

Geraldo Aclécio Melo

**PURIFICAÇÃO DA ENZIMA POLIFENOLOXIDASE DO
CAFEEIRO, SUA RELAÇÃO COM RESISTÊNCIA A
PRAGAS E O CONTROLE DA SÍNTESE DE SEU
PRINCIPAL SUBSTRATO, O ÁCIDO CLOROGÊNICO**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
GERALDO ACLÉCIO MELO
e aprovada pela Comissão Julgadora.

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

Orientador: Prof. Dr. Paulo Mazzafera

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

M491p	Melo, Geraldo Aclécio Purificação da enzima polifenoloxidase do cafeeiro, sua relação com resistência a pragas e o controle da síntese de seu principal substrato, o ácido clorogênico / Geraldo Aclécio Melo. -- Campinas, SP: [s.n.], 2005. Orientador: Paulo Mazzafera. Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia. 1. Café - Doenças e pragas. 2. Plantas - Resistência. 3. Polifenol oxidase. 4. Ácido clorogênico. I. Mazzafera, Paulo. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título. (rcdet/ib)
--------------	---

Título em inglês: Coffee polyphenoloxidase purification, its relation with plague resistance and synthesis control of its main substrate, chlorogenic acid.

Palavras-chave em inglês: Coffee – Diseases and pests, Polyphenol oxidase, Plants - Resistance, Chlorogenic acid.

Área de concentração: Biologia Vegetal.

Titulação: Doutor em Biologia Vegetal.

Banca examinadora: Paulo Mazzafera, Michel Vincentz, Marcelo Carnier Dornelas, Luiz Gonzaga Esteves Vieira, Carlos Augusto Colombo.

Data da defesa: 30/06/2005.

DATA DE DEFESA: 30/08/2005

Banca Examinadora

Prof. Dr. Paulo Mazzafera (orientador)

Prof. Dr. Luiz Gonzaga Esteves Vieira

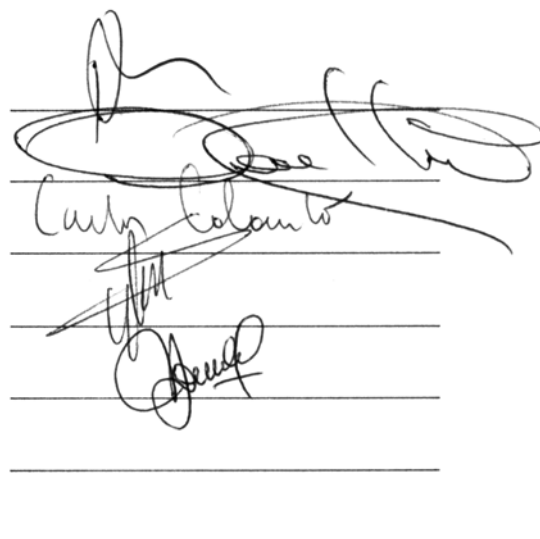
Prof. Dr. Carlos Augusto Colombo

Prof. Dr. Michel Vincentz

Prof. Dr. Marcelo Carnier Dornelas

Prof. Dr. Marlene Aparecida Schiavinato

Prof. Dr. Gonçalo A. Guimarães Pereira



Handwritten signatures of the examiners, including Paulo Mazzafera, Luiz Gonzaga Esteves Vieira, Carlos Augusto Colombo, Michel Vincentz, Marcelo Carnier Dornelas, Marlene Aparecida Schiavinato, and Gonçalo A. Guimarães Pereira, written over horizontal lines.

Aos meus pais e irmãos,

DEDICO

À minha querida e amada esposa, Aneliza,
À minha filha, Anamaria,

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

A Deus, que sempre me ilumina.

À Universidade Estadual de Campinas, pela oportunidade de realização do curso.

À Fapemig, pela concessão da bolsa de estudos.

À minha esposa, Aneliza, que com muito amor me acompanha nessa jornada.

Ao meu orientador, professor Paulo Mazzafera, pela orientação, confiança e entusiasmo que sempre me animou.

Ao Instituto Agrônômico de Campinas, por ceder material de estudo.

Aos pesquisadores, Oliveira Guerreiro Filho, Bernadete Silvarola e Daniel Ramiro, pelas orientações e auxílio nos experimentos.

Aos membros da pré-banca, prof. Carlos A. Colombo, prof. Camilo J. Novello e prof. Ângelo L. Cortelazzo, pelas valiosas contribuições.

Aos professores do departamento de Fisiologia Vegetal, Sodek, Marlene, Cláudia e Jorge, pelo incentivo.

Aos amigos e colegas, Milton, Rúbia, Clara, Laura, Jane, Flávia, Diego, Rose, Divina, Igor, Karina e Mário, pelos bons momentos compartilhados.

Ao pessoal do apoio técnico, Denise, Dulce, Néia, Carlão, Paiola, Lúcia e Seu Domingos, pelo apoio e auxílio.

A todos aqueles que de alguma maneira estiveram presentes.

ÍNDICE

RESUMO	vii
SUMMARY	ix
INTRODUÇÃO GERAL	1
REFEFÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	4
CAPÍTULO I – PURIFICAÇÃO DA ENZIMA POLIFENOLOXIDASE DE FOLHAS DE <i>Coffea arabica</i>	9
Introdução	10
Material e Métodos	12
Resultados e Discussão	18
Referências Bibliográficas	26
CAPÍTULO II – EXPRESSÃO DA ATIVIDADE DE POLIFENOLOXIDASE EM FOLHAS DE CAFEIEIRO E SUA RELAÇÃO COM A RESISTÊNCIA A PRAGAS	30
Introdução	31
Material e Métodos	34
Resultados	41
Discussão	49
Referências Bibliográficas	55
CAPÍTULO III – CONTROLE DA SÍNTESE DE ÁCIDO CLOROGÊNICO EM FOLHAS E EM FRUTOS DE <i>Coffea arabica</i>.....	59
Introdução	60
Material e Métodos	65
Resultados	73
Discussão	87
Referências Bibliográficas	93
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	100

RESUMO

Polifenoloxidase - PFO (EC 1.14.18.1 ou EC 1.10.3.2) é uma enzima de ampla distribuição entre as plantas e catalisa a hidroxilação de monofenóis a *o*-difênóis e a oxidação destes para *o*-diquinonas. Sua função em plantas tem sido relacionada a mecanismos de defesa contra patógenos e pragas. Em cafeeiro, o ácido 5-cafeoilquínico, também conhecido como ácido clorogênico (CGA) é o principal substrato da PFO e ambos, enzima e substrato, estão presentes em quantidades expressivas nos frutos e nas folhas desta planta. O CGA também está relacionado com mecanismos de defesas das plantas e como tal é considerado importante substrato em reações de oxidação, principalmente aquelas mediadas pela PFO. No presente estudo, com objetivo de conhecer características da PFO de folhas do cafeeiro, de averiguar sua ação em mecanismos de defesa nessa planta e de entender fatores ligados à síntese e ao acúmulo de seu principal substrato foram feitas a purificação e caracterização dessa enzima, estudos da expressão de sua atividade, bem como estudos de expressão de enzimas da via de síntese do CGA em cafeeiro. Com o uso de técnicas de precipitação com sulfato de amônio, cromatografias de troca iônica, interação hidrofóbica e exclusão molecular foi possível obter a PFO com alto grau de pureza. A enzima apresentou massa molecular de 40,5 Kda e preferência pelo ácido 5-cafeoilquínico como substrato. Sequências de peptídeos obtidas após digestão da proteína e análise por espectrometria de massas mostraram-se homólogas a seqüências de PFO de várias outras plantas. O nível constitutivo de atividade da PFO observado para quinze genótipos de café variou de 3,8 a 88,0 unidades de atividade/mg de proteína, entretanto não teve relação direta com resistência a pragas e doenças nessa planta. A resistência

ao bicho mineiro foi significativamente relacionada ao nível de compostos fenólicos, entretanto, ácido 5-cafeoilquínico, o principal substrato da PFO em café, não teve relação com essa resistência, sugerindo a importância de outros compostos fenólicos como substratos da PFO. Dano mecânico, tratamento com ácido metiljasmônico, inoculação com esporos do fungo *Hemileia vastatrix* e a infestação com ovos do inseto *Perileucoptera coffeella* levaram a respostas variadas nos níveis de atividade de PFO nos genótipos avaliados. Baseando-se nesses resultados, conclui-se que a ação da PFO na resistência do cafeeiro a pragas e doenças pode estar relacionada ao potencial oxidativo do tecido e não simplesmente uma maior atividade; que o tipo e quantidade de substrato encontrado no tecido podem ser importantes na resistência do cafeeiro e que entre os genótipos pode existir a especialização de mecanismos de resistência envolvendo a ação da PFO. Estudos de expressão por RT-PCR de fenilalanina amônia-liase (PAL), cinamato 4-hidroxiase (C4H), coumarato 3-hidroxiase (C3H), hidroxicinamoil-CoA ligase (4CL) e hidroxicinamoil-CoA:D-quinato hidroxicinamoil transferase (CQT), enzimas da via de síntese do CGA, tiveram sua expressão reduzida à medida que o tecido envelhece. No endosperma foi observado um decréscimo acentuado de expressão no final da maturação dos frutos. Plântulas estioladas obtidas pela germinação de sementes no escuro e transferidas para luz mostraram aumentos significativos no conteúdo de CGA após 24 horas. Esses aumentos foram transientes e coincidiram com a expressão da PAL, C4H, C3H, 4CL e CQT. Os resultados indicam existência de controle da síntese de CGA e a existência de mecanismos de controle da expressão em comum para as cinco enzimas estudadas.

SUMMARY

Polyphenoloxidase - PPO (EC 1.14.18.1 ou EC 1.10.3.2) is an enzyme with broad distribution among plants and catalyzes the hydroxylation of monophenols to *o*-diphenols and the oxidation of these to *o*-diquinones. Its function on plants has been related to defense mechanisms against pathogens and plagues. 5-Caffeoylquinic acid, also known as chlorogenic acid (CGA), is the main PPO substrate in coffee tissues and both, enzyme and substrate are present on substantial quantities in fruits and leaves. CGA is also referred to having connection with plants defense mechanisms and it is also an important substrate on oxidation reactions, mainly those mediated by PPO. Therefore, in order to increase our knowledge on the coffee PPO characteristics, to verify its role in defense mechanisms and also to understand the factors connected to the synthesis of CGA, coffee leaf PPO was purified and characterized regarding kinetic parameters and its activity in leaves of several coffee species exposed or not to pest (leaf miner) and disease (leaf rust). Also studies on the expression of the enzymes of CGA synthesis were carried out. By using ammonium sulfate precipitation followed by chromatographic steps on ionic exchange, hydrophobic interaction and molecular exclusion resins it was possible to purify PPO to homogeneity. The enzyme presented a molecular mass of 40,5 Kda and used 5-cafeoylquinic acid as the preferred substrate. Peptide sequences obtained after digestion of the purified PPO and analysis through mass spectrometry were homologous to PPO sequences of several other plants. The constitutive level of PPO activity observed for 15 coffee genotypes varied from 3,8 to 88,0 units of activity/mg of protein, but did not have a direct relationship with resistance to plagues in this plant. Resistance to leaf miner was significantly related to the level of

phenolic compounds. However, 5-caffeoylquinic acid, the main substrate of PPO on coffee, was not related with resistance, suggesting the importance of other phenolic compounds as PPO substrates. Mechanical damage, treatment with methyljasmonic acid, inoculation with spores from *Hemileia vastatrix* and the infestation with the insect *Perileucoptera coffeella* led to varied results of the PPO activity in the evaluated genotypes. Based on these results, we conclude that the PPO role in the coffee resistance to plagues and diseases might be related to the oxidative potential of the tissue and not only on the PPO activity; that the kind and quantity of PPO substrate found in the tissue might be important for the resistance of the coffee tree and that there may be specific mechanisms of resistance involving PPO action among the genotypes. RT-PCR studies of the expression of phenylalanine ammonia-lyase (PAL), cinnamate 4-hydroxylase (C4H), coumarate 3-hydroxylase (C3H), hydroxycinnamoyl-CoA ligase (4CL) and hydroxycinnamoyl-CoA:D-quinic acid hydroxycinnamoyl transferase (CQT), which code for enzymes of the CGA biosynthetic pathway, showed that the expression of these enzymes decrease with tissue aging. In the endosperm, an evident decrease on the expression was observed in the end of the fruit ripening. Etiolated seedlings obtained by germination of coffee seeds in the dark and transferred into light showed significant increasing on the CGA content after 24 hours. The increase was transient and followed the expression pattern of PAL, C4H, C3H, 4CL and CQT. The results indicate that CGA biosynthesis is coordinately regulated by the expression of the five enzymes.

INTRODUÇÃO GERAL

Polifenoloxidase (PFO) é uma enzima cúprica que usa oxigênio molecular para oxidar *o*-difenóis a *o*-quinonas (atividade difenolase, EC 1.10.3.1). Em algumas plantas também pode hidroxilar monofenóis a *o*-difenóis (atividade monofenolase, EC 1.14.18.1). A PFO apresenta ampla distribuição entre as plantas e, geralmente, é codificada por famílias multigênicas, as quais têm mostrado complexo padrão de expressão. Em batata foram caracterizados cinco genes de PFO com expressão em flores, folhas jovens, tricomas, raízes e tubérculos (Thygesen *et al.*, 1995). Em tomate, pelo menos sete genes foram caracterizados (Newman *et al.* 1993; Thipyapong & Steffens, 1997). Em banana foram isolados quatro cDNAs codificando PFO, os quais mostraram diferentes padrões de expressão em tecidos vegetativos e reprodutivos (Gooding *et al.*, 2001). Em híbrido poplar, três cDNAs de PFO foram isolados e estes também mostraram padrões distintos de expressão (Constabel *et al.*, 2000; Wang & Constabel, 2003; Wang & Constabel, 2004). Em uva, somente um gene de PFO foi encontrado (Dry & Robinson, 1994).

Por estar localizada nos tilacóides, foi sugerido que a PFO exerce papel na fotossíntese, estando ligadas à captura de oxigênio e à fosforilação pseudocíclica (Vaughn *et al.*, 1988). Outros trabalhos sugerem seu envolvimento na biossíntese de pigmentos (Vaughn & Duke, 1984; Steiner *et al.*, 1999; Nakayama *et al.*, 2000); entretanto, está ficando mais claro e aceito que, em algumas plantas, PFO exercem papel fundamental na defesa contra herbívoros e patógenos (Constabel *et al.*, 1995; Li & Steffens, 2002; Thipyapong, *et al.*, 2004; Wang & Constabel, 2004).

O papel antiherbivoria da PFO foi primeiramente demonstrado em tomate por

Felton *et al.* (1989), que mostraram que quinonas geradas pela ação da PFO podem alquilar proteínas da dieta e reduzir o valor nutricional destas para insetos. Outras evidências para o papel da PFO na defesa contra herbívoros vêm da descoberta de ela pode ser induzida por sinalizadores de defesa em plantas como a sistemina e o ácido metiljasmonico, associando a expressão da PFO às vias de sinalização de defesas, bem conhecidas em tomate (Constabel *et al.*, 1995). Recentemente, Wang & Constabel (2004) mostraram que uma maior expressão da PFO em transgênicos de *Populus sp.* aumenta a resistência ao ataque de larvas do inseto *Malacossoma disstria*.

A PFO também tem mostrado ser importante na defesa contra patógenos. Plantas transgênicas de tomate superexpressando a enzima mostraram aumento de resistência à bactéria patogênica *Pseudomonas syringae* (Li & Steffens, 2002), enquanto que sua supressão levou a uma maior susceptibilidade à infestação por essa bactéria (Thipyapong *et al.*, 2004).

Em café, o ácido 5-cafeoilquínico (5-cqa), também conhecido como ácido clorogênico (CGA) é o principal substrato da PFO e ambos, enzima e substrato, estão presentes em quantidades expressivas nos frutos e nas folhas desta planta. O CGA é referido em mecanismos de interação das plantas com outros organismos, podendo ter ligação com mecanismos de resistência ao ataque de herbívoros e patógenos (Felton & Duffey, 1991; Summers & Felton, 1994; Kranthi *et al.*, 2003; Shadle, *et al.*, 2003; Niggeweg *et al.*, 2004) e, como tal, é considerado importante substrato em reações de oxidação, principalmente aquelas mediadas pela PFO, onde são geradas as clorogenoquinonas. O CGA também é importante como substância de reserva durante o crescimento inicial das plantas, onde provavelmente está envolvido nos processos de lignificação (Aerts & Baumann, 1994; Schoch *et al.*, 2001). Recentemente, vem

crescendo o interesse do uso de CGA na saúde humana, sendo ressaltada sua capacidade antioxidante e o efeito antagonista de alguns de seus isômeros a opióides e ao transporte de glicose (Flores *et al.*, 2000; Daglia *et al.*, 2000; Nardine *et al.*, 2002; Paulis *et al.*, 2002; Sotillo & Hadley, 2002; Chun *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2003; Frank *et al.*, 2003).

No café, além do CGA, são encontradas outras formas isoméricas deste ácido e foi observado que durante o desenvolvimento ocorrem grandes alterações nos seus conteúdos em frutos e folhas (Clifford & Kazi, 1987; Menezes & Clifford, 1987; Bertrand *et al.*, 2003). Essas alterações parecem estar associadas a um determinado estágio de desenvolvimento da planta o que sugere a existência de controle dessas alterações. Conhecer mecanismos envolvidos na síntese do CGA seria de grande importância para entendimento do padrão de acúmulo desse composto, bem como para entender sua função nas plantas.

Diante do exposto, este trabalho teve como objetivos purificar e conhecer características da PFO de folhas; estudar a relação da expressão da atividade dessa enzima com resistência a pragas e doenças de folhas do cafeeiro e estudar a expressão de enzimas da via de síntese do CGA em cafeeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aerts, R. J.; Baumann, T. W., 1994. Distribution and utilization of chlorogenic acid in coffee seedlings. *J. Exp. Bot.* 45(273):97-503.
- Bertrand, C.; Noiro, M.; Doubeau, S.; De Kochko, A.; Hamon, S.; Campa, C., 2003. Chlorogenic acid content swap during fruit maturation in *Coffea pseudozanguebariae*. Quantitative comparison with leaves. *Plant Science* 165(6):1355-1361.
- Chun, O. K.; Kim, D.; Moom, H. Y.; Kang, G. H.; Lee, C. Y., 2003. Contribution of individual polyphenolics to total antioxidant capacity of plums. *J. Agric. Food Chem.* 51: 7240-7245.
- Clifford, M. N.; Kazi, T., 1987. The influence of coffee bean maturity on the content of chlorogenic acids, caffeine and trigonelline. *Food Chem.* 25:59-69.
- Constabel, C. P.; Bergey, D. R.; Ryan, C. A., 1995. Systemin activates synthesis of wound-inducible tomato leaf polyphenol oxidase via the octadecanoid defense signaling pathway. *PNAS*, 92:407-411.
- Constabel, C. P., Yip, L., Patton, J. J., Christopher, E., 2000. Polyphenol oxidase from hybrid poplar. Cloning and expression in response to wounding and herbivory. *Plant Physiol.* 124:285-295.
- Daglia, M.; Papetti, A.; Gregotti, C.; Berte, F.; Gazzani, G., 2000. *In vitro* antioxidant and *ex vivo* protective activities of green and roasted coffee. *J. Agric. Food Chem.* 48(5):1449-1454.
- Dry, I. B.; Robinson, S. P., 1994. Molecular cloning and characterization of grape berry polyphenol oxidase. *Plant Mol. Biol.* 26:495-502.

- Felton, G. W.; Donato, K.; Del Vecchio, R. J.; Duffey, S.S., 1989. Activation of plant polyphenol oxidases by insect feeding damage reduces nutritive quality of foliage for noctuid herbivores. *J. Chem. Ecol.* 15(12):2667-2694.
- Felton, G. W.; Duffey, S.S., 1991. Reassessment of the role of gut alkalinity and detergency in insect herbivory. *J. Chem. Ecol.* 17(9):1821-1836.
- Flores, G. B.; Andrade, F.; Lima, D. R., 2000. Can coffee help fighting the drug problem? Preliminary results of a Brazilian youth drug study. *Acta Pharm. Sin.* 21(12):1057-1216.
- Frank, J.; Kamal-eldin, A.; Razdan, A.; Lundh, T.; Vessby, B., 2003. The dietary hydroxycinnamate caffeic acid and its conjugate chlorogenic acid increase vitamin E and cholesterol concentrations in sprague-dawley rats. *J. Agric. Food Chem.* 51:2526-2531.
- Gooding, P. S.; Bird, C.; Robinson, S.P., 2001. Molecular cloning and characterisation of banana fruit polyphenol oxidase. *Planta*, 213 (5): 748-757.
- Kranthi, S.; Kranthi, K. R.; Wanjari, R. R., 2003. Influence of semilooper damage on cotton host-plant resistance to *Helicoverpa armigera* (Hub). *Plant Science* 164(2):157-163.
- Lee, K. W.; Kim, Y. J.; Kim, D.; Lee, H. J.; Lee, C. Y., 2003. Major phenolics in apple and their contribution to the total antioxidant capacity. *J. Agric. Food Chem.* 51:6516-6520.
- Li, L.; Steffens, J. C., 2002. Overexpression of polyphenol oxidase in transgenic tomato plants results in enhanced bacterial disease resistance. *Planta* 215:239-247.
- Menezes, H. C.; Clifford, M. N., 1987. The influence of stage of maturity and processing

- method on the relation between the different isomers of caffeoylquinic acid in green coffee beans. In: 12th Int. Scientific Colloquium on Coffee, Montreux. ASIC, Paris. 377-381p.
- Nakayama, T.; Yonekura-Sakakibara, K.; Sato, T.; Kikuchi, S.; Fukui, Y.; Fukuchi-Mizutani, M.; Ueda, T.; Nakao, M.; Tanaka, Y.; Kusumi, T.; Nishino, T., 2000. Aureusidin synthase: a polyphenol oxidase homolog responsible for flower coloration. *Science* 290, 1163–1166.
- Nardini, M.; Cirillo, E.; Natella, F.; Scaccini, C., 2002. Absorption of phenolic acids in humans after coffee. *J. Agric. Food Chem.* 50:5735-5741.
- Newman, S. M.; Eannetta, N. T.; Yu, H.; Prince, J. P.; Vicente, M. C.; Tanksley, S. D. Steffens, J. C., 1993. Organisation of the tomato polyphenol oxidase gene family. *Plant Mol. Biol.* 21:1035-1051.
- Niggeweg, R.; Michael, A.; Martin, C., 2004. Engineering plants with increased levels the antioxidant chlorogenic acid. *Nat. Biotech.* 22(6):746-754.
- Paulis, T.; Schmidt, D. E.; Bruchey, A. K.; Kirby, M. T.; McDonalk, M. P.; Commers, P.; Lovinger, D. M.; Martin, P. R., 2002. Dicinnamoylquinides in roasted coffee inhibit the human adenosine transporter. *Eur. J. Pharm.* 442:215-223.
- Schoch, G.; Goepfert, S.; Morant, M.; Hehn, A.; Meyer, D.; Ullmann, P.; Werck-Reichhart, D., 2001. CYP98A3 from *Arabidopsis thaliana* is a 3'-hydroxylase of phenolic esters, a missing link in the phenylpropanoid pathway. *J. Biol. Chem.* 276(39):36566-36575.
- Shadle, G. L.; Wesley, S. V.; Korth, K. L.; Chen, F.; Lamb, C.; Dixon, R. A., 2003. Phenylpropanoid compounds and disease resistance in transgenic tobacco with altered expression of l-phenylalanine ammonia-lyase. *Phytochemistry* 64:153–

- Sotillo, D. V. R.; Hadley, M., 2002. Chlorogenic acid modifies plasma and liver concentrations of: cholesterol, triacylglycerol, and minerals in (fa/fa) Zucker rats. *J. Nut. Biochem.* 13(12):717-726.
- Steiner, U.; Schliemann, W.; Böhm, H.; Strack, D., 1999. Tyrosinase involved in betalain biosynthesis of higher plants. *Planta* 208:114-124.
- Summers, C. B.; Felton, G. W., 1994. Prooxidant effects of phenolic-acids on the generalist herbivore *Helicoverpa Zea* (Lepidoptera, Noctuidae) – Potential mode of action for phenolic-compounds in plant anti-hervivore chemistry. *Ins. Biochem. Mol. Biol.* 24(9):943-953.
- Thipyapong, P.; Steffens, J.C., 1997. Tomato polyphenol oxidase. Differential response of the polyphenol oxidase F promoter to injuries and wound signals. *Plant Physiol.* 115:409–418.
- Thipyapong, P.; Hunt, M. D.; Steffens, J. C., 2004. Antisense downregulation of polyphenol oxidase results in enhanced disease susceptibility. *Planta*, 220:105-117.
- Thygesen, P. W.; Dry, I. B.; Robinson, P. S., 1995. Polyphenol oxidase in potato: a multigene family that exhibits differential expression patterns. *Plant Physiol.* 109:525-531.
- Vaughn, K. C.; Duke, S. O., 1984. Function of polyphenol oxidase in higher plants. *Physiol. Plant.* 60:106-112.
- Vaughn, K. C.; Lax, A. R.; Duke, S. O., 1988. Polyphenol oxidase: the chloroplast oxidase with no established function. *Physiol. Plant.* 72:659-665.
- Wang, J. H.; Constabel, C. P., 2003. Biochemical characterization of two

differentially expressed polyphenol oxidases from hybrid poplar, *Phytochemistry* 64(1):115-121.

Wang, J. H.; Constabel, C. P., 2004. Three polyphenol oxidases from hybrid poplar are differentially expressed during development and after wounding and elicitor treatment . *Physiol. Plant.* 122: 344–353.

CAPÍTULO I

Purificação da enzima polifenoloxidase de folhas de *Coffea arabica*

1. INTRODUÇÃO

Polifenoloxidase (PFO; EC 1.10.3.2) é uma enzima de ampla distribuição entre as plantas que catalisa a hidroxilação de monofenóis a *o*-difenóis e a oxidação de *o*-difenóis a *o*-diquinonas (Mayer & Harel, 1979). Geralmente são codificadas por mais de um gene (Newman *et al.*, 1993; Thygesen *et al.*, 1995; Haruta *et al.*, 2001; Zhou *et al.*, 2003) e esses genes podem apresentar padrões diferenciados de expressão, com diferenças temporais e espaciais (Thipyapong & Steffens, 1997; Thygesen *et al.*, 1995; Gooding *et al.*, 2001; Wang & Constabel, 2003). Sua função fisiológica nas plantas ainda não foi esclarecida, entretanto, sua ação tem sido relacionada à biossíntese de pigmentos (Vaughn & Duke, 1984; Steiner *et al.*, 1999; Nakayama *et al.*, 2000), à captura de oxigênio molecular no cloroplasto (Vaughn *et al.*, 1988) e a mecanismos de defesa das plantas (Bashan *et al.*, 1985; Constabel *et al.*, 1992; Li & Steffens, 2002). Devido às propriedades das quinonas e das reações em que elas participam, a PFO tem grande importância para a indústria alimentícia, sendo considerada responsável pela depreciação e pela redução do valor nutricional de produtos de origem vegetal.

Em café, a PFO tem sido correlacionada com qualidade da bebida (Amorim & Silva, 1968; Amorim & Amorin, 1977; Amorim & Melo, 1991) e alguns estudos abordaram o seu envolvimento em mecanismos de resistência ao ataque de patógenos e herbívoros (Maxemiuc-Nacache & Dietrich, 1985; Mazzafera *et al.*, 1989; Ramiro, 2003).

Sua caracterização foi feita em extratos parcialmente purificados de folhas e frutos do cafeeiro (Draetta & Lima, 1976; Mazzafera & Robinson, 2000) e, de

maneira semelhante ao observado para outras plantas, foram observadas formas ativas da PFO com diferentes massas moleculares. Em várias plantas onde a enzima foi purificada e caracterizada, sua massa molecular tem sido determinada em 40-45 Kda ou 60-65 Kda.

De acordo com Robinson & Dry (1992), a PFO é sintetizada como uma pré-proteína, incluindo um peptídeo trânsito que posteriormente é removido por hidrólise. Koussevitzky *et al.* (1998) demonstraram que uma peptidase presente no estroma é responsável pela clivagem do peptídeo trânsito da PFO durante o transporte dessa proteína para o cloroplasto. A síntese da PFO na forma de uma pré-proteína tem sido usada como explicação pelo aparecimento de bandas de atividade dessa proteína com diferentes massas moleculares (Robinson & Dry, 1992; Escribano *et al.*, 1997; Constabel *et al.*, 2000; Gandia-Herrero *et al.*, 2004). A ocorrência de múltiplas bandas de atividade da PFO também tem sido associada à presença de isoformas (Wang & Constabel, 2003) e a modificações ocorridas durante a extração da enzima, tanto por proteólise, como por associação da mesma com outras substâncias (Ho, 1999; Gooding *et al.*, 2001).

A PFO ainda tinha sido purificada a partir de folhas do cafeeiro. Estudos com extratos semi purificados mostraram bandas de atividade com aproximadamente 45 e 67 Kda, sugerindo que a PFO também existe na forma de uma pré-proteína em folhas dessa planta (Mazzafera & Robinson, 2000).

Neste estudo, foram feitas a purificação e caracterização da PFO objetivando maior conhecimento das suas propriedades em folhas do cafeeiro.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material Vegetal e Reagentes

Para purificação da polifenoloxidase foram utilizadas folhas recém colhidas do primeiro e segundo par a partir da gema apical coletados em planta adulta de *Coffea arabica* cv. Mundo Novo.

Foram utilizados reagentes das marcas Sigma e/ou Merk, grau laboratório.

2.2 Extração e atividade de PFO

A extração e os ensaios de atividade da PFO foram feitos segundo metodologia descrita por Mazzafera & Robinson (2000). O material vegetal foi triturado em Polytron em meio de extração contendo 100 mM de fosfato de sódio pH 7, ácido ascórbico 2% , 5 mM de dithioerythritol (DTE), 10 % de PVPP e 5 mM de PMSF (Phenylmethylsulfonyl Fluoride), na proporção de 1 g de folha para 5 mL de meio de extração. Em seguida o homogenizado foi filtrado em gaze, centrifugado a 22.000 x g, a 4 °C por 15 minutos e o sobrenadante foi considerado o extrato bruto.

A atividade da PFO foi determinada pelo consumo de oxigênio medido num eletrodo de oxigênio equipado com um controlador (Marca Hansatech - modelo CB1D) a 25°C. A mistura de reação, com volume final igual a 1,0 mL, continha a enzima, 1 mM de ácido 5-cafeoilquínico (5-cqa), 3,5 mM de SDS e 50 mM de fosfato de sódio pH 6,0. A reação foi iniciada com a adição de 5-cqa e a taxa de consumo de oxigênio no primeiro minuto foi usada para calcular a atividade da enzima.

A atividade da PFO também foi visualizada após eletroforese em gel de poliacrilamida a 12%, contendo 0,1% de SDS (SDS-PAGE). O gel foi lavado com tampão fosfato de sódio 50 mM pH 6,0 por 2 minutos e, em seguida, imergido no

mesmo tampão contendo 2 mM de 5-cqa e 0,5 mM de *p*-fenilenodiamino. A reação foi paralisada após 5 minutos e registou-se a imagem do gel.

2.3 Purificação

A purificação da PFO foi feita a partir de 200 mL de extrato bruto obtido conforme descrito no item 2.2. Esta fração foi submetida à precipitação a baixa temperatura com sulfato de amônio 80% de saturação e o precipitado obtido após centrifugação foi dissolvido em 20 mL de tampão fosfato 50 mM, pH 6,0 (tampão de eluição -TE) e eluído numa coluna Sephadex G25 (10 x 2,8 cm) equilibrada com o mesmo tampão.

Uma fração de 20 mL coletada após a eluição da coluna G25, foi adicionada numa coluna DEAE-Celulose (10 x 2,5 cm), coletando-se toda a fração protéica não retida. O volume total dessa fração foi então adicionado numa coluna S-Sepharose (16 x 1,0 cm) previamente equilibrada com NaCl 1,0 M e lavada com TE. Novamente coletou-se toda a fração protéica não retida e em seguida foi adicionado sulfato de amônio à mesma fração até atingir a concentração de 1,0 M e aplicou-se a mistura numa coluna Phenyl Sepharose (12 x 1,5 cm) anteriormente equilibrada com sulfato de amônio 1,0 M. A coluna foi então lavada com 100 mL de TE contendo sulfato de amônio 1,0 M e em seguida as proteínas retidas foram eluídas num gradiente decrescente de sulfato de amônio (1 a 0 M) diluído em TE, com fluxo de 2 mL/minuto. Foram coletadas frações de 6 mL e em cada fração monitorada a atividade da PFO.

Cinco mL da fração anterior com maior atividade da PFO foram aplicados numa coluna Sephacryl S-200 26/60 HR (Pharmacia) e eluídos com TE contendo 150

mM de NaCl com fluxo constante de 0,8 mL/minuto. A atividade da PFO foi monitorada em cada fração coletada e em seguida fez-se reação de atividade da PFO em gel para as frações apresentando atividade. Baseado no bandejamento selecionou-se uma fração com atividade apenas numa banda com massa molecular aproximada de 45 Kda. Essa sendo considerada a fração purificada da PFO. A concentração de proteínas nas frações de cada etapa foi determinada pelo método de Bradford (1976). Como padrão utilizou-se albumina do soro bovino (BSA).

2.4 Caracterização da PFO purificada

2.4.1 Massa molecular e Km de substrato

A massa molecular aparente da PFO purificada foi estimada em comparação com marcadores de massa molecular (MM) após eletroforese SDS-PAGE em condições semidesnaturantes e desnaturantes. Em condições semidesnaturantes, as amostras da proteína na sua forma nativa foram aplicadas no gel contendo 0,1% de SDS. Em condições desnaturantes, foi feito o mesmo procedimento, entretanto, as amostras foram previamente fervidas em tampão contendo β -mercaptoetanol (0,5%) e SDS (0,5%).

A massa molecular também foi estimada através de uma curva construída pela calibração da coluna sephacryl S-200 com padrões protéicos de fosforilase b (MM=97 Kda), albumina (MM=66 Kda), ovalbumina (MM=45 Kda) e anidrase carbônica (MM=30 Kda).

Para determinação do Km para substratos e para realização de ensaios de inibição da PFO, foram feitas reações de atividade, medidas pelo consumo de oxigênio conforme descrito anteriormente. Como substratos foram utilizados 5-cqa,

4-metilcatecol e ácido caféico.

2.4.2 Seqüência de aminoácidos

A fração de maior atividade obtida no último passo da purificação foi dessalinizada em mini-coluna PD 10 (G25) (Pharmacia), concentrada em speed-vac (Marca Savant, modelo SC110) e submetida à eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS. Após o gel ser corado com Coomassie blue, a banda foi recortada do gel e então feita a redução, a alquilação e a digestão da proteína para posterior sequenciamento dos peptídeos conforme procedimentos a seguir:

1) lavagem do gel: fragmentos do gel contendo as bandas com aproximadamente $1,0 \text{ mm}^2$ foram colocados em tubo eppendorf e lavou-se com NH_4HCO_3 100 mM. Em seguida adicionou-se 200 μL de acetonitrila 50% diluída em NH_4HCO_3 50 mM, agitou-se o tubo e incubou-se por 10 minutos. Este último procedimento foi repetido até o gel ficar claro e em seguida lavado por 5 minutos com 200 μL de acetonitrila 100%, sob agitação periódica;

2) redução da proteína: após lavagem, os fragmentos de gel foram secados em speed-vac e a eles adicionados 50 μL de DTT, 10 mM diluído em NH_4HCO_3 100 mM sob agitação e o tubo foi incubado por 60 minutos a 60°C . Em seguida o tubo foi resfriado e o excesso da solução de DTT, removido;

3) alquilação da proteína: adicionou-se ao tubo 50 μL de iodoacetamida 50 mM diluída em 100 mM NH_4HCO_3 , agitou-se e incubou-se no escuro por 45 minutos. Após este tempo removeu-se o excesso de iodoacetamida, lavou-se o gel com NH_4HCO_3 100 mM por 5 minutos e em seguida lavou-se o gel por 2 vezes com acetonitrila 50% diluída em NH_4HCO_3 50 mM. O gel foi então desidratado

adicionando-se 100 μ L de acetonitrila 100% e incubando-se por 5 minutos. Após isto, removeu-se a acetonitrila e secou-se o gel em speed-vac;

4) digestão da proteína: adicionou-se tripsina (marca Sigma) (12.5 ng de tripsina/ μ L de NH_4HCO_3 50mM) o suficiente para cobrir o gel e incubou-se por 30 minutos a 4°C. Em seguida o tubo foi centrifugado brevemente e deixou-se digerir por 12 horas a 37°C.

Após a digestão, os peptídeos foram extraídos do gel por três lavagens sucessivas com solução contendo acetonitrila 50% e ácido fórmico 2%. Em cada lavagem, o tubo foi agitado, centrifugado brevemente e sonificado por 5 minutos. Os sobrenadantes de cada lavagem foram juntados e o volume final foi reduzido em speed-vac para aproximadamente 10 μ L.

As amostras contendo os peptídeos foram enviadas ao Laboratório de Espectrometria de Massas da Fundação André Tozello, onde foi feita a separação e o sequenciamento dos peptídeos em aparelho espectrômetro de massas. Uma amostra da proteína pura também foi enviada para certificação da pureza e determinação da massa molecular.

Os espectros de massas foram obtidos usando um espectrômetro de massas híbrido tipo Q-TOF (Q-TOF Ultima – Micromass, Manchester, Reino Unido) equipado com uma fonte Zspray operando no modo íon positivo. As condições de ionização usadas incluíram tensão capilar de 2.3 kV, tensão do cone e lente RF1 de 30 V e 100 V, respectivamente, e energia de colisão de 10 eV. A temperatura da fonte foi de -70°C e o gás do cone foi N_2 no fluxo de 80 L/h. Foi usado gás argônio para refrigerar a colisão e para a fragmentação dos íons na célula de colisão. A calibração externa foi feita com iodeto de sódio numa escala de massas de 50 a 3000 m/z. Todos os espectros foram

adquiridos com o analisador TOF no modo V (TOF $kV=9.1$) e com tensão do MCP ajustada em 2150 V.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Purificação da PFO

Através do uso de precipitação com sulfato de amônio e cromatografias de troca iônica, interação hidrofóbica e de exclusão molecular, foi possível obter a PFO purificada. Na tabela 1 é apresentado um resumo da purificação.

Tabela 1: Resumo da purificação da polifenoloxidase de folhas de cafeeiro A=Volume, B=Proteína, C=Atividade, D=Atividade total, E=Atividade específica, F=Fator de purificação e G=Recuperação.

Passo	A mL	B mg/mL	C Un/mL	D Un	E Un/mg	F Fator	G %
Extrato Bruto	250	15,3	13200	3300000	862,7	1,0	100%
SA80% / G25	20	94,4	154000	3080000	1631,3	1,9	93,3%
DEAE-Celulose	60	3,8	41800	2508000	11000,0	12,7	76%
S-Sepharose	70	2,8	16500	1155000	5892,2	6,8	35%
Phenyl Sepharose	6	2,3	42900	257400	18652,1	21,6	7,8%
Sephacryl S-200	5	0,3	9900	49500	33000,0	38,2	1,5%

No procedimento, a coluna DEAE-celulose foi utilizada sem ativação de suas cargas, mostrando, dessa forma, ser bastante eficiente para remoção de pigmentos e grande parte das proteínas. Em testes preliminares esta foi a melhor maneira encontrada para se obter uma fração límpida e com alto percentual de recuperação da atividade da PFO. A coluna S-sepharose mostrou ser bastante eficiente na retenção de formas ativas da PFO com massas moleculares abaixo de 40 kda, comumente encontradas em extratos brutos e semi purificados de folhas de café (figura 1, linhas 4 e 5). A coluna Phenyl Sepharose reteve 100% da atividade aplicada na coluna. Nesta coluna, formas da PFO com massa molecular acima de 40 kda foram eluídas em um único pico (figura 2).

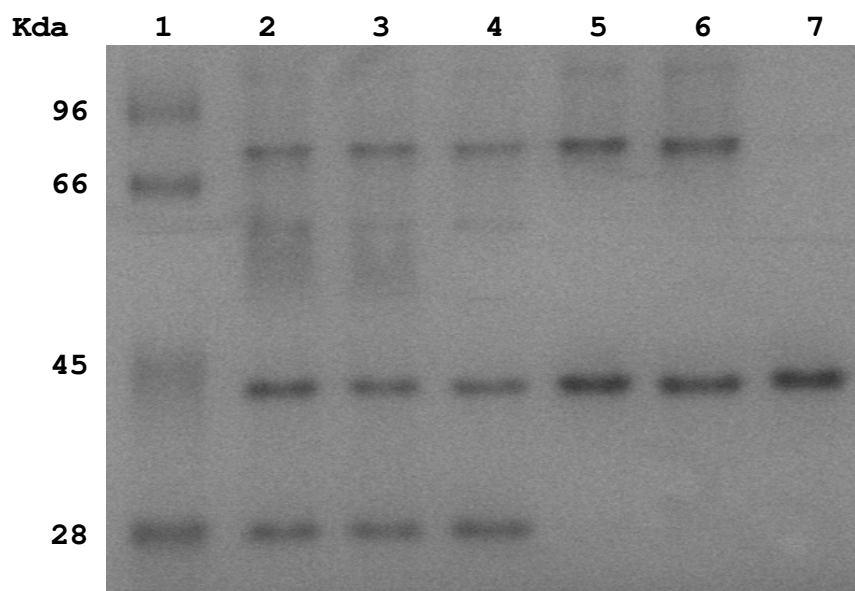


Figura 1: SDS-PAGE semi-denaturante, revelado para atividade da polifenoloxidase de folhas de cafeeiro. Colunas 1=Marcador de massa molecular, 2=Extrato Bruto, 3=Precipitado com SA 80%, 4=Fração eluída da DEAE-Sepharose, 5=Fração eluída da S-sepharose, 6=Fração eluída da coluna Phenyl Sepharose e 7=Fração 39 da coluna Sephacryl S-200.

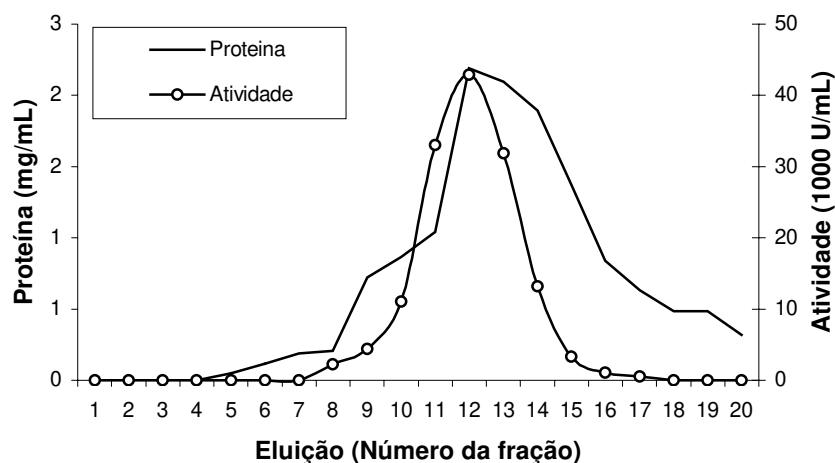


Figura 2: Perfil de eluição de proteínas e de atividade da PFO na coluna phenyl sepharose. Fluxo de 2,0 mL/min.

Na coluna sephacryl S-200 as formas da PFO foram eluídas em frações

separadas (figura 3), sendo possível recuperar, na fração de melhor resolução, 1,5% da atividade total da PFO com fator de purificação igual a 38,2 (tabela 1). Este valor é de fato muito maior, uma vez que 40% da atividade total foi recuperada na fração retida na coluna S-sepharose, a qual continha formas da PFO com massas menores que 40 Kda (dados não mostrados). Pode-se pensar num valor maior ainda quando se considera a presença de formas da PFO com massa acima de 45 Kda.

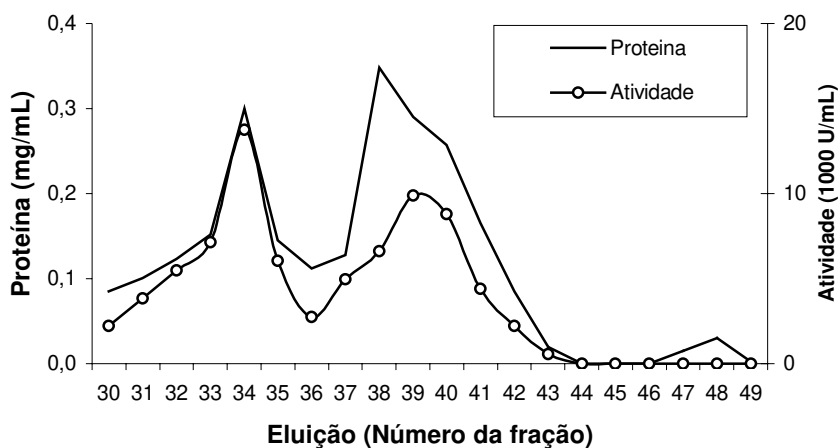


Figura 3: Perfil de eluição de proteínas e de atividade da *PFO* de folhas do cafeeiro na coluna Sephacryl S-200. Fluxo de 0,8 mL/min.

A atividade da PFO foi acompanhada em todas as etapas, tanto pela medição através do consumo de oxigênio, como pelo registro do padrão de bandas de atividade em gel de poliacrilamida semidesnaturante. Este procedimento serviu como orientação na seleção da forma da PFO a ser purificada.

O padrão de bandas de atividade em cada etapa da purificação está

representado na figura 1. Como pode ser observado na figura 1, neste estudo, também foram observadas formas da PFO com diferentes massas moleculares. O acompanhamento da atividade da PFO, em gel de poliacrilamida, após cada etapa do processo de purificação, entretanto, permitiu a seleção de uma forma com massa molecular entre 40 e 45 Kda para ser purificada. Em várias plantas onde a PFO foi purificada a principal forma ativa da PFO apresentou massa molecular em torno 40-45 Kda (Robinson & Dry, 1992; Escribano *et al.*, 1997; Constabel *et al.*, 2000; Gandia-Herrero *et al.*, 2004). A ocorrência de múltiplas bandas de atividade da PFO tem sido associada à presença de isoformas da enzima (Wang & Constabel, 2003), a modificações ocorridas durante sua extração, tanto por proteólise, quanto por sua associação com outras substâncias (Ho, 1999; Gooding *et al.*, 2001) e ao processo de ativação da enzima envolvendo proteólise (Koussevitzky *et al.*, 1998; Robinson & Dry, 1992). Modificações durante a extração parecem não ser a causa das múltiplas bandas de atividade aqui observadas uma vez que o uso de inibidores de proteases e de protetores não impediu o aparecimento dessas bandas.

3.2 Caracterização da PFO

3.2.1 Massa molecular

A forma da PFO escolhida para purificação apresentou massa molecular aparente de 43 Kda, determinada em gel SDS-PAGE semi-denaturante (figura 4B, coluna 6). Em condições desnaturantes, essa mesma forma apresentou massa molecular aparente de aproximadamente 60 Kda (figura 4A, coluna 6). A massa molecular aparente determinada através de uma curva de calibração da coluna Sephacryl S-200, foi de 44 Kda. A análise em espectrômetro de massas resultou

numa massa molecular de 40,5 Kda (figura 5).

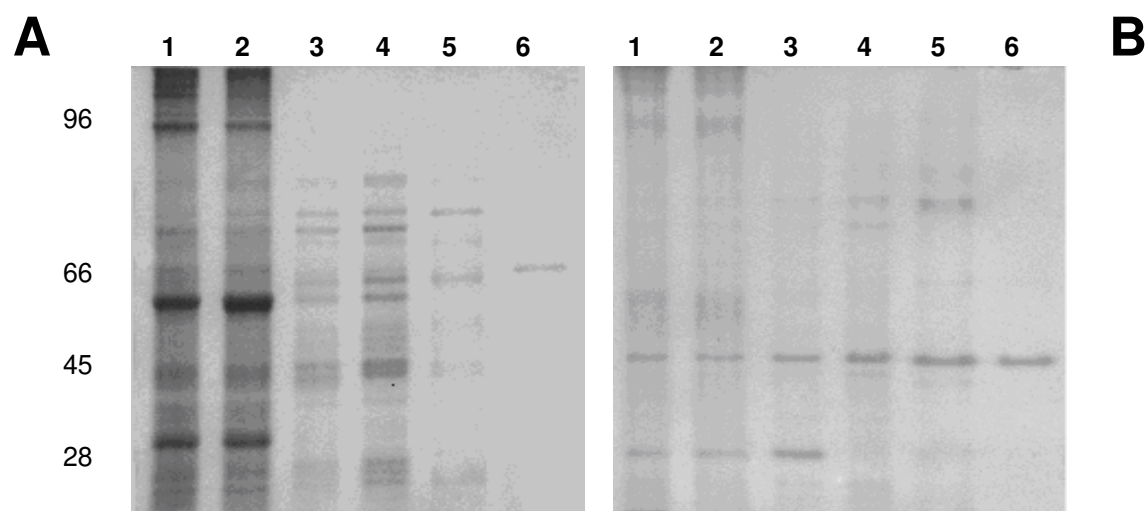


Figura 4: SDS-PAGE denaturante corado com Coomassie blue (A) e SDS-PAGE semi-denaturante corado com Coomassie blue após revelado para atividade da polifenoloxidase em folhas de cafeeiro (B). Colunas 1=Extrato Bruto, colunas 2=Precipitado com SA 80%, colunas 3=Fração eluída da DEAE-Sepharose, colunas 4=Fração eluída da S-Sepharose, colunas 5=Fração da coluna Phenyl Sepharose, colunas 6=Fração da coluna Sephacryl.

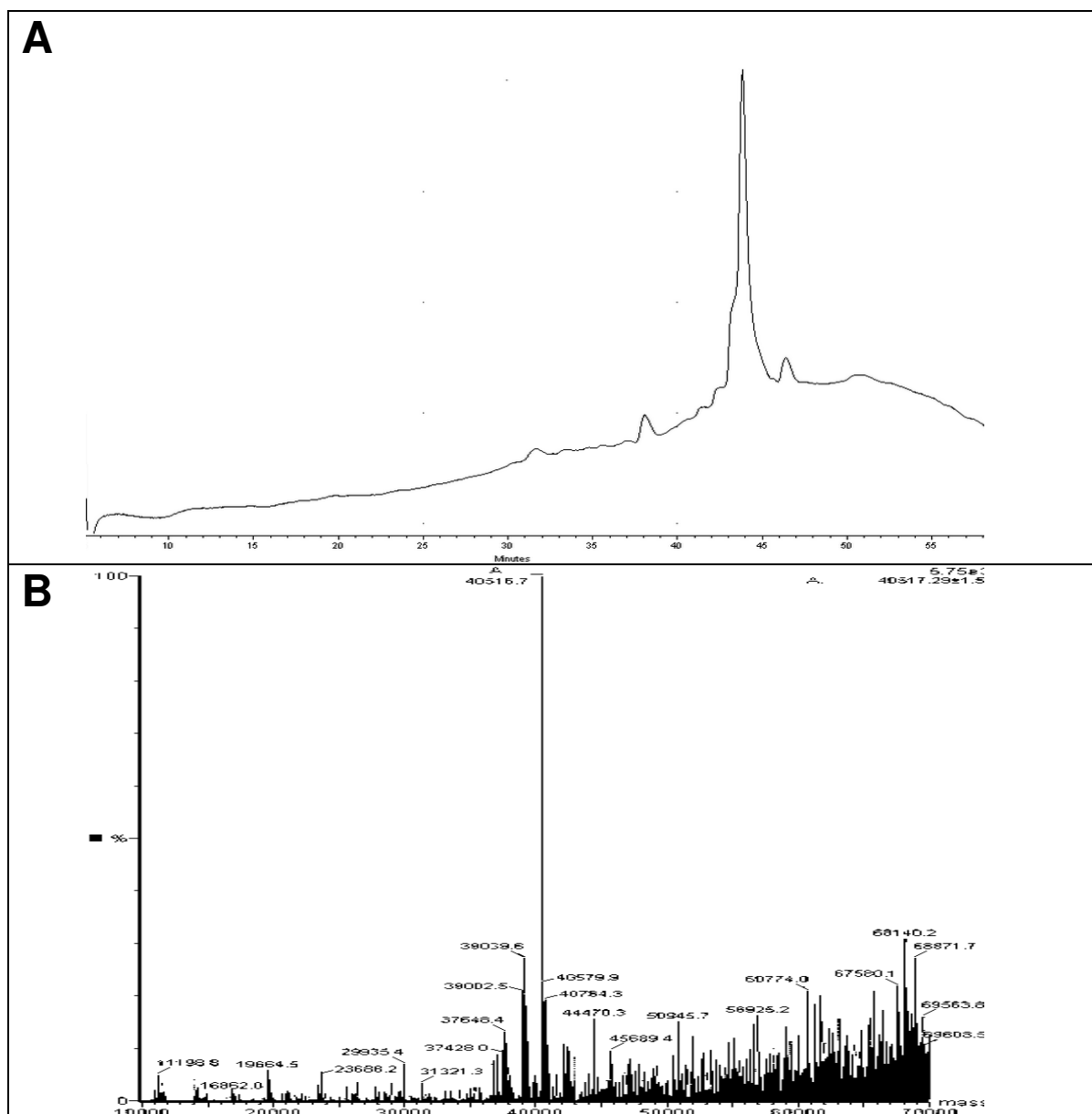


Figura 5: Cromatograma (HPLC) da proteína polifenoloxidase purificada de folhas do cafeeiro (A) e espectro de massas da corrida em HPLC aos 44 minutos (B).

A diferença no valor da massa molecular observada entre a proteína nativa e denaturada provavelmente se deve a presença de resíduos de cisteína em sua estrutura. Robinson & Dry (1992) demonstraram que a presença desses resíduos na estrutura da PFO pode alterar sua mobilidade em gel, provavelmente pela formação de pontes de dissulfeto que são rompidas durante a denaturação.

3.2.2 Afinidade para substratos

A afinidade para substratos foi determinada para o ácido 5-cafeoilquínico, para 4-metil catecol e para o ácido caféico. O K_m determinado para esses compostos foi de 1,5 mM, 1,92 mM e 5,34 mM, respectivamente.

Vários estudos têm demonstrado que a PFO pode oxidar vários substratos com diferenças de afinidade dependendo da planta estudada e/ou da isoforma da enzima. Em café o ácido 5-cafeoilquínico pode representar cerca de 70% do total de fenóis presentes (Clifford, 1985) e, em folhas de *C. arábica*, pode atingir cerca de 1% da massa seca (vide capítulo 3, figura 10). Portanto é possível que este fenol seja o principal substrato da PFO de folhas do cafeeiro.

3.2.3 Seqüência de aminoácidos

No sequenciamento da proteína purificada foram obtidas seqüências de 4 peptídeos, sendo: QPNGEDMGNFYSAGR, EVPDPDWLNSSFIFYDENAQPVR, MGYLYQK e VDLPWVK. Com o uso dessas seqüências em busca (Blast-P) no banco NCBI (National Center for Biotechnology Information – <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) obteve-se homologia com PFO de *Populus balsamifera* subsp. *trichocarpa* x *Populus deltóides* (acesso -gi|51872305|gb|AAU12257.1|, *Triticum aestivum* (acesso - gi|46946552|gb|AAT06526.1|, *Malus domestica* (acesso - gi|2293360|dbj|BAA21677.1|, *Pyrus pyrifolia* (acesso - gi|15487290|dbj|BAB64530.1| e outras.

O alinhamento das seqüências dos peptídeos com a seqüência deduzida de aminoácidos do clone COPO3 da PFO de *C. arábica* (Mazzafera & Robinson, dados não publicados) revelou uma alta identidade (figura 6).

```

Sequência -----QPNGEDMGNFYSAGR----- 15
COPO3      AGDEPNAFAGAGSIEASPHIP IHRWVGDP RQPNGEDLGNFY SAGRDI VFYSHHANVDRMW 60
              *****.******

Sequência -----EVPDPDWLNSSFIFYDENAQPVR-----MGYLYQKVDLPWVK- 52
COPO3      TIWQQLGGRKEVPDPDWLNSSFIFYDENAQPVRVKVRDSFSNDRMGYIYEKVDIPWLKN 120
              *****.******

Sequência -----
COPO3      KPVARVRKSRVALTSGAPPADKVFPGLDKIVKVLVKRPKLSRSKRQKEDEEERLVVYGI 180

Sequência -----
COPO3_      EFSMDKYVKFDVFINDEDDNPNDFAKSEYVGS 212

```

Figura 6: Alinhamento (Clustalw – 1.82) das seqüências obtidas com o clone COPO3 de PFO. * indica coincidência de resíduo de aminoácido.

Este resultado indica que a PFO purificada provavelmente corresponde ao gene COPO3. Estudos posteriores de expressão desse gene poderão revelar sua importância para plantas do cafeeiro, inclusive sua relação com mecanismos de defesa da planta contra o ataque de herbívoros e patógenos. Estudos recentes utilizando outras plantas demonstraram de modo direto a importância da PFO nestes mecanismos (Li & Steffens, 2002; Thipyapong *et al.*, 2004).

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Amorim, H. V.; Silva, D. M., 1968. Relationship between the polyphenol oxidase activity of coffee beans and the quality of beverage. *Nature* 219:9381-9382.
- Amorim, H. V.; Amorim, V. L., 1977. Coffee enzymes and coffee quality. In: Ory, R. L.; St Angelo, A. J.; (Eds.), *Enzymes in food and beverages processing*, ACS Symposium Series, 47. American Chemical Society, PP.27-56.
- Amorim, H. V.; Melo, M., 1991. Significance of enzymes in non-alcoholic coffee beverage. In: Fox, P. F. (Ed.), *Food Enzymology*, vol. 2. Elsevier, London. 189-209p.
- Bashan, Y.; Okon, Y.; Heni, Y., 1985. Peroxidase, polyphenoloxidase, and phenol in relation to resistance against *Pseudomonas syringae* p. tomato in tomato plants. *Can. J. Bot.* 65:366-372.
- Bradford, M. M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.
- Clifford, M. N., 1985. Chlorogenic acids. In: Clarke, R. J.; Macrae, R. eds. *Coffee*. Vol. 1. Chemistry. London: Elsevier. 153-202p.
- Constabel, C. P.; Bergey, D. R.; Ryan, C. A., 1992. Systemin activates synthesis of wound-inducible tomato leaf polyphenol oxidase via the octadecanoid defense signaling pathway. *PNAS* 407-411.
- Constabel, C. P.; Yip, L.; Patton, J. J.; Christopher, M. E., 2000. Polyphenol oxidase from hybrid poplar. Cloning and expression in response to wounding and herbivory. *Plant Physiol.* 124:285–295.

- Draetta, I. S.; Lima, D. C., 1976. Isolamento e caracterização das polifenoloxidasas do café. *Coletânea do Instituto de Tecnologia de Alimentos*, 7:13-28.
- Escribano, J.; Cabanes, J.; Garcia-Carmona, F., 1997. Characterization of latent polyphenol oxidase in table beet: effect of sodium dodecyl sulphate. *J. Sci. Food Agric.* 73: 34-38.
- Gandia-Herrero, F.; Garcia-Carmona, F.; Escribano, J., 2004. Purification and characterization of a latent polyphenol oxidase from beet root (*Beta vulgaris* L.). *J. Agric. Food Chem.* 52:609-615 609.
- Gooding, P. S.; Bird, C.; Robinson, S.P., 2001. Molecular cloning and characterisation of banana fruit polyphenol oxidase. *Planta* 213 (5): 748-757.
- Haruta, M.; Pederson, J. A.; Constabel, C. P., 2001. Polyphenol oxidase and herbivore defense in trembling aspen (*Populus tremuloides*): cDNA cloning, expression, and potential substrates. *Physiol. Plant.* 12: 552–558.
- Ho, K. K., 1999. Characterization of polyphenol oxidase from aerial roots of an orchid, Aranda 'Christine 1300'. *Plant Physiol. Biochem.* 37:841–848.
- Koussevitzky, S.; Neèman, E.; Sommer, A; Steffens, J. C.; Harel, E., 1998. Purification and properties of a novel chloroplast stromal peptidase. Processing of polyphenol oxidase and other imported precursors. *J. Biol. Chem.* 273:27067-27069.
- Li, L.; Steffens, J. C., 2002. Overexpression of polyphenol oxidase in transgenic tomato plants results in enhanced bacterial disease resistance. *Planta* 215:239-247.
- Maxemiuc-Nacache, V.; Dietrich, S. M. C., 1985. Changes in phenols and oxidative enzymes in resistant and susceptible *Coffea arabica* inoculated with *Hemileia*

- vastatrix* (Coffee rust). *Rev. Bras. Bot.* 8:185-190.
- Mayer, A. M.; Harel E., 1979. Polyphenol oxidases in plants. *Phytochemistry* 18:193-215.
- Mazzafera, P.; Gonçalves, W.; Fernandes, J. A. R., 1989. Fenóis, peroxidase e polifenoloxidase na resistência do cafeeiro a *Meloidogyne incognita*. *Bragantia* 48:131-142.
- Mazzafera, P.; Robinson, S. P., 2000. Characterization of polyphenol oxidase in coffee. *Phytochemistry* 55:285–296.
- Nakayama, T.; Yonekura-Sakakibara, K.; Sato, T.; Kikuchi, S.; Fukui, Y.; Fukuchi-Mizutani, M.; Ueda, T.; Nakao, M.; Tanaka, Y.; Kusumi, T.; Nishino, T., 2000. Aureusidin synthase: a polyphenol oxidase homolog responsible for flower coloration. *Science* 290:1163–1166.
- Newman, S. M.; Eannetta, N. T.; Yu, H.; Prince, J. P.; De-Vicente, M. C.; Tanksley, S. D.; Steffens, J.C. 1993. Organisation of the tomato polyphenol oxidase gene family. *Plant Mol. Biol.* 21:1035–1051.
- Ramiro, D. A., 2003. Alterações histoquímicas em genótipos resistentes e suscetíveis ao bicho-mineiro-do-cafeeiro. Instituto Agronômico de Campinas, Campinas/SP. Dissertação de mestrado. 73p.
- Robinson, S. P.; Dry, I. B., 1992. Broad bean leaf polyphenol oxidase is a 60-kDa protein susceptible to proteolytic cleavage. *Plant Physiology* 99: 317-323.
- Steiner, U.; Schliemann, W.; Böhm, H.; Strack, D., 1999. Tyrosinase involved in betalain biosynthesis of higher plants. *Planta* 208:114-124.
- Thipyapong, P., Steffens, J.C., 1997. Tomato polyphenol oxidase. Differential response of the polyphenol oxidase F promoter to injuries and wound signals.

Plant Physiol. 115:409–418.

- Thipyapong, P.; Hunt, M. D.; Steffens, J. C., 2004. Antisense downregulation of polyphenol oxidase results in enhanced disease susceptibility. *Planta* 220:105-117.
- Thygesen, P. W.; Dry, I. B.; Robinson, S.P., 1995. Polyphenol oxidase in potato: a Multigene family that exhibits differential expression patterns. *Plant Physiol.* 109:525–531.
- Vaughn, K. C.; Duke, S. O., 1984. Function of polyphenol oxidase in higher plants. *Physiol. Plant.* 60:106-112.
- Vaughn, K. C.; Lax, A. R.; Duke, S. O., 1988. Polyphenol oxidase: the chloroplast oxidase with no established function. *Physiol. Plant.* 72:659-665.
- Wang, J. H.; Constabel, C.P., 2003. Biochemical characterization of two differentially expressed polyphenol oxidases from hybrid poplar. *Phytochemistry* 64(1):115-121.
- Zhou, Y. C.; O'Hare, T.J.; Jobin-Decor, M.; Underhill, S. J. R.; Wills, R. B. H.; Graham, M. W., 2003. Transcriptional regulation of a pineapple polyphenol oxidase gene and its relationship to blackheart. *Plant Biotech. J.* 1(6):463-478.

CAPÍTULO II

Expressão da atividade de polifenoloxidase em folhas de cafeeiro e sua relação com resistência a pragas

1. INTRODUÇÃO

Polifenoloxidase - PFO (EC 1.14.18.1 ou EC 1.10.3.2) é uma enzima de ampla distribuição entre as plantas, que catalisa a hidroxilação de monofenóis a *o*-difenois e a oxidação destes para *o*-diquinonas (Mayer & Harel, 1979). Quinonas são moléculas altamente reativas e que espontaneamente podem complexar vários tipos de moléculas, incluindo proteínas, lipídeos, ácidos nucleicos e carboidratos. Devido a essas propriedades das quinonas, a função da PFO em plantas tem sido relacionada a mecanismos de defesa contra patógenos e pragas. Recentemente, Li & Steffens (2002) obtiveram evidência direta desse papel da PFO em plantas. Estes autores observaram que plantas transgênicas de tomate, superexpressando a PFO, tinham uma maior capacidade oxidativa, sendo observado que elas eram mais resistentes à infestação pela bactéria *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*.

O modo de ação proposto para a PFO é baseado na capacidade dessa enzima oxidar rapidamente compostos fenólicos quando o tecido é danificado. Nesta situação, há o rompimento de plastídeos, compartimento celular onde se situa a enzima, entrando então em contato com os compostos fenólicos liberados pelo rompimento do vacúolo, principal organela de armazenamento desses compostos (Mayer & Harel, 1979). As quinonas formadas, por sua vez, podem agir de várias maneiras levando à proteção das plantas: 1) pela sua alta reatividade com outros compostos celulares, podem limitar o desenvolvimento de doenças nos sítios infectados acelerando a morte celular das células próximas ao local de infecção, impedindo seu avanço e/ou por gerar um ambiente tóxico que irá inibir o crescimento do patógeno dentro das células (Bi & Felton, 1995); 2) pela sua habilidade em

alquilar proteínas, principalmente por se ligar covalentemente a aminoácidos mais suscetíveis à alquilação, tais como lisina, histidina, cisteína e metionina, reduzindo a biodisponibilidade dessas proteínas (Felton *et al.*, 1989; Felton *et al.*, 1992); 3) e também podendo reagir com outros compostos fenólicos, aumentando a formação de polímeros, de ligações covalentes e a condensação com mais proteínas, promovendo, desse modo, barreiras adicionais que irão impedir a entrada de patógenos.

O fato da atividade da PFO ser induzida por fatores abióticos e bióticos, tais como danos causados por herbívoros, infecções por fungos e bactérias, danos mecânicos, regurgitados de insetos e pelo tratamento com compostos sinalizadores da via dos octadecanóides, é uma evidência adicional do seu envolvimento em mecanismos de defesa em plantas. Esse tipo de resposta tem sido observado na expressão de outros genes ligados à defesa das plantas (Corbin *et al.*, 1987; Farmer & Ryan, 1992; Warner *et al.*, 1995), e constitui uma estratégia evolutiva das plantas para se defenderem de predadores.

Poucos estudos relacionam a atividade da PFO a mecanismos de defesa em plantas de café. Maxemiuc-Naccache & Dietrich (1985) e Mazzafera *et al.* (1989) sugeriram o envolvimento dessa enzima na resistência do cafeeiro contra o fungo *Hemileia vastatrix*, causador da ferrugem, e o nematóide *Meloidogyne incógnita*. Ramiro (2003), entretanto, não encontrou evidências do envolvimento de PFO em interações com o inseto *Perileucoptera coffeella*, um minador de folhas do cafeeiro.

Em café, os níveis constitutivos da PFO são relativamente altos quando comparados a outras espécies (Mazzafera & Robinson, 2000). Associado a isso, a atividade da PFO desta planta é induzida pelo tratamento com ácido metiljasmônico

ou por dano mecânico. Os níveis de ácido clorogênico, um fenol de ampla distribuição e principal substrato da PFO extraída de folhas do cafeeiro (Mazzafera & Robinson, 2000), também são bastante elevados nesta planta, podendo representar cerca de 11% e 1% da matéria seca de frutos e de folhas, respectivamente (Clifford, 1985; ver cap. 3). Para Felton *et al.* (1989), a co-ocorrência de PFO e de difenóis é um indício de que a oxidação fenólica mediada por esta enzima é um mecanismo potencial de defesa das plantas.

O objetivo do presente estudo foi relacionar a atividade de PFO em café e resistência à pragas e doenças nesta planta. Para isto, foram realizados ensaios onde a atividade dessa enzima foi avaliada em diferentes genótipos, em interações compatíveis e não compatíveis do café com o fungo *H. vastatrix* e com o inseto *P. coffeella* e em resposta aos tratamentos com ácido metiljasmonico e dano mecânico.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material vegetal

2.1.1. Atividade da PFO em folhas de diferentes genótipos

As análises foram realizadas em folhas de cafeeiros adultos mantidos no campo, e pertencentes ao Banco Ativo de Germoplasma do Instituto Agronômico de Campinas, situado no Centro Experimental Central, na Fazenda Santa Elisa, Campinas-SP. Foram utilizadas plantas de *Coffea arabica* var. Mundo Novo, *C. kapakata*, *C. dewevrei*, *C. salvatrix*, *C. racemosa*, *C. canephora* cv. Conilon, *C. brevipes*, *C. excelsa*, *C. canephora* cv. Guarini, *C. liberica*, *C. eugenoides* e *C. stenophylla*. Também foram analisados o Híbrido do Timor (HT), um híbrido natural entre as espécies *C. arabica* e *C. canephora*, e plantas de duas linhagens híbridas resultantes do cruzamento de *C. arabica* x *C. racemosa*, aqui nomeadas de H1023 e H1036.

Em cada genótipo foram coletadas folhas do segundo e do terceiro pares a partir da gema apical do ramo e os extratos protéicos foram obtidos no mesmo dia da coleta. As avaliações foram feitas em triplicatas, sendo cada repetição constituída de três amostras de folhas. Todas as folhas foram coletadas de uma única planta.

2.1.2. Atividade da PFO em folhas submetidas a dano mecânico e tratadas com ácido metiljasmônico

Folhas recém colhidas de *C. arabica*, *C. racemosa*, *C. salvatrix* e do HT foram submetidas a dano mecânico e ao tratamento com ácido metiljasmônico (Meja). O dano mecânico foi causado com alfinete, provocando perfurações em ambas as faces das folhas perfazendo um total aproximado de 15 furos/cm². As

folhas danificadas e não danificadas (controle) foram colocadas em câmaras úmidas, mantidas em condições de luz e temperatura de laboratório. As câmaras úmidas foram confeccionadas com bandejas de plástico tampadas com uma placa de vidro transparente e dentro das quais foram colocadas espumas molhadas para manter a umidade. Quarenta e oito horas após o dano mecânico, as folhas foram retiradas das câmaras e foram obtidos os extratos protéicos.

No tratamento com Meja, as folhas foram colocadas em câmaras úmidas confeccionadas conforme descrito anteriormente, entretanto, sem a tampa de vidro. Essas câmaras foram colocadas dentro de sacos de plástico, que em seguida foram vedados. O Meja (50 μ L) foi aplicado em um pequeno pedaço de algodão, que foi fixado com fita adesiva na parede interna do saco plástico. Meja foi aplicado no início do experimento e 24 h depois (também 50 μ L). Após 24 h da segunda aplicação de Meja, ou seja, 48 horas após início do tratamento, as folhas foram retiradas para obtenção dos extratos protéicos. Como controle, folhas foram submetidas às mesmas condições, ou seja, em câmaras úmidas, mas sem a aplicação de Meja. Neste ensaio, foram feitas quatro repetições, cada uma constituída de 3 folhas. Todas as folhas foram coletadas de uma única planta.

2.1.3. Atividade da PFO em interações com o fungo *H. vastatrix*

A atividade de PFO em interações com o fungo da ferrugem do cafeeiro, (*H. vastatrix*), foi avaliada em folhas do Híbrido de Timor (considerado resistente à ferrugem) e em folhas de *C. arabica* cv. Mundo Novo (considerado suscetível). Para isso, folhas pertencentes ao segundo e terceiro pares completamente expandidos, foram coletadas de plantas adultas crescendo no campo e inoculadas com esporos

(1mg/mL) do fungo apresentando 60% de germinação em água destilada.

O teste de germinação foi feito misturando uma pequena quantidade de esporos em cerca de 100 µL de água destilada colocados em cima de uma lâmina microscópica. A lâmina foi colocada no escuro por 24 h e em seguida avaliou-se a geminação dos esporos pela contagem em microscópio. Considerou-se germinado o esporo com emissão de tubos germinativos bem desenvolvidos.

A inoculação foi feita pulverizando os esporos misturados em água na face abaxial das folhas, local onde estão localizados os estômatos em folhas do cafeeiro. Após inoculação as folhas foram colocadas em câmaras úmidas (descritas anteriormente), mantidas no escuro durante as primeiras 24 h (Mazzafera & Magalhães, 1989) e a partir daí colocadas sob fotoperíodo de 12 h em temperatura ambiente. Durante o período do ensaio, as folhas foram pulverizadas diariamente com água destilada e a umidade da câmara mantida por adição de água na espuma.

Controles foram feitos com folhas não inoculadas submetidas às mesmas condições das inoculadas. Amostras para obtenção de extratos protéicos foram retiradas nos tempos 0, 2, 3, 4, 6 e 8 dias após inoculação. Foram feitas quatro repetições, sendo cada repetição constituída de três folhas. Todas as folhas foram coletadas de uma única planta.

2.1.4. Atividade da PFO em interações com *P. coffeella*

Para as interações com *P. coffeella*, folhas recém colhidas de plantas crescendo em condições de campo, de *C. arabica* cv. Mundo Novo e das linhagens híbridas H1036 e H1023, resultantes do cruzamento entre as espécies *C. arabica* e *C. racemosa*, foram colocadas em gaiolas de crescimento do inseto durante uma

noite para oviposição (Guerreiro Filho *et al.*, 1999). No dia seguinte as folhas foram retiradas das gaiolas e colocadas em câmaras úmidas, mantidas sob fotoperíodo de 12 h em temperatura ambiente por todo período do ensaio. Os controles foram feitos com folhas não submetidas à infestação. Para a exposição das folhas ao bicho mineiro, foi utilizada a criação do inseto mantida pelo Dr. Oliveira Guerreiro Filho, no Instituto Agronômico de Campinas.

As extrações de proteínas dessas folhas foram feitas em amostras coletadas nos tempos 0, 2, 6, 8 e 11 dias após a oviposição. Foram feitas cinco repetições, cada uma constituída de uma folha. Todas as folhas foram coletadas de uma única planta.

2.2. Extração e determinação da atividade da PFO

A extração e os ensaios de atividade da PFO foram feitos segundo metodologia descrita por Mazzafera & Robinson (2000). Para obtenção dos extratos protéicos, as folhas foram picadas com tesoura em pequenos pedaços e trituradas em Polytron, em meio de extração (5 mL para 1 g de folhas) contendo 100 mM de fosfato de sódio pH 7, ácido ascórbico 2% , 5 mM de dithioeritritol (DTE) e 20 % de PVPP (p/p). Após centrifugação (25.000 g, por 20 min, a 4°C); 2,5 mL do sobrenadante foram filtrados em mini-colunas PD-10 Sephadex G25 (Pharmacia), usando-se fosfato de sódio 50 mM, pH 6, como tampão de eluição. As concentrações de proteínas nos extratos foram determinadas pelo método de Bradford (1976) utilizando-se reagente pronto da Amersahn-Pharmacia. Como padrão utilizou-se albumina do soro bovino (BSA).

A atividade da PFO foi determinada pelo consumo de oxigênio, medido em

eletrodo a 25°C. A mistura de reação, com volume final de 1,0 mL, continha 1 mM de ácido 5-cafeoilquínico (5-cqa), 3,5 mM de SDS e 50 mM de fosfato de sódio pH 6. A reação foi iniciada com a adição de 5-cqa e a taxa de consumo de oxigênio no primeiro minuto foi usada para calcular a atividade da enzima.

Também foram feitas reações com os substratos ácido caféico, 4-metilcatecol, catecol, L-DOPA (3-(3,4-dihidrofénil)-L-alanina), tirosina, ácido *p*-cumárico e hidroquinona, todos na concentração de 1mM. A atividade foi expressa em unidades/mg de proteína, sendo cada unidade igual a 1 μ mol de O₂ consumido/min.

Também foi feita a atividade da PFO em gel de poliacrilamida semidesnaturante (Mazzafera & Robinson, 2000). Quantidades iguais de proteínas dos extratos protéicos foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 12% contendo 0.1% SDS. Após eletroforese o gel foi lavado em tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 6,0, por 5 min e em seguida foi feita a reação no mesmo tampão contendo 2 mM de 5-cqa e 0,5 mM de *p*-fenilenodiamino.

2.3. Extração e análise de compostos fenólicos totais e de ácido 5-cafeoilquínico

Os níveis de compostos fenólicos solúveis totais e de 5-cqa foram analisados nas folhas dos 15 genótipos e nos ensaios com dano mecânico e ácido metiljasmônico. Para extração, as folhas recém colhidas foram trituradas em Polytron usando-se metanol 70%, na proporção de 5 ml para 1 g de folha. Os extratos foram deixados por 24 h em temperatura ambiente (20-25°C) e em seguida centrifugados a 15.000 g por 10 min. A 1,0 mL do sobrenadante adicionou-se reagente de Carrez (Ky

et al., 1997) e o sobrenadante utilizado para as determinações após centrifugação da mistura.

A concentração de fenóis totais foi determinada usando o método descrito por Swain & Hills (1959). A 10 µL do extrato foram adicionados 3,6 mL de H₂O e 0,25 mL de reagente de Folin Ciocalteu. Após agitação e transcorridos 3 min, foi adicionado à mistura 0,5 mL de Na₂CO₃ saturado (17,5g/50 mL) e 0,75 mL de H₂O. Foi feita nova agitação e após 1 h a mistura foi centrifugada (2.000 rpm, 10 min) e então procedeu-se a leitura de absorbância a 725 nm. Como padrão foi utilizado 5-cqa.

Os níveis de 5-cqa nas amostras foram determinados em HPLC. O extrato acima foi diluído em água e 50 µL foram injetados em sistema de fase reversa usando uma coluna Microsorb C18 (5 µm, 4,6 x 250 mm). A detecção foi feita com detector de UV a 326 nm. Para cálculo das concentrações utilizou-se como padrão 5-cqa. Todas as corridas cromatográficas foram realizadas em gradiente de ácido acético 0,5% tendo água como solvente A e metanol puro como solvente B. O gradiente utilizado foi de 0 a 80% de solvente B em 40 min. Durante toda corrida o fluxo foi de 1,0 mL/min.

Amostras extras foram secas em estufa e foi calculado um valor relativo da massa seca em relação à massa fresca. Esse valor foi usado para calcular a massa seca de cada amostra analisada multiplicando-se o mesmo pela massa fresca usada em cada amostra.

O perfil cromatográfico de compostos fenólicos totais foi registrado em corridas extras utilizando o gradiente de 10 a 80% de solvente B em 15 min.

3. RESULTADOS

A atividade da PFO foi analisada em folhas de diferentes genótipos de café com características diferenciadas quanto à resistência às principais pragas doença dessa cultura. Dos genótipos analisados, *C. dewevrei*, *C. salvatrix*, *C. brevipes*, *C. stenophylla*, *C. kapakata*, *C. racemosa*, *C. liberica* e *C. eugenioides* são referidos como resistentes ao bicho mineiro (Guerreiro Filho *et al.*, 1991; Guerreiro Filho & Mazzafera, 2000). Estes mesmos autores citam *C. arabica* cv. Mundo Novo e *C. canephora* como susceptíveis à essa praga. *C. arabica* cv. Mundo Novo também é referido como sendo susceptível ao fungo da ferrugem e a nematóides (Maxemiuc-Naccache & Dietrich, 1985; Mazzafera *et al.*, 1989). HT é considerado resistente à ferrugem (Bonomo *et al.*, 2004) e, das linhagens híbridas (*C. arabica* x *C. racemosa*), H1023 é susceptível e H1036 é resistente ao bicho mineiro (Oliveiro Guerreiro Filho, comunicação pessoal).

O nível constitutivo de atividade da PFO observado para os quinze genótipos (Figura 1), variou de 3,8 (*C. salvatrix*) a 88,0 unidades/mg de proteína (*C. canephora* cv. Guarini).

A atividade da PFO também foi avaliada quanto ao padrão de bandas em gel de poliacrilamida semidesnaturante. Pelo menos quatro padrões diferentes de bandejamento foram observados: a) duas bandas nítidas, em *C. arabica*, H1023, H1036 e em *C. salvatrix*; b) três bandas nítidas, em *C. canephora* (Conilon e Guarini), *C. liberica*, *C. eugenioides*, *C. stenophylla*, HT, *C. kapakata*, *C. dewevrei* e *C. excelsa*; c) quatro bandas nítidas, observadas em *C. racemosa*; d) cinco bandas, observado em *C. brevipes* (Figura 2). Maior tempo exposição do gel ao substrato permitiu o aparecimento

de bandas menos intensas.

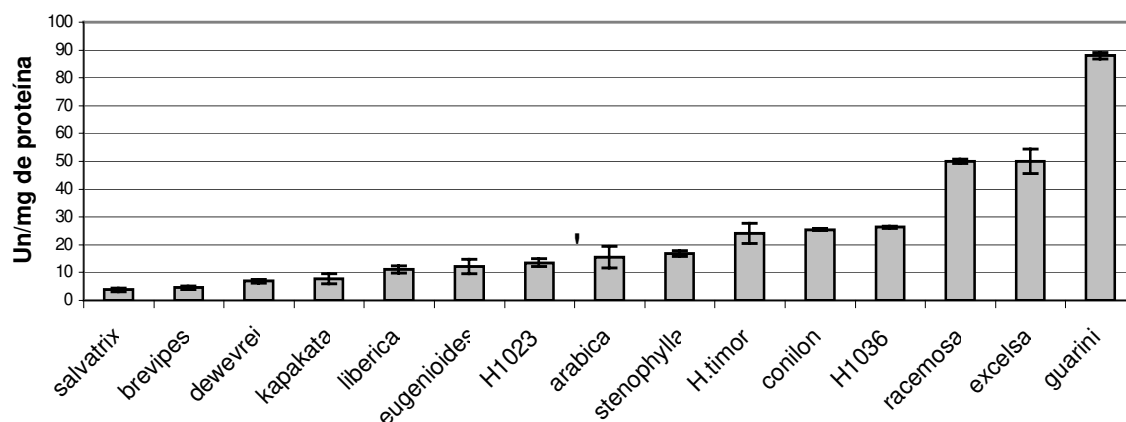


Figura 1: Atividade de PFO em folhas de cafeeiro. Médias de três repetições. Barras representam o desvio padrão.

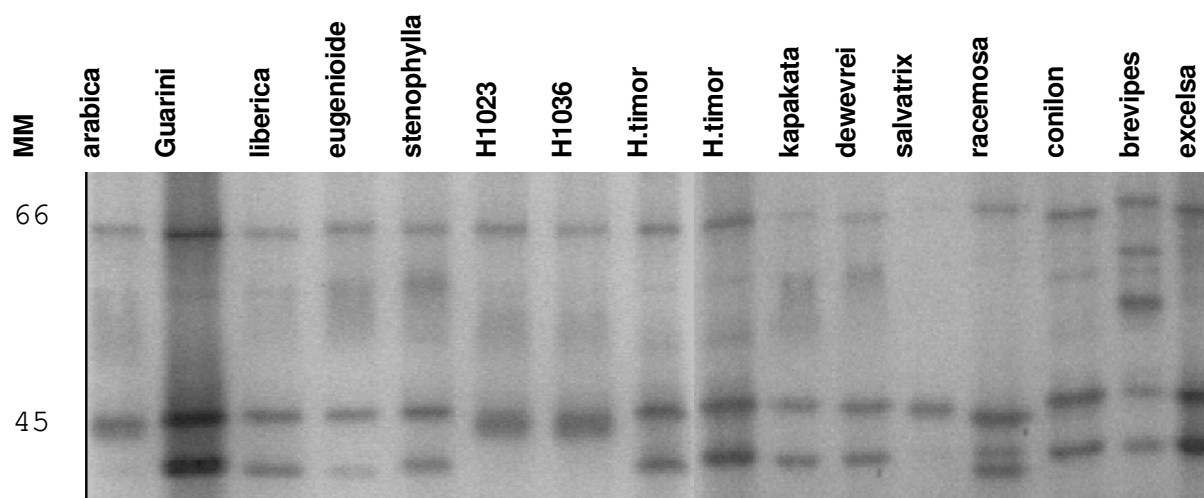


Figura 2: Bandas de atividade da PFO de folhas de cafeeiro em gel de poliácridamida semidesnaturante. MM = marcação de massa molecular em Kda.

Na análise da atividade de PFO através do consumo de oxigênio, diferentes substratos foram testados com os 15 genótipos. Dentre estes, o 5-cqa

apresentou-se como melhor substrato, destacando-se também 4-metilcatecol (4MC), ácido caféico e catecol (Tabela 1).

Tabela 1: Afinidade de PFO de folhas de cafeeiros a diferentes substratos. A atividade é expressa em unidades/mg de proteína. Médias de três repetições. Traço indica atividade não detectada.

Genótipo	5-cqa	4MC	Ác.caféico	Catecol	DOPA	Tirosina	Ác. <i>p</i> -cumárico	Hidroquinona
Guarini	88.0	71.2	13.8	44.3	3.2	1.0	0.6	-
Excelsa	50.0	39.2	7.8	35.0	3.8	0.6	0.4	0.4
Racemosa	49.9	29.7	6.0	22.1	-	-	-	-
H1036	26,3	24.8	5.6	10.1	2.3	-	-	-
Conilon	25.5	17.9	4.1	7.5	0.5	-	-	-
Stenophylla	16.9	19.9	3.8	6.4	1.9	-	0.6	-
Arábica	15.5	18.9	4.5	5.9	0.9	-	-	-
H. de timor	14.2	13.5	5.7	9.9	2.1	-	-	-
H1023	13.6	10.2	2.0	4.1	0.7	-	-	0.7
Eugenioides	12.1	8.1	1.9	4.4	0.6	-	-	-
Liberica	11.2	8.2	1.4	6.2	0.4	-	-	-
Kapakata	7.8	22.5	6.2	15.6	1.7	0.8	-	-
Dewevrei	6.9	6.6	1.2	3.4	-	-	-	-
Brevipes	4.6	3.2	0.4	2.2	-	-	-	-
Salvatrix	3.8	2.1	0.2	0.2	-	-	-	-

Nestas mesmas plantas também foram analisados os níveis de compostos fenólicos totais e de 5-cqa. Os níveis de compostos fenólicos totais foliares observados variaram entre 92,9 mg/g (*C. racemosa*) e 235,5 mg/g (*C. liberica*) (Figura 3A) e os níveis de 5-cqa variaram de 1,39 mg/g (*C. salvatrix*) a 21,01 mg/g (*C. eugenioides*) (Figura 3B).

Dano mecânico e tratamento com Meja em *C. arabica* cv. Mundo Novo, HT, *C. racemosa*, e *C. salvatrix*, levaram a respostas variadas nos níveis de atividade de PFO. Essas espécies foram escolhidas para tratamentos de indução primeiramente por *C. arabica* ser susceptível tanto à ferrugem (*H. vastatrix*) quanto ao bicho mineiro (*P. coffeella*), HT ser resistente à ferrugem e *C. salvatrix* e *C.*

racemosa serem resistentes ao bicho mineiro. Em segundo, pelos perfis cromatográficos dos extratos fenólicos, que são semelhantes em *C. arabica* cv. Mundo Novo e HT, diferindo bastante em *C. racemosa* e *C. salvatrix* (Figura 4).

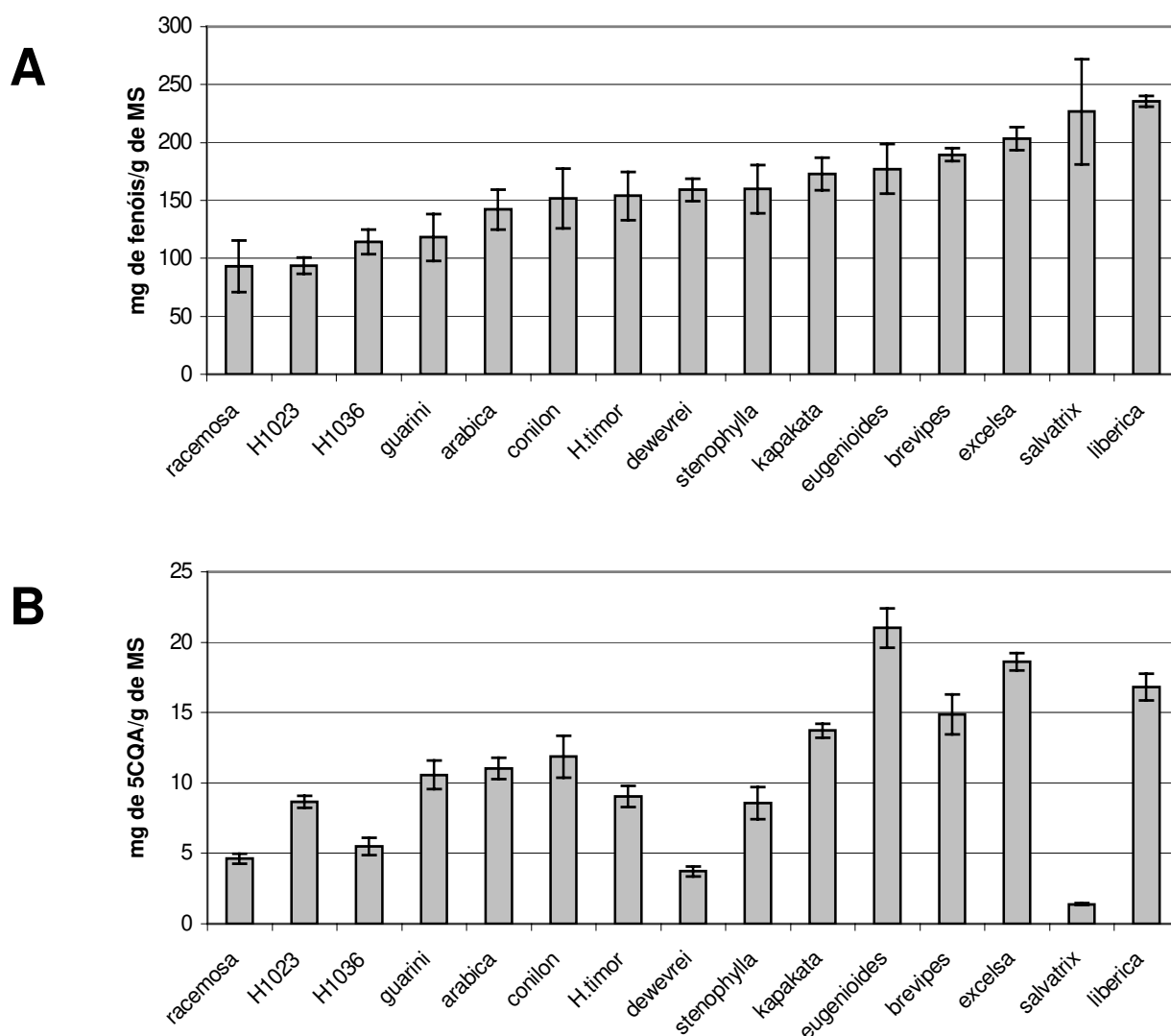
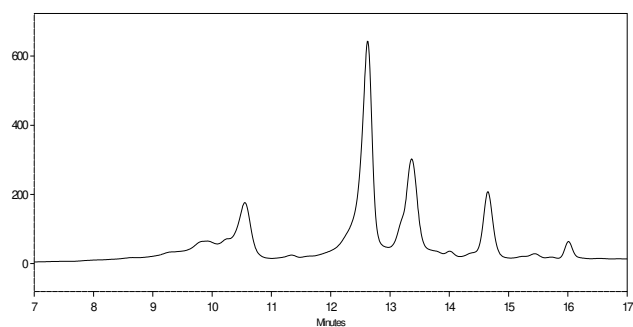
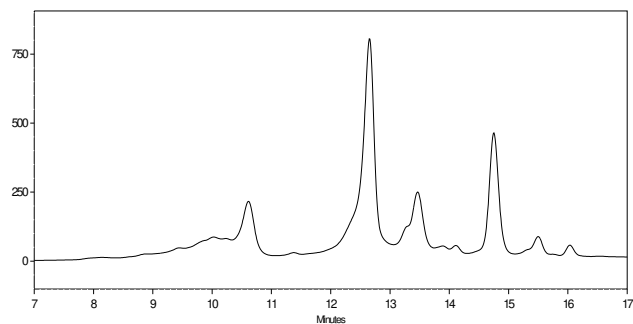


Figura 3: Níveis de compostos fenólicos totais e de 5-cqa em folhas de cafeeiros. Médias de três repetições. Barras representam o desvio padrão.

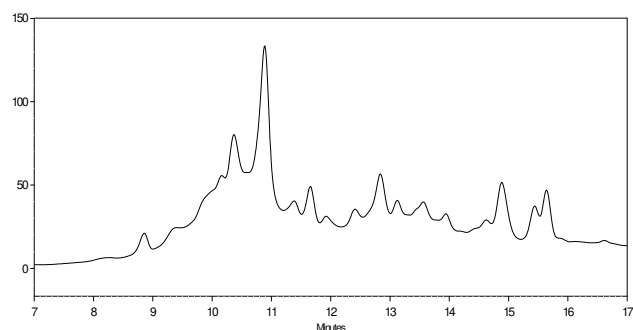
C. arabica



H. de Timor



C. racemosa



C. salvatrix

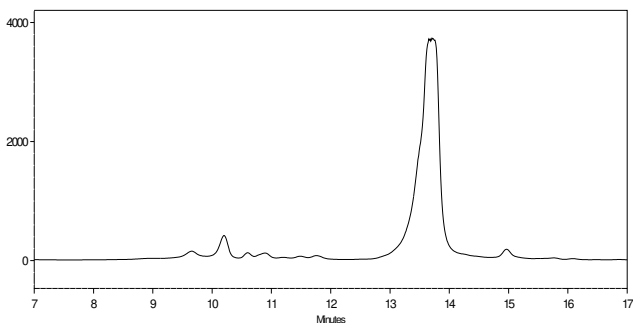


Figura 4: Perfil cromatográfico em HPLC para compostos fenólicos totais extraídos de folhas de cafeeiro.

Em *C. arabica* cv. Mundo Novo, nenhuma variação significativa foi observada na aplicação de Meja ou por dano mecânico (Figura 5A). Em HT e *C.*

racemosa a atividade da PFO foi induzida significativamente em pelo menos um dos tratamentos (Figura 5B e 5C). A variação em relação ao controle atingiu cerca de 45% para folhas de HT tratadas submetidas a dano mecânico e cerca de 30% para folhas de *C. racemosa* submetidas ao tratamento com meja. Em *C. salvatrix* a variação de atividade atingiu cerca de 85% para folhas danificadas e cerca 225% em folhas tratadas com Meja (Figura 5C).

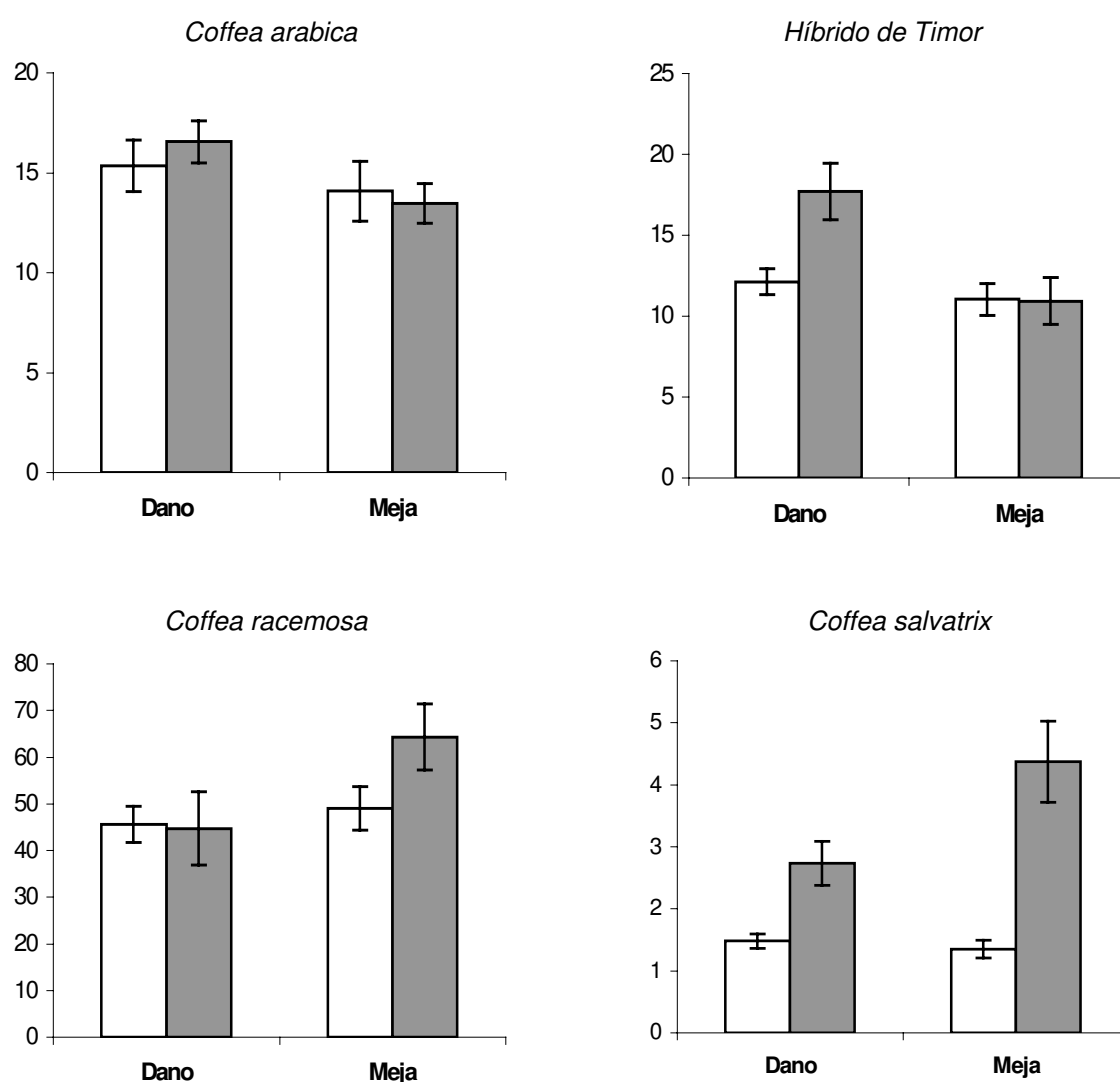


Figura 5: Atividade de PFO em folhas de cafeeiros submetidas a dano mecânico (Dano) e ao tratamento com ácido metiljasmonico (Meja). Controles = colunas em branco. Médias de quatro repetições. Barras representam o desvio padrão.

As bandas de atividade da PFO em gel de poliacrilamida semidesnaturante observadas para essas quatro plantas não foram diferentes no bandeamento, mas apenas na intensidade das bandas entre folhas induzidas e não induzidas (dados não apresentados).

Os níveis de compostos fenólicos totais foram diferentes dos controles apenas em folhas *C. racemosa* tratadas com Meja, sendo maior que o controle (Figura 6).

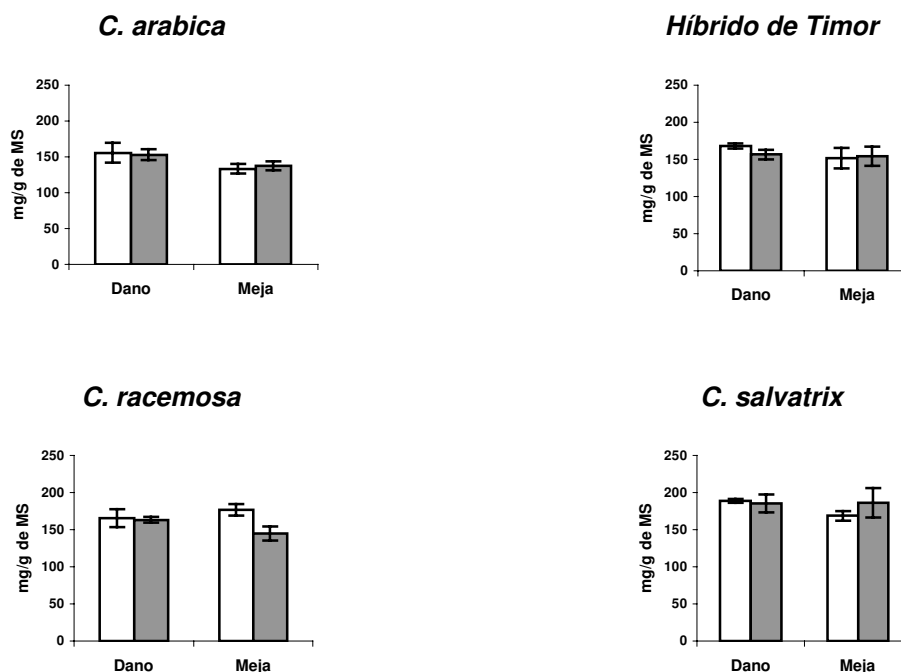


Figura 6. Níveis de compostos fenólicos totais em folhas de cafeeiros submetidas a dano mecânico (Dano) e ao tratamento com ácido metiljasmônico (Meja). Controles = colunas em branco. Médias de quatro repetições. Barras representam o desvio padrão.

Em folhas de *C. arabica* cv. Mundo Novo e HT inoculadas com esporos do fungo *H. vastatrix*, a atividade da PFO foi induzida significativamente apenas em folhas do HT (Figura 7B), após o quarto dia após a inoculação.

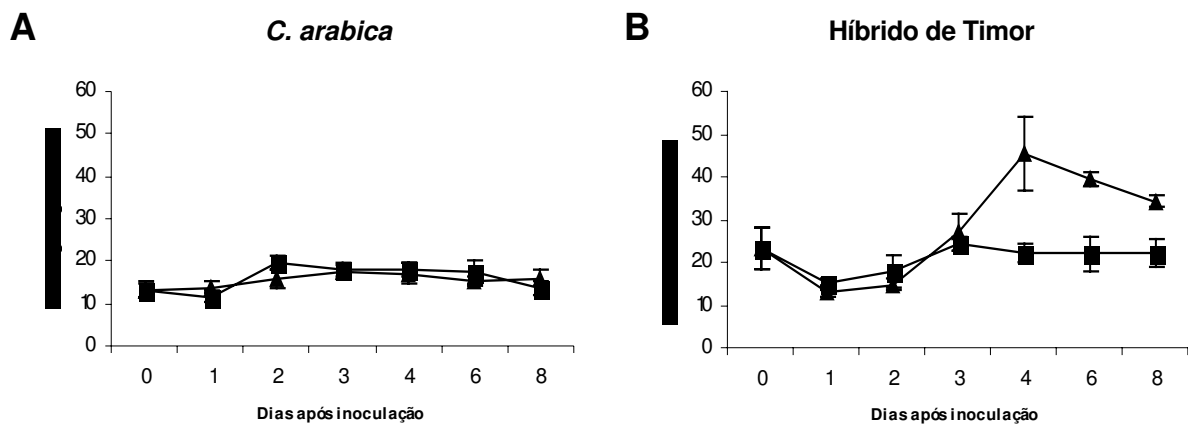


Figura 7. Atividade de PFO em folhas de café inoculadas (▲) e não inoculadas (■) com esporos de *H. vastatrix*. Médias de quatro repetições. Barras representam o desvio padrão.

Os padrões de bandas de atividade da PFO em gel de poliacrilamida não foram diferentes quanto aos tratamentos dentro de cada genótipo avaliado (dados não apresentados).

A infestação de folhas de *C. arabica* cv. Mundo Novo e das linhagens híbridas H1023 e H1036 com bicho mineiro causou maior nível de atividade da PFO apenas em H1036 no oitavo dia após ovoposição (Figura 8).

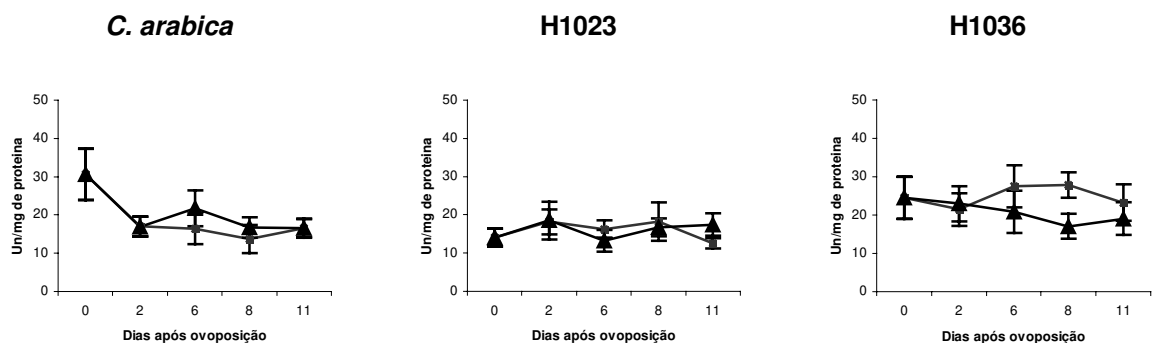


Figura 8. Atividade de PFO em folhas de café infestadas (▲) e não infestadas (■) com *P. coffeella*. Médias de cinco repetições. Barras representam o desvio padrão.

4- DISCUSSÃO

Em vários estudos, níveis mais elevados de atividade da PFO têm sido associados à resistência das plantas contra insetos e patógenos (Thipyapong *et al.*, 1995; Constabel *et al.*, 2000; Haruta *et al.*, 2001; Li & Steffens, 2002; Shimizu, 2004). Isso tem sido discutido tanto em termos dos níveis constitutivos de atividade, como também em relação à sua indução.

Nos genótipos de café aqui analisados foi observada grande variação nos níveis constitutivos da atividade da PFO. Do menor ao maior valor de atividade observado, houve variação da ordem de 10 vezes (Fig. 1). Considerando as características desses genótipos em relação à resistência a pragas e doenças, nenhuma relação pode ser feita quanto aos níveis de atividade da PFO. Ou seja, os genótipos *C. dewevrei*, *C. salvatrix*, *C. brevipes*, *C. stenophylla*, *C. eugenoides*, *C. liberica*, *C. kapakata* e *C. racemosa*, HT e linhagem H1036, que apresentam resistência relatada para algum tipo de praga, têm valores de atividade da PFO tanto entre os menores valores como entre os valores mais elevados. Isso também é válido para *C. arabica* cv. Mundo Novo, *C. canephora* cv Guarini, *C. canephora* cv Conilon e a linhagem H1023, considerados susceptíveis.

Para a maioria das espécies aqui estudadas, foram usadas as mesmas plantas usadas por Guerreiro Filho & Mazzafera (1999) em seu estudo sobre o papel da cafeína na resistência do cafeeiro ao bicho mineiro. Numa análise de correlação entre atividade da PFO aqui observada e dano causado pelo bicho mineiro (dados retirados do trabalho de Guerreiro Filho & Mazzafera, 2000), o valor de r (Pearson) foi de 0,44, $p=1749$. Esses resultados sugerem que, nesses genótipos, a PFO não

está envolvida na resistência ao bicho mineiro.

O modo de ação proposto para a PFO, no entanto, é baseado na capacidade dessa enzima em oxidar rapidamente *o*-dihidroxifenóis a *o*-quinonas quando o tecido é atacado. As quinonas por sua vez, podem agir de várias maneiras levando à proteção das plantas. Assim, a ação eficiente da PFO depende de outros fatores, como de níveis satisfatórios de seus substratos a serem oxidados e da quantidade e qualidade de proteínas presentes na planta, o que em última análise levará a um maior efeito das quinonas (Felton *et al.*, 1992).

Considerando, portanto, o nível de compostos fenólicos totais dos genótipos resistentes e dos genótipos susceptíveis, observa-se que, neste caso, existe uma relação inversa entre nível de compostos fenólicos totais e dano causado pelo bicho mineiro, ou seja, uma relação direta entre nível de compostos fenólicos totais e resistência a essa praga. As plantas resistentes, salvo *C. racemosa* e H1036, apresentaram maiores níveis e plantas susceptíveis apresentaram menores níveis (Figura 3A). O coeficiente de correlação - r (Pearson) - entre o nível de compostos fenólicos totais observado e a o dano causado pelo bicho mineiro (dados retirados do trabalho de Guerreiro Filho & Mazzafera, 2000) foi de -0,443, $p=0,1726$. Desconsiderando *C. racemosa* na análise o r foi de -0,746, $p=0,0132$, o que indica um comportamento diferenciado desse genótipo. Como os níveis constitutivos de atividade da PFO em café são relativamente superiores a outras espécies (Mazzafera & Robinson, 2000), o nível de atividade de PFO, em si, pode ser irrelevante para a resistência em café. Entretanto, a ação de PFO torna-se importante quando se analisa a capacidade oxidativa do tecido, o que pode ser visualizado pela relação direta entre os níveis de compostos fenólicos totais e a

resistência.

Apesar da maior preferência pelo 5-cqa como substrato, houve uma grande variação na especificidade de substratos da PFO (Tabela 1). Por outro lado, não houve relação entre os níveis de compostos fenólicos totais e de 5-cqa (r (Pearson)=0,38, $p=0,1618$). Isto sugere que outros fenóis podem ter importância maior que CQA na oxidação de fenóis por PFO no processo de resistência a pragas. Os diferentes perfis cromatográficos de fenóis obtidos em HPLC sugerem isto, ou seja, ainda que 5-cqa, seja o melhor substrato de PFO, outros fenóis presentes em maiores quantidades podem ter maior importância relativa na resistência. A identificação desses compostos como, por exemplo, no caso de *C. salvatrix*, que mostrou um pico quase único nos extratos, poderia comprovar ou aprofundar esta hipótese.

Os diferentes padrões de bandas de atividade de PFO observados entre os genótipos (Figura 2) sugerem a presença de formas diferentes entre alguns deles. Entretanto, outros fatores podem levar à formação de bandas de diferentes massas moleculares de PFO. A PFO é codificada no núcleo, sendo sintetizada no citoplasma como uma pré-proteína com massa molecular de 60-66 Kda, e durante seu transporte até os plastídeos e/ou sua ativação, parte desta pré-proteína é removida pela ação de proteases específicas da membrana do envelope, gerando uma proteína massa aproximada de 45 Kda (Robinson & Dry, 1992; Koussevitzky *et al.*, 1998). Para a maioria das plantas a forma ativa da PFO tem massa molecular aproximada de 45 Kda. No entanto, a pré-proteína também pode apresentar atividade em algumas plantas.

A obtenção de bandas diferentes também pode ser devida à ação de

proteases durante a obtenção dos extratos protéicos e/ou pela associação da PFO com outras moléculas, como os taninos, alterando suas propriedades, inclusive a sua mobilidade no gel (Mazzafera & Robinson, 2000). Harel *et al.* (1973) demonstraram que múltiplas bandas de atividade da PFO podem ser reproduzidas pela ação de proteases comerciais adicionadas ao meio de reação.

Estudos mais detalhados poderão confirmar a distinção de formas da PFO entre os genótipos de café, se os diferentes padrões de bandas observados são devido a formas diferentes ou simplesmente resultado de processos proteolíticos. Também poderão ser feitas associações entre a presença e o padrão de expressão de formas diferentes da PFO, caso elas existam, e respostas fisiológicas da plantas.

Geralmente a PFO é codificada por mais de um gene (Newman *et al.*, 1993; Thygesen *et al.*, 1995) e isoformas desta enzima são observadas em várias plantas (Constabel *et al.* 2000; Wang & Constabel, 2003). Dentre as diferenças destacadas entre elas, a especificidade de substrato pode ser uma característica marcante e, conforme ressaltaram Wang & Constabel (2003), esta característica pode estar associada a diferenças funcionais da enzima, inclusive no envolvimento em mecanismos de defesa da planta. Estes autores estudaram a expressão de duas isoformas da PFO de folha de *Populus tremuloides* e observaram diferenças na sua especificidade de substrato. Foi observado que uma das formas, de menor especificidade, somente era expressa após indução por dano mecânico.

Foi observado que a atividade da PFO de folhas do café pode ser induzida em alguns genótipos e em outros não. Observou-se também que a indução é dependente do tipo de fator utilizado (Fig. 5). Em *C. racemosa*, HT e *C. salvatrix*, genótipos que apresentam resistência ao bicho mineiro ou à ferrugem, houve

indução da PFO por pelo menos um tratamento. Em *C. arabica* cv. Mundo Novo, genótipo caracteristicamente susceptível a pragas e doenças, nenhuma resposta foi observada.

A inoculação de folhas do cafeeiro com esporos do fungo *H. vastarix* ou a infestação com o inseto *P. coffeella*, também levou a respostas diferenciadas na indução da PFO. A inoculação com o fungo levou à indução da PFO somente no genótipo resistente (HT). Já a infestação com o bicho mineiro causou aumento na atividade de PFO apenas no oitavo dia após a ovoposição e somente no genótipo resistente.

A indução da atividade da PFO por fatores abióticos e/ou bióticos tem sido considerada como evidência da ação da PFO em mecanismos de defesa das plantas (Mayer & Harel, 1979; Felton *et al.*, 1989; Thipyapong *et al.*, 1995; Constabel & Ryan, 1998; Constabel *et al.*, 2000; Haruta *et al.*, 2001). A não indução da PFO ou a indução dependente do fator, como aqui observadas, pode estar refletindo a especialização de mecanismos de defesa em plantas do café.

Constabel & Ryan (1998) analisaram a indução de PFO por dano mecânico e por Meja em 18 espécies de plantas cultivadas e também observaram grande variação das respostas entre as espécies. Para os autores isso é indicativo de especialização de mecanismos. Por exemplo, plantas de pimenta (*Capsicum annum*) e de alfafa (*Medicago sativa*) acumularam níveis significativos de inibidores de proteases, um fator de defesa, quando danificadas ou tratadas com Meja. Entretanto, a atividade da PFO nessas espécies não foi induzida sob estes tratamentos.

A variação de respostas na indução da PFO pelos fatores abióticos e bióticos aqui testados sugere que, se a PFO está envolvida na resistência apresentada pelos

genótipos avaliados, provavelmente existe mecanismos diferenciados de ação envolvendo essa enzima. Os valores de atividade de PFO e de compostos fenólicos totais observados para *C. racemosa* e H1036 podem ser um indício disso. Ao contrário dos demais genótipos resistentes avaliados, esses dois genótipos apresentaram níveis elevados de PFO e baixos níveis de compostos fenólicos totais.

Baseando nos resultados aqui observados, conclui-se que a resistência do cafeeiro pode estar relacionada ao potencial oxidativo do tecido e não simplesmente a uma maior atividade da PFO; que o tipo e quantidade de substrato da PFO encontrado no tecido podem ser importantes na resistência do cafeeiro e que entre os genótipos pode existir a especialização de mecanismos de resistência envolvendo a ação da PFO.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bi, J. L.; Felton, G. W., 1995. Foliar oxidative stress and insect herbivory: primary compounds, secondary metabolites, and reactive oxygen species as components of induced resistance. *J. Chem. Ecol.* 21:1511-1530.
- Bonomo, P; Cruz, C. D.; Viana, J. M. S.; Pereira, A. A.; de Oliveira, V. R.; Carneiro, P. C. S., 2004. Avaliação de progênies obtidas de cruzamentos de descendentes do HT com as cultivares Catuaí Vermelho e Catuaí Amarelo. *Bragantia* 63(2):207-219.
- Bradford, M. M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.
- Clifford, M. N. 1985. Chlorogenic acids. In: Clarke, R. J.; Macrae, R. eds. *Coffee*. Vol. 1. Chemistry. London: Elsevier. 153-202p.
- Constabel, C. P.; Ryan, C. A., 1998. A survey of wound and methyl jasmonate-induced leaf polyphenoloxidase in crop plants. *Phytochemistry* 47(4):507-511.
- Constabel, C. P.; Yip, L.; Patton, J. J.; Christopher, E., 2000. Polyphenol oxidase from hybrid poplar. Cloning and expression in response to wounding and herbivory. *Plant Physiol.* 124:285-295.
- Corbin, D. R.; Sauer, N.; Lamb. C. J., 1987. Differential regulation of a hydroxyproline-rich glycoprotein gene family in wounded and infected plants. *Mol. Cell Biol.* 7:4337-4344.
- Farmer, E. E.; Ryan, C. A., 1992. Octadecanoid precursors of jasmonic acid activate the synthesis of wound-inducible proteinase inhibitors. *Plant Cell* 4:129-134.

- Felton, G. W.; Donato, K.; Del Vecchio, R. J.; Duffey, S.S., 1989. Activation of plant polyphenol oxidases by insect feeding damage reduces nutritive quality of foliage for noctuid herbivores. *J. Chem. Ecol.* 15(12):2667-2694.
- Felton, G. W.; Donato, K.; Del Vecchio, R. J.; Duffey, S.S., 1992. Impact of oxidized plant phenolics on the nutritional quality of dietary protein to a noctuid herbivore. *J. Insect Physiol.* 38(4):277-285.
- Guerreiro Filho, O.; Silvarola, M. B.; Eskes, A. B., 1999. Expression and mode of inheritance of resistance in coffee to leaf miner *Perileucoptera coffeella*. *Euphytica* 105:7-15.
- Guerreiro Filho, O.; Medina Filho, H. P.; Carvalho, A., 1991. Fontes de resistência ao bicho-mineiro, *Perileucoptera coffeella*, em *Coffea* spp. *Bragantia* 50(1):45-55.
- Guerreiro Filho, O.; Mazzafera, P., 2000. Caffeine does not protect coffee against the leaf miner *Perileucoptera coffeella*. *J. Chem. Ecol.* 26(6):1447-1464.
- Harel, E.; Mayer, A. M.; Lehman, E., 1973. Multiple forms of vitis-vinifera catechol oxidase. *Phytochemistry* 12:2649-2654.
- Haruta, M.; Pederson, J. A.; Constabel, C. P., 2001. Polyphenol oxidase and herbivore defense in trembling aspen (*Populus tremuloides*): cDNA cloning, expression, and potential substrates. *Physiol. Plant.* 112:552–558.
- Koussevitzky, S.; Ne'eman, E.; Sommer, A.; Steffens, J. C.; Harel, E., 1998. Purification and properties of a novel chloroplast stromal peptidase - processing of polyphenol oxidase and other imported precursors. *J. Biol. Chem.* 273:27064-27069.
- Ky, C.; Noirot, M.; Hamon, S., 1997. Comparison of five purification methods for chlorogenic acids in green coffee beans (*Coffea* sp.). *J. Agric. Food Chem.* 45:786-790.

- Li, L.; Steffens, J. C., 2002. Overexpression of polyphenol oxidase in transgenic tomato plants results in enhanced bacterial disease resistance. *Planta* 215:239-247.
- Maxemiuc-Naccache, V.; Dietrich, S. M. C., 1985. Changes in phenols and oxidative enzymes in resistant and susceptible *Coffea arabica* inoculated with *Hemileia vastatrix* (Coffee rust). *Rev. Bras. Bot.* 8:185-190.
- Mayer, A. M.; Harel E., 1979. Polyphenol oxidases in plants. *Phytochemistry* 18:193-215.
- Mazzafera, P.; Gonçalves, W., Fernandes, J. A. R., 1989. Fisiologia de plantas. Fenóis e polifenoloxidase na resistência do cafeeiro a *Meloidogyne incognita*. *Bragantia* 48(2):131-142.
- Mazzafera, P.; Magalhães, A. C. N., 1989. Resistência induzida no complexo *Coffea arabica* L. *Hemileia vastatrix* Berk.: Fenóis e Enzimas. *Turrialba* 39(3):334-345.
- Mazzafera, P.; Robinson, S. P., 2000. Characterization of polyphenol oxidase in coffee. *Phytochemistry* 55:256-296.
- Newman, S. M.; Eannetta, N. T.; Yu, H.; Prince, J. P.; Vicente, M. C.; Tanksley, S. D. Steffens, J. C., 1993. Organisation of the tomato polyphenol oxidase gene family. *Plant Mol. Biol.* 21:1035-1051.
- Ramiro, D. A., 2003. Alterações histoquímicas em genótipos resistentes e suscetíveis ao bicho-mineiro-do-cafeeiro. Instituto Agronômico de Campinas, Campinas/SP. Dissertação de mestrado. 73p.
- Robinson, P. S.; Dry, I. B., 1992. Broad bean leaf polyphenol oxidase is a 60-kilodalton protein susceptible to proteolytic cleavage. *Plant Physiol.* 99:317-323.
- Shimizu, M. M., 2004. Polifenoloxidase como fator de resistência da soja a nematóide e

- na oxidação do palmito. UNICAMP, Campinas/SP. Tese de Doutorado. 107p.
- Swain, T.; Hills, W. E., 1959. The phenolic constituents os *Prunus domestica*. I. The quantitative analysis of phenolic constituents. *J. Sci. Food. Agric.* 10:63-68.
- Thipyapong, P., Hunt, M. D., Steffens, J. C., 1995. Systemic wound induction of potato (*Solanum tuberosum*) poyphenol oxidase. *Phytochemistry* 40(3):673-676.
- Thygesen, P. W.; Dry, I. B.; Robinson, P. S., 1995. Polyphenol oxidase in potato: a multigene family that exhibits differential expression patterns. *Plant Physiol.* 109:525-531.
- Wang, J. H.; Constabel, C. P., 2003. Biochemical characterization of two diferentially expressed polyphenol oxidases from hybrid poplar. *Phytochemistry* 64(1):115-121.
- Warner, L. A.; Li, G.; Ware, D.; Somssich, I. E.; Davis, K. R., 1995. The phenylalanine ammonia-lyase gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* 27:327-338.

CAPÍTULO III

Controle da síntese de ácido clorogênico em folhas e em frutos de *Coffea arabica*

1. INTRODUÇÃO

Ácidos clorogênicos (CGAs) são produtos do metabolismo de fenilpropanos e compreendem um grupo de ésteres formados entre certos ácidos *trans*-cinâmicos e o ácido quínico, sendo eles os ácidos cafeoilquínico, feruloilquínico e *p*-coumaroilquínico, bem como seus isômeros. Dentre estes isômeros, o ácido 5-cafeoilquínico é o de mais ampla distribuição em plantas superiores e por isso comumente é tratado pelo nome genérico de ácido clorogênico. Os CGAs são referidos como compostos de reserva de importância durante o crescimento inicial da planta e provavelmente estão envolvidos nos processos de lignificação (Schoch *et al.*, 2001; Aerts & Baumann, 1994). Também estão envolvidos em mecanismos de interação das plantas com outros organismos, podendo ter ligação com mecanismos de resistência ao ataque de herbívoros e patógenos (Felton & Duffey, 1991; Summers & Felton, 1994; Kranthi *et al.*, 2003; Shadle *et al.*, 2003). Mais recentemente, vêm ganhando importância para a saúde humana, sendo ressaltada sua capacidade antioxidante e seu efeito antagonista a opióides e ao transporte de glicose e, portanto, no combate ao diabetes (Flores *et al.*, 2000; Daglia *et al.*, 2000; Nardine *et al.*, 2002; Paulis *et al.*, 2002; Sotillo & Hadley, 2002; Chun *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2003; Frank *et al.*, 2003).

Os CGAs têm importância bastante grande para a indústria cafeeira. Quantitativamente, são importantes constituintes dos grãos de café, podendo representar de 5-8% e 7-11% nas espécies *Coffea arabica* e *Coffea canephora*, respectivamente (Clifford, 1985; Balyaya & Clifford, 1985; Ky *et al.*, 2001). Estas duas espécies representam quase que a totalidade do café consumido no mundo, sendo que a primeira representa mais de 75% e é tida como o padrão de referência para o

café como bebida, sendo a segunda de bebida neutra e não existindo até o momento um sistema de classificação para a bebida resultante dos seus grãos (Söndahl & Lauritis, 1992). Ohiokpehai *et al.* (1982) ressaltaram que isto por si só seria suficiente para sugerir que os CGAs têm influência na bebida do café e explicaria a diferença de seu sabor nessas duas espécies.

Vários isômeros de CGAs são encontrados nas sementes de café, sendo os mais abundantes 3-cqa (ácido 3-cafeoilquínico), 4-cqa (ácido 4-cafeoilquínico), 5-cqa (ácido 5-cafeoilquínico), 3,4-dicqa (ácido 3,4-dicafeoilquínico), 3,5-dicqa (ácido 3,5-dicafeoilquínico), 4,5-dicqa (ácido 4,5-dicafeoilquínico), 3-fqa (ácido 3-feruloilquínico), 4-fqa (ácido 4-feruloilquínico) e 5-fqa (ácido 5-feruloilquínico) (Clifford, 1985).

Variações qualitativas e quantitativas no conteúdo de CGAs ocorridas durante o desenvolvimento do fruto também parecem ser importantes na qualidade final do aroma e sabor do café. Clifford e Kazi (1987) e Menezes e Clifford (1987) observaram que durante o desenvolvimento do fruto ocorre uma redução nos níveis de CGAs nas sementes com o avanço da maturação. Também observaram que ocorre alteração na proporção dos isômeros presentes na semente de café. Menezes (1994) encontrou que a proporção de monoisômeros em relação aos diisômeros é maior nos frutos com maturação mais avançada e observou que a proporção final desses isômeros no café a ser processado pode influenciar na qualidade da bebida. Para a planta, entretanto, essas alterações podem estar relacionadas a características adaptativas, como por exemplo, com o modo de dispersão das sementes, como sugerido por (Bertrand *et al.*, 2003), com o estabelecimento das plantas (Aerts & Baumann, 1994), ou com a resistência a herbívoros e patógenos.

Bertrand *et al.* (2003) analisaram o conteúdo de CGAs em folhas e frutos

de *C. pseudozanguebariae* em desenvolvimento e observaram que as alterações são mais acentuadas no final da maturação. Em *C. arabica* e *C. canephora*, Clifford e Kazi (1987) também mostraram alterações ocorridas nos últimos estádios do amadurecimento. Esse tipo de comportamento sugere que essas alterações podem estar sob regulação. Neste sentido, estudos envolvendo o controle da expressão de genes codificando para enzimas envolvidas na biossíntese de CGAs tornam-se promissores, sobretudo como auxílio para a compreensão do padrão de acúmulo desses compostos nas plantas.

A biossíntese do 5-cqa foi estudada em algumas plantas (Levy & Zucker, 1966; Kojima *et al.*, 1961; Kojima & Uritani, 1973; Steck, 1968; Stöckigt & Zenk, 1974; Rhodes & Woollorton, 1976; Ulbrich & Zenk, 1979; Schoch *et al.*, 2001; Hoffmann *et al.*, 2003), sendo conhecidas as enzimas envolvidas na sua formação. Resumidamente (figura 1), a biossíntese do 5-cqa inicia-se com a desaminação da fenilalanina pela enzima fenilalanina amônia-liase (PAL) para formar o ácido *trans*-cinâmico. Este é hidroxilado por um citocromo P450, a cinamato 4-hidroxilase (C4H), para formar ácido *p*-cumárico, que por sua vez pode ser hidroxilado para formar o ácido caféico, através da ação da enzima *p*-cumarato 3-hidroxilase (C3H), ou sofrer esterificação mediada pela enzima 4-cumaroil-CoA ligase (4CL). Neste passo, essa enzima também pode ter como substrato o ácido caféico (Rhodes & Woollorton, 1976). Numa etapa final, um ou os dois tioésteres (cumaroil-CoA e cafeoil-CoA) são transesterificados com o ácido quínico, por ação de uma transferase, a hidroxicinamoil-CoA:quinato hidroxicinamoiltransferase (CQT), formando assim os ácidos 5-coumaroilquínico ou 5-cafeoilquínico, respectivamente. De acordo com Hoffmann *et al.* (2003), o ácido coumaroilquínico pode ser convertido a ácido cafeoilquínico pela ação de uma hidroxilase similar à C3H.

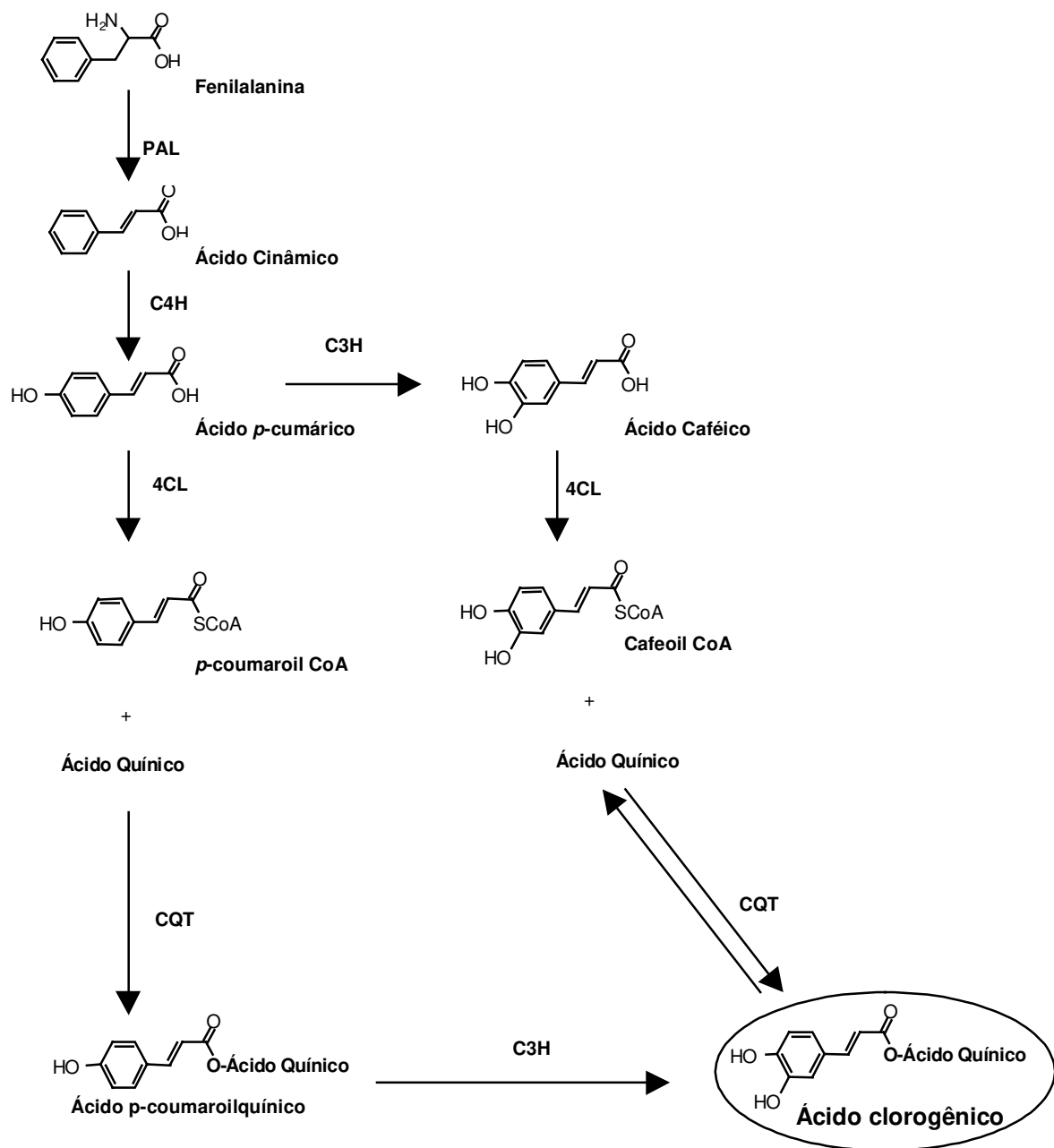


Figura 1: Esquema da via biossintética do ácido clorogênico. PAL– fenilalanina amônia-liase, C4H – cinamato 4-hidroxilase, C3H – coumarato 3-hidroxilase, 4CL – Hidroxicinamoil-CoA ligase, CQT–Hidroxicinamoil-CoA:D-quinato hidroxicinamoil transferase,

Com o término do programa brasileiro de seqüenciamento de EST's do

café (Coffee Genome Project - www.lge.ibi.unicamp.br/cafe) cresceram significativamente as possibilidades de estudos de expressão das enzimas do metabolismo do ácido clorogênico no cafeeiro. Portanto, o objetivo do presente estudo foi identificar possíveis mecanismos de regulação das enzimas da via biossintética do 5-cqa e melhor entender as alterações e o padrão de acúmulo desse composto em café. Para isto, foram feitas buscas de seqüências codificando essas enzimas no banco do projeto genoma café e foi estudada a sua expressão durante o desenvolvimento de folhas e frutos de *C. arabica* var. Mundo Novo.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Pesquisa do banco de ESTs do projeto genoma do café

Foram realizadas pesquisas no banco de seqüências expressas do projeto genoma do café (Coffee Genome Project - www.lge.ibi.unicamp.br/cafe) utilizando palavras chave que identificam as enzimas: fenilalanina amônia-liase (PAL), cinamato 4-hidroxilase (C4H), coumarato 3-hidroxilase (C3H), 4-coumaroil-CoA ligase (4CL) e hidroxicinamoil-CoA:quinato hidroxicinamoil transferase (CQT). Para esta última enzima, a pesquisa também foi feita utilizando a seqüência do gene de tabaco (Hoffmann *et al.*, 2003). As seqüências de ESTs localizadas foram clusterizadas (programa Clustal) e dos contigs formados para cada enzima, foram selecionados aqueles com maior número relativo de seqüências provenientes de duas bibliotecas feitas a partir de frutos. Esses contigs foram traduzidos e a seqüência deduzida de aminoácidos de cada proteína foi utilizada para uma nova busca (Blast-P) no banco NCBI (National Center for Biotechnology Information – <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) para confirmar a identidade dos mesmos.

2.2. Desenho de primers

Partindo dos contigs selecionados, foram feitas combinações de primers (“sense” e “antisense”) dentro de cada seqüência de maneira a se obter fragmentos de tamanhos diferentes na amplificação via PCR. Como para cada contig foram desenhados 4 ou 5 primers, isto permitia pelo menos 4 combinações, ou quatro fragmentos a serem amplificados. Uma vez que se tinha conhecimento do número de pares de bases dos fragmentos esperados, esta foi uma primeira maneira utilizada para certificar de que estávamos trabalhando com as seqüências previstas. Os primers desenhados foram denominados:

para PAL → PAL-0R, PAL-4R, PAL-0L e PAL-4L;
para C4H → C4H-0R, C4H-1R, C4H-0L e C4H-1L;
para C3H → C3H-0R, C3H-1R, C3H-0L e C3H-1L;
para 4CL → 4CL-0R, 4CL-3R, 4CL-4R, 4CL-0L e 4CL-4L;
para CQT → CQT-0R, CQT-1R, CQT-0L e CQT-1L.

R indica os primers “sense” e L os primers “antisense”.

2.3. Material vegetal

2.3.1. Busca de um modelo de estudo

Para verificar o controle da biossíntese de 5-cqa procuramos por um modelo de estudo, uma vez que o desenvolvimento de frutos de café poderia tomar muito tempo, dado que o período decorrido entre o florescimento e a maturação leva em torno de 34 semanas. Na busca de um modelo de estudo, onde as expressões das enzimas pudessem ser correlacionadas com a síntese do 5-cqa, foram realizados alguns ensaios:

Ensaio 1 - Infiltração com intermediários da via biossintética dos CGAs em discos foliares. Neste ensaio, discos foliares foram infiltrados com ácido cinâmico, ácido coumárico, ácido caféico e ácido quínico, e em seguida foram colocados numa câmara úmida e expostos à luz branca (lâmpadas incandescentes). Após 12, 24 e 48 h, analisou-se o conteúdo de 5-cqa nos discos.

Ensaio 2 - Efeito da luz. Folhas, em expansão, de uma planta adulta foram envolvidas com papel alumínio, de maneira que ficassem completamente no escuro. Após 20 dias, retirou-se o papel alumínio e analisou-se o conteúdo de 5-cqa em comparação com uma folha não coberta. Também analisou 5-cqa após 12 e 24 h da

retirada do papel alumínio;

Ensaio 3 - Exposição à luz de plantas germinadas no escuro. Sementes foram germinadas em vermiculita e mantidas no escuro por sessenta dias. As plântulas estioladas obtidas foram expostas à luz branca (lâmpadas fosforescentes) e nos tempos 0, 12, 24 e 48 h de exposição foram coletadas amostras para análise do conteúdo de 5-cqa.

Os três ensaios foram realizados com material de *C. arabica* var. Mundo Novo.

2.4. Estudos de expressão

Estudos de expressão foram conduzidos através de análise semi-quantitativa por RT-PCR (transcrição reversa seguida de reação em cadeia pela polimerase) utilizando o material listado abaixo:

1 - Do ensaio de exposição à luz de plantas germinadas no escuro, descrito no item 2.3.1, foram feitas coletas de plântulas estioladas com 60 dias de idade e que foram expostas à luz por 0, 12, 24 e 48 h. Dessas plântulas foram separados os hipocótilos e as folhas para análises. As raízes foram descartadas.

2 - Folhas em desenvolvimento foram coletadas de um cafeeiro de *C. arabica* var. Mundo Novo com 8 anos de idade, crescendo na área experimental do Departamento de Fisiologia Vegetal da Unicamp. Foram utilizadas folhas em 4 estádios de desenvolvimento, coletadas num mesmo ramo da planta. Foram considerados os estádios: 1 = folhas do primeiro par, 2 = folhas do segundo par, 3 = folhas do terceiro par e 4 = folhas do quinto par.

3- Frutos em desenvolvimento foram coletados de um cafeeiro de *C. arabica* var. Mundo Novo, com 8 anos de idade, crescendo na área experimental do

Departamento de Fisiologia Vegetal da Unicamp. Foram coletados frutos em vários estádios de desenvolvimento e destes foram separados os endospermas. Os seguintes estádios foram considerados: 1 = frutos verdes com endosperma em início de desenvolvimento e ainda com perisperma visível e ocupando a maior parte da loja; 2 = frutos verdes com endosperma ocupando toda loja, mas ainda de consistência gelatinosa; 3 = frutos verdes com endosperma ocupando toda loja e com consistência rígida e 4 = frutos maduros (cereja) com endosperma completamente desenvolvido. Para melhor caracterizar cada estágio, também foi quantificada a massa do endosperma em relação à massa total do fruto.

2.5. Extração de RNA

A extração de RNA foi feita com uso de perclorato de sódio (Rezaian & Krake, 1987). Aproximadamente 2 g do material vegetal foram macerados em nitrogênio líquido e homogeneizados por 30 min em 9 mL da solução: perclorato de sódio 5 M, Tris-HCl 300 mM, pH 8,3, EDTA 20 mM, SDS 1%, PVPP 8,5% e 2-mercaptoetanol 1%. O homogeneizado foi filtrado em lã de vidro e precipitado com 2,5 volumes de etanol absoluto a -20°C , por 20 min, e em seguida centrifugado a 8.000 rpm, 4°C , por 15 min. O precipitado foi dissolvido em 1,0 mL de Tris-EDTA, pH 8,0, e foram realizadas duas extrações com fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1, v/v/v) e uma extração com clorofórmio:álcool isoamílico (24:1, v/v). O RNA foi precipitado durante 30 min pela adição de 0,2 volumes de acetato de sódio 3 M, pH 5,2, e 2,5 volumes de etanol absoluto gelado a -20°C . Após centrifugação a 8.000 rpm, 4°C , por 20 minutos, o precipitado foi lavado duas vezes com etanol 70%. Depois de seco brevemente, o RNA precipitado foi solubilizado em 300 μL de água DEPC autoclavada. Para remoção de resíduos de DNA, o RNA foi em seguida

tratado com DNase livre de RNase, conforme protocolo do fabricante (Promega, 2000). A quantificação do RNA foi feita através da absorção a 260 nm, usando-se a fórmula:

$$\text{RNA total } (\mu\text{g}/\mu\text{L}) = (A_{260} \times F) / 25$$

onde F = fator de diluição, (ex: 5 μL RNA + 595 μL H₂O -> F = 120)

A qualidade do RNA total extraído foi verificada através de eletroforese por 30 min em gel de agarose 1% (p/v) na presença de brometo de etídio com posterior visualização sob luz ultravioleta.

2.5. Síntese da primeira fita de cDNA

A primeira fita do cDNA foi sintetizada a partir de 2,5 μg de RNA total, num meio de reação com volume final de 20 μL , contendo uma unidade de transcriptase reversa (AMV-RT, Promega), dNTP 0,5 mM e 1 mM de B26 (oligodT – Primer). Antes da adição da transcriptase reversa, a reação foi incubada a 80°C por 5 min e resfriada no gelo por 2 min. Em seguida, foram adicionados a enzima e o tampão de reação e incubou-se a 42°C por 60 min. A reação foi paralisada incubando-se o meio a 80°C por 15 min. O cDNA foi diluído para 200 μL com água destilada estéril e armazenado a -20°C.

2.6. RT-PCR semi-quantitativo

Os estudos por RT-PCR semi-quantitativo foram feitos conforme (Berdy *et al.*, 2001). Igual volume (5 μL) de cDNA de cada material foi utilizado na reação de RT-PCR, que foi conduzido com 25 ciclos, número empiricamente definido como condição não saturante dos níveis de amplificação.

Para amplificação foram utilizados os primers:

para PAL

PAL-4R (5' – acc gtc aag gar gca gtt ctc – 3')

PAL-4L (5' – agg cct tac atg gtg gca ac – 3');

para C4H

CH4-0R (5' – gcc tca aga tgg gaa tga aat cc – 3')

C4H-0L (5' – tcg caa cct cac tga cta cgc – 3');

para C3H

C3H-1R (5' – tcg gtc aag ttc ctc ttg cgc – 3')

C3H-1L (5' – tta cag cca tgg ttg att cc – 3');

para 4CL

4CL-4R (5' – aac ctt ggg taa acg ggt tc – 3')

4CL-4L (5' – tcc gac tcc gac tca aag atc – 3');

para CQT

CQT-1R (5' – tca cat caa ggc cac gg – 3 ')

CQT-0L (5' – aaa atc gag gtg aag gaa tcg – 3');

Como controle, primers degenerados de actina, gentilmente cedidos pela Dra. Miriam Peres Maluf, foram usados em reações paralelas usando os mesmos cDNAs. A actina é produto de um gene constitutivo que é expresso constantemente expresso. Após adição de *Taq* DNA polymerase e de tampão de reação (Promega), 0,5 mM dNTPs e 2,5 mM de MgCl₂, as reações foram aquecidas a 94°C por 2 min. A amplificação consistiu de 30 s de desnaturação a 94°C, seguido de 30 s de anelamento a 52°C e 1 min de extensão a 72°C. O volume total de cada reação foi

analisado por eletroforese em gel de agarose 1% (p/V) na presença de brometo de etídio e visualizado com luz ultravioleta.

Uma duplicata de cada reação de PCR foi utilizada para seqüenciamento dos fragmentos. Após eletroforese, os fragmentos foram extraídos do gel usando um kit de extração de DNA em gel de agarose (Montage Gel Extraction Kit – Millipore). O seqüenciamento foi feito no Hemocentro da Unicamp, utilizando um sequenciador MegaBace (Amersham Biosciences).

2.7. Extração e Quantificação do ácido 5-cafeoilquínico

Folhas e endospermas foram triturados em N₂ líquido e 50 mg foram extraídos com 1 mL de metanol 70%. A mistura foi agitada por uma hora na temperatura ambiente, centrifugada (15.000 rpm, 10 min) e o sobrenadante coletado para quantificação do 5-cqa.

As quantificações do 5-cqa foram feitas em sistema HPLC Shimadzu, equipado com autoinjeter SIL-AVP, detector de diodo PDA-10AVP, coluna Microsorb C18 (5µm, 4,6 x 250 mm) e sistema controlador Class-VP. Para isso, foram injetados 10 µL do extrato e registrou-se a absorção com leituras na faixa de 190-390 nm. Para cálculos, construiu-se uma curva padrão utilizando o 5-cqa puro (Sigma) com leituras de absorção a 326 nm. As análises cromatográficas foram realizadas em gradiente de 20 min de 10-80% de metanol em solução aquosa de 0,5% de ácido acético 0,5%, com fluxo constante de 1 mL/min.

3. RESULTADOS

3.1. Análise do banco de EST do projeto genoma do café

Para estudar a expressão da PAL, C4H, C3H, 4CL e CQT em folhas e frutos de café, informações sobre as seqüências dos genes codificando estas enzimas foram obtidas pela análise do banco de EST do projeto genoma do café.

Após a busca por palavras-chave nas várias bibliotecas usadas neste projeto, foram obtidas 74 seqüências com identidade significativa com PAL (valor de e entre 0 e $3e-13$), 51 seqüências com identidade significativa com C4H (valor de e entre 0 e $5e-11$), 42 seqüências com identidade significativa com C3H (valor de e entre 0 e $3e-9$), 53 seqüências com identidade significativa com 4CL (valor de e entre 0 e $8e-34$) e 45 seqüências com identidade significativa com CQT (valor de e entre 0 e $8e-34$). Essas seqüências foram clusterizadas (Clustal) e os contigs formados comparados entre si através do alinhamento global das seqüências usando o programa LALIGN (http://www.ch.embnet.org/software/LALIGN_form.html) (tabela 1).

Desses contigs, foram selecionados aqueles formados com maior número relativo de seqüências expressas oriundas de frutos. Assim, era possível que mesmo um contig com predominância de ESTs provenientes de folhas fosse escolhido. No projeto duas bibliotecas foram feitas a partir de frutos, uma com frutos ainda verdes e outra com frutos maduros. Seqüências provenientes da biblioteca de frutos maduros de *Coffea racemosa* foram excluídas. A proporção de seqüências oriundas de frutos dentro dos contigs selecionados foi de 6/21, 5/36, 4/16, 12/26 e 2/3 (EST de frutos/total de ESTs no contig), respectivamente para a PAL, C4H, C3H, 4CL e CQT (tabela 2).

Tabela 1: Identidade entre os contigs formados. Asteriscos identificam os contigs usados nos estudos.

Contig	Identidade (%) entre os contigs							Origem dos ESTs mais abundantes nos contigs
PAL	1	2	3	**4**	5	-	-	
1	-	-	-	-	-	-	-	Frutos
2	46,1	-	-	-	-	-	-	Folhas
3	65,1	45,2	-	-	-	-	-	Folhas
4	45,2	67,8	45,2	-	-	-	-	Folhas (7) e Frutos (6)
5	56,5	41,4	52,5	41,4	-	-	-	Folhas
C3H	1	**2**	3	4	5	6	7	
1	-	-	-	-	-	-	-	BP1
2	30,5	-	-	-	-	-	-	Frutos
3	47,8	46,5	-	-	-	-	-	Folhas
4	47,2	46,0	93,9	-	-	-	-	RM1, FR1 , FB1
5	41,3	41,5	44,9	44,0	-	-	-	CS1, RX1
6	34,3	60,4	38,9	39,2	45,9	-	-	RT8
7	44,5	37,3	47,3	47,3	67,9	40,3	-	RT8
C4H	**1**	2	-	-	-	-	-	
1	-	-	-	-	-	-	-	Folhas
2	39,0	-	-	-	-	-	-	Folhas (14) Calos ou Células (11) Frutos (5)
4CL	1	2	3	4	5	**6**	-	
1	-	-	-	-	-	-	-	Folhas
2	30,9	-	-	-	-	-	-	LP1, FB4
3	65,9	43,7	-	-	-	-	-	Folhas
4	25,7	43,6	28,0	-	-	-	-	CS1
5	37,6	43,9	41,5	38,3	-	-	-	Folhas
6	48,8	33,9	48,4	26,3	39,0	-	-	Frutos
CQT	**1**	2	3	4	-	-	-	
1	-	-	-	-	-	-	-	Frutos
2	46,7	-	-	-	-	-	-	
3	47,5	47,4	-	-	-	-	-	Folhas
4	48,1	49,3	89,5	-	-	-	-	Folhas

Tabela 2: Resumo da análise no banco de EST's do projeto genoma do café

Gene	Nº de contigs formados	Nº de EST's no contig escolhido	% de EST's de biblioteca de fruto
PAL	5	21	28,57
C4H	2	36	13,88
C3H	7	16	25,00
4CL	6	26	46,15
CQT	4	3	66,66

Estes contigs foram traduzidos e as seqüências deduzidas de

aminoácidos foram alinhadas com seqüências de outras plantas depositadas em banco público de dados (NCBI - blastp nr), apresentando identidade significativa (tabelas 3, 4, 5, 6 e 7). Nas figuras 2, 3, 4, 5 e 6, são mostrados os alinhamentos entre os contigs selecionados e as seqüências mais significativas.

Tabela 3: Identidade entre a seqüência de aminoácidos do contig PALCAC1 e seqüências de outras espécies.

Gene/Espécie	% /nº de aminoácidos	Acesso
<i>Nicotiana tabacum</i>	88,4/597	P45733
<i>Catheranthus roseus</i>	89,6/597	BAA95629
<i>Ipomea nil</i>	89,8/597	AAG45585
<i>Citrus limon</i>	87,8/597	Q42667
<i>Nicotiana tabacum</i>	89,3/597	P25872
<i>Coffea canephora</i>	84,0/597	AAN32866.1

Tabela 4: Identidade entre a seqüência de aminoácidos do contig C4HCAC3 e seqüências de outras espécies.

Gene/Espécie	% /nº de aminoácidos	Acesso
<i>Catharanthus roseus</i>	89,8/284	P48522
<i>Populus balsamifera</i> subsp. <i>Tricocarpa</i> x <i>P. destoides</i>	85,1/288	AAG50231
<i>Capsicum annuum</i>	85,7/286	AAG43824
<i>Gossypium arboreum</i>	83,4/289	AAG10197
<i>Helianthus tuberosus</i>	83,3/287	Q04468

Tabela 5: Identidade entre a seqüência de aminoácidos do contig C3HCAC2 e seqüências de outras espécies.

Gene/Espécie	% /nº de aminoácidos	Acesso
<i>Ammi majus</i>	76,1/507	AAT06912
<i>Glycine max</i>	73,7/513	O48922
<i>Arabidopsis thaliana</i>	73,8/508	NP_850337
<i>Lithospermum erythrorhizon</i>	75,5/510	BAC44836
<i>Sesamum indicum</i>	74,0/504	AAL47545

Tabela 6: Identidade entre a seqüência de aminoácidos do contig 4CLCAC12 e seqüências de outras espécies.

Gene/Espécie	% /nº de aminoácidos	Acesso
acil-CoA sintetase de <i>Capsicum annuum</i>	79,7/533	AAL29212
sintetase AMP-dependente de <i>Arabidopsis thaliana</i>	77,5/519	NP_190468
Coumarato-CoA ligase <i>Arabidopsis thaliana</i>	77,3/519	AAM65672
OSJNB0088H09.2 de <i>Oryza sativa</i>	67,8/525	CAC03444

Tabela 7: Identidade entre a seqüência de aminoácidos do contig CQTCAC1 e seqüências de outras espécies.

Gene/Espécie	% /nº de aminoácidos	Acesso
Hidroxicinamoil transferase (<i>Nicotiana tabacum</i>)	87,5/168	CAD47830
Anthranilato N-benzoiltransferase (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	77,8/167	AAM61215
Anthranilato N-benzoiltransferase (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	77,8/167	NP_199704
OSNBa0029H02.14 (<i>Oryza sativa</i>)	73,1/171	CAE01632
Hidroxiantranilato hydroxicinamoiltransferase (<i>Avena sativa</i>)	69,0/171	BAC78635

C4HPB	0	-----MDLLLEKTLGSEVAILVAIVSKLRGKFKLPPGPIPVVFGNWLOVGDDLNRNLTDLAKKFGDIIFLLRMGQRNLVVVSSPDLS
C4HHT		-----MDLLLEKTLVAFIAAIIIGAILVSKLRGKFKLPPGPIPVVFGNWLOVGDDLNRNLTDLAKKFGDIIFLLRMGQRNLVVVSSPELA
C4HCA		-----MDLLLEKTLVGLFFAIVVAIVSKLRGKFKLPPGPIPVVFGNWLOVGDDLNRNLTDLAKKFGDIIFLLRMGQRNLVVVSSPELA
C4HGA		-----MDLLLEKTLVGLFFAIVVAIVSKLRGKFKLPPGPIPVVFGNWLOVGDDLNRNLTDLAKKFGDIIFLLRMGQRNLVVVSSPELA
C4HCR		-----MDLLLEKTLVGLFFAIVVAIVSKLRGKFKLPPGPIPVVFGNWLOVGDDLNRNLTDLAKKFGDIIFLLRMGQRNLVVVSSPELA
C4HCAC3		SLRHQFHSITHASQPNQTSHSQQLIPSTALHTVMDLLLEKTLVGLFFAIVVAIVSKLRGKFKLPPGPIPVVFGNWLOVGDDLNRNLTDLAKKFGDIIFLLRMGQRNLVVVSSPELA
C4HPB	121	KEVLHTQGVEFGSRTRNVVFDIFTGKGQDMVFTVYGEHWRKMRRIMTVPFFTNKVVQYRYGWEEEAAQVVEDVKKNPEAATNGIVLRRRLQLMMYNMYRIMFDRRFESEDDPLFNKLR
C4HHT		KEVLHTQGVEFGSRTRNVVFDIFTGKGQDMVFTVYGEHWRKMRRIMTVPFFTNKVVQYRYGWEAEAAAVVDDVKKNPAATTEGIVLRRRLQLMMYNMYRIMFDRRFESEDDPLFNKLR
C4HCA		KEVLHTQGVEFGSRTRNVVFDIFTGKGQDMVFTVYGEHWRKMRRIMTVPFFTNKVVQYRYGWESEVAVVDDVKKNPEAATNGIVLRRRLQLMMYNMYRIMFDRRFESEDDPLFNKLR
C4HGA		KEVLHTQGVEFGSRTRNVVFDIFTGKGQDMVFTVYGEHWRKMRRIMTVPFFTNKVVQYRYGWEDEAAASVDDVKKNPEAATNGIVLRRRLQLMMYNMYRIMFDRRFESEDDPLFNKLR
C4HCR		KEVLHTQGVEFGSRTRNVVFDIFTGKGQDMVFTVYGEHWRKMRRIMTVPFFTNKVVQYRYGWEEEAARVVEDVKKNPEAATNGIVLRRRLQLMMYNMYRIMFDRRFESEDDPLFNKLR
C4HCAC3		KEVLHTQGVEFGSRTRNVVFDIFTGKGQDMVFTVYGEHWRKMRRIMTVPFFTNKVVQYRYGWEAEAAAVVDDVKKNPEAATNGIVLRRRLQLMMYNMYRIMFDRRFESEDDPLFNKLR
C4HPB	241	ALNGERSRLAQSFEYNYGDFIPILRPFLRGYLIKICEVKERRLOLFKDYFVDERKKLASTKNMSNEGLKCAIDHILDAQQKGEINEDNVLYIVENINVAAIETTLWSIEWGIAELVNHPE
C4HHT		ALNGERSRLAQSFEYNYGDFIPILRPFLRNYLKICEVKDKRLOLFKDYFVDERKKIGSTKKMDNNOLKCAIDHILEAKEKGEINEDNVLYIVENINVAAIETTLWSIEWGIAELVNHPE
C4HCA		ALNAERSRLAQSFEYNYGDFIPILRPFLRGYLIKICEVKERRLOLFKDYFVDERKKLSNTKSMDSNALKCAIDHILEAQKGEINEDNVLYIVENINVAAIETTLWSIEWGIAELVNHPE
C4HGA		ALNGERSRLAQSFEYNYGDFIPILRPFLRGYLIKICEVKERRLOLFKDYFVDERKKLATTKRIDNNALKCAIDHILEAQKGEINEDNVLYIVENINVAAIETTLWSIEWGIAELVNHPE
C4HCR		ALNGERSRLAQSFEYNYGDFIPILRPFLRGYLIKICEVKERRLOLFKDYFVDERKKFGSTKSMDSNLSLKCAIDHILEAQKGEINEDNVLYIVENINVAAIETTLWSIEWGIAELVNHPE
C4HCAC3		ALNGERSRLAQSFEYNYGDFIPILRPFLRGYLEIKICEVKERRLOLFKITSIT-KEELASTTSMGNSLSLKCAIDHILEHSGDRI-----
C4HPB	361	IQQKLRHEDTLLGPGHQITEPDYKLPYLNAVIKETLRLRMAIPLLVPHMNLHDAKLGFDIPAESKILVNAWWLANNPAHWKNPEEFRPERFLEEEAKVEANGNDFRYLPFGVGRSC
C4HHT		IQAKLREHDTKLPGVQITEPDVQNLPLYQAVVKETLRLRMAIPLLVPHMNLHDAKLGFDIPAESKILVNAWWLANNPDQWKKPEEFRPERFLEEEAKVEANGNDFRYLPFGVGRSC
C4HCA		IQQKLREEIDAVLPGVQVTEPDTHKLPDLQAVIKETLRLRMAIPLLVPHMNLHDAKLAGYIPAESKILVNPWWLANNPAHWKKPEEFRPERFLKEEKHVDANGNDFRYLPFGVGRSC
C4HGA		IQQKLREIDTVLPGVQVTEPDTHKLPYLQAVIKETLRLRMAIPLLVPHMNLHDAKLGFDIPAESKILVNAWWLANNPAHWKNPEEFRPERFEEESKVEANGNDFRYLPFGVGRSC
C4HCR		IQQKLRELETVLPGVQITEPDYKLPYLQAVIKETLRLRMAIPLLVPHMNLHDAKLGFDIPAESKILVNAWWLANNPEHWKKPEEFRPERFLEESKVEANGNDFRYLPFGVGRSC
C4HCAC3		-----
C4HPB	481	PGIILALPILGITLGRIVQNFELLPPPGQSKIDTAEGGQFSLHILKHSTIVAKPRSF
C4HHT		PGIILALPILGITIGRLVQNFELLPPPGQSKIDTDEKGGQFSLHILKHSTIVAKPRSF
C4HCA		PGIILALPILGITLGRIVQNFELLPPPGQSKIDTTEKGGQFSLHILKHSTIVAKPRSF
C4HGA		PGIILALPILGITLGRIVQNFELLPPPGQSKIDTSEKGGQFSLHILKHSTIVAKPRVF
C4HCR		PGIILALPILGITIGRLVQNFELLPPPGQSKIDTSEKGGQFSLHILKHSTIVLKPRTF
C4HCAC3		-----

Figura 3: Alinhamento das seqüências mais representativas. C4HCAC3, seqüência de *Coffea arabica* identificada neste trabalho; C4HCR, cinamato 4-hidroxilase de *Catharanthus roseus* (acesso: P48522); C4HPB, cinamato 4-hidroxilase de *Populus balsamifera* subsp. *Tricocarp* x *P. destoides* (acesso: AAG50231); C4HCA, cinamato 4-hidroxilase de *Capsicum annuum* (acesso: AAG43824); C4HGA, cinamato 4-hidroxilase de *Gossypium arboreum* (acesso: AAG10197); C4HHT, cinamato 4-hidroxilase de *Helianthus tuberosus* (acesso: Q04468). Em preto, resíduos conservados em todas as seqüências.

C3HCAC2	0	ASGTKQATVPTSSSTILFYFFMVSKLKPSYP	MALLLILLPV-AFIFLAYSLEYERLRFKLP	PPGPRPKPVVGNLYDIKPVRFKCYAEWSKLYGPI	SVYFGS	QLNTVVNTAELAKEVLKNDQ
C3HLE		-----MALPAIP	LAIIFLI-----IS--YKLYQKRLRLKLP	PPGPRPLPIIGNIYQVKPVKFRCFYNWSKTYGPI	SIYYGSQ	MNVIVSTTELAKVLEKNDQ
C3HAM		-----MALFLYLIIP	CTIILLQLYHKLRFLKLP	PPGPRPWPVGNLYDIEPVRFRCFNNWSKTYGPI	SVWFGST	LNIVVNTELAKEVLKDKDQ
C3HGM		-----MALLLIIP	ISLVTLWLGTYTLQRLRFKLP	PPGPRPWPVVGNLYDIKPVRFRCFAEWAQSYGPI	SVWFGST	LNIVVSNSELAKEVLKEHDQ
C3HAT		-----MSWFLIAVAT	-IAAVVSYKLIQRLRYKFP	PPGSPKPIVGNLYDIKPVRFRCVYEAQSYGPI	SVWIGSIL	NVVVSSAELAKEVLKEHDQ
C3HSI		-----MALPLILS	-FLTIFIAKLFQRLRYKLP	PPGPRPLPVVGNLYDIKPLVRCFTEWSQVYGPI	SVYLGSHLSVVVN	SSAELAKEVLKNDQ
C3HCAC2	121	QLADRYRTRPSARMSRNCODLIWADYGPHYVKVRKLCNLELFTPKRLEGLRPTREDEV	TAMVDSIFKDC	TKPENKGSLLMRNYLGSVAFNNITRLTFGKRF	MNSEGVVDE	QOQEFKCIIV
C3HLE		HLADRFTRSSASMSRGKDLIWADYGPHYVKVRKLCNVELFSPKRLEAIRPMREDEV	TALVESIYKDC	TKPELKGKSLLVREYLSSVAFNNITRLAFGKRF	MSNGVVDG	QOQEFKCIIV
C3HAM		QLADRHRSRSAAKFSRDGODLIWADYGPHYVKVRKVCLELFTPKRLEAIRPVEDEV	TAMVESIYKDC	TNSDTIGKSLLRQYLGAVAFNNITRLAFGKRF	VNSEGVVDE	QOQEFKCIIV
C3HGM		LLADRHRSRSAAKFSRDGKDLIWADYGPHYVKVRKVCLELFTPKRLEAIRPVEDEV	TAMVESIYKDC	TNSDTIGKSLLRQYLGAVAFNNITRLAFGKRF	VNSEGVVDE	QOQEFKCIIV
C3HAT		KLADRHRRNRSTAFSRNCODLIWADYGPHYVKVRKVCLELFTPKRLESRLPTREDEV	TAMVESVFRDC	CNLPENRAGLQRLKYLGAFAFNNITRLAFGKRF	MNAEGVVDE	QOQEFKCIIV
C3HSI		QLANRRNRTRQIAKFSKNGADLIWSDYGPHYVKVRKVCLELFTSMKRLEGLRPTREDEV	TAMVESIYKDC	CNKPENKGSLLMRNYLGSVAFNNITRLTFGKRF	MSNGVVDG	QOQEFKCIIV
C3HCAC2	241	SNGIRIGAKLSVADHLPWLRWTFVGENEDLDKHNARRDKLRTIMEEHTLARQKSGNTK	QHFVDALLTLQK	YDLSDDTVIGLLWDMITAGMDITTTISVEWAMAELVKNPRVQOK	QOQEFKCIIV	
C3HLE		HDGIKITAKLSIAEYLPWIRWMFKVEGDALDKFAADRDHLTRVIMEEH----	IKSGNTKQHFVDALLTLQK	YDLSDDTVIGLLWDMITAGMDITTTISVEWAMAELVKNPRVQOK	QOQEFKCIIV	
C3HAM		ANGLKLGASLATAEHIQWLRWTFPLEEEAFKKGARRDNLTRAIMEEHTLARQKSGGT	KQHFVDALLTLQK	YDLSDDTVIGLLWDMITAGMDITTTISVEWAMAELVKNPRVQOK	QOQEFKCIIV	
C3HGM		ENGLKLGASLATAEHIQWLRWTFPLEEEAFKKGARRDNLTRAIMEEHTLARQKSGGT	KQHFVDALLTLQK	YDLSDDTVIGLLWDMITAGMDITTTISVEWAMAELVKNPRVQOK	QOQEFKCIIV	
C3HAT		SNGLKLGASLATAEHIQWLRWTFPLEEEAFKKGARRDNLTRAIMEEHTLARQKSGGT	KQHFVDALLTLQK	YDLSDDTVIGLLWDMITAGMDITTTISVEWAMAELVKNPRVQOK	QOQEFKCIIV	
C3HSI		HNGIKLGTKKSWAEFLPWRFLEFKTENQLLAEDDALDSFTKKIMQEHTLARQKSGGT	KQHFVDALLTLQK	YDLSDDTVIGLLWDMITAGMDITTTISVEWAMAELVKNPRVQOK	QOQEFKCIIV	
C3HCAC2	361	DRVIGSDRIMTEADFAKLPYLQCVAKAELRLHPPTPLMLPHRANANVKIGGYDIPKGS	IVHVNVAW	ARDPAVWKNPFEFRPERFLEEDVDK	KGHDVRLLPFGAGRR	CPGAQLAINLVT
C3HLE		DRVVGPRIMTEADVPKLPYLQCVAKAELRLHPPTPLMLPHRANANVKIGGYDIPKGS	IVHVNVAW	ARDPAVWKNPFEFRPERFLEEDVDK	KGHDVRLLPFGAGRR	CPGAQLAINLVT
C3HAM		DRVIGYERVLTEADFSNLPYLQCVAKAELRLHPPTPLMLPHRANANVKIGGYDIPKGS	IVHVNVAW	ARDPAVWKNPFEFRPERFLEEDVDK	KGHDVRLLPFGAGRR	CPGAQLAINLVT
C3HGM		DRVIGLERVMTBADFSNLPYLQCVAKAELRLHPPTPLMLPHRANANVKIGGYDIPKGS	IVHVNVAW	ARDPAVWKNPFEFRPERFLEEDVDK	KGHDVRLLPFGAGRR	CPGAQLAINLVT
C3HAT		DRVVGLEDRILTEADFSNLPYLQCVAKAELRLHPPTPLMLPHRANANVKIGGYDIPKGS	IVHVNVAW	ARDPAVWKNPFEFRPERFLEEDVDK	KGHDVRLLPFGAGRR	CPGAQLAINLVT
C3HSI		DRVVGSDRIMTEADIPNLPYLQCVAKAELRLHPPTPLMLPHRANANVKIGGYDIPKGS	IVHVNVAW	ARDPAVWKNPFEFRPERFLEEDVDK	KGHDVRLLPFGAGRR	CPGAQLAINLVT
C3HCAC2	481	SMLGHLHHFTWSPPPGVPRPEEIDLES	PGVTYMRTPLOAVATPRLE-AHLNRPVEL-			
C3HLE		SSLGHLHHFTWSPQPGVKPEEIDLES	ENPGVTYMRNPVKAVVSPRLSAVHLYKRVEDM-			
C3HAM		SMLGHLHHYSWAPPSGLSSDEIDMS	ESPGVTYMRTPLOAVATPRLE-SQLYKRLAVEDM			
C3HGM		SMLGHLHHFCWTPPEGMKPEEIDMG	ENPGLVTYMRTPLOAVVSPRL-SHLYKRVPAEI-			
C3HAT		SMMSHLHHFVWTPPGCTKPEEIDMS	ENPGLVTYMRTPLOAVATPRLE-SDLYKRVPYDM-			
C3HSI		SMLGHLHHFTWTPPGCTKPEEIDMG	ENPGLVTYMRTPLOAVATPRLE-ADLFKRVASGNV			

Figura 4: Alinhamento das seqüências mais representativas. C3HCAC2, seqüência de *Coffea arabica* identificada neste trabalho; C3HAM, citocromo P450 de *Ammi majus* (acesso: AAT06912); C3HGM, citocromo P450 de *Glycine Max* (acesso: O48922); C3HAT, citocromo P450 de *Arabidopsis thaliana* (acesso: NP_850337); C3HLE, citocromo P450 de *Lithospermum erythrorhizon* (acesso: BAC44836); C3HSI, coumarato 3-hidroxilase de *Sesamum indicum* (acesso: AAL47545). Em preto, resíduos conservados em todas as seqüências.

```

4CLCAC12 0   TRPIFPHSSSFRLSLLSTFFLCPFLSMENLTLSGLLIKVAAKFPSRRAISVGRFDLSHARLHQLVERTATRLVA-AGVQPGDVIALTFPNSVEFVIAFLAVIRARATAAPLNPAYTAE
4CLCA       -----MECLITLTGFLKHVAEKYPSHRAISVSGRLDITHARLQQLVERAASQIVA-AGVKPGDVVALTFPNTIEFVIMFLAVIRARATAAPLNSAYMAEE
4CLAT1      -----MDSDTLSGLLENVAKKFPDRRALSVSQKFNLT HARLHDLIERAASRLVSDAGIKPGDVVALTFPNTVEFVIMFLAVIRARATAAPLNAAYTAE
4CLAT2      -----MDSDTLSGLLENVAKKFPDRRALSVSQKFNLT HARLHDLIERAASRLVSDAGIKPGDVVALTFPNTVEFVIMFLAVIRARATAAPLNAAYTAE
4CLOS       -----METPTLTTLTKAAVATFPSRRALAVPGKVDLSHAALDALVDAARLAADAGVLPCHVVALAFPNTEVELVIMFLAVIRARATAAPLNPAQTQEE

4CLCAC12 121 FEFYLSDSKILLTSKOGSAPAAQAASKINIPHVTVALPDADSDVALSSSLSQYESDPEPDNLSSKILNDPSDI SLFLHTSGTTSRPKGVPLTQNLVSVNNIKSVYRITESDSTVI
4CLCA       FEFYLSDES KILLT TAKEGNEAAQAASKLKIPRISVTLSQPSDVA FSP-----APPESDLESMSKIVNEPSDVGLFLHTSGTTSRPKGVPLAQNLNLSVNNIKSVYKLSDDTSTVI
4CLAT1      FEFYLSDSKILLTSKEGNAPAAQAASKLKISHVTATLLDAGSDLVLSV-----ADSDSVVDSATELVNHPDDGALFLHTSGTTSRPKGVPLTQNLASVKNIKAVYKLTESDSTVI
4CLAT2      FEFYLSDSKILLTSKEGNAPAAQAASKLKISHVTATLLDAVSDLVLSV-----ADSDSVVDSATELVNHPDDGALFLHTSGTTSRPKGVPLTQNLASVKNIKAVYKLTESDSTVI
4CLOS       FEFYLSDSGARILITNPEGNVAAQAASKLGLAHTTASLKDAAGQVHLAG-----FPASAAAAAKDFANDPSDVGLFLHTSGTTSRPKGVPLTQNLAAVSVNIRAVYRLTEADATVI

4CLCAC12 241 VLPLFHVHGLLAGLLSSVGAGGAVTLPAAGRFSASTFWSDMKYNNATWYTAVPTI HQIILDRHLNSPEVYRRLRFIRSCSAALAP SILARLEEFACAPVLEAYAMTEASHLMASNPLPQ
4CLCA       VLPLFHVHGLIAGLLSSLGAGAAVTLPAAGRFSASTFWSDMKYNNATWYTAVPTI HQIILDRHLSKPESDYPKLRFIRSCSAALAP SVMARLEEFAPVLEAYAMTEATHLMASNPLPE
4CLAT1      VLPLFHVHGLLAGLLSSLGAGAAVTLPAAGRFSATTFWPDMMKYNNATWYTAVPTI HQIILDRHASHPETEYKPLRFIRSCSASLAPVILSRLEEFACAPVLEAYAMTEATHLMSSNPLPE
4CLAT2      VLPLFHVHGLLAGLLSSLGAGAAVTLPAAGRFSATTFWPDMMKYNNATWYTAVPTI HQIILDRHASHPETEYKPLRFIRSCSASLAPVILSRLEEFACAPVLEAYAMTEATHLMSSNPLPE
4CLOS       VLPLFHVHGLLAGLLSLASGASVTLPAAGRFSASTFWADMRGAGATWYTAVPTI HQIILDRHTSKPEAEYALRFIRSCSASLAPALMEKLEEFACAPVLEAYAMTEASHLMTSNPLPE

4CLCAC12 361 DGPVHPGSVGKPVGOEMAILDENGGKPEANANGEVCIIRGPNVTKGYKNNPEANKSAFQFGWFHTGDI GYLDSDGYL ELVGRIKELINRGGEKISPIEVDVAVLTHP DVAQAVAGVGPDDK
4CLCA       DGPVHPGSVGKPVGOEMAILNENGGELQGNANGEVCIIRGPNVTKGYKNNPEANKSAFQFGWFHTGDI GYLDSDGYL ELVGRIKELINRGGEKISPIELDAVAVLTHP DVAQAVAGVGPDDK
4CLAT1      DGPVHPGSVGKPVGOEMAILNEKEIQEPNNKGEVCIIRGPNVTKGYKNNPEANKAGFEFGWFHTGDI GYFDIDGYL ELVGRIKELINRGGEKISPIEVDVAVLTHP DVSQGVAFGVPDEK
4CLAT2      DGPVHPGSVGKPVGOEMAILNEKEIQEPNNKGEVCIIRGPNVTKGYKNNPEANKAGFEFGWFHTGDI GYFDIDGYL ELVGRIKELINRGGEKISPIEVDVAVLTHP DVSQGVAFGVPDEK
4CLOS       DGARKAGSVGRVGOEMAILDEEGRRVEAGKSGEVCIIRGANVTSGYKNNPEANEAFFFGWFHTGDI GVVDEEGYL ELVGRIKELINRGGEKISPIEVDVAVLTHP DVAQAVAGVGPDAK

4CLCAC12 481 YGEEINCAVIPREGANIDESEVSRHCKTNLAGFKVPKVFITDNLPKTASGKIQRRLVAEHFLAQISTAKVPKFGA
4CLCA       YGEEINCAVIPREGSNIDEAEVLRFCCKNLAAFKVPKVFITDNLPKTASGKIQRRLVAEHFLAQISTAKVPKFGA
4CLAT1      YGEEINCAVIPREGTTVTEEDIKAFCKKNLAAFKVPKVFITDNLPKTASGKIQRRLVAOHFLEKP-----
4CLAT2      YGEEINCAVIPREGTTVTEEDIKAFCKKNLAAFKVPKVFITDNLPKTASGKIQRRLVAOHFLEKP-----
4CLOS       YGEEINCAVIPREGVSLGEEVSLAYCRRNLAAFKVPKVFITADELPKTATGKIQRRLVAOHFVVPVLPKTA-----

```

Figura 5: Alinhamento das seqüências mais representativas. 4CLCAC12, seqüência de *Coffea arabica* identificada neste trabalho; 4CLCA, acil-CoA sintetase de *Capsicum annuum* (acesso: AAL29212); 4CLAT1, sintetase AMP-dependente de *Arabidopsis thaliana* (acesso: NP_190468); 4CLAT2, coumarato-CoA ligase *Arabidopsis thaliana* (acesso: AAM65672); 4CLOS, OSJNB0088H09.2 de *Oryza sativa* (acesso: CAC03444). Em preto, resíduos conservados em todas as seqüências.

CQTOS	0	-----MAITVRRSTMVRPAWETPRVRLWNSNLDLVVERFHTPSVYFYRRG
CQTAS		-----MKLTIVRSSTVVVPAETPRVRLWNPDLVVERFHTPSVYFYRRG
CQTAT1		-----MKINIRDSTMVRPATETPITNLWNSNVDLVVERFHTPSVYFYRPT
CQTAT2		-----MKINIRDSTMVRPATETPITNLWNSNVDLVVERFHTPSVYFYRPT
CQTNT		-----MKIEVKESTMVKPAAETPQRLWNSNVDLVVERFHTPSVYFYRPT
CQTCAC1		PRVRSDFSRLKSNPLRTPYLRQHHCYPYFHSHPACHLLLLLLFLFEFLIPPNNILPSQLFSCCTCQARIQIQLSTKKEVKE TMVRPAQETPGRNLWNSNVDLVVERFHTPSVYFYRPT
CQTOS	121	PEGGGAPEGFDFGERMRRALAEALVPFYPMAGRLARDEDGRVEIDCNGEGVLFEVADAPDASVDDYGDFAPTMELKRLIPAVDYTDITSSFSLLVLQVITYFKCGGVS LGVGMQHHAADGM
CQTAS		--GDGDACCYFDAARMRRALAEALVPFYPMAGRLAHDEDGRVEIDCNAEGVLFEVADAPDGAVDDEGDFAPTMGLKRLIPTVDFTGCISSYPLLVOVTHFKCGGVALGIGMQHHVADGF
CQTAT1		-----GASNFFDPQVMKEALS KALVPFYPMAGRLKRDDDGRIEIDCNGAGVLFEVADT-PSVIDDEGDFAPTMNLRLIPEVDHSTGIHSFPLLVLQVITFFKCGGAS LGVGMQHHAADGF
CQTAT2		-----GASNFFDPQVMKEALS KALVPFYPMAGRLKRDDDGRIEIDCNGAGVLFEVADT-PSVIDDEGDFAPTMNLRLIPEVDHSTGIHSFPLLVLQVITFFKCGGAS LGVGMQHHAADGF
CQTNT		-----GSPNFFDPQVMKEALS KALVPFYPMAGRLCRDEDDGRIEIDCKGQGVLFVEAES-DGVVDDEGDFAPTMELRLIPEVDYSQGIQS YALLVLQVITFFKCGGVS LGVGMQHHAADGA
CQTCAC1		-----GSSNFFDAKVLKDALSRALVPFYPMAGRLKRDEDDGRIEIECNGEGVLFEVADT-DGVVDDEGDFAPTMELRLIPEVDYSQGISS YALLVLQVITYFKCGGVS LGVGMQHHAADGF
CQTOS	241	SGLHFINSWSDLCRGQTQIAIMPFIDRTLLRARDPPPTPSYPHVEYQAPAMLSSVPQSVTANKTTTPTTAVDIFKLTRSDLGRLRSQ LPSGEGAPRFSTYAVLAAHVWRCVSLARGLPSEQ
CQTAS		SGLHFINSWSDLCRGVPIAVMPFIDRTLLRARDPPVPTHPHVEYQAPAMLGSEEPQALAGKPESPTAVDIFKLRSDDLGLRLAQLPTGEGAPRFSTYAVLGAHVWRCASLARGLAPEQ
CQTAT1		SGLHFINTWSDMARGLDLTIPPFIDRTLLRARDPPQPAFH HVEYQAPAPSMKIPLD----PSKSGPENTTVSIFKLTRDQLVALKAKSKEDGNTVSYSSYEMLAGHVWRSVVGKARGLPNDQ
CQTAT2		SGLHFINTWSDMARGLDLTIPPFIDRTLLRARDPPQPAFH HVEYQAPAPSMKIPLD----PSKSGPENTTVSIFKLTRDQLVALKAKSKEDGNTVSYSSYEMLAGHVWRSVVGKARGLPNDQ
CQTNT		SGLHFINTWSDMARGLDLTIPPFIDRTLLRARDPPQPPFHVEYQPPPTLKVTPEN--TPISEAVPETSVSIFKLTRDQINTLKAKSKEDGNTVNYSSYEMLAGHVWRSTCMARGLAHDQ
CQTCAC1		SGLHFI IHG-----LIWP-----VALMPCH-----
CQTOS	361	PTKLYCATDGRQRLQPLPEGYFGNVIFTATPLAEAGKVTSG-LADGAAVIEQALDRMNDSYCRSALDYLELQPDLSALVRGAHTFRCPNLGLTSWVRLPIHDADFGWGRPVFMGPGGIA
CQTAS		PTKLYCATDGRQRLTPTLPDGYFGNVIFTATPLAEAGKVTGS-LADGATTIQDALEKMDDEYCHSALDYLELQPDLSALVRGAHTFRCPNLGLTSWVRLPIHDADFGWGRPVFMGPGGIA
CQTAT1		ETKLYIATDGRSRLRPQLPPGYFGNVIFTATPLAVAGDLLSKPTWYAAGQIHDFLVRMDNDYLR S ALDYLEMQPDLSALVRGAHTYKCPNLGITSWVRLPIYDADFGWGRPIFMGPGGIP
CQTAT2		ETKLYIATDGRSRLRPQLPPGYFGNVIFTATPLAVAGDLLSKPTWYAAGQIHDFLVRMDNDYLR S ALDYLEMQPDLSALVRGAHTYKCPNLGITSWVRLPIYDADFGWGRPIFMGPGGIP
CQTNT		ETKLYIATDGRSRLRPSLPPGYFGNVIFTTTP IAVAGDIQSKPIWYAASKLHDALARMDNDYLR S ALDYLELQPDLSALVRGAHTFRCPNLGITSWVRLPIHDADFGWGRPIFMGPGGIA
CQTCAC1		-----
CQTOS	481	YEGLAFLVPSANKDGSLSIAISLQAEHMEKFRKLIFEV
CQTAS		YEGLAFLVPSANRDGSLSV AISLQAEHMEKFRKMIFDF
CQTAT1		YEGLSFVLPSP TNDGSLSV AISLQSEHMKLF EKFLFEI
CQTAT2		YEGLSFVLPSP TNDGSLSV AISLQSEHMKLF EKFLFEI
CQTNT		YEGLSFILPSP TNDGSSV AISLQAEHMKLF EKFLYDF
CQTCAC1		-----

Figura 6: Alinhamento das seqüências mais representativas. CQTCAC1, seqüência de *Coffea arabica* identificada neste trabalho; CQTNT, hidroxicinamoil transferase de *Nicotiana tabacum* (acesso: CAD47830); CQTAT1, anthranilato N-benzoiltransferase de *Arabidopsis thaliana* (acesso: AAM61215); CQTAT2, anthranilato N-benzoiltransferase de *Arabidopsis thaliana* (acesso: NP_199704); CQTOS, OSNBa0029H02.14 de *Oryza sativa* (acesso: CAE01632); CQTAS, hidroxiantranilato hidroxicinamoiltransferase de *Avena sativa* (acesso: BAC78635). Em preto, resíduos conservados em todas as seqüências.

Cada contig foi utilizado para desenhar primers (“sense” e “antisense”) para amplificar fragmentos dos transcritos. Para certificar de que o fragmento amplificado correspondia ao gene esperado, os primers foram combinados dois a dois, de modo que fossem obtidos fragmentos com número de pares de bases esperados (tabela 8).

Tabela 8: Tamanho esperado de fragmentos dos transcritos após amplificação

Gene	Combinação de primers		Nº de bases esperados na amplificação
	Primer 1	Primer 2	
PAL	PAL-0L	PAL-0R	593
	PAL-0L	PAL-4R	257
	PAL-4L	PAL-0R	839
	PAL-4L	PAL-4R	503
C4H	C4H-0L	C4H-0R	533
	C4H-0L	C4H-1R	605
	C4H-1L	C4H-0R	693
	C4H-1L	C4H-1R	765
C3H	C3H-0L	C3H-0R	586
	C3H-0L	C3H-1R	850
	C3H-1L	C3H-0R	275
	C3H-1L	C3H-1R	554
4CL	4CL-0L	4CL-0R	570
	4CL-0L	4CL-4R	743
	4CL-0L	4CL-3R	1238
	4CL-4L	4CL-0R	373
	4CL-4L	4CL-4R	566
	4CL-4L	4CL3R	1061
CQT	CQT-0L	CQT-0R	500
	CQT-0L	CQT-1R	528
	CQT-1L	CQT-0R	678
	CQT-1L	CQT-1R	757

Nas quatro combinações de primers utilizadas para cada gene, o tamanho do fragmento observado numa amplificação teste, utilizando cDNA obtido a partir de RNA folha, foi coincidente com o tamanho esperado. Na figura 7, são apresentados os resultados de ensaios de RT-PCR com duas combinações de

primers para cada gene. Algumas destas combinações foram escolhidas e os fragmentos isolados do gel e enviados para seqüenciamento, confirmando serem as seqüências esperadas, conforme comentaremos no item 3.3.

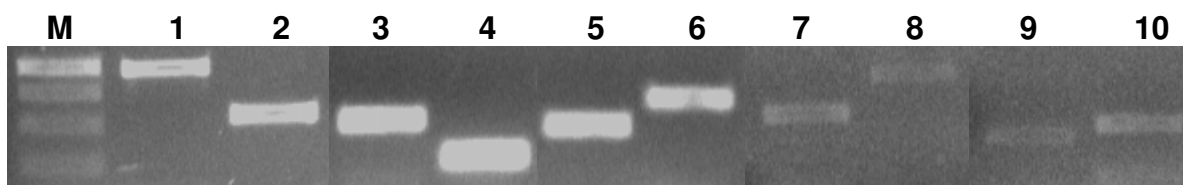


Figura 7: Gel de agarose 1% ilustrando amplificações obtidas.. M = Marcador (bandas de 1000, 750, 500, 250 pb); 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10 = fragmentos amplificados com primers 4CL-R3/4CL-L4, 4CL-4R/4CL-4L, PAL-4R/PAL-4L, PAL-4R/PAL-0L, C4H-0R/C4H-0L, C4H-1R/C4H-1L, C3H-1R/C3H-1L, C3H-1R/C3H-0L CQT-0R/CQR-0L e CQT-1R/CQT-0L, respectivamente.

3.2. Determinação de um modelo para modular a biossíntese de ácido clorogênico

Para estudar a expressão dos genes codificando para enzimas da via de biossíntese do 5-cqa procurou-se inicialmente um modelo no qual pudessem ser observadas variações significativas do conteúdo desse composto, como o fornecimento de compostos intermediários na via de biossíntese e através da indução da via biosintética do 5-cqa por uma condição estimulante. Somente em folhas de plântulas estioladas, obtidas a partir de sementes germinadas no escuro e expostas à luz foi possível observar alterações significativas nos níveis de 5-cqa. Houve aumento no conteúdo de 5-cqa após 24 hs de exposição e com 48 h de exposição à luz o conteúdo de 5-cqa era 2 vezes maior do que os níveis iniciais (figura 8). Após 72 e 96 h, o conteúdo de 5-cqa tendia aos níveis iniciais. Não foram analisados os níveis dos outros CGAs. De acordo com Clifford (1985), há um

predomínio de 5-cqa nas espécies de café e em *C. arabica*, sendo que o conteúdo desse ácido representa aproximadamente 80% do total de CGAs presentes no fruto (Clifford, 1985; Ky, *et al.*, 2001).

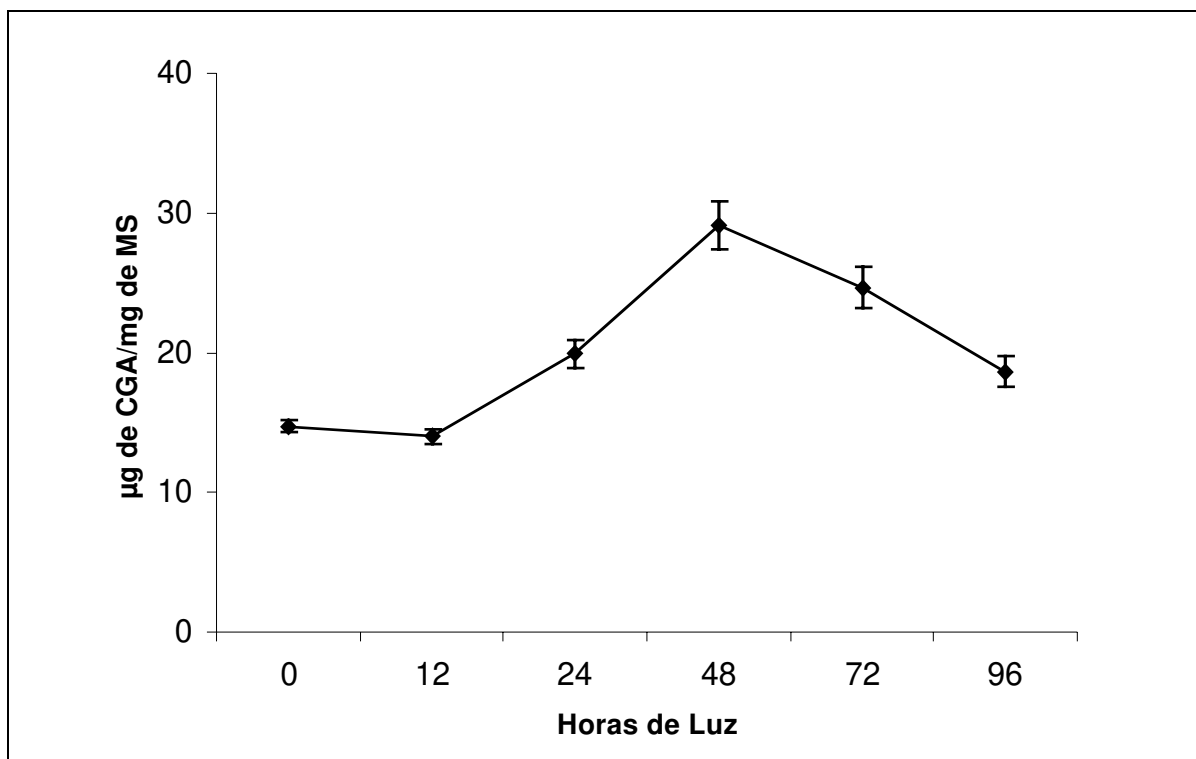


Figura 8: Conteúdo de ácido 5-cafeoilquinico em folhas do café crescidas no escuro por sessenta dias e expostas em diferentes tempos à luz.

3.3. Análises de expressão por RT-PCR semi-quantitativo

Inicialmente o estudo do controle da biossíntese de 5-cqa em café foi realizado através da dosagem das atividades enzimáticas de PAL, C4H, C3H, 4CL e CQT, conforme métodos descritos na literatura. Exceto para PAL, não detectamos atividade das outras enzimas. Os tecidos do cafeeiro são conhecidos por possuírem grande quantidade de compostos fenólicos, que poderiam estar interferindo nas dosagens, através da formação de quinonas reativas, processo mediado pela

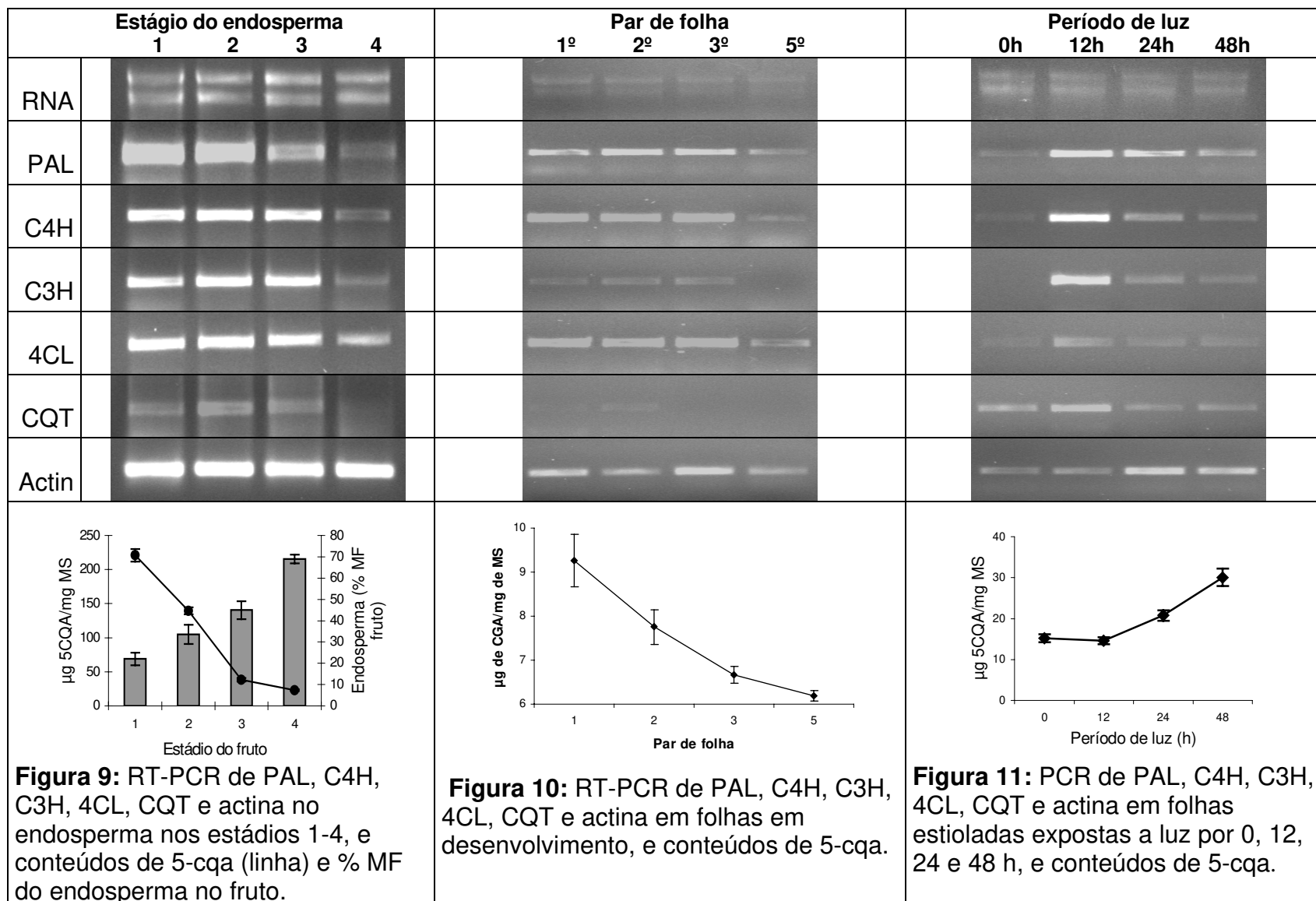
polifenoloxidase (Mazzafera & Robinson, 2000). Mesmo a adição de inibidores de proteases (PMSF), complexadores de fenóis (PVPP), antioxidantes (ácido ascórbico), EDTA e DTT não possibilitaram sucesso nas dosagens. Foi por esta razão que se decidiu estudar a expressão dos genes codificando para as enzimas, através de RT-PCR.

As expressões dos genes (contigs) identificados para PAL, C4H, C3H, 4CL e CQT foram estudadas em folhas e frutos em desenvolvimento, coletados de uma planta adulta, e em folhas de plântulas estioladas de *C. arabica* cv. Mundo Novo, obtidas a partir de sementes germinadas no escuro e posteriormente expostas à luz. Para os ensaios de RT-PCR foi escolhida uma combinação de primers para cada gene, sendo para PAL, PAL-4R e PAL-4L; para C4H, CH4-0R e C4H-0L; para C3H, C3H-1R e C3H-1L; para 4CL, 4CL-4R e 4CL-4L; para CQT, CQT-1R e CQT-0L. Como controle utilizou-se primers de actina. Os tamanhos esperados para os fragmentos a serem amplificados eram de 503, 533, 554, 566 e 528 pares de bases, respectivamente para a PAL, C4H, C3H, 4CL e CQT (tabela 8). No seqüenciamento desses fragmentos, foram obtidas seqüências que alinhadas (programa – LALIGN) com as seqüências esperadas resultaram em identidades de 98,3/464, 95,3/528, 98,6/488, 98,0/508 e 99,6/465, (percentual/número de nucleotídeos), respectivamente para os fragmentos da PAL, C4H, C3H, 4CL e CQT.

Em folhas e em frutos de cafeeiro coletados em estádios de desenvolvimento, a abundância dos transcritos dos genes analisados é mais intensa nos primeiros estádios e decresce nos estádios representativos de tecidos mais velhos (figuras 9 e 10). No endosperma, o decréscimo de expressão observado para os 5 genes, foi acentuado do estágio 3 para o estágio 4. A expressão desses genes, em folhas de plantas germinadas no escuro e posteriormente expostas à luz,

aumentou em níveis significativos após 12 h de exposição e posteriormente retornou a níveis basais de folhas sem exposição à luz (figura 11).

Concomitantemente à análise de expressão, foi observado que o conteúdo de 5-cqa também é maior em tecidos mais jovens e diminuiu nos tecidos mais velhos (figuras 9 e 10). Nas folhas expostas à luz, foi observado que o conteúdo de 5-cqa aumentou após 24 h de exposição e em 48 h era aproximadamente duas vezes maior do que os níveis iniciais (figura 11). De maneira semelhante aos dados apresentados na figura 8, os níveis de 5-cqa reduziram após 72 h.



4- DISCUSSÃO

A biossíntese de 5-cqa, o principal ácido clorogênico em café, envolve a via dos fenilpropanóides e tem a participação direta de cinco enzimas: PAL, C4H, CH3, 4CL e CQT (Schoch *et al.*, 2001; Bushman *et al.*, 2002). Com o projeto genoma do café, foram geradas aproximadamente 150.000 seqüências expressas, ampliando muito as possibilidades de estudos moleculares com essa planta. Na análise aqui realizada, apesar de não ter sido encontrada no banco de ESTs do café nenhuma seqüência completa para os genes da PAL, C4H, CH3, 4CL e CQT, foi possível identificar seqüências com identidade significativa para os genes e, portanto, permitir a realização de estudos de expressão através de ensaios de RT-PCR.

Estudos anteriores mostraram que o conteúdo dos CGAs em café varia ao longo do desenvolvimento das folhas (Bertrand *et al.*, 2003), e frutos (Clifford & Kazi, 1987; Bertrand *et al.*, 2003). A concentração desses compostos é geralmente mais elevada em tecidos jovens, e à medida que o tecido envelhece ocorre redução com posterior estabilização em um determinado patamar. Acompanhando essa redução, também ocorrem alterações na composição dos CGAs no endosperma durante o desenvolvimento dos frutos (Menezes, 1994; Bertrand *et al.*, 2003). Em *C. arabica* e *C. canephora*, inicialmente ocorre predomínio dos ácidos 3,4 e 3,5-dicafeoilquínicos e posteriormente ocorre reversão no sentido de maior acúmulo dos ácidos 3-cafeoilquínico, 4-cafeoilquínico e 5-monocafeoilquínico. Não é conhecido como se processa o controle dessas últimas alterações da via de biossíntese dos CGAs. Esse tipo de comportamento, no entanto, condiz com idéia de que existe algum tipo de regulação envolvendo a biossíntese desses compostos e, conseqüentemente, o padrão de acúmulo dos mesmos em café.

O controle do fluxo de metabólitos na via de fenilpropanóides tem sido

objetivo de vários estudos (Nugroho *et al.*, 2002; Costa *et al.*, 2003; Ro & Douglas, 2004). Particularmente, no que diz respeito a biossíntese de 5-cqa, o primeiro passo da via, que envolve a enzima PAL, tem sido bem estudado tanto sob o aspecto bioquímico quanto molecular. As evidências sugerem que esta enzima é fundamental na regulação da biossíntese do 5-cqa (Howles *et al.*, 1996; Shadle *et al.*, 2003), porém, a reação catalisada pela PAL é um passo comum à biossíntese de muitos outros compostos, tais como flavonóides, lignina, xantonas, etc, o que sugere a existência de outros pontos importantes na regulação dessa via (Anterola *et al.*, 2002). Bushman *et al.* (2002) observaram em milho que a chalcona sintase (CHS), a enzima que catalisa o passo inicial da ramificação da via de fenilpropanos para a formação dos flavonóides, estava associada ao controle do fluxo de carbono entre a síntese dos flavonóides e de 5-cqa, sendo o acúmulo de 5-cqa favorecido em certas situações. A CQT, enzima que catalisa o passo final da biossíntese de 5-cqa, compete por substrato com a CHS e com enzimas envolvidas na síntese de lignina (Bushman *et al.*, 2002; Hoffmann *et al.*, 2003), podendo ser, também, um possível ponto de regulação na biossíntese de 5-cqa. Niggeweg *et al.* (2004) e Hoffmann *et al.* (2004) mostraram através da alteração da expressão (silenciamento ou superexpressão do gene) que a CQT tem efeitos diretos no acúmulo de 5-cqa em plantas de tomate e de tabaco. Hoffmann *et al.* (2004) silenciaram CQT em tabaco para estudar a influência de 5-cqa na biossíntese de lignina e observaram que o silenciamento do gene de CQT levou, ao contrário do esperado, a aumento da quantidade de 5-cqa no caule de tabaco, não sendo alterado nas folhas. As justificativas dadas pelos autores para isto é que o silenciamento, de alguma maneira, poderia estar afetando a atividade reversa (no sentido de degradação de 5-cqa) ou que outra aciltransferase, caracterizada em tomate por Niggeweg *et al.*,

(2004), poderia estar atuando nestes tecidos. Ainda, levantaram a possibilidade de pools diferentes de 5-cqa nos diferentes tecidos, ou melhor, um no caule que seria ativo metabolicamente, sendo “responsivo” às alterações ocorridas, e outro na folha que seria quantitativamente importante, mas que seria vagarosamente mobilizado para a síntese de lignina.

De acordo com Anterola *et al.* (2002), as enzimas C4H e C3H também podem exercer controle na biossíntese de CGA. Em estudos com *Pinus taeda*, o padrão de transcrição observado indicou que a alocação de carbono na via de fenilpropanóides pode ser controlada pela modulação da atividade dessas enzimas. Para os autores, o controle exercido por essas enzimas pode ser mais importante no controle da via do que aquele exercido pela PAL. Howles *et al.* (1996) observaram que a reação catalisada pela C4H pode ser limitante na biossíntese de 5-cqa, sendo, portanto, um ponto de controle da via.

Para estudar a regulação de uma via metabólica, alguns fatores devem ser considerados, incluindo a regulação da atividade das enzimas por fatores como competição, disponibilidade e afinidade pelo substrato, presença de inibidores e/ou ativadores, pH no meio, associação entre as enzimas, quantidade de moléculas das enzimas presentes e compartimentalização das reações (Anterola *et al.*, 2002). Associado a alguns desses fatores, estão aspectos genéticos como a presença ou ausência de regulação gênica.

No presente estudo, análises dos níveis de transcrição gênica das cinco enzimas envolvidas na biossíntese do 5-cqa foram associadas ao acompanhamento dos níveis de 5-cqa em folhas e frutos de café em desenvolvimento, confirmando a existência de regulação gênica dessa via e que essa regulação pode estar associada ao padrão de acúmulo observado. Foi observada uma redução na concentração de

5-cqa ao longo do desenvolvimento que combinou com os níveis de transcrição dos genes das enzimas, que também foram menores em tecidos mais velhos.

O padrão de expressão em folhas de plântulas estioladas, expostas à luz, também confirma a existência de regulação gênica na biossíntese do 5-cqa. Houve alterações nos níveis de expressão em resposta ao tratamento, e estas estiveram coordenadas com as alterações nos níveis de 5-cqa, também sugerindo que os níveis de 5-cqa dependem da manutenção dos níveis de expressão gênica.

No endosperma, o nível de expressão observado no estágio 4 (fruto maduro) foi evidentemente menor que no estágio anterior (estágio 3), indicando uma queda acentuada de expressão. Entretanto, essa queda acentuada não foi observada nos níveis de 5-cqa entre estes dois estágios. Esse fato, no entanto, pode ter relação com as alterações qualitativas no conteúdo de CGAs que ocorre no final da maturação dos frutos relatadas por Clifford e Kazi (1987) e Bertrand *et al.* (2003). Estes autores relataram mudanças na proporção de isômeros no final da maturação de frutos. Portanto, seria bastante interessante expandir o presente estudo para avaliar o papel de CQT na biossíntese dos outros CGAs. O completo sequenciamento do gene codificando para esta enzima e sua expressão em bactéria poderia propiciar estudos sobre a afinidade aos substratos e qual sua importância na formação dos isômeros. Niggeweg *et al.* (2004) observaram que o silenciamento da CQT em plantas de *Nicotiana benthamiana* causa alterações nos níveis de 5-cqa e de 3cqa, sugerindo a importância dessa enzima na síntese de mais de um isômero. Por outro lado, não poderia ser excluída a participação de outras enzimas, uma vez que vários são os isômeros de CGAs. Também, temos que considerar que aqui se estudou os contigs formados com maior proporção de seqüências provenientes de bibliotecas de frutos (tabela 1 e 2) e que é muito provável que os outros contigs

possam codificar para enzimas que tenham especificidade diferente para os substratos. Apenas um estudo completo de expressão e dosagem dos vários tipos de CGAs poderiam responder esta questão.

Analizando o padrão geral de expressão gênica, observa-se que houve uma coordenação de expressão das cinco enzimas analisadas. Este resultado foi encontrado tanto ao longo do desenvolvimento de folhas e frutos, como na indução da expressão por luz. Isso sugere a existência de mecanismos de controle da expressão em comum para as enzimas estudadas. Este tipo de associação é comum em vias metabólicas associadas a respostas induzidas nas plantas (Loake *et al.*, 1992; Logermann *et al.*, 1995; Martin & Paz-Ares, 1997; Takeda *et al.*, 1999; Hahlbrock *et al.*, 2003; Whitbred & Schuler, 2000). Resposta induzida é uma estratégia encontrada nas plantas contra o ataque de herbívoros e patógenos, inclusive naquelas onde o 5-cqa é indicado como antagonista ao ataque desses agentes (Felton & Duffey, 1991; Summers & Felton, 1994; Kranthi *et al.*, 2003; Shadle, *et al.*, 2003). Isso sugere, portanto, que a regulação coordenada da expressão de genes envolvidos na biossíntese do 5-cqa aconteça em no cafeeiro. Além disso, mostra a possibilidade de manipulação dessa via no sentido de modular a quantidade de 5-cqa em plantas de café e com isso intervir de forma concreta nas características organolépticas da bebida produzida. O uso de promotores específicos para sementes, como é caso do estudo com proteínas 11S da semente de café (Marraccini *et al.*, 1999; Rogers *et al.*, 1999), permitiriam controlar o nível de 5-cqa nas sementes.

5- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aerts, R. J.; Baumann, T. W., 1994. Distribution and utilization of chlorogenic acid in coffea seedlings. *J. Exp. Bot.* 45(273):97-503.
- Anterola, A. M.; Jeon, J.; Davin, L. B.; Lewis, N. G., 2002. Transcriptional control of monolignol biosynthesis in *Pinus taeda*. Factors affecting monoignol ratios and carbon allocation in phenylpropanoid metabolism. *J. Biol. Chem.* 277(21):18272-18280.
- Balyaya, K. J.; Clifford, M. N., 1985. Chlorogenic acids and caffeine contents of monsooned indian arabica and robusta coffees compared with wet and dry processed coffees form the same geographic area. In: 16ht Int. Scientific Colloquium on Coffee, Kyoto. ASIC, Paris. 316-325p.
- Berdy, S. E.; Kudla, J.; Gruissem, W.; Gillaspy, G. E., 2001. Molecular characterization of At5PTase1, an inositol phosphatase capable of terminating inositol trisphosphate signaling. *Plant Physiol.* 126:801–810.
- Bertrand, C.; Noiro, M.; Doulebeau, S.; De Kochko, A.; Hamon, S.; Campa, C., 2003. Chlorogenic acid content swap during fruit maturation in *Coffea pseudozanguebariae*. Quantitative comparison with leaves. *Plant Science* 165(6):1355-1361.
- Bushman, B. S.; Snook, M. E.; Gerke, J. P.; Szalma, S. J.; Berhow, M. A.; Houchins, K. E.; McMullen, M. D., 2002. Two loci exert major effects on chlorogenic acid synthesis in maize silks. *Crop Science* 42(5):1669-1678.
- Chun, O. K.; Kim, D.; Moom, H. Y.; Kang, G. H.; Lee, C. Y., 2003. Contribution of individual polyphenolics to total antioxidant capacity of plums. *J. Agric. Food Chem.* 51: 7240-7245.

- Clifford, M. N. Chlorogenic acids. In: Clarke, R. J.; Macrae, R., 1985. *Coffee*. Vol. 1. Chemistry. London: Elsevier. 153-202p.
- Clifford, M. N.; Kazi, T., 1987. The influence of coffee bean maturity on the content of chlorogenic acids, caffeine and trigonelline. *Food Chem.* 25:59-69.
- Costa, M. A.; Collins, R. E.; Anterola, A. M.; Cochrane, F. C.; Davin, L. B.; Lewis, N. G., 2003. An in silico assessment of gene function and organization of the phenylpropanoid pathway metabolic networks in *Arabidopsis thaliana* and limitations thereof. *Phytochemistry* 64:1097–1112.
- Daglia, M.; Papetti, A.; Gregotti, C.; Berte, F.; Gazzani, G., 2000. In vitro antioxidant and ex vivo protective activities of green and roasted coffee. *J. Agric. Food Chem.* 48(5):1449-1454.
- Felton, G. W.; Duffey, S.S., 1991. Reassessment of the role of gut alkalinity and detergency in insect herbivory. *J. Chem. Ecol.* 17(9):1821-1836.
- Flores, G. B.; Andrade, F.; Lima, D. R., 2000. Can coffee help fighting the drug problem? Preliminary results of a Brazilian youth drug study. *Acta Pharm. Sin.* 21(12):1057-1216.
- Frank, J.; Kamal-eldin, A.; Razdan, A.; Lundh, T.; Vessby, B., 2003. The dietary hydroxycinnamate caffeic acid and its conjugate chlorogenic acid increase vitamin E and cholesterol concentrations in sprague-dawley rats. *J. Agric. Food Chem.* 51:2526-2531.
- Hahlbrock, K.; Bednarek, P.; Ciolkowski, I.; Hamberger, B.; Heise, A.; Liedgens, H.; Logemann, E.; Nürnberger, T.; Schmelzer, E.; Somssich, I. E.; Tan, J., 2003. Non-self recognition, transcriptional reprogramming, and secondary metabolite accumulation during plant-pathogen interactions. *PNAS* 100(2):14569–14576.

- Hoffmann, L.; Maury, S.; Martz, F.; Geoffroy, P.; Legrand, M., 2003. Purification, cloning, and properties of an acyltransferase controlling shikimate and quinate intermediates in phenylpropanoid metabolism. *J. Biol. Chem.* 278(1):95-103.
- Hoffmann, L.; Besseau, S. Geoffroy, P.; Ritzenthaler, C.; Meyer, D.; Lapierre, C.; Pollet, B.; Legrand, M., 2004. Silencing of hydroxycinnamoyl-Coenzyme A shikimate/quinic hydroxycinnamoyltransferase affects phenylpropanoid biosynthesis. *Plant Cell* 16:1446–1465.
- Howles, P. A.; Sewalt, V. J. H.; Paiva, N. L.; Elkind, Y.; Bate, N. J.; Lamb, C.; Dixon, R. A., 1996. Overexpression of L-phenylalanine ammonia-lyase in transgenic tobacco plants reveals control points for flux into phenylpropanoid biosynthesis. *Plant Physiol.* 112:1617-1624.
- Kojima, M.; Minamikawa, H. Hyodo, I.; Uritani, I., 1961. Incorporation of some possible radioactive intermediates into chlorogenic acid in sliced sweet potato tissue. *Plant Cell Physiol.* 10:471-474.
- Kojima, M.; Uritani, I., 1973. Studies on chlorogenic acid biosynthesis in sweet potato root tissue in special reference to the isolation of a chlorogenic acid intermediate. *Plant Physiol.* 51:768-771.
- Kranthi, S.; Kranthi, K. R.; Wanjari, R. R., 2003. Influence of semilooper damage on cotton host-plant resistance to *Helicoverpa armigera* (Hub). *Plant Science* 164(2):157-163.
- Ky, C. L.; Louarn, J.; Dussert, S.; Guyot, B.; Hamona, S.; Noirota, M., 2001. Caffeine, trigonelline, chlorogenic acids and sucrose diversity in wild *Coffea arabica* L. and *C. canephora* P. accessions. *Food Chem.* 75:223–230.

- Lee, K. W.; Kim, Y. J.; Kim, D.; Lee, H. J.; Lee, C. Y., 2003. Major phenolics in apple and their contribution to the total antioxidant capacity. *J. Agric. Food Chem.* 51:6516-6520.
- Levy, C. C.; Zucker, M., 1966. Cinnamoyl and p-coumaroyl esters as intermediates in the biosynthesis of chlorogenic acid. *J. Biol. Chem.* 235:2418-2425.
- Loake, G. J.; Faktor, O.; Lamb, C. J.; Dixon, R. A., 1992. Combination of H-box [CCTACC(N)7CT] and G-box [CACGTG] cis element necessary for feed-forward stimulation a chalcone synthase promoter by the phenylpropanoid-pathway intermediate p-coumaric acid. *PNAS* 89:9230-9234.
- Logermann, E.; Parniske, M.; Hahlbrock, K., 1995. Modes of expression and common structural features of the complete phenylalanine ammonia-lyase gene family in parsley. *PNAS* 92:5905-5909.
- Martin, C.; Paz-Ares, J., 1997. MYB transcription factors in plants. *Trend. Genet.* 13(2):67-73.
- Marraccini, P.R.; Deshayes, A.; Petiard, V.; Rogers, W.J., 1999. Molecular cloning of the complete 11S seed storage protein gene of *Coffea arabica* and promoter analysis in transgenic tobacco plants. *Plant Physiol. Biochem.* 37:273-282.
- Mazzafera, P.; Robinson, S. P., 2000. Characterization of polyphenol oxidase in coffee. *Phytochemistry* 55:256-296.
- Menezes, H. C.; Clifford, M. N., 1987. The influence of stage of maturity and processing method on the relation between the different isomers of caffeoylquinic acid in green coffee beans. In: 12th Int. Scientific Colloquium on Coffee, Montreux. ASIC, Paris. 377-381p.
- Menezes, H. C., 1994. The relationship between the state of maturity of raw coffee beans and the isomers of caffeoylquinic acid. *Food Chem.* 50:293-296.

- Nardini, M.; Cirillo, E.; Natella, F.; Scaccini, C., 2002. Absorption of phenolic acids in humans after coffee. *J. Agric. Food Chem.* 50:5735-5741.
- Niggeweg, R; Michael, A.; Martin, C., 2004. Engineering plants with increased levels the antioxidant chlorogenic acid. *Nat. Biotech.* 22(6):746-754.
- Nugroho, L. H.; Verberne, M. C.; Verpoorte, R., 2002. Activities of enzymes involved in the phenylpropanoid pathway in constitutively salicylic acid-producing tobacco plants. *Plant Physiol. Biochem.* 40:755–760.
- Ohiokpehai, O.; Brumen, G.; Clifford, M. N., 1982. The chlorogenic acids content of some peculiar green coffee beans and the implications for coffee beverage quality. In: 10th Int. Scientific Colloquium on Coffee, Salvador. ASIC, Paris. 177-185p.
- Paulis, T.; Schmidt, D. E.; Bruchey, A. K.; Kirby, M. T.; McDonalk, M. P.; Commers, P.; Lovinger, D. M.; Martin, P. R., 2002. Dicinnamoylquinides in roasted coffee inhibit the human adenosine transporter. *Eur. J. Pharm.* 442:215-223.
- Promega, 2000. RQ1 Rnase-Free Dnase. Technical Bulletin 518:1-4.
- Rezaian M. A.; Krake L. R., 1987. Nucleic acid extraction and virus detection in grapevine. *J. Vir. Met.* 17:277-285.
- Rhodes, M. J. C.; Woollorton, L. S. C., 1976. The enzymic conversion of hydroxycinnamic acids to *p*-coumaroylquinic acid and chlorogenic acids in tomato fruits. *Phytochemistry* 15:947-951.
- Ro, D.; Douglas, C. J., 2004. Reconstitution of the entry point of plant phenylpropanoid metabolism in yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). Implications for control of metabolic flux into the phenylpropanoid pathway. *J. Biol. Chem.* 279(4):2600–2607.

- Rogers, W.J.; Bezard, G.; Deshayes, A.; Meyer, I.; Petiard, V.; Marraccini, P., 1999. Biochemical and molecular characterization and expression of the 11S-type storage protein from *Coffea arabica* endosperm. *Plant Physiol. Biochem.* 37:261-272.
- Schoch, G.; Goepfert, S.; Morant, M.; Hehn, A.; Meyer, D.; Ullmann, P.; Werck-Reichhart, D., 2001. CYP98A3 from *Arabidopsis thaliana* is a 3'-hydroxylase of phenolic esters, a missing link in the phenylpropanoid pathway. *J. Biol. Chem.* 276(39):36566-36575.
- Shadle, G. L.; Wesley, S. V.; Korth, K. L.; Chen, F.; Lamb, C.; Dixon, R. A., 2003. Phenylpropanoid compounds and disease resistance in transgenic tobacco with altered expression of l-phenylalanine ammonia-lyase. *Phytochemistry* 64:153–161.
- Söndahl, M. R.; Lauritis, J. A. 1992. Coffee. *Biotechnology of Perennial Fruit Crops*. F. A. Hammerschlag and R. E. Litz. Cambridge, CAB International. 401-420p.
- Sotillo, D. V. R.; Hadley, M., 2002. Chlorogenic acid modifies plasma and liver concentrations of: cholesterol, triacylglycerol, and minerals in (fa/fa) Zucker rats. *J. Nut. Biochem.* 13(12):717-726.
- Steck, W., 1968. Metabolism of cinnamic acid in plants: chlorogenic acid formation. *Phytochemistry* 7:1711-1717.
- Stöckigt, J.; Zenk, M. H., 1974. Enzymatic synthesis of chlorogenic acid from caffeoyl coenzyme A and quinic acid. *FEBS Letters* 42:131-134.
- Summers, C. B.; Felton, G. W., 1994. Prooxidant Effects of phenolic-acids on the generalist herbivore *Helicoverpa Zea* (Lepidoptera, Noctuidae) – Potential mode of action for phenolic-compounds in plant anti-herbivore chemistry. *Ins. Biochem. Mol. Biol.* 24(9):943-953.

- Takeda, S.; Sugimoto, K.; Otsuke.; Hiroshika, H., 1999. A 13-bp cis-regulatory element in the LTR promoter of the tobacco retrotransposon Tto1 is involved in responsiveness to tissue culture, wounding, methyl jasmonate and fungal elicitors. *P. Journal* 18(4):383-393.
- Ulbrich, B.; Zenk, M. H., 1979. Partial purification and properties of hydroxycinnamoyl-CoA:quinate hydroxycinnamoyl transferase from higher plants. *Phytochemistry* 18:929:933.
- Whitbred, J. M.; Schuler, M. A., 2000. Molecular characterization of *CYP73A9* and *CYP82A1* P450 genes involved in plant defense in pea. *Plant Physiol.* 124:47–58.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

São várias as evidências que indicam que a enzima polifenoloxidase pode estar envolvida em mecanismos de defesas das plantas contra o ataque de pragas e doenças. Estudos recentes com o uso de transgênicos têm confirmado este papel da polifenoloxidase em algumas plantas e, de maneira geral, a resistência tem sido associada a um maior nível de expressão de atividade dessa enzima.

Neste estudo, a atividade da PFO foi correlacionada com resistência ao ataque de um herbívoro (*Perileucoptera coffeella*) e de um fungo patogênico (*Hemileia vastatrix*) de folhas do cafeeiro. Os resultados observados indicam que, se a PFO de fato tem envolvimento na resistência a essa praga e doença, a quantidade e o tipo de substrato da enzima presente nas folhas podem ter maior importância para a resistência do que simplesmente uma maior atividade da enzima.

Para uma melhor caracterização da PFO, foram feitas determinações de algumas características dessa enzima. Dentre essas características, a especificidade e preferências para substratos foi averiguada para a enzima semi-purificada e purificada. A enzima tem uma baixa especificidade para substratos, entretanto, uma maior preferência para o ácido 5-cafeoilquínico. Apesar dessa preferência por este ácido, que também parece ser o principal substrato da PFO em café, a análise de correlação entre a quantidade desse substrato presente em folhas e a resistência mostrou que outros substratos podem ser importantes, sugerindo uma especialização de mecanismos que pode envolver a especificidade para substratos.

A análise de expressão de enzimas da via de síntese do ácido 5-cafeoilquínico demonstrou a existência de controle da síntese desse composto em plantas de café. Demonstrou também, que podem existir mecanismos de controle em

comum para as cinco enzimas estudadas. Estes resultados abrem novas perspectivas de estudos, uma vez que sugerem que a formação de CGA pode ser manipulada pela alteração da expressão desses genes. Além disso, este poderia ser um caminho para melhor entender se o CGA tem importância no potencial oxidativo do tecido, fator que parece ser importante no envolvimento da enzima PFO na resistência em plantas de cafeeiro às pragas.