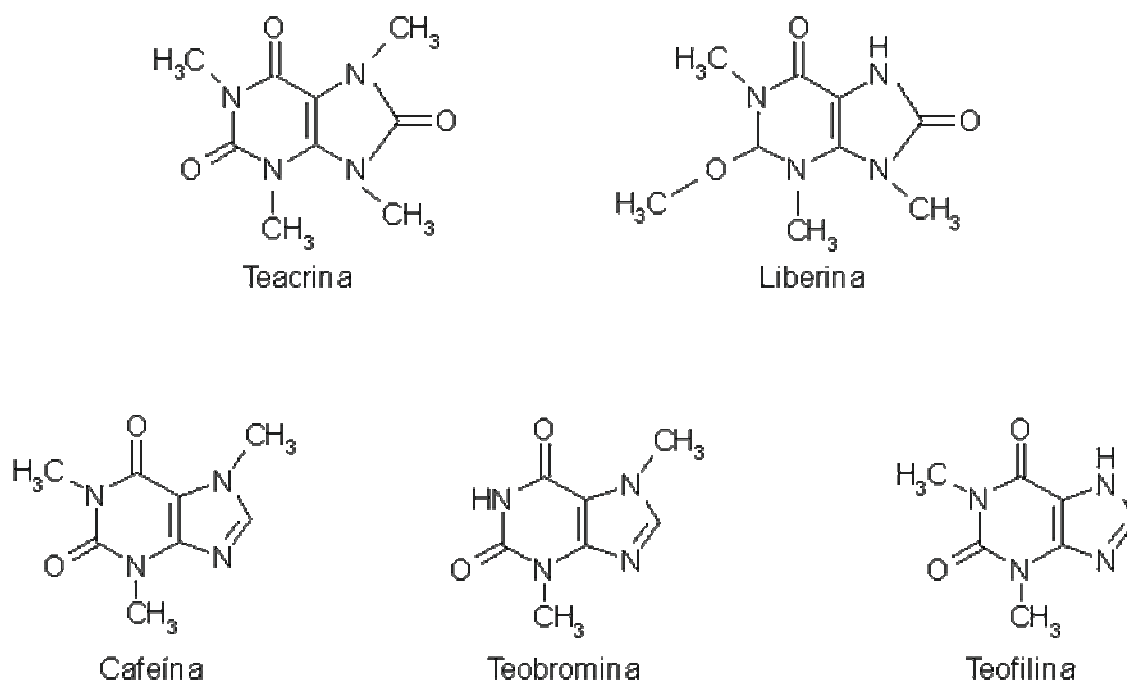


Figura 1. Alcalóides purínicos em plantas. Os ácidos metilúricos liberina e teacrina e as metilxantinas cafeína, teobromina, teofilina.

O anel purínico, característico das metilxantinas, origina-se a partir de nucleotídeos purínicos. A biossíntese destes nucleotídeos inclui três etapas:

biossíntese *de novo* de nucleotídeos purínicos, interconversão de nucleotídeos purínicos e reutilização purínica (Ashihara & Crozier, 1998). Na primeira etapa ocorre à síntese de inosina-5-monofosfato (IMP), via que envolve alguns aminoácidos como glutamina, glicina e aspartato. Na segunda etapa o IMP é convertido em adenosina-5-monofosfato (AMP) e guanosina-5-monofosfato (GMP) e, através de uma deaminase, o AMP é novamente convertido em IMP. A terceira etapa, que é independente das outras duas, consiste na reutilização das purinas, em que bases purínicas e nucleosídeos são catabolizados a nucleotídeos e ácidos nucléicos.

Folhas de *Camellia sinensis* que receberam [8-¹⁴C]-adenina e [8-¹⁴C]-hipoxantina (Ashihara & Kubota, 1987) foram capazes de sintetizar cafeína a partir destes compostos, enquanto que estudo feito com [8-¹⁴C]-adenina e [8-¹⁴C]-guanina em folhas de *C. arabica* indicou que o nucleotídeo purínico com maior taxa de conversão para metilxantinas foi a adenina (Ashihara et al., 1996).

A xantosina é o primeiro composto chave da via biossintética de cafeína, e é originado a partir de quatro rotas: biossíntese purínica *de novo*, degradação de nucleotídeos de adenina e de guanina e ciclo da S-adenosil-metionina (SAM). Como observado em *C. sinensis* e *C. arabica*, a principal via biossintética da cafeína (fig. 2) consiste de quatro passos, sendo que três deles são catalisados por metiltransferases e um por uma nucleosidase (Ashihara et al., 2008). A SAM é o doador do grupo metil das três metiltransferases em questão.

A xantosina metiltransferase, também chamada de 7-metilxantosina sintase (EC 2.1.1.158), é a primeira metiltransferase envolvida nesta via biossintética, sendo que esta enzima catalisa a reação de xantosina para 7-metilxantosina, ao promover a metilação na posição 7. A proteína codificada pelo gene *CaXMT1*, que foi isolado de frutos imaturos de *C. arabica*, apresentou especificidade apenas para a conversão de

xantosina para 7-metilxantosina (Uefuji et al., 2003). Na tentativa de isolar uma cafeína sintase, o gene *CmXRS1* foi expresso em *Escherichia coli* e a proteína heteróloga produzida apresentou atividade 7-metilxantosina sintase (Mizuno et al., 2003a). O interessante é que a expressão deste gene ocorre em folhas, botões florais e grãos imaturos, mas não em grãos maduros (Ashihara et al., 2008).

O segundo passo consiste da retirada de uma ribose do anel purínico, que é feita através da N-metilnucleosidase (EC 3.2.2.25). Esta enzima é responsável pela reação que transforma 7-metilxantosina em 7-metilxantina.

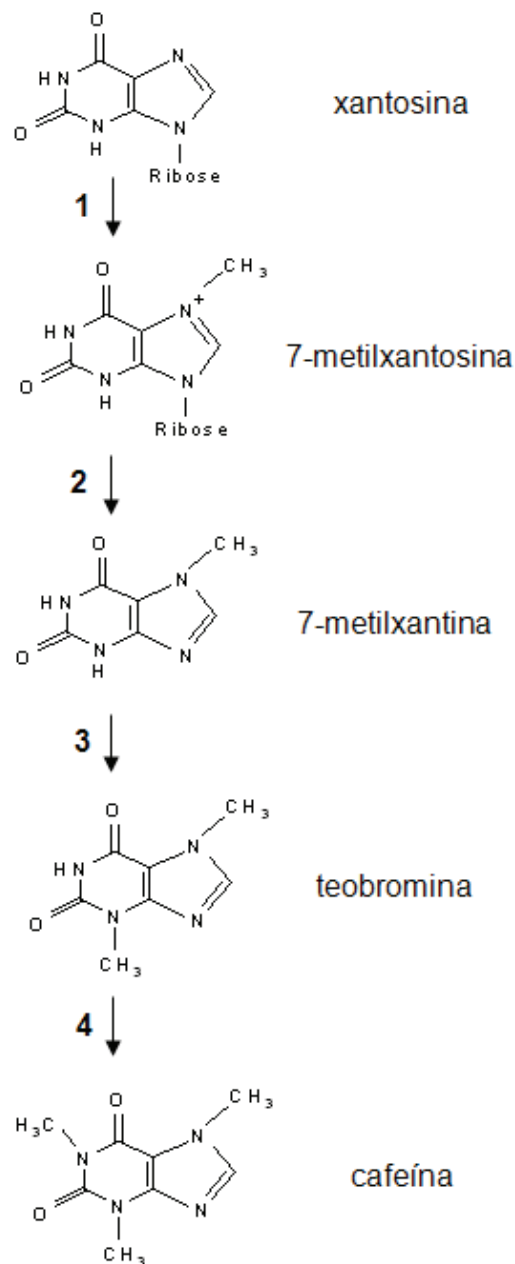


Figura 2. Principal rota de biossíntese de alcalóides purínicos em *C. arabica*. **1.** 7-metilxantosina sintase (xantosina metiltransferase), **2.** N-metilnucleosidase, **3.** teobromina sintase (7-metilxantina metiltransferase) e **4.** cafeína sintase (3,7-dimetilxantina metiltransferase).

A etapa seguinte envolve a segunda metilação do anel purínico, que é feita na posição 3. Esta reação é catalisada pela 7-metilxantina-metiltransferase (EC 2.1.1.159), ou teobromina sintase, que converte 7-metilxantina em teobromina. Esta enzima apresenta atividade máxima com pH entre 7 e 8, e a temperatura ótima em torno de 35°C (Waldhauser et al., 1997). Em 2001, Ogawa et al. obtiveram uma proteína heteróloga de *C. arabica* que apresentava apenas atividade 7-metiltransferase. Dois genes, *CaMXMT1* e *CaMXMT2*, isolados a partir de frutos imaturos de *C. arabica*, foram expressos em *E. coli* e as proteínas obtidas catalisaram a conversão de 7-metilxantina para teobromina. Outra conversão que foi efetuada, mas com menor atividade, foi a de paraxantina para cafeína (Uefuji et al., 2003). No mesmo ano esta mesma enzima foi descrita por Mizuno et al. (2003b), mas a nomenclatura por eles utilizada foi CTS (Coffee Theobromine Synthase). Assim como a xantosina metiltransferase, teobromina sintase não foi expressa em grãos maduros, mas foi em folhas jovens, botões florais e grãos imaturos (Ashihara et al., 2008).

A enzima envolvida na última etapa da via biossintética da cafeína é a 3,7-dimetilxantina-metiltransferase (EC 2.1.1.160), ou cafeína sintase. Ela é responsável pela metilação na posição 1 do anel purínico, convertendo desta maneira teobromina em cafeína. A máxima atividade desta enzima ocorre em pH 8.5 e a temperatura ótima é em torno de 35°C (Waldhauser et al., 1997). Pela primeira vez, Suzuki & Takahashi (1975) observaram que extratos de chá (*Camelia sinensis*) apresentaram atividade tanto 7-metilxantina metiltransferase quanto 3,7-dimetilxantina metiltransferase. Mazzafera et al. (1994a) purificaram de endospermas e folhas de *C. arabica* uma enzima, que assim como a encontrada em *C. sinensis*, foi capaz de

converter 7-metilxantina em teobromina e teobromina em cafeína. Em folhas de *C. arabica* esta dupla atividade metiltransferase também foi encontrada (Waldhauser et al., 1997). Novamente, alguns anos depois, uma purificação enzimática feita a partir de folhas de *C. sinensis* também apresentava atividade teobromina e cafeína sintase (Kato et al., 1999). O gene da cafeína sintase foi primeiramente isolado por Kato et al. (2000) em folhas jovens de chá (*TCS1*), e a enzima além de converter 7-metilxantina em teobromina, também catalisava a conversão de teobromina para cafeína. A proteína CaDXMT1, obtida da mesma maneira que a CaMXMT em frutos imaturos de *C. arabica*, apresentou afinidade com vários substratos. Ela foi capaz de catalisar a conversão de 7-metilxantina para teobromina, de teobromina para cafeína e de paraxantina para cafeína, sendo a paraxantina o substrato que apresentou maior afinidade com esta enzima (Uefuji et al., 2003). Outros dois genes, chamados de *CCS1* e *CtCS7*, também deram origem a proteínas que apresentaram atividade cafeína sintase com dupla função (Mizuno et al., 2003b). O interessante é que a *CCS1*, ao contrário da CaMXMT, é expressa em todos os tecidos. Não há relatos de genes que expressem enzimas com atividade exclusivamente de cafeína sintase.

O catabolismo da cafeína consiste na remoção de seus três grupos metílicos, o que novamente resulta na formação de xantina. Como pode ser visto na fig. 3, a via principal do catabolismo é cafeína → teofilina → 3-metilxantina → xantina. Estudos catabólicos do metabolismo de cafeína em folhas de *C. arabica* indicaram que a conversão de cafeína para teofilina através da demetilação, efetuada pela N7-demetilase (EC 1.13.12), ocorre mais vagorosamente do que o passo anterior da via metabólica. Em contrapartida, a teofilina foi rapidamente metabolizada, assim como os outros produtos catabólicos (Suzuki & Waller 1984; Ashihara et al. 1996). Enquanto em folhas e frutos de *C. arabica* resultados similares foram encontrados,

em *C. dewevrei* foi observado que a baixa quantidade de cafeína encontrada em endospermas imaturos e em folhas jovens foi justamente devida a uma alta taxa de conversão de cafeína para teofilina (Mazzafera et al. 1994b; Vitória & Mazzafera 1998). É justamente devido a regulação neste passo da via metabólica que folhas e frutos de *C. arabica* apresentam acúmulo de cafeína (Ashihara et al. 1996; Vitória & Mazzafera 1998). Em *C. arabica* e em *C. dewevrei* cafeína também pode ser convertida diretamente em teobromina e em seguida em 3-metilxantina, enquanto que em *C. liberica* ela é degradada via ácidos metilúricos, acumulando liberina (Mazzafera, 2004). Já a xantina é degradada pela rota catabólica convencional de purinas via ácido úrico. Na sequência há a formação de alantoína e ácido alantóico, e após uma série de reações, há também a formação de gás carbônico e amônia (Ashihara et al., 1996; Mazzafera, 2004).

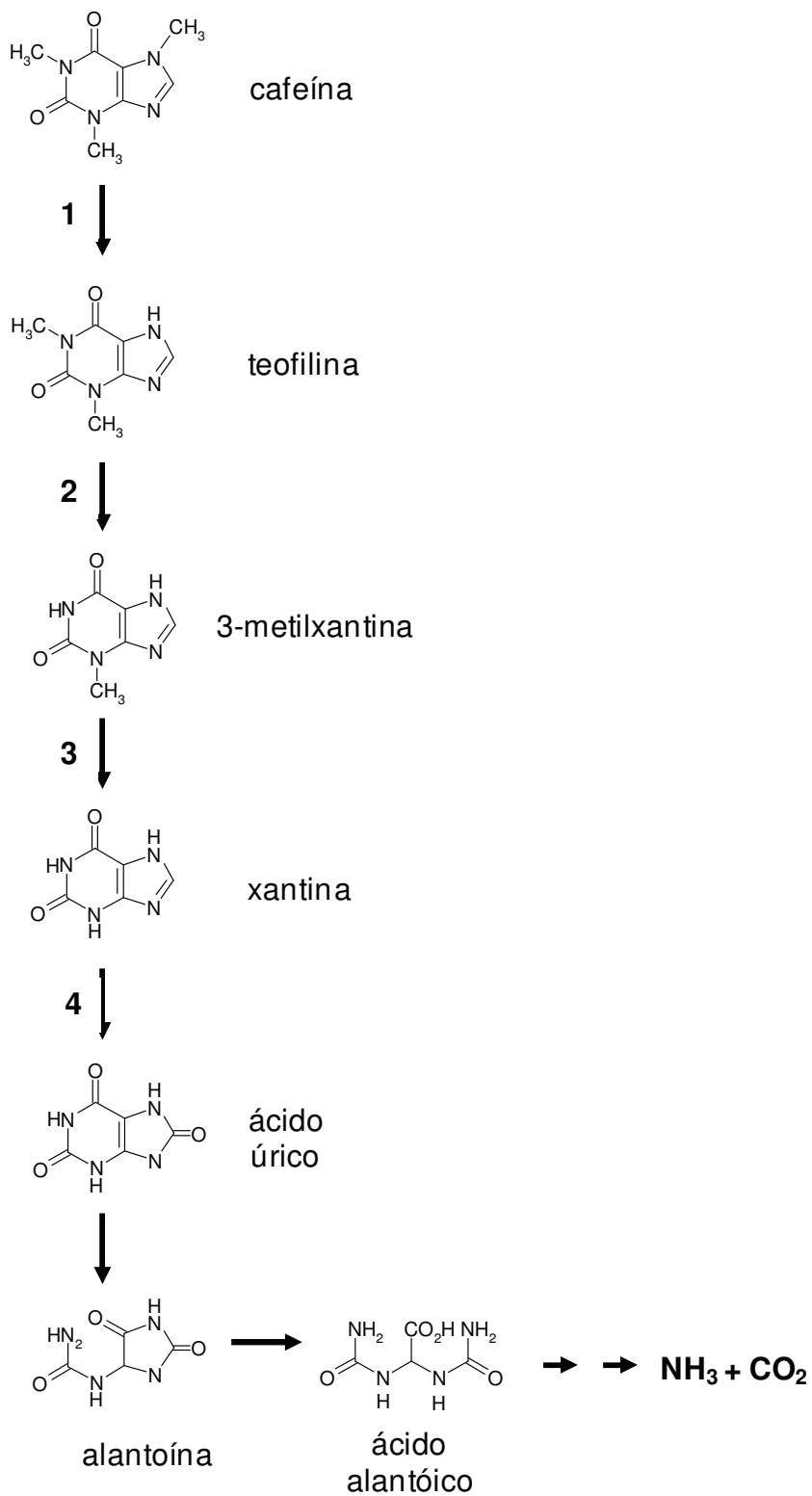


Figura 3. Principal rota de catabolismo de cafeína em *C. arabica*. **1.** N-7 demetilase, **2.** N-1 demetilase, **3.** N-3 demetilase, **4.** Xantina desidrogenase.

1.4. Papel ecológico dos alcalóides purínicos

Folhas de *C. sinensis* e folhas e frutos de café apresentam altas quantidades de cafeína endógena, entretanto uma explicação sobre o papel fisiológico de metilxantinas ainda não foi determinado. Após uma série de estudos, é creditada a cafeína principalmente dois papéis ecológicos, o primeiro deles é o de agente alelopático e o segundo o de defesa química, ou anti-herbivoria. Entretanto, foi observado que os resultados que comprovam estes dois papéis se mostraram variáveis, sendo necessário analisar os casos separadamente, como concluiu Mazzafera et al (1996).

A alelopatia é um fenômeno em que a liberação de substâncias químicas causa efeitos benéficos ou adversos tanto à própria planta quanto a outra planta, e são vários os trabalhos que comprovam o efeito alelopático da cafeína (Chou & Waller 1980; Shettel & Balke 1983; Waller et al. 1986; Smyth 1992). Alguns estudos demonstraram que tanto sementes de chá quanto de café liberam cafeína durante a germinação, podendo inclusive causar autoinibição da germinação (Friedman & Waller 1983; Baumann & Gabriel 1984; Suzuki & Waller 1987). Além disso, Waller et al. (1986) concluíram que a cafeína presente no solo, devido a queda de frutos e de folhas de café, eram capazes de inibir o desenvolvimento microbiano, acumulando-se no solo. Entretanto, bactérias capazes de degradar a cafeína foram isoladas (Blecher & Lingens, 1977; Woolfolk ,1975), entre elas a *Pseudomonas*, gênero bacteriano mais encontrado em solos. Mazzafera et al. (1996) comprovaram a degradação de cafeína em solos não autoclavados ao verificar que cafeína exógena,

adicionada a este solo, tiveram uma drástica queda desta metilxantina devido a degradação microbiana.

Já a teoria da defesa química propõe que as altas concentrações de cafeína encontradas nas diferentes partes do cafeeiro (flores, folhas jovens e frutos) são uma defesa contra o ataque de herbívoros e patógenos. Em 1984, Nathanson publicou um trabalho em que inferiu que cafeína e outras metilxantinas apresentam um possível papel como pesticida natural. Foi observado que larvas de *Manduca sexta* predaram menos folhas de tomateiros após serem aspergidas com diferentes concentrações de cafeína, observando uma relação inversa entre concentração de cafeína e área predada.

Com base nos resultados publicados por Nathanson (1984), foram desenvolvidas plantas transgênicas de tabaco que apresentavam síntese de cafeína com a finalidade de avaliar o efeito repelente em larvas (*Spodoptera litura*) de tabaco (Uefuji et al. 2005; Ogita et al. 2005). Os resultados mostraram que os insetos selecionaram positivamente os controles, evitando as plantas com cafeína. Entretanto, quando as plantas com cafeína eram predadas, as quantidades desta metilxantina não eram suficientes para causar um efeito letal nestes insetos.

Eficácia na administração de cafeína ao combate a herbivoria também foi constatado por Hollingsworth et al. (2002). Em solos borrifados com solução de 1 a 2% de cafeína foi observado que 92% de lesmas da espécie *Veronicella cubensis* morreram após 48 horas. Neste trabalho também foi constatado que folhas de nabo tratadas com diferentes concentrações de cafeína foram menos predadas por lesmas do que folhas não tratadas. Outra conclusão foi de que a exposição de caracóis *Zonitoides arboreus* a diferentes dosagens de cafeína foi associada a mortalidade destes animais.

Entretanto, estudos com a broca dos grãos, praga relativamente comum em cafeeiros no Brasil, não indicaram uma clara relação entre quantidade de cafeína endógena e resistência da planta ao ataque desta praga, não podendo portanto inferir que a alta quantidade de cafeína encontrada nos grãos estão associados com a proteção dos mesmos contra esta praga (Mazzafera & Magalhães, 1991; Mazzafera et al. 1996).

1.5. Efeitos fisiológicos e comportamentais de cafeína e teobromina em seres humanos

A maior fonte de cafeína para o ser humano é o café, sendo que a média de ingestão está entre 200 e 300 mg de cafeína/dia, equivalente a duas ou três xícaras (Eteng et al., 1997).

São dois os mecanismos de ação creditados às metilxantinas, em especial a cafeína e a teofilina. O principal deles é a inibição da família de enzimas fosfodiesterase, sendo que este mecanismo foi descoberto após estudos *in vitro* utilizando-se altas concentrações de metilxantinas. Estas enzimas são responsáveis pela hidrólise de nucleotídeos cíclicos, principalmente a adenosina monofosfato cíclica (AMPc), e, devido a este fato, a administração de metilxantinas aumenta os níveis intracelulares deste composto. São várias as funções atribuídas ao AMPc, entre elas a estimulação cardíaca, o relaxamento da musculatura lisa e redução das atividades imunes e inflamatórias de células específicas. O segundo mecanismo conhecido é a inibição dos receptores de adenosina das superfícies celulares, sendo que estes receptores modulam a atividade da enzima adenilciclase (EC 4.6.1.1)

(Katzung, 2007). São dois os receptores que podem ser encontrados, o A_1 e o A_2 , sendo que estes receptores são diferencialmente distribuídos pelo sistema nervoso (Ferré, 2008). A estimulação do A_1 leva à inibição da adenilciclase, enzima que catalisa a formação de AMPc a partir do ATP, reduzindo desta maneira os níveis de AMPc. Já ao estimular o receptor A_2 a adenilciclase é ativada e os níveis de AMPc aumentam (Fisone et al., 2004).

Devido a estes mecanismos de ação, a cafeína ocasiona uma série de mudanças fisiológicas e comportamentais. Ao levar em conta os efeitos da cafeína no comportamento humano foi observado que baixas doses desta metilxantina aumentaram o estado de alerta, mas quando a dose foi aumentada, pessoas sensíveis a este alcalóide apresentaram ansiedade (Smith, 2002). Talvez relacionado ao estado de alerta ocasionado, também foi demonstrado que a quantidade de informações processadas pelo ser humano é maior após a administração de cafeína (Ruijter et al., 1999). Altas doses de cafeína podem levar a insônia, entretanto estes estudos sugerem que as pessoas geralmente sabem dosar a ingestão de cafeína no período noturno, já que não foi verificada uma forte correlação entre consumo de cafeína e perda de sono. Já estudos focados nos efeitos da cafeína em alguns processos cognitivos e memória não foram conclusivos (Smith, 2002).

A intoxicação por cafeína pode ocorrer e gerar alguns sintomas, entre eles irritabilidade, insônia, diurese, arritmia, taquicardia, respiração elevada, distúrbios gastrintestinais, dor de cabeça, náusea, vômitos, tontura, ansiedade, zumbido, tremor e excitação. Já sintomas de intoxicação severa podem provocar hipocalcemia, hiponatremia, arritmia ventricular, hipertensão seguida por hipotensão, falha respiratória, rabdomiólise, fibrilação ventricular e colapso circulatório. Apesar de raro,

encontrou-se na literatura relatos sobre mortes por ingestão de altas doses de cafeína (Kerrigan & Lindsey 2005; Mrvos et al. 1989; Garriott et al. 1985), sendo que o último caso relatado foi de uma mulher de 21 anos que ingeriu 10.000 mg de cafeína (Rudolph & Knudsen 2010).

Entretanto, o consumo moderado, de até 400 mg de cafeína por dia não provoca efeitos cardiovasculares adversos e também não causa danos ao status ósseo nem ao balanço de cálcio. Em compensação foi observado que mulheres férteis que consumiram até 300 mg de cafeína por dia apresentaram diminuição na fecundidade (Nawrot et al., 2003). Estudos indicam que tanto cafeína quanto teobromina têm acesso à placenta, e que o feto pode ser prejudicado por não apresentar mecanismos de desintoxicação em níveis adequados (Eteng et al., 1997).

Pouco se sabe sobre os efeitos comportamentais da teobromina em seres humanos. Em 1936, foi reportada uma overdose acidental de teobromina, que ocasionou sintomas como náusea, vômitos, tontura e dor de cabeça. Ao observar os efeitos subjetivos de teobromina e cafeína, constatou-se que os efeitos provocados pela cafeína eram bem mais marcantes do que aqueles provocados pela teobromina. Enquanto efeitos como bem estar, energia, motivação para o trabalho, estado de alerta, concentração, tremores, palpitações, entre outros, foram observados após administração de diferentes dosagens de cafeína, apenas alguns efeitos, tais como energia, motivação para o trabalho e estado de alerta, foram observados após administração de teobromina, e mesmo assim, apenas sob determinadas dosagens desta metilxantina (Mumford et al., 1994).

Em pessoas sensíveis a cafeína pode causar alguns efeitos indesejados, entre eles palpitações, distúrbios gastrintestinais, ansiedade, tremores, aumento da

pressão sanguínea e insônia (Ashihara & Crozier, 2001), sendo este o principal motivo pelo qual algumas pessoas procuram o café descafeinado para consumo.

1.6. Ocorrência de metilxantinas em plantas

As plantas capazes de sintetizar alcalóides purínicos dividem-se em aproximadamente 100 espécies, inseridas em 13 ordens. Entre elas estão espécies dos gêneros *Camellia*, *Coffea*, *Ilex*, *Paullinia*, *Theobroma* e *Herrania*, que acumulam pelo menos uma metilxantina. Em *Camellia* foi encontrada uma grande variação nas quantidades de metilxantinas, sendo que em *C. sinensis* var. *sinensis* foram encontrados 2,8% de cafeína em folhas jovens e em *C. sinensis* var. *assamica* a quantidade foi de 2,4%. Em contrapartida, o alcalóide purínico mais abundante em *C. irrawadiensis* foi a teobromina (Nagata & Sakai, 1985; Ashihara & Crozier, 1999), e em outras 20 espécies de *Camellia* as metilxantinas não foram detectadas. Em *Ilex paraguayensis* var. *paraguayensis* foram encontrados 0,65% de cafeína e 0,12% de teobromina e em *I. paraguayensis* var. *vestita* foram detectados 0,003% de cafeína e 0,22% de teobromina. Em outras espécies de *Ilex* as metilxantinas estavam ausentes (Reginato et al., 1999). Também foi demonstrado que folhas e frutos jovens de *I. paraguayensis* apresentaram maiores níveis de cafeína e teobromina, e que em plantas parcialmente sombreadas a teobromina apresentou aumento proporcional em relação à cafeína. Teofilina também foi encontrada em folhas, mas não em frutos maduros, casca ou córtex (Mazzafera, 1994).

Espécies de *Paullinia* podem acumular até dois tipos de alcalóides purínicos, como é o caso de *Paullinia cupana*, em que os cotilédones acumulam 0,015% de

teobromina e 4,28% de cafeína, enquanto que folhas jovens da mesma espécie acumulam 1,26% de teobromina e 0,003% de teofilina (Weckerle et al., 2003). Frutos de *Theobroma cacao* acumulam uma série de metilxantinas, que variam de acordo com o tecido analisado. Com exceção do pericarpo, os alcalóides que apresentaram maior acúmulo foram respectivamente teobromina, e em seguida a cafeína (Zheng et al., 2004).

1.7. Espécies do gênero *Coffea* com baixas concentrações de cafeína

Apesar de *C. arabica* e *C. canephora* serem as espécies economicamente mais importantes do gênero *Coffea*, há no mundo aproximadamente 100 espécies deste gênero da família Rubiaceae (DaMatta & Ramalho, 2006), sendo que este é subdividido nos subgêneros *Coffea*, com 95 espécies, e *Baracoffea* com oito espécies (DaMatta & Ramalho 2006; Davis et al., 2006; Mazzafera et al., 2009). Vale ressaltar que das espécies deste gênero apenas *C. arabica* é tetraplóide ($2n=4x=44$), enquanto que as outras espécies são diplóides ($2n=22$). Algumas espécies apresentam naturalmente menores quantidades de cafeína do que *C. arabica*, sendo que a maioria destas é utilizada para a produção de híbridos, com a finalidade de obtenção de plantas com baixas quantidades de cafeína.

Há também espécies da Seção Mascarocoffea, provenientes de Madagascar, que apresentaram baixas quantidades de cafeína. *C. kianjavatensis* apresentou 0,75% de cafeína e 0,07% de teobromina e *C. lancifolia* apresentou 0,63% (A320) e 0,55% (A405) de cafeína e 0,06% de teobromina (A320 e A405). Já em *C. homollei* não foram detectadas nem cafeína nem teobromina em suas sementes (Rakotomalala et al., 1992). Em *C. sensuiflora* a quantidade de cafeína encontrada

ficou entre 0,45 e 0,5% (Mazzafera et al., 2009). O inconveniente é que estas sementes possuem características agrônômicas pobres, e seu paladar é comprometido devido à presença de cafamarina (Mazzafera et al., 1991; Ashihara & Crozier, 1999). O diterpeno glicosilado do tipo “furokaurane” encontrado em *Coffea pseudozanguebariae* também torna as sementes naturalmente descafeinadas desta planta pouco palatáveis (Prewo et al., 1990; Mazzafera et al., 2009).

Mazzafera e Carvalho (1992) produziram vários híbridos a partir de cruzamentos com algumas espécies de *Coffea*, entre eles variedades de *C. arabica* e *C. canephora*, e espécies como *C. eugenoides* (0,4 a 0,6% de cafeína), *C. liberica* (1,1 a 1,4% de cafeína), *C. racemosa* (0,9 a 1,3% de cafeína) e *C. salvatrix* (0,2 a 0,7% de cafeína), entre outras (Mazzafera et al. 2009). As quantidades de cafeína em sementes de híbridos interespecíficos complexos (com cruzamentos ou retrocruzamentos entre mais de duas espécies) variaram entre 1,34% e 0,65%, enquanto que em sementes provenientes de flores que apresentaram polinização cruzada variaram de 2,19% a 0,16%. Atualmente, novos híbridos desenvolvidos em Madagascar por Nagai et al. (2008) apresentaram 0,37% de cafeína e teobromina não detectável.

Estudo feito por Mazzafera et al. (1994b) com *C. dewevrei* mostrou que endospermas jovens desta planta apresentaram baixas quantidades de cafeína, em torno de 0,25%, além de acumular certa quantidade de teobromina. Através de estudos com marcadores radioativos foi possível concluir que folhas e endospermas neste estágio de desenvolvimento metabolizaram cafeína mais rapidamente do que endospermas e folhas de *C. arabica* das variedades Mundo Novo e Laurina.

Outro estudo feito com folhas e frutos de *C. arabica* mostrou que houve diminuição nas quantidades de teobromina e cafeína após administração de

riboflavina a estas plantas. Este composto é um potente inibidor da enzima inosina monofosfato desidrogenase (IMPDH, EC 1.1.1.250), que é uma desidrogenase dependente de NAD⁺ que catalisa a transformação de IMP em xantosina-monofosfato (XMP). Após o estudo, os autores sugeriram que uma alternativa para a produção de transgênicos com baixas quantidades de metilxantinas é a supressão do gene que codifica a IMPDH (Keya et al., 2003).

Com o desenvolvimento das técnicas de biologia molecular, foram desenvolvidas plantas transgênicas com genes suprimidos das principais metiltransferases da via de biossíntese da cafeína, sendo que para isso foi utilizado RNA de interferência (RNAi). Ogita et al. (2003) descreveram a produção de um cafeeiro transgênico no qual silenciou-se com RNAi a expressão do gene *CaMXMT1*, um dos que codificam a enzima teobromina sintase. Estes RNAs foram desenvolvidos a partir de seqüências específicas não traduzidas da região 3' do gene em questão de *C. canephora*. Estes transgênicos apresentaram uma queda de 30 a 80% na quantidade de teobromina e 50 a 70% na de cafeína, quando comparados com plantas controle. Foi observado que o *CaMXMT*-RNAi além de suprimir os transcritos de *CaMXMT*, também suprimiu os de *CaXMT* e *CaDMXMT*. Estes resultados só foram obtidos em folhas, já que as plantas ainda eram jovens. Posteriormente Ogita et al. (2004), através de *CaMXMT1*-RNAi, conseguiu reduzir teobromina e cafeína de 30 a 50% em relação ao controle em linhagens transgênicas de tecidos embriogênicos de *C. arabica* e plântulas transgênicas de *C. canephora*. É interessante observar que esta seqüência de *CaMXMT1*-RNAi, assim como no trabalho anteriormente citado, não apenas interferiu nos transcritos para *CaMXMT1*, mas também nos de *CaXMT1* e *CaDXMT1*. Com obtenção de tais resultados os autores sugeriram o uso de tal método para produção de cafeeiros descafeinados.

No entanto, hoje não se tem notícia do conteúdo de cafeína nestas plantas, ou seja, após terem tido tempo suficiente para florescer e frutificar.

1.8. Processos de descafeinação de grãos

Descafeinação é o processo pelo qual a cafeína é artificialmente retirada de materiais, como grãos de café, de cacau, do gênero *Cola*, entre outros. Há vários métodos de descafeinação conhecidos aplicáveis a grãos de café pobres, sendo que alguns são utilizados em escala industrial. Alguns processos caíram em desuso devido à utilização de compostos prejudiciais à saúde, como foi o caso do método desenvolvido por Ludwig Roselius e Karl Wimmer em 1903, em que o benzeno era um dos compostos utilizados na descafeinação. O processo que utiliza fluido supercrítico é considerado um método fisiologicamente não-tóxico, pois não deixa resíduos de solventes orgânicos (Mazzafera & Carvalho, 1991; Mazzafera et al., 2009). O principal inconveniente deste método é o custo (Shahid, 2003). Já no processo que utiliza água como solvente, os grãos verdes são embebidos com água quente e, após a cafeína ser liberada na água, os grãos são separados, e a água passa por um filtro contendo carvão ativo que captura a cafeína. No Brasil, o processo industrial mais utilizado é aquele em que o solvente é o diclorometano (Toci et al., 2006), sendo que neste método há a possibilidade de executar o processo de modo direto ou indireto. Neste último, a água é re-utilizada após o uso do solvente.

O inconveniente observado em todos os processos de descafeinação utilizados na indústria, mas em menor grau para o método supercrítico, é que

além da retirada da cafeína, outros compostos que estão relacionados ao sabor e ao aroma da bebida são parcialmente perdidos ou quimicamente alterados (Saldaña et al., 1998; Farah et al., 2006a, Toci et al., 2006; Abrahão et al., 2008). Outro ponto a ser levado em consideração são os resíduos dos solventes orgânicos que podem se depositar nos grãos e potencialmente causar algum dano à saúde, apesar da FDA (Food and Drug Administration) ter considerado o diclorometano em baixas concentrações seguro à saúde humana e nenhum caso de câncer ter sido atribuído a resquícios deste solvente nos grãos (Ramalakshmi & Raghavan, 1999).

É interessante ressaltar que mesmo o café artificialmente descafeinado apresenta ainda uma certa quantidade de cafeína em sua composição. Em grãos verdes descafeinizados por diclorometano, por exemplo, é possível encontrar 0,02 mg de cafeína/g (Toci et al., 2006).

1.9. Compostos relacionados ao sabor e aroma do café

Até 1989 foram encontrados aproximadamente 800 compostos relacionados ao aroma, sendo que 80 a 85% referem-se aos compostos heterocíclicos (Reineccius, 1995). Outros compostos como os alifáticos, alicíclicos e aromáticos também contribuem para este processo, só que em menor escala (Moreira et al., 2000). Destes compostos, que são formados após a torrefação, os que mais contribuem para o sabor e aroma da bebida são os pirróis, os furanos, as piridinas e as pirazinas (fig. 4). Dentre os precursores destes compostos estão açúcares,

aminoácidos, peptídeos, trigonelina, ácidos clorogênicos, ácidos orgânicos, lipídios e carotenóides (Montavon et al., 2003).

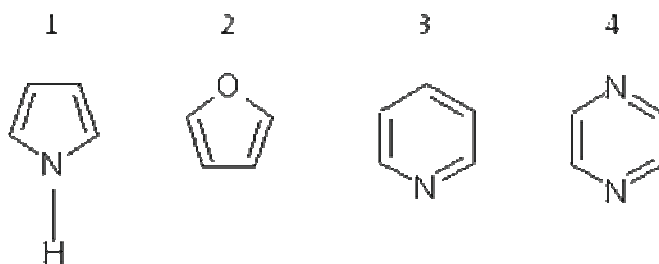


Figura 4. Compostos relacionados ao sabor e aroma da bebida.
1. Pirrol, 2. Furano, 3. Piridina e 4. Pirazina.

A trigonelina, um alcalóide formado a partir de nucleotídeos de piridina, é sintetizada via degradação de dinucleotídeo de nicotina e adenina (NAD). Esta degradação forma o ácido nicotínico, que é o precursor da trigonelina (Ashihara, 2006). A enzima responsável pela formação de trigonelina via ácido nicotínico é a nicotinato *N*-metiltransferase (E.C. 2.1.1.7.), também conhecida como trigonelina sintase. Assim como as metiltransferases envolvidas na síntese de metilxantinas, esta enzima também é dependente de SAM. Nos frutos foi encontrado acúmulo de trigonelina durante todo o seu desenvolvimento, inclusive na fase final, quando estes desenvolveram totalmente as sementes (Koshiro et al., 2006). A degradação térmica da trigonelina dá origem a piridinas, sendo que quanto maior o grau de torrefação maior a quantidade de piridinas provenientes por esta via são encontradas (Maria et al., 1999). A degradação deste alcalóide dá origem tanto a compostos voláteis quanto não voláteis, sendo que os principais compostos provenientes da trigonelina após o aquecimento, entre 180 e 230^o C por aproximadamente 15 minutos, foram as piridinas niacinamida, o metil-nicotinato e a metil-nicotinamida (De Maria et al., 1999). Este alcalóide pode ainda, após aquecimento, dar origem a alguns pirróis, sendo que

estes ainda podem, através de reações secundárias com açúcares, dar origem a outros compostos.

Os ácidos carboxílicos são compostos que contribuem para a acidez final da bebida (Woodman, 1985, citado em Alcázar et al., 2003), sendo que nela os mais abundantes são o acético, o fórmico e o propanóico (Moreira et al., 2000). São duas as principais vias que originam estes ácidos, sendo a primeira a degradação de açúcares e pirólise da sacarose, e a segunda via ocorre pela degradação térmica de compostos de “Amadori” (Moreira et al., 2000).

Em 1912, Louis-Camille Maillard descobriu a reação amino-carbonila quando pesquisava síntese de peptídeos sob condições fisiológicas (Namiki, 1988). A reação de “Maillard”, como ficou conhecida, tem sido tradicionalmente apontada como responsável pela geração de aromas como assado, torrado ou tipo caramelo, assim como o desenvolvimento de coloração marrom em alimentos que são expostos a temperaturas altas (Ho et al., 1993). Este processo compreende três estádios, sendo que o primeiro é a condensação entre o grupo carbonila de um açúcar redutor e o grupo amino de aminoácidos livres. O segundo passo é o rearranjo do composto formado no passo anterior podendo formar o composto de “Amadori” (1-amino-1-desoxi-2-cetose) ou o composto de “Heynes” (2-amino-2-desoxi-1-aldose) e estes dois compostos após algumas reações produzem intermediários α -dicarbonilas. O terceiro passo é a polimerização destes intermediários para a formação de pigmentos de melanoidinas (Ho et al., 1993).

Experimentos contendo hidroxí-aminoácidos e sacarose deram origem a piridinas, sendo que as alquil-piridinas foram os compostos característicos neste

experimento (Baltes & Bochmann, 1987; De Maria et al., 1999). A degradação de açúcares, através da pirólise da sacarose e da reação de “Maillard”, dá origem aos furanos. Alguns destes compostos contribuem consideravelmente para as características sensoriais da bebida, sendo que o mais conhecido é o 2-tio-hidroximetil-furano, conhecido desde a década de 20. Dependendo da concentração deste composto o café torrado apresenta aroma de café torrado fresco (0,01 a 0,5 µg/L) ou de torrado velho (1 a 10 µg/L). Outros compostos também importantes são o caveofurano, o 2-etil-furano, o furano, o 2-metil-furano e o furfural. Também são encontrados as furanonas, que dão aroma de caramelo à bebida, e o 2-hidroximetil-furano, que confere o aroma amargo e de matéria queimada. Uma série de pirróis é formada através da reação de “Maillard” ou simplesmente pela pirólise de aminoácidos, como foi observado em serina e treonina. Neste grupo há alguns compostos de impacto no aroma do café, como é o caso do N-furfuril-2-metil-pirrol e do N-etil-2-formil-pirrol (De Maria et al., 1999). A reação de “Maillard”, a pirólise de hidroxi-aminoácidos e a reação entre compostos α -carbonil e α -aminoácidos (reação de “Strecker”), também são responsáveis pela formação de pirazinas. Há vários compostos deste grupo que apresentam contribuições sensoriais para o café, entre eles estão as metoxi-pirazinas, a isobutil-metoxi-pirazina, a 2-etil-3,5-dimetil-pirazina, a 2,3,5-trimetil-pirazina, a 2-vinil-5-metil-pirazina e a isopropenil-pirazina (Maria et al., 1999).

Além da reação com aminoácidos livres, os açúcares também podem reagir com peptídeos e proteínas. Aproximadamente 45% do total de proteínas encontradas nas sementes de café são proteínas de reserva, sendo que estas são fontes de aminoácidos e compostos nitrogenados para a germinação da semente (Montavon et

al., 2003). É interessante ressaltar que proteases presentes na semente estão envolvidas na quebra de certas proteínas, desta maneira liberando aminoácidos que podem posteriormente estar relacionados a reações relacionadas ao aroma e sabor da bebida (Ludwig et al., 2000). Com o processo de torrefação, dos aproximadamente 12% de proteínas encontradas em grãos verdes, restaram cerca de 3% (Reineccius, 1995). Foi observado também que proteínas ligadas à lisina podem produzir uma variedade de compostos, entre eles furanos e piranos, através da reação de “Maillard”. Também é conhecido que a deaminação espontânea de resíduos de asparagina e glutamina pode resultar na formação de amônia, sendo que esta molécula entra numa série de reações que levam à formação de compostos que produzem pirazinas (Ho et al., 1993). Já a 2,5-dimetil-3-etil pirazina é produzida a partir do dipeptídio alanina-aspartato, composto considerado de impacto no aroma da bebida (Reineccius, 1995). Pirrol e alquil-pirróis podem ser formados pela pirólise de aminoácidos ligados a proteínas (De Maria et al., 1996; De Maria et al., 1999).

Os ácidos clorogênicos são ésteres formados entre o ácido quínico e o resíduo de um dos ácidos cinâmicos, entre eles o caféico, o *p*-cumárico ou o ferúlico. A composição destes ácidos no café é muito complexa, sendo que há cinco grupos principais: ácidos cafeoilquínicos (sendo o 5-cafeoilquínico o mais abundante em sementes verdes), ácidos feruloilquínicos, ácidos dicafeoilquínicos, ácidos *p*-coumailquínicos e ácidos cafeoilferuloilquínicos (Trugo & Macrae, 1984). *C. arabica* apresenta aproximadamente de 5 a 8% (com base em massa seca) de ácidos clorogênicos em sementes verdes. Nos grãos de café foi comprovado que estes ácidos formam complexos com a cafeína (Horman & Viani, 1972) e posteriormente

foi proposto que eles são compartimentalizados no vacúolo (Waldhauser & Baumann, 1996).

Após torrefação leve, aproximadamente 61% dos ácidos clorogênicos presentes nos grãos de café verde de *C. arabica* sofrem degradação. Este processo dá origem a uma variedade de fenóis. O guaiacol e o 4-vinil-guaiacol são importantes compostos na composição do aroma do café, com o guaiacol apresentando odor de matéria queimada e o 4-vinil-guaiacol de especiarias. O fenol também é um composto encontrado em abundância na bebida (Moreira et al., 2000).

1.10. Atividade antioxidante

Antioxidantes são compostos que impedem ou retardam a oxidação de outras moléculas ao inibirem a iniciação ou propagação de reações de oxidação em cadeia. São considerados antioxidantes naturais os compostos fenólicos, os compostos nitrogenados, os carotenóides e o ácido ascórbico (Velioglu et al., 1998). A atividade antioxidante em grãos verdes de café é creditada à presença de ácidos clorogênicos, ácidos fenólicos, polifenóis e alcalóides (Brezová et al., 2009). Dependendo das condições de torrefação, estes compostos são parcialmente decompostos, entretanto há a geração de novos compostos que também possuem capacidade antioxidante, como o caso de melanoidinas, que são gerados a partir da reação de “Maillard” (Del Castillo et al., 2002; Brezová et al., 2009).

Foi observado que tanto o ácido caféico quanto a cafeína, ambos compostos presentes nos grãos de café, apresentaram atividades antioxidante em experimentos

in vitro (Brezová et al., 2009), assim como também o ácido clorogênico (Chen & Ho, 1997).

Dos compostos heterocíclicos encontrados nos grãos após a torrefação, os que apresentaram maior atividade antioxidante foram os pirróis. Furanos também apresentaram atividade antioxidante, mas em menor grau do que o composto anterior. Entretanto os tiazóis e as pirazinas não apresentaram atividade antioxidante significativa (Yanagimoto et al., 2002).

1.11. O café naturalmente descafeinado

Em 1987 foi iniciado no Instituto Agrônomo de Campinas (IAC) um programa de melhoramento genético para redução do teor de cafeína em cafeeiros (Mazzafera & Carvalho, 1992; Mazzafera et al. 1997; Silvarolla et al. 1999; Silvarolla et al. 2000), e também como parte deste programa foram feitas análises em material da Etiópia mantido na coleção de germoplasma do IAC (Silvarolla et al., 2000; Silvarolla et al., 2004). Entre aproximadamente 3000 cafeeiros que representavam 300 acessos de *C. arabica* provenientes da Etiópia foram descobertas três árvores que apresentavam concentração muito baixa de cafeína em suas sementes (Silvarolla et al., 2004). Estas plantas foram nominadas AC1, AC2 e AC3 em homenagem ao geneticista Alcides Carvalho, falecido em 1992 e tido como a maior autoridade no melhoramento do café no Brasil. A planta AC1, a qual se mostrou geneticamente mais apta para a transferência do caráter “ausência de cafeína” para variedades com alta produtividade (comunicação pessoal de Maria Bernadete Silvarolla), apresentava na

semente cafeína na ordem de 0,76 mg /g de massa seca. Também foi descoberto que esta planta acumulava teobromina, precursor imediato da cafeína. Experimentos com [¹⁴C]-cafeína indicaram que as folhas de AC1 não apresentavam disfunção na degradação deste composto, enquanto que ao administrar [2-¹⁴C]-adenina às folhas, elas acumularam teobromina marcada com radioatividade. Estes dados indicaram que a baixa quantidade de cafeína nas folhas seria devida a uma mutação no gene da cafeína sintase.

2. OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo o estudo bioquímico da planta AC1 comparativo com a variedade Mundo Novo, que teve como foco o estudo no metabolismo de metilxantinas em folhas, raízes, flores e frutos em diferentes fases de maturação.

Os objetivos específicos foram:

- Analisar o desenvolvimento do fruto de AC1;
- Analisar qualitativamente e quantitativamente as metilxantinas em raízes, folhas, internódios e flores do cafeeiro naturalmente descafeinado e nos diferentes tecidos e estádios de desenvolvimento do fruto;
- Explicar as prováveis causas da baixa quantidade de cafeína encontrada nos frutos de AC1;
- Analisar quantitativamente e qualitativamente os compostos e os precursores responsáveis pelo sabor e aroma do café naturalmente descafeinado;

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material vegetal

Frutos, folhas, flores, internódios de ramos plagiotrópicos e raízes de *C. arabica*, tanto da variedade Mundo Novo (MN), utilizada como controle, quanto da planta AC1, naturalmente descafeinada, foram coletados na área Experimental da Fazenda Santa Elisa do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), Campinas, SP. As coletas, que ocorreram em condições de campo, sempre foram auxiliadas e acompanhadas pela pesquisadora Maria Bernadete Silvarolla, do Centro de Café Alcides Carvalho daquela instituição.

Amostragem 1: Nesta primeira etapa foram coletados dos indivíduos fragmentos de 20 cm de raízes secundárias e terciárias (somente embaixo da saia do cafeeiro) ; os três primeiros pares foliares a partir do ápice, sendo o primeiro com aproximadamente 1cm, o segundo com 5 cm e o terceiro com 8 cm; e aproximadamente cinco fragmentos dos primeiro, terceiro e quinto internódios a partir dos ramos plagiotrópicos. Foram feitas análises quantitativas e qualitativas de metilxantinas em todos estes órgãos. As coletas foram feitas no final do mês de outubro de 2004.

Amostragem 2: Entre os anos de 2005 e 2006 foram feitas coletas de flores logo após antese e frutos em diferentes estádios fenológicos. Ao todo foram feitas oito coletas de frutos, sendo que nestas foram obtidos desde frutos bem jovens (chumbinho) até completamente desenvolvidos e maduros (cereja). Na primeira coleta, que ocorreu no mês de outubro, foram coletados frutos com 15 dias após o

florescimento (DAF), no estágio chumbinho. Já na segunda coleta (43 DAF), feita no mês de novembro, e na terceira (70 DAF), em dezembro, foram coletados frutos no estágio de expansão. Na quarta coleta (100 DAF), que foi feita no mês de janeiro, foram coletados frutos no início do estágio de grão verde. A quinta (136 DAF) e a sexta (143 DAF) coletas foram feitas no mês de fevereiro, e os frutos ainda estavam na fase de grão verde. A sétima (162 DAF) e a oitava (179 DAF) coletas foram feitas no mês de março, sendo que nesta última os grãos estavam no estágio cereja. Em cada etapa aproximadamente 30 frutos de cada árvore foram retirados, sendo que nas mesmas datas também foram feitas coletas do primeiro par de folhas, com aproximadamente 2 cm cada um. Nos mesmos dias em que as coletas foram realizadas, 20 destes frutos foram dissecados e seus tecidos separados e congelados para análises posteriores. Os frutos restantes foram congelados inteiros. Com os frutos destas coletas foram obtidas as massas frescas e secas, e com os extratos dos endospermas destes frutos foram feitas análises de metilxantinas, trigonelina, açúcares, ácidos orgânicos, ácidos clorogênicos e aminoácidos por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Com estes mesmos extratos também foram feitas análises colorimétricas de compostos fenólicos totais e com extratos de frutos completamente maduros foram quantificados aminoácidos totais. Análises qualitativas e quantitativas de metilxantinas foram feitas em extratos de folhas e flores.

Amostragem 3: Esta coleta compreendia frutos verdes com endospermas ocupando todo o lóculo. Logo após a coleta, estes frutos foram dissecados, os endospermas prontamente congelados com auxílio de N₂ líquido e posteriormente congelados em freezer -80 °C. Com os endospermas destes frutos, que foram

coletados em janeiro de 2007, foram feitas as análises enzimáticas de teobromina e cafeína sintase e as análises de reação em cadeia da polimerase (RT)-PCR.

Amostragem 4: Numa quarta etapa, em janeiro 2008, frutos verdes com endospermas líquidos, mas ocupando todo o lóculo, e folhas jovens com aproximadamente 2 cm foram coletados e utilizados em experimentos de metabolismo de [2-¹⁴C]cafeína e [2-¹⁴C]adenina.

Amostragem 5: Foram fornecidos pela pesquisadora Maria Bernadete Silvarolla grãos verdes secos que foram utilizados para análises de atividade antioxidante e proteínas de reserva por eletroforese SDS-PAGE.

3.2. Massas frescas e secas durante o desenvolvimento dos frutos

Após cada coleta (amostragem 2), aproximadamente 20 frutos de cada planta foram dissecados com o auxílio de um bisturi e os diferentes tecidos, pericarpo, perisperma e quando presente o endosperma, foram pesados em balança analítica para obtenção da massa fresca. Após a dissecação estes tecidos foram imediatamente colocados em tubos mantidos em gelo. Posteriormente estes tecidos foram congelados em N₂ líquido, liofilizados e após secos foram novamente pesados para a obtenção da massa seca.

3.3. Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

3.3.1. Extração de endospermas, perispermas, pericarpos, folhas, flores, internódios e raízes

Para as análises de metilxantinas (cafeína e teobromina), trigonelina, ácidos clorogênicos, açúcares e aminoácidos; endospermas, perispermas, pericarpos, folhas, flores, internódios e raízes (amostragens 1 e 2) foram liofilizados e posteriormente macerados com o auxílio de almofariz e pistilo e as extrações foram feitas com 100 mg de tecido em 5 mL de metanol a 70% em banho-maria a 50 °C por 1 h.

Para a análise de ácidos orgânicos foram utilizados 100 mg de endosperma em 5 mL de ácido sulfúrico a 4 mM contendo 5 mM de DTT. Durante 1 hora a amostra foi mantida no gelo sob agitação.

Os extratos foram centrifugados, armazenados em freezer a -30 °C e antes de serem inseridos no sistema de HPLC foram novamente centrifugados por 10 min a 12000 x g.

3.3.2. Quantificação de compostos

3.3.2.1. Metilxantinas e trigonelina

As análises quantitativas de cafeína e teobromina foram feitas em cromatógrafo Shimadzu equipado com sistema de bombas LC-10 Ai, injetor automático, detector de diodo SPD-M10A e coluna C18 (4,6 mm x 250 mm, poros de 0,1 nm, partículas 5 µm, ACE-121-2546). Foram injetados 10 µL de amostra a um

fluxo de 0,8 mL/min. As fases móveis utilizadas foram ácido acético a 0,5 % (A) e metanol (B) compondo gradiente de: 0-5 min de 0 a 5% de B, 5-30 min de 5 a 70% de B, 30-32 min de 70 a 100% de B, 32-34 min de 100 a 0% de B e de 34-44 min foi mantido 0% de B. Os compostos foram detectados por um detector de diodo (DAD) com $\lambda = 272$ nm. O programa utilizado para detectar e calcular a área dos picos foi o CLASS-VP. Para cálculo de concentrações foram utilizados como padrões puros de cafeína, teobromina e trigonelina (Sigma). Enquanto análises de trigonelina foram realizadas em endospermas, as de metilxantinas foram realizadas em endospermas, pericarpos, perispermas, folhas, flores, internódios e raízes de MN e AC1. As amostras utilizadas foram as descritas no item 3.3.1.

3.3.2.2. Açúcares (glicose, frutose e sacarose) em endospermas

As análises quantitativas de glicose, frutose e sacarose foram feitas em cromatógrafo Shimadzu equipado com sistema de bombas LC-10 Ai e injetor automático. Estas amostras foram analisadas com detector eletroquímico (400 mV) e a coluna utilizada foi Dionex CarboPac™ PA1 (4 x 250 mm) e uma pré-coluna Dionex CarboPac™ PA1 (4 x 50 mm). Foram injetados 2 μ L de amostra e o fluxo utilizado foi de 1,2 mL/min. As fases móveis utilizadas foram água (A) e NaOH 200 mM (B), sendo que a concentração de NaOH durante os 15 minutos da corrida foi de 40 mM. O programa utilizado para detectar e calcular a área dos picos foi o CLASS-VP. Para cálculo de concentrações foram utilizados padrões puros, na concentração de 1 mg/mL, de glicose, frutose e sacarose (Sigma). As amostras utilizadas foram as descritas no item 3.3.1.

3.3.2.3. Aminoácidos livres em endospermas

As análises qualitativas e quantitativas de aminoácidos foram feitas no cromatógrafo Shimadzu equipado com injetor manual com válvula Rheodyne e loop de 20 µL, sistema de bombas LC-10 Ai e detector de fluorescência (RF- 10 AXL) com extinção em 250 nm e emissão em 480 nm. Foi utilizada uma coluna C18 (4 mm x 250 mm, partículas de 5 µm, Supelco LC-18). O tampão A era composto de 50 mM de acetato de sódio, 50 mM de Na₂HPO₄, sendo o pH ajustado para 7,25 com HCl concentrado e complementado com tetrahidrofurano e metanol até a concentração de 0,2% cada. O tampão B continha metanol e água (65/35, v/v). O gradiente utilizado foi de 0-21 min de 25 a 46% de B, 21-26 min de 46 a 48% de B, 26-35 min de 48 a 60% de B, de 35-45 min de 60 a 70% de B, de 45-49 min de 70 a 100% de B, de 49 a 64 min continuou com 100% de B e de 64 a 65 de 100 a 25% de B. A amostra foi preparada utilizando-se o método OPA-Borato (Jarrett et al., 1986). Neste processo, que é feito em frasco coberto com papel alumínio, 20 µL de amostra são misturados a 60 µL de reagente OPA-Borato e após 2 min de reação, 10 µL da mistura são injetados no cromatógrafo. O programa utilizado para detectar e calcular a área dos picos foi o CLASS-VP. Este método não detecta cisteína e não é eficiente para prolina. O padrão utilizado (Sigma) para cálculo de concentrações foi uma mistura de aminoácidos (Asp, Glu, Arg, Lys, Asn, His, Gln, Ser, Thr, Ala, Gly, Val, Leu, Phe, Tyr, Ile, Met). As amostras utilizadas foram as descritas no item 3.3.1.

3.3.2.4. Ácidos clorogênicos em endospermas

As análises quantitativas de ácidos clorogênicos foram feitas no cromatógrafo Shimadzu equipado com injetor automático, detector de diodo (DAD) e coluna C18 (4,6 mm x 250 mm, poros de 0,1 nm e partículas com 5 µm, ACE-121-2546). No sistema de fase reversa foram injetados 10 µL de amostra a um fluxo de 0,8 mL/min. O gradiente utilizado foi o mesmo utilizado para metilxantinas e trigonelina. Os compostos foram detectados em 313 nm. O programa utilizado para detectar e calcular a área dos picos foi o CLASS-VP. Para cálculo de concentrações foi utilizado como padrão o ácido 5-cafeoilquínico – 5CQA (Sigma) para todos os ácidos clorogênicos. A identificação dos ácidos clorogênicos foi feita através do espectro de absorção no ultravioleta pelo DAD. As amostras utilizadas foram as descritas no item 3.3.1.

3.3.2.5. Ácidos orgânicos em endospermas

As análises quantitativas de ácidos orgânicos foram feitas no cromatógrafo Shimadzu equipado com injetor manual com válvula Rheodyne e loop de 100 µL, detector UV e coluna de exclusão iônica Aminex HPX-87H. Foram aplicados 15 µL de amostra a um fluxo de 0,6 mL/min sendo que os compostos foram analisados a 210 nm. A fase móvel utilizada foi ácido sulfúrico a 4 mM e a corrida isocrática teve duração de 30 min. Para cálculo de concentrações foram utilizados padrões puros dos ácidos oxálico, málico, cítrico e succínico.

Para todas as análises em HPLC, as substâncias foram identificadas por co-cromatografia de padrões puros com amostras.

3.4. Análises colorimétricas

3.4.1. Quantificação de compostos fenólicos

A quantificação de compostos fenólicos foi feita utilizando o reagente Folin-Ciocalteu (Swain & Hillis, 1959). A curva de calibração foi obtida na faixa de 5 a 50 µg de 5CQA. As leituras foram feitas em espectrofotômetro (Pharmacia Biotech, Ultrospec 1000) em comprimento de onda de 725 nm. As amostras utilizadas nesta análise foram de endospermas, extraídas como descrito no item 3.3.1.

3.4.2. Quantificação de aminoácidos livres totais

As determinações foram feitas em alíquotas de 50 µL das amostras e usando a metodologia desenvolvida por Cocking e Yemm (1954), por reação colorimétrica com ninidrina. A curva de calibração foi obtida na faixa de 20 a 100 nmol de leucina. As leituras foram feitas em espectrômetro (Pharmacia Biotech, Ultrospec 1000) em comprimento de onda de 570 nm. A amostra utilizada neste experimento foi a de endospermas no estádio cereja, extraída como descrito no item 3.3.1.

3.4.3. Atividade antioxidante por 2,2-difenil-picrilidrazil (DPPH)

Para estas análises foram utilizadas diferentes concentrações de extratos metanólicos a 70% de endospermas completamente desenvolvidos de MN e AC1. As concentrações utilizadas de cada amostra foram: 8, 16, 32, 48, 64 e 80 µg de endosperma/mL. Os tecidos foram extraídos com metanol conforme descrito no item 3.3.1. A curva cinética foi obtida através do monitoramento do radical livre de nitrogênio do composto 2,2-difenil-picrilidrazil (DPPH) na presença de cada extrato. Para este experimento, que foi adaptado volumetricamente para placa de 96 poços, foram adicionados 200 µL de solução de DPPH, a 100 mM, a 50 µL das diferentes concentrações dos extratos. Os brancos foram feitos com metanol a 70% e os resultados de absorvância no tempo zero foram conseguidos ao adicionar DPPH a metanol a 70% (Maróstica Jr. et al., 2009). A capacidade antioxidativa do extrato foi medida através do decréscimo na absorvância em 517 nm nos intervalos de tempo de 0, 1, 5, 10, 15, 20, 25 e 30 min. Para cada tempo, a atividade foi calculada segundo a seguinte fórmula: $[(\text{Absorbância da amostra} - \text{Absorbância do branco}) /$

Absorbância do DPPH com metanol] *100. Todas as determinações foram feitas em triplicatas.

3.5. Análise de proteínas de reserva por eletroforese desnaturante

Endospermas completamente desenvolvidos de MN e AC1 foram liofilizados e posteriormente macerados em moinho de facas até se tornarem pó. Durante 3 horas o material foi mantido em Soxhlet com n-hexano para retirada de lipídeos e em seguida deixado em capela por 16 h para evaporação do solvente. O pó delipidado foi extraído no gelo (4°C), em almofariz e pistilos gelados, utilizando-se 500 mg de endosperma para 3 mL de tampão desnaturante (Tris-HCl 40 mM, pH 8.0, uréia 7 M, tiouréia 2 M, ditiotretitol 1 mM). A extração durou 10 min e o extrato foi centrifugado por 20 min em centrífuga refrigerada (4°C) a 20.000 x g. Diferentes quantidades de proteínas, 5 µg e 10 µg (Bradford, 1976), foram extraídas dos endospermas de MN e AC1 e foram aplicadas em gel de SDS-PAGE 12,5% (Laemmli, 1970). Foi utilizado um padrão de baixo peso molecular (GE Life Sciences, USA) e o gel foi corado com Coomassie Brilliant Blue R-250. As bandas foram detectadas e localizadas com o programa UN-SCAN-IT gel 6.1.

3.6. Análises de expressão gênica

3.6.1. Extração de RNA total e tratamento com DNase

Os RNAs totais de endospermas de MN e AC1 foram isolados utilizando-se o reagente TRIzol[®] (Invitrogen), segundo recomendações do fabricante. Para ter garantia da integridade do RNA extraído foi feita uma eletroforese em gel de agarose a 1% e em seguida o RNA extraído de cada amostra foi quantificado em espectrofotômetro a 260 nm e sua quantidade avaliada com base na relação da absorbância 260 - 280 nm. Cerca de 10 µg de RNA foram tratadas com DNase, com o kit Turbo DNase Ambion[®], para que qualquer resquício de DNA genômico fosse eliminado.

3.6.2. Síntese de cDNA

O cDNA utilizado na quantificação pela técnica de reação em cadeia da polimerase por transcriptase reversa (RT-PCR) foi sintetizado a partir de 2 µg de RNA total com a utilização do kit SuperScript[™] First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen). A síntese foi feita a 37° C por 60 minutos.

3.6.3. Análise qualitativa por RT-PCR

Foram feitas análises de expressão por RT-PCR dos genes que codificam as enzimas 7-metilxantosina sintase (CmXRS1), teobromina sintase (CTS2) e cafeína sintase (CCS1). O gene da actina foi usado como normalizador. As reações foram

feitas utilizando-se o kit Taq DNA polimerase (Qiagen). Estas foram postas no termociclador (Eppendorf Mastercycler Personal) programado para 30 ciclos de amplificação com as seguintes condições de reação: 94°C – 45 s (desnaturação), 55°C – 30 s (anelamento) e 72°C – 90 s (extensão). Os produtos de reação foram separados em gel de agarose a 1%, com tampão Tris-acetato-EDTA (TAE) em cuba de eletroforese (Amersham). Os géis foram corados com brometo de etídeo e as bandas foram visualizadas sob luz UV e a densidade ótica das bandas calculada através do programa GEL DOC (Quantity One, BioRad).

Os primers usados nas análises de teobromina sintase (CTS2: Forward 5'-CCCGTCCAGAAGGCATATTT-3' e Reverse 5'-GAGAAGGCATCATAATGGG-3') e cafeína sintase (CCS1: Forward 5'-CGCAATCTTGAGAAAGAA-3' e Reverse 5'-CAGGATACAGGGGAATGGGATC-3') foram desenhados pela Dra. Miriam Peres Maluf, da Embrapa-Café, sediada no Centro de Café Alcides Carvalho do IAC. Os primers de 7-metilxantosina sintase foram aqueles desenhados por Koshiro et al. (2006), Forward 5'-ATGCCCGGCTCTTTCTACAG-3' e R:5'-CGGGCGTCTAATTCAACTCCT-3'.

3.6.4. Análise semi-quantitativa por RT-PCR

A normalização da expressão do gene endógeno de actina foi feita utilizando-se 25 ciclos com a seguinte programação: 94°C – 3 s, 52°C – 30 s e 72°C – 60 s. Já os genes de 7-metilxantosina sintase (*CmXRS1*), teobromina sintase (*CTS2*) e cafeína sintase (*CCS1*) foram amplificados como descrito acima. As reações foram feitas utilizando-se o kit Taq DNA polimerase (Fermentas). Os produtos de reação

foram separados em gel de agarose 1%, com tampão TAE em cuba de eletroforese (Amersham). Os géis foram corados com brometo de etídeo e as bandas visualizadas e fotografadas através do programa GEL DOC (Quantity One, BioRad), o qual também permite determinar as densidades dos produtos de PCR (bandas) nos géis.

3.7. Atividade das enzimas cafeína sintase e teobromina sintase

Foram medidas as atividades enzimáticas das metiltransferases teobromina sintase (E.C. 2.1.1.159) e cafeína sintase (E.C.2.1.1.160) nos endospermas. Os endospermas foram separados dos frutos congelados com nitrogênio líquido. Estes foram macerados até pó com o auxílio de pistilo e almofariz previamente resfriados. Para cada grama de endosperma foram adicionados 5 mL de tampão de extração composto de fosfato de sódio a 200 mM, 5 mM de EDTA, 0,7 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de 2- β mercaptoetanol, 1,5% de ácido ascórbico e 4% de polivinilpolipirrolidona (Kato et al., 1996). Após homogeneização, o extrato ficou durante 15 min no gelo, sob leve agitação, e posteriormente foi centrifugado por 15 min a 30.000 xg, a 4°C. O sobrenadante foi separado e saturado a 80% com sulfato de amônio e centrifugado por 15 min a 30.000 xg, a 4°C. O precipitado recuperado foi solubilizado em tampão fosfato a 200 mM e dessalinizado em uma coluna PD10 (Amersham Pharmacia Biotech, UK), a qual foi previamente equilibrada com o mesmo tampão (Koshiro et al., 2006). A concentração de proteínas neste extrato foi determinada segundo método de Bradford (1976).

A dosagem da teobromina sintase foi feita utilizando-se 7-metilxantina (Sigma) como substrato, enquanto que para a dosagem da cafeína sintase o substrato utilizado foi a 1,7- dimetilxantina, ou paraxantina (Sigma). Em frascos de 1,5 mL, foram adicionados 0,11 μCi de [^3H]-S-adenosil metionina, aproximadamente 100 μg de proteína, 10 μL de substrato a 3,5 mM e tampão fosfato a 50 mM para o volume final de 200 μL . A reação foi incubada a 28°C durante 30 min e em seguida foram adicionados 100 μL de HCl a 6 N para que a reação fosse interrompida. Em cada frasco foi colocado 1 mL de clorofórmio, quando o substrato utilizado foi paraxantina,

e clorofórmio e álcool isopropílico na proporção 17:3 (v/v) quando o substrato utilizado foi 7-metilxantina. Cada frasco foi agitado com a utilização de um vortex por 30 s e a fração clorofórmica foi coletada com o auxílio de uma seringa. As frações foram postas em vidros de cintilação e levadas a estufa a 80°C. Após total secagem, foi adicionado 5 mL de líquido de cintilação e a leitura para radioativos ^3H foi feita em cintilador (Mazzafera et al., 1994b).

3.8. Metabolismo de [^{14}C]adenina e [^{14}C]cafeína em folhas e frutos

Folhas jovens, com aproximadamente 2 cm, foram destacadas dos ramos sob água e tiveram os pedúnculos individualmente colocados em frascos de 1,5 mL contendo aproximadamente 1 mL de água. Duas lâmpadas fluorescentes (20W) foram postas próximas aos frascos (50 cm) e após ter sido observada absorção d'água por redução do seu volume no frasco, retirou-se bastante da água e adicionou-se 0,2 μCi de [^{14}C]cafeína em 3 folhas de MN e em 3 folhas de AC1 e 0,2 μCi de [^{14}C]adenina em 3 folhas de MN e outras 3 folhas de AC1. Após 48 horas, as folhas foram retiradas da solução aquosa, congeladas e liofilizadas.

Com bisturi foi retirada uma pequena parte de frutos verdes, próximos ao pedúnculo. Estes frutos foram então colocados em gerbox, sendo fixados ao fundo com lanolina, deixando a parte cortada para cima. Para evitar oxidação no corte, foram adicionados 20 μL de tampão fosfato a 100 mM, pH 7. Após absorção do tampão, foi adicionado 0,2 μCi de [^{14}C]cafeína para cada um dos 8 frutos de MN e 8 de AC1; além de 0,2 μCi de [^{14}C]adenina para cada um dos 8 frutos de MN e 8 de AC1. No centro do gerbox foi colocado papel de filtro umedecido e a montagem foi

colocada sob luz branca fluorescente em câmara de crescimento por 24 h quando metade dos frutos de cada tratamento foi retirada. Os frutos restantes ficaram por mais 24 h sob as mesmas condições, totalizando 48 h de incubação. Após cada retirada os endospermas foram separados, congelados e liofilizados.

Após secagem de endospermas e folhas, as metilxantinas foram extraídas. As diferentes partes das plantas foram maceradas com o auxílio de almofariz e pistilo e foi feita a extração na proporção de 20 mg de tecido/mL de metanol a 70%. Os macerados foram colocados em frascos com tampa rosqueada e postos em banho-maria a 50 °C por 1 h. Os extratos foram transferidos para tubos de microcentrífuga de 1,5 mL e centrifugados por 10 min a 12.000 xg. Após centrifugação, 500 µL de cada amostra foram transferidos para outros frascos de 1,5 mL e colocadas para secagem em Speed-Vac (Savant). Após totalmente secas, as amostras foram solubilizadas em 30 µL de água e mantidas sob agitação constante por 1 h. As amostras foram aplicadas em placas de cromatografia de camada delgada de sílica GF₂₅₄ (Merck, Darmstadt, Germany) e sobre elas 5 µg dos padrões de cafeína, teobromina e teofilina. A corrida foi feita com clorofórmio:metanol (9:1). Com o uso de lâmpadas UV 254 nm as substâncias cafeína, teobromina e teofilina foram localizadas nas placas e as manchas circundadas com lápis. Os R_f's para cafeína, teobromina e teofilina foram respectivamente 0,51, 0,37 e 0,41. Com o auxílio de uma espátula a placa foi raspada nos locais específicos onde se detectou as metilxantinas e cada mancha raspada foi colocada em tubos de cintilação, aos quais foram adicionados 1 mL de metanol e 5 mL de líquido de cintilação. Cada amostra foi lida em contador de radioatividade com leitura para o isótopo ¹⁴C por 2 min.

3.9. Análise estatística

As concentrações de cafeína, teobromina, trigonelina, açúcares, aminoácidos, ácido orgânicos e ácidos clorogênicos nos diferentes tecidos de frutos foram estimados com base na média de três replicatas técnicas de uma mesma extração e respectivos desvios padrões. Os tecidos utilizados em cada extração, como descrito no item 3.3.1, eram uma amostra composta referente a aproximadamente 20 frutos. Para folhas maduras foram feitas 3 replicatas técnicas de uma mesma extração e respectivos desvios padrões, sendo que foi utilizada uma mistura de 4 folhas para o extrato. Compostos fenólicos e aminoácidos livres totais foram estimados com base na média de 3 replicatas técnicas de uma mesma extração e respectivos desvios padrões. Quanto a atividade antioxidante e proteínas totais solúveis foram feitas duas extrações biológicas, sendo que para cada uma destas extrações foram feitas 3 replicatas técnicas, além de respectivos desvios padrões. As atividades enzimáticas cafeína sintase e teobromina sintase foram estimadas com base na média de 5 repetições biológicas e respectivos desvios padrões. Para metilxantinas de diferentes pares foliares e internódios apenas uma repetição foi feita.

Nos experimentos de RT-PCR e RT-PCR semiquantitativa, para cada gene que foi analisado (CmXRS1, CTS2 e CCS1), foram feitas duas repetições biológicas e tréplicas de reações de cada repetição.

4. RESULTADOS

4.1. Acúmulo de massas frescas e secas em frutos

As massas frescas dos frutos de MN e AC1 durante o desenvolvimento podem ser observadas nas fig. 5A e 5B, respectivamente. Os primeiros frutos foram coletados quando se apresentavam na forma de “chumbinho”. Nesta fase inicial não foi possível separar os frutos em seus diferentes tecidos e, portanto, não são apresentados dados deste estágio, apenas a massa total. As massas frescas dos primeiros frutos coletados de MN apresentaram média de 16,8 mg, enquanto que o valor médio encontrado para frutos de AC1 foi de 25 mg. Quando observamos as massas secas, que podem ser observadas na fig. 6, encontramos valores similares para os dois frutos.

Na coleta feita 43 dias após o florescimento (DAF) os frutos coletados já puderam ser separados em pericarpo e perisperma, sendo que este último tecido ocupava todo o lóculo do fruto. Também foi possível observar que ambos os tecidos apresentavam coloração verde. Na coleta do mês seguinte, ou seja, 70 DAF, os frutos, apesar de maiores, ainda só apresentavam pericarpo e perisperma. Foram observados acréscimos tanto de massa fresca quanto de massa seca em relação aos frutos na fase chumbinho.

O endosperma, em ambos os casos, surgiu em torno de 100 DAF. Tanto em frutos de MN quanto de AC1 o endosperma ocupava uma pequena parte do lóculo, além de apresentar aspecto leitoso e coloração esbranquiçada. Apesar de ambos terem aparecido a partir desta coleta, os endospermas de MN tinham em média 24

mg de massa fresca, apresentando tamanho reduzido se comparados aos de AC1, com massa em torno de 124 mg, diferença também observada ao analisar as massas secas deste tecido nos dois tipos de frutos. Foi interessante observar que a massa do perisperma encontrada em MN apresentou valor muito parecido ao da coleta anterior, enquanto que em AC1 foi possível ver uma perda de massa de 23% em relação à coleta anterior nos frutos da planta descafeinada. Ao verificar as massas secas dos perispermias foi observado que em ambos os casos houve perda de massa.

Na coleta após 136 DAF, o endosperma apesar de ainda ter aspecto leitoso já ocupava todo ou a maior parte do lóculo anteriormente ocupado pelo perisperma. Neste estágio este último tecido tornou-se a película prateada envolvendo todo o endosperma. Após sete dias foi observado aumento na massa seca de endospermias de AC1 e diminuição da massa seca do perisperma em relação a coleta anterior. Já em MN estas massas apresentaram valores próximos se compararmos as duas coletas.

Na coleta seguinte, que foi aos 147 DAF, um aumento nas massas secas e frescas de todos os tecidos analisados pode ser observado em AC1. Em MN foi observada um decréscimo de 6,83% nas massas dos frutos secos, que foi devida a uma pequena diferença na massa do endosperma. Este tecido, em ambos os casos, deixou de ser leitoso e ganhou consistência.

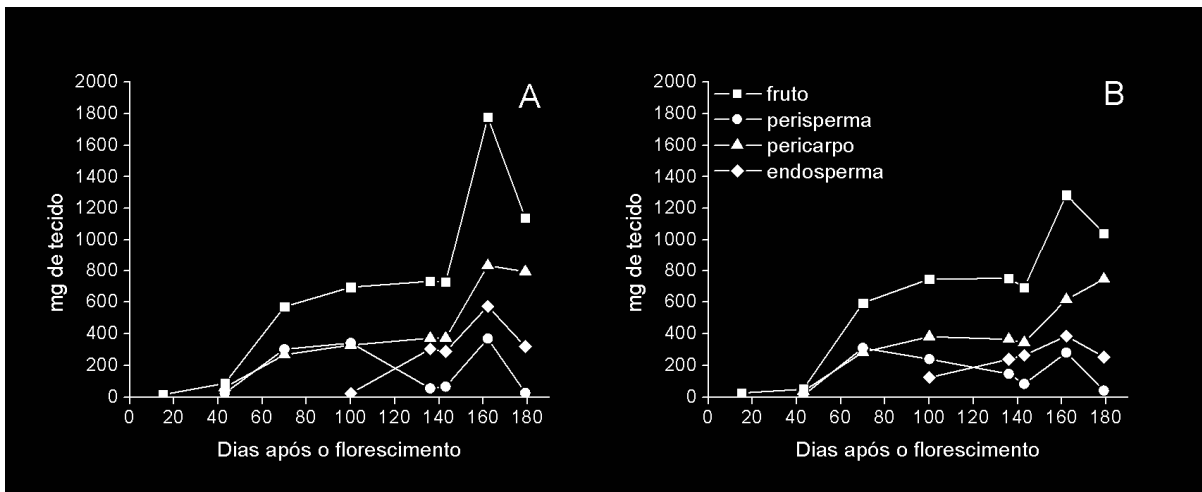


Figura 5. Massas frescas dos diferentes tecidos de 20 frutos da variedade Mundo Novo (A), utilizada como controle, e da planta AC1 (B), naturalmente descafeinada.

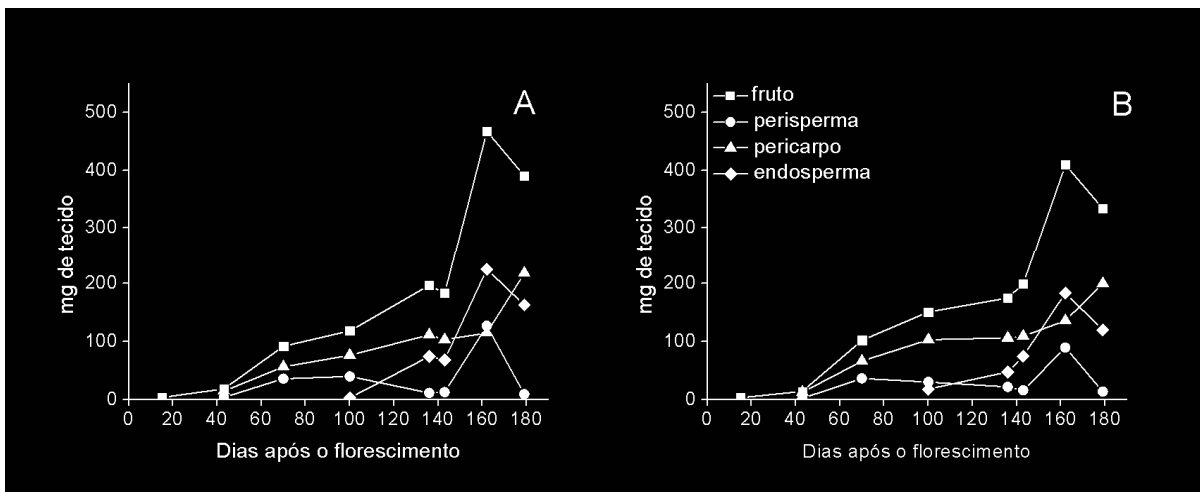


Figura 6. Massas secas dos diferentes tecidos de 20 frutos da variedade Mundo Novo (A), utilizada como controle, e AC1 (B), naturalmente descafeinada.

Na última coleta, que foi 179 DAF, o fruto apresentava o mesocarpo externo com coloração avermelhada e o endocarpo, também chamado de pergaminho, de consistência dura e com coloração amarelada. O endosperma também era duro e envolto pelo perisperma remanescente, que também neste estágio é conhecido como membrana prateada.

Apesar das diferenças encontradas, os frutos apresentaram comportamentos similares quanto ao desenvolvimento. O que vale ressaltar é que se pode observar que endospermas maduros de AC1 perderam menos massa do que os de MN.

4.2. Análises de cafeína e teobromina

Os cromatogramas de vários tecidos e órgãos de MN e AC1 apresentaram diferenças quanto à quantidade de metilxantinas. Como se pode ver nas fig. 7 e 8, os endospermas de MN e AC1 mostraram claramente a principal diferença encontrada entre as duas plantas de café. No cromatograma de MN, fig. 7, foi possível observar o pico 5, que indica a presença de cafeína, enquanto que na fig. 8, relativo a AC1, mesmo sendo possível observar a cafeína, a sua quantidade foi drasticamente menor. Além deste fato, em AC1 também foi encontrado um outro composto, representado pelo pico 2. Este composto é a teobromina, precursor da cafeína.

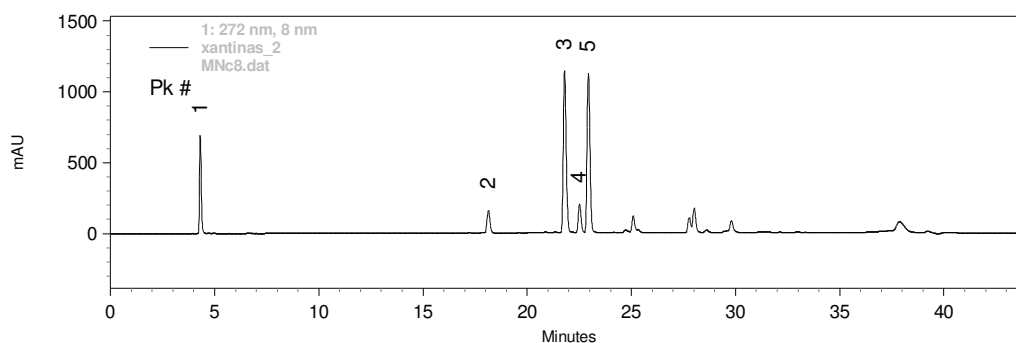


Figura 7. Cromatograma de metilxantinas, ácidos clorogênicos e trigonelina de endospermas de Mundo Novo. Picos: **1.** trigonelina, **2.** ácido clorogênico, **3.** ácido 5-cafeoilquínico, **4.** ácido clorogênico, **5.** cafeína.

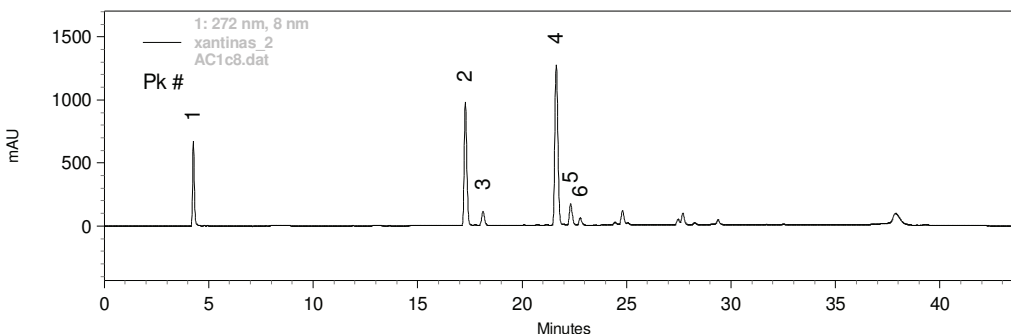


Figura 8. Cromatograma de metilxantinas, ácidos clorogênicos e trigonelina de endospermas de AC1. Picos: **1.** trigonelina, **2.** teobromina, **3.** ácido clorogênico, **4.** ácido 5-cafeoilquínico, **5.** ácido clorogênico, **6.** cafeína.

4.2.1. Variação na quantidade de cafeína e teobromina em raízes, internódios e primeiros pares foliares

Nas análises feitas nas raízes de ambas as plantas não se detectou nenhuma metilxantina.

Tanto em MN quanto em AC1 houve diminuição nas quantidades de metilxantinas nos pares foliares com o amadurecimento destes. Em MN tanto cafeína quanto teobromina foram detectadas, enquanto que em AC1 a teobromina foi a única metilxantina detectada. Outro fato que pode ser mencionado é que apesar de AC1 apenas apresentar teobromina, os pares foliares apresentaram uma maior quantidade de metilxantinas do que os pares foliares de MN (fig. 9).

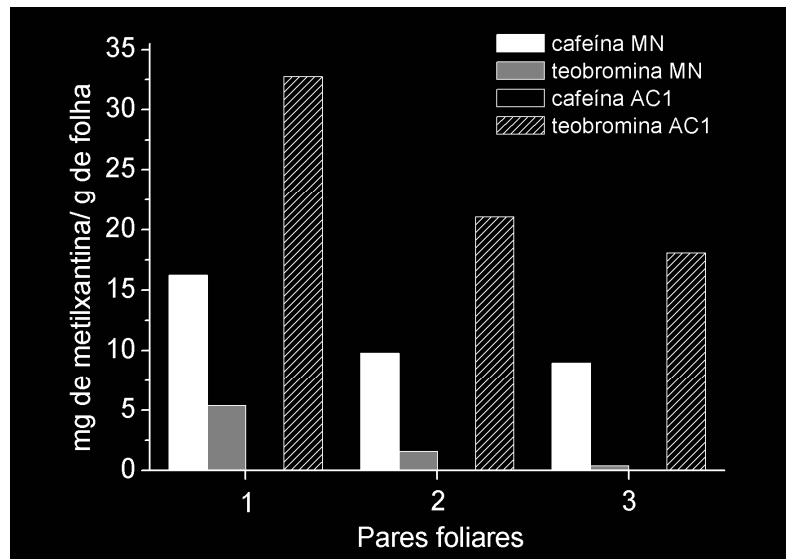


Figura 9. Quantidade de cafeína e teobromina nos primeiros pares foliares da variedade Mundo Novo, utilizada como controle, e AC1, planta naturalmente descafeinada. 1 = folhas com 1 cm, 2= folhas com 5 cm e 3 = folhas com 8 cm.

Ao analisar a fig. 10 observou que MN apresentou teobromina apenas no primeiro internódio, enquanto que em AC1 esta metilxantina também estava presente no terceiro e no quinto. Cafeína apareceu nos três internódios analisados de MN, mas não foi detectada em nenhum internódio de AC1. Foi também observado nas duas plantas analisadas que as duas metilxantinas detectadas diminuíram de maneira acentuada do primeiro para o terceiro internódio. As quantidades de cafeína encontradas no terceiro e no quinto internódio foram equivalentes, enquanto que as quantidades de teobromina encontradas em AC1 diminuíram do terceiro para o quinto internódio.

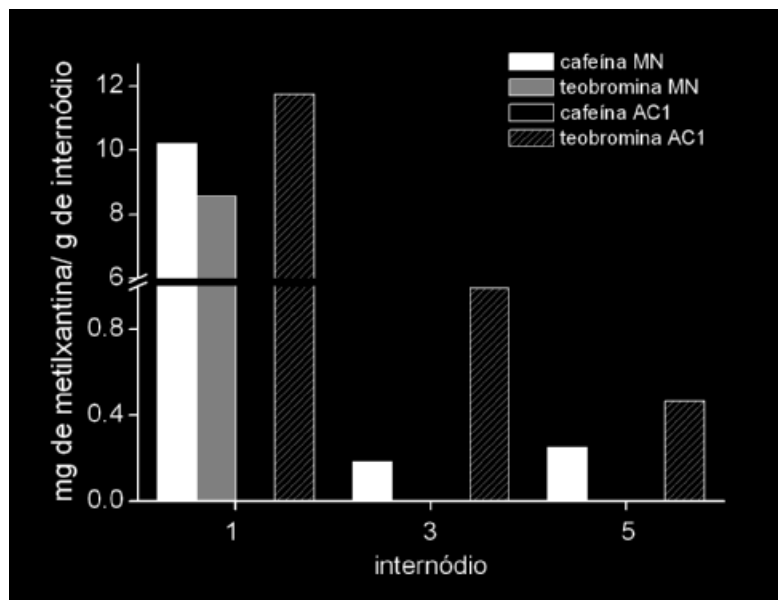


Figura 10. Quantidade de cafeína e teobromina nos internódios da variedade Mundo Novo, utilizada como controle, e na planta AC1, naturalmente descafeinada.

4.2.2. Variação das quantidades de cafeína e teobromina em endospermas

Ao observar as análises mostradas na fig. 11A, verificou que em MN, independente do estágio de desenvolvimento, há uma alta quantidade de cafeína se compararmos com a de teobromina, freqüentemente ausente no endosperma. Ainda em MN foi observado que a cafeína manteve-se entre 12,6 e 6,8 mg de cafeína/g de tecido ao longo do desenvolvimento do endosperma. Este tecido quando completamente maduro apresentou em média 8,6 mg de cafeína/g de endosperma, enquanto que a teobromina não foi detectada. Foi também possível constatar que a quantidade de cafeína diminuiu em endospermas completamente desenvolvidos quando comparados com endospermas imaturos, principalmente após 100 DAF.

Analisando a fig. 11B observa-se uma inversão de resultados em relação à fig. 11A. Enquanto que em MN as quantidades de teobromina eram baixas ou inexistentes, em AC1 elas variaram entre 13,4 e 6,7 mg/g de endosperma, sendo que as maiores quantidades foram encontradas quando o endosperma apresentava-se imaturo. Foi interessante observar que as quantidades de cafeína encontradas foram baixas em todos os casos, mas nunca inexistentes. As quantidades deste composto variaram entre 0,25 e 0,48 mg/g de endosperma.

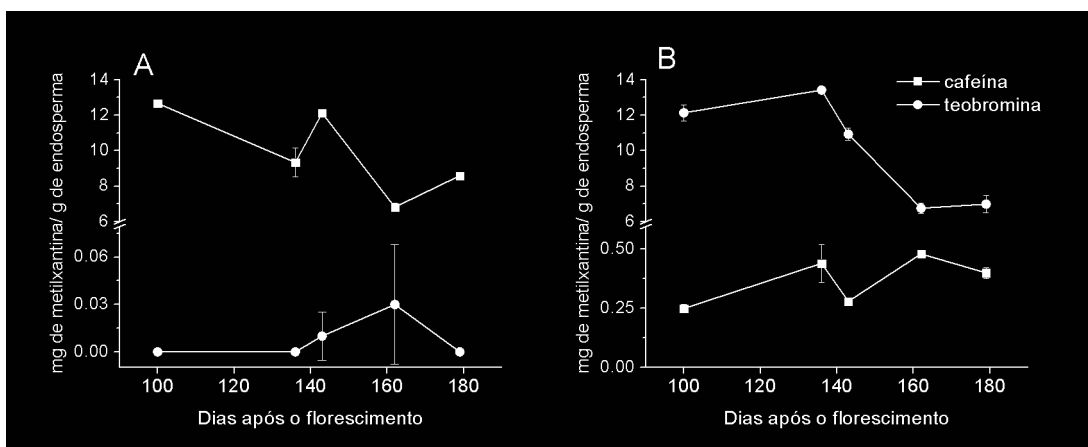


Figura 11. Variação na quantidade de metilxantinas (mg de metilxantina/ g de massa seca) em endospermas das plantas da variedade Mundo Novo (A), utilizada como controle, e da planta AC1 (B), naturalmente descafeinada, de acordo como estágio de desenvolvimento. Média de triplicatas ± desvio padrão.

4.3. Variação da quantidade de cafeína em folhas, flor, pericarpo e perisperma de frutos

Na primeira coleta foram encontrados em MN 28,5 mg/g e em AC1 3,9 mg de cafeína/g de fruto. Como estes frutos eram chumbinhos, não foi possível separá-los em diferentes tecidos. Observando a fig. 12, tanto no pericarpo quanto no perisperma de MN foi possível observar que as maiores quantidades relativas de cafeína foram encontradas 43 DAF, quando os frutos ainda eram pequenos. As quantidades variaram entre 15 mg/g e 6 mg de cafeína/g de pericarpo e entre 8,5 e 3 mg de cafeína/g de perisperma.

Em AC1 as quantidades de cafeína variaram entre 0,035 e 0,89 (70 DAF) mg de cafeína/g (162 DAF) no pericarpo e entre 0,058 (43 DAF) e 1,91 (100 DAF) mg de cafeína/g no perisperma (fig. 12).

Em MN foi verificado que tanto o pericarpo quanto o endosperma, independente da coleta observada, apresentaram maiores quantidades de cafeína do que no perisperma da respectiva coleta (fig. 11 e 12A).

Já em AC1, aos 43 e 70 DAF, as quantidades de cafeína encontradas no pericarpo foram maiores do que aquelas encontradas no perisperma da mesma coleta. Nas coletas seguintes o inverso foi encontrado, podendo-se observar valores maiores de cafeína nos perispermas do que no pericarpo (fig. 12A e 12B). Todos os perispermas de AC1 coletados também apresentaram maiores quantidades de cafeína do que os endospermas das respectivas coletas (fig. 11 e 12B).

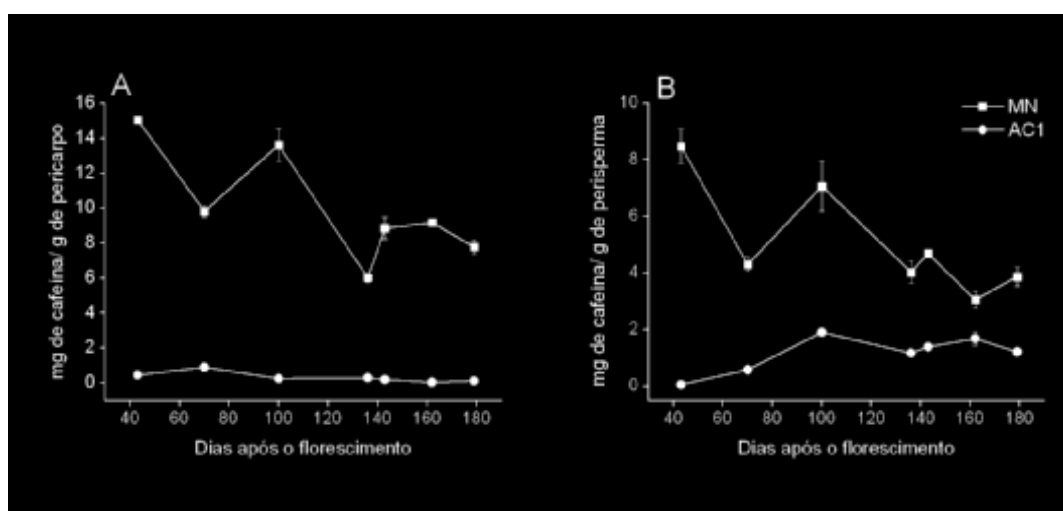


Figura 12. Quantidade de cafeína em pericarpo (A) e perisperma (B) da variedade Mundo Novo (MN), utilizada como controle, e da planta AC1, naturalmente descafeinada. Média de triplicatas ± desvio padrão.

Em flores de MN foi observado aproximadamente 1,6 mg de cafeína/g de flor, enquanto que em AC1 foi encontrado aproximadamente 1,04 mg de cafeína/g de flor.

Em folhas maduras foi possível observar o mesmo padrão encontrado para o endosperma (fig. 13). Foram encontradas altas quantidades de cafeína em folhas de MN se comparadas com as quantidades encontradas em AC1. Em MN houve uma variação de 5,2 mg/g a 12,3 mg de cafeína/g de folha, podendo-se observar uma

tendência de aumento nas quatro últimas coletas. Em AC1 foi interessante observar que aos 15, 43 e 70 DAF foram encontradas baixas quantidades de cafeína (0,36; 1,26 e 1,25 mg de cafeína/g de folha), mas nas coletas seguintes, com exceção da coleta de 147 DAF, não houve detecção desta metilxantina pelo método empregado.

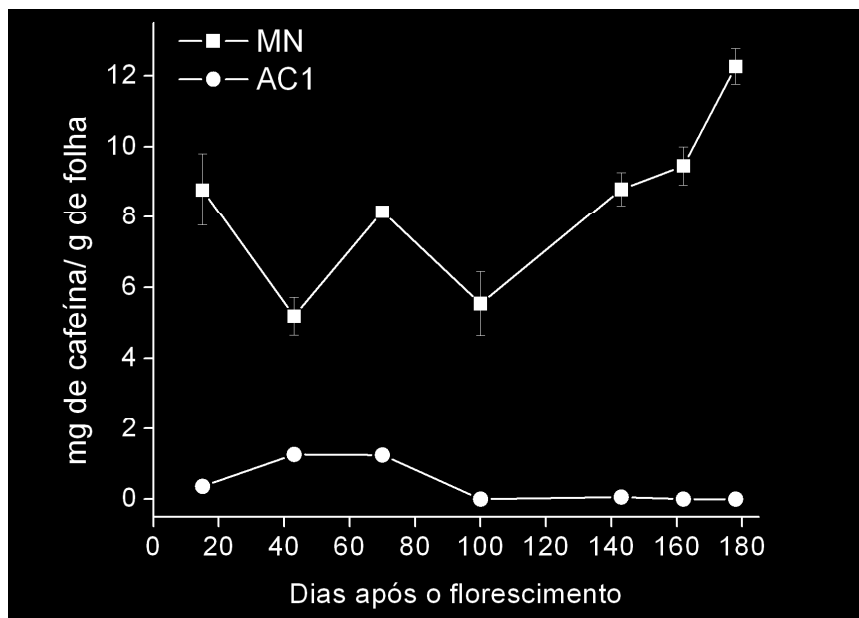


Figura 13. Quantidade de cafeína em folhas da variedade Mundo Novo, utilizada como controle, e da planta AC1, naturalmente descafeinada. Média de triplicatas \pm desvio padrão.

4.4. Quantificação de compostos relacionados ao aroma e sabor do café

4.4.1. Trigonelina em endospermas

A trigonelina foi detectada em todas as amostras de endospermas analisadas (fig. 14). Nas análises das amostras aos 100 DAF a quantidade de trigonelina encontrada em AC1 foi 1,85 vezes maior do que a encontrada em MN. Na coleta

seguinte a diferença quantitativa de trigonelina entre ambos os endospermas também foi observada, com AC1 apresentando 1,71 vezes mais trigonelina do que MN. Nas coletas seguintes as quantidades de trigonelina de MN e AC1 tornaram-se mais próximas. Quando os frutos tornaram-se completamente desenvolvidos foram encontradas quantidades similares em torno de 11 mg de trigonelina/ g nos endospermas de AC1 e MN.

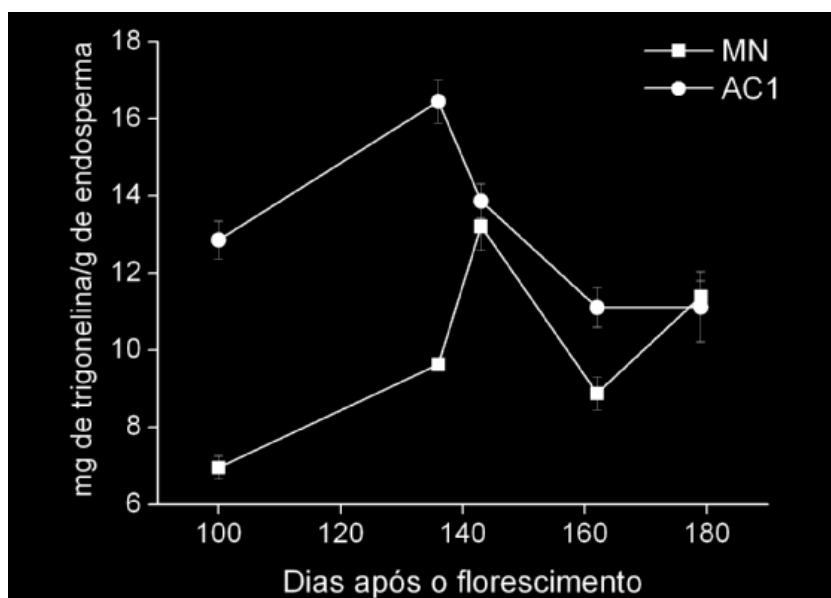


Figura 14. Quantidades de trigonelina em endospermas da variedade Mundo Novo (MN), utilizada como controle, e da planta AC1, naturalmente descafeinada. Média de triplicatas \pm desvio padrão.

4.4.2. Glicose, frutose e sacarose em endospermas

Os níveis de sacarose nos endospermas, na primeira vez em que este tecido foi encontrado nos frutos, ficaram em torno de 6,2 mg/g em MN e 11,8 mg/g em AC1. Os açúcares redutores, tanto em MN quanto em AC1, apresentaram valores maiores do que a sacarose neste mesmo estágio de desenvolvimento. Em MN foram encontrados 21,7 mg de glicose e 43 mg de frutose/g de endosperma, enquanto que

em AC1 os valores encontrados foram 24,9 mg de glicose e 83 mg de frutose/g de endosperma. Os desvios indicaram que os três açúcares apresentaram diferenças significativas nas duas plantas analisadas, sendo que em AC1 as quantidades sempre foram maiores.

Com o amadurecimento dos frutos foi verificada uma inversão na quantidade dos níveis de sacarose e de açúcares redutores encontrados, tanto em MN quanto em AC1. Com 136 DAF verificou que a quantidade de sacarose encontrada em MN foi 26,7 mg/g, enquanto que os níveis de açúcares redutores apresentaram uma queda, encontrando-se 0,58 mg/g de frutose e 0,85 mg de glicose/g de endosperma. Em AC1 foi encontrado 25,1 mg de sacarose/ g de endosperma, 1,85 mg de frutose e 0,55 mg de glicose/g de endosperma. Neste estágio os três açúcares, tanto em MN quanto em AC1, apresentaram quantidades similares de glicose, frutose e sacarose.

Nas coletas seguintes os níveis de sacarose também foram maiores do que os de açúcares redutores, como pode ser visto nas fig. 15A e 15B. Na última coleta, quando o grão apresentava-se completamente desenvolvido, as quantidades de sacarose encontradas em AC1 foram 37,1 mg/g e em MN 66,2 mg/g, sendo que neste estágio foi encontrada diferença significativa para este açúcar. Os níveis de frutose foram 1,1 mg/g em AC1 e 3,3 mg/g em MN, enquanto que as quantidades de glicose foram 0,12 mg / g de endosperma em AC1 e em MN de 1,4 mg/g. Os desvios indicaram que não houve diferenças significativas destes dois açúcares em MN e AC1.

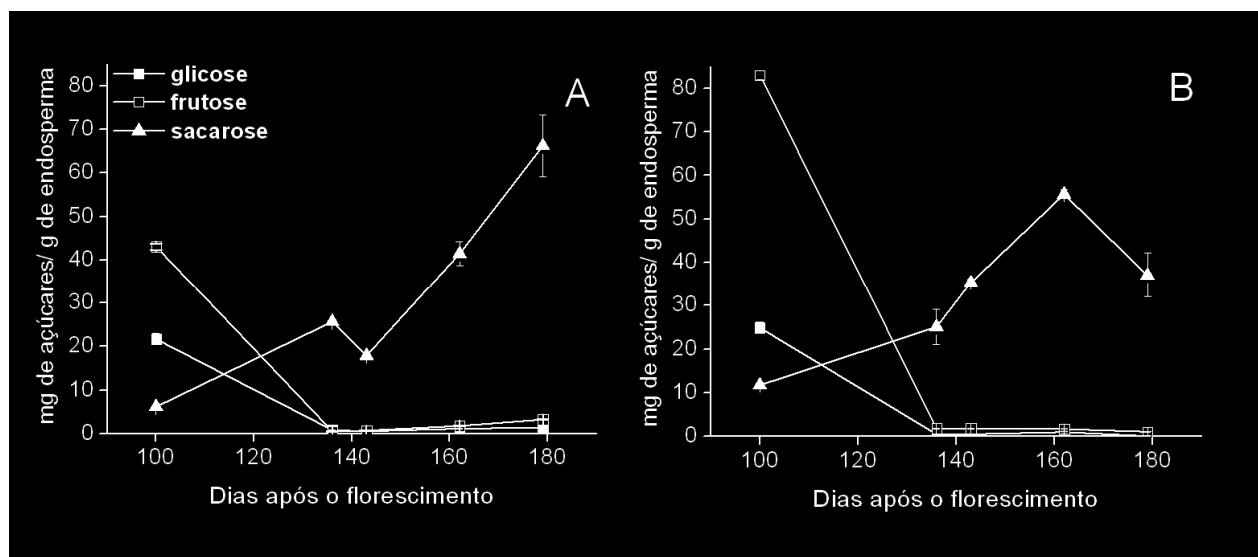


Figura 15. Açúcares em endospermas da variedade Mundo Novo (A), utilizada como controle e da planta AC1 (B), naturalmente descafeinada. Média de triplicatas \pm desvio padrão.

4.4.3. Quantificação de aminoácidos livres em endospermas

Na fig. 16 observou-se que as variações nas quantidades de aminoácidos livres encontrados em endospermas de MN e AC1. Os aminoácidos que apresentaram maiores valores em AC1 foram asparagina, glutamato e aspartato, sendo que a diferença do primeiro para o segundo foi muito pequena. Em MN os maiores valores foram encontrados também em asparagina, glutamato e aspartato. Em MN e em AC1 asparagina apresentou valores relativamente próximos em endospermas maduros, em torno de 30 mol%. Analisando os valores encontrados para o glutamato, foi constatado que AC1, cujo valor foi de 27,5 mol%, apresentou maiores quantidades do que MN. Já ao analisar as quantidades de aspartato foi verificado o inverso, ou seja, MN, cujo valor encontrado foi de 12,9 mol%, apresentou valor maior do que AC1.

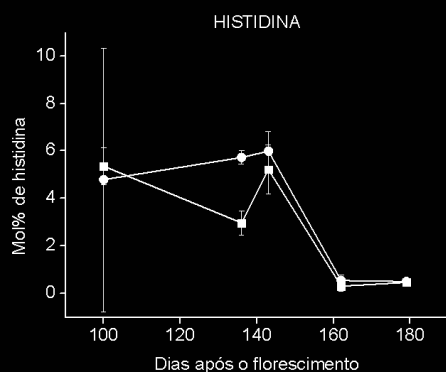
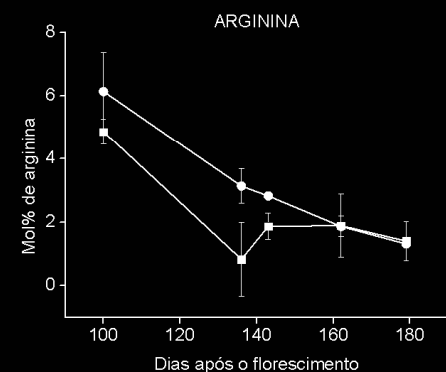
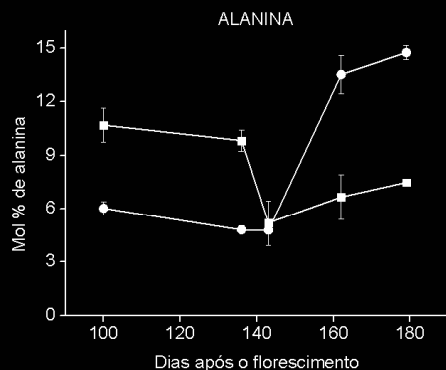
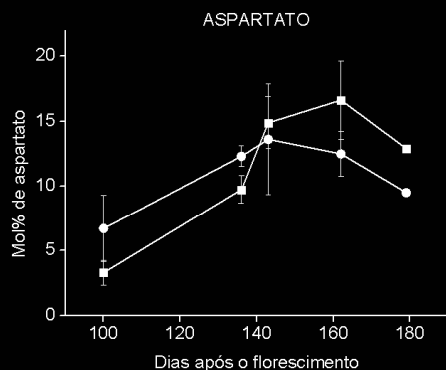
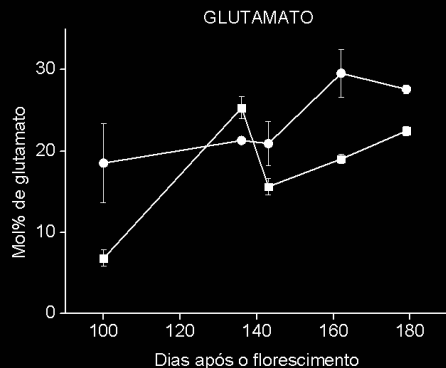
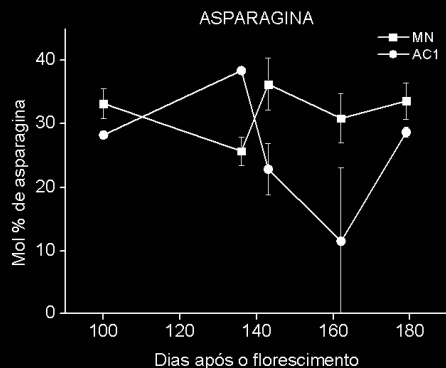
Alguns aminoácidos apresentaram comportamentos semelhantes ao longo do desenvolvimento dos frutos. No primeiro grupo valores maiores foram encontrados em endospermas imaturos do que em maduros, sendo que ao longo do desenvolvimento variações muito bruscas nas concentrações destes aminoácidos não foram encontradas. Fazem parte deste grupo arginina, histidina, treonina, valina, serina e GABA.

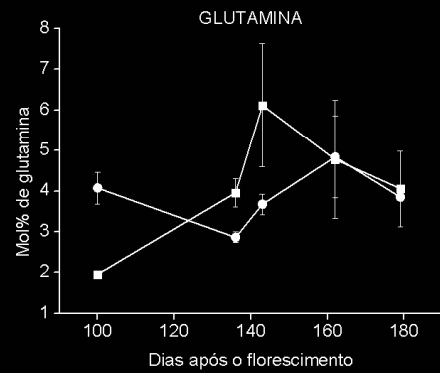
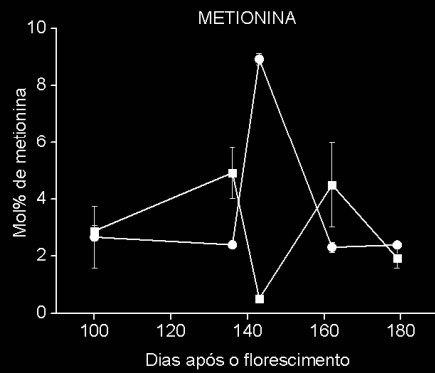
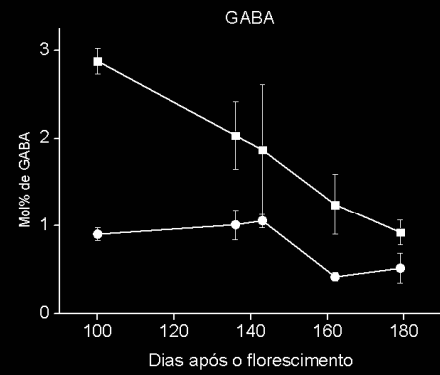
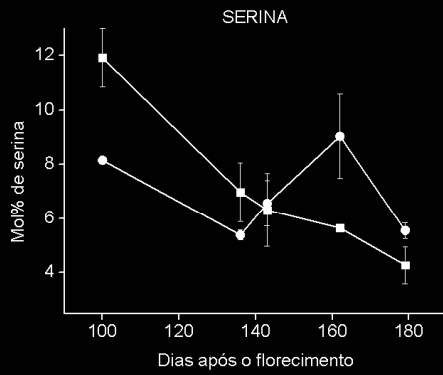
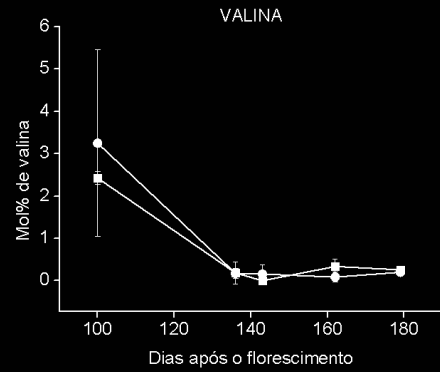
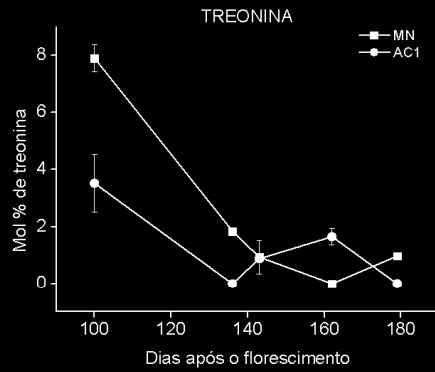
Outros aminoácidos, como é o caso da metionina, glutamina, glicina, leucina, alanina e até mesmo da já mencionada asparagina, apresentaram consideráveis variações ao longo do amadurecimento dos endospermas. Além desta variação, alanina apresentou valores relativamente altos em relação a muitos aminoácidos analisados, sendo que em MN os valores variaram entre 5,2 e 10,7 mol% e em AC1 entre 4,7 e 14,7 mol%.

Fenilalanina, nos endospermas das duas plantas analisadas, apresentou aumento na fase final do desenvolvimento, sendo que em MN aumentou de 2 para 4 mol% e em AC1 de 1 para 2,6 mol%.

Outros aminoácidos, como é o caso da isoleucina, da lisina, da tirosina e das já mencionadas valina e leucina, apresentaram baixos valores ao longo do desenvolvimento dos endospermas de MN e AC1. Em endospermas maduros de AC1 glicina e treonina estavam ausentes, enquanto que em MN o aminoácido que apresentou o menor valor encontrado foi a valina, com 0,25 mol%.

Em endospermas completamente desenvolvidos a maioria dos aminoácidos não apresentou diferenças significativas. Entretanto os que apresentaram estão aqueles que estavam em maiores concentrações, como foi o caso da alanina, asparagina, aspartato e glutamato.





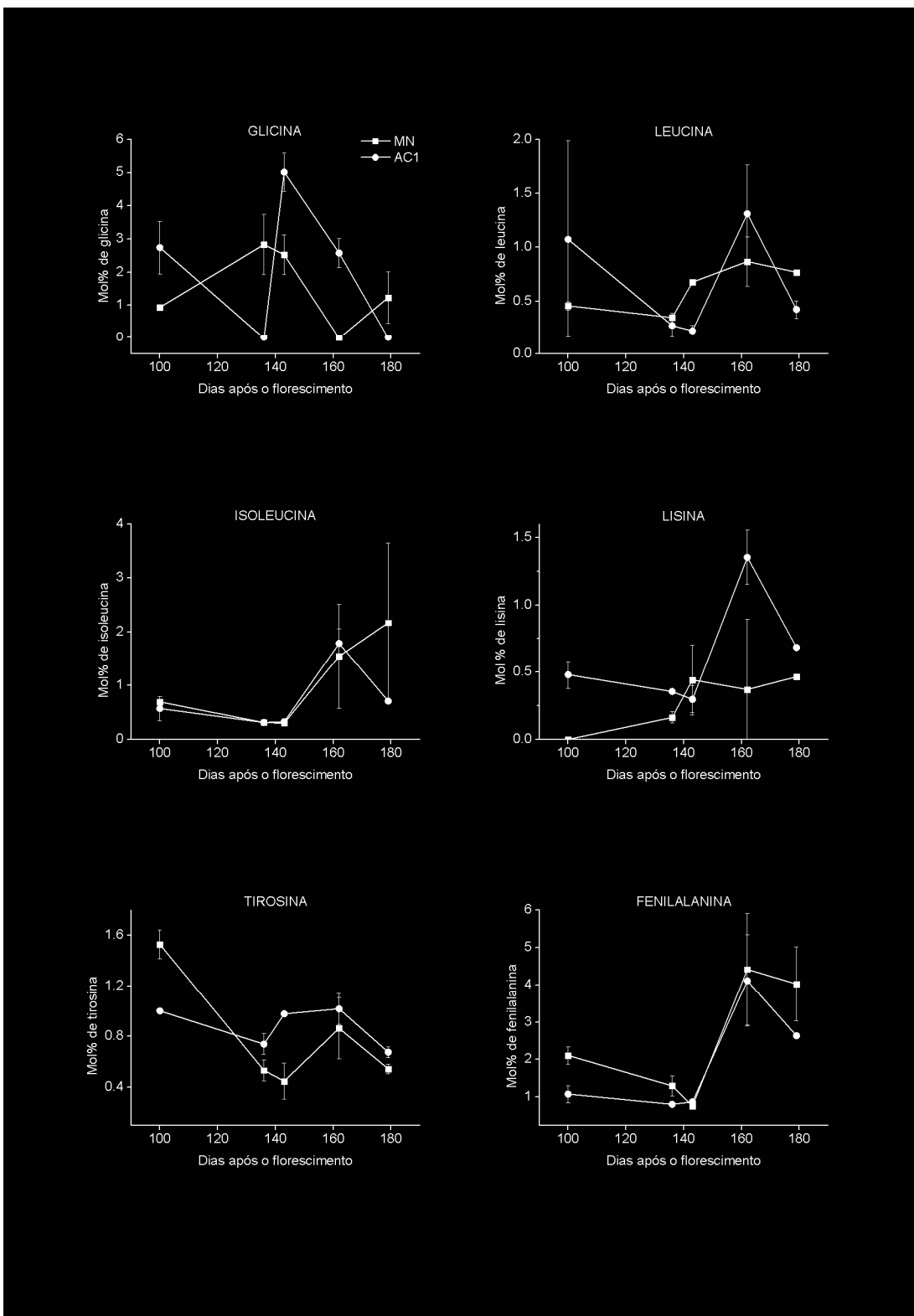


Figura 16. Aminoácidos livres em endospermas da variedade Mundo Novo, utilizada como controle, e da planta AC1, naturalmente descafeinada. Média de triplicatas \pm desvio padrão.

4.4.4. Ácidos orgânicos em endospermas

Foram detectados e quantificados em diferentes estádios de desenvolvimento, quatro ácidos orgânicos em endospermas de MN e AC1. Os ácidos encontrados foram o oxálico, cítrico, málico e succínico (fig. 17A e 17B).

No endosperma completamente desenvolvido de MN, oxalato foi o segundo ácido orgânico mais abundante, com 11,2 mg/g. Em AC1 a quantidade foi significativamente menor, chegando a 1,97 mg/g.

Em endospermas completamente desenvolvidos o ácido cítrico foi o que apresentou maiores quantidades. Em MN foram encontrados 21,58 mg/g e em AC1 o valor encontrado foi 16,77 mg/g de endosperma. Em AC1 os valores encontrados para outros ácidos foram muito próximos 2,77 mg de succinato e 3,6 mg de malato/g de endosperma, que foi o segundo ácido carboxílico mais abundante em AC1. Em MN foram encontrados 1,88 mg de malato/g e 5,21 mg de succinato/g de endosperma.

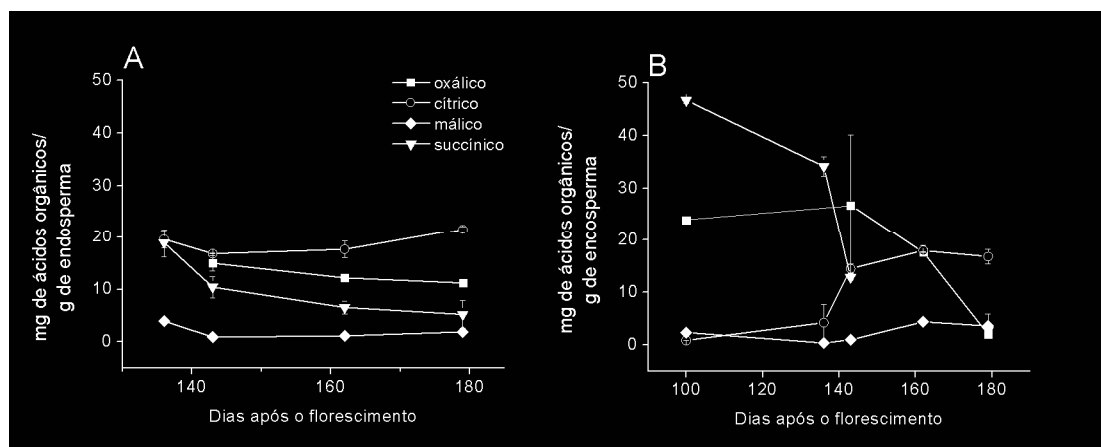


Figura 17. Ácidos orgânicos em endospermas da variedade Mundo Novo (A), utilizada como controle, e da planta AC1 (B), naturalmente descafeinada. Média de triplicatas \pm desvio padrão.

4.4.5. Ácidos clorogênicos em endospermas

Pelo espectro obtido no detector de diodo do HPLC (fig. 18) foi possível avaliar quais dos picos detectados referiam-se aos ácidos clorogênicos. Além do ácido 5CQA foram detectados outros sete picos com perfil espectrofotométrico típico de ácidos clorogênicos. Como não havia padrões para tais ácidos, eles foram calculados com base no 5CQA. O cromatograma representativo destes ácidos está representado na fig. 19.

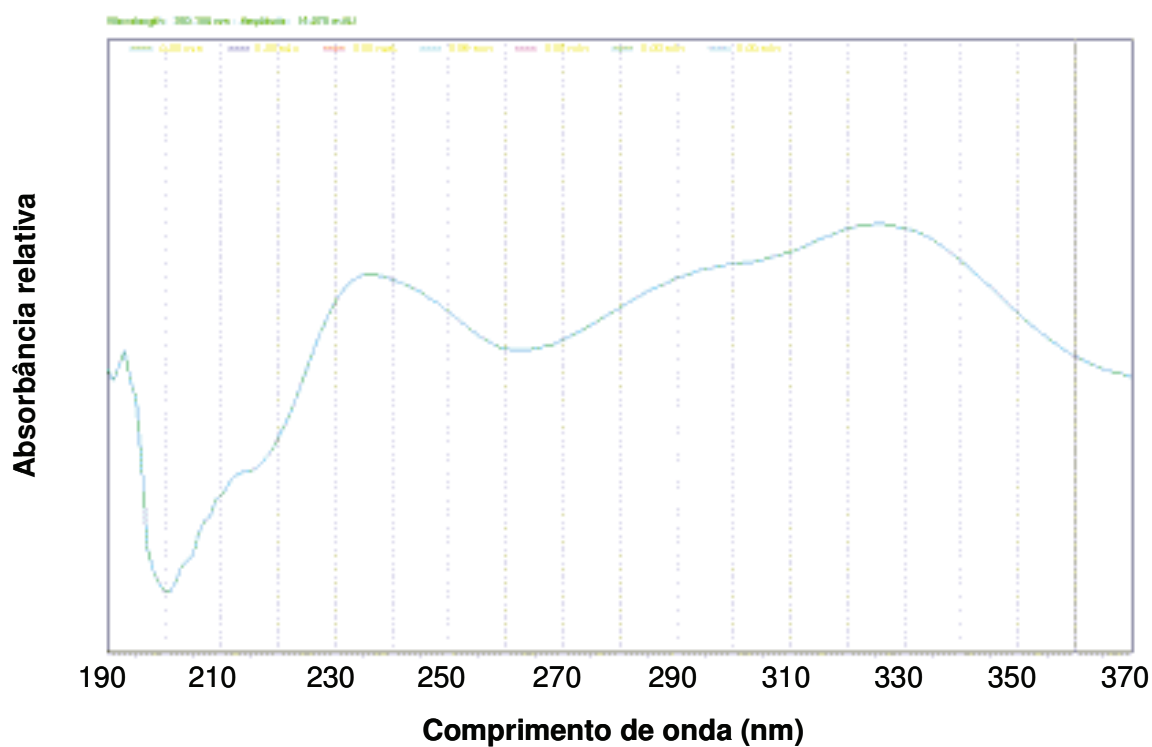


Figura 18. Espectro de absorção característico de ácidos clorogênicos.

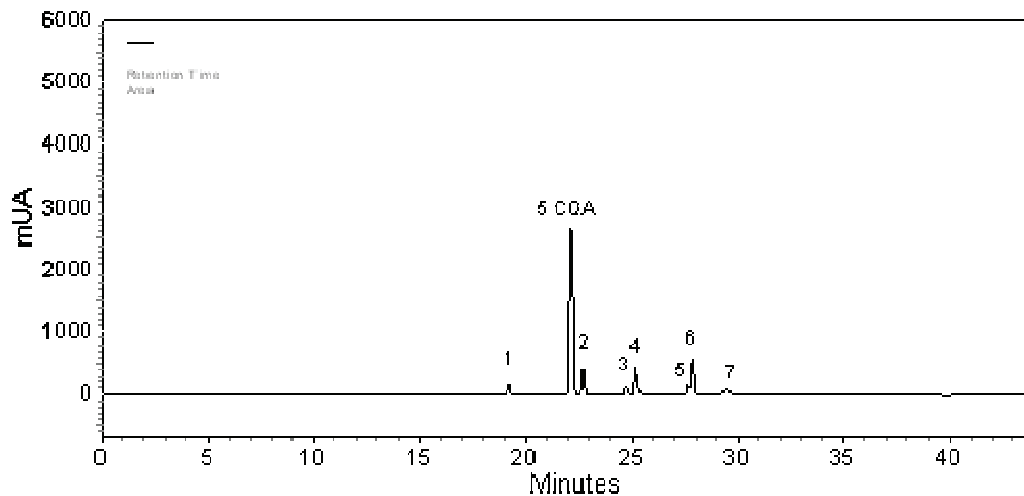


Figura 19. Cromatograma representativo de ácidos clorogênicos em endospermas de *C. arabica*. Além do ácido 5 cafeoilquínico (5CQA), foram encontrados sete principais ácidos clorogênicos, numerados de 1 a 7.

O ácido 5CQA apresentou algumas diferenças quantitativas ao longo do desenvolvimento dos endospermas de MN e AC1 (fig. 20). As análises mostraram que AC1 sempre apresentou maiores quantidades deste ácido, sendo que a maior diferença foi encontrada aos 162 DAF. No último estágio, quando o grão estava completamente desenvolvido, os valores tornaram-se muito próximos ao de MN. Em MN foram encontrados 51,52 mg/g, enquanto que em AC1 o valor foi de 53,9 mg/g de endosperma.

Foi interessante observar que ao longo do desenvolvimento a soma de todos os ácidos clorogênicos superou as quantidades de 5CQA, tanto em MN quanto em AC1. No último estágio, quando o grão já se apresentava completamente desenvolvido, foi verificado que a soma de ácidos clorogênicos em MN, 93 mg/g, foi maior do que a soma em AC1, 81 mg/g (fig. 20).

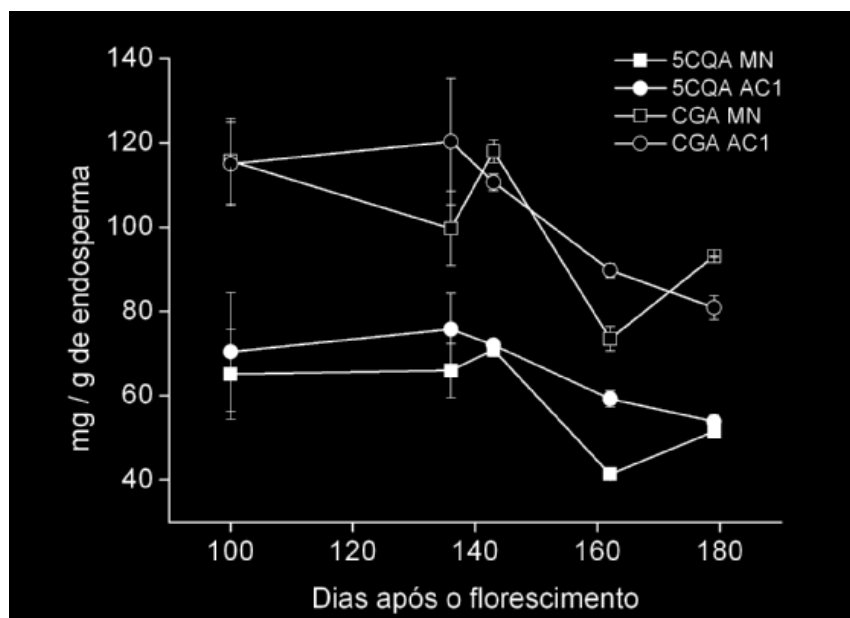


Figura 20. Quantificação de ácido 5-cafeoilquínico (5CQA) e outros ácidos clorogênicos (CGA) em endospermas da variedade Mundo Novo (MN), utilizada como controle, e da planta AC1, naturalmente descafeinada. Média de triplicatas \pm desvio padrão.

Ao observar separadamente cada ácido clorogênico foi verificado que todos apresentaram certa variação ao longo do desenvolvimento do endosperma (fig. 21). Nas duas plantas o ácido clorogênico 2 foi o que apareceu em maior quantidade em endospermas completamente desenvolvidos. Tanto em MN quanto em AC1 os valores deste ácido aumentaram se comparados com endospermas imaturos, sendo que em MN um aumento relativamente contínuo foi observado, enquanto que em AC1 certa variação foi encontrada ao longo do desenvolvimento. Vale ressaltar que as quantidades deste ácido não foram muito maiores do que as dos segundos ácidos encontrados em endospermas maduros. Neste estágio de desenvolvimento em MN e em AC1 foram respectivamente encontrados 9,5 e 7,5 mg/g de endosperma.

O ácido clorogênico 1 aumentou em ambas as plantas ao longo do desenvolvimento do fruto. Em MN este aumento foi consistente, enquanto que em

AC1, apesar de também ter sido observado aumento ao longo do desenvolvimento do fruto, uma pequena queda da penúltima para a última coleta foi constatada.

Em endospermas jovens os CGAs que apresentaram maiores valores foram o 6 e o 4, sendo que em MN o 6 foi maior que o 4 e em AC1 o inverso foi encontrado. Além disso, deve ser destacado que em endospermas maduros os valores encontrados para os dois ácidos em AC1 foram próximos, enquanto que para MN houve uma diferença considerável entre um e outro.

Foi interessante também observar o comportamento do ácido clorogênico 3. Em endospermas imaturos de MN e AC1 ele foi o terceiro maior ácido encontrado, mas com o desenvolvimento do endosperma suas quantidades diminuíram até se tornar o ácido clorogênico encontrado em menor quantidade nos endospermas completamente desenvolvidos das duas plantas analisadas. Neste caso também vale ressaltar que em MN a quantidade deste ácido clorogênico, que foi de 0,95 mg/g, foi consideravelmente menor do que dos ácidos 5 e 7, que em ambos os casos foi de aproximadamente 4,5 mg/g, enquanto que em AC1 as quantidades dos ácidos 3, 5 e 7 foram próximas, variando entre 1 e 1,8 mg/g.

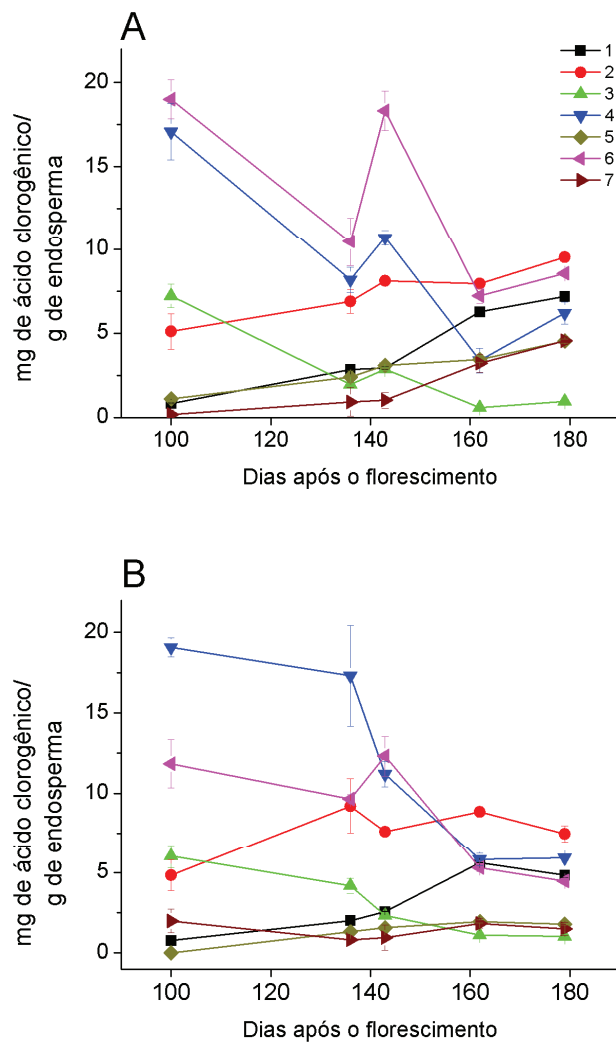


Figura 21. Quantidade de ácidos clorogênicos em endospermas de Mundo Novo (A), utilizada como controle, e da planta AC1, naturalmente descafeinada (B). Média de triplicatas \pm desvio padrão.

4.5. Compostos fenólicos totais em endospermas

Ao longo do desenvolvimento do fruto verificou que a variação nas quantidades de compostos fenólicos totais em endospermas de MN e AC1 (fig. 22). Em endospermas mais jovens houve uma maior quantidade destes compostos,

sendo que em MN foram encontrados 153,7 mg/g e em AC1 o valor foi de 170,1 mg de compostos fenólicos totais/ g de endosperma. As menores quantidades foram encontradas aos 162 DAF. O resultado encontrado em tecidos de MN foi 30,95 mg/g e nos de AC1 foi 45,53 mg/g de endosperma. Quando os grãos atingiram o grau máximo de maturação em ambos os casos houve um aumento quantitativo destes compostos em relação à coleta anterior. Foram encontrados 68 mg/g em MN e 78,8 mg/g de endosperma em AC1.

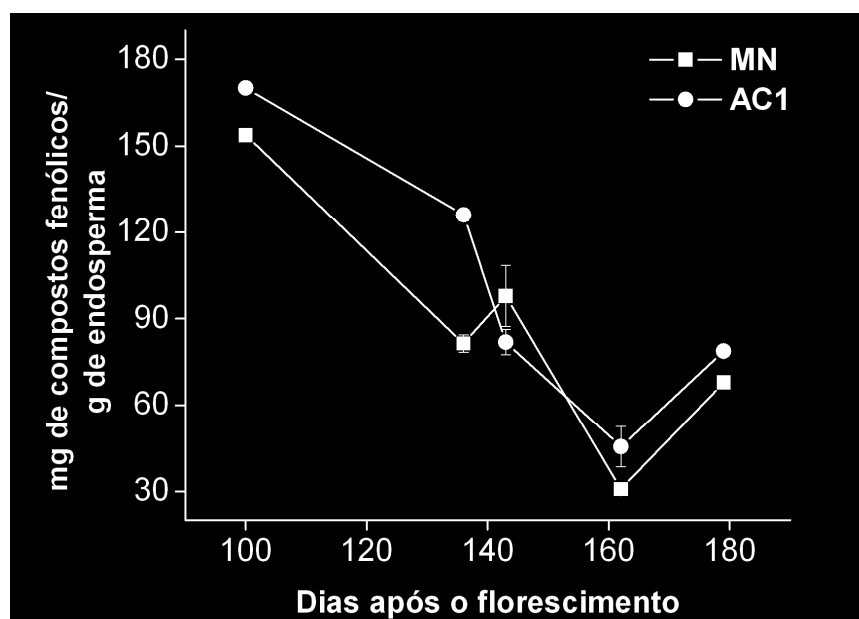


Figura 22. Quantidade de compostos fenólicos encontrados em endospermas da variedade Mundo Novo (MN), utilizada como controle, e da planta AC1, naturalmente descafeinada. Média de triplicatas \pm desvio padrão.

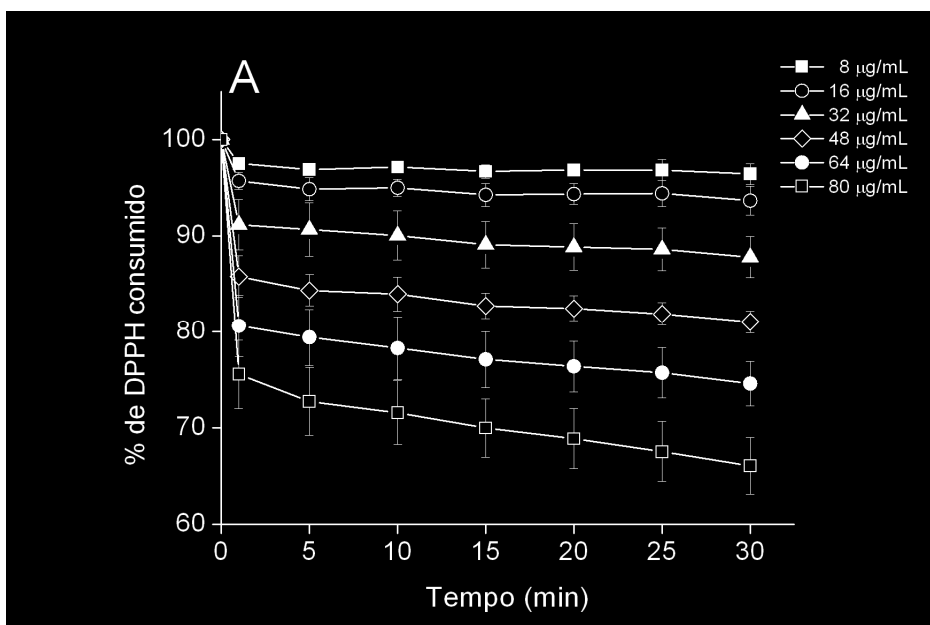
4.6. Aminoácidos totais em endospermas maduros

Foi encontrada maior quantidade de aminoácidos totais livres em endospermas maduros de MN, sendo que nesta planta o total observado foi de $35 \pm 3,28$ nmol de aminoácidos/mg de endosperma. Já na planta descafeinada a

quantidade de aminoácidos totais livres foi menor, totalizando $25 \pm 1,47$ nmol /mg de endosperma.

4.7. Atividade antioxidante de endospermas

Ao analisar as atividades antioxidantes em grãos verdes de MN e AC1 foi encontrado que nos dois casos as atividades foram maiores nos cinco primeiros minutos de reação, e que após este período a porcentagem de DPPH consumido diminuiu consideravelmente. Ao observar as atividades entre 5 e 30 min percebe-se que as porcentagens diminuíram gradativamente, como pode ser visto nas fig. 23A e 23B, onde também ficou evidente que ao aumentar as concentrações dos extratos, entre 8 e 80 μg de grão verde/mL, houve também aumento na atividade antioxidante. Os grãos verdes de ambas as plantas apresentam atividade antioxidante similar.



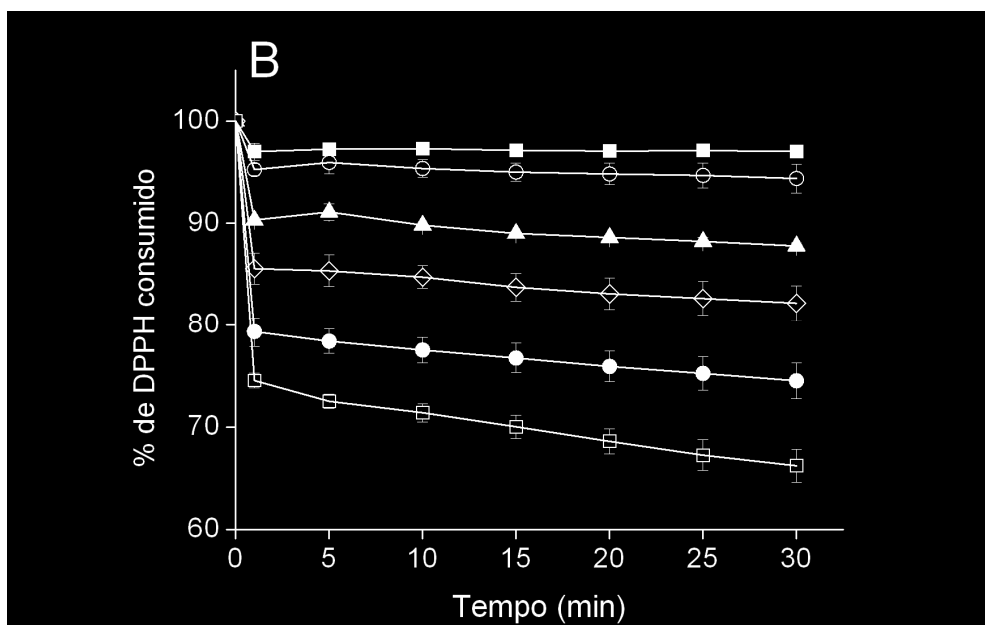


Figura 23. Atividade antioxidante de grãos verdes da variedade Mundo Novo (A), utilizada como controle, e da planta AC1 (B), naturalmente descafeinada. A porcentagem de DPPH consumido foi verificada nas seguintes concentrações: 8, 16, 32, 48, 64 e 80 µg/ mL. Média de triplicatas ± desvio padrão.

4.8. Análise de proteínas de reserva por eletroforese desnaturante (SDS-PAGE)

Foi verificado que os dois endospermas apresentaram perfis eletroforéticos de proteínas semelhantes (fig. 24).

Com a extração utilizada foi observado que as duas bandas que apresentaram maior intensidade foram referentes à proteína de reserva 11S. Esta proteína foi desmembrada em duas subunidades, sendo que o braço α apresentou aproximadamente 38 kDa e o β aproximadamente 25 kDa.

O programa UN-SCAN-IT gel 6.1, utilizado para detecção das bandas, também encontrou outras proteínas e/ou subunidades de proteínas em comum. Estas apresentaram aproximadamente as seguintes massas: 32, 31, 29, 23, 21, 16 e

12 kDa. Outras bandas de maior massa molecular também puderam ser visualizadas, tendo elas cerca de 59, 53 e 49 kDa. Ao analisar criteriosamente os perfis foi notado que a banda com 16 kDa aparece com maior intensidade em AC1 e que a banda com 21 kDa foi mais intensa em MN.

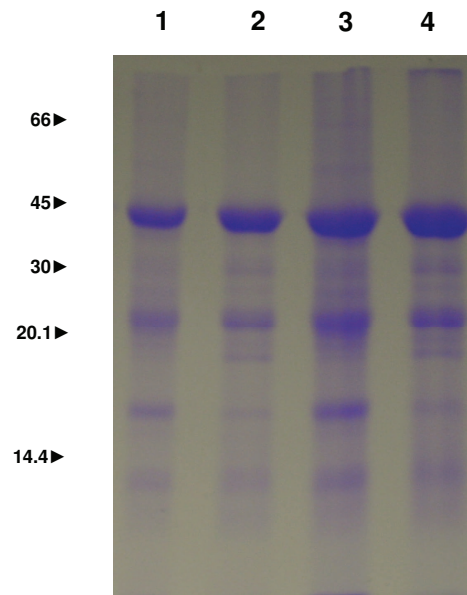


Figura 24. Gel SDS-PAGE 12,5%. Marcador de massa molar indicado em kDa. As linhas indicam: **1.** 5 µg de proteína de endospermas de AC1; **2.** 5 µg de proteína de endospermas de MN; **3.** 10 µg de proteína de endospermas de AC1; **4.** 10 µg de proteína de endospermas de MN.

4.9. Atividades de teobromina sintase e cafeína sintase

Foram medidas as atividades de duas enzimas chaves do metabolismo de metilxantina nos endospermas de MN e AC1, teobromina sintase e cafeína sintase (fig. 25). Observou-se que tanto a atividade teobromina sintase quanto a de cafeína sintase é maior em endospermas da planta MN. A atividade teobromina sintase foi

em média 1,78 vezes maior em MN, enquanto que a cafeína sintase apresentou diferenças bem maiores, sendo 17,78 vezes maior em endospermas da planta com alto índice de cafeína.

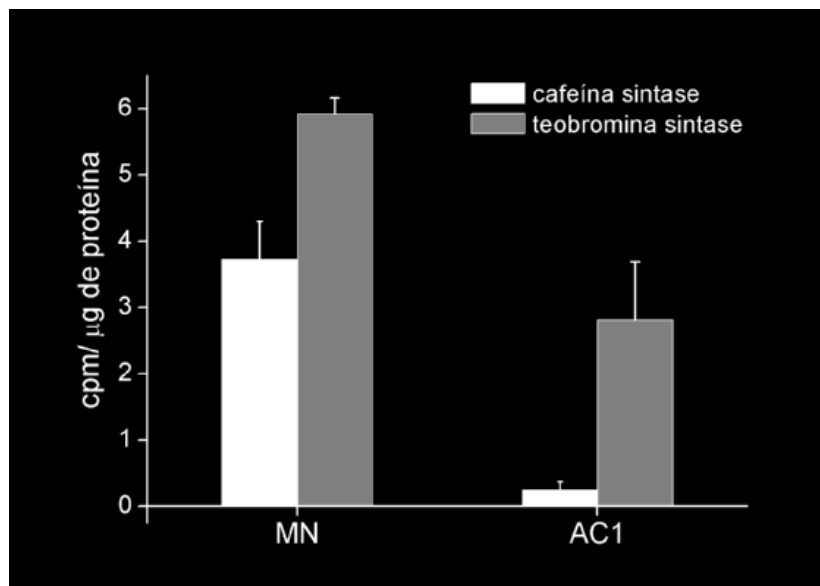


Figura 25. Atividade enzimática de teobromina sintase em endospermas da variedade Mundo Novo (MN), utilizada como controle, e da planta AC1, naturalmente descafeinada. Média de cinco atividades \pm desvio padrão.

4.10. Análises de expressão gênica por RT-PCR

Foram feitas análises da expressão de genes das três metiltransferases relacionadas à síntese de cafeína, 7-metilxantosina sintase (CmXRS1), teobromina sintase (CTS2) e cafeína sintase (CCS1). Os três genes foram expressos, tanto nos endospermas de MN quanto nos de AC1, indicando que os mRNA destas enzimas estavam presentes nos endospermas. As bandas referentes aos fragmentos gênicos amplificados para cada um dos genes podem ser visualizadas na fig. 26.

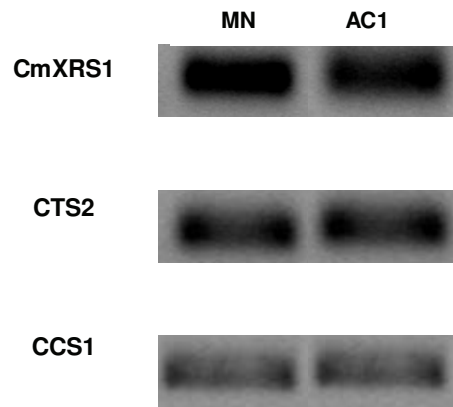


Figura 26. Expressão de *CmXRS1* (7-metilxantosina sintase), *CTS2* (teobromina sintase) e *CCS1* (caféina sintase) em endospermas de MN (controle) e AC1 (naturalmente descafeinada) feitas por RT-PCR.

Para uma análise mais detalhada dos dados foi feito RT-PCR semi-quantitativo destes mesmos genes, tendo como gene normalizador actina (fig. 27).

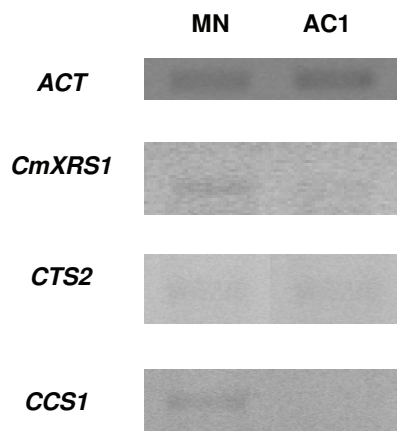


Figura 27. RT-PCR semi-quantitativa de genes de 7-metilxantosina sintase (*CmXRS1*), teobromina sintase (*CTS2*) e caféina sintase (*CCS1*) de endospermas de MN (controle) e AC1 (naturalmente descafeinada). Normalização feita com actina (*ACT*).

Os dados obtidos indicaram que para os três genes estudados houve um maior nível de transcritos em endospermas de MN, sendo as expressões dos genes *CmXRS1*, *CTS2* e *CCS1* consistentes com as atividades observadas de teobromina e caféina sintase, assim como com os ensaios de traçadores radioativos e

determinação dos níveis endógenos de metilxantinas, enquanto que ao observar os resultados obtidos em AC1 as expressões dos mesmos genes foram menores para os genes *CmXRS1* e *CTS2*, indicando que há poucos transcritos no endosperma em comparação com MN. Em AC1, o gene de cafeína sintase (*CCS1*) parece ser menos expresso do que os outros genes analisados, como pode ser visto na fig. 27.

4.11. Metabolismo de [¹⁴C]adenina e [¹⁴C]cafeína em frutos e folhas

Após incubar folhas de MN com [¹⁴C]adenina por 48 h foi observado maior acúmulo de radioatividade em teofilina e em cafeína, e em níveis muito próximos. Teobromina marcada também foi encontrada nestas folhas, mas com radioatividade duas vezes menor do que cafeína. Em AC1, também incubadas com [¹⁴C]adenina por 48 h foi observado quase 6 vezes mais teobromina marcada do que cafeína e aproximadamente 4 vezes mais teobromina do que teofilina (Tabela 1).

Após adicionar cafeína marcada nas folhas de MN foi verificado que maior parte da cafeína foi metabolizada após 48 h. A metilxantina encontrada com maiores quantidades de radioatividade foi a teofilina, além de também ser possível observar certa quantidade em teobromina. Assim como em MN, em AC1 também foi encontrado maior acúmulo de teofilina marcada além de uma baixa quantidade de teobromina, mas a maior parte da cafeína não foi metabolizada (Tabela 1).

No endosperma de AC1, tanto com 24 quanto com 48 h de incubação com adenina, a teobromina foi consistentemente a metilxantina encontrada com maior radioatividade, sendo que após 24 h de incubação foi detectada aproximadamente 60 vezes mais radioatividade em teobromina do que em cafeína. Após 48 h esta

diferença caiu para sete vezes. Baixas quantidades de radioatividade em cafeína e teofilina também foram detectadas nestes tempos de incubação. Já em endosperma de MN foi verificado maior acúmulo de cafeína marcada e menores quantidades de teobromina, tanto após 24 quanto 48 h de incubação (Tabela 2). Ainda nos endospermas de MN foi observado que após 24 h de incubação a cafeína marcada foi transformada em sua maior parte em teofilina, mas quantidades significativas de radioatividade em teobromina também puderam ser encontradas. Após 48 h também foi possível observar teobromina e teofilina marcadas, sendo que teobromina foi encontrado em maior quantidade.

Tabela 1. Estudo metabólico em folhas de MN (controle) e AC1 (naturalmente descafeida) com precursores marcados. Resultados expressos em cintilação por minuto/ mg de folha (cpm/ mg).

<i>Órgão</i>	<i>Planta</i>	<i>Radioisótopo</i>	<i>Tempo de incubação (horas)</i>	<i>[¹⁴C]Cafeína (cpm/mg)</i>	<i>[¹⁴C]Teobromina (cpm/mg)</i>	<i>[¹⁴C]Teoflilina (cpm/mg)</i>
Folha	MN	Adenina	48	2,26	1,02	2,71
	MN	Cafeína	48	2,39	1,01	3,18
	AC1	Adenina	48	1,35	7,95	2,09
	AC1	Cafeína	48	298,01	35,37	142,85

Tabela 2. Estudo metabólico nos endospermas de frutos de MN (controle) e AC1 (naturalmente descafeinada) com precursores marcados. Resultados expressos em cintilações por minuto/ mg de endosperma (cpm/ mg).

<i>Órgão</i>	<i>Planta</i>	<i>Radioisótopo</i>	<i>Tempo de incubação (horas)</i>	<i>[¹⁴C]Cafeína (cpm/mg)</i>	<i>[¹⁴C]Teobromina (cpm/mg)</i>	<i>[¹⁴C]Teoflilina (cpm/mg)</i>
Endosperma	AC1	Adenina	24	0,90	53,76	2,10
	AC1	Adenina	48	3,07	20,14	2,71
	MN	Adenina	24	17,42	5,08	3,20
	AC1	Cafeína	24	9,93	14,71	6,00
	AC1	Cafeína	48	35,23	2,36	15,90
	MN	Cafeína	24	3,97	2,19	3,76
	MN	Cafeína	48	34,78	11,06	8,04

5. DISCUSSÃO

5.1. Desenvolvimento do fruto

Nos 70 primeiros dias após o florescimento, quando apenas foram encontrados pericarpo e perisperma, foi observada uma rápida expansão do fruto tanto em MN quanto em AC1. As análises mostraram que no interior do fruto o tecido em expansão era o perisperma, oriundo de uma rápida multiplicação das células do integumento (Mendes, 1941).

À medida que o fruto se desenvolveu, o perisperma foi gradualmente substituído pelo endosperma. Este último apresentou coloração branca e aspecto leitoso em frutos imaturos, mas devido ao acúmulo de complexos polissacarídeos, como arabinogalactanos, tornou-se mais consistente durante o amadurecimento do fruto (Dentan, 1985 citado por Castro & Marraccini, 2006). O perisperma, que em frutos maduros também é chamado de película prateada, tornou-se uma fina camada que envolvia os endospermas dos frutos de MN e AC1.

Uma análise criteriosa dos dados sugere que os frutos de AC1 desenvolveram-se antes dos frutos de MN. Examinando as fig. 5 (A e B) e 6 (A e B), nota-se que o desenvolvimento do endosperma em substituição ao perisperma ocorreu mais rapidamente na planta AC1, já que na coleta feita aos 100 DAF as massas seca e fresca do endosperma de AC1 foram consideravelmente superiores às encontradas em MN. Em compensação os frutos maduros de MN eram maiores, com valores superiores tanto de massa fresca quanto de massa seca.

Também foi interessante notar que no último estágio foi observado, tanto em MN quanto em AC1, perda d'água por parte dos frutos. Como descrito na literatura, nos estádios iniciais de desenvolvimento do fruto a quantidade de água pode representar cerca de 80%, a qual diminui ao longo do desenvolvimento, aumentando desta maneira a massa seca (Eira et al., 2006). Também observou-se uma perda de massa, tanto em MN quanto em AC1, que deve-se provavelmente a uma alta taxa respiratória, característica deste estágio de desenvolvimento.

5.2. Cafeína em raízes, flores, internódios

A análise feita neste trabalho mostrou que nenhuma metilxantina foi detectada nas raízes de MN e AC1. Este resultado corrobora o que foi encontrado em plântulas de *C. arabica*, para a qual foi relatado que a cafeína estava ausente em raízes (Zheng & Ashihara, 2004).

Nas flores foi observada uma pequena diferença nas quantidades de cafeína entre as plantas analisadas, apesar de MN ainda apresentar quantidades maiores desta metilxantina. Baumann (2006) relatou que em flores de *C. arabica* na fase de antese a cafeína é o alcalóide purínico mais abundante. As pétalas e o gineceu apresentaram 0,58 mg/g de massa fresca (3000 nmol/ g de massa fresca), enquanto que os estames apresentaram 1,36 mg/g de massa fresca (7000 nmol/ g de massa fresca).

Foi observado neste trabalho que quanto mais novo o internódio, maior a quantidade de metilxantinas nele contido, tanto em MN quanto em AC1. Zheng e Ashihara (2004) verificaram em plântulas de *C. arabica* com seis meses de idade

que nos ramos superiores a quantidade de cafeína encontrada foi quase sete vezes maior do que aquela encontrada nos ramos inferiores. Nos resultados aqui apresentados, no primeiro internódio em MN, além do acúmulo de cafeína, há também o de teobromina, enquanto que em AC1 apenas teobromina foi encontrada. Isto sugere que a atividade biossintética de cafeína está comprometida neste tecido, pois ao contrário do que foi visto em outros tecidos dos frutos de AC1 – em que ainda foi possível observar cafeína – nos internódios nem traços foram detectados. Nos outros dois internódios foram encontradas baixas quantidades de metilxantinas em relação ao primeiro internódio, além de haver apenas cafeína em MN e apenas teobromina em AC1.

5.3. Cafeína em pericarpo e perisperma de frutos

O pericarpo (ou polpa) de AC1 apresentou baixa quantidade de cafeína em relação ao de MN. A polpa é um subproduto do processamento do café, e seu descarte é prejudicial à natureza devido à quantidade de cafeína e taninos encontrados (Mazzafera, 1999). As altas quantidades desses compostos também são um empecilho à utilização deste subproduto como ração animal por diminuírem sua palatabilidade (Mazzafera, 1999). Há a possibilidade do pericarpo encontrado na planta descafeinada mitigar o impacto causado pelo descarte deste material, já que a baixa quantidade desta metilxantina poderia aumentar a palatabilidade da mesma para utilização como ração. Para comprovação desta hipótese estudos específicos são indicados.

5.4. Metabolismo de metilxantinas em endospermas

Apesar da quantidade de cafeína em AC1 ser muito menor do que a encontrada em MN, o padrão de acúmulo de cafeína foi semelhante nos dois cafeeiros. Tanto em AC1 quanto em MN a maior porcentagem ocorreu quando os frutos eram ainda bem jovens (chumbinho). Em MN a porcentagem foi de 2,86% e em AC1, de 0,39%. Frutos de *C. arabica* das variedades Mokka e Catimor também apresentaram maiores porcentagens em frutos neste mesmo estágio de desenvolvimento, mas em ambos os casos as porcentagens de cafeína foram ainda maiores do que aquelas encontradas em MN, sendo que em Mokka o valor encontrado foi de 4,16% e em Catimor foi de 6% (Koshiro et al., 2006).

O menor valor percentual de cafeína em MN ocorreu do estágio chumbinho para o estágio de surgimento do perisperma. Nesta variedade, a queda foi de 2,86% para 1,2%, enquanto que nas variedades Mokka e Catimor a queda entre estes dois estádios também foram consideráveis. Na variedade Mokka a queda foi de 4,16% para 2,7% e em Catimor foi de 6% para 3,1% (Koshiro et al., 2006). Na planta descafeinada não houve diferença nas porcentagens, já que praticamente o mesmo percentual foi encontrado, aproximadamente 0,38%.

Os endospermas completamente desenvolvidos de MN e AC1 analisados neste trabalho apresentaram, respectivamente, médias de 0,9% e 0,04% de cafeína, com base na massa seca. Ky et al. (2001) encontraram média de 1,2% em sementes de *C. arabica* de plantas selvagens, variando de 0,96% e 1,62%. As variedades de *C. arabica* Mokka e Catimor apresentaram cada uma 1% de cafeína neste mesmo estágio de desenvolvimento (Koshiro et al., 2006).

As sementes de AC1 apresentaram concentrações de cafeína muito inferiores às plantas de *C. arabica* pesquisadas até então. Algumas espécies apresentam naturalmente menores quantidades de cafeína do que a maior parte das variedades de *C. arabica*, como é o caso de *C. eugenoides* (0,4%), *C. arabica* var. Laurina (0,6%), *C. salvatrix* (0,8%), *C. racemosa* (0,8%) e *C. dewevrei* (0,25% em endospermas imaturos). Mazzafera e Carvalho (1992) obtiveram os híbridos H6868-1 e o H6742-1, ambos (*C. liberica* x *C. eugenoides*) x *C. eugenoides*, que apresentaram respectivamente 0,70% e 0,65% de cafeína. Atualmente, novos híbridos desenvolvidos em Madagascar por Nagai et al. (2008), a partir de cruzamentos entre *C. arabica*, *C. canephora* e *C. eugenoides*, apresentaram 0,37% de teobromina e quantidades não detectadas de cafeína.

A análise da via biossintética da cafeína aqui apresentada indicou que nos endospermas de MN a cafeína foi a metilxantina que apresentou maiores níveis, apesar de apresentar certa quantidade de teobromina. Já em AC1, como visto no Tabela 2, a metilxantina que apresentou maior acúmulo foi a teobromina. A teofilina, produto do catabolismo da cafeína também foi detectada tanto em MN quanto em AC1. Suzuki e Waller (1984) mostraram em frutos imaturos de *C. arabica* que, após a administração de adenina marcada, 33,4% da radioatividade foi incorporada em cafeína; 1,6% em teobromina e 1% em 7-metilxantina, enquanto que não foi encontrada radioatividade em teofilina.

Analisando os resultados obtidos em MN e AC1, após administração de cafeína marcada aos frutos imaturos observou-se que nos endospermas tanto teobromina quanto teofilina foram sintetizados. O mesmo foi encontrado no estudo feito por Suzuki e Waller (1984), em que frutos imaturos, além de apresentarem a

própria cafeína adicionada, apresentaram entre o dobro e o triplo de teobromina em relação à teofilina.

Os frutos de MN e AC1 não apresentaram diferenças significativas quanto ao catabolismo de cafeína, indicando que o acúmulo de teobromina encontrado em frutos de AC1, em relação aos de MN, está relacionado com a baixa atividade da cafeína sintase a partir da teobromina.

Com os resultados encontrados pelos estudos metabólicos com compostos marcados e dosagens de metilxantinas endógenas, constatou-se que as altas taxas de teobromina na planta AC1 foi devido a um comprometimento na conversão de teobromina em cafeína, reação catalisada pela cafeína sintase. Para corroborar este resultado foram medidas nos endospermas as atividades enzimáticas de duas das três metiltransferases da via biossintética da cafeína, teobromina sintase e cafeína sintase. Foi tomado o cuidado de usar endospermas imaturos, porque este é o período em que estes tecidos apresentam maior atividade biossintética de cafeína, como comprovado por Suzuki e Waller (1984) e Mazzafera (1994a). Ao comparar as atividades de endospermas de MN e AC1 foi interessante observar que a atividade da metiltransferase cafeína sintase apresenta diferença significativa, sendo significativamente menor em AC1. Apesar de não haver diferença significativa na atividade da teobromina sintase das duas plantas, nos endospermas de AC1 houve uma tendência a uma menor concentração de teobromina. Foi então comprovada por este experimento, que a baixa quantidade de cafeína nos endospermas destas plantas foi devida a uma diminuição na conversão de teobromina em cafeína. Em contraste, Mazzafera et al. (1994b) verificaram que em endospermas imaturos de *C. dewevrei*, a baixa quantidade de cafeína encontrada deve-se a um alto catabolismo da cafeína, ao se comparar com atividades de *C. arabica* das variedades Mundo

Novo e Laurina. Como visto em AC1, os endospermas de *C. dewevrei*, observados por Mazzafera et al. (1994b), acumularam teobromina. O acúmulo deste composto em *C. dewevrei* foi devido a uma efetiva conversão de cafeína em teobromina. Isto foi comprovado após incubar frutos imaturos das três plantas com [³H]cafeína + teofilina. Foi encontrado que a inibição da conversão de [³H]cafeína foi maior em endospermas de *C. dewevrei* para teobromina do que para teofilina.

O gene *CmXRS1*, que codifica a enzima 7-metilxantosina sintase, foi expresso nos dois endospermas, e apesar de ter sido encontrada alguma diferença entre MN e AC1, esta diferença não foi significativa.

O gene *CCS1*, apesar de ser expresso nos endospermas das duas plantas, apresentou expressão significativamente maior nos endospermas de MN. É possível que a baixa expressão em AC1 seja responsável pela baixa quantidade de cafeína nos endospermas de AC1. Por se tratar de um gene que codifica uma enzima bifuncional, apresentando atividades teobromina e cafeína sintase, este resultado pode explicar, pelo menos em parte, as baixas atividades encontradas de cafeína sintase e teobromina sintase nos endospermas descafeinados. Semelhantemente, também, foi encontrada diferença de expressão para o gene *CTS2*, que codifica a enzima teobromina sintase, que foi expresso nas duas plantas, apesar de em MN a expressão ter sido maior.

Análises por PCR quantitativo mostraram que a expressão dos genes que codificam para as enzimas teobromina sintase (*CTS2*) e cafeína sintase (*CCS1*) foram reduzidos na planta AC1, em comparação com a variedade com cafeína (Maluf et al., 2009). Estes resultados não foram consistentes com nossos resultados para atividades enzimáticas, em que a atividade cafeína sintase foi quase ausente e havia uma parcial redução da atividade da teobromina sintase. Uma possível explicação

para a redução da conversão enzimática de 7-metilxantina para teobromina é que a cafeína sintase é uma enzima bifuncional, que também media a biossíntese de teobromina para 7-metilxantina (Mizuno et al., 2003). Então, a redução da atividade da teobromina sintase foi em parte perdida devido à perda da expressão do gene da cafeína sintase. Os resultados da expressão gênica não são suportados também pelos resultados dos experimentos com administração de [2-¹⁴C] adenina em frutos (este trabalho) e com folhas de AC1 (Silvarolla et al., 2004), na qual mostrou que o bloqueio na síntese de cafeína ocorreu entre teobromina e cafeína. Uma significativa redução da expressão de teobromina sintase em AC1 (Maluf et al., 2009) deve ser explicada pelo fato de que as três metiltransferases da via biossintética da cafeína em café compartilham de alta similaridade de suas seqüências (Mizuno et al., 2003; Kato & Mizuno, 2004; Yoneyama et al., 2006; Ashihara, 2008) na qual pode ter resultado na perda da especificidade nos primers usados nas análises de expressão em AC1 (Maluf et al., 2009). Os mesmos primers utilizados por Maluf et al. (2009) foram utilizados nos experimentos deste trabalho.

5.5. Metabolismo de metilxantinas em folhas

A administração de adenina marcada a folhas de *C. arabica* var. Kent mostrou que a partir deste precursor houve a síntese de alcalóides purínicos (Ashihara et al., 1996), sendo que em folhas jovens foram encontradas teobromina e cafeína marcadas, com valores respectivamente de 26,2 e 20,5 kBq/ mg de folha fresca. Como observado na Tabela 1, as folhas das duas plantas de *C. arabica* analisadas também apresentaram cafeína e teobromina marcadas. A diferença mais evidente foi

que a quantidade de teobromina marcada nas folhas de AC1 foi aproximadamente seis vezes maior do que a de cafeína, enquanto que em MN a quantidade de cafeína marcada foi pouco mais que o dobro de teobromina. Estes resultados sugerem que a conversão de teobromina para cafeína apresenta alguma disfunção em AC1 em relação às folhas de MN. Estes resultados estão em concordância com os níveis de cafeína e teobromina endógenas encontradas nas folhas analisadas. Assim como observado nos primeiros pares foliares de MN, Ashihara et al. (1996) observaram em *C. arabica* var. Kent que à medida que a folha envelheceu houve uma diminuição tanto nos níveis de cafeína quanto de teobromina. Eles analisaram três categorias de folhas: jovens, com 7,1 mg de cafeína/g e 1,8 mg de teobromina/g; maduras, com 2,1 mg de cafeína/g e 0,13 mg de teobromina/g; e velhas, com 2,4 mg de cafeína/g e 0,06 mg de teobromina/g. Em MN foi possível observar este padrão de acúmulo de metilxantinas ao longo do amadurecimento das folhas. Foi interessante observar que nas folhas de AC1 o método empregado não detectou cafeína, apenas altas quantidades de teobromina, reforçando a hipótese de deficiência na conversão de teobromina para cafeína nos pares foliares de AC1.

Apesar de na variedade Kent a teofilina não ter sido detectada, tanto em MN quanto em AC1 esta metilxantina foi encontrada, tanto após administração de adenina quanto de cafeína marcadas. Quando se administrou cafeína marcada, além da teofilina, também foi detectada teobromina, sugerindo que esta metilxantina está envolvida em pelo menos parte da via de degradação de cafeína. Silvarolla et al. (2004) obtiveram resultados similares com folhas de MN e AC1, já que traços de teofilina e teobromina, em ambos os casos, foram localizados após administrar cafeína marcada.

No período em que foram feitas as coletas, as quantidades de cafeína em MN apresentaram algumas variações. É sabido que o metabolismo de metilxantinas é alterado em folhas de *Camellia sinensis* devido a variações sazonais, sendo que as quantidades de metilxantinas são maiores na primavera e menores no inverno (Fujimori et al., 1991). Entretanto, as variações que ocorreram nas folhas analisadas neste trabalho foram nas estações primavera e verão, sendo que os maiores valores de cafeína em MN, ao contrário de AC1, foram encontrados no verão, quando as temperaturas e a incidência de chuvas geralmente é maior.

5.6. Compostos relacionados ao sabor e aroma do café em grãos verdes

Em frutos verdes, mas que já apresentavam o endosperma desenvolvido, o acúmulo de trigonelina encontrado (fig. 14) foi próximo ao acumulado nas sementes de frutos maduros, sendo que em MN foram encontrados 9 mg/g e em AC1 este acúmulo chegou a 11 mg/g. Estudo feito com duas variedades de *C. arabica* mostrou que diferenças quantitativas também foram encontradas em frutos verdes (Koshiro et al., 2006), assim como visto em MN e AC1. Enquanto Catimor acumulou 14 mg/g, Mokka apresentou aproximadamente 10 mg/g de trigonelina, valores próximos ao que foi encontrado em MN, que foi de aproximadamente 11 mg/g. No trabalho de Ky et al. (2001) foi observado que sementes de plantas selvagens de *C. arabica* acumularam 11,9 mg/g de trigonelina. Em *C. arabica* brasileiro, proveniente de Espírito Santo do Pinhal, SP, foram encontrados aproximadamente 13,4 mg/g deste composto (Farah et al., 2006a) e em *C. arabica* proveniente da Etiópia o acúmulo foi

de 13 mg/g (Campa et al., 2004). No processo de descafeinação por diclorometano foi detectada perda de trigonelina, como mostrado em trabalho feito por Abrahão et al. (2008). Sementes de *C. arabica* integrais apresentaram entre 12,4 mg/g e 13,4 mg/g de trigonelina, enquanto que os grãos que passaram pelo processo de retirada da cafeína apresentaram entre 11,7 mg/g e 11,8 mg/g de trigonelina, havendo, portanto, uma pequena perda deste composto.

Trigonelina é um dos precursores de produtos responsáveis pela qualidade do aroma do café, já que após a torra a degradação deste composto pode chegar até 90% (Farah et al., 2006a), sendo a niacina um dos compostos formados mais conhecidos. Como mostrado neste trabalho, a planta descafeinada acumula quantidades de trigonelina similares a outras *C. arabica*, entre elas variedades comerciais.

Houve significativa variação nas quantidades de ácidos carboxílicos ao longo do desenvolvimento do fruto (fig. 17). Em ambas as plantas o ácido cítrico foi o que apareceu em maior concentração. Em MN a quantidade deste ácido carboxílico manteve-se relativamente estável, entre 16 e 21 mg/g, enquanto que em AC1 este mesmo ácido aumentou ao longo do desenvolvimento, indo de 0,8 a 16,7 mg/g. O mesmo padrão encontrado em AC1 foi visto em duas variedades de *C. arabica*, Caturra comercial e Caturra 2308, por Rogers et al. (1999). Estas variedades apresentaram no início do desenvolvimento entre 0,4 e 1,9 mg/g, enquanto que no grão maduro a quantidade deste ácido variou entre 12,8 e 15,8 mg/g. Em sementes de *C. arabica*, com variedade não especificada, Alcázar et al. (2003) observaram que o ácido que apresentou maior acúmulo também foi o cítrico. Esta planta acumulou 8,5 mg/g, valor inferior aos encontrados neste trabalho e nas variedades Caturra comercial e Caturra 2308 (Rogers et al., 1999).

Variações no acúmulo de ácido málico também foram encontradas ao longo do desenvolvimento do endosperma de MN e AC1. Nas variedades estudadas de Caturra (Rogers et al., 1999), apesar deste ácido apresentar entre 4 e 5 mg/g, ele foi o segundo mais abundante em sementes. Em uma variedade não especificada de *C. arabica*, Alcázar et al. (2003) observaram o acúmulo de 4,14 mg ácido málico/g. Em AC1 este ácido apresentou quantidades próximas às dos trabalhos citados, chegando a 3,6 mg/g, sendo o segundo ácido mais abundante neste tecido (fig. 17). Já MN apresentou 1,8 mg/g, quantidade inferior ao encontrado em nas outras variedades de *C. arabica*.

Quanto ao oxalato, em AC1 atingiu 1,9 mg/g e em MN, 12 mg/g. Em endospermas de Caturra a quantidade deste ácido foi de 6,7 mg/g, ou seja, valor intermediário ao encontrado em MN e AC1 (Rogers et al., 1999).

Grãos de *C. arabica* cv. Caturra (Rogers et al., 1999) apresentaram padrão de acúmulo de açúcares semelhante ao que foi encontrado em MN e AC1. Os açúcares redutores, glicose e frutose, que apresentaram altas quantidades em grãos jovens, passaram a apresentar baixos níveis em grãos maduros. Quanto à sacarose o inverso foi encontrado.

Em endospermas imaturos de MN a concentração de glicose foi metade da concentração de frutose, enquanto que a proporção inversa foi encontrada em grãos imaturos de Caturra (Rogers et al., 1999). Também houve diferenças quantitativas, já que as concentrações de glicose em Caturra ficaram entre 80 e 120 mg/g e as de frutose a metade. Em AC1 a quantidade de glicose foi próxima a encontrada em MN, entre 21 e 24 mg/g, mas a frutose em AC1 apresentou quantidades mais elevadas, do que foi encontrado em MN. Nos grãos maduros a glicose diminuiu para 1,4 mg/g em MN e em AC1 as concentrações foram ainda menores, chegando a 0,12 mg/g.

Frutose, que também apresentou queda, ficou em 3,2 mg/g em MN e 1,1 mg/g em AC1. Nas variedades estudadas por Rogers et al. (1999), frutose e glicose apresentaram respectivamente 0,4 e 0,3 mg/g, quantidades bem menores do que foi observado no atual estudo. Murkovic e Derler (2006) observaram que em sementes de café Arábica de vários locais do mundo a glicose variou entre quantidades não detectadas a 2,2 mg/g enquanto que frutose variou entre quantidades não detectadas e 1,9 mg/g. Talvez um dos fatores que afetam estes dados seja o exato estágio de amadurecimento em que os grãos foram coletados. Mazzafera (dados não publicados) observou que tomando como base a coloração vermelha da epiderme, frutos aparentemente no mesmo estágio de maturação ainda mostravam intensa variação de cor quando se usava um colorímetro portátil para determinação da cor. Sabe-se que fatores externos também podem alterar os níveis de açúcares em grãos de café. Geromel et al. (2008) observaram que grãos de café crescidos à sombra além de serem maiores, apresentam menores níveis de sacarose e maiores de açúcares redutores. Entretanto diferenças ambientais provavelmente não são os fatores responsáveis pelo resultado encontrado, já que ambas as plantas estão sob as mesmas condições ambientais, no mesmo campo experimental.

Endospermas imaturos apresentaram 6 mg/g de sacarose em MN e 11 mg/g em AC1 no mesmo estágio de desenvolvimento. Em grãos imaturos de Caturra foram encontradas baixas quantidades deste açúcar, ocorrendo aumento com o desenvolvimento destes. No grão maduro sacarose apresentou entre 50 e 120 mg/g, chegando a representar aproximadamente 100% do total de açúcares livres nos grãos de Caturra (Rogers et al., 1999).

Nos vários tipos de grãos de *C. arabica* provenientes de Espírito Santo do Pinhal, SP, as quantidades de sacarose variaram entre 78,5 e 48 mg/g, e estas

quantidades não apresentaram correlação com a qualidade dos cafés analisados (Farah et al., 2006a). Outro estudo com *C. arabica* proveniente da Etiópia mostrou que o acúmulo deste açúcar no grão foi aproximadamente 93,2 mg/g (Campa et al., 2004) e em grãos desta mesma espécie originados de vários lugares do mundo foi observado que as quantidades de açúcares variaram entre 63 e 90 mg/g (Murkovic & Derler, 2006). Como visto, há variações consideráveis nos teores deste açúcar entre uma planta e outra, que são atribuídas às peculiaridades de cada variedade e influência de outros fatores (Toci et al., 2006). Em MN as porcentagens nos endospermas completamente maduros chegaram a 61 mg/g e em AC1 foram 37 mg/g. Em grãos de *C. arabica*, com variedade não identificada, os teores de sacarose em grãos verdes integrais foram de 96,5 mg/g. Após descafeinação com diclorometano estes grãos apresentaram 38,5 mg/g de sacarose, ou seja, houve perda de 60% deste composto (Toci et al., 2006).

Em sementes brasileiras não torradas de *C. arabica* var. *Typica*, o aminoácido encontrado em maior quantidade foi o glutamato, com 1414 µg/g, vindo em seguida o aspartato, com 523 µg/g, e em terceiro o GABA, com 397 µg/g (Casal et al., 2005). Em grãos verdes de *C. arabica* proveniente de vários lugares do mundo foi observado que a alanina foi o aminoácido que apresentou maior concentração, variando entre 410 a 14000 µg/g, seguida pela asparagina, que acumulou entre 280 e 960 µg/g e em terceiro foi a fenilalanina, que ficou entre 180 e 780 µg/g (Murkovic & Derler, 2006). Nesse trabalho, como visto em resultados, os três aminoácidos mais abundantes tanto em MN em quanto em AC1 foram asparagina, aspartato e glutamato. Apesar dos três primeiros aminoácidos mais abundantes terem sido os mesmos, o que indica que os produtos da reação de “Maillard” não devem ter alterações tão significativas, é de se considerar que em MN a quantidade de

aminoácidos livres encontrados foi significativamente maior. A asparagina e o glutamato foram aminoácidos também encontrados em altas concentrações em outros grãos de café, como acima descrito. Como não foi descrito o procedimento adotado, é possível que a alta quantidade de alanina encontrada em todas as amostras analisadas por Murkovic e Derler (2006) seja devida ao processamento pós-colheita, como descrito por Arnold & Ludwig (1996) e Castro & Marraccini (2006). Além disso, fatores ambientais também podem ser os responsáveis pelas diferenças nos níveis de aminoácidos. É conhecido que a temperatura do ar é um fator que afeta a qualidade da bebida, já que ela influencia na atividade de proteinases. Em frutos de *C. arabica* cv. Obatã, foi observado que diferenças na temperatura onde se encontravam os cafeeiros influenciou na quantidade de alguns aminoácidos encontrados em endospermas (Abreu et al., 2012). Não foi possível fazer um paralelo com a composição de aminoácidos em grãos artificialmente descafeinados, já que não há estudos publicados sobre este parâmetro.

Foi observado aqui que apesar dos níveis de 5CQA nos endospermas de MN e AC1 serem próximos, foram detectados respectivamente 92,9 e 80,85 mg de ácidos clorogênicos/g de endosperma em MN e AC1, indicando que há uma maior quantidade de ácidos clorogênicos nas sementes da planta com cafeína. Análise colorimétrica mostrou que as quantidades de compostos fenólicos foram próximas, sendo que em MN a quantidade foi de 15% e em AC1 foi de 17%. Estes resultados associados levam a crer que, principalmente nos endospermas de AC1, outros compostos polifenólicos, podendo ser inclusive outros ácidos clorogênicos, não foram detectados pelo método empregado no HPLC. Esta hipótese é plausível se levarmos em consideração que recentemente Clifford et al. (2006) descreveram doze novos ácidos clorogênicos em grãos verdes de café.

Também foi observado que tanto MN quanto AC1 apresentaram maiores quantidades de 5CQA do que algumas sementes de *C. arabica* mostradas na literatura. Em *C. arabica* selvagem foi observada uma média de acúmulo de 31 mg/g com base na massa seca de 5CQA e 4CQA associados (Ky et al., 2001) e nas variedades Bourbon, Sumatra (proveniente de Mandhelin), Sumatra (proveniente de Torajaland) e Herlon foram encontradas respectivamente 31; 32; 43 e 36 mg/g de 5CQA (Farah et al., 2006b). Há alguns fatores como frio, altas intensidades luminosas, condições de stress hídrico, que influenciam o acúmulo de fenilpropanóides, entre eles os ácidos clorogênicos (Dixon & Paiva, 1995). Experimentos indicaram que os níveis de ácidos clorogênicos aumentam com a altitude (Avelino et al., 2005) e que os níveis de 5CQA aumentam e os de 3CQA e 4CQA diminuem com o aumento da temperatura (Joët et al., 2010). Nas variedades estudadas por Farah et al. (2006b) foi interessante observar que grãos descafeinados, utilizando água como meio de descafeinação, apresentaram queda na quantidade de 5CQA. Concomitantemente houve aumento nos níveis de outros ácidos clorogênicos, atribuído a dois principais fatores. Um deles é que o processo de descafeinação pode ter ocasionado perda de compostos hidrossolúveis e o segundo é que pode ter ocorrido a isomerização de substituintes do cinamoil na posição 5 do ácido quínico para as posições 3 e 4 (Farah et al., 2006b). A descafeinação com diclorometano influenciou ainda mais as quantidades de 5CQA em grãos verdes de *C. arabica* (Toci et al., 2006; Abrahão et al., 2008). No grão integral a variação encontrada ficou entre 48 e 36 mg/g, enquanto que nos grãos descafeinados a concentração de 5 CQA ficou em torno de 19 mg/g (Abrahão et al., 2008). No café Arabica proveniente de Espírito Santo do Pinhal foi encontrado perda de 42% de 5CQA, aumento de 61% do 3 CQA e de 60% do 4 CQA. Foi também

observada uma forte relação entre a quantidade de ácidos clorogênicos e a qualidade da bebida (Farah et al., 2006a). Maiores quantidades de isômeros do cafeoilquínico e do feruloilquínico nos grãos verdes indicam pobre qualidade do café, enquanto que maiores quantidades de dicafeoilquínicos indicam boa qualidade da bebida proveniente deste grão (Farah et al., 2006a).

Como mostrado pela literatura, os processos de descafeinação alteram os teores de ácidos clorogênicos em grãos de *C. arabica*. O café naturalmente descafeinado tem a vantagem de manter os níveis destes compostos próximos aos encontrados em cafés comumente consumidos pela população.

Como constatado por Abrahão et al. (2008) em análises de café descafeinado quimicamente, a bebida feita a partir de grãos de *C. arabica* normais foi classificada como café bebida dura, com corpo, aroma, acidez e retrogostos normais, enquanto que as características da bebida descafeinada foi café descaracterizado, sem acidez, retrogosto ruim e sabor de gordura. Com base nesta avaliação foi observado a relevância da bebida naturalmente descafeinada, já que a bebida proveniente destes grãos é boa, igual a cafés cultivados comercialmente (comunicação pessoal de Maria Bernadete Silvarolla). Foram mantidas as quantidades de trigonelina, o ácido cítrico foi o ácido carboxílico mais abundante, a sacarose foi o monossacarídeo mais abundante, e os teores de ácido clorogênico foram similares aos da planta com cafeína. Além da manutenção do aroma e do paladar da bebida, não há o inconveniente de resíduos de solvente remanescente do processo de descafeinação.

5.7. Atividade antioxidante

Além de serem importantes no sabor e no aroma da bebida, os compostos polifenólicos possuem grande importância na atividade antioxidante, sendo que os principais componentes são os ácidos clorogênicos (Nesbery & Budryn, 2003). São muitos os trabalhos que mostram a atividade antioxidante das sementes e da bebida do café (Daglia et al. 2000; Nesbery & Budryn 2003; Brezová et al. 2009; Sacchetti et al. 2009). As avaliações das atividades antioxidantes neste trabalho mostraram que tanto em MN quanto em AC1 as atividades foram similares. A literatura mostra que bebidas provenientes de sementes de *C. arabica* artificialmente descafeinadas não mostraram diferenças quanto às atividades antioxidantes em relação ao grão de café integral (Richelle et al., 2001).

6. CONCLUSÕES

- Toda a planta AC1, e não somente os frutos, apresentam baixos níveis de cafeína;
- Foram encontrados altos níveis de teobromina, precursor da cafeína;
- O acúmulo de teobromina se deve a uma baixa atividade da enzima cafeína sintase;
- O catabolismo de cafeína não contribuiu para as taxas de cafeína encontradas nos endospermas da planta descafeinada;
- Em AC1, a maioria dos compostos relacionados ao sabor e ao aroma da bebida apresenta quantidades semelhantes ao da planta MN;
- A atividade antioxidante é semelhante nos dois endospermas.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Sementes de AC1 apresentam as mesmas propriedades organolépticas de uma planta de *C. arábica*, com o diferencial de possuir baixa concentração de cafeína. Por esse motivo podem ser utilizadas como grãos descafeinados, evitando os resíduos de diclorometano do processo químico de descafeinização. Estas sementes também são vantajosas sob o ponto de vista de divulgação comercial em relação a possíveis cafés transgênicos com baixas concentrações de cafeína, já que a baixa quantidade de AC1 é uma característica “natural” da planta. Devido ao fato do café descafeinado ter consumo maior no mercado externo, é de se esperar que a exportação deste tipo de café também traga vantagens econômicas para o país.

8. LITERATURA CITADA

- Abrahão, S.A. et al., 2008. Compostos bioativos em café integral e descafeinado e qualidade sensorial da bebida. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 43(12), pp.1799–1804.
- Abreu, H.M.C. et al., 2012. Influence of air temperature on proteinase activity and beverage quality in *Coffea arabica*. , 35(4), pp.357–376.
- Alcázar, A. et al., 2003. Ion chromatographic determination of some organic acids, chloride and phosphate in coffee and tea. *Talanta*, 61, pp.95–101.
- Associação Brasileira da Indústria de Café (ABIC).
- Arnold, U. & Ludwig, E., 1996. Analysis of free amino acids in green coffee beans II. Changes of the amino acid content in arabica coffees in connection with post-harvest model treatment. *Z Lebensm Unters Forsch*, 203(4), pp.379–384.
- Ashihara, H. et al., 1996. Biosynthesis of caffeine in leaves of coffee. *Plant Physiology*, 111, pp.747–753.
- Ashihara, H., 2006. Metabolism of alkaloids in coffee plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 18(1), pp.1–8.
- Ashihara, H., 2008. Production of a new low-caffeine hybrid coffee and the biochemical mechanism of low caffeine accumulation. *Euphytica*, 164, pp.133–142.
- Ashihara, H. & Crozier, A., 1999. *Biosynthesis and metabolism of caffeine and related purine alkaloids in plants* 1st ed. J. A. Callow, ed., Advances in Botanical Research.
- Ashihara, H. & Crozier, A., 2001. Caffeine: a well known but little mentioned compound in plant science. *Trends Plant Science*, 6(9), pp.407–413.
- Ashihara, H. & Kubota, H., 1987. Biosynthesis of purine alkaloids in *Camellia* plants. *Plant and Cell Physiology*, 28(3), pp.535–539.
- Ashihara, H., Sano, H. & Crozier, A., 2008. Caffeine and related purine alkaloids: Biosynthesis, catabolism, function and genetic engineering. *Phytochemistry*, 69, pp.841–856.
- Ashihara, H. & Suzuki, T., 2004. Distribution and biosynthesis of caffeine en plants. *Frontiers in Bioscience*, 9, pp.1864–1976.

- Avelino, J. et al., 2005. Effects of slope exposure, altitude and yield on coffee quality in two altitudeterroirs of Costa Rica, Orosi and Santa María de Dota. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85(11), pp.1869–1876.
- Baltes, W. & Bochmann, G., 1987. Model reactions on roast aroma formation. III. Mass spectrometric identification of pyrroles from the reaction of serine and threonine with sucrose under the conditions of coffee roasting. *Z Lebensm Unters Forsch*, 184, pp.478–484.
- Baumann, T. W., 2006. Some thoughts on the physiology of caffeine in coffee and a glimpse of metabolite profiling. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 18(1), pp.243–251.
- Baumann, T. W. & Gabriel, H., 1984. Metabolism and excretion of caffeine during germination of *Coffea arabica* L. *Plant Cell Physiol.*, 25(8), pp.1431–1436.
- Blecher, R. & Lingens, F., 1977. The metabolism of caffeine by a *Pseudomonas putida* strain. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie*, 358(7), pp.807–17.
- Bradford, M. M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, pp.248–254.
- Brezová, V., Slebodová, A. & Stasko, A., 2009. Food Coffee as a source of antioxidants: AN EPR study. *Food Chemistry*, 114, pp.859–868.
- Camargo, Â.P. & Camargo, M.B.P., 2001. Definição e esquematização das fases fenológicas do cafeeiro arábica nas condições tropicais do Brasil (1). *Bragantia*, 60(1), pp.65–68.
- Campa, C. et al., 2004. Trigonelline and sucrose diversity in wild *Coffea* species. *Food Chemistry*, 88, pp.39–43.
- Casal, S. et al., 2005. Roast effects on coffee amino acid enantiomers. *Food Chemistry*, 89, pp.333–340.
- Del Castillo, M.D., Ames, J.M. & Gordon, M.H., 2002. Effect of roasting on the antioxidant activity of coffee brews. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, pp.3698–3703.
- Castro, R. D. de & Marraccini, P., 2006. Cytology, biochemistry and molecular changes during coffee fruit development. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 18(1), pp.175–199.
- Chen, J. H. & Ho, C., 1997. Antioxidant activities of caffeic acid and its related hydroxycinnamic acid compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, pp.2374–2378.

- Chou, C.-H. & Waller, G. R., 1980. Possible allelopathic constituents of *Coffea arabica*. *Journal of Chemical Ecology*, 6(3), pp.643–654.
- Clifford, M.N. et al., 2006. Characterization by LC-MSn of four new classes of chlorogenic acids in green coffee beans: Dimethoxycinnamoylquinic acids, diferuloylquinic acids, caffeoyl-dimethoxycinnamoylquinic acids, and feruloyl-dimethoxycinnamoylquinic acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(6), pp.1957–1969.
- Cocking, E. C. & Yemm, E. W., 1954. Estimation of aminoacids by ninhidrin. *Biochemical Journal*, 58, pp.12–13.
- Daglia, M. et al., 2000. In vitro antioxidant and ex vivo protective activities of green and roasted coffee. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, pp.1449–1454.
- DaMatta, F. M. & Ramalho, J. D. C., 2006. Impacts of drought and temperature stress on coffee physiology and production: a review. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 18(1), pp.55–81.
- Davis, A. P. et al., 2006. An annotated taxonomic conspectus of the genus. *Botanical Journal of the Linnean Society*, pp.465–512.
- Dentan, E., 1985. *The microscopic structure of the coffee bean*. In: Clifford MN and Wilson KC (Eds) *Coffee: botany, biochemistry and production of beans and beverage*,
- Dixon, R. A. & Paiva, N. L., 1995. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *The Plant Cell*, 7, pp.1085–1097.
- Eira, M. T. S. et al., 2006. Coffee seed physiology. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 18(1), pp.149–163.
- Eteng, M. U. et al., 1997. Recent advances in caffeine and theobromine toxicities: a review. *Plant Foods for Human Nutrition*, pp.231–243.
- Farah, A. et al., 2006. Correlation between cup quality and chemical attributes of Brazilian coffee. *Food Chemistry*, 98, pp.373–380.
- Farah, A. et al., 2006. Chlorogenic acids and lactones in regular and water-decaffeinated Arabica coffees. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, pp.374–381.
- Ferre, S., 2008. An update on the mechanisms of the psychostimulant effects of caffeine. *Journal of Neurochemistry*, pp.1067–1079.

- Fisone, G., Borgkvist, A. & Usiello, A., 2004. Review Caffeine as a psychomotor stimulant: mechanism of action. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 61, pp.857–872.
- Friedman, J. & Waller, G. R., 1983. Caffeine hazards and their prevention in germinating seeds of coffee (*Coffea arabica* L.). *Journal of Chemical Ecology*, 9(8), pp.1099–1106.
- Fujimori, N., Suzuki, T. & Ashihara, H., 1991. Seasonal variations in biosynthetic capacity for the synthesis of caffeine in tea leaves. *Phytochemistry*, 30(7), pp.2245–2248.
- Garriott, J.C. et al., 1985. Five cases of fatal overdose from caffeine-containing “look-alike” drugs. *J. Anal.Toxicol.*, 9, pp.141–143.
- Geromel, C. et al., 2008. Effects of shade on the development and sugar metabolism of coffee (*Coffea arabica* L.) fruits. *Plant physiology and biochemistry: PPB/ Société française de physiologie végétale*, 46(5-6), pp.569–79.
- Ho, H.I. et al., 1993. An overview of the Maillard reactions related to aroma generation in coffee. *ASIC*, pp.519–527.
- Hollingsworth, R. G., Armstrong, J.W. & Campbell, E., 2002. Caffeine as a repellent for slugs and snails. *Nature*, 417(6892), pp.915–6.
- Horman, I. & Viani, R., 1972. The nature and confirmation of the caffeine-chlorogenate complex of coffee. *Journal of Food Science*, 37, pp.925–927.
- Jarrett, H. W. et al., 1986. The separation of o-phthalaldehyde derivatives of amino acids by reversed-phase chromatography on octylsilica columns. *Analytical Biochemistry*, 153(1), pp.189–198.
- Joët, T. et al., 2010. Influence of environmental factors, wet processing and their interactions on the biochemical composition of green Arabica coffee beans. *Food Chemistry*, 118(3), pp.693–701.
- Kato, M. et al., 1996. Caffeine biosynthesis in young leaves of *Camellia sinensis*: In vitro studies on N-methyltransferase activity involved in the conversion of xanthosine to caffeine. *Physiologia Plantarum*, 98, pp.629–636.
- Kato, M. et al., 2000. Caffeine synthase gene from tea leaves. *Nature*, 406(August), pp.956–957.
- Kato, M. et al., 1999. Purification and characterization of caffeine synthase from tea leaves. *Plant Physiology*, 120(June), pp.579–586.
- Kato, M. & Mizuno, K., 2004. Caffeine synthase and related methyltransferases in plants. *Frontiers in Bioscience*, 9, pp.1833–1842.

- Katzung, B. G., 2007. *Farmacologia básica e clínica* 10th ed., Mc Graw-Hill Brasil.
- Kerrigan, S. & Lindsey, T., 2005. Fatal caffeine overdose: two case reports. *Forensic Sci. Int.*, 153, pp.67–69.
- Keya, C.A., Crozier, A. & Ashihara, H., 2003. Inhibition of caffeine biosynthesis in tea (*Camellia sinensis*) and coffee (*Coffea arabica*) plants by ribavirin. *FEBS Letters*, 554(3), pp.473–477.
- Koshiro, Y. et al., 2006. Changes in content and biosynthetic activity of caffeine and trigonelline during growth and ripening of *Coffea arabica* and *Coffea canephora* fruits. *Plant Science*, 171, pp.242–250.
- Ky, C.L. et al., 2001. Caffeine, trigonelline, chlorogenic acids and sucrose diversity in wild *Coffea arabica* L. and *C. canephora* P. accessions. *Food Chemistry*, 75, pp.223–230.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, pp.680–685.
- Lundsberg, L.S., 1998. *Caffeine consumption*. In: Spiller, G. *Caffeine* G. A. Spiller, ed., Crc Press.
- Maluf, M.P. et al., 2009. Altered expression of the caffeine synthase gene in a naturally caffeine-free mutant of *Coffea arabica*. *Genetics and Molecular Biology*, 32, pp.802–810.
- Maria, C. A. B. et al., 1996. Composition of green coffee water-soluble fractions and identification of volatiles formed during roasting. *Food Chemistry*, 55(3), pp.203–207.
- Maria, C. A. B., Moreira, R. F. A. & Trugo, L. C., 1999. Componentes voláteis do café torrado. Parte I: Compostos heterocíclicos. *Química Nova*, 22(2), pp.209–217.
- Maróstica Jr., M.R. et al., 2009. Antioxidant potential of aroma compounds obtained by limonene biotransformation of orange essential oil. *Food Chemistry*, 116, pp.8–12.
- Mazzafera, P. & Carvalho, A., 1991. A cafeína do café. *Documentos IAC*, 25. Instituto Agrônomo, Campinas.
- Mazzafera, P. & Magalhães, A.C.N., 1991. Cafeína em folhas e sementes de espécies de *Coffea* e *Paracoffea*. *Revista Brasileira de Botânica*, 14, pp.157–160.
- Mazzafera, P. & Carvalho, A., 1992. Breeding for low seed caffeine content of coffee (*Coffea* L.) by interspecific hybridization. *Euphytica*, 59, pp.55–60.

- Mazzafera, P., Wingsle, G., et al., 1994a. S-adenosyl-methionine:Theobromine 1-N-methyltransferase an enzyme catalysing the synthesis of caffeine in coffee. *Phytochemistry*, 37(6), pp.1577–1584.
- Mazzafera, P., Crozier, A. & Sandberg, G., 1994b. Studies on the metabolic control of caffeine turnover in developing endosperms and leaves of *Coffea arabica* and *Coffea dewevrei*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42, p.1423.
- Mazzafera, P. et al., 1997. Caffeine content of diploid coffee. *Ciência e Cultura*, 49, pp.216–218.
- Mazzafera, P., 1999. Mineral nutrition and caffeine content in coffee leaves. *Bragantia*, 58(2), pp.387–391.
- Mazzafera, P., Yamaoka-Yano, D.M. & Vitória, A. P., 1996. Para que serve a cafeína em plantas? *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, 8(1), pp.67–74.
- Mazzafera, P., 2004. Catabolism of caffeine in plants and microorganisms. *Frontiers in Bioscience*, 9, pp.1348–1359.
- Mazzafera, P. et al., 2009. Decaf and the steepchase towards decaffito—the coffee from caffeine-free Arabica plants. *Tropical Plant Biology*, 2(2), pp.63–76.
- Mendes, A. J. T., 1941. Citological observations in Coffea. VI. Embryo and endosperm development in *Coffea arabica* L. *American Journal of botany*, 28(9), pp.784–789.
- Mizuno, K., Okuda, A., et al., 2003a. Isolation of a new dual-functional caffeine synthase gene encoding an enzyme for the conversion of 7-methylxanthine to caffeine from coffee (*Coffea arabica* L.) 1. *FEBS Letters*, 534, pp.75–81.
- Mizuno, K., Kato, M., et al., 2003b. The first committed step reaction of caffeine biosynthesis: 7-methylxanthosine synthase is closely homologous to caffeine synthases in coffee (*Coffea arabica* L.). *FEBS Letters*, 547, pp.56–60.
- Montavon, P. et al., 2003. Evolution of green coffee protein profiles with maturation and relationship to coffee cup quality. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(8), pp.2328–2334.
- Moreira, R.F.A., Trugo, L.C. & Maria, C. A. B., 2000. Componentes voláteis do café torrado. Parte II: compostos alifáticos, alicíclicos e aromáticos. *Química Nova*, 23(2), pp.195–203.
- Mrvos, R. M. et al., 1989. Massive caffeine ingestion resulting in death. *Vet. Hum. Toxicol.*, 31, pp.571–572.
- Mumford, G.K. et al., 1994. Discriminative stimulus and subjective effects of theobromine and caffeine in humans. *Psychopharmacology*, 115(1-2), pp.1–8.

- Murkovic, M. & Derler, K., 2006. Analysis of amino acids and carbohydrates in green coffee. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 69(1-2), pp.25–32.
- Nagai, C. et al., 2008. Production of a new low-caffeine hybrid coffee and the biochemical mechanism of low caffeine accumulation. *Euphytica*, 164, pp.133–142.
- Nagata, T. & Sakai, S., 1985. Purine base pattern of *Camellia irrawadiensis*. *Phytochemistry*, 24(10), pp.2271–2272.
- Namiki, M., 1988. Chemistry of Maillard reactions: Recent studies on the browning reaction mechanism and the development of antioxidants and mutagens. *Advances in Food Research*, 32, pp.115–184.
- Nathanson, J. A., 1984. Caffeine and related methylxanthines: Possible naturally occurring pesticides. *Science*, 226(4671), pp.184–187.
- Nawrot, P. et al., 2003. Effects of caffeine on human health. *Food Additives & Contaminants*, 20(1), pp.1–30.
- Nesbery, E. & Budryn, G., 2003. Antioxidative activity of green and roasted coffee beans as influenced by convection and microwave roasting methods and content of certain compounds. *Europe Food Research Technology*, 217, pp.157–163.
- Ogawa, M. et al., 2001. 7-Methylxanthine methyltransferase of coffee plants. *Journal Biological Biochemistry*, 276(11), pp.8213–8218.
- Ogita, S. et al., 2003. Producing decaffeinated coffee plants. *Nature*, 423(June), pp.19–21.
- Ogita, S. et al., 2004. Application of RNAi to confirm theobromine as the major intermediate for caffeine biosynthesis in coffee plants with potential for construction of decaffeinated varieties. *Plant Molecular Biology*, pp.931–941.
- Ogita, S. et al., 2005. Metabolic engineering of caffeine production. *Plant Biotechnology*, 468, pp.461–468.
- Petermann, J.B. & Baumann, T. W., 1983. Metabolic relations between methylxanthines and methyluric acids in *Coffea* L. *Plant Physiology*, 73(4), pp.961–964.
- Prewo, R. et al., 1990. Crystal structure of mozambioside, a diterpene glycoside of *Coffea pseudozanguebariae*. *Phytochemistry*, 29, pp.990–992.
- Rakotomalala, J.-J.R. et al., 1992. Caffeine and theobromine in green beans from *Mascarocoffea*. *Phytochemistry*, 31(4), pp.1271–1272.

- Ramalakshmi, K. & Raghavan, B., 1999. Caffeine in coffee: Its removal. Why and how? *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 39(5), pp.441–456.
- Reginato, F.H. et al., 1999. Methylxanthines accumulation in Ilex species - Caffeine and theobromine in erva-mate (*Ilex paraguariensis*) and other Ilex species. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 10(6), pp.443–446.
- Reineccius, G.A., 1995. The Maillard reaction and coffee flavor. *ASIC*, pp.249–257.
- Richelle, M., Tavazzi, I. & Offord, E., 2001. Comparison of the antioxidant activity of commonly consumed polyphenolic beverages (coffee, cocoa, and tea) prepared per cup serving. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, pp.3438–3442.
- Rogers, W.J. et al., 1999. Changes to the content of sugars, sugar alcohols, myo-inositol, carboxylic acids and inorganic anions in developing grains from different varieties of Robusta (*Coffea canephora*) and Arabica (*C. arabica*) coffees. *Plant Science*, 149(2), pp.115–123.
- Rudolph, T. & Knudsen, K., 2010. A case of fatal caffeine poisoning. *Acta anaesthesiologica Scandinavica*, 54(4), pp.521–3. A
- Ruijter, J., Lorist, M.M. & Snel, J., 1999. The influence of different doses of caffeine on visual task performance. *Journal of Psychophysiology*, 13, pp.37–48.
- Sacchetti, G. et al., 2009. Effect of roasting degree, equivalent thermal effect and coffee type on the radical scavenging activity of coffee brews and their phenolic fraction. *Journal of Food Engineering*, 90, pp.74–80.
- Saldaña, M.D.A., Mazzafera, P. & Mohamed, R.S., 1998. Extração dos alcalóides cafeína e trigonelina dos grãos de café com CO₂ supercrítico. *Ciência Tecnologia de Alimentos*, 17, pp.371–376.
- Shahid, J., 2003. Genetically decaffeinated coffee. *Journal of Bioscience*, 28(5), pp.529–531.
- Shettel, N.L. & Balke, N.E., 1983. Plant growth response to several allelopathic chemicals. *Weed science*, 31, pp.293–298.
- Silvarolla, M. B. et al., 1999. Ploidy level and caffeine content in leaves of *Coffea*. *Sciencia Agricola*, 56, pp.661–663.
- Silvarolla, M. Be., Mazzafera, P. & Fazuoli, L. C. 2004. A naturally decaffeinated arabica coffee. *Nature*, 429(June), p.826.
- Silvarolla, M. B. Mazzafera, P. & Lima, M. M. A., 2000. Caffeine content of Ethiopian *Coffea arabica* beans. *Genetics and Molecular Biology*, 23(1), pp.213–215.

- Simões, C. M. O. et al., 2007. *Farmacognosia, da planta ao medicamento* 6th ed., PharmaBooks.
- Smith, A., 2002. Effects of caffeine on human behavior. *Food and Chemical Toxicology*, 40, pp.1243–1255.
- Smyth, D. A., 1992. Effect of methylxanthine treatment on rice seedling growth. *Journal of Plant Growth Regulation*, 11(2), pp.125–128.
- Suzuki, T. & Waller, G. R., 1987. Allelopathy due to purine alkaloids in tea seeds during germination. *Plant and Soil*, 98(1), pp.131–136.
- Suzuki, T. & Takahashi, E., 1975. Biosynthesis of Caffeine by Tea-Leaf Extracts. *Biochemical Journal*, 146, pp.87–96.
- Suzuki, T. & Waller, George R., 1984. Biosynthesis and biodegradation of caffeine, theobromine, and theophylline in *Coffea arabica* L. fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 32, pp.845–848.
- Swain, T. & Hillis, W.E., 1959. The phenolic constituents of *Prunus domestica*. I. The quantitative analyses of phenolic constituents. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 10, pp.63–68.
- Toci, A., Farah, A. & Trugo, L. C., 2006. Efeito do processo de descafeinação com diclorometano sobre a composição química dos cafés arábica e robusta antes e após a torração. *Química Nova*, 29(5), pp.965–971.
- Trugo, L. C. & Macrae, R., 1984. Chlorogenic acid composition of instant coffees. *Analyst*, 109, pp.263–266.
- Uefuji, H. et al., 2005. Caffeine production in tobacco plants by simultaneous expression of three coffee N-methyltransferases and its potential as a pest repellent. *Plant Molecular Biology*, 59(2), pp.221–7.
- Uefuji, H. et al., 2003. Molecular cloning and functional characterization of three distinct N-methyltransferases involved in the caffeine biosynthetic pathway in coffee plants. *Plant Physiology*, 132(May), pp.372–380.
- Velioglu, Y.S. et al., 1998. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(10), pp.4113–4117.
- Vitória, A. P. & Mazzafera, P., 1998. Caffeine degradation in leaves and fruits of *Coffea arabica* and *Coffea dewevrei*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 33(12), pp.1957–1961.

- Waldhauser, S. S. M. & Baumann, T. W., 1996. Compartmentation of caffeine and related purine alkaloids depends exclusively on the physical chemistry of their vacuolar complex formation with chlorogenic acids. *Phytochemistry*, 42(4), pp.985–996.
- Waldhauser, S. S. M., Kretschmar, J.A. & Baumann, T. W., 1997. N-methyltransferase activities in caffeine biosynthesis: biochemical characterization and time course during leaf development of *Coffea arabica*. *Phytochemistry*, 44(5), pp.853–859.
- Waller, G. R. et al., 1986. Caffeine autotoxicity in *Coffea arabica*. In C.-S. T. Alan R. Putnam, ed. *The Science of Allelopathy*. New York: John Wiley, pp. 243–269.
- Weckerle, C. S., Stutz, M. A. & Baumann, T. W., 2003. Purine alkaloids in Paullinia. *Phytochemistry*, 64, pp.735–742.
- Woodman, J. S., 1985. *Carboxylic acids in: Coffee. Volume I: Chemistry* R. J. Clarke & R. Macrae, eds., Elsevier.
- Woolfolk, C. A., 1975. Metabolism of N-methylpurines by a *Pseudomonas putida* strain isolated by enrichment on caffeine as the sole source of carbon and nitrogen. *Journal of bacteriology*, 123(3), pp.1088–106.
- Yanagimoto, K. et al., 2002. Antioxidative activity of heterocyclic compounds found in coffee volatiles produced by Maillard. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, pp.5480–5484.
- Yoneyama, N. et al., 2006. Substrate specificity of N-methyltransferase involved in purine alkaloids synthesis is dependent upon one amino acid residue of the enzyme. *Molecular genetics and genomics*: 275(2), pp.125–35.
- Zheng, X. & Ashihara, H., 2004. Distribution, biosynthesis and function of purine and pyridine alkaloids in *Coffea arabica* seedlings. *Plant Science*, 166, pp.807–813.
- Zheng, X. et al., 2004. Biosynthesis, accumulation and degradation of theobromine in developing *Theobroma cacao* fruits. *Phytochemistry*, 369, pp.363–369.