

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

ALINE ANDRÉIA CAVALARI



**INVERTASE ÁCIDA, SACAROSE SINTASE E O  
METABOLISMO DE AÇÚCARES NO DESENVOLVIMENTO  
DA SEMENTE DE CAFÉ (*Coffea arabica* L.)**

Este exemplar corresponde à redação final  
da tese defendida pelo(a) candidato (a)  
ALINE ANDRÉIA CAVALARI  
aprovada pela Comissão Julgadora.

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

Orientador: Prof. Dr. Paulo Mazzafera

2004

i

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL  
SEÇÃO CIRCULANTE

856E1100R

UNIDADE	BC
Nº CHAMADA	UNICAMP
	C314i
V	EX
TOMBO BC/	59780
PROC.	16-2117104
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	11,00
DATA	14/09/2004
Nº CPD	

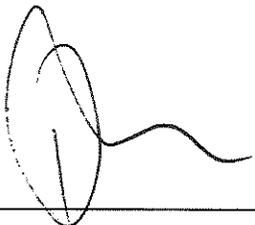
Bib id 321930

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

**C314i**      **Cavalari, Aline Andréia**  
 Invertase ácida, sacarose sintase e o metabolismo de açúcares no desenvolvimento da semente de café (*Coffea arabica* L.) /Aline Andréia Cavalari. --  
 Campinas, SP:[s.n.], 2004.

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

1. Invertase. 2. Sacarose. 3. Café. I. Mazzafera, Paulo. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Paulo Mazzafera 

Marcos Silveira Buckeridge 

Arthur Germano Fett Neto 

Eduardo Caruso Machado \_\_\_\_\_

**Dedico esta tese à meu avô Ângelo Cavallari (in memoriam), Pedro Nunes Alves  
(in memoriam) e minhas avós D. Augusta e D. Áurea.**

## AGRADECIMENTOS

*Agradeço ao Professor Doutor Paulo Mazzafera pela orientação, aos técnicos, funcionários e professores do Departamento de Fisiologia Vegetal (IB), pela ajuda e ensinamentos durante a elaboração deste trabalho.*

*Agradeço aos Dr's, Buckeridge, Caruso e Fett-Neto por fazerem parte da pré-banca e banca.*

*Agradeço aos colegas de laboratório pela ajuda científica e pessoal, em especial a doutoranda Clara Geromel.*

*Agradeço as minhas amigas Renita, Laura, Sandra, Cris, Andréa, Ilka, Rúbia, Milton, Geraldo, Luciana, Jane, Flávia, Ana Lúcia, Silvia.*

*Agradeço a minha prima Rafaela, tia Santina e tio Mário pela ajuda com o inglês.*

*Agradeço em especial a Dra. Claudia e aos meus amigos Jorge, Gerald e Clóvis, pela força e amizade.*

*Meus agradecimentos a meus pais Pedro e Luzia, minha irmã Enila, meu namorado Tiago, meus sogros e minha amiga-irmã Vanessa, pela paciência, carinho, atenção e incentivo neste período e em toda minha vida.*

*Agradeço a Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp) pelo auxílio técnico e financeiro.*

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
1.1. Relação Fonte-Dreno	1
1.2. Reservas de sementes	2
1.3. Partição de carbono	3
1.4. Invertases e Sacarose Sintase	4
1.5. Invertases	8
1.6. Sacarose Sintase	10
1.7. O cafeeiro e o fruto de café	11
1.8. Carboidratos da semente do café	14
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>18</b>
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>18</b>
3.1. Material vegetal	18
3.2. Crescimento dos frutos de café	18
3.3. Extração dos açúcares solúveis	19
3.4. Extrações e dosagens de Inv A e Susy	20
3.5. Fornecimento de $^{14}\text{CO}_2$	21
3.6. Auto-radiografia dos frutos incubados com $^{14}\text{CO}_2$	23
3.7. Fornecimento de $[\text{U-}^{14}\text{C}]$ sacarose e $[\text{U-}^{14}\text{C}]$ frutose	23
4.1. Crescimento e desenvolvimento dos frutos de café	25
4.2. Testes para Inv A em folhas e frutos	30

4.3. Testes enzimáticos para Susy em folhas e frutos de café	35
4.4. Dosagens de açúcares endógenos e atividades enzimáticas em frutos de café em diferentes estádios de desenvolvimento	39
4.5. Ensaio com radioisótopos	43
4.5.1. Fornecimento de $^{14}\text{CO}_2$	43
4.5.2. Auto-radiografia	48
4.5.3. Fornecimento de $[\text{U-}^{14}\text{C}]$ sacarose e $[\text{U-}^{14}\text{C}]$ frutose	51
<b>5. CONCLUSÕES</b>	<b>54</b>
<b>6. BIBLIOGRAFIA</b>	<b>55</b>

## RESUMO

Em sementes de café (*Coffea arabica*) a composição de carboidratos é bem conhecida, e reflete na qualidade da bebida. Porém a importação dos açúcares a partir das folhas e a participação efetiva dos frutos fotossintetizantes na assimilação de carbono são pouco estudadas. O fruto de café possui um perisperma abundante durante as primeiras fases do seu desenvolvimento sendo que o mesmo envolve dando lugar ao endosperma. No fruto maduro o perisperma se torna residual (de 2 a 3 camadas de células) conhecido como película prateada. Este trabalho teve como principais objetivos investigar o papel do perisperma em grãos de café, e estabelecer as atividades de Invertase ácida de parede celular (Inv A) e Sacarose sintase (Susy), as quais estão presentes no metabolismo dos açúcares endógenos e estruturais em frutos de *C. arabica*. Foram efetuados testes de pH ótimo, temperatura ótima, concentração de substrato e quantidade de proteína no meio de reação. Foram realizados ensaios com radioisótopos de  $^{14}\text{CO}_2$  e  $[\text{U-}^{14}\text{C}]$  sacarose e  $[\text{U-}^{14}\text{C}]$  frutose, para quantificação e localização dos açúcares.

As enzimas e os teores de açúcares endógenos foram conjuntamente avaliados nos diferentes estágios de desenvolvimento dos frutos de café. Observou-se que tanto açúcares redutores como sacarose têm redução dos conteúdos durante a formação do fruto, porém esses teores aumentam na casca e endosperma no final do desenvolvimento. InvA tem aumento de atividade no final do desenvolvimento na casca e perisperma, sendo que para Susy o aumento é nos três tecidos. Análise de radioatividade nos ensaios de  $^{14}\text{CO}_2$  e  $[\text{U-}^{14}\text{C}]$  sacarose e  $[\text{U-}^{14}\text{C}]$  frutose mostram

que existe uma translocação dos açúcares da casca para o perisperma e deste para o endosperma, além de existir a translocação dos açúcares das folhas diretamente para o perisperma.

Portanto, com os dados de dosagens dos açúcares endógenos, radioatividade e atividades enzimáticas, podemos inferir que o perisperma recebe sacarose e/ou açúcares redutores da casca e das folhas, mas os repassam quase que integralmente ao endosperma. Além de armazenar açúcares redutores para atração de água.

## SUMMARY

The composition of carbohydrates in coffee (*Coffea arabica*) seeds is well known as well as their participation in the quality of the beverage. However, very little is known about the transport of photoassimilates from leaves to fruits and the contribution of fruit photosynthesis to the sugar metabolism in the seeds. Immature coffee fruits have an abundant perisperm which becomes residual with fruit maturation, being replaced by the endosperm. In the mature fruit the residual perisperm is named silver skin. The objectives of this work were to investigate the role of the perisperm during the fruit development and to study the participation of the enzymes Acid Invertases (Inv A) and Sucrose Synthase (Susy) in the transfer process occurring among the tissue fruits.

Enzyme activities and soluble carbohydrates were evaluated in different stages of the fruit development. It was observed that both reducing sugars and sucrose decreased during fruit development but increasing in the endosperm and pericarp (coat) at the final stages of maturation. Inv A activity increased towards maturation in the coat and perisperm, while Susy increased in coat, perisperm and endosperm. By feeding leaves with  $^{14}\text{CO}_2$  and fruits with  $[\text{U-}^{14}\text{C}]$  sucrose and  $[\text{U-}^{14}\text{C}]$  fructose it was possible to study the transport of sugars from the leaves to fruits and among the tissues forming the fruits. In summary, it was observed that sugars coming from leaves (probably sucrose) to fruits were distributed between coat and perisperm, and from these tissues to the endosperm. These results were confirmed by the data obtained from fruits fed with  $[\text{U-}^{14}\text{C}]$  sucrose and  $[\text{U-}^{14}\text{C}]$  fructose. As a conclusion,

the drop observed for reducing sugars in the perisperm at the late maturation stages indicates that they are transported to the endosperm. Therefore, in addition to the role they have to maintain a low osmotic potential providing a water supply for the fruit, it seems that reducing sugar also plays a role as carbon source for the endosperm growth. In this process, Inv A and Susy seem to play a key role modulating the intensity of the transfer occurring among the tissues during fruit development.

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Relação Fonte-Dreno

Com a evolução dos vegetais superiores, ocorreu a divisão de funções entre as diferentes células, tecidos e órgãos, além do desenvolvimento de um sistema de controle e transporte entre os mesmos, para a interconexão e coordenação dos trabalhos realizados em diferentes tecidos (Wardlaw, 1990).

Com a dinâmica dos metabólitos formados nos tecidos fonte e os assimilados nos tecidos drenos, a planta tende a acumular matéria seca no órgão de armazenamento. Fonte é o conjunto de órgãos ou tecidos responsáveis pela produção de metabólitos, a partir dos intermediários sintetizados no processo fotossintético. O dreno é o conjunto de órgãos ou tecidos que utilizam ou armazenam os fotoassimilados produzidos pela fonte. Os drenos podem ser irreversíveis ou permanentes, como meristema intercalar de folhas, de flores e de inflorescências, os entrenós de cana-de-açúcar, o tronco de árvores, os tecidos de reserva de frutos e muitos outros tecidos (Pimentel, 1998).

Outra atividade da fonte durante o período de desenvolvimento vegetativo é também a produção de fotoassimilados, os quais são acumulados temporariamente e posteriormente mobilizados para regiões dreno da planta.

É evidente a integração entre fonte e dreno, sendo a demanda intimamente associada ao fornecimento de fotoassimilados. Esse controle se dá pela forte relação existente entre os tecidos fonte e dreno, sendo que a exportação de sacarose das células foliares é o principal fator de ligação entre a assimilação do carbono da fonte e o carbono utilizado no dreno (Roitsch & Ehne, 2000).

## 1.2. Reservas de sementes

Dentre as substâncias que compõem as sementes, encontramos aquelas que formam a sua reserva. Essas substâncias estão localizadas basicamente em duas estruturas: no endosperma, em sementes albuminosas e nos cotilédones nas sementes exalbuminosas. As principais substâncias de reserva acumuladas nas sementes dividem-se em três grupos: os lipídeos, as proteínas e os carboidratos. A ocorrência e a proporção entre estes três grupos de compostos é variável nas sementes de diferentes espécies. Tais compostos são caracterizados como reserva em comparação com outras substâncias presentes na semente, devido à sua degradação e subsequente mobilização dos seus produtos em direção ao eixo embrionário durante a germinação e o estabelecimento da plântula.

Desta maneira as sementes são excelentes materiais para se estudar o transporte de fotoassimilados e o metabolismo de dreno (Roitsch, 1999), uma vez que durante o seu desenvolvimento ocorre a divisão celular, o crescimento, a diferenciação e a estocagem de vários produtos, dentre eles proteínas, óleos, carboidratos, etc.

Os açúcares utilizados no metabolismo das sementes são de óbvia importância, tendo como exemplo a regulação da relação fonte-dreno, além de controlar a expressão de genes que codificam algumas enzimas envolvidas no transporte e absorção dos açúcares metabolizados pela fonte. O controle genético do metabolismo fonte-dreno é determinante para o desenvolvimento das plantas (Hill *et al.*, 2003).

### 1.3. Partição de carbono

A assimilação do carbono nas plantas resulta na formação de sacarose, sendo que esta possui papel central no crescimento e desenvolvimento das plantas superiores (Tymowska-Lalanne & Kreis, 1998). Assume-se freqüentemente que o transporte de açúcares para drenos metabólicos é controlado exclusivamente pelo dreno. Dados recentes indicam que o controle da partição dos fotoassimilados é realizado por processos complexos de transporte e transferência, localizados no dreno, controlados por proteínas transportadoras específicas para sacarose. Farrar *et al.* (2000), demonstraram que após trinta minutos de baixa temperatura ocorre acúmulo de sacarose nas folhas (fonte) de *Lolium temulentum*, pois as enzimas envolvidas neste metabolismo diminuem suas atividades. Conseqüentemente, na presença de elevadas concentrações de sacarose a atividade dos transportadores tende a ser menor, o que torna ainda mais complicado o metabolismo de sacarose nas sementes, sendo que o descarregamento do floema parece ser predominantemente apoplástico. Portanto, é necessária a presença de transportadores específicos para sacarose (Kühn *et al.*, 1999; Weschke *et al.*, 2000).

Vários transportadores de sacarose têm sido caracterizados em várias dicotiledôneas (Ward *et al.*, 1998). Estes são proteínas bastante hidrofóbicas, consistindo de 12 domínios trans-membrana (Marger *et al.*, 1993). O funcionamento dos transportadores de sacarose estudados até o momento é dependente de energia (ATP) e eles também funcionam como co-transportadores de sacarose-H<sup>+</sup>. Tais proteínas constituem uma grande família gênica. Por outro lado, alguns genes desta

família são expressos preferencialmente nos drenos, onde controlam o descarregamento de sacarose no apoplasto.

Teoricamente, e dependendo do tecido, pode haver quatro mecanismos de descarregamento do floema para células do dreno: a) via plasmodesma; b) descarregamento de sacarose no apoplasto e absorção como sacarose pela célula dreno; c) transferência via endocitose da sacarose apoplástica; d) desdobramento de sacarose em frutose e glicose, através de invertases extracelulares, e absorção das hexoses pelas células dreno (Herbers *et al.*, 1998). Na maioria dos casos estudados, trigo, milho e *Vicia faba*, a rota conhecida é a transferência (descarregamento) da sacarose das células companheiras para as células do pedicelo, com passagem para o apoplasto, sendo então absorvida na forma de sacarose ou como hexoses, produtos da atividade da invertase extracelular, localizada na parede celular das células do endosperma.

#### 1.4. Invertases e Sacarose Sintase

No processo de descarregamento do floema duas enzimas fazem o desdobramento de sacarose em hexoses, as Invertases – Inv's (EC 3.2.1.26) e a Sacarose Sintase - Susy (EC 2.4.1.13).

A quebra da sacarose por Inv é uma reação irreversível e totalmente dependente da concentração intracelular de sacarose (Weber *et al.*, 1997). A distinção entre os diferentes tipos de Inv baseia-se na sua localização celular e no seu pH de atividade ótima, dividindo-se em ácidas (pH 4,5-5,0), sendo estas vacuolar e de parede, e as alcalinas, ou citoplasmáticas (pH 7,0-7,8), mas tendo Km, inibidores e propriedades bioquímicas distintas (Tymowska-Lalanne & Kreis, 1998).

Trabalhos recentes sugerem que as isoformas de Inv são expressas em diferentes tipos de células e possuem papéis distintos. Com isto, a Inv A (invertase ácida de parede celular) tem sido associada com o transporte de açúcar e zonas de crescimento ativo, tais como frutos. Já a invertase ácida do vacúolo (Inv V) encontra-se ativa na maioria das vezes quando o tecido já está maduro. A invertase alcalina do citoplasma (Inv C) é considerada uma enzima de manutenção, envolvida na degradação da sacarose quando as atividades da Inv A e da Susy são baixas (Les Copeland, 1990).

O descarregamento de sacarose via apoplástica envolve sua clivagem pela Inv A (Roitsch, 1999). O resultado é a formação de hexoses, (frutose e glicose) as quais serão utilizadas para o crescimento da célula. O mesmo autor afirma que a atividade da Inv A pode também ser regulada pela presença de patógenos, oscilação de temperatura, etc.

Diferentemente das Inv's, a Susy catalisa uma reação reversível (sacarose + UDP  $\leftrightarrow$  frutose + UDP-glicose). A Susy geralmente está associada ao crescimento e expansão celular e, portanto, encontra-se presente em quase todos os tecidos das plantas. UDP-Glicose e frutose formadas são imediatamente incorporadas na formação de componentes para o crescimento celular, sendo que o UDP é reciclado, voltando para a mesma via (Tanase & Shohei, 2000). Tem sido relatado que no citoplasma, a Susy pode estar associada à membrana celular, exatamente para fornecer intermediários para a síntese de celulose (Ruan *et al.*, 1995).

São poucos os casos em que se estudou efetivamente o papel da Susy e das Inv's no controle do crescimento de sementes. O caso mais estudado foi o de

sementes de milho, sendo isto possível graças à existência de mutantes deficientes para as duas enzimas (Chourey *et al.*, 1999).

Mn1 é um mutante de semente de milho denominado como tendo o fenótipo “miniatura” e apresenta aspecto de semente normal, apesar do menor tamanho. Quando em homozigose, a mutação recessiva *mn1* leva ao reduzido desenvolvimento das sementes, com redução drástica de aproximadamente 80% do peso, quando comparada ao tipo selvagem. Sementes *mn1* são deficientes na Inv A que é específica para o desenvolvimento do endosperma (Chourey *et al.*, 1999). Análises moleculares e genéticas mostraram que *Mn1* é o gene específico para Inv A. A maior expressão de *Mn1* no tipo selvagem coincide com a época de maior entrada de sacarose e maior crescimento do endosperma de milho. De modo semelhante, o mesmo ocorre com o crescimento do cotilédone nas sementes de *V. faba*, como demonstrado por Weber *et al.* (1997), e em tubérculos de batata, por Sonnewald *et al.* (1997).

Em *mn1* também existem mudanças estruturais. Estudos histológicos mostraram que o desenvolvimento das sementes é normal neste mutante até 9 dias após a polinização, sendo que após este período passa a existir uma defasagem entre o desenvolvimento do pedicelo e a região basal do endosperma, com o desaparecimento de células maternas que formam a região chalazal, o tecido que conecta o pedicelo à placenta (endosperma) (Cheng *et al.*, 1996). A razão desta “atrofia” das células da chalaza é desconhecida, sendo sugerido que a redução do uso de sacarose, causando seu acúmulo na região, poderia levar ao desbalanço osmótico no pedicelo, com conseqüente degeneração das células maternas em estágios iniciais do desenvolvimento das sementes.

Susy desempenha papel fundamental no balanço de energia da célula, uma vez que direciona a utilização da sacarose para diversos caminhos metabólicos e outros relacionados com a estrutura das células e armazenamento de reservas (Chourey *et al.*, 1998). Assim como para Inv A, a melhor caracterização de Susy até o momento foi feita em milho, também devido à disponibilidade de mutantes.

São conhecidos para esta enzima duas isoformas, SS1 e SS2, codificadas por dois loci de genes homólogos, *Sh1* e *Sus1*, respectivamente. SS1, codificada por *Sh1*, é mais abundante em endosperma em desenvolvimento e a sua mutação leva ao fenótipo “enrugado 1” (*shrunken 1*), especificamente relacionado com o aspecto do endosperma (Chourey *et al.*, 1976). SS2, codificada por *Sus1*, também é detectada no endosperma e no embrião e é conhecido apenas um caso de mutante neste gene, sendo vários em *Sh1*. Com a possibilidade de analisar três genótipos, *Sh1Sus1*, *sh1Sus1* e *sh1sus1* pode-se avaliar a contribuição relativa de cada isoenzima no desenvolvimento do endosperma. Assim, mostrou-se que SS1 é fundamental na geração de substratos para a síntese de celulose em milho (Chourey *et al.*, 1998). O mesmo foi concluído em relação à semente de algodão, onde Susy é importante na partição de carbono para a síntese de fibras de celulose, sendo que neste caso o descarregamento de sacarose é via simplasto, como demonstrado por Ruan *et al.* (1997). No mutante *sh1* ocorre degeneração celular aos 12 dias após a polinização, sendo restrita, porém, às células centrais do endosperma, acumuladoras de amido. Ocorre, em média, redução de 60% de amido, comparativamente ao tipo selvagem (*Sh1Sus1*). No genótipo selvagem, este período coincide com o final das divisões mitóticas e início da expansão celular. Apesar de menos estudado, principalmente pela

falta de maior número de mutantes, a comparação do mutante duplo *sh1sus1(-1)* com *sh1Sus1* mostrou que ocorre redução de amido (53% e 78%, respectivamente) nas sementes, sugerindo que SS2 provavelmente esteja mais relacionada com a formação de amido do que SS1. Assim, ambos genes controlariam a partição de UDP-glicose entre amido e celulose, sendo que para o mutante enrugado 1, a deficiência na síntese de celulose seria causadora de tal fenótipo.

### 1.5. Invertases

Inv's têm sido purificadas e caracterizadas bioquimicamente a partir de várias plantas e de diferentes tecidos. Sua importância no metabolismo de carbono, principalmente sua suposta participação na partição de fotoassimilados, justifica estes estudos. Como já citado, são três as Inv's conhecidas, sendo distintas pelo pH de atividade e localização celular.

Recentemente, com o emprego de técnicas de biologia molecular, foi possível a clonagem de vários genes de Inv's e, assim, um refinamento no estudo do papel fisiológico destas enzimas. Verificou-se que cada um dos três tipos de Inv's é membro de uma família de genes, sendo cada tipo codificado por vários genes. Por exemplo, em cenoura são conhecidos pelo menos três genes codificando Inv A e dois codificando Inv V (Sturm *et al.*, 1999). A existência de vários genes provavelmente é o que permite a flexibilidade das plantas em modular o metabolismo de carboidratos, em função dos vários estímulos endógenos e ambientais.

As duas Inv's ácidas (Inv A e Inv V) têm características bioquímicas semelhantes. Com base no seqüenciamento de genes de várias plantas, pode-se identificar que eles apresentam uma região a qual codifica um sinal que possibilita atravessar a membrana do retículo endoplasmático, permitindo sua liberação no

vacúolo ou apoplasto), assim como dois motivos bastante característicos e conservados (NDPNG e WECP/VDF). A prolina (P) na Inv A é que determina seu pH mais ácido e maior taxa de quebra de rafinose. Na Inv V, prolina é substituída por valina (V) (Goetz & Roitsch, 1999).

Além da semelhança desses motivos, o grau de similaridade na seqüência completa de nucleotídeos entre Inv A de várias plantas é relativamente alta, como demonstrado nos trabalhos de Tymowska-Lalanne & Kreis (1998).

Tratando-se de uma família multigene, as três Inv's, nas suas variadas isomorfias, são expressas diferencialmente em tecidos de vegetais, ocorrendo alterações no padrão de expressão ao longo da diferenciação dos tecidos (Sturm *et al.*, 1999). Para o caso daquelas Inv's onde foram seqüenciadas as regiões 5', verificou-se a presença de várias seqüências ("boxes"), apresentando grande similaridade com elementos induzíveis por auxina, etileno, dano mecânico e acopladores do tipo bZIP (Tymowska-Lalanne & Kreis, 1998).

Isto explica, a influência que reguladores de crescimento, estresses (hídrico e dano mecânico) e patógenos, podem exercer sobre a expressão de genes de Inv's (Kingston *et al.*, 1999 *apud* Sturm *et al.*, 1999). Entretanto, as comparações destas regiões entre os diferentes genes mostraram seqüências não comuns, sugerindo modos de ação independentes para as Inv's.

Devido à complexidade da família de genes que codificam para Inv's em plantas, as respostas observadas com plantas transgênicas deficientes ou superexpressando Inv's têm sido as mais variadas.

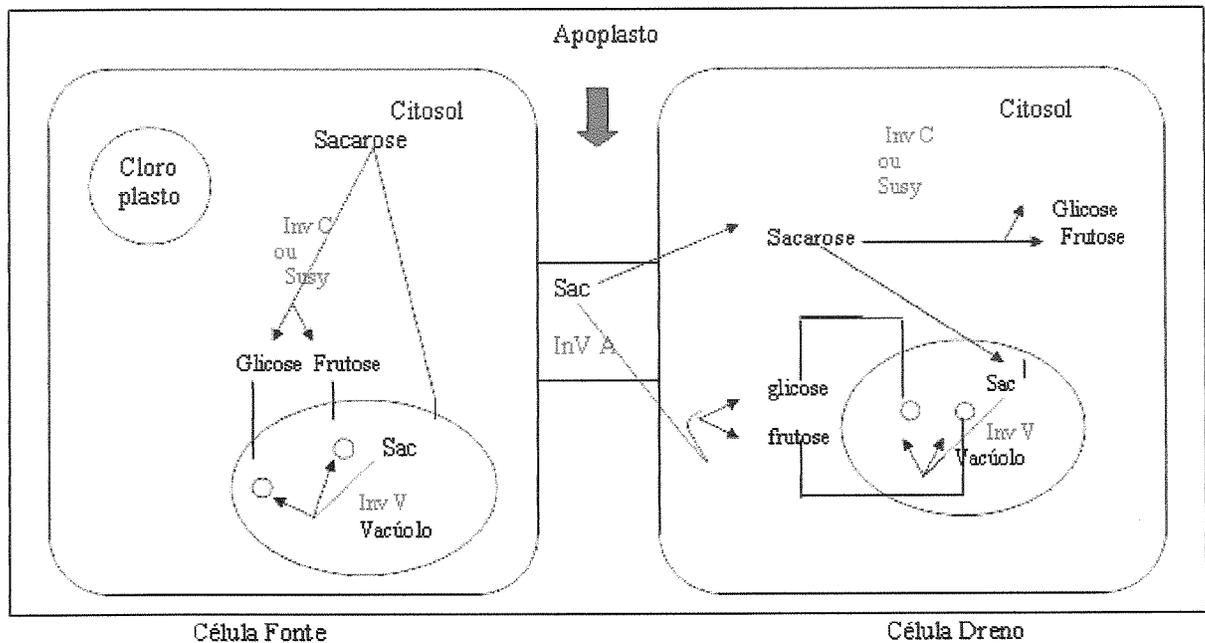
## 1.6. Sacarose Sintase

A Susy é uma enzima citoplasmática que catalisa de forma reversível a reação  $\text{sacarose} + \text{UDP} \leftrightarrow \text{frutose} + \text{UDP-glicose}$ . Entretanto, é geralmente aceito que o papel de Susy seria o desdobramento da sacarose para suprir UDPG-glicose para a síntese de amido e polissacarídeos de parede celular (Chourey *et al.*, 1976 *apud* Amor *et al.*, 1995 ). No citoplasma, tem sido relatado que a Susy pode estar associada à membrana celular, para fornecer intermediários para a síntese de celulose (Ruan *et al.*, 1997).

Em milho, estudos conduzidos por Chourey e colaboradores (Chourey *et al.*, 1998) mostraram claramente o envolvimento de Susy no fornecimento de substrato para respiração, na biossíntese de amido, e componentes da parede celular. Outros estudos, como os realizados por Marña *et al.* (1990), mostraram seu envolvimento na adaptação de plantas à anoxia e baixas temperaturas. Estudos imunocitoquímicos mostraram que Susy em milho está localizada tanto na bainha vascular como em tecidos drenos (Nolte *et al.*, 1993).

Apesar de existirem duas isoenzimas, SS1 e SS2, codificadas por dois loci de genes homólogos, suas características cinéticas são muito semelhantes em várias plantas estudadas (Tanase & Shohei, 2000). A expressão de Susy tem sido manipulada usando-se a técnica de RNA antisense, e para batata foi verificado que havia menor acúmulo de amido, reduzindo o rendimento agrônômico da planta (Zrenner *et al.*, 1995).

O envolvimento da Susy, afetando a capacidade de dreno, como mostrado para batata, também foi sugerido em tomate por Wang *et al.* (1993) e na formação de cotilédones de ervilha por Tegeder *et al.* (1999). A fig. 1 apresenta passos em que as Inv's e a Susy estão envolvidas.



**Figura 1.** Localização celular dos três tipos de Invertases e da Sacarose Sintase (Susy). Invertase citoplasmática (Inv C), Invertase vacuolar (Inv V) e Invertase de parede celular (Inv A). Círculos amarelos: glicose; círculos verdes: frutose. (Adaptado de Tymowska-Lalanne & Kreis, 1998).

### 1.7. O cafeeiro e o fruto de café

O café foi introduzido no Brasil no ano de 1727, pelo sargento-mor Francisco de Melo Palheta, trazido de Caiena, na Guiana Francesa, para Belém, capital do estado do Pará. Ainda em meados daquele mesmo século, a cultura foi levada para

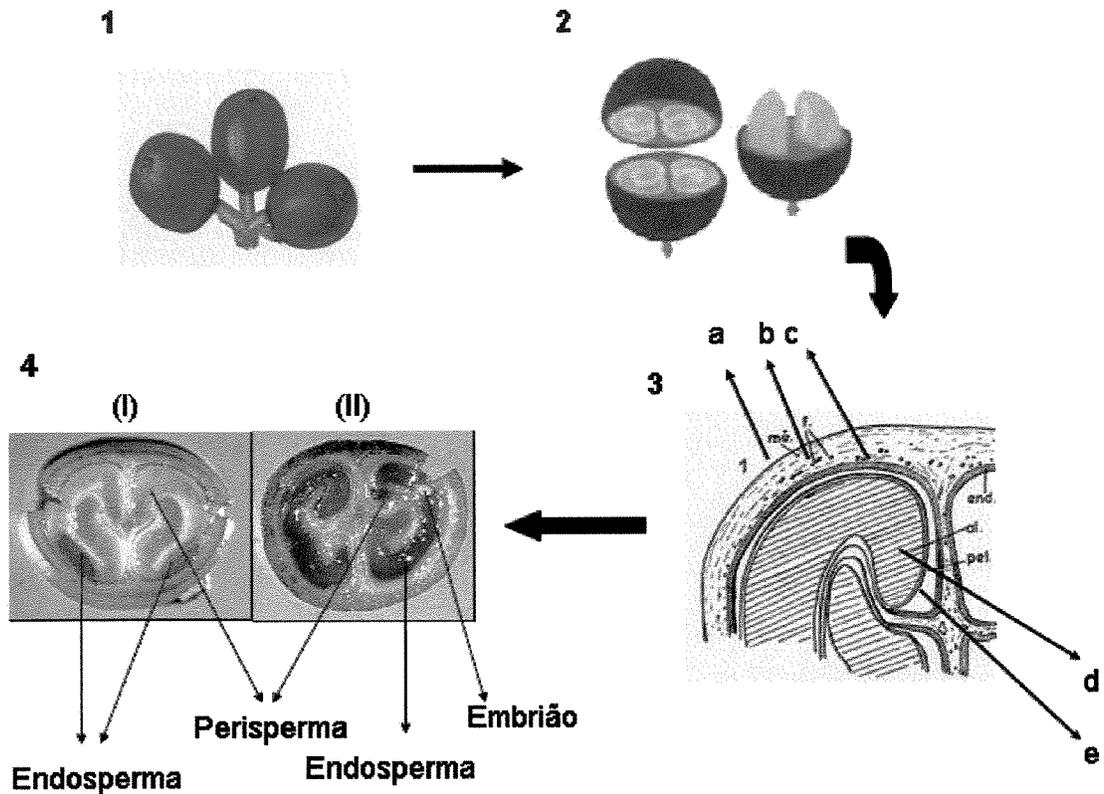
o estado do Rio de Janeiro por João Alberto Castelo Branco, de onde se espalhou até chegar no estado de São Paulo. O sucesso da implantação da nova cultura teve como motivação a crise na produção de açúcar, que naquela época sofria com a grande competição das colônias européias da América Central. Um outro fator determinante para o sucesso do café em solo brasileiro foi a captação dos recursos das outras atividades exploratórias em crise (açúcar, algodão e mineração) aliado à fácil colocação do novo produto no mercado internacional. Atualmente, o café ainda é uma importante fonte geradora de renda e empregos, na lavoura, na indústria e no comércio. As primeiras referências botânicas sobre o café datam do século XVI. De acordo com Carvalho (1946), inicialmente o café pertenceu à família *Celastereae*, passando por outras famílias como *Rutaceae* e *Oleaceae*. Somente no ano de 1753 Linneu o descreveu como *Coffea arabica* pertencente à família *Rubiaceae*.

A espécie *C. arabica* corresponde a 90% da produção mundial de café, destacam-se também as espécies *Coffea canephora* e *Coffea liberica* com 9% e 1%, respectivamente, da produção mundial (Simpson & Orgozaly, 1995).

O fruto do café pode ser definido como uma drupa de formato ovóide, verde passando de verde a vermelho com a maturação. Contém normalmente duas sementes elípticas, que são plano-convexas e possuem um sulco longitudinal sobre a superfície plana.

O fruto maduro de café (cereja) é formado por exocarpo (vermelho e amarelo), mesocarpo (ou polpa), endocarpo (ou pergaminho), película prateada e endosperma ou semente. O embrião é situado em um dos lados do endosperma, próximo ao pedúnculo (fig. 2). A quantidade de grãos é determinada pela fecundação dos dois óvulos presentes no ovário. No entanto, pode ocorrer de apenas um único óvulo ser

fecundado, o qual irá ocupar todo o espaço do ovário, gerando um grão diferente e único, de formas arredondadas, denominado moça (Cardoso, 1990).



**Figura 2.** Fruto de café (1), em cortes longitudinal e transversal (2), (3) e o detalhe destes tecidos, Exocarpo (a), mesocarpo (b), endocarpo ou pergaminho ou end (c), endosperma ou semente ou al (d) e perisperma ou pel (e). (4). Foto in vivo do fruto de café, mostrando a formação dos tecidos: (I) primeiras fases do desenvolvimento e (II) fases finais do desenvolvimento do fruto de café.

Após a florada, o fruto de café, conhecido neste estágio como chumbinho, passa a apresentar uma rápida multiplicação das células do integumento, havendo então a formação de um tecido transitório, chamado perisperma. Entretanto, o endosperma, que representa mais de 95% da massa da semente madura, somente terá as primeiras divisões mitóticas ao redor de 40 dias. O espaço antes ocupado pelo perisperma passa, então, a ser ocupado pelo endosperma, ocorrendo assim a involução do perisperma, que ao final do processo de formação da semente e maturação do fruto, ficará representado por 2 a 3 camadas de células, tecido conhecido como película prateada. Em outras plantas, dificilmente o perisperma atinge o grau de desenvolvimento como visto em café, sendo atrofiado e dando origem ao nucelo (Mendes, 1941).

A maturação do café é iniciada com o aumento da atividade respiratória e com a síntese do etileno, acelerando o metabolismo de açúcares e ácidos, a degradação da clorofila e síntese de pigmentos responsáveis pela mudança de coloração do fruto verde a cereja, que ocorrem de maneira simultânea com a síntese de compostos voláteis, ésteres e álcoois, que caracterizam o aroma do fruto maduro. (Clifford, 1985).

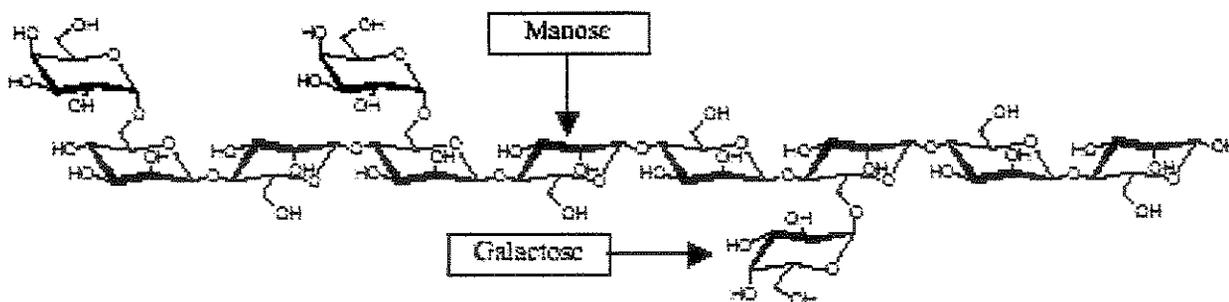
#### 1.8. Carboidratos da semente do café

Sementes de café possuem pequenas quantidades de açúcares simples, incluindo redutores (Clifford, 1985). Normalmente estaquiose, rafinose, arabinose, manose, galactose, ribose e ramnose são encontradas como traço e quantidades de frutose e glicose ficam ao redor de 0,023 – 0,030% e 0,030 - 0,038%, respectivamente. Sacarose está presente em proporção bem maior, ao redor de 8%.

Em grãos verdes de café há muito pouco amido e um alto conteúdo de polissacarídeos associados à parede celular (Wolfron *et al.*, 1960; Wolfron & Patin, 1965). A fração de polissacarídeo de grãos verdes de café consiste de galactomananos, correspondendo a 50% dos polissacarídeos, sendo o restante arabinogalactanos (30%), celulose (15%) e pectinas (5%) (Redgwell *et al.*, 2003).

A maior parte dessa fração é insolúvel em água e constituída de um manano composto de uma cadeia linear de manoses unidas entre si por ligações do tipo  $\beta$ -D-1,4 (fig. 3). Este composto constitui aproximadamente 20–30% do peso seco de grãos de *C. arabica* e de *C. canephora* var. *robusta* (Clifford, 1985; Bradbury & Halliday, 1990).

O manano contém 1–2% de resíduos de galactose terminais (fig. 3), as quais são ligadas à cadeia principal por ligação do tipo  $\alpha$ -1,6. Assim, os mananos são estruturalmente relacionados aos galactomananos, apenas apresentando um grau menor de ramificação com galactose. Uma das características mais importantes no que concerne à comparação entre galactomananos de diferentes origens é a proporção entre os resíduos de manose e galactose. Esta proporção é importante porque ela caracteriza a solubilidade do galactomanano em água. Sendo assim quanto maior a proporção de galactose, mais solúvel é o polímero. Tanto para *C. arabica* como para *C. canephora*, os galactomananos, os arabinogalactanos e a celulose destacam-se como os polissacarídeos predominantes da parede celular (Buckeridge & Dietrich, 1990; Buckeridge *et al.*, 1995).



**Figura 3.** Estrutura do galactomanano em sementes de café mostrando a cadeia principal de  $\beta$ -D-1,4 manose e as ramificações de galactose unidas a esta por ligações do tipo  $\alpha$ -1-6.

Embora as composições dos polissacarídeos de grãos de café *C. arabica* e *C. canephora* sejam parecidas, parece que ocorrem pequenas diferenças nas quantidades relativas de galactomanano e arabinogalactano presentes nas duas espécies (Redgwell *et al.*, 2002). O perfil dos polissacarídeos, expresso como monossacarídeos resultantes de uma hidrólise ácida, é similar em grãos de *C. arabica* e *C. canephora*. A principal diferença parece estar no conteúdo de arabinogalactanos, que são mais solúveis e por isso ao preparar o café, uma maior proporção deste polissacarídeo é obtida em *C. canephora* em relação a *C. arabica* (Fisher *et al.*, 2001). Os mananos por sua vez, são menos solúveis que os arabinogalactanos e geralmente formam parte significativa da borra de café após a extração. Com isto, grande parte dos mananos é perdida como borra, sendo descartada como material de baixo valor comercial e com poucas aplicações (MS. Buckeridge, comunicação pessoal)

Rogers *et al.* (1999) investigaram as variações de açúcares em frutos em desenvolvimento de *C. arabica* var. Caturra detectando vários açúcares livres, entretanto, com clara e grande predominância de sacarose, seguida de glicose e frutose. Nas primeiras semanas após o florescimento encontraram níveis de glicose de aproximadamente 12% da massa seca do fruto, caindo drasticamente para 0,03% de massa seca com 30 semanas após o florescimento. No fruto já maduro o decréscimo de açúcares redutores é acompanhado pelo acréscimo de sacarose. No perisperma, os níveis de açúcares redutores é maior que o de sacarose. Já no endosperma, sacarose é o açúcar predominante. Entretanto, apesar destes níveis opostos, no perisperma, sacarose sempre manteve níveis constantes, enquanto que com a involução deste tecido havia queda significativa na concentração de hexoses.

O mesmo ocorria no endosperma, mas de forma menos drástica. Apesar de não discutirem mais profundamente sob o ponto de vista fisiológico estas variações Rogers *et al.* (1999) sugerem que o grande nível de hexoses no perisperma, pelo menos em certos estágios durante o crescimento do fruto, indicaria o catabolismo de sacarose, e de forma semelhante ao milho; uma das funções disto seria a redução do potencial osmótico, atraindo água. Nada foi discutido por Rogers *et al.* (1999) a respeito do endosperma em relação a processos fisiológicos, e ficam perguntas tais como: as atividades de Inv's e Susy seriam mais ativas no perisperma do que no endosperma? Visto que aparentemente não há continuidade física entre perisperma e endosperma (Begnami & Mazzafera, dados não publicados) como seriam as transferências de compostos entre estes tecidos? Temporalmente, as atividades destas enzimas decairiam no endosperma? Seria o perisperma determinante do crescimento

do endosperma? Sendo galactomananos a principal reserva de carboidratos na semente de café, qual seria o perfil dinâmico temporal de incorporação de hexoses (manose) neste polímero?

## **2. OBJETIVOS**

Apesar de ser conhecida a constituição dos carboidratos presentes nas sementes de café (endosperma), sendo isto facilmente compreendido pela sua importância no desenvolvimento da qualidade da bebida, muito pouco se sabe sobre como ocorre a importação de açúcares a partir das folhas, assim como também a participação efetiva dos frutos no processo de assimilação de carbono, uma vez que eles efetuam fotossíntese.

O objetivo deste estudo foi verificar a partição de carbono em frutos de café durante o seu desenvolvimento, procurando: (1) determinar a participação e papel do perisperma neste processo e qual sua relação metabólica com o endosperma, (2) investigar como atuam as enzimas Inv A e Susy neste processo.

## **3. MATERIAL E MÉTODOS**

### **3.1. Material vegetal**

A cultivar utilizada foi a Catuaí Vermelho da espécie *C. arabica*. As análises foram realizadas com os 2º e 3º pares de folhas e frutos em diferentes estádios de desenvolvimento (de chumbinho a cereja), coletados de plantas de quatro anos crescendo na área experimental do Departamento de Fisiologia Vegetal da Unicamp.

### 3.2. Crescimento dos frutos de café

Aproximadamente a cada 2 semanas após a floração foram coletados frutos, nos quais determinou-se o diâmetro e as massas fresca e seca (secagem em estufa 70°C por 2 dias). Após cento e cinquenta dias do florescimento, quando o endosperma se encontrava com tamanho suficiente para ser visto a olho nu, os frutos foram separados em casca, perisperma e endosperma, para os quais foram determinadas as massas fresca e seca. Denomina-se casca o conjunto dos tecidos exo, meso e endocarpo.

No mesmo período em que foram coletados frutos para acompanhamento do crescimento, outros frutos foram coletados para dosagem dos açúcares livres e estruturais, e determinações de atividade da Inv A e Susy.

As coletas se deram nos intervalos de aproximadamente 25 dias até o amadurecimento (225 dias após o florescimento). Os frutos foram separados em endosperma, casca e perisperma. Após a coleta, os frutos foram cortados ao meio com bisturi e imediatamente as faces expostas foram colocadas em tampão fosfato de sódio 200 mM, pH 7, contendo 2% de ácido ascórbico, e conservadas em gelo.

Em seguida, o tampão foi escoado e realizou-se uma lavagem rápida com o tampão gelado, mas desta vez sem conter ácido ascórbico e as partes separadas foram mantidas em freezer -70°C até o momento das dosagens dos açúcares endógenos e das atividades enzimáticas de Inv A e Susy.

### 3.3. Extração dos açúcares solúveis

Após a coleta das folhas e dos frutos (separados em casca perisperma e endosperma) as amostras foram congeladas a  $-70^{\circ}\text{C}$  e antes de serem analisadas, foram liofilizadas. Antes da extração, o tecido foi macerado em almofariz em nitrogênio líquido.

A extração dos açúcares foi feita com 5ml de etanol 80% para cada 1 g de tecido liofilizado. Foram feitas três extrações seqüenciais, cada uma com o mesmo volume de etanol, em tubos fechados em banho-maria a  $75^{\circ}\text{C}$  por 30 minutos, com agitações ocasionais. Testes prévios mostraram que três extrações eram suficientes para extrair todos os açúcares solúveis. Os extratos das três extrações foram combinados e neles dosados açúcares solúveis totais - AST (Dubois *et al.*, 1956), açúcares redutores - AR (Somogy, 1952) e sacarose - SAC (Van Handel, 1968).

### 3.4. Extrações e dosagens de Inv A e Susy

Para Inv A, as proteínas foram extraídas de material macerado em nitrogênio líquido, utilizando-se tampão fosfato 100 mM, pH 7, 0, contendo 2 mM  $\text{MgCl}_2$ , 5 mM EDTA, 10 mM 2-mercaptoetanol e 2% de ácido ascórbico. Para a extração de Susy, utilizou-se TRIS 200 mM, pH 8, contendo 2 mM  $\text{MgCl}_2$ , 5 mM EDTA, 10 mM 2-mercaptoetanol e 2% de ácido ascórbico. Para cada 1 g de material adicionou-se 5-7ml de tampão de tampão resfriado a  $4^{\circ}\text{C}$ . O extrato foi deixado em gelo por trinta minutos, com agitação ocasional, e depois centrifugado a 27.000 g a  $4^{\circ}\text{C}$ , por 15 minutos. O sobrenadante foi recuperado e passado em colunas PD10 – Sephadex G25. A eluição das proteínas foi feita com tampão fosfato 25 mM, pH 7, 0, para Inv A,

e TRIS 100 mM, pH 8, para Susy. Nos extratos protéicos filtrados foram determinadas as concentrações de proteínas (Bradford, 1976).

O meio de reação padrão para a dosagem de Inv A foi 100 µg de proteína, 100 µl de sacarose 1 M, diluída em tampão 50 mM citrato-fosfato, pH 4,5, e o volume ajustado para 1 ml com tampão 50 mM citrato-fosfato, pH 4,5. Após a incubação por 60 minutos a 37°C, quantificou-se os AR formados (Somogy, 1952).

A dosagem de atividade de Susy foi na direção de síntese de SAC. A composição do meio de reação padrão foi 75 µg de proteína, 20 µl de UDPG 100 mM, 20 µl de frutose 100mM e o volume ajustado para 1 ml com tampão Tris 200 mM, pH 6,0. A incubação foi de 60 minutos a 30°C e a SAC formada determinada (Van Handel, 1968)

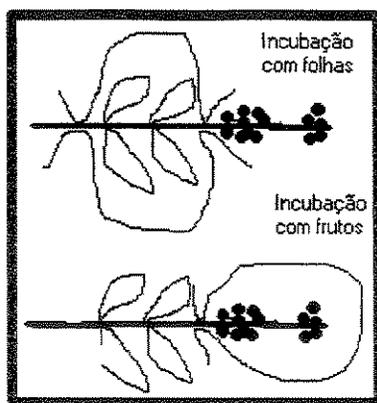
Para Inv A e Susy foram feitos diferentes ensaios variando a temperatura, pHs e quantidade de proteínas e substratos no meio de incubação.

No ensaio de determinação de temperatura ótima para Inv A as reações também foram analisadas por HPLC (high-performance liquid chromatography), utilizando-se detector de índice de refração e coluna Shim-pack CLC-NH2 (Shimadzu). A separação dos açúcares foi obtida com acetonitrila 75% como eluente, com fluxo de 1ml/min. Os picos detectados foram comparados com picos de glicose e frutose, com quantidades conhecidas de padrões puros, para a determinação da concentração nos meios de reação.

### 3.5. Fornecimento de $^{14}\text{CO}_2$

Para o fornecimento de  $^{14}\text{CO}_2$ , folhas ou frutos foram envoltos com sacos plásticos, deixando-se dentro destes um Eppendorf com solução aquosa de  $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$  de 10 Mdpm, e outro contendo HCl. Foram selecionados ramos que continham frutos com o endosperma já em desenvolvimento e outros com frutos que tinham apenas o perisperma. Para o ensacamento de ramos, foram retiradas folhas, mantendo-se apenas quatro por ramo, sendo estas do 4º e 5º pares, como mostrado no esquema (fig. 4). Após a completa vedação do envoltório plástico com barbante, por manuseio externo os conteúdos dos Eppendorfs foram misturados, promovendo a liberação de  $^{14}\text{CO}_2$ . O fornecimento de  $^{14}\text{CO}_2$  foi feito entre 6 e 7h da manhã durante 4 horas e a seguir procedeu-se à retirada do envoltório plástico.

A coleta dos frutos para análise foi feita no final da tarde do mesmo dia e no início do dia seguinte, aproximadamente 4 e 24 horas após aplicação de  $^{14}\text{CO}_2$ , respectivamente. Os frutos foram dissecados em endosperma, perisperma e casca, e secos em liofilizador. Neles foram feitas extrações de açúcares solúveis e nas frações obtidas foram determinadas as radioatividades totais. Também as radioatividades específicas em SAC e AR foram determinadas após cromatografia em papel, como descrito no item 3.7.



**Figura 4.** Esquema do fornecimento de  $^{14}\text{CO}_2$ , para folhas (A) e frutos (B)

### 3.6. Auto-radiografia dos frutos incubados com $^{14}\text{CO}_2$

Alguns frutos que receberam  $^{14}\text{CO}_2$  foram deixados nas plantas até atingirem a completa formação do endosperma. Posteriormente os frutos foram colhidos e fatiados com auxílio de um bisturi. As fatias foram montadas seqüencialmente em uma cartolina e esta colocada para impressionar um filme sensível a raios-X. A montagem foi isolada do contato com luz por meio de cassete apropriado para este fim. A montagem foi colocada em freezer  $-70^\circ\text{C}$  e o filme revelado aproximadamente após um mês de exposição. Os endospermas destes mesmos frutos foram utilizados para extração de açúcares solúveis, amido e polissacarídeos de parede celular.

A extração de açúcares solúveis foi realizada como descrito no item 3.3 e o material sólido recuperado foi extraído com dimetil sulfoxido (DMSO) (2 x 25 ml/100mg) durante 24 horas sob agitação contínua (Fry, 1988). O extrato de DMSO recuperado foi reservado e o precipitado extraído com ácido trifluoracético 2N (3 X 1,5 ml) com autoclavagem a  $120^\circ\text{C}/1\text{h}$ . O sobrenadante recuperado (contendo polissacarídeos de parede celular) foi seco em speed-vac e solubilizado em pequeno volume de água. As frações etanólicas (açúcares solúveis), de DMSO (amido) e trifluoracética (açúcares de parede) tiveram então a radioatividade determinada após

adição de líquido de cintilação e contagem por 5 minutos em contador de cintilação. Os dados foram expressos como radioatividade por quantidade de massa inicial extraída.

### 3.7. Fornecimento de [U-<sup>14</sup>C] sacarose e [U-<sup>14</sup>C] frutose

Para o fornecimento de sacarose e frutose marcadas, frutos foram destacados dos ramos 175 dias após o florescimento e imediatamente colocados em água fria. O pedúnculo foi retirado com o auxílio de bisturi, sendo neste local aplicados os produtos marcados com <sup>14</sup>C. Os frutos foram imobilizados dentro de caixa gerbox transparente, com auxílio de lanolina, deixando o lado do pedúnculo para cima.

No centro da caixa foi colocado um pedaço de papel de filtro saturado com água e a caixa foi colocada sob a luz de uma lâmpada incandescente de 100W, posicionada a 50 centímetros. Uma série de frutos recebeu [U-<sup>14</sup>C] frutose e [U-<sup>14</sup>C] sacarose. Cada fruto recebeu 0,9 µCi ([U-<sup>14</sup>C] frutose 50 µCi/mmol, [U-<sup>14</sup>C] sacarose 50 µCi/mmol, Amershan Biotech) e após a absorção da solução marcada, foram adicionadas gotículas de água sobre o local do corte para evitar ressecamento. Em seguida, sobre o gerbox foi colocado um vidro comum e o material incubado por 24 horas.

Após este período, os frutos foram separados em endosperma, perisperma e casca e, após serem congelados e liofilizados, tiveram os açúcares endógenos extraídos e suas concentrações determinadas. Os mesmos extratos foram usados para determinação da radioatividade total e radioatividade específica dos açúcares.

Inicialmente a radioatividade específica seria determinada por HPLC, com uso de um detector de índice de refração acoplado em linha com um de radioatividade. Uma vez que a célula do detector de radioatividade é de 500 µl, existe sobreposição

de frutose e glicose ao passarem na célula, não permitindo a determinação individual das radioatividades específicas dos açúcares.

Assim, optou-se por separar os açúcares por cromatografia descendente de papel, utilizando como mistura de solvente acetato de etila:piridina:H<sub>2</sub>O:ácido acético:ácido propiônico (50/50/10/5/5, v/v/v/v/v). Glicose, frutose e sacarose (50 µg de cada) foram aplicadas em linha lateral para servirem de padrão de corrida. As corridas foram de 20 horas. Depois de retirado da cuba de cromatografia e secagem em capela, o cromatograma foi revelado com reagente de anilina (Walkey & Tillman, 1977).

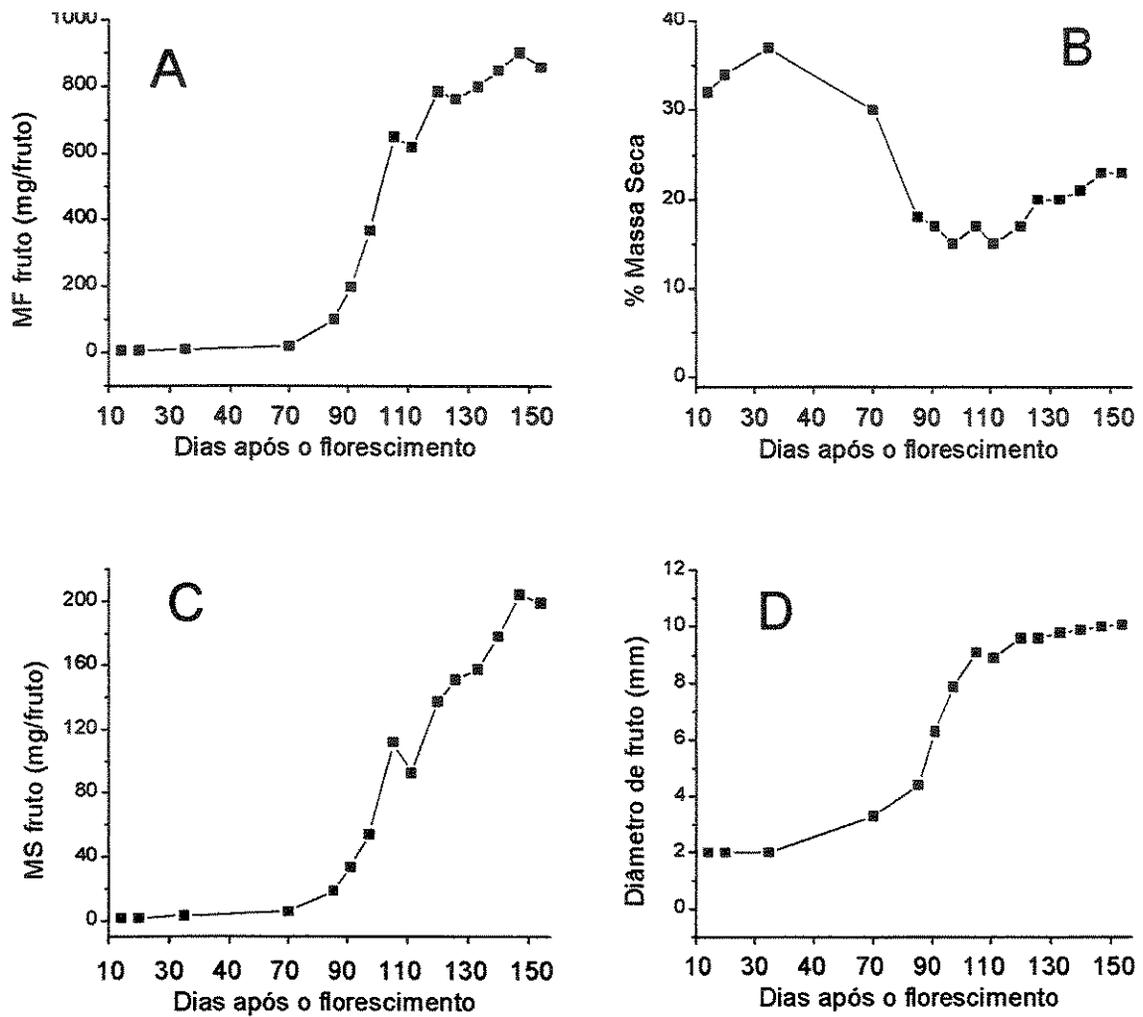
Após visualização das manchas de glicose, frutose e sacarose, elas foram recortadas separadamente do cromatograma, cortadas em tiras, colocadas em frascos de vidro para cintilador e trituradas em politron com 5 ml de etanol. Em seguida, adicionou-se 10ml de líquido de cintilação e após decantação dos resíduos do papel por 60 minutos, foi contada a radioatividade em contador de cintilação por 5 minutos.

Como controle de possível interferência do papel, foram retiradas áreas semelhantes de papel nas linhas laterais nas quais foram aplicados os padrões dos açúcares. Para a determinação da radioatividade específica de sacarose, usou-se a radioatividade determinada e quantidade conhecida em cada amostra aplicada, dado este obtido pela dosagem nos extratos. Para AR, usou-se a soma da radioatividade de frutose e glicose e os dados de AR determinados em cada amostra.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Crescimento e desenvolvimento dos frutos de café

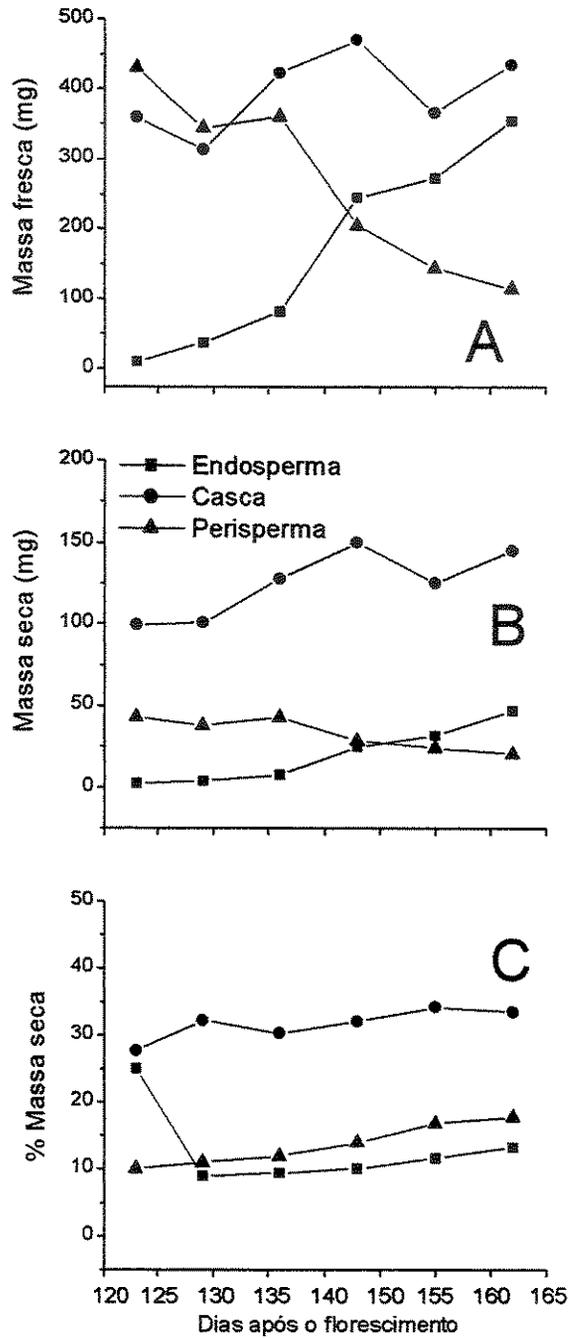
Os dados relativos ao crescimento dos frutos de café são mostrados nas fig. 5 e 6. A fig. 5 apresenta o crescimento de todo fruto, no período de 10/2001 a 02/2002, verificando-se o crescimento inicial lento, acelerando após a sexta coleta, quando então houve ganho significativo de massa (fig. 5A e C). Este aumento de massa está diretamente relacionado com a formação do endosperma, chegando a representar no fruto maduro aproximadamente 95% da massa total do fruto (Mendes, 1941). De modo inverso, os dados de porcentagem de massa seca (fig. 5 B) apresentam queda inicial, sendo isto atribuído ao acúmulo de água no fruto, durante o crescimento do perisperma (Mazzafera & Robinson, 2000).



**Figura 5.** Crescimento dos frutos de café durante o período compreendido entre 10/2001 a 02/2002. Massa fresca do fruto (A), porcentagem de massa seca (B), massa seca do fruto (C) e diâmetro do fruto (D).

A fig. 6 mostra a evolução da massa, massa fresca e % de massa seca nos tecidos, mas iniciando-se em período mais adiantado do crescimento dos frutos, ou seja, a partir dos 100 dias após o florescimento, quando início o maior crescimento do endosperma, época na qual ocorreu aumento da massa seca do fruto, como indicado na fig. 5. Uma alteração que se destaca na fig. 6 é a menor participação do perisperma nas massas fresca (fig. 6A) e seca do fruto (fig. 6B), mas aumentando um pouco a porcentagem de massa seca (fig. 6C).

Um único trabalho sugere qual o papel do perisperma no café. Quando Rogers *et al.* (1999), sugeriam que o conteúdo de açúcares redutores no perisperma era inicialmente alto para manter o balanço hídrico favorável, indicavam indiretamente que um provável papel desse tecido era acumular água para depois repassá-la ao endosperma. No mesmo período em que ocorre esta queda de massa fresca do perisperma, ocorre o início do acúmulo de massa do endosperma, a parte economicamente importante do café. Potomati & Buckeridge (2002) com estudos em *Sesbania virgata*, verificaram que a reserva acumulada no endosperma (galactomanano) tem como principal função acúmulo de água para o desenvolvimento do embrião. A queda na porcentagem de massa seca do endosperma (fig. 6C), provavelmente está relacionada com a entrada de água neste tecido, sendo que posteriormente existe a tendência de aumento, a fase em que ele acumula mais carbono. Por outro lado, as variações de massa seca na casca não são tão pronunciadas.



**Figura 6.** Crescimento de endosperma, perisperma e casca em frutos de café. (A) massa fresca (mg/fruto), (B) massa seca (mg/fruto) e (C) porcentagem de massa seca (mg/fruto).

## 4.2. Testes para Inv A em folhas e frutos

As dosagens enzimáticas realizadas em de café são dificultadas pela grande quantidade de fenóis existentes no fruto. Somente em sementes, tem sido relatado que ácido clorogênico pode chegar a 5-6% da massa seca (Clifford, 1985). Desta forma, antes de iniciar as dosagens com frutos, foi realizada uma série de testes com folhas, que podem ter mais de 10% de fenóis (Mazzafera, 1987). Com isto estaríamos evitando a perda de material, o que poderia ser um problema, pois o café frutifica apenas uma vez ao ano.

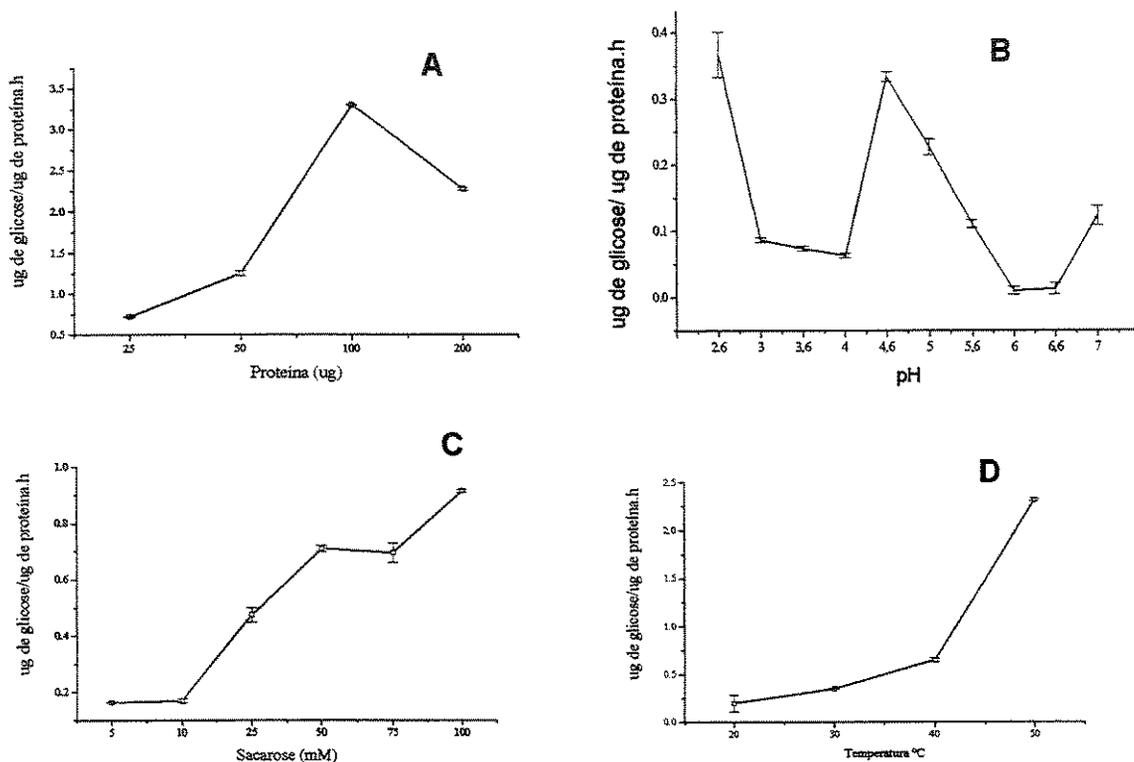
Nos testes prévios realizados com folhas foram analisados os perfis das enzimas Inv A e Susy e através de tais testes, determinou-se:

- ✓ quantidade de proteína no meio de reação
- ✓ pH ótimo
- ✓ concentração de substrato no meio de reação
- ✓ temperatura ótima

A fig. 7 apresenta o resultados para Inv A, sendo determinada concentração ótima de substrato como 100 mM de sacarose, a quantidade ótima de proteína de 100 µg, os melhores pH's foram em 2,6, 4,5 e 7,0, e por fim a melhor temperatura em 50°C.

Vários trabalhos têm relatado dois pH's ótimos de Inv A 2,5 a 5 (Tymowska-Lalanne & Kreis, 1998). Recentemente, mostrou-se que estas variações podem ser derivadas de alterações de apenas um resíduo de aminoácido em regiões conservadas da enzima (Goetz & Roitsch, 1999).

Os ensaios com temperatura foram repetidos várias vezes, inclusive com soluções reagentes novos, sem alteração dos resultados para Inv A, confirmando aumento de atividade com o aumento de temperatura. Desta maneira, os extratos de reações foram submetidos à cromatografia líquida de alta eficiência e os dados são apresentados na tabela 1, onde se observa que a temperatura ótima encontrada foi 37°C, confirmando os trabalhos encontrados na literatura. As diferenças entre as análises podem ser explicadas por alguma interferência da temperatura com os reagentes usados durante a dosagem dos AR.



**Figura 7.** Ensaios de atividade de Invertase àcida Inv A com extratos de folhas de café para determinação da quantidade de proteína (A), pH ótimo (B), e quantidade de substrato (C) temperatura ótima no meio de reação. (D). Barras indicam o erro padrão da média.

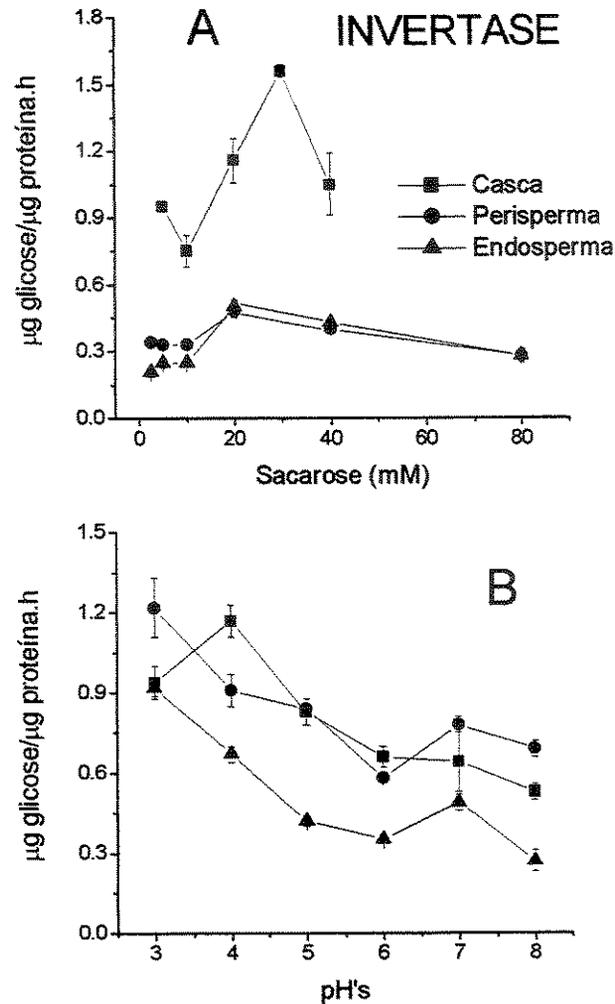
**Tabela 1.** Atividade da Invertase ácida( Inv A) avaliada pela produção de AR e determinada por HPLC utilizando-se detector de índice de refração e coluna Shim-pack CLC-NH2 (Shimadzu) em diferentes temperaturas de incubação.

Temperaturas de incubação (°C)	Atividade específica ( $\mu\text{g}$ de AR/ $\mu\text{g}$ de proteína.hora)
37	1,92
50	0,18
70	0,46

Para os testes de atividade com frutos, foram utilizados frutos coletados no início de 2003. Os dados obtidos definiram os parâmetros à serem usados na determinação da atividade da Inv A dos frutos colhidos em 2002, cujo crescimento foi apresentado na fig. 5.

Os frutos de 2003 usados nos testes, apresentavam-se com massa fresca de 780 mg/fruto, massa seca de 150 mg/fruto, porcentagem massa seca de 19,2%. Comparados aos dados da fig. 6, eles corresponderiam aos frutos de 130 aos 165 dias após a floração . Quando separados, o endosperma de cada fruto apresentou massa fresca de 21,7 mg, massa seca de 2,3 mg, porcentagem de massa seca de 13,8%. O perisperma apresentou para cada fruto matéria fresca de 203 mg, massa seca de 11,6 mg, porcentagem de massa seca de 5,7%. A casca de cada fruto possuía massa fresca de 640 mg, massa seca de 179 mg, porcentagem de massa seca de 28%. A temperatura de incubação usada nos ensaios foi 37°C e a quantidade de proteína foi 70  $\mu\text{g}$ . Testou-se o pH e a concentração de substrato no meio de reação em extratos do endosperma, casca e perisperma (fig. 8). Os

resultados foram diferentes dos obtidos para folhas (fig. 7). Nos três tecidos dos frutos, os melhores pH's de atividade foram mais baixos do que os de folhas, sendo entre 3 e 4. Resultados semelhantes foram obtidos com sementes de canola - *Brassica napus* (Hill *et al.*, 2003), ou seja, uma queda contínua de atividade conforme o aumento do pH, partindo de pH 3. Por outro lado, outros trabalhos mostram que a atividade pode variar bastante, indo de 2,5 a 5 (Tymowska-Lalanne & Kreis, 1998).



**Fig. 8.** Ensaio de atividade de Invertase àcida (Inv A) com extratos de endosperma, perisperma e casca de frutos de café para determinação da concentração ótima de substrato no meio de reação (A) e pH ótimo (B). Médias de 3 repetições. Barras indicam o desvio padrão da média.

Pelos dados apresentados na fig. 8 pode-se verificar que tanto para os testes de pH como para os de concentração de sacarose no meio de reação, as atividades foram maiores na casca. Hill *et al.* (2003), em seus estudos com canola, notaram que

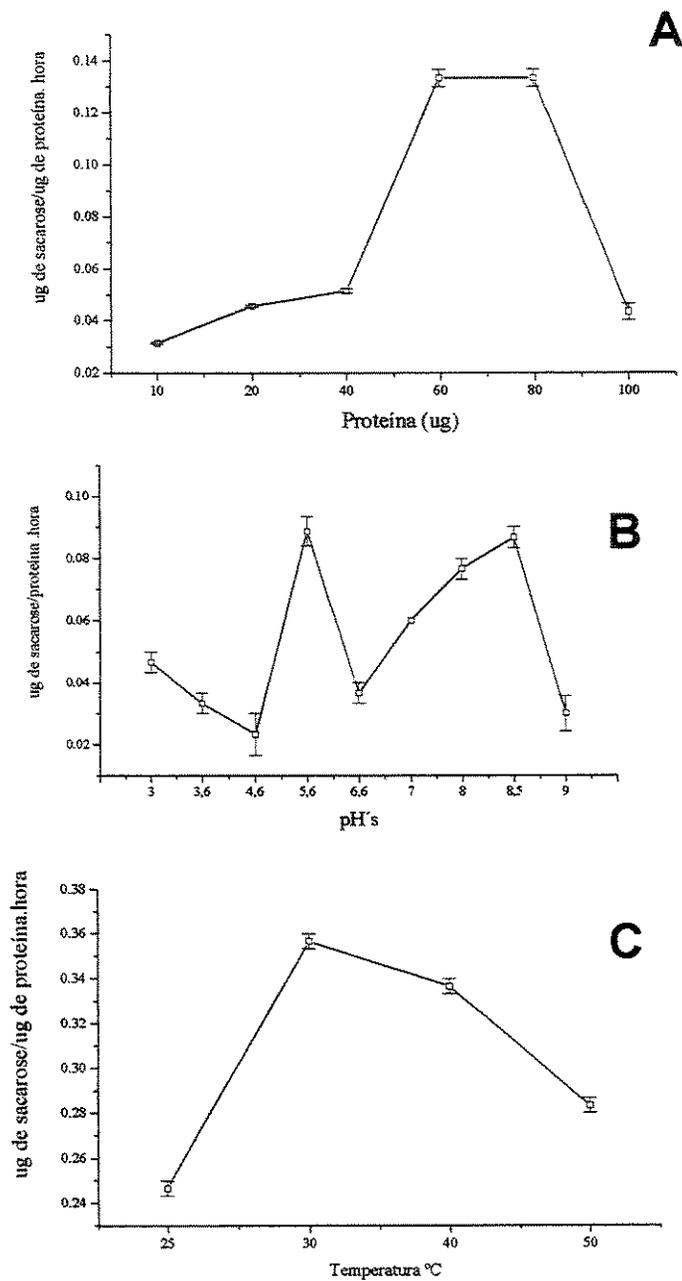
nas sementes o endosperma tinha maior atividade do que a casca, mas essas atividades tendiam a diminuir com o crescimento.

Os ensaios para análises das atividades de Inv A em frutos de café nos diferentes estádios de desenvolvimento foram realizadas a partir destes testes prévios, utilizando-se pH 4 e 30 mM de SAC no meio de reação.

As diferenças observadas aqui entre folhas e frutos podem estar relacionadas aos órgãos estudados. Segundo Kingston-Smith *et al.* (1999) o fato de folhas passarem de drenos para fontes altera sobremaneira a proporção entre as diferentes isoformas de Inv's no metabolismo de açúcares nestes tecidos. Isto somente é possível pelo fato de Inv's serem codificadas por uma família multigênica (Tymowska-Lalanne & Kreis, 1998; Kingston-Smith *et al.*, 1999).

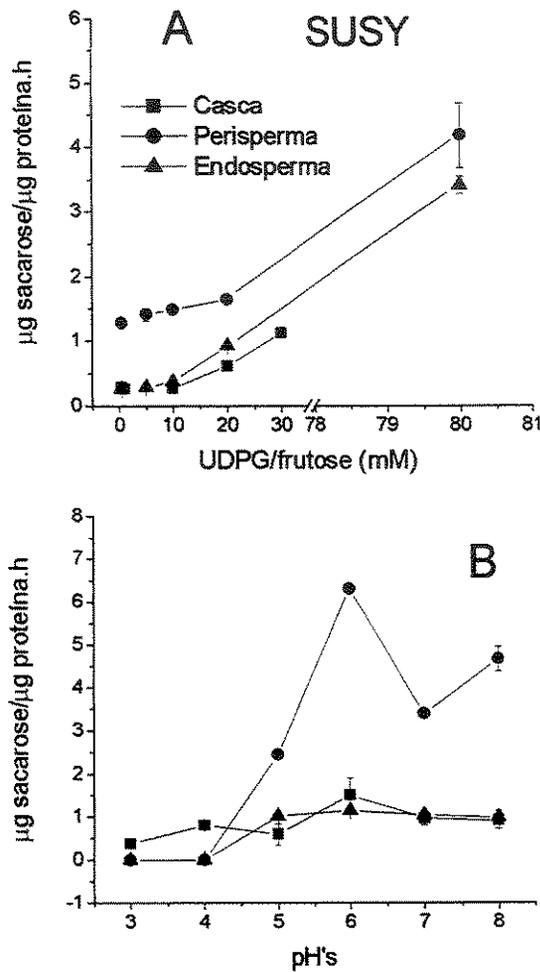
#### 4.3. Testes enzimáticos para Susy em folhas e frutos de café

Os resultados dos ensaios preliminares realizados em folhas são apresentados na fig. 10. As melhores condições para o meio de reação foram: 60 a 80 µg proteína, pH 5,5 e 8,5 para síntese da SAC e temperatura ótima de 30°C. As concentrações de substratos não foram testadas em folhas por falta do reagente na época destas dosagens.



**Figura 9.** Testes enzimáticos da atividade de Sacarose Sintase (Susy) com extratos de folhas em função da quantidade de proteína (A), do pH ótimo (B) e da temperatura ótima (C) no meio de reação. Barras indicam o erro padrão da média.

Para os diferentes tecidos do fruto (perisperma, endosperma e casca) a melhor atividade enzimática foi observada com pH 6, 80 mM de concentração final de UDP-glicose e frutose no meio de reação, como mostra a fig. 10. A extração foi realizada da maneira apresentada em Material e Métodos e a temperatura de incubação foi de 30°C, sendo adicionado de 70 a 80 µg de proteína ao meio de reação. Os pHs ótimos para a atividade enzimática, variam entre as isoformas de Susy, existindo também diferenças se o pH for determinado com a reação de síntese ou de quebra de sacarose. Assim, Tanase & Shohei (2000) encontraram melhor atividade com pH 8,5 na direção da clivagem e 7,5 na direção da síntese de sacarose para Susy de *Pyrus serotina* – pêra japonesa. Copeland (1990) mostrou que a Susy também possuía dois pHs de atividade alta, sendo que na direção de clivagem a melhor atividade se encontrava em pH 6 e 7 e na direção da síntese os melhores pHs eram 7,5 e 9,0. Mais recentemente, em raízes de beterraba, Klotz *et al.* (2003) verificaram a presença de duas isoenzimas, sendo que na direção de síntese uma delas apresentou até 4 picos de maior atividade nos pH's 6; 7,5; 8,5 e 10. Já a outra isoenzima teve maior atividade em pH's 7 e 10. Portanto, as diferenças aqui encontradas poderiam ser devido à presença de isoenzimas nos diferentes órgãos, folha e fruto.



**Figura 10.** Testes enzimáticos da atividade de Sacarose Sintase (Susy) com extratos de endosperma, perisperma e casca de frutos de café, em função do pH ótimo (A) e da concentração de substratos no meio de reação (B). Médias de 3 repetições. Barras indicam o desvio padrão da média.

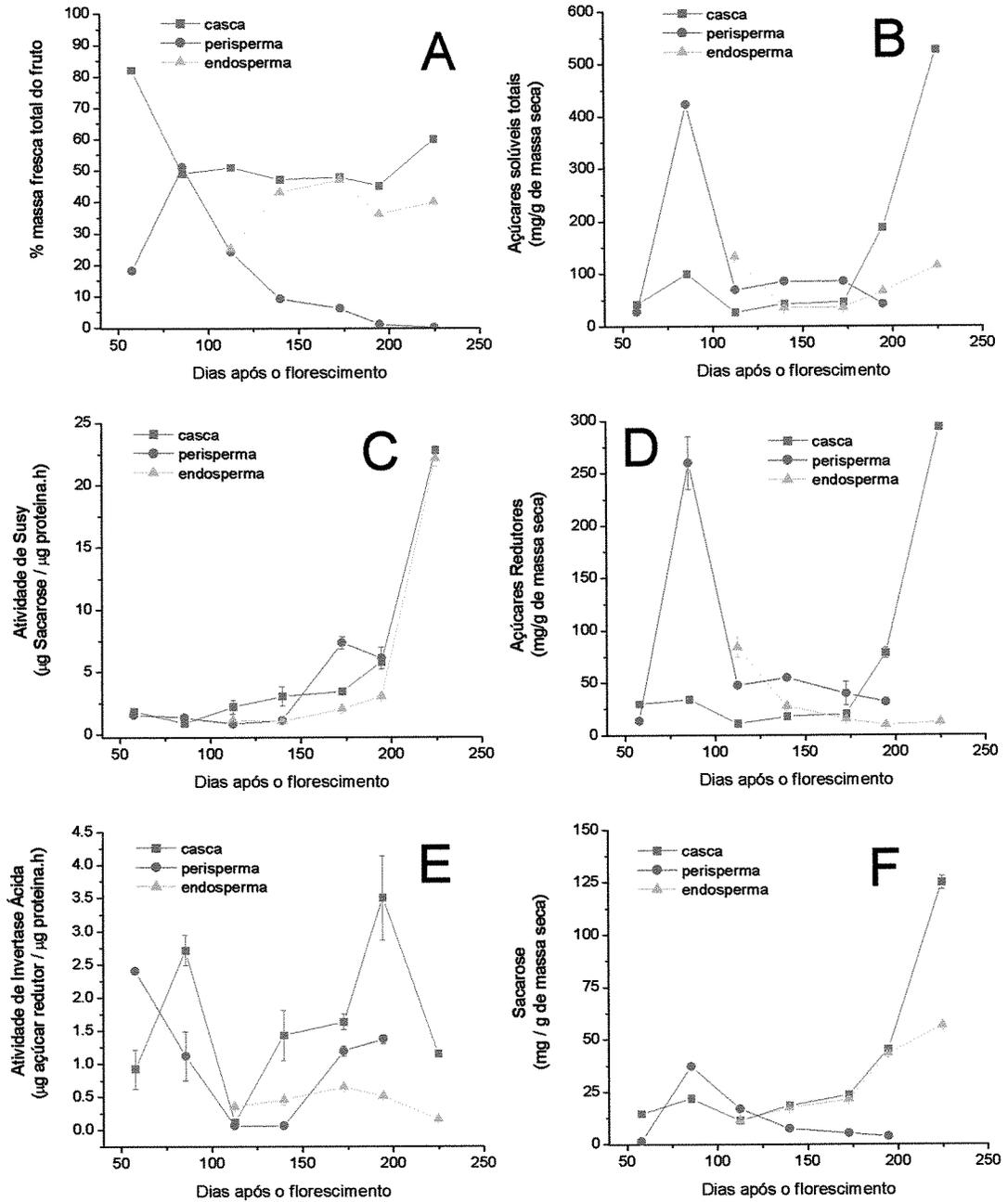
#### 4.4. Dosagens de açúcares endógenos e atividades enzimáticas em frutos de café em diferentes estádios de desenvolvimento

Os dados da fig. 11 são referentes às coletas feitas entre o final de 2001 e começo de 2002, conforme citado em Material e Métodos.

As fig. 11 B, D e F apresentam as variações da concentração dos açúcares encontrados nos frutos de café em diferentes estádios de desenvolvimento. Aos 80 dias do florescimento, observou-se um pico de SAC e AR no perisperma, os quais coincidem com o pico máximo de massa do mesmo tecido, o que pode ser observado na figura 11 A. A partir do 100º dias após o florescimento houve queda nas concentrações dos açúcares em questão, tanto no endosperma quanto no perisperma, porém com intenso aumento destes açúcares na casca 200 dias após o florescimento.

Comparativamente com os resultados de Rogers *et al.* (1999) os dados de SAC e AR no endosperma são bastante semelhantes. Naquele estudo, o aumento da concentração de SAC foi encontrado nos estádios finais do desenvolvimento dos frutos, chegando próximo a 60 mg/g da massa seca.

O aumento da concentração de AR na casca é atribuído ao amadurecimento, sendo que no fruto, ao passar da cor verde para amarelada e depois para vermelha, ocorre hidrólise dos açúcares presentes na polpa. A polpa (ou mucilagem) contém 84,2% de água, 8,9% de proteína, 4,1% de açúcares. Dos açúcares, aproximadamente 60% são redutores (Vicent, 1985).



**Figura 11.** Massa fresca (A), teor de açúcares solúveis (B), açúcares redutores (D), sacarose (F), e atividades enzimáticas de Susy (C) e Inv A (E) nos tecidos de frutos coletados em diferentes estádios do desenvolvimento. Médias de 4 repetições. Barras indicam o desvio padrão da média

Rogers *et al.* (1999) também observaram maior teor de AR no perisperma em estágios iniciais de desenvolvimento do fruto, isto ocorre para abaixar o potencial osmótico do tecido, garantindo o suprimento de água. É curioso observar que na casca o teor de AR acompanha o do endosperma, sugerindo que pode haver transferência de um tecido para o outro. Nos dados apresentados na fig. 11E observa-se alta atividade enzimática da Inv A na casca durante os primeiros estádios de desenvolvimento, o qual é acompanhado pelo aumento brusco dos AR no perisperma 80 dias após o florescimento (fig.11D).

No endosperma, ocorre redução de AR nos estádios finais, quando se observa o aumento do teor de SAC. Este aumento pode ser em decorrência da síntese a partir de AR.

Os dados enzimáticos demonstram a grande complexidade do metabolismo de açúcar em café. A atividade de Inv A (fig. 11E) aumentou no perisperma e casca no final do desenvolvimento, ainda que somente a casca tenha apresentado aumento de AR, apenas nos estádios finais do desenvolvimento do fruto. A primeira interpretação é que os AR formados por atividade de Inv A poderiam estar sendo ou respirados ou entrando no metabolismo de síntese de galactomananos e/ou amido. O fato de também haver redução de SAC indicaria um rápido desdobramento desse açúcar.

Porém, ao mesmo tempo, Susy também tem aumento de atividade (fig.11C). Vale a pena observar que a reação de Susy foi feita na direção de síntese de SAC, logo, se quisermos compará-la com Inv A, os dados tem que ser multiplicados por dois (1 de frutose e 1 de glicose). Assim, o aumento de SAC no endosperma e casca

poderá ser explicado pelo aumento de Susy, mas como explicar os dados do perisperma? A falta de paralelismo entre os dados de Susy e o teor de SAC em perisperma, ou seja, aumento de atividade sem o correspondente aumento do açúcar, poderia ser pelo fato de haver transporte de SAC destes tecidos para o endosperma. Outra possível explicação é que neste estágio do desenvolvimento o perisperma é um tecido com apenas algumas camadas de células, tendo então seu papel fisiológico diminuído.

Segundo Weber *et al.* (1997) em estudos com *V. faba*, a atividade da Inv A é alta durante as primeiras fases do desenvolvimento da semente, resultando em alta relação hexoses/sacarose, promovendo o crescimento celular. Isto foi observado nos frutos de café (fig. 11 D, E e F), sendo que a relação tende a diminuir com a formação do endosperma e amadurecimento do fruto. Esta queda na relação ocorre coincidentemente com o aumento de massa seca do endosperma (fig. 11A).

Trabalhos como de Sung *et al.* (1989), que testaram bioquimicamente a força do dreno em várias espécies de plantas, medindo a hidrólise da SAC via Inv A e Susy demonstraram que a Susy tem grande atividade na hidrólise da sacarose no citoplasma de drenos ativos e sua atividade diminui em drenos maduros. A hidrólise pela INv A seria secundária.

Ross & Davies (1992), em estudos com *V. faba*, também demonstraram que a quebra da SAC era preferencialmente pela Susy. Cordenunsi & Lajolo (1995), verificaram a queda na atividade hidrolítica da Susy durante o amadurecimento da banana.

Porém, Nascimento *et al.* (2000), observaram que durante a maturação de banana havia diminuição de Susy, paralela à degradação de amido. Alta atividade foi

observada durante a formação de amido. Desta forma, os autores concluíram que a Susy é importante na síntese de amido, tendo atividade na direção de clivagem de SAC. Tais dados estão de acordo com outros observados para tomate (Wang *et al.*, 1993) e endosperma de milho (Chourey & Nelson, 1976), mas diferentes de pêra asiática (Moriguvhi *et al.*, 1992), que assim como em endosperma de café, apresentou aumento de atividade durante o amadurecimento.

Portanto, por meio destas análises, considera-se que para o endosperma de café a Susy possui sua maior atividade na direção da síntese de SAC e durante as fases finais do desenvolvimento do fruto. Na casca o aumento da atividade de Susy estaria relacionada à maior presença de substratos (AR), provenientes de hidrólise de açúcar de parede, uma vez que existe o aumento de atividade de pectina esterase na polpa, durante a maturação do fruto (Vicent, 1985). Os dados não permitem explicar o aumento no perisperma.

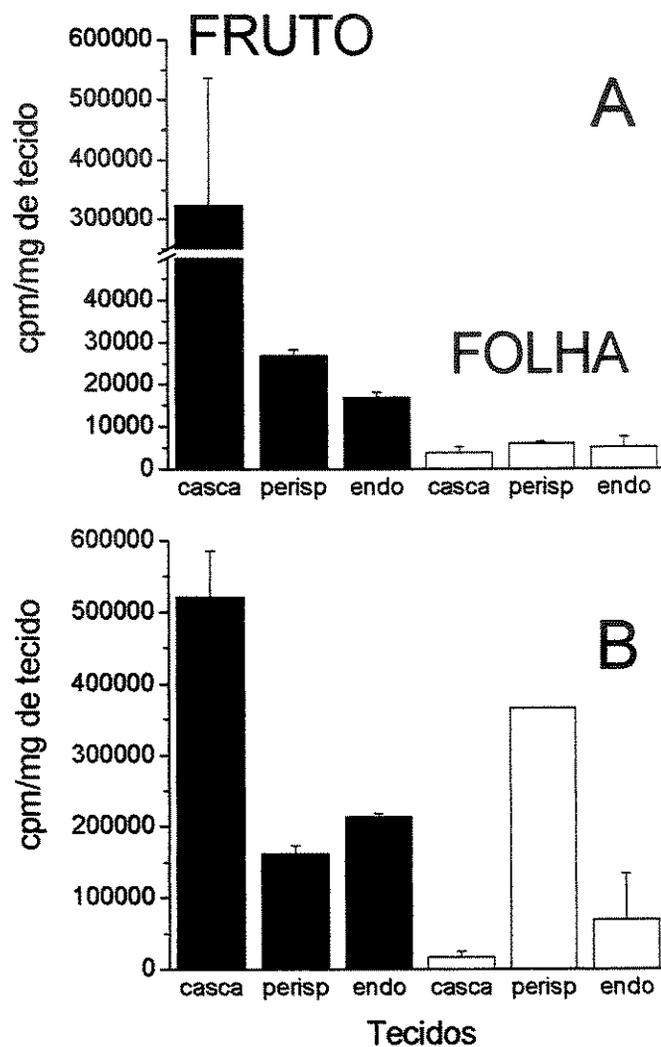
#### 4.5. Ensaio com radioisótopos

##### 4.5.1. Fornecimento de $^{14}\text{CO}_2$

A incubação com  $^{14}\text{CO}_2$  foi realizada em 21/12/2001, com frutos que estavam iniciando o desenvolvimento do endosperma, ou seja, o endosperma correspondia a 11%, o perisperma a 17% e a casca a 72% da massa seca do fruto. A incubação foi realizada de duas formas, uma apenas nas folhas e outra apenas nos frutos, com dois ramos para cada tratamento. Após a exposição por 4 horas a  $^{14}\text{CO}_2$ , a incubação procedeu por 4 e 24 horas. Neste ensaio, foram observados resultados contrastantes entre os tratamentos. Na incubação por 4 horas (fig. 12A) a maior radioatividade foi observada no fruto, o que pode ser explicado pelo fato do fruto fazer fotossíntese (Salazar *et al.*, 1997).

O mesmo foi observado com 24 horas de incubação, porém, é muito interessante observar que nos dois tempos de aplicação nas folhas não houve aumento de radioatividade na casca. Isto sugere que de fato, a casca faz significativamente fotossíntese e que vindo das folhas, a SAC transportada parece ser descarregada diretamente no perisperma.

Cortes histológicos de frutos de café (Begnami & Mazzafera, dados não publicados), mostram grande quantidade de vasos (floema e xilema) chegando ao perisperma e casca, mas nenhum ao endosperma. Da mesma forma, Begnami & Mazzafera (dados não publicados) não observaram continuidade física e celular entre o perisperma e endosperma. O que sugere que a transferência dos açúcares da casca para o perisperma e desta para o endosperma seria apoplástica. De acordo com Münch (1930) a translocação de assimilados no floema é dirigida por um gradiente de potencial osmótico entre a fonte e o dreno. Ao se tratar de descarregamento apoplástico, Van Bel, (1993), afirma que o descarregamento dos açúcares fabricados nas folhas é realizado com maior eficiência pelos vasos do floema de menor calibre. Isto transcreve uma relação: menor calibre, maior capacidade de descarregamento de sacarose. Já vasos com calibre maior tem como função transportar os açúcares por longas distâncias, mantendo altas as concentrações de solutos, os quais serão descarregados no apoplásto (Lalonde *et al.*, 2003).

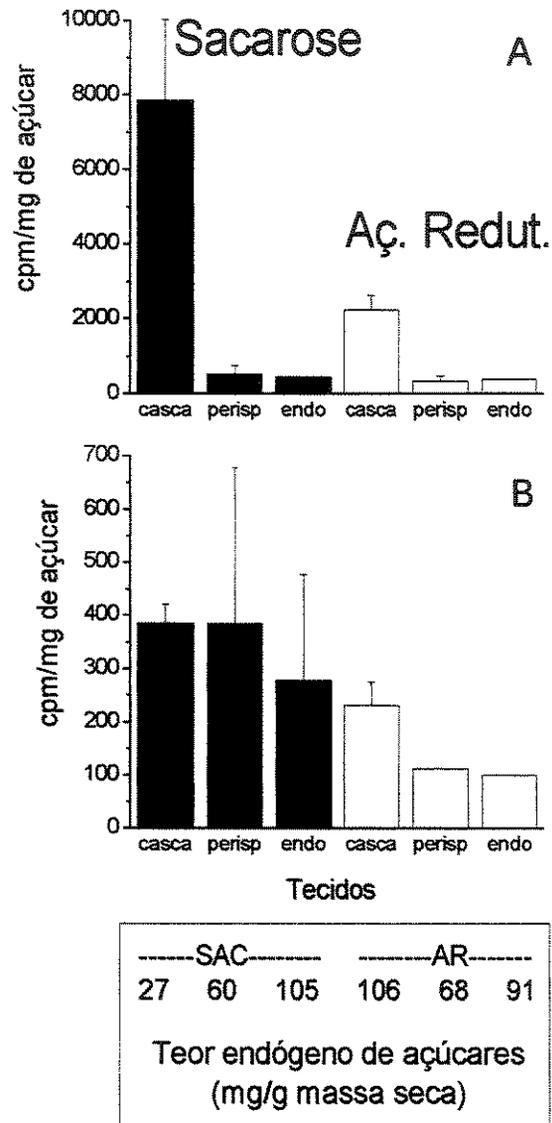


**Figura 12.** Radioatividade incorporada nos diferentes tecidos de frutos de café após o fornecimento de  $^{14}\text{CO}_2$  por 4 horas e incubação dos frutos e/ou de folhas por 4 (A) e 24 horas (B). Barras indicam o desvio padrão da média.

Uma vez que na incubação de  $^{14}\text{CO}_2$  por 24 horas ocorreu maior incorporação de  $^{14}\text{CO}_2$  somente para ele foram determinadas as radioatividades específicas dos açúcares). A fig. 13 mostra estes resultados. Quando o fornecimento de  $^{14}\text{CO}_2$  foi realizado para frutos, a maior radioatividade específica de SAC e AR foram observadas na casca. Tais resultados eram esperados, uma vez que frutos realizam fotossíntese e houve grande incorporação de radioatividade na casca (fig. 13A). As detecções de radioatividade em AR no perisperma e no endosperma não permitem dizer se SAC ou AR foram translocados da casca, mas permitem afirmar que, se AR foi translocado, houve atividade de síntese de Susy, e se SAC foi translocada, houve atividade de Inv A. Quando o fornecimento de  $^{14}\text{CO}_2$  foi feito para folhas (fig. 13B) a radioatividade específica foi menor na casca, da ordem de 200-400 cpm/mg, comparativamente ao fornecimento para frutos, com valores 20 vezes superiores (fig. 13A). Além disso, a radioatividade específica foi mais homogênea entre os diferentes tecidos. Tanto no fornecimento para folhas como frutos, SAC apresentou maior radioatividade específica em cada tecido. Outros dados interessantes são que entre o perisperma e o endosperma a radioatividade específica de SAC e de AR são menores no segundo tecido. Sendo que o ensaio é o "retrato" de um curto período de tempo, tais dados indicam que existe, de fato, translocação de um tecido para o outro.

Isto é coerente, pois sendo estes resultados obtidos da incubação de folhas com  $^{14}\text{CO}_2$ , o transporte até os frutos se deu na forma de SAC, logo, como esperado, a radioatividade específica é maior neste açúcar tanto na casca como perisperma, que possuem vasos de transporte. Assim, a presença de alta radioatividade em SAC

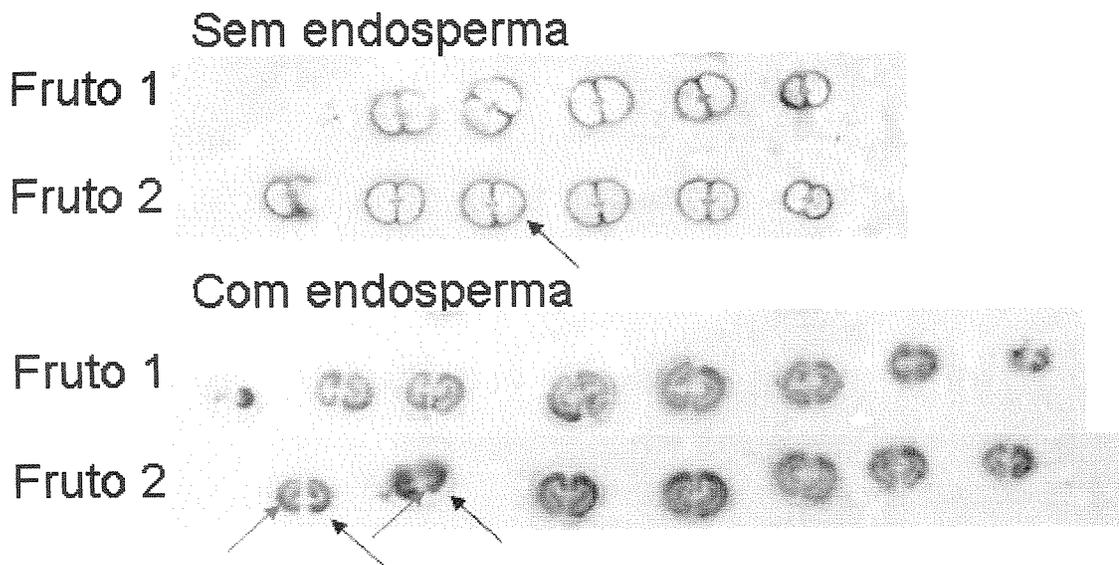
no endosperma também demonstrou um intenso transporte desse açúcar para o tecido.



**Figura 13.** Radioatividade específica de SAC e AR nos diferentes tecidos (casca, perisperma e endosperma) de frutos de café, quando o fornecimento de  $^{14}\text{CO}_2$  foi feito em frutos (A) ou folhas (B), e a incubação por 24 horas. Barras indicam o desvio padrão da média

#### 4.5.2. Auto-radiografia

Neste ensaio, frutos de café foram incubados com  $^{14}\text{CO}_2$  em dois estádios de desenvolvimento, sem endosperma e com endosperma. Após terem completado a maturação, foram colhidos, fatiados e as fatias colocadas para impressionar filme de raio-X. A fig. 14 mostra os resultados destes ensaios. Cada linha de fruto representa um fruto inteiro fatiado. Quando a aplicação foi realizada na ausência do endosperma, houve maior impressão do filme na região da casca, com muito pouca radioatividade encontrada no endosperma. Por outro lado, quando a incubação foi realizada com frutos apresentando endosperma em desenvolvimento a marcação do filme de raio-X ocorreu intensamente no endosperma. É curioso notar que neste caso a marcação não preencheu todo o endosperma, ou melhor, pode-se observar que o centro de marcação era menos intensa. Acreditamos que isto ocorreu pelo fato do fornecimento ter sido realizado em um dado momento do desenvolvimento do endosperma, sugerindo que a “deposição” de radioatividade ocorreu numa camada de células. Ao contrário dos frutos incubados sem endosperma quase nenhuma marcação foi observada no perisperma.



**Figura 14.** Auto-radiografia de frutos que receberam  $^{14}\text{CO}_2$  em dois estádios de desenvolvimento. As setas vermelhas indicam o endosperma e as pretas, a casca.

Os ensaios de fornecimento de  $^{14}\text{CO}_2$  mostraram a presença de radioatividade na casca, perisperma e endosperma, indicando que ocorre, de fato, transporte entre estes tecidos. Desta forma, a impressão observada somente na casca, nos frutos que receberam  $^{14}\text{CO}_2$  quando ainda não possuíam o endosperma formado, reflete que o perisperma pode não ser um dreno forte. Vale a pena lembrar que o fornecimento de  $^{14}\text{CO}_2$  apenas para frutos (fig. 12 A) mostrou presença maciça de radioatividade na casca. Por outro lado, quando o fornecimento foi para folhas, houve boa distribuição entre casca, endosperma e perisperma. Assim, pode-se inferir que grande parte do açúcar do perisperma é proveniente das folhas. No entanto, ainda existe a probabilidade de que tenha ocorrido transferência de casca para o perisperma, ou mesmo que o açúcar da casca seja respirado.

Durante a maturação do fruto de café ocorre aumento da atividade respiratória. Puschmann (1975), observou que depois da 26ª semana após o florescimento, ou seja, aproximadamente 180 dias, há grande aumento da respiração na casca, da ordem de 3 a 4 vezes. O máximo é atingido com 32 semanas (224 dias). Este autor também avaliou o teor de açúcar solúvel em álcool (açúcares solúveis totais e os redutores) na casca, observando aumento paralelo ao da respiração. O mesmo foi observado por nós nas figs.11 B e D.

A boa marcação no endosperma indica ser este tecido um dreno bastante forte. Como o perisperma fica reduzido a uma fina película, é difícil verificar na fig. 14 se houve impressão do filme por este tecido.

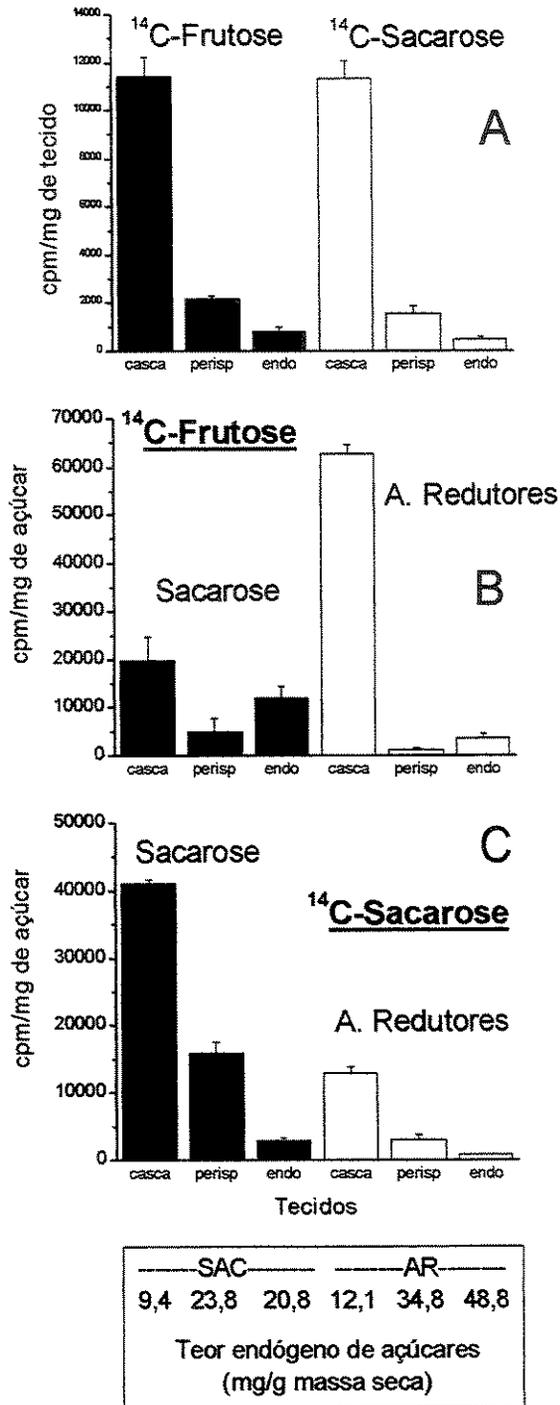
As determinações de radioatividades nas frações de açúcares solúveis, amido e polissacarídeos de parede celular mostraram, no entanto, que deve existir um padrão de acúmulo desses compostos. A fração de açúcares solúveis teve 60.584 cpm/g de endosperma, a fração de amido, 110.000 cpm/g e a fração de polissacarídeos de parede celular apenas 6.478 cpm/g. Uma vez que o fornecimento de  $^{14}\text{CO}_2$  foi feito por apenas 4 horas é possível que preferencialmente, naquele momento, grande parte do carbono entrando no endosperma estivesse sendo dirigido para amido, em detrimento a fração hemicelulose de galactomananos. Redgwell *et al.* (2003) acompanharam o acúmulo de açúcares na forma de polissacarídeos no endosperma de café entre a 11ª e 37ª semanas após o florescimento, observando uma alteração na proporção entre galactose e manose no galactomanano, o que conferiria maior rigidez e menor solubilidade ao polissacarídeo. A responsável pela mudança na proporção

seria uma  $\alpha$ -galactosidase. Por outro lado, outros açúcares presentes na fração denominada resíduos insolúveis em álcool, na qual se encontra o galactomanano, mostrou redução de xilose, rhamnose, arabinose, glicose, ácido glucorônico e ácido galacturônico. A fração denominada solúvel em álcool aumentou constantemente até a 37ª semana. Nela, exceto sacarose e galactose, rhamnose, arabinos, xilose, manose e glicose diminuíram com o crescimento do endosperma.

O dado mais surpreendente do ensaio de autoradiografia é a radioatividade na fração de açúcares solúveis. Notamos, porém, que a casca pode fixar uma boa quantidade de carbono figs. (12 e 14) e como matéria de especulação é possível que durante o amadurecimento parte do carbono possa ser redistribuída para o endosperma, uma vez que a casca é rica em AR, tendo 4,1% de açúcares solúveis e destes 60% são redutores (Vicent, 1985). Desta forma, os dados de açúcares endógenos e fornecimento de  $^{14}\text{CO}_2$  indicaram que além de poder manter disponibilidade adequada de água para o desenvolvimento do fruto, o perisperma parece também ser responsável pela passagem de açúcares para o endosperma.

#### 4.5.3. Fornecimento de [U- $^{14}\text{C}$ ] sacarose e [U- $^{14}\text{C}$ ] frutose

O ensaio de fornecimento de [U- $^{14}\text{C}$ ] sacarose e [U- $^{14}\text{C}$ ] frutose foi realizado com frutos de café no mesmo estágio de desenvolvimento que os frutos utilizados para as análises enzimáticas, ou seja, aproximadamente 175 dias após o florescimento, com o endosperma ainda em desenvolvimento. Os resultados são mostrados na fig. 15. A fig 15A apresenta os dados de radioatividade por massa nos diferentes tecidos dos frutos que receberam [U- $^{14}\text{C}$ ]sacarose e [U- $^{14}\text{C}$ ]frutose.



**Figura 15.** Radioatividade total por massa (A) e radioatividade específica em açúcares (SAC e AR) na incubação com [U-<sup>14</sup>C] frutose (B) e [U-<sup>14</sup>C] sacarose (C)

Barras indicam o desvio padrão da média

A maior radioatividade encontra-se na casca, para ambos os tratamentos. Isso se deve ao fato que na montagem do experimento, no local de aplicação (o pedúnculo), os produtos marcados provavelmente atingiram preferencialmente os vasos presentes na casca. A fig. 15A não discrimina em quais substâncias (açúcares) está a radioatividade, mas mostra claramente que houve transferência entre perisperma e endosperma, uma vez que este último não possui vasos do floema.

Na fig. 15 B são apresentadas as radioatividades específicas em SAC e AR quando forneceu-se [U-<sup>14</sup>C]frutose. Como esperado, a maior radioatividade foi incorporada na casca e a maior radioatividade específica em AR.

A fig. 15 C mostra os resultados da aplicação de [U-<sup>14</sup>C]sacarose, como esperado a maior radioatividade estava na casca e a maior atividade específica em SAC. Estes dados, em relação aos dados enzimáticos, ilustram novamente a complexidade do metabolismo de açúcar no fruto de café. Assim, quando se forneceu [U-<sup>14</sup>C]frutose detectou-se radioatividade em SAC em todos os tecidos, mostrando não só a atividade de Susy, mas também que houve translocação, podendo ser tanto na forma de SAC como AR. Também é curioso observar que quando <sup>14</sup>C-frutose foi oferecida aos frutos, a radioatividade específica no perisperma foi menor que no endosperma. Por outro lado, quando [U-<sup>14</sup>C]sacarose foi fornecida o perisperma mostrou maior radioatividade em SAC que em AR. Como especulação, poderia ser sugerido que AR são preferencialmente transportados, pois quando [U-<sup>14</sup>C]frutose foi fornecida é que observou-se maior radioatividade por massa (fig. 15A ) e maior radioatividade específica em SAC no endosperma (fig. 15B ).

Os frutos usados apresentaram teor endógeno de SAC que permite dizer que estava na fase de acumulação deste açúcar, como mostrado na fig. 15. Talvez isto explique a maior radioatividade específica em SAC, mais visível com [U-<sup>14</sup>C] frutose, mas também uma tendência quando [U-<sup>14</sup>C]sacarose foi usada. Os dados de Susy (fig. 11) também estão de acordo com esta interpretação.

## 5. CONCLUSÕES

Através dos dados de radioatividade, dosagens de açúcares endógenos e atividade enzimática de Inv A e Susy nos diferentes estádios de desenvolvimento do fruto de café, pode-se inferir que o perisperma é um tecido que recebe açúcares das folhas e da casca, ainda fotossintetizante.

Além de ter a função de diminuir o potencial osmótico do tecido para atração de água, o perisperma parece ser um tecido de passagem, o qual transfere grande parte dos açúcares recebidos diretamente da folha e/ou da casca para o desenvolvimento do endosperma.

Nestes processos as enzimas Invertase ácida e Sacarose Sintase (Inv A e Susy) possuem atividades diferentes no decorrer do desenvolvimento, sendo no início representada pela Inv A e nos estádios finais pela Susy, tendo como principal açúcar a ser incorporado na fase final a SAC.

O fato de todo o processo envolver três tecidos, torna a interpretação dos dados complexa e novos estudos são necessários para se conhecer melhor como se dá a transferência entre os tecidos.

## 6. BIBLIOGRAFIA

- Amor, Y.; Haigler, C.H.; Johnson, S.; Wainscott, M. & Delmer, D.P., 1995. A membrane-associated form of sucrose synthase and its potential role in synthesis of cellulose and callose in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:9353-9357.
- Bradbury, A.G.W. & Halliday, D.J., 1990. Chemical estruturas of green bean polisacchararides. *J. Agric. Food. Chem.* 38:389-392, 1990.
- Bradford, MN., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Buckeridge, M.S. & Dietrich, S.M.C., 1990. Galactomannan from Brazilian legume seeds. *Rev. Bras. Bot.* 13:109-112.
- Buckeridge, M.S.; Panegassi, V.R.; Rocha, D.C. & Dietrich, S.M.C., 1995. Seed galactomannan in the classification and evolution of the Leguminosae. *Phytochemistry.* 38:871-875.
- Cardoso, A.P.S., 1990. *Café. Cultura e tecnologia primária.* Instituto de Investigação Científica Tropical, Lisboa, p.44-48.
- Carvalho, A., 1946. Distribuição geográfica e classificação botânica do gênero *Coffea* com referencial espécie arabica. *Bol. Sup. Serv. Café (Secret. Fazenda)*, 21(229): 127-130.
- Cheng, WH.; Taliercio, EW. & Chourey, PS., 1996. The miniature seed locus of maize encodes a cell wall invertase required for normal development of endosperm and maternal cells in the pedicel. *Plant Cell.* 8: 971-983 .

- Chourey, PS. & Nelson, OE., 1976. The enzymatic deficiency conditioned by the shrunken 1 mutation in maize. *Biochem. Genetics*. 14: 1041-1055 .
- Chourey, PS.; Taliercio, EW.; Carlson, SJ. & Ruan, Y-L.; 1998. Genetic evidence that the two isozymes of sucrose synthase present in developing maize endosperm are critical, one for cell wall integrity and the other for starch synthesis. *Mol. Gen. Genet.* 259: 88-96.
- Chourey, PS., 1999. Sucrose metabolizing genes are critical for growth and development of maize seed. *Phyton*. 39: 7-11.
- Cliford, M.N., 1985. Chemical and physical aspects of coffee and coffee products. In: *Coffee: Botany, biochemistry and Production of Beans and Beverage* (M.N. Clifford and K.C. Willson, eds), 1<sup>st</sup> edition, American Edition, Westport, Connecticut, London,pp. 305-374.
- Copeland, L., 1990. Enzymes of Sucrose Metabolism. *Methods in plant biochemistry*. 3: 73-83. Academic Press, San Diego.
- Cordenunsi, B. R. & Lajolo M. F. 1995. Starch breakdown during banana ripening: sucrose syntase and sucrose-phosphate- syntase. *J. Agric. Food. Chem.* 43 (2): 347-351.
- Dubois, M.; Gilles, K.A.; Hamilton, J.K.; Rebers, P.A. & Smith, F., 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28: 350-356.
- Farrar, J.; Pollock, C. & Gallagher J., 2000. Sucrose and integration of metabolism in vascular plants. *Plant Sci.* 154: 1-11.

- Fisher, M.; Reimann, S.; Trovato, V. & Redgewill, R. J., 2001. Polysaccharides of green and robusta coffee beans. *Carb. Res.* 330: 93-101.
- Goetz, M. & Roitsch, T., 1999. The different pH optima and substrate specificities of extracellular and vacuolar invertases from plants are determined by a single amino-acid substitution. *The Plant J.* 20 (6) : 707-711.
- Herbers, K. & Sonnewald U., 1998. Molecular determinants of sink strength. *Curr. Opin. Plant Biol.* 1: 207-216
- Hill, M.L.; Smith, M.R.E. & Rawsthorne, S., 2003. Metabolism of sugar in the endosperm of developing seeds of oilseed rape. *Plant Physiol.* 131:228-236.
- Ho, L., 1979. Regulation of assimilate translocation between leaves and fruits in the tomato. *Ann.Bot.* 43: 437-448
- Kingston-Smith, AH.; Walker, RP. & Pollock C., 1999. Invertase in leaves: conundrum or control point? *J. Exp. Bot.* 50: 735-743.
- Klotz, K.L; Finger, F.L & Shelver, W.L., 2003. Characterization of two sucrose synthase isoforms in sugarbeet root. *Plant. Physiol. Biochem.* 41: 107-115.
- Kühn, C.; Barker, L.; Bürkle, L. & Frommer, WB., 1999. Update on sucrose transport in higher plants. *J. Exp. Bot.* 50: 935-953.
- Lalonde, S.; Tegeder, M.; Throne-Hoslst, M.; Frommer, B. W. & Patrick, W. J., 2003. Phloem loading and unloading of sugars and amino acids. *Plant Cell. Envir.* 26: 37-56.

- Maraña, C.; Garcia-Olmedo, F. & Carbonero, P., 1990. Differential expression of two types of sucrose synthase- encoding genes in wheat in response to anaerobiosis, cold shock and light. *Gene* 88: 167-172.
- Marger, M. & Saier, Jr. M., 1993. A major superfamily of transmembrane facilitators that catalyse uniport, symport and antiport. *Trends Biochem. Sci.* 18: 13-20.
- Mazzafera, P. & Robinson, S. P., 2000. Characterization of polyphenol oxidase in coffe. *Phytochemistry.* 55:285-296.
- Mazzafera, P., 1987. Estudo sobre a resistência induzida no complexo *Coffea arabica* L.-*Hemileia vastatrix* Berk. et Br. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Brasil, tese de Mestrado.
- Mendes, A.J.T., 1941. Cytological observations in *Coffea*. VI Embryo and endosperm developement in *Coffea arabica* . L. *Am. J. Botany.*28: 784-789.
- Moriguchi, T.; K. Abe, T.; Sanada & Yamaki, S., 1992. Leves and role of sucrose synthase, sucrose-phosphate syntase, and acid invertase in sucrose accumulation in fruit of Asian pear. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 117(2), 274-278.
- Münch, E., 1930. Dite Stoffbewegungen in der Pflanze. Fischer, Jena, Germany.
- Nascimento, J. O.; Cordenunsi, R. B. & Lajolo, M. F., 2000. Sucrose synthase activity and expression during development and ripening in bananas. *J. Plant. Physiol.* 156: 605-611.
- Nolte, K.D. & Koch, K.E., 1993. Companion-cell specific localization of sucrose synthase in zones of phloem loading and unloading. *Plant Physiol.* 101:899-905.
- Patrick, J. W., 1988. Assimilate partitioning in relation crop productivity. *Hort. Sci.* 23: 33-40.

- Pimentel, C., 1998. *Metabolismo de Carbono na Agricultura Tropical*. Editora Universidade Rural do Rio de Janeiro, Km 47, Seropédica-RJ, 159p.
- Potomati, A. & Buckeridge. M., S., 2002 Effect of abscisic acid in the mobilisation of galactomannan and embryo development of *Sesbania virgata*(Cav). Pers. (Leguminosae-Faboiceae).Rev. Bras. Bot. 25. 303-310.
- Puschmann, R., 1975. Características bioquímicas do fruto do cafeeiro (*Coffea arabica* L.) durante a maturação. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Brasil, tese de Mestrado.
- Redgwell, R.J.; Curti, D.; Fisher, M.; Nicolas, P. & Fay, L.B., 2002 Coffee bean arabinogalactans: acidic polymers covalently linked to protein, Carb. Res. 337: 239-253.
- Redgwell, J.; Curti, D.; Rogers, J.; Nicolas, P. & Fischer, M., 2003 Changes to the galactose/manose ratio in galactomannans during coffee bean (*Coffea arabica* L.) development: implications for in vivo modification of galactomannan synthesis. Planta., 217:316-326.
- Rogers, W.J.; Michaux, S.; Bastin, M. & Bucheli, P., 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*). Plant Sci. 149: 115-123.
- Roitsch, T., 1999. Source-sink regulation by sugar and stress. Curr. Opin. Plant Biol.. 2: 198-206.
- Roitsch, T.& Ehne, R., 2000. Regulation and function of extracellular invertase from higher plants in relation to assimilate partitioning, stress responses and sugar signalling. Aust. J. Plant Physiol. 27:815-825.

- Ross, A. H. & Davies, V. H., 1992. Purification and characterization of SS from the cotyledons of *V. Faba*. *Plant. Physiol.* 100: 1008-1013.
- Ruan, Y.L.; Chourey, P.S.; Delmer, D.P. & Prez, G.L., 1995. Soluble invertase from grape berries: purification, deglycosilation and antibody especificity. *Plant Physiol. Biochem.* 33: 25-31.
- Ruan, Y-L.; Chourey, PS.; Delmer, DP. & Perez-Grau L., 1997. The differential expression of sucrose synthase in relation to diverse patterns of carbon partitioning in developing cotton seed. *Plant Physiol.* 115: 375-385.
- Salazar, GMR.; Lopez, FY.; Mosquera, SLP.; Riano, HNM. & Arcila, PJ., 1997. Characterization of photosynthetic activity of coffee (*Coffea* sp) fruits. IN: Congresso de 1997 da American Society of Plant Physiology. Suplemento de *Plant Physiology*.
- Simpson, B.B.& Orgraly, M.C., 1995. *Economic botany: Plants in our world.*, Ed. McGraw-Hill, New York,, p. 446-457.
- Somogy, N., 1952. Notes on sugar determination. *J. Biol. Chem.* 195: 19-23.
- Sonnewald, U.; Hajirezaei, M-R.; Kossman, J.; Trethewey, RN. & Willmitzer, L., 1997. Increased potato tuber size resulting from apoplastic expression of a yeast invertase. *Nature Biotechnol.* 15: 794-797 .
- Sturm, A., 1999. Invertases: primary structures, functions, and roles in plant development and sucrose partitioning. *Plant Physiol.* 121: 1-7 .
- Sung, S.S.; Xu, D.P. & Black, C.C., 1989. Identification of actively filling sucrose sinks. *Plant Physiol.* 89: 1117-1121.
- Tanase, K. & Shohei, Y., 2000. Purification and characterization of two sucrose

- synthase isoforms from japanese pear fruit. *Plant Cell Physiol.* 41 (4) : 408-414.
- Tegeder, M.; Wang, X.-D.; Frommer, W.B.; Offler, C.E. & Patrick, J.W., 1999. Sucrose transport into developing seeds of *Pisum sativum* L. *Plant J.* 18:151-161.
- Tressl, R.; Holzer, M. & Kamperschroer, H., 1982 *Proc 10<sup>th</sup> Coll. Asic.* 279-92. (M.N. Clifford and K.C. Willson, eds), 1<sup>st</sup> edition, American Edition, Westport, Connecticut, pp. 305-374.
- Tymowska-Lalanne, Z. & Kreis, M. 1998. The plant invertases: physiology, biochemistry and molecular biology. *Adv. Bot. Res.* 28: 71-117 .
- Van Bel, A.J.E. 1993. Strategies of phloem loading. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology.* 44: 253-281.
- Van Handel, E., 1968. Direct microdetermination of sucrose. *Anal. Biochem.* 22: 280-283.
- Vincent JC (1985) Green coffee processing. *In* R Macrae, ed, *Coffee. Vol 2. Technology*, Vol Vol. 2. Elsevier Applied Science, London, pp 1-33
- Walkey, J.W. & Tillman, J., 1977. A simple thin layer chromatographic technique for the separation of mono and oligosaccharides. *J. Chromatogr.* 132:172-174.
- Wang, F.; Sanz, A.; Brenner, M.L. & Smith, A., 1993. Sucrose synthase, starch accumulation and tomato fruit sink strength. *Plant Physiol.* 101:321-327
- Ward, J.; Kúhn, C.; Tegeder, M. & Frommer, WB., 1998. Sucrose transport in higher plants. *Int. Rev. Cytol.* 178: 41-71.
- Wardlaw, I. F., 1990. The control of carbon partitioning in plants. *The New Phytol.* 166: 341-381.

- Weber, H.; Borisjuk, L. & Wobus U., 1997. Sugar import and metabolism during seed development. *Trends Plant Sci.* 2: 169-174.
- Weschke, W.; Panitz, R.; Sauer, N.; Wang, Q.; Neubohn, B.; Webwe, H. & Wobus, U., 2000. Sucrose transport development and starch accumulation. *Plant J.* 21: 455-467.
- Wolfron, M.L.; R.A. Plunkett, & M.L. Laver., 1960. Carbohydrates of coffee bean. *Agric. Food Chem.* 8(1): p. 58-65
- Wolfron, M.L. & Patin, D.L., 1965. Carbohydrates of coffee bean. IV. Na arabinogalactan. *J. Org. Chem.*, 8:58-65.
- Zrenner, R.; Salanoubat, M.; Willmitzer, L. & Sonnewald, U., 1995. Evidence of the crucial role of sucrose synthase for sink strength using transgenic potato plants (*Solanum tuberosum* L.) *Plant J.* 7:97-107.