

FLÁVIA CAMILA SCHIMPL

**“TEORES DE METILXANTINAS E METABOLISMO DE CAFEÍNA
EM FRUTOS DE GUARANÁ (*Paullinia cupana* var. *sorbilis* Kunth.)”**

**CAMPINAS
2013**

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

FLÁVIA CAMILA SCHIMPL

**“TEORES DE METILXANTINAS E METABOLISMO DE CAFEÍNA
EM FRUTOS DE GUARANÁ (*Paullinia cupana* var. *sorbilis* Kunth.)”**

Este exemplar corresponde à redação final
da Dissertação defendida pela candidata

Flávia Camila Schimpl

e aprovada pela Comissão Julgadora.

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biologia da UNICAMP para obtenção do
Título de Mestra em Biologia Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Mazzafera

CAMPINAS,
2013

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

Sch34t Schimpl, Flávia Camila, 1987-
Teores de metilxantinas e metabolismo de cafeína em frutos de guaraná
(*Paullinia cupana* var. *sorbilis* Kunth.) / Flávia Camila Schimpl. – Campinas, SP :
[s.n.], 2013.

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

1. Alcaloides. 2. Cafeína sintase. 3. Proteínas recombinantes. I. Mazzafera,
Paulo, 1961-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III.
Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Methylxanthine content and caffeine metabolism in guarana fruits
(*Paullinia cupana* var. *sorbilis* Kunth.)

Palavras-chave em inglês:

Alkaloids

Caffeine synthase

Recombinant proteins

Área de concentração: Biologia Vegetal

Titulação: Mestra em Biologia Vegetal

Banca examinadora:

Paulo Mazzafera [Orientador]

José Francisco de Carvalho Gonçalves

Alexandra Christine Helena Frankland Sawaya

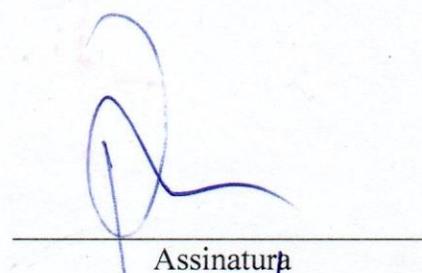
Data de defesa: 31-07-2013

Programa de Pós-Graduação: Biologia Vegetal

Campinas, 31 de julho de 2013

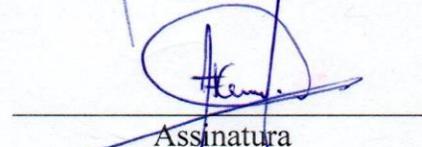
BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Paulo Mazzafera (orientador)



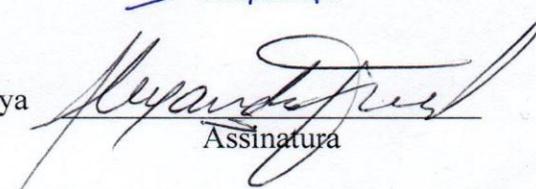
Assinatura

Dr. José Francisco de Carvalho Gonçalves



Assinatura

Profa. Dra. Alexandra Christine Helena Frankland Sawaya



Assinatura

Prof. Dr. Rafael Vasconcelos Ribeiro

Assinatura

Dr. Carlos Augusto Colombo

Assinatura

DEDICATÓRIA

**Dedico este trabalho ao meu esposo João Cláudio
e aos meus pais Ana Lúcia e Edvaldo,
como todo carinho.**

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal.

À Fapesp, pelo suporte financeiro.

Ao Departamento de Biologia Vegetal, pela infra-estrutura, e a todos do departamento, técnicos, alunos e professores.

Ao professor Paulo Mazzafera, meu orientador, pela oportunidade de crescimento e aprendizado durante a execução do trabalho.

Ao professor José Francisco de Carvalho Gonçalves do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia pela indicação, confiança e apoio na coleta do material vegetal em Manaus.

Aos colegas do Laboratório de Fisiologia e Bioquímica Vegetal - INPA, Rebeca, Rodrigo e Mebly pelo apoio nas coletas.

Ao professor José Ferreira da Silva da Universidade Federal do Amazonas, pelo contato com a Fazenda Agropecuária Jayoro Ltda e informações valiosas a respeito do guaraná.

À Fazenda Agropecuária Jayoro Ltda pela disponibilidade do material vegetal.

À Dra. Juliana Lischka Sampaio Mayer pela ajuda nas análises de hibridização *in situ*.

Ao Eduardo Kiyota pela ajuda nas análises de expressão e purificação da proteína recombinante e amizade.

Ao Dr. Fábio Conte pela ajuda nas análises de purificação da proteína heteróloga.

Aos membros do LaFiMP-Unicamp pela ajuda constante com diferentes técnicas, discussões científicas e companheirismo.

À Juliana Cazoto e Adilson Domingues, meus amigos, por estarem sempre dispostos a me ajudar análises e tirar dúvidas, além de tornarem esses dois anos mais alegres.

Aos membros da pré-banca e banca, pelas valiosas sugestões ao meu trabalho.

À minha família, pais, irmãs, cunhados e sobrinhos pelo apoio incondicional e refúgio nos momentos de dificuldades.

Ao meu esposo João Cláudio pelo apoio, incentivo, paciência, companheirismo, amizade e claro, amor. E à sua família, por suportar a saudade.

À todos os meus amigos e pessoas que, de qualquer forma, colaboraram para a realização deste trabalho.

RESUMO

Alguns grupos de plantas caracterizam-se por acumularem cafeína. Chá, café e guaraná, que acumulam cafeína, são algumas dessas plantas. As sementes de guaraná possuem o maior teor de cafeína já descrito em plantas, entre 2,5 e 6%. A popularização dos produtos a base de guaraná e a alta demanda por cafeína natural (obtida por descafeinação de plantas) destacam o interesse comercial pela espécie. A biossíntese de cafeína em plantas foi extensivamente estudada em café e chá e ambas espécies têm as mesmas vias chave da biossíntese da cafeína. O terceiro passo da via ocorre na presença de teobromina sintase (TS), enzima com atividade específica na conversão de 7-metilxantina em teobromina, e/ou dependendo da espécie, na presença de cafeína sintase (CS), uma enzima bifuncional que atua nos dois últimos passos da síntese de cafeína, na conversão da 7-metilxantina para teobromina e posteriormente desta para cafeína. O objetivo desta tese foi caracterizar os níveis de metilxantinas, atividade e expressão de CS em frutos de guaraná, sendo que para isto foram realizadas análises bioquímicas e moleculares nos tecidos de cinco cultivares (BRS-Amazonas, BRS-CG372, BRS-CG611, BRS-Maués, BRS-Luzéia). Teobromina acumulou preferencialmente em folhas (estádios jovem, intermediária e madura), caule (porção apical e basal), inflorescência, pericarpo de frutos nos estádio verde, intermediário e maduro. Nas sementes, a cafeína foi o alcaloide que acumulou em maior quantidade e atingiu níveis entre 3,3 e 5,8%. Nos tecidos analisados, seja teobromina ou cafeína, a maior concentração do alcaloide foi em tecidos novos, reduzindo com o desenvolvimento. Enquanto que teofilina foi encontrada em quantidades baixas em todos os materiais. A maior concentração de cafeína em frutos imaturos foi confirmada pela maior atividade de CS e maior expressão de *PcCS*. A busca do gene da CS de guaraná no banco de sequências EST Realgene gerou uma sequência de nucleotídeos (*PcCS*) com 1080 pb, que apresenta semelhança filogenética com proteínas de CS de cacau (*BCS1*) e chá (*TCS1* e *TCS2*). A produção da proteína recombinante permitiu a caracterização funcional de *PcCS* como uma CS bifuncional, capaz de catalisar os dois últimos passos de metilação da biossíntese de cafeína. *PcCS* mostrou afinidade para 7-metilxantina e teobromina (maior afinidade), diferindo das CS descritas para outras espécies acumuladoras de cafeína, que possuem maior afinidade por paraxantina. Provavelmente isto se deve aos resíduos de aminoácidos presentes no sítio ativo da proteína predita, quando comparada com a de café.

Palavras-chave: Alcaloide, cafeína sintase, proteína recombinante.

SUMMARY

Some plants are characterized by presenting high contents of caffeine. Tea, coffee and guarana, which accumulate the alkaloid caffeine, are some of these plants. Guarana seeds have the highest caffeine content (2.5 and 6%) among plants accumulating methylxanthine alkaloids. The increase in popularity of products made from guarana and the high demand for natural caffeine (obtained by decaffeination plant) justify the commercial interest for this species. The biosynthesis of caffeine in plants has been extensively studied in coffee and tea and both species present high similarity regarding the caffeine biosynthesis pathway. The third step of the pathway occurs in the presence of the enzyme theobromine synthase (TS), which converts 7-methylxanthine to theobromine but depending on the species, this step is also mediated by caffeine synthase (CS), an bifunctional enzyme that in addition to convert 7-methylxanthine to theobromine, also convert the later to caffeine. The aim of this study was to characterize the levels of methylxanthine alkaloids, activity and expression of caffeine synthase in the guarana fruit, and for this biochemical and molecular analyses were carried out in tissues of five cultivars of guarana (BRS-Amazonas, BRS-CG372, CG611-BRS, Maués-BRS, BRS-Luzéia). Theobromine was preferentially accumulated in the leaves (young, intermediate and mature stages), stems (apical and basal sections), inflorescence, and pericarp of fruits (green, intermediate and mature stages). However caffeine accumulated in the seeds as the main alkaloid and reached levels between 3.3 and 5.8%. In all tissues analyzed, whether theobromine or caffeine, the alkaloid concentration was higher in new tissues, reducing with the development/maturation. While theophylline was found in low amounts in all materials. The highest concentration of caffeine in immature fruits was confirmed by the highest activity of CS and highest expression of *PcCS*. The search for the CS gene of guarana in the EST guarana database Realgene generated a sequence of nucleotides (*PcCS*) with 1080 bp, which presented phylogenetic similarity with proteins of caffeine synthase from cocoa (*BCSI*) and tea (*TCSI* and *TCS2*). The production of the *PcCS* recombinant protein allowed the functional characterization of the enzyme as a bifunctional CS, able to catalyze the two last methylation steps in the biosynthesis of caffeine. *PcCS* showed affinity for 7-methylxanthine and theobromine (highest), differing from the CS described for other species accumulating caffeine, which have highest affinity paraxanthine. This is probably due to the amino acid residues present in the active site of the predicted protein when compared to coffee.

Keywords: Alkaloid, caffeine synthase, recombinant protein.

ÍNDICE

DEDICATÓRIA.....	vi
AGRADECIMENTOS	vii
RESUMO	viii
SUMMARY	ix
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Caracterização da espécie e cultivo do guaranazeiro	1
1.2 Produção e comercialização	3
1.3 Composição química da semente	7
1.4 Cafeína.....	11
1.4.1 Metabolismo de cafeína	13
2. OBJETIVOS.....	17
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	18
3.1 Material vegetal.....	18
3.2 Quantificação de metilxantinas	20
3.3 Anatomia dos frutos	20
3.4 Atividade da cafeína síntese	21
3.5 Análise de sequências no banco de dados Forest e desenho de primers	22
3.5.1 Cafeína sintase	22
3.6 Extração de RNA total e síntese de cDNA.....	24
3.7 Clonagem e sequenciamento.....	24
3.8 Alinhamento múltiplo e análise filogenética.....	25
3.9 Análise da expressão por RT-PCR quantitativo.....	26
3.9.1 Genes referência.....	27
3.10 Hibridizações <i>in situ</i>	29
3.11 Expressão de PcCS recombinante	31
3.11.1 Clonagem da PcCS	31
3.11.2 Subclonagem e transformação na bactéria de expressão	32
3.11.3 Expressão da PcCS	32
3.11.4 Purificação da PcCS.....	33
3.11.5 Estudos cinéticos da PcCS	33
3.12 Análises estatísticas.....	34
4. RESULTADOS	36
4.1 Quantificação do teor de metilxantinas	36
4.2 Análises anatômicas	40
4.3 Atividade da cafeína sintase	42
4.4 Alinhamento múltiplo e análise filogenética.....	42
4.5 Expressão do gene de cafeína sintase (<i>PcCS</i>) em frutos de guaraná.....	46
4.5.1 Seleção do gene referencia.....	46
4.5.2 Expressão relativa de PcCS	51
4.5.3 Análise de expressão por hibridização <i>in situ</i>	51
4.6. Clonagem e expressão da cafeína sintase recombinante	53

5. DISCUSSÃO.....	56
Distribuição de cafeína nos tecidos de guaraná.....	56
Isolamento e caracterização do gene de cafeína sintase em guaraná	60
6. CONCLUSÃO.....	65
7. LITERATURA CITADA.....	66

1. INTRODUÇÃO

O guaraná, guaraná-da-amazônia, guaranaina, guaranauva, uarana ou narana é uma espécie nativa da região amazônica, conhecida por seus benefícios estimulantes e medicinais, usada há séculos por comunidades indígenas da Amazônia. O primeiro relato do uso do guaraná ocorreu em 1669, quando em expedição jesuíta pela Amazônia, o missionário João Felipe Bettendorf registrou que os índios Sateré-Mawé consumiam uma bebida estimulante constantemente. Ele também relatou os efeitos diurético, contra dores de cabeça, febre e câibras (Maravalhas, 1965; Henman, 1986).

Paullinia cupana e *Paullinia sorbilis* foram os registros botânicos de guaraná mantidos por quase um século, de 1820 a 1897 (Schmidt, 1941). O primeiro refere-se à amostras provenientes da região do Alto Rio Negro, San Fernando de Atabapo - Venezuela, e foi mantido por anterioridade. *Paullinia sorbilis* foi coletada na região de Maués no Amazonas, Brasil, e passou a ser designada como uma variedade, *P. cupana* var. *sorbilis* Kunth. (Ducke, 1937). Neste trabalho será feita referência a essa variedade de guaraná, que é a única explorada comercialmente e a qual a maioria das pesquisas tem sido direcionada.

1.1 Caracterização da espécie e cultivo do guaranazeiro

A família Sapindaceae está entre as principais famílias da vegetação da região neotropical, com cerca de 140 gêneros e duas mil espécies distribuídas em três subfamílias, o guaranazeiro pertence à subfamília Sapindoideae. O gênero *Paullinia*, com cerca de 200 espécies, está quase em sua totalidade distribuído pela América tropical e subtropical, com exceção de *P. pinnata* presente também na África tropical (Gentry, 1991; Souza & Lorenzi, 2008).

Existem controvérsias quanto à origem e distribuição do guaranazeiro (*P. cupana* var. *sorbilis*), mas aparentemente o seu habitat natural está delimitado à região da bacia hidrográfica do rio Maués-Açu, que coincide com o território dos índios Sateré-Mawé (Schmidt, 1941; Saldaña *et al.*, 2002). O centro de origem filogenética do guaraná seria, de acordo com Ducke (1937), o Alto Rio Negro.

A palavra *guaraná* significa “trepadeira” em diversos dialetos indígenas e está relacionada com o hábito de crescimento de liana dessa planta perene, provida de gavinhas, e ao utilizar árvores como suporte pode atingir até 10 m de altura (figura 1A) (Lodewijks, 1986).



Figura 1: Planta de guaraná com hábito de crescimento de liana (A); com hábito de crescimento de arbusto quanto plantado em área aberta (B); inflorescência e frutos de guaraná em diferentes estádios de desenvolvimento na mesma ráquis (C); detalhe do fruto de guaraná semelhante a um olho humano, característica marcante de espécie (D).

O guaranazeiro é uma planta monóica, e as flores pseudo-hermafroditas são limitantes para a produção de frutos. Embora sejam produzidas cerca de 95 flores por inflorescência, a proporção entre flores masculinas e femininas (em média 4,5:1), afeta diretamente à produção do guaranazeiro, sendo que esta variação ocorre, principalmente, em

virtude de fatores ambientais e genéticos (Henman, 1982; Escobar, 1985; Pereira & Sacramento, 1987; Lunguinho, 2007).

A inflorescência do tipo cacho ocorre nas axilas das folhas ou nas gavinhas (pedunculadas) e pode ultrapassar 20 cm de comprimento. Numa mesma inflorescência, eventualmente ocorrem picos de floração masculina e feminina de forma dessincronizada (Goldim, 1978; Pereira & Sacramento, 1987; Lunguinho, 2007). A ocorrência de mais de um período de floração feminina faz com que sejam encontrados em uma mesma ráqui flores e frutos em diferentes estádios de desenvolvimento (figura 1C). Dessa forma, a colheita, feita manualmente, pode se prolongar por até três meses, se tornando dispendiosa (Atroch, 2009).

O fruto, pontiagudo na extremidade, é uma cápsula com deiscência septicida e pedúnculo desenvolvido, possui de uma a quatro sementes envolvidas parcialmente por um arilo branco e farináceo, que se trata anatomicamente de uma sarcotesta, que aparentemente tem função de proteção do embrião contra perda de umidade (Polo, 2006). A semente escura em contraste da cor vermelha da casca lembra um olho humano, característica marcante para o reconhecimento do guaraná (figura 1D) (Schmidt, 1941; Souza *et al.*; 1996; Embrapa, 2001; Smith & Atroch, 2010). Quando secas ou torradas, as sementes, dão origem ao produto comercial com alto teor de cafeína (2,5 a 6%), cerca de 2 a 5 vezes mais que as sementes de café (*Coffea arabica*) (Cabral, 1932; Lyra, 1953; Souza, 2010).

1.2 Produção e comercialização

Os índios Sateré-Mawé deram início ao processo de domesticação do guaraná na região do rio Maués e seus afluentes em plantios controlados. Posteriormente, colonizadores

locais se interessaram pela a espécie, após tomarem conhecimento das propriedades da bebida de guaraná, e passaram a explorar a planta comercialmente (Monteiro, 1965).

Até os anos 80, a cidade de Maués, no estado do Amazonas, era líder absoluta na produção do guaraná, com 90% da pequena produção brasileira. Porém, a ampliação do uso comercial da semente, principalmente pela utilização do extrato de guaraná na formulação de refrigerantes e pelas indústrias farmacêutica e de beleza, estimulou a expansão da produção de guaraná em estados vizinhos como Acre, Pará e Mato Grosso, chegando até a região cacauzeira no sul da Bahia, que atualmente é a maior produtora de guaraná, conforme mostram os dados da tabela 1 (IBGE, 2011).

Tabela 1. Estados produtores de guaraná no Brasil (ano de referência: 2011).

Estado	Área plantada (ha)	Área colhida (ha)	Produção (t)	Rendimento médio (kg/ha)	Participação na produção (%)
Acre	27	27	3	111	0,1
Amazonas	6743	3349	599	179	16,0
Pará	41	41	21	512	0,6
Bahia	7054	6749	2907	431	77,4
Mato Grosso	600	517	224	433	6,0
Total	14465	10683	3754	351	100

Fonte: IBGE (<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria>), acessado em 09/2012.

A Embrapa Amazônia Ocidental vem trabalhando no melhoramento do guaranazeiro desde a década de 70 por meio de seleção clonal, à partir de um banco ativo de germoplasma. Existem 18 cultivares destinadas às produções no Amazonas com características desejáveis, resistência a pragas e doenças e alta produtividade. As mudas são produzidas a partir de clonagem de estacas. Por outro lado, na Bahia os guaranazais são provenientes de pé franco, à partir de material genético desconhecido (Embrapa, 2001, 2005; Ceplac, 2012) . No entanto, a

produtividade dos guaranazeiros do Amazonas é inferior aos da Bahia (tabela 1), o que pode estar relacionado com o sistema de produção e baixa tecnificação dos agricultores amazonenses, em sua maioria pequenos produtores, ainda que as práticas culturais recomendadas sejam as mesmas nos dois locais (Embrapa, 2005; Sebrae, 2006).

Apesar da diferença de produtividade entre estes dois estados, o preço dos grãos pago ao produtor é maior no Amazonas, R\$ 21,00 kg⁻¹ contra R\$ 11,75 kg⁻¹ da Bahia (Conab, 2008). Isso se deve ao fato dos produtores do Amazonas negociarem diretamente com as indústrias de beneficiamento de guaraná localizadas exclusivamente no estado, e o produto baiano tem seu custo aumentado pelo transporte até as indústrias no Amazonas. Após o processamento, parte do extrato de guaraná permanece nessas empresas para a produção de bebidas e parte é destinada ao mercado interno e externo (Sagri, 2010; Albertino *et al.*, 2012).

O processamento da semente de guaraná desde a colheita até a obtenção do pó passa por torrefação e trituração, e esses processos variam entre pequenos e grandes produtores (figura 2). No beneficiamento manual a retirada das sementes do interior dos frutos é realizada após três dias de fermentação, mas quando realizada por despoldadeira mecânica pode ser feito imediatamente após a colheita. Em seguida, as sementes são lavadas para remoção do arilo e secas em tachos de ferro ou de barro, durante três a cinco horas, com movimentação constante (Schmidt, 1941; Smith & Atroch, 2010).

Em escala industrial, a retirada de água da semente é realizada com secadores e ao final do processo é obtido o guaraná em ramas (sementes torradas). Nesse estado, as sementes podem ser trituradas ou maceradas até a obtenção do pó, e a partir dele é possível obter o extrato,

o xarope e o bastão, sendo esta última a forma como os índios Saté-mawé armazenam e preservam as propriedades do guaraná (Schmidt, 1941; Walker *et al.*, 2000).

Aproximadamente 70% da produção nacional de sementes de guaraná é absorvida pelas indústrias de bebidas do estado do Amazonas. Deste valor, em média 45% vão para a produção de refrigerantes - o “Guaraná”, e os 25% restantes são destinados à produção de extrato e xarope, comercializados principalmente para complementar o teor de cafeína de bebidas. O pó de guaraná também é comercializado, mas em menor quantidade (10% do total produzido) para consumo em preparação caseira de uma bebida energética ou ingerido puro como tônico acondicionado em cápsulas gelatinosas ou sachês. Os 20% restantes da produção são absorvidos pela indústria farmacêutica e de cosméticos (Atroch, 2002; Kuri, 2008).



Figura 2. Processamento artesanal do produto de guaraná. Fermentação dos frutos (A); torrefação das sementes em tacho de ferro (B); Pó de guaraná (C); Mistura do pó e água para moldagem de bastão (D); Bastão moldado e defumado (E).

Os produtos finais de maior difusão e aceitação pelos mercados brasileiro e estrangeiro ainda são os refrigerantes à base de guaraná e bebidas energéticas. Em 2008 foram consumidos cerca de 3 bilhões de litros de refrigerante sabor guaraná no Brasil, e o consumo de bebidas energéticas a base de guaraná (com adição de extrato, sabor e aroma) cresceu mais de 300% em quatro anos (ABIR, 2008). O alto consumo nacional de bebidas gaseificadas contendo extrato de guaraná abre perspectivas mercadológicas para investidores com foco no crescente mercado, bem como o surgimento de novos produtos baseados em evidências dos benefícios à saúde humana causados pelas substâncias presentes nessa planta podem levar a maior aceitação e, conseqüentemente, maior demanda por guaraná.

Mazzafera (2012) discute que para o caso do café, a cafeína, que é normalmente considerada como subproduto do processo de descafeinação, pode ter importância maior do que se imagina, pelo fato de que existe alta e crescente demanda por cafeína natural (obtida por descafeinação de plantas), enquanto que a demanda por café descafeinado apresenta crescimento muito lento. Um aspecto interessante é que o mercado pode demandar diferencialmente cafeína sintética ou natural, dependendo do produto ao qual o alcaloide será adicionado. Assim, o esperado é que produtos alimentícios ou cosméticos tenham adição preferencial de cafeína natural. A cafeína do guaraná, se extraída e comercializada, certamente seria adequada a este mercado. Porém, informações a este respeito não estão disponíveis.

1.3 Composição química da semente

A primeira análise química de guaraná foi realizada por Theodoro Peckolt, em 1867 (Laemmert & Laemmert, 1868), que fez a descrição de alguns constituintes orgânicos e minerais

na massa da semente e testa. Outros trabalhos complementaram os dados de composição centesimal, e contribuíram para a elucidação da composição e nomenclatura de outros compostos encontrado por Peckolt (tabela 2).

Tabela 2. Composição química de sementes de guaraná coletadas em Maués-AM, de acordo com Angelucci *et al.* (1978).

Substância	g 100g⁻¹
Amido	60,88
Taninos	9,60
Proteínas	8,56
Açúcares solúveis totais	7,97
Açúcares redutores	4,89
Cafeína	3,79
Fibra	3,15
Pentosana	0,21
Cinzas	1,46

Com base no uso tradicional indígena, Cadet de Gassicourt (1817) em Paris, descreveu pela primeira vez o guaraná como medicamento, e suas propriedades terapêuticas como estimulante, tônico e afrodisíaco foram difundidas mundialmente. Atualmente o guaraná é considerado uma planta medicinal. Os alcaloides purínicos do tipo metilxantinas são as principais substâncias à que se atribui o efeito estimulante causado pelo consumo do guaraná (Henman, 1982; 1986; Kofink *et al.*, 2007).

Além da ação estimulante no sistema nervoso central, estudos indicam que a cafeína é responsável por efeitos como a melhora do estado de alerta, tempo de reação, velocidade de processamento de informações, memória, melhora do humor, melhora do desempenho em exercícios físicos, efeito termogênico associado à perda de peso e secreção de ácido gástrico. A teofilina é apontada como responsável pelo efeito broncodilatador do guaraná, além de contribuir, mesmo que fracamente, para o efeito estimulante. O efeito diurético associado ao consumo do

guaraná tem sido relacionado à presença da teobromina (Alves & Bragagnolo, 2002; De Maria & Moreiras, 2007; Heckman *et al.*, 2010).

O elevado teor de cafeína em plantas de guaraná desperta o interesse da comunidade científica desde seus primeiros relatos até os dias de hoje e variações no seu conteúdo continuam sendo encontradas. Na tabela 3 estão listados diferentes trabalhos que analisaram o teor de cafeína em diferentes tecidos do guaranazeiro e em material de diferentes locais de cultivo. Tais variações certamente estão relacionadas à variabilidade genética, mas também devido às condições edafoclimáticas dos locais de cultivo. De qualquer forma, o alto conteúdo de cafeína tem sido uma característica importante no processo de seleção de variedades para melhoramento e lançamento de cultivares para cultivo comercial (Angelucci *et al.*, 1978; McCusker *et al.*, 2003; Nascimento Filho *et al.*, 2007; Heckman & Mejia, 2010; Heckman *et al.*, 2010).

A cafeína é a substância responsável pela maioria os estudos destinados ao guaraná, no entanto, recentemente houve uma iniciativa brasileira de se obter informações genômicas a fim de expandir o conhecimento sobre a espécie (Ângelo *et al.*, 2008). Foram anotadas 15.387 ESTs (etiquetas de sequencias expressas) de amostras compostas por frutos de guaraná em diferentes estádios de maturação, das quais cerca de 4% estão relacionadas com genes do metabolismo secundário, incluindo vias metabólicas de flavonóides (da síntese de catequinas e antocianinas) e da cafeína, sendo feitas 94 anotações referente a genes homólogos que codificam para a cafeína sintase (CS) em outras espécies, enzima que atua no último passo da via de biossíntese de cafeína (Ashihara *et al.*, 2008).

Tabela 3. Teor de cafeína em diferentes amostras de guaraná.

Tecido	Cafeína (%)	Local	Referência
Folha	1,6	Maués-AM	Pires, 1949
Caule (madeira)	0,2	Maués-AM	Pires, 1949
Caule (casca)	1,8	Maués-AM	Pires, 1949
Pericarpo	0,0	Costa Rica	Baumann <i>et al.</i> , 1995
Pericarpo	0,5*	Pres. Figueiredo-AM	Oliveira, 2010
Septo	0,7	Costa Rica	Baumann <i>et al.</i> , 1995
Sarcotesta (arilo)	0,0	Costa Rica	Baumann <i>et al.</i> , 1995
Testa	1,1	Pariquera-Açu-SP	Spoladore, 1987
Testa	1,6	Costa Rica	Baumann <i>et al.</i> , 1995
Testa	2,0*	Pres. Figueiredo-AM	Oliveira, 2010
Testa	2,9	Maués-AM	Maravalhas, 1965
Semente	2,3	Pariquera-Açu-SP	Spoladore, 1987
Semente	2,3	Maués-AM	Pires, 1949
Semente (secagem industrial)	3,0	Maués-AM	Meurer-Grimes <i>et al.</i> , 1998
Semente	3,1	Maués-AM	Maravalhas, 1965
Semente (torrefação tradicional)	3,7	Maués-AM	Meurer-Grimes <i>et al.</i> , 1998
Semente	4,3	Costa Rica	Baumann <i>et al.</i> , 1995
Semente	6,1	Alta Floresta- MT	Antonelli Ushirobira <i>et al.</i> , 2004
Semente	7,8	Maués-AM	Antonelli Ushirobira <i>et al.</i> , 2004
Cotilédones	4,3*	Pres. Figueiredo-AM	Oliveira, 2010

*valor médio para as cultivares. 1: BRS-608; 2:BRS-300; 3:BRS-619; 4:BRS-87. Cotilédones: se refere ao conjunto cotilédones e embrião, também chamado de amêndoa.

Como resultado das anotações de ESTs, Figueiredo *et al.* (2011) identificaram *in silico* três sequências completas de possíveis genes homólogos que codificam CS em guaraná e que tiveram as sequências confirmadas por sequenciamento. Adicionalmente, estudos de proteômica durante a maturação do fruto revelaram pouca variação no perfil de proteínas expressas à medida que o tecido amadurece, exceto na condição de sementes madura, que apresentou um perfil bastante característico. No entanto, não foi identificada nenhuma proteína envolvida com o metabolismo secundário (Souza, 2010).

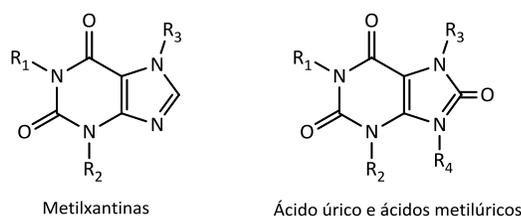
Embora existam informações sobre sequências gênicas relacionadas à biossíntese de cafeína em guaraná, a elucidação da via ainda não foi alcançada para esta espécie (Ashihara & Suzuki, 2004; Ashihara *et al.*, 2008;). Assim, ainda com pequenas variações, em plantas

acumuladoras de cafeína, a rota principal da síntese é bastante conservada (Ashihara & Suzuki, 2004; Mazzafera, 2004; Ashihara *et al.*, 2008).

1.4 Cafeína

Os metabólitos secundários de planta são classificados em três grupos quimicamente distintos: terpenos, compostos fenólicos e compostos nitrogenados. No último grupo encontram-se os alcaloides, representando cerca de 20% de todos os produtos do metabolismo especializado vegetal (Ogawa *et al.*, 2001). A cafeína juntamente com outras metilxantinas e ácidos metilúricos são alcaloides derivados de bases nitrogenadas, as purinas adenina e guanina, sendo denominados alcaloides purínicos (figura 3) (Anaya *et al.*, 2006; Ashihara *et al.*, 2008).

Alcaloides purínicos estão presentes em mais de 80 espécies vegetais, sendo preferencialmente acumulados ácidos metilúricos ou teobromina. A presença de cafeína é relatada em 13 ordens de plantas, a maioria eudicotiledôneas. Café (*Coffea arabica*), chá (*Camellia sinensis*), mate (*Ilex paraguariensis*) e cola (*Cola acuminata*), acumulam majoritariamente cafeína com concentrações em média de 1% da matéria seca (Mazzafera *et al.*, 1991; Ashihara & Crozier, 1999b; Ogawa *et al.*, 2001). Outras espécies como *Camellia irrawadiensis* (Nagata & Sakai, 1985; Ashihara & Kubota, 1986), *Camellia ptilophylla* (Ashihara *et al.*, 1998) *Theobroma cacao* (Hammerstone *et al.*, 1994; Pura Naik, 2001; Koyama *et al.*, 2003) acumulam mais teobromina.



Composto	Nome comum	R1	R3	R7	R9	O-2	$\Delta^{2,3}$
<u>Metilxantinas</u>							
Xantina		H	H	H	-	-	-
1-Metilxantina		CH ₃	H	H	-	-	-
3-Metilxantina		H	CH ₃	H	-	-	-
7-Metilxantina		H	H	CH ₃	-	-	-
1,3-Dimetilxantina	Teofilina	CH ₃	CH ₃	H	-	-	-
1,7-Dimetilxantina	Paraxantina	CH ₃	H	CH ₃	-	-	-
3,7-Dimetilxantina	Teobromina	H	CH ₃	CH ₃	-	-	-
1,3,7-Trimetilxantina	Cafeína	CH ₃	CH ₃	CH ₃	-	-	-
<u>Ácido úrico e ácidos metilúricos</u>							
Ácido úrico		H	H	H	H	-	-
1,3,7-Ácido trimetilúrico		CH ₃	CH ₃	CH ₃	H	-	-
1,3,7,9-Ácido tetrametilúrico	Teacrina	CH ₃	CH ₃	CH ₃	CH ₃	-	-
O(2),1,9-Ácido trimetilúrico	Liberina	CH ₃	H	H	CH ₃	CH ₃	$\Delta^{2,3}$
O(2),1,7,9-Ácido tetrametilúrico	Metiliberina	CH ₃	H	CH ₃	CH ₃	CH ₃	$\Delta^{2,3}$

Figura 3. Esqueletos e estruturas de metilxantinas e ácidos úrico e metilúricos. Adaptado de (Ashihara *et al.*, 2008).

O guaraná é a espécie na qual foi encontrado o maior conteúdo de cafeína já descrito em vegetais. Suas sementes podem conter de 2,5 a 6% de cafeína (Spoladore, 1987; Heckman *et al.*, 2010; Oliveira, 2010). As outras metilxantinas, como teobromina e teofilina, também foram encontradas em tecidos de guaraná, mas em menor proporção, abaixo de 0,3% (Wisniewski, 1955; Oliveira, 2010).

A cafeína destaca-se entre os alcaloides pela sua aplicação industrial, estando presente na composição de diferentes produtos (café, chá, chocolates, refrigerantes de cola, produtos de beleza, medicamentos, etc.) e por consequência dessa diversidade de produtos,

estima-se que cerca de 80% da população em geral faz uso dessa substância diariamente, embora seja muito difícil quantificar seu consumo (Juliano & Griffiths, 2004; Mazzafera *et al.*, 2009).

O primeiro isolamento de cafeína foi feito em 1820 por Friedlieb Ferdinand Runge a partir do chá (*C. sinensis*) e do café (*C. arabica*), junto com outras metilxantinas, incluindo teobromina (3,7 dimetilxantina), paraxantina (1,7-dimetilxantina) e ácido metilúrico (Anaya *et al.*, 2006; Mazzafera *et al.*, 2009). Na mesma década (1826), Theodor Martius realizava o primeiro estudo químico em guaraná e descrevia a massa do guaraná como constituída por óleo graxo verde, resina, goma, amido, celulose e uma matéria cristalina, branca e amarga, a qual denominou guaranina (Martius, 1840; Corrêa, 1926). Mais tarde, Berthemot & Dechastelus (1840) revelaram que guaranina, na verdade era a cafeína, mas a associação da molécula com taninos haviam levado Theodor Martius a crer se tratar de uma substância nova.

A maioria dos estudos sobre a cafeína em plantas se concentra no chá ou no café (Ashihara & Crozier, 1999b). No Brasil, o cafeeiro é quem recebe destaque, por este ser um dos principais produtos agrícolas na pauta das exportações do país. Por outro lado, a cafeína do guaraná ainda é pouco investigada, apesar de ser a fonte vegetal mais rica desse alcaloide (Spoladore, 1987; Mehr *et al.*, 1996; Ashihara *et al.*, 2011; Oliveira, 2010;).

1.4.1 Metabolismo de cafeína

A via de biossíntese de cafeína em plantas foi extensivamente estudada em café e chá e ambas espécies têm as mesmas vias chave da biossíntese da cafeína (Figura 4). Estudos indicam que a mesma via é encontrada em cacau e mate (Mazzafera *et al.*, 1991; Ashihara, 1993; Mazzafera, 1994; Koyama *et al.*, 2003; Ashihara *et al.*, 2011).

Quatro possíveis rotas iniciais atuam na biossíntese de cafeína, na formação de xantosina: AMP (adenosina-5-monofosfato), IMP (inosina-5-monofosfato, *de novo*), XMP (xantosina-5-monofosfato), e GMP (guanosina-5-monofosfato). As evidências sugerem que a rota mais importante é a da IMP, que é derivada da biossíntese *de novo* de nucleotídeos purínicos (Fujimori & Ashihara, 1993; Ashihara *et al.*, 2011).

A formação de cafeína está intimamente associada com o ciclo de S-adenosil-L-metionina (SAM). Nos três passos de metilação da formação de cafeína SAM é usado como doador de grupo metil. Ao transferir o radical metil, SAM é convertido em S-adenosil-L-homocisteína (SAH), que em seguida é hidrolisado para L-homocisteína e adenosina. A adenosina é utilizada como intermediário para a biossíntese de cafeína, enquanto L-homocisteína é reciclado para repor os níveis de SAM (Ashihara *et al.*, 2008).

A elucidação da biossíntese de cafeína foi possível a partir de estudos com precursores marcados com isótopos radioativos (Suzuki & Waller, 1984b, 1988; Mazzafera *et al.*, 1991; Ashihara *et al.*, 2008). Posteriormente, as enzimas da via foram identificadas e algumas purificadas e, mais recentemente os genes codificando estas metiltransferases foram isolados e clonados (Mazzafera *et al.*, 1994b; Kato *et al.*, 1996; 1999; 2000; Mizuno *et al.*, 2003a,b; Ogita *et al.*, 2003; Uefuji *et al.*, 2003; Yoneyama *et al.*, 2006).

O primeiro passo, a conversão da xantosina em 7-metilxantosina, é catalisada pela enzima 7-metilxantosina sintase (XMT - xantosina 7-*N*-metiltransferase, EC 2.1.1.158), os genes que a codificam em café foram isolados em 2003 por dois grupos japoneses paralelamente. CmXRS1 (AB 034699) e CaXMT1 (AB048793) tiveram a atividade *in vitro* comprovada depois de produzidas as proteínas recombinantes (Mizuno *et al.*, 2003a; Uefuji *et al.*, 2003).

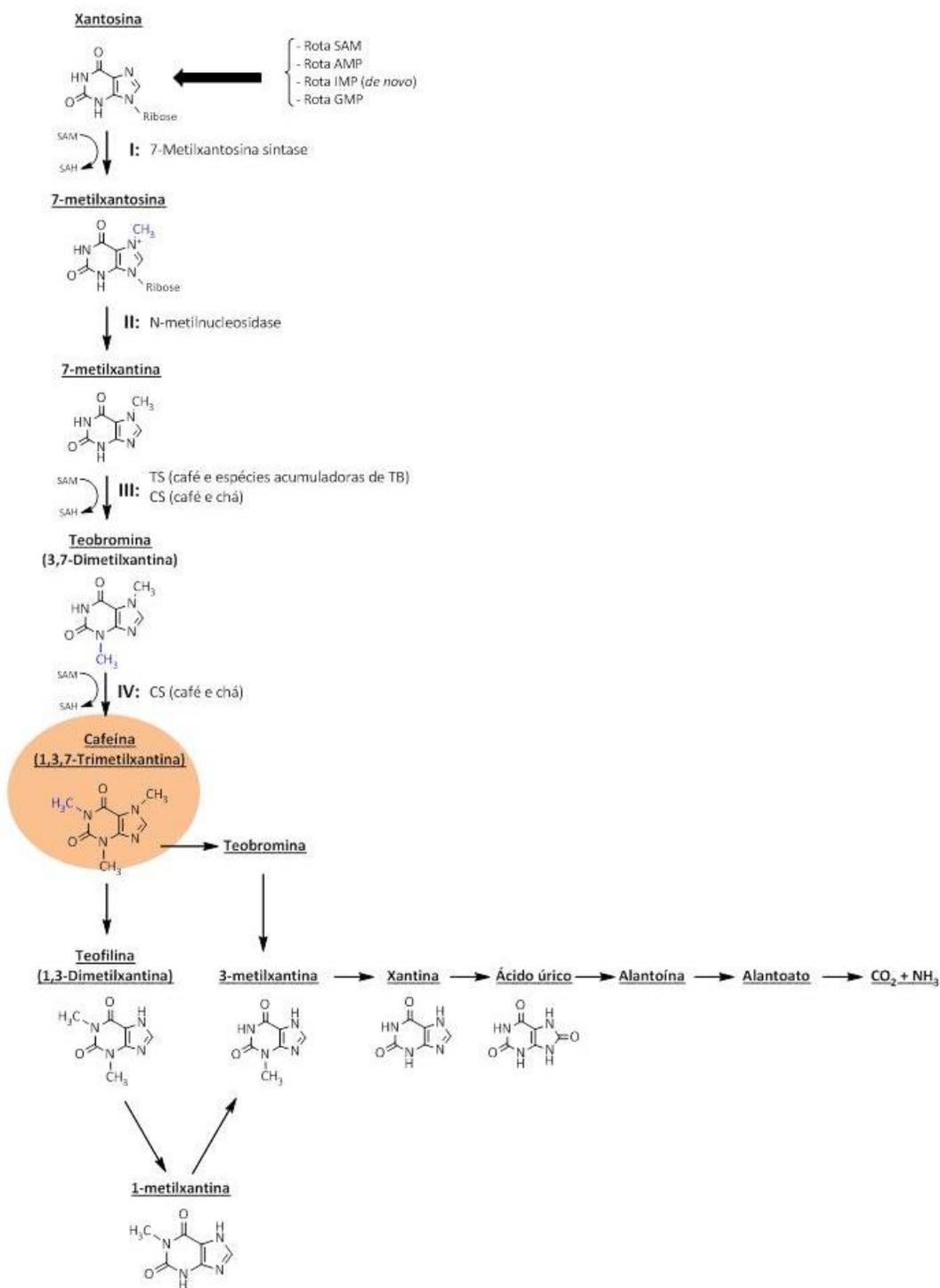


Figura 4. Metabolismo de cafeína em diferentes espécies. Rotas SAM, AMP, *de novo* e GMP são diferentes caminhos de biossíntese de xantosina. SAM: *S*-adenosil-*L*-metionina; SAH: *S*-adenosil-*L*-homocisteína. Adaptado de (Yoneyama *et al.*, 2006; Mazzafera *et al.*, 2009).

O segundo passo da biossíntese de cafeína, uma hidrólise, é catalisada por uma *N*-metilnucleosidase (7-metilxantosina, EC 3.2.2.25) que ainda não teve o gene isolado (Ashihara *et al.*, 2008).

O terceiro passo da via, e o segundo de metilação, pode ocorrer na presença de uma enzima com atividade específica na conversão de 7-metilxantina em teobromina, a teobromina sintase (TS ou MXMT) (CTS1 e CaMXMT, EC 2.1.1.159). Estudos realizados com espécies acumuladoras de teobromina, *T. cacao* (Yoneyama *et al.*, 2006), *Camellia ptilophylla* e *Camellia irrawadiensis* (Yoneyama *et al.*, 2006) foram encontrados genes homólogos de TS com apenas atividade 3-*N*-metiltransferase. Em café a formação de teobromina a partir de 7-metilxantina acontece tanto na presença de TS como de CS (Mizuno *et al.*, 2003b; Uefuji *et al.*, 2003), enquanto que em chá não foram encontrados genes que codificassem TS.

Cafeína sintase (CS ou DXMT, EC 2.1.1.160) é uma enzima bifuncional que atua nos dois últimos passos da síntese de cafeína, na conversão da 7-metilxantina em teobromina e de teobromina em cafeína. Dois genes que codificam a CS foram clonados de folhas de chá CTS1 e CTS2 (AB031280 e AB054841) (Kato *et al.*, 2000).

A CS recombinante de café (CCS1 e CaDMXT1) e de chá (TCS1) apresentam afinidade pelos substratos paraxantina, teobromina e 7-metilxantina (Kato *et al.*, 2000; Mizuno *et al.*, 2003b; Uefuji *et al.*, 2003). Embora a afinidade por paraxantina seja maior que para as demais metilxantinas, até o momento não foi detectada a presença desse metabólito no tecido vegetal. Assim, *in vivo* a CS está envolvida principalmente na conversão de 7-metilxantina à cafeína através de teobromina (Kato *et al.*, 1999; Ashihara *et al.*, 2011).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Caracterizar os níveis de metilxantinas em diferentes tecidos do guaranazeiro e determinar a atividade e a expressão da cafeína sintase em frutos de clones selecionados de *Paullinia cupana* var. *sorbilis*.

2.2 Objetivos específicos

- Determinar o nível de metilxantinas nos diferentes tecidos do fruto do guaraná;
- Determinar a atividade da cafeína sintase em frutos de guaraná;
- Analisar as sequências dos genes de cafeína sintase presentes no banco do projeto EST-Guaraná;
- Validar a sequência isolada através da produção da proteína heteróloga;
- Conduzir estudos de cinética enzimática em cafeína sintase extraída de tecidos de guaraná e a proteína heteróloga;
- Detectar a localização dos transcritos de cafeína sintase em frutos do guaraná através de hibridização *in situ*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material vegetal

O material vegetal foi coletado na Fazenda da Agropecuária Jayoro Ltda, município de Presidente Figueiredo, AM (01°57'24" S, 60°08'31" W) a 120 km de Manaus-AM. Cinco cultivares dentre as 18 comercialmente disponíveis pela Embrapa foram selecionadas de acordo com a importância econômica (mais plantadas) e com a disponibilidade no local de coleta. Diferentes tecidos em diferentes estádios de desenvolvimento foram coletados de plantas adultas das cultivares BRS-Amazonas, BRS-Maués, BRS-Luzéia, BRS-CG372, BRS-CG611 em triplicata biológica: frutos verdes, intermediários e maduros (separados em semente e pericarpo), folha nova, intermediária e madura, inflorescência (com botões florais até flores completamente abertas, sendo excluído eventuais frutos já em formação) e caule apical (porção de 20 cm coletada a 10 cm abaixo do ápice) e caule basal (porção de 20 cm coletada a 20 cm acima do solo). Os tipos de tecidos coletados são mostrados na figura 5.

Logo após a coleta e divisão do material, as amostras foram então congeladas em nitrogênio líquido e estocadas a -80°C no Laboratório de Fisiologia e Bioquímica Vegetal no Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (CPST-INPA). O transporte até Campinas, SP, foi realizado em gelo seco, com posterior armazenamento a -80°C até o momento das análises. Para análises bioquímicas (conteúdo de metilxantinas) foram utilizados todos os tecidos de todas as cultivares. As cultivares mais contrastante para o conteúdo de cafeína em sementes foram utilizadas para as análises de expressão molecular (tabela 4).

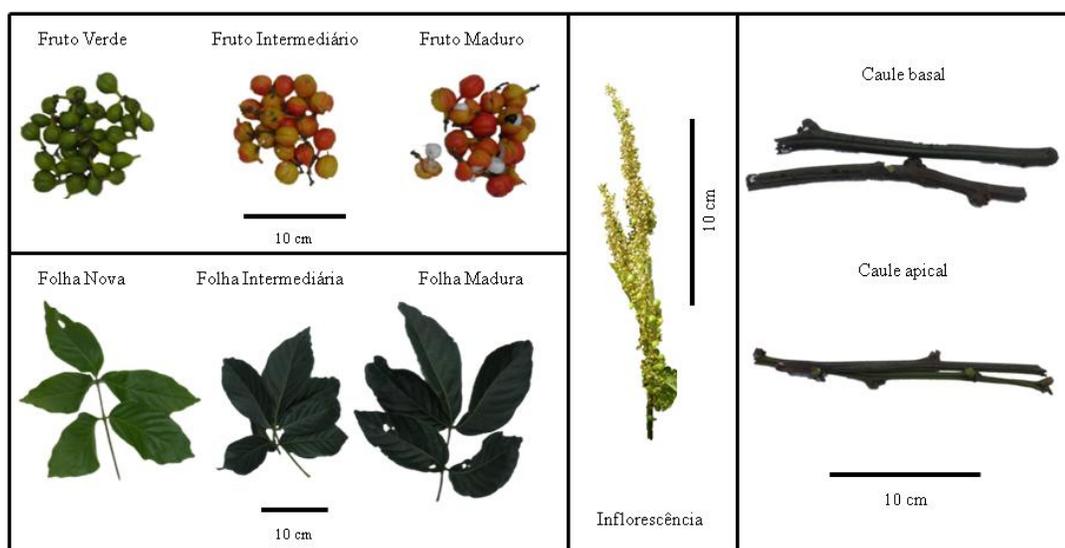


Figura 5. Ilustração do material biológico coletado para análises bioquímicas e moleculares.

Tabela 4. Identificação do material vegetal coletado para análises bioquímicas (por HPLC) e moleculares (qRT-PCR).

Tecido	Sigla	Cultivar coletada para análise em HPLC	Cultivar coletada para análise de qRT-PCR
Caule basal	CB	Todas	-
Caule apical	CA	Todas	-
Folha nova	FN	Todas	-
Folha madura	FM	Todas	-
Folha senescente	FS	Todas	-
Inflorescência	IL	Todas	-
Gavinhas	GV	Todas	-
Pericarpo – fruto verde	PV	Todas	BRS-Amazonas BRS-Maués
Pericarpo – fruto intermediário	PI	Todas	BRS-Amazonas BRS-Maués
Pericarpo – fruto maduro	PM	Todas	BRS-Amazonas BRS-Maués
Semente – fruto verde	SV	Todas	BRS-Amazonas BRS-Maués
Semente – fruto intermediário	SI	Todas	BRS-Amazonas BRS-Maués
Semente – fruto maduro	SM	Todas	BRS-Amazonas BRS-Maués

3.2 Quantificação de metilxantinas

Parte do material vegetal coletado foi seco em estufa a 50°C até massa constante e triturado finamente em moinho de facas tipo Willey. Cerca de 100 mg de material pulverizado foi homogeneizado com 5 mL de metanol a 80% em tubos de vidro com tampa rosqueada e mantido em banho térmico a 50°C durante 2h, com agitação ocasional. Após resfriamento em temperatura ambiente, as amostras foram centrifugadas à 15000 xg durante 20 min e 100 µL do sobrenadante foi diluído em água destilada, na proporção de 1:10 para sementes e 1:2 para os demais tecidos. A partir destes extratos, procedeu-se às análises de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com detector de diodo (Shimadzu Inc., Kyoto, Japão) operando em 272 nm. A separação foi feita em coluna de fase reversa C18 (25 cm x 4,6 mm x 5 µm, Supelco™) sendo a fase móvel (A) água e (B) metanol, ambos com ácido acético a 0,5 %, sob um fluxo de 1,2 mL min⁻¹. O gradiente utilizado foi: 0 min 10% B, 18 min 45% B, 19 min 100% B e 20-30 min 10% B. Para a determinação das quantidades dos alcaloides foram feitas curvas padrão com cafeína, teofilina e teobromina (Sigma).

3.3 Anatomia dos frutos

Para se obter conhecimento prévio às análises de hibridização *in situ* foram observadas características anatômicas do fruto de guaraná. Pericarpo e sementes da cultivar BRS-Amazonas em diferentes fases de desenvolvimento, a saber: verde, intermediário e maduro, foram fixadas em solução de FAA 50 (etanol 50%, formaldeído, ácido acético; 18:1:1 v/v/v) (Johansen, 1940), por 12 h a 4°C, levadas a bomba de vácuo, desidratadas em série etílica e estocadas em etanol a 70% a 4°C. Em seguida as amostras foram infiltradas com resina plástica

(Leica Historesin[®]), seguindo as instruções do fabricante. Este material foi seccionado em micrótomo rotativo manual (Leica[®]) com navalha do tipo C e secções com 7 µm de espessura foram coradas com azul de toluidina a 0,05 % (Sakai, 1973) em tampão fosfato e citrato pH 4,5 (McIlvaine, 1921) e montadas em resina sintética “Entellan[®]” (Merck[®]). Foi realizado um teste com Reagente de Wagner para evidenciar a presença de alcaloides (Furr & Mahlberg, 1981). A análise das lâminas procedeu-se em microscópio Olympus BX 51, com a captura das imagens por câmera de vídeo Olympus DP71 acoplada. As escalas micrométricas foram obtidas nas mesmas condições ópticas utilizadas.

3.4 Atividade da cafeína síntese

Para a atividade de CS, sementes de guaraná da cultivar BRS-Amazonas coletadas e mantidas a -80°C foram maceradas em mortar com auxílio de um pistilo e extraídos (1 g) com 5 mL de tampão fosfato de sódio (PBS) 200 mM, pH7,3, a 4°C, contendo 5 mM EDTA, 10 mM 2-β-mercaptoetanol, 0,5% de ácido ascórbico, 0,5% triton X-100 e 4% de polivinilpolipirrolidona) e centrifugado por 15 min a 30.000 xg (4°C). O sobrenadante recuperado foi saturado a 80% com sulfato de amônio e centrifugado por 15 min a 30.000 xg (4°C). O precipitado recuperado foi solubilizado em tampão PBS 200 mM, pH7,3 contendo 5 mM de EDTA, 10 mM 2-β-mercaptoetanol e imediatamente dessalinizado e concentrado por ultra filtração (Amicon[®] Ultra-4 Centrifugal Filter Devices, Millipore), usando o mesmo tampão da ressuspensão para as lavagens. A concentração de proteínas no extrato foi determinada com reagente pronto da BioRad (Bradford, 1976).

A determinação da atividade da CS foi baseada na transferência de ³H marcado de um

grupo metila a partir de [metil-³H]SAM para o substrato. As reações foram montadas em tubos Eppendorf de 1,5 ml contendo 0,11 µCi [metil-³H]SAM, 100 µg de proteína, 10 µL de substrato a 3,5 mM e tampão tris-HCl 100 mM, pH 8,0 para o volume final de 200 µL. As reações foram incubadas a 28°C por 30 min e interrompidas por adição de 1 mL de clorofórmio, seguido de agitação em vórtex por 30 s. Após rápida centrifugação para separação de fases, a fração orgânica foi coletada e transferida para frascos de cintilação, sendo em seguida seca no fluxo de ar em capela. Em seguida foram adicionados 5 mL de líquido de cintilação e a radioatividade incorporada em cafeína foi determinada em contador de cintilação (Kato *et al.*, 1996). Uma reação sem o substrato foi usada como controle. A atividade foi expressa em Katal, que corresponde a quantidade de enzima que é capaz de transformar 1 mol de substrato por segundo.

Os parâmetros cinéticos K_m e V_{max} foram calculados por ajuste da curva ($1/V \times 1/[S]$) no modelo de Lineweaver-Burk, para reações usando seis concentrações diferentes de teobromina como substrato.

3.5 Análise de sequências no banco de dados Forest e desenho de primers

3.5.1 Cafeína sintase

Os bancos de sequências expressas (ESTs) de frutos de guaraná da Rede da Amazônia Legal de Pesquisas Genômicas - Realgene (Ângelo *et al.*, 2008) e o *GeneBank* do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) foram utilizados para a busca de sequências MXS, TS e CS. A busca foi realizada através de palavras-chaves.

A partir das sequências identificadas como cafeína sintase no banco de ESTs de guaraná, foram selecionadas aquelas com maior número de pares de bases e menor *e-value* com o

alinhamento de sequências públicas dos genes que codificam a CS de café (*Coffea arabica*: CCS1, AB086414, 1203 pb) e chá (*Camellia sinensis*, TCS1, AB031280, 1438 pb), disponíveis no *GeneBank*, usando a ferramenta BLAST (Altschul *et al.*, 1990).

Com os ESTs selecionados foi montado um *contig* com 1487 pb utilizando a ferramenta ClustalW dentro do ambiente do software BioEdit (Thompson *et al.*, 1994). O mesmo *contig* foi utilizado para desenho de *primers* nas regiões 5'UTR, 3'UTR e internos a CDS (figura 6) para ampliações por RT-PCR, resultando em dois fragmentos para clonagem e sequenciamento.

```

AAAAGCAGGCTGGTAACGGTCCGGAATTCGCCGGATATCGTCGACCCACGCGTCCGGGAAAATCAAAAGATTTCAATATC
ATGGATGGATGTGAAAGATGTGCTTTGTATGAACAAAGGAGAAGGAGAAGGCAGCTACTTGTCTCAATTCTAAAGTCTC
GATAATAACAGCAGTCAAATCAATCCCAACCCATAAGAGGGCAATTGAATCACTCTTCAAAGAAGAATCACCACCATTT
GAACACCTCCTAAATGTGGCAGATTTGGGGTGTGCTTCAGGCTTAACTTCAAATACCATAATGTC AACCGTAGTCCAAA
CAGTGGTCAACAAATGCAGAGAATTGAATCACAAAATCCAGAGTTTCAATCTACTTGAATGATCTACCATCTAATGA
CTTCAACACACTCTTCAAGGGATTGAACGGTTTTATGGGTAGTGGTGGTGAAGAATTGAAAAACTTTCATGTCTTGTC
ATGGGTGCTCCTGGTTCTTTTCATGGGAGGCTCTTTCCTTTGAATACAATTCATCTTGTTTACTCTAATATTCTGTTC
ATTGGCTCTCCAAGGTACCGGATCTTAGAGATGAAAAAGGTAATCCAATAACAAAGGAACATTTTACCCTATCGAAAAC
GAGTCCTAGTGCTGTAAGAGAAGCGTACCTTGCCTCAATTCGACAAGACTTCACATTTTTTCTAAAGTCACGTGCTGAG
GAGATGGTGTCCAATGGTTCGAGTTGGGTTGGTTCTCCATGGAAGACTCTCTCAAGATTTCTCCAGCGAAAAGAACTTC
AATTACCTTGGTTACTTCTCTCCCAAGCCATATCTCGCTTGGTTTCCAAGGGATTGATAGATGAAGAGAAATTGGATTC
ATTTGAGGTACCATACTACGCACCATCAGAGCAAGAAGTGAAGAATTAGTAGAGGGAGAGGGTTCGTATGCGGTGGAG
CTCATGGAAACATTTACAATCAAGATCGCAGTCGGAGATGAGGGCATCTGGAGTGATGCCCGAGGGTTTGTGAACAATC
TCAGATCAATCACTGAGACATTGATTTACATCACTTTGGACCTCAAATTCCTTGATGAATTGTATGGTGAGATTCATGA
TCTGCCTCTACAAGATTTTGCTACTCAATGTAGCTTTGTTGTTTCGTTTGGAGGAGAAATTAAACAAGCAAAGGGCCTAC
TGCTTACTTGTATGCTTTGTTTGATATCAATTTACATTAATAATAATAATAATAATAATAAGATGTAGCAA
CTGGTCTATCCCTTACCAGGCCCGAAGTCCTGAGTTCGATTCTCAAGGGGGTTGGGGGATGTGTGTTGTAAGGGGGCCA
ATAGTGCCAATTGTCGAAAAAATAAAAAATAAATAAAGCTAGAAGGTTATATTCAGTGAAAAAATAAAAAAAGGG
CGGCCGCTCTAGAGTATCCCTCGAGGGGCCCAAGCTTACGCGTACCCAGCTTTCTTGTAACAAGTGG

```

Figura 6. *Contig* gerado no banco de ESTs de guaraná. Região codificadora (1080 pb) é identificada pelo códon de metionina (ATG) até spot códon (TAA). A confirmação do contig foi feita pelo sequenciamento de dois fragmentos, que foram gerados pela amplificação dos primers identificados por sublinhado (fragmento 1) e sublinhado duplo (fragmento 2).

3.6 Extração de RNA total e síntese de cDNA

A extração de RNA foi realizada pelo método de perclorato de sódio (Rezaian & Krake, 1987). Após a extração, o RNA foi tratado com DNase “Turbo DNA-free” (Ambion, Inc.) e quantificado em espectrofotômetro a 260 nm. A determinação da concentração de RNA, em $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$, foi obtida a partir da equação: $\text{RNA} = (\text{Abs}_{260} \times \text{diluição})/25$. A qualidade do RNA foi verificada em eletroforese em gel de agarose a 1 % com brometo de etídio, com visualização sob luz UV em fotodocumentador (Gel Doc 2000, BIO RAD). Um volume referente a 2 μg de RNA total foi utilizado para sintetizar a primeira fita de cDNA com kit SuperScript III First-Strand (Invitrogen), de acordo com as instruções do fabricante.

3.7 Clonagem e sequenciamento

O cDNA de sementes verdes, produzido conforme descrito no item 3.6., foi utilizado para amplificação de fragmentos de CS por RT-PCR, usando-se os pares de *primers* descritos na figura 6, em reação com a enzima Platinum[®] Pfx DNA Polymerase (Invitrogen). A partir do produto amplificado, 3 μL foram utilizados para a ligação ao vetor de clonagem “pGEM[®]-T easy Vector System” (Promega). Bactérias *Escherichia coli* da cepa DH5 α termocompetentes (Novagen) foram transformadas com o plasmídeo recombinante, plaqueadas em meio LB semi-sólido contendo 100 $\mu\text{g } \text{ml}^{-1}$ de ampicilina, 0,5 mM de IPTG e 80 $\mu\text{g } \text{ml}^{-1}$ de XGal (pGEM[®]-T easy Vector System, Promega), e incubadas a 37°C *overnight*. Colônias transformadas de coloração branca foram selecionadas para a minipreparação de plasmídios pelo método de lise alcalina (*PureLink Quick Plasmid Miniprep Kit*, Invitrogen). A presença do inserto foi confirmada por uma reação de restrição com EcoRI (Promega), que corta o vetor pGEM[®]-T easy em

ambas as extremidades, liberando o fragmento inserido, visualizado em gel de agarose. A identidade do fragmento clonado foi verificada pelo sequenciamento usando *primers* flanqueadores do vetor (*T7 promoter* e *SP6 promoter*) e *primers* internos descritos na figura 6. As reações de sequenciamento foram realizadas com *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems) de acordo com as instruções do fabricante, seguidas de precipitação com etanol a 70%, e os produtos analisados pelo sequenciador ABI Prism 377 (Applied Biosystems). Todos os processos relativos ao sequenciamento foram realizados no Laboratório de Análise Genética Molecular, do Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética (CBMEG) da UNICAMP. A sequência obtida foi comparada com as sequências originais para confirmação de identidade.

3.8 Alinhamento múltiplo e análise filogenética

Sequências de aminoácidos de *N*-metiltransferases de café (*C. arabica* e *C. canephora*) chá (*Camellia sinensis*, *C. ptilophylla* e *C. irrawie*), cacau (*T. cacao*) e guaraná (presente trabalho) foram alinhadas pelo programa ClustalW (Thompson *et al.*, 1994) e tiveram a predição da estrutura 2D realizada no programa ESPript (Gouet *et al.*, 1999), utilizando como referência a estrutura da CS de *C. canephora* (CcDMXT1, PDB ID: 2EFJ).

Sequências de aminoácidos de *N*-metiltransferases de café (*C. arabica* e *C. canephora*) chá (*C. sinensis*), cacau (*T. cacao*) e guaraná (presente estudo) foram alinhadas pelo programa ClustalW (Thompson *et al.*, 1994), e o alinhamento foi inserido no software MEGA 5 (Tamura *et al.*, 2011) e utilizado para a construção da árvore filogenética utilizando o algoritmo Neighbor-Joining (Saitou & Nei, 1987). Regiões de *Gap* foram excluídos por ajustes manuais. Valores de bootstrap foram obtidos após 10.000 repetições.

3.9 Análise da expressão por RT-PCR quantitativo

Análises de expressão de *PcCS* foram realizadas por PCR em tempo real (qRT-PCR) utilizando amostras de cDNA (diluídas 50x) sintetizadas a partir de 2 µg de RNA total. As reações (processadas em triplicata) foram preparadas com o QuantiFast™ SYBR® Green PCR Kit (Quiagen). As PCRs foram analisadas em iCycler iQ™5 Multicolor Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) nas condições: 95°C por 3 min, seguidos por 40 ciclos de 95°C por 10 s e 60°C por 30 s. Um valor de *Ct* (*Cycle threshold*) foi criado, sendo *Ct* definido como o número de ciclos no qual a taxa de amplificação do gene alvo torna-se exponencial.

Para as análises de qPCR foram feitos *primers* em regiões não conservadas (gene específico) para a família gênica das metilxantinas com a utilização do programa Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) para o gene de CS (senso: 5'-AGATTTGGGGTGTGCTTCAG-3' e antisenso: 5'-TAAAACCGCTCAATCCCTTG-3') e genes referência (tabela 5). A confirmação de especificidade do *amplicon* foi baseada na curva de dissociação no final de cada ensaio e foi gerada uma curva de eficiência de amplificação para cada par de *primers*, em que foi determinada eficiência entre >90% e <110% para todos os *primers*. A quantificação relativa da expressão foi determinada comparando a expressão transcricional entre genes alvo e referência pelo método $2^{-\Delta Ct}$, onde: 2 representa a eficiência do primer do gene alvo (eficiência é calculada como a % de eficiência x 0.01 + 1); $\Delta Ct = (Ct_{alvo} - Ct_{ref})$ Ct = ciclo limiar, alvo = gene alvo, e ref = gene referência (Livak & Schmittgen, 2001).

3.9.1 Genes referência

Para controle interno da expressão gênica de CS nos tecidos de guaraná por RT-PCR quantitativo foi realizada seleção de genes normalizadores. Foram utilizadas sequências “iscas” de genes de referência de *Arabidopsis thaliana* para a busca de genes no banco de EST de guaraná. Os genes constitutivos selecionados estão entre aqueles conhecidos como atuarem em processos celulares estáveis e permanentes - house-keeping - entre os diferentes tipos de células (Czechowski *et al.*, 2005). Os *primers* utilizados para os 13 genes normalizadores estão listados na tabela 5. A escolha dos melhores genes de referência foi determinada a partir de valores de quantificação relativa de expressão de cada gene comparados por dois algoritmos diferentes, o geNorm (Vandesompele *et al.*, 2002) e NormFinder (Andersen *et al.*, 2004).

Tabela 5. Identificação dos genes referências e sequência de primers usados nas análises de RT-qPCR.

Nome do gene	Descrição do gene	Banco RealGene	<i>A. thaliana</i> gene	Primer forward/reverse (5'-3')	Tamanho do fragmento (pb)	Eficiência de amplificação (%)
18s	18s Ribossomal RNA	Contig2420	At3g41768	TGACGGAGAATTAGGGTTCG CTTGGATGTGGTAGCCGTTT ACCATCACCAGAATCCAACACAATA CC	61	99,0
ACT	Actin7	Contig1017	At5g09810	ACCATCACCAGAATCCAACACAATA CC	122	99,4
ADH	Alcohol dehydrogenase	Contig193	At5g43940	GTTGCAGCATCAGGTCAAGA ACGTCCATTTTCAGCACACA CACACAGCAGCTGTACCTT AAGGACCGTTCAATTCGTTG	248	95,2
a-TUB	Alpha-tubulin 6	Contig1517	At4g14960	TCCCAACAACGTGAAGTCAA CTTTCGGCCTCAGTGAACTC CGGACCTGGTATTCTCTCCA TGGAGGTCCTCCAGAGCTA	92	90,0
b-TUB	Beta-tubulin 3	Contig2535	At5g62700	ACAGATCTCCACACCGAAGC CAGCAGCTTTACCAGGGAAG	197	110,0
Ciclof	Cyclophilin (ROC3)	Contig12	At2g16600	CTCATTGAAGGGTGGTGCT GTCTTTGGGTGGCTGTGAT AAAGGTGGCCGCTTTATCTT GCTAGGAAATCGCTCTGCAC	182	98,3
EF1a	Translation elongation factor α	Contig2542	At5g60390	TAAGGAAGGCATTCCACCTG TAATCCGCTCAATGGTGTCA GCGGATCTTGAAGGAGTTGA TGGGTGGCTTGAAAGGATAG	150	102
EF1b	Translation elongation factor β	Contig499	At5g19510	TCATCCTGGAAGGCCTAATG CAACCTTGGTGTCAAGTCCA	208	99,7
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Contig644	At1g13440	TAAGGAAGGCATTCCACCTG TAATCCGCTCAATGGTGTCA GCGGATCTTGAAGGAGTTGA TGGGTGGCTTGAAAGGATAG	232	99,8
ICDH	Isocitrate dehydrogenase	Contig496	At1g65930	TCATCCTGGAAGGCCTAATG CAACCTTGGTGTCAAGTCCA	238	104,4
S24	40S ribosomal protein S24-1	Contig2137	At3g04920	TAAGGAAGGCATTCCACCTG TAATCCGCTCAATGGTGTCA GCGGATCTTGAAGGAGTTGA TGGGTGGCTTGAAAGGATAG	221	106
UQT	Ubiquitin 11	Contig1935	At4g05050	GCGGATCTTGAAGGAGTTGA TGGGTGGCTTGAAAGGATAG	212	95,1
UQT-C	Ubiquitin-conjugating enzyme E2	Contig140	At5g53300	GCGGATCTTGAAGGAGTTGA TGGGTGGCTTGAAAGGATAG	185	90,3

3. 10 Híbridizações *in situ*

A síntese de sondas de hibridização *in situ* teve como molde o produto da amplificação por RT-PCR clonado em vetor pGEM[®]-T easy Vector System (Promega). Para reação de RT-PCR foi utilizado cDNA de semente verde sintetizados conforme item 3.6 e *primers* desenvolvidos a partir de regiões não conservadas (gene específico) para a família gênica das metilxantinas com a utilização do programa Primer3plus (<http://http://primer3plus.com/>) para o gene de CS (senso: 5'-AGATTTGGGGTGTGCTTCAG-3' e antisenso: 5'-TAAAACCGCTCAATCCCTTG-3'), nas condições: 95°C por 3 min, seguidos por 40 ciclos de 95°C por 10 s e 60°C por 30 s. O fragmento de CS clonado foi confirmado por sequenciamento. *Escherichia coli* da cepa DH10B foi transformada com o produto da clonagem e selecionada por meio seletivo contendo o antibiótico ampicilina, XGal e IPTG, para a identificação das colônias que integraram o plasmídeo contendo o inserto. A confirmação da clonagem foi realizada por sequenciamento.

Os plasmídeos contendo o fragmento de CS foram linearizados com a enzima EcoRI (a 37°C por 1h). As sondas foram obtidas por transcrição *in vitro* dos plasmídeos linearizados, com emprego da transcritase SP6, em reação contendo uracila marcada com digoxigenina (DIG-UTP), segundo as instruções do fabricante do kit de marcação (Roche). Para o controle negativo, sondas senso foram sintetizadas como descrito acima, no entanto com o emprego da enzima T7 polimerase.

As amostras coletadas para as hibridizações *in situ* foram fixadas a vácuo, em 4% de paraformaldeído em tampão fosfato (130 mM NaCl, 7 mM Na₂HPO₄, e 3 mM NaH₂PO₄), por 12 horas a 4°C. O material fixado foi desidratado em série butílica terciária, ABT-EtOH (Álcool Butílico Terciário: Etanol) (70, 85, 95 e 100%) (Johansen, 1940) e mantidas por 48 horas em cada solução. Em seguida, as amostras foram mantidas por 48 horas em ABT 100%, com a repetição

dessa etapa por três vezes. As amostras em ¼ ABT 100% foram invertidas em recipientes contendo ¾ de Paraplast® X-tra (Fisher, cat. n° 23-021-401) solidificado e posteriormente mantidos em estufa à 58°C para a liquidação do Paraplast® e evaporação do álcool butílico. Foram realizadas três trocas de Paraplast® em intervalos de 12 horas e por fim, as amostras foram colocadas em formas para a solidificação do Paraplast®. As amostras seccionadas em micrótomo rotativo manual (Leica®) com navalha do tipo C ou descartável e as secções, com 10 a 12 µm de espessura, foram distendidas em placa aquecedora a 48°C com água DEPC em lâminas Probe-On Plus® (Fisher).

Paraplast® foi removido por imersão das lâminas em xilol, posteriormente em etanol 100% e secas em temperatura ambiente. Para aumentar a permeabilidade dos tecidos e assim a exposição dos ácidos nucléicos às sondas, as lâminas foram incubadas por 10 minutos a 37°C em tampão de digestão contendo Proteinase K (1µg/ml em 50mM Tris-HCl pH 7.5). Em seguida, as lâminas foram lavadas por 10 minutos em água DEPC e incubadas por 10 minutos em 0,1M Trietanolamina-HCl, pH 8.0 e 0,5% anidrido acético [v/v], para neutralizar íons livres e prevenir hibridações inespecíficas.

As lâminas foram hibridadas com 300µL de solução de hibridação (3mL de formamida deionizada, 132µL of 1M Tris-HCl pH: 7.5; 720µL NaCl 5M, 120µL de EDTA; 144µL de denharts, 1,44 mL de dextran sulfato -solução estoque a 50%) contendo cerca de 600 ng das sondas *sense* e *antisense* específicas para o gene de CS por 14-16 horas a 42°C. Para remover as fitas simples de RNA e aumentar a especificidade da sonda, foi aplicado 5µg/ml de RNase em NTE (2.5 M NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 5 mM EDTA) por 30 min.

O resultado da hibridação foi visualizado por meio de anticorpo anti-DIG conjugado com fosfatase alcalina (*Anti-Digoxigenin-AP, Fab fragments*; Roche) diluído 1000 vezes em 100 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl por 1 hora. Posteriormente as lâminas foram incubadas por 10

minutos em tampão de detecção (100 mM Tris pH 7,5; 100 mM NaCl; 5 mM MgCl₂) e depois aplicados 300 µL de BCIP/NBT (Sigma) prosseguindo *overnigh* no escuro. A documentação dos resultados foi realizada a captura de imagens usando câmera de vídeo Olympus DP71 acoplada ao microscópio Olympus BX 51.

3. 11 Expressão de PcCS recombinante

3.11.1 Clonagem da PcCS

A partir do cDNA de sementes verdes de guaraná foi realizada RT-PCR para amplificação do gene da CS utilizando Platinum® *Pfx* DNA Polymerase (Invitrogen) e os *primers* senso: 5'-GGATCCATGGATATGAAAGATGTGCTTTG-3' e antisenso: 5'-GTCGACTTAATTTCTCTTCAAACCAACAACA-3' (contendo os sítios de restrição das enzimas *Bam*HI e *Sal*I, respectivamente). O fragmento amplificado foi purificado do gel de agarose por meio de “GeneJET Gel Extraction Kit” (Fermentas). Posteriormente prosseguiu-se a etapa de adição da cauda poli-A conforme recomendações do manual técnico para clonagem no vetor pGEM®-T easy Vector System (Promega). Após clonagem, a transformação de *E. coli* DH5α termocompetente a clonagem foi confirmada por sequenciamento. A digestão dos vetores e do fragmento clonado em pGEM®-T easy foi realizada com enzimas *Bam*HI e *Sal*I (Fermentas) a 37° C por 1 hora e os produtos foram separados por eletroforese em gel de agarose. Os fragmentos referente a PcCS foram purificados do gel de agarose por meio de “GeneJET Gel Extraction Kit” (Fermentas).

3.11.2 Subclonagem e transformação na bactéria de expressão

Os produtos da digestão de *Bam*HI e *Sal*I purificados foram ligados com T4 DNA ligase (Promega) no vetor de expressão procariótica pET28a (Invitrogen) a 4°C “overnight” e suas identidades confirmadas por sequenciamento. Os vetores foram então utilizados para transformar células eletrocompetentes de *E. coli* DH10B, plaqueadas em LB semi-sólido contendo kanamicina a 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$ e cloranfenicol na concentração final de 34 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e incubadas a 37°C “overnight”. A seleção das colônias transformantes foi feita através de minipreparação por lise alcalina (miniprep). Após a confirmação da clonagem, a construção pET28a-*PcCS* foi utilizada para transformar células de *E. coli* BL21(pRil) por eletroporação, e plaqueadas nas mesmas condições que DH10B.

3.11.3 Expressão da PcCS

Um teste em pequena escala foi realizado para avaliar a capacidade e eficiência da expressão. As bactérias foram crescidas em meio Luria-Bertani (LB) durante a noite, sob agitação de 200 rpm a 37°C, contendo 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de kanamicina e, 34 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de cloranfenicol. No dia seguinte este inóculo inicial foi utilizado para inoculação em meio de cultura fresco (1:100, v/v), onde continuaram crescendo até $A_{600\text{nm}} = 0,4$ a 0,8. Após este período, uma alíquota de meio foi coletada e centrifugada a 5000 rpm, 4°C, durante 10 min para constituir a fração não induzida (controle). Ao restante de meio, aplicou-se o indutor de expressão IPTG (isopropyl- β -thiogalactopyranoside) em concentração final de 1 mM, seguido de incubação a 37°C, sob agitação de 200 rpm durante 4 h.

O nível de expressão foi checado através de eletroforese desnaturante em gel 12,5% de poliacrilamida (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970). Para tanto, o meio de cultura foi centrifugado e o pellet solubilizado em tampão PBS (50 mM, pH 7,3 100 mM NaCl, 5% de glicerol) e tratado com lisozima (concentração final: 1mg ml^{-1}) durante 30 min. Para garantir o rompimento das células, a solução foi sonicada (Ultrasonic Homogenizer 4710, Cole-Parmer Instruments) utilizando ponteira fina e pulsos

de 3 s, separados por intervalos de 5 s, somando 5 min de sonicação. Seguiu-se com a centrifugação a 15000 rpm, 4°C, durante 20 min, para separação da fração solúvel (sobrenadante) e da fração insolúvel (pellet). Amostras do sobrenadante foram desnaturadas pela adição de igual volume de tampão de desnaturação (Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8, 45% glicerol, 2-β-mercaptoetanol 2%, azul de bromofenol 0,001g ml⁻¹ e SDS 0,02 g ml⁻¹) e incubação em água fervente por 5 minutos. Ao final da corrida, o gel foi corado em solução de Comassie Blue 2,7% durante 30 min e posteriormente descorado em solução de metanol 30% e ácido acético 10%.

3.11.4 Purificação da PcCS

O vetor pET28a confere à proteína produzida a cauda de 6 histidinas fusionada na posição N-terminal, o que possibilitou sua purificação pelo método de cromatografia líquida de afinidade com resina de metal imobilizado (IMAC - *Imobilized Metal Affinity Chromatography*). Utilizou-se resina de níquel Ni-NTA agarose (Qiagen), cujo princípio de funcionamento baseia-se na afinidade dos resíduos de histidina pelo níquel imobilizado na resina. Desse modo, cerca de 1 ml da respectiva resina foi homogeneizada por 1 h à 4°C com a fração solúvel obtida como descrito no item 3.10.3. A mistura foi empacotada em coluna específica para purificação por gravidade e o *flow through* (fração não ligada) foi coletado. Quantidades crescentes de imidazol (de 10 mM a 500 mM) um competidor pelo níquel da resina, em tampão PBS (20 mM, pH 6.0 contendo 500 mM NaCl), foram usadas para eluir as proteínas fusionadas.

3.11.5 Estudos cinéticos da PcCS

O extrato protéico proveniente da purificação (item 3.10.4) foi submetido à diálise por 24h a 4°C contra tampão PBS 25 mM, pH 7,3, 1 mM EDTA e 1 mM DTT. As reações enzimáticas se procederam como descrito no item 3.4., com a diferença de que ao invés de se usar SAM marcado com trítio utilizou-se SAM “frio” e a formação do produto da reação foi analisada por

UPLC (Ultra Performance Liquid Chromatography) acoplada à um espectrômetro de massas triplo-quadrupolo, TQD (Micromass-Waters, Manchester, England). A identificação/quantificação do metabólito foi baseada em seus tempos de retenção, m/z e MS/MS. A separação cromatográfica foi realizada utilizando uma coluna Waters Acquity C18-BEH (2,1 mm x 50 mm 1,7 μm) em um gradiente de eluição de 5% a 100% de acetonitrila (solvente B) em 8 min, e água Milli-Q com 0,1% de ácido fórmico como solvente A. Foi utilizado fluxo de 0,200 ml min^{-1} e temperatura da coluna de 30°C. A ionização por eletrospray em modo de íon positivo foi utilizado sob as seguintes condições: capilar 3,0 kV e do cone 50 V, temperatura da fonte de íons de 150°C, temperatura de dessolvatação 300°C. Os espectros MS/MS foram obtidos por dissociação induzida por colisão com energia de colisão de 20 V.

Para determinar a afinidade de CS por diferentes substratos foram realizadas reações utilizando-se 1-metilxantina, 3-metilxantina, 7-metilxantina, paraxantina, teofilina e teobromina na concentração de 600 μM .

3.12 Análises estatísticas

As análises bioquímicas do teor de metilxantinas e atividade da CS e de expressão molecular foram feitas em triplicata biológica e cada uma dessas em triplicatas técnicas. Previamente às análises estatísticas, foram aplicados testes de Lilliefors e Levene para verificação do cumprimento às premissas de normalidade e homogeneidade de variâncias, respectivamente.

No caso das análises de quantificação de metilxantinas, devido a discrepância dos dados não paramétricos, efetuou-se a transformação dos dados para raiz quadrada. Mesmo com a transformação dos dados, as premissas continuaram não sendo atendidas, portanto, optou-se por realizar apenas estatística descritiva. Para as demais análises, atividade e expressão de CS, que

satisfizeram as premissas, utilizou-se o teste paramétrico de Tukey em fatorial a 5% de probabilidade ($p < 0,05$).

Todas as análises foram feitas no programa Statistica (versão 7.0 para Windows - STATSOFT INC., 2004) e os gráficos elaborados em SigmaPlot (versão 11.0 para Windows - STATSOFT INC., 2008), com os resultados expressos como média seguidas de barras de erro padrão.

4. RESULTADOS

4.1 Quantificação do teor de metilxantinas

Os teores das metilxantinas cafeína, teobromina e teofilina entre os tecidos em diferentes estádios de desenvolvimento são bastante variáveis. Em todas as cultivares, teobromina é a metilxantina encontrada em maior quantidade nas folhas e nos caules (figuras 7 e 8).

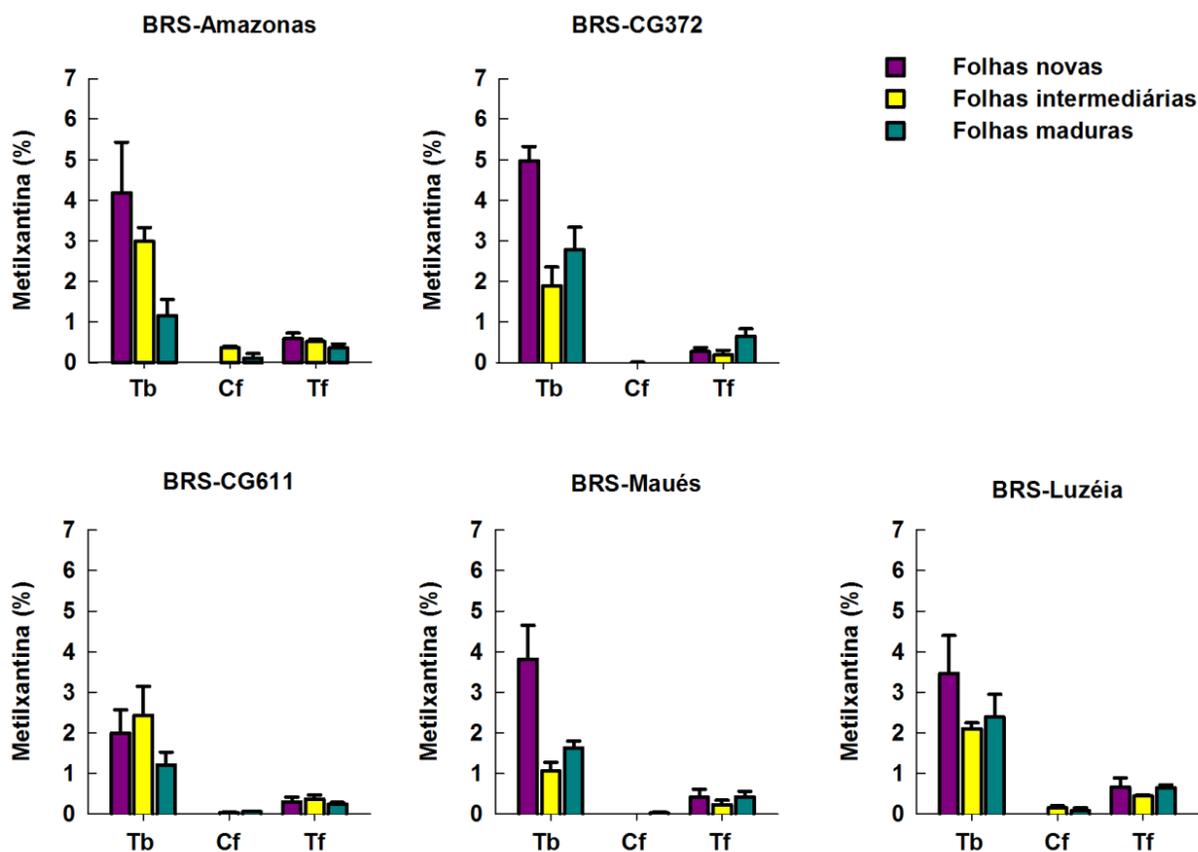


Figura 7. Teores de teobromina (Tb), cafeína (Cf) e teofilina (Tf) em folhas em três estádios de desenvolvimento de cultivares de guaranazeiros.

Com exceção da cultivar BRS-CG611, o maior conteúdo de teobromina foi observado em folhas jovens. Nessas folhas, os teores desse alcaloide estão entre 3,47 e 4,18%, ao passo que

cafeína é encontrada em níveis muito baixos e apenas nas folhas mais intermediárias e maduras (Figura 7).

No caule, o padrão de distribuição de metilxantinas observado foi semelhante ao das folhas, sendo que entre os tecidos analisados foi aquele com os menores teores (figura 8). Caules mais novos, apicais, tiveram maior teor de metilxantinas. Os níveis de teobromina no caule apical variaram de 0,10 a 0,76% e no caule basal entre 0,04 e 0,38%.

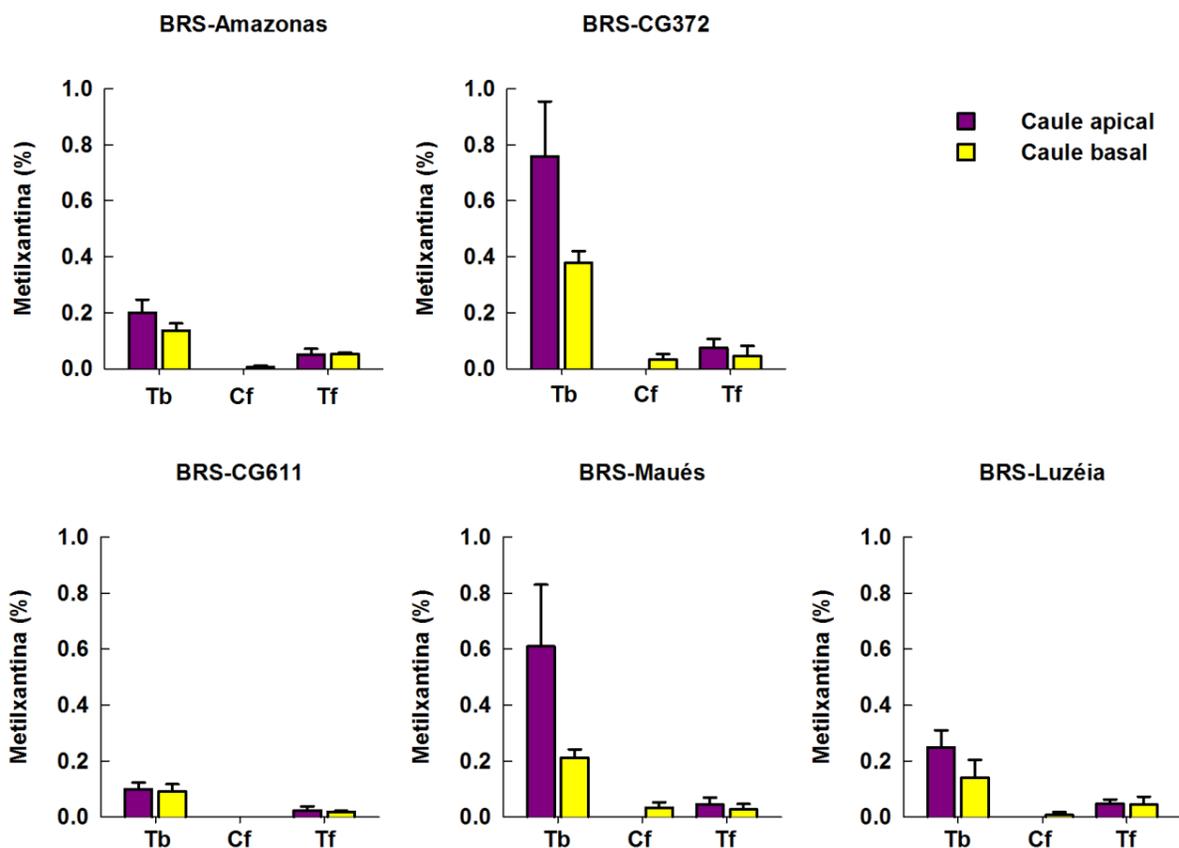


Figura 8. Teores de teobromina (Tb), cafeína (Cf) e teofilina (Tf) em caules apical e basal de cultivares de guaranazeiros.

A teobromina também foi o alcaloide mais encontrado nas inflorescências de todas as cultivares estudadas, chegando a ser até 60 vezes maior que cafeína e oito vezes maior que teofilina (Figura 9).

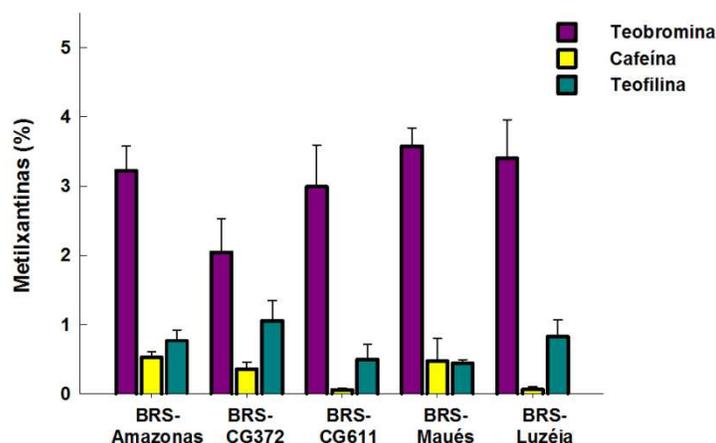


Figura 9. Teores teobromina , cafeína e teofilina em inflorescências de cultivares de guaranazeiros.

Da mesma forma que em folhas, caules e inflorescências, teobromina foi o alcaloide encontrado em maior quantidade no pericarpo, sendo seguida de cafeína e teofilina (Figura 8). Apenas nas sementes o conteúdo de cafeína foi superior ao de teobromina, sendo encontrados valores 3,3 e 5,8% da massa seca (Figura 10). Tal qual em folhas e caule, sementes de frutos novos acumularam mais cafeína, havendo redução com a maturação. Quanto ao teor de teofilina, os valores encontrados em sementes e pericarpo foram inferiores a 0,04% em todos os estádios das cultivares (Figura 10).

Dessa forma, de maneira geral verificou-se que teobromina é o alcaloide predominante em tecidos vegetativos, flores e pericarpo, e cafeína predomina apenas nas sementes, assim como os teores dos dois alcaloides são mais elevado nos tecidos mais jovens, ocorrendo decréscimo no decorrer do desenvolvimento.

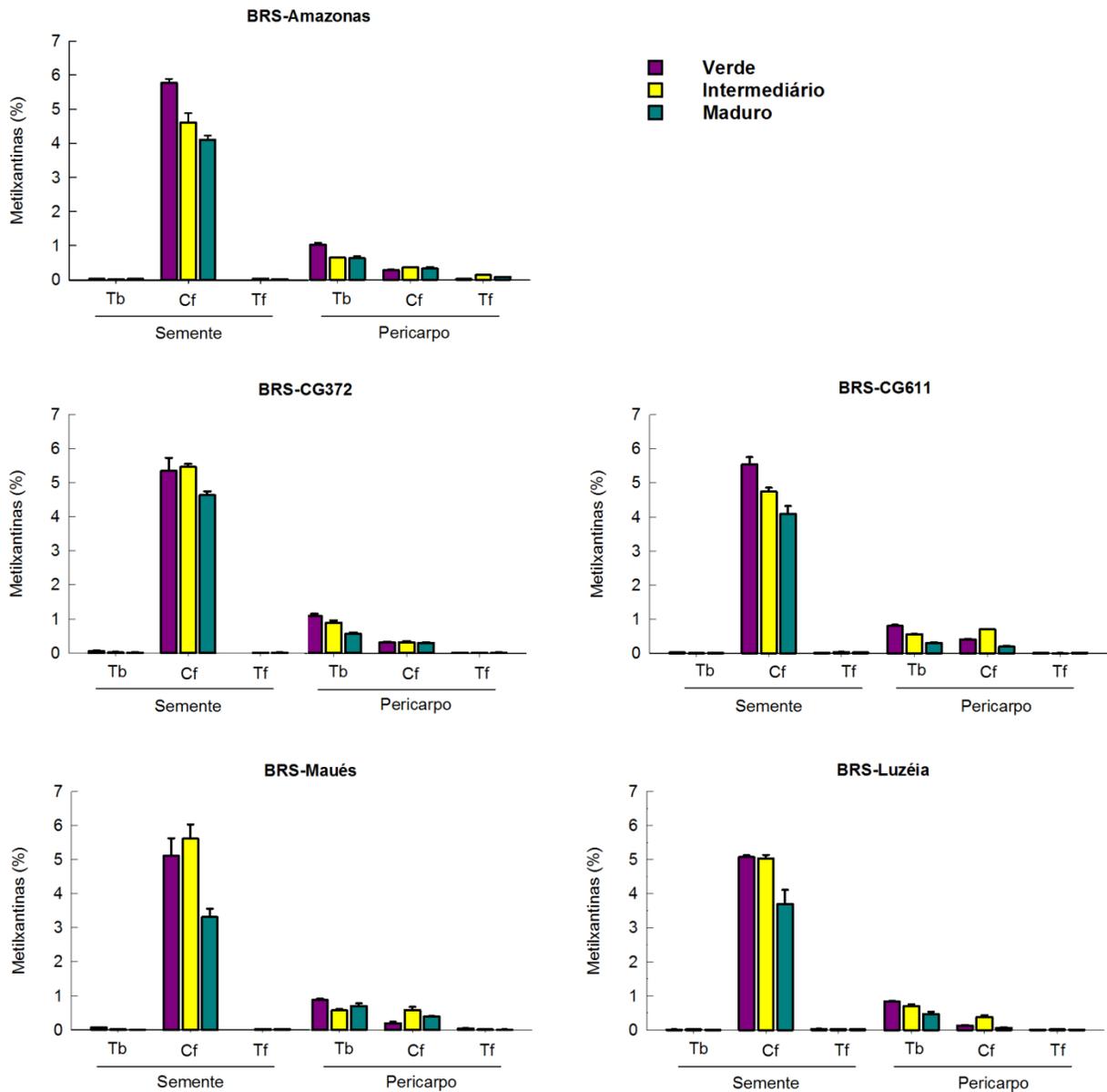


Figura 10. Teores de teobromina (Tb), cafeína (Cf) e teofilina (Tf) nas semente e pericarpo de frutos de cultivares de guaranazeiros em diferentes estádios de maturação.

4.2 Análises anatômicas

Os frutos de *Paulinia cupana* são do tipo cápsula e a deiscência ocorre por fendas longitudinais (Polo, 2006), conforme evidenciado na Figura 11A-C. As camadas de células mais internas do pericarpo são arranjadas longitudinalmente e apresentam parede celular espessa e lignificada (Figura 11D-F). A reação com o reagente de Wagner no pericarpo não detectou alcaloides (Figura 11G-I), o que provavelmente se deve à sensibilidade do método, cafeína, teobromina e teofilina foram detectadas nas análises por HPLC. Porém, foi o tecido com menor quantidade de metilxantinas, entre aqueles analisados.

No decorrer do desenvolvimento do embrião, o endosperma é consumido e o tecido de reserva na semente quiescente são os cotilédones, que ocupam a maior parte do volume da semente (Figura 11N-O). A análise com o reagente de Wagner revelou a presença de grãos de amido e alcaloides (coloração castanha) no interior das células do cotilédone. Entretanto, diferenças ao longo do desenvolvimento não puderam ser notadas, o que é esperado em uma técnica qualitativa, como a histoquímica (Figura 11M-O).

O envoltório da semente imatura apresenta células com núcleos evidentes, conteúdo celular denso, presença de amido e paredes celulares delgadas (Figura 11J e M). Nas fases seguintes até a semente madura, a camada mais externa do envoltório seminal (exotesta) torna-se extremamente lignificada e rígida, enquanto as outras camadas celulares tornam-se colabadas. Na região do envoltório seminal próximo ao arilo, várias camadas externas tornam-se lignificadas (Figura 11J-O). Grãos de amido foram observados no arilo das sementes em fase verde e intermediária de desenvolvimento.

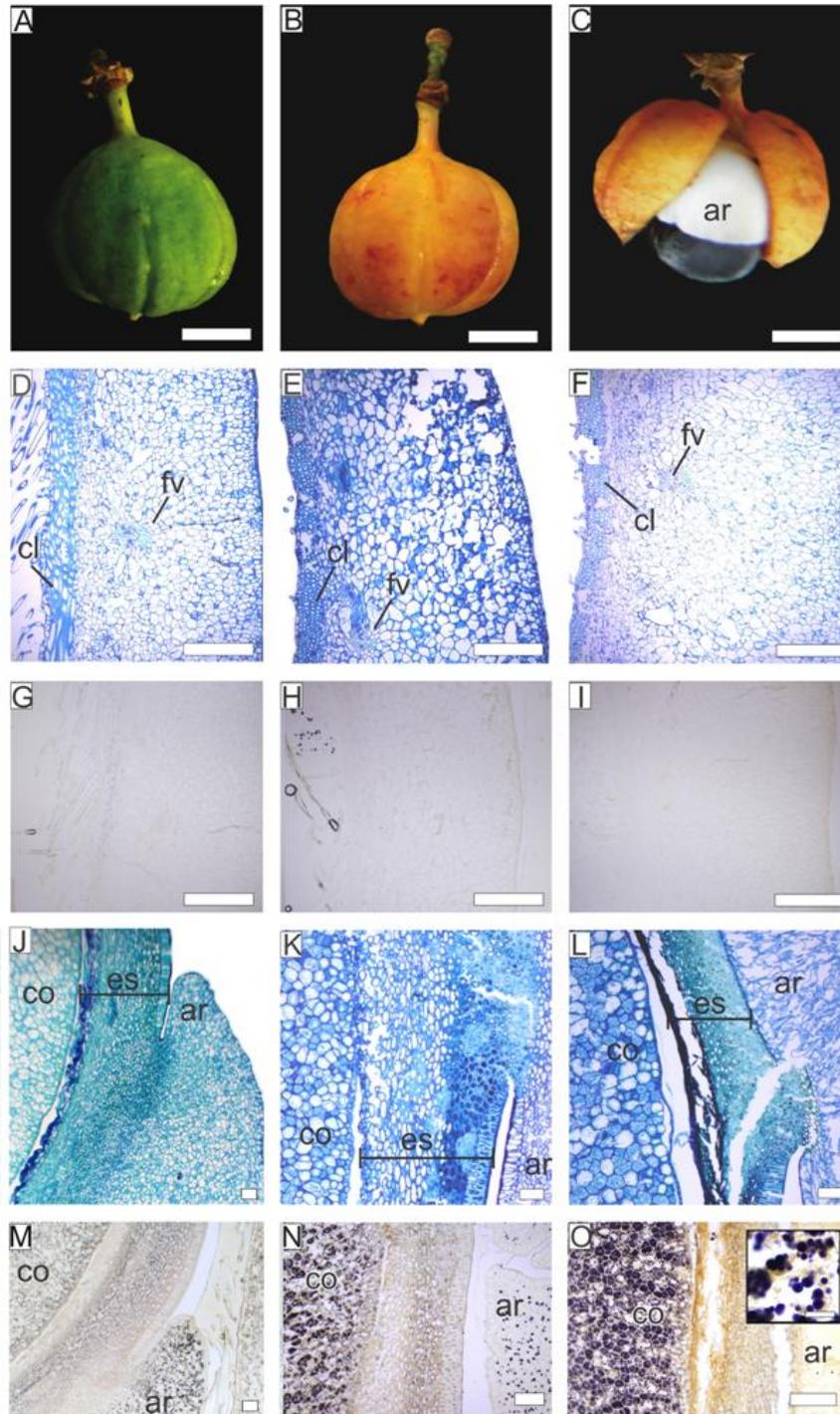


Figura 11. Frutos de guaraná verde (A), intermediário (B) e maduro (C); Cortes histológicos longitudinais do pericarpo (D-F) e semente (J-L); teste histoquímico com reagente de Wagner em corte longitudinal do pericarpo (G-I) e semente (M-O). As figuras em coluna são de estádios de desenvolvimento referentes aos frutos em A-C. **cl** = célula lignificada, **es** = envoltório seminal, **co** = cotilédone, **ar** = arilo, **fv** = feixe vascular. Barras: A-C = 1 cm; D-I = 300 μ m; J-L = 50 μ m; M-O = 100 μ m; O em detalhe = 20 μ m.

4.3 Atividade da cafeína sintase

A atividade da enzima CS foi determinada em sementes de guaraná em diferentes estádios de desenvolvimento (tabela 6). A atividade é significativamente maior no estágio verde, reduzindo com o decorrer do desenvolvimento do fruto.

Tabela 6. Atividade de cafeína sintase em sementes de frutos de guaraná em diferentes estádios de desenvolvimento.

Estádio de desenvolvimento	Atividade (fkat mg⁻¹ proteína)
Verde	20,9 ± 2,4*
Intermediário	6,6 ± 1,0
Maduro	3,8 ± 0,9

Os valores são médias de triplicatas com desvio padrão. * indica diferença significativa pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Parâmetros cinéticos foram determinados em extratos de sementes de frutos verdes pelo método de ajuste de curva de Lineweaver-Burk. Os valores do K_m e da V_{max} da CS tendo teobromina como substrato foram 259 μM e 87 $\mu\text{mol min}^{-1}$, respectivamente.

4.4 Alinhamento múltiplo e análise filogenética

A partir da busca de *reads* de CS no banco de EST de guaraná foi gerado um *contig* (*PcCS*) com 1080 pares de bases da região codificadora do gene (CDS). Utilizando-se primers flanqueadores e internos da CDS foram feitas amplificações por RT-PCR e os fragmentos obtidos foram sequenciados. A sequência foi então alinhada com a sequência do *contig*, confirmando sua identidade. A sequência foi traduzida e depois alinhada com as sequências traduzidas das enzimas que catalisam em outras espécies a metilação de 7-metilxantina para teobromina, TS e da teobromina para cafeína, CS (figura 12).

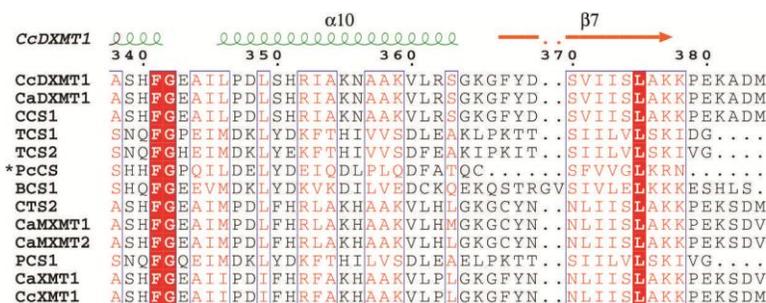


Figura 12. Alinhamento de cafeína sintase de guaraná (*PcCS*) com sequências representantes de *N*-metiltransferases de outras espécies. Estruturas secundária moldadas a partir de *CcDXMT1* (cafeína sintase de café). O núcleo de ligação do domínio de SAM está colorido em verde, enquanto que o domínio de enovelamento helicoidal está colorido em laranja. Os motivos de ligação de SAM (A, B' e C) e a região conservada YFFF são mostrados YFFF por caixas em preto. Números de acesso: CcDXMT, DQ422955; CaDXMT1, AB084125; CCS1, AB086414 ; TCS1, AB031280; TCS2, AB031281; PcCS (este estudo); BCS1, AB096699; CTS2, AB054841; CaMXMT1, AB084794; CaMXMT2, AB084126; PCS1, AB207819; CaXMT1, AB048793; CcXMT1, DQ422954.

A proteína do gene isolado de guaraná (*PcCS*) é altamente conservada nos domínios de reconhecimento da família das metiltransferases, ou seja os motivos A, B' e C, específicos para a ligação com S-adenil-metionina (SAM) e a região conservada YFFF (figura 12).

A predição da estrutura bidimensional da enzima a partir de CcDXMT1 (CS de *Coffea canephora*) mostra que PcCS possui resíduos de aminoácidos diferentes nas posições 27 (T = treonina), 239 (L = leucina) e 266 (Y = tirosina), consideradas cruciais para reconhecimento do substrato específico 7-metilxantina ou teobromina da enzima de café (figura 12) (McCarthy & McCarthy, 2007).

PcCS mostrou maior identidade com sequências de aminoácidos de *N*-metiltransferases de espécies acumuladoras de teobromina, *T. cacao* (BCS1), *Camellia irrawadiensis* (ICS1) e *C. ptilophylla* (PCS1), sendo ID = 0,483, 0,455 e 0,449, respectivamente. Para as demais espécies a identidade não passou de 0,350. As similaridades entre as sequências é evidenciada quando organizadas na árvore filogenética (figura 13).

A árvore filogenética ramificou-se claramente em dois clados. O clado onde se posicionou PcCS encontram-se seqüências de *N*-metiltransferases de chá e cacau, espécies acumuladoras tanto de teobromina como de cafeína. O outro clado agrupou seqüências de MXS, TS e CS de café (*C. arabica* e *C. canephora*).

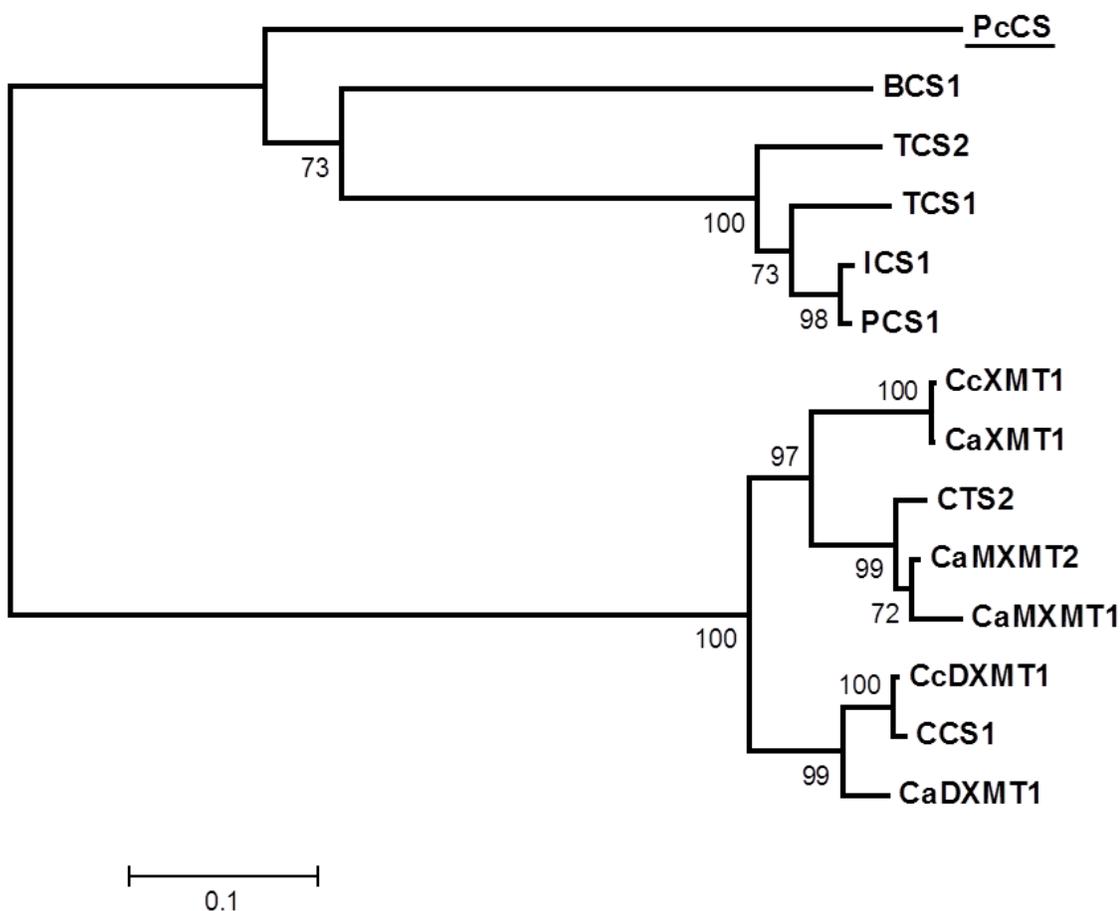


Figura 13. Árvore filogenética de *N*-metiltransferases de guaraná PcCS (presente estudo), *C. arabica* (CaXMT1: AB048793, CTS2: AB054841, CaMXMT1: AB084794, CaMXMT2: AB084126, CaDXMT1: AB084125, CCS1: AB086414), *C. canephora* (CcXMT1: DQ422954, CcDXMT: DQ422955), *C. sinensis* (TCS1: AB031280, TCS2: AB031281), *C. irrawadiensis* (ICS1: AB056108), *C. pitophila* (PCS1: AB207819) e *T. cacao*, (BCS1, AB096699). Iniciais seguidas de XMT indicam metilxantosina sintase, MXMT e TS indicam teobromina sintase e DXMT e CS indicam cafeína sintase.

4.5 Expressão do gene de cafeína sintase (*PcCS*) em frutos de guaraná

4.5.1 Seleção do gene referência

A fim de normalizar a expressão do gene de CS de guaraná foram testados 13 genes de referência, que tem sido relacionados a processos celulares basais presentes em diferentes tipos celulares. O perfil de transcrição desses 13 genes foi analisado por qRT-PCR em seis tipos de amostras (diferentes tecidos e cultivares), sendo que o gene ribossomal 18s apresentou o menor valor médio de *Ct* (11,2), sugerindo que é altamente expresso nos tecidos analisados (figura 14). Dentre os demais genes candidatos, os valores médios de *Ct* variou de 21,3 à 27,1, sendo que Ciclof, *EF1a* *GAPDH* tiveram os menores valores, e b-tub junto com actina tiveram o menor valor médio de expressão.

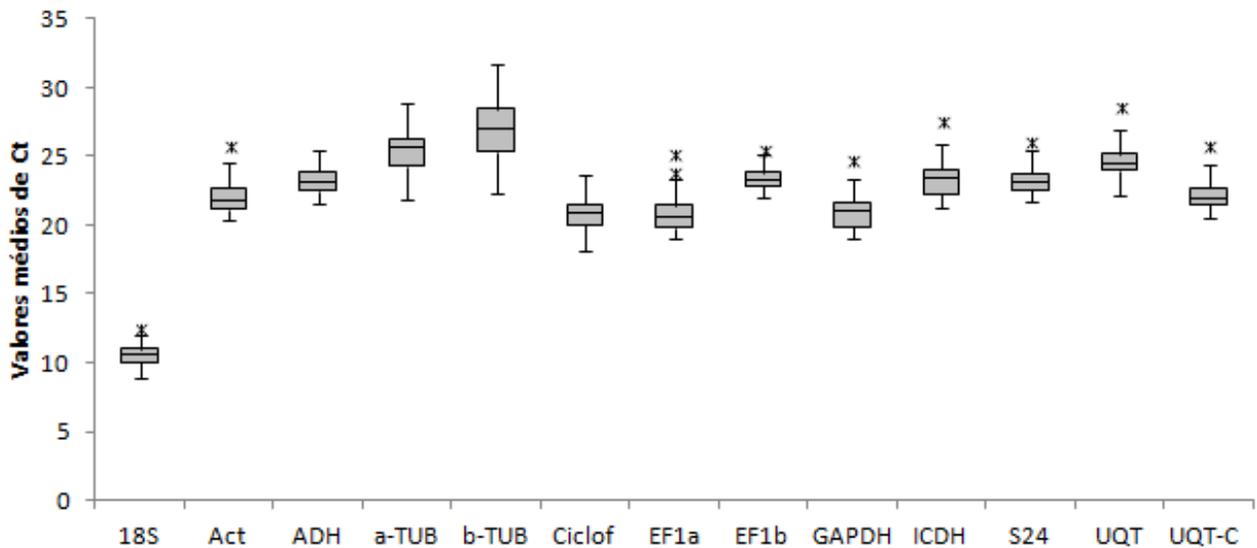


Figura 14. Valores de *Ct* de RT-qPCR de cada gene referência nas condições analisadas. A caixa indica os percentis 25 e 75, as barras verticais representam os valores mínimos e máximos e a barra no interior da caixa representa a mediana. Asteriscos representam os valores outliers.

Os genes candidatos *Ef1b*, *UQT* e *s24* apresentaram o menor coeficiente de variação, sendo 0,15%, 0,17% e 0,18%, respectivamente. O gene 18s também foi o que apresentou maior coeficiente de variação (CV=0,73), o que seria esperado pois sendo altamente expresso, pode apresentar mais variações de expressão em diferentes condições (figura 14).

Para analisar de forma mais detalhada a expressão desses 13 genes, os dados de expressão foram avaliados em seis tipos de amostras, sendo um conjunto geral, compostos por frutos (semente e pericarpo) de três cultivares de guaranazeiro (BRS-Amazonas, BRS-Maués, BRS-Luzéia), dois conjuntos compostos por tecidos diferentes do fruto (semente e pericarpo) das três cultivares, e outros três conjuntos de frutos de cada cultivar individualmente. A estabilidade de expressão dos genes foi avaliada utilizando os algoritmos NormFinder (tabela 7) e geNorm (tabela 8).

Tabela 7. Estabilidade de expressão de candidatos à genes referencia calculada pelo algoritmo NormFinder, em seis condições analisadas.

Nome do gene	Valor de estabilidade					
	Fruto todas as cultivares	Fruto BRS-Amazonas	Fruto BRS-Maués	Fruto BRS-Luzéia	Semente todas as cultivares	Pericarpo todas as cultivares
18S	0,168	0,140	0,164	0,171	0,197	0,112
ACT	0,078	0,098	0,063	0,063	0,078	0,064
ADH	0,105	0,100	0,082	0,101	0,117	0,075
a-TUB	0,122	0,103	0,110	0,146	0,127	0,101
b-TUB	0,114	0,104	0,131	0,098	0,124	0,093
Ciclof	0,087	0,067	0,088	0,089	0,099	0,066
EF1-a	0,124	0,102	0,118	0,082	0,111	0,099
EF1-b	0,128	0,133	0,076	0,107	0,154	0,082
GAPDH	0,113	0,108	0,097	0,126	0,117	0,055
ICDH	0,091	0,092	0,095	0,084	0,129	0,045
S24	0,096	0,064	0,102	0,106	0,133	0,051
UBQT	0,095	0,075	0,087	0,062	0,111	0,071
UBQT-C	0,131	0,125	0,093	0,127	0,122	0,096
Melhor combinação de genes	ACT UBQT	Ciclof S24	ICDH UBQT-C	ACT UBQT	EF1a UBQT	GAPDH S24
Estabilidade (melhor combinação)	0,054	0,039	0,044	0,046	0,052	0,033

Por se tratar de algoritmos diferentes, os valores de estabilidade também são diferentes. NormFinder se baseia nas variações inter e intra-grupo para determinar o fator de normalização, assim, ao escolher o melhor par de genes, é também calculado o valor de estabilidade para a melhor combinação (Andersen *et al.*, 2004). O geNorm calcula a média da variação de expressão dos genes em pares, em comparação com a estabilidade de expressão média (M) de todos os outros genes a serem testados (Vandesompele *et al.*, 2002). Assim, a eleição do melhor par de gene é variável entre os dois algoritmos, baseado na classificação (ranking) gerada por cada um.

Tabela 8. Estabilidade de expressão de candidatos à genes referencia calculada pelo algoritmo geNorm após a exclusão gradual de cada gene referência menos estável, em seis condições analisadas.

Nome do gene	Valor de estabilidade (M)					
	Fruto todas as cultivares	Fruto BRS- Amazonas	Fruto BRS- Maués	Fruto BRS- Luzéia	Semente todas as cultivares	Pericarpo todas as cultivares
18S	0,7544	0,7339	0,6568	0,6693	0,7919	0,5542
ACT	0,5933	0,5500	0,5396	0,4617	0,296	0,3971
ADH	0,4343	0,3398	0,2653	0,4185	0,4898	0,3587
a-TUB	0,8412	0,6498	0,7760	0,7023	0,8788	0,6629
b-TUB	0,9969	0,9053	0,964	0,971	1,0927	0,7629
Ciclof	0,5502	0,5638	0,4710	0,5772	0,5699	0,4931
EF1-a	0,6473	0,5380	0,6046	0,5372	0,3801	0,5227
EF1-b	0,6981	0,8201	0,3144	0,3119	0,7153	0,4303
GAPDH	0,5653	0,4766	0,4326	0,6102	0,296	0,4772
ICDH	0,5762	0,4950	0,5585	0,5124	0,538	0,4107
S24	0,4343	0,3398	0,2653	0,3119	0,6178	0,3587
UBQT	0,5063	0,4489	0,3628	0,4907	0,5938	0,4571
UBQT-C	0,6257	0,5778	0,5168	0,5542	0,4530	0,3897
Melhor combinação de genes	ADH S24	ADH S24	ADH S24	EF1-b S24	ACT GAPDH	ADH S24

Nenhum dos conjuntos experimentais estudados obteve o mesmo par de genes referência selecionado pelo geNorm e NormFinder. De acordo com o NormFinder, *UQT* foi selecionado mais vezes como um dos dois genes mais estáveis, enquanto que no geNorm *S24* foi selecionado em quatro das seis condições analisadas, sendo que para o último algoritmo, em quatro dos seis conjuntos experimentais (frutos de diferentes cultivares; pericarpo de diferentes cultivares; frutos de BRS-Amazonas; frutos de BRS-Maués) *S24* e *ADH* foram indicados.

A categorização das análises em diferentes conjuntos experimentais, mostrou ser eficiente, uma vez que os genes selecionados como referência, foi de maneira geral, diferente entre os conjuntos. Nos valores dados pelo geNorm (tabela 8) nota-se que a estabilidade de expressão é afetada principalmente pelos tecidos em relação às cultivares, pois para frutos os genes *S24* e *ADH* foram os mais estáveis quando avaliadas todas as cultivares, e também as cultivares BRS-Amazonas e BRS-Maués, individualmente.

Apesar do NormFinder ser preferencialmente mais utilizado, pelo fato de fazer análises inter e intra genes, sendo considerado mais robusto, o geNorm avalia o número mínimo de genes que devem ser utilizados para a normalização de um determinado conjunto de amostras. Este algoritmo indica um valor de variação em pares (Vx/y) entre dois genes referência (fatores de normalização), sendo aceito o valor de corte de 0,15, abaixo do qual a inserção de um gene de referência adicional não é necessária (utilizando o número de gene referencia representado por x em Vx/y) (figura 15) (Vandesompele *et al.*, 2002).

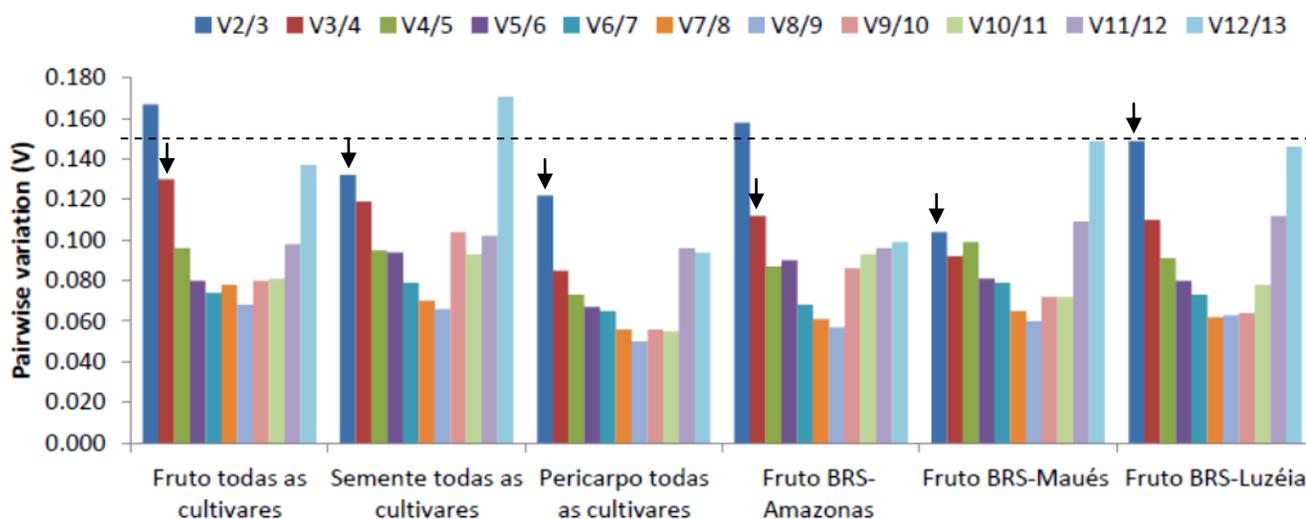


Figura 15. Variação pairwise (V) para determinação do número ótimo de genes referência para normalização em cada condição analisada. As setas indicam o número ideal de genes para normalização.

Neste trabalho investigou-se a expressão de *PcCS* em frutos de guaraná das cultivares BRS-Amazonas e BRS-Maués, para isso foram utilizados como genes normalizadores aqueles eleitos os mais estáveis do conjunto experimental de frutos para todas as cultivares, como também analisou-se a expressão de *PcCS* em tecidos vegetativos de BRS-Amazonas, para essas amostras adotou-se os mesmos genes de referencias indicados para normalizar a expressão em frutos. Apesar de $V_{2/3}$ para o conjunto ser abaixo de 0,150, o que indica ser necessário uso de apenas dois genes referencias (figura 15), optou-se por utilizar genes eleitos tanto por NormFinder como por geNorm (tabela 9), totalizando quatro genes de referência.

Tabela 9. Genes referência selecionados pelos programas NormFinder e geNorm utilizados para a normalização da expressão do gene de cafeína sintase (*PcCS*) em pericarpo e semente de diferentes cultivares de guaraná.

	Fruto	Pericarpo	Semente
Genes normalizadores	<i>ACT</i>	<i>GAPDH</i>	<i>EF1a</i>
	<i>UQT</i>	<i>S24</i>	<i>UQT</i>
	<i>ADH</i>	<i>ADH</i>	<i>ACT</i>
	<i>S24</i>		<i>GAPDH</i>

4.5.2 Expressão relativa de PcCS

PcCS é expresso em todos os tecidos analisados nas cultivares testadas, sendo significativamente mais elevado em semente verde. Nota-se maior expressão em tecidos verdes, com redução nos estádios mais avançados de desenvolvimento em folhas, sementes, e pericarpo (Figura 16). A expressão de *PcCS* nos tecidos verdes foi 7 a 20 vezes maior que nos demais estádios em sementes e 2 a 2,5 vezes maior em pericarpo.

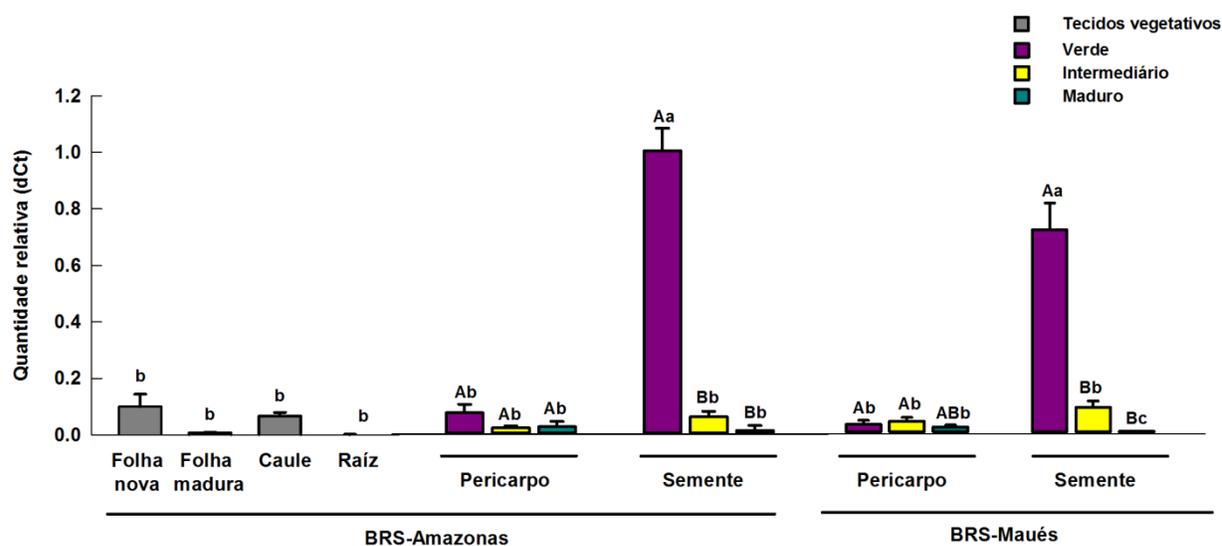


Figura 16. Expressão relativa de *PcCS* em tecidos vegetativos de BRS-Amazonas e sementes e pericarpo de guaraná em diferentes estádios do fruto para BRS-Amazonas e BRS-Maués. Médias seguidas de letras maiúsculas indicam diferenças estatísticas entre cultivares para um mesmo tecido; letras minúsculas indicam diferenças entre tecidos de uma mesma cultivar. Análise pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

4.5.3 Análise de expressão por hibridização *in situ*

Na hibridização *in situ* a expressão do gene é indicada indiretamente pela detecção da cor púrpura. A marcação da sonda do gene *PcCS* nas sementes e frutos de *P. cupana* apresentou

variação na localização do sinal e de acordo com o estágio de desenvolvimento. Na semente verde a marcação foi evidenciada nas células do cotilédone (figura 17A, setas); nas sementes em fase intermediária (figura 17E) e madura (figura 17F), a intensidade do sinal foi reduzida e sua visualização dificultada pela presença de muitos grânulos de amido e pela presença de substâncias que apresentam naturalmente coloração laranja. Não foi observado o sinal positivo de hibridização *in situ* no tegumento da semente (figura 17C), no arilo (figura 17D) e no pericarpo em nenhum dos estádios de desenvolvimento.

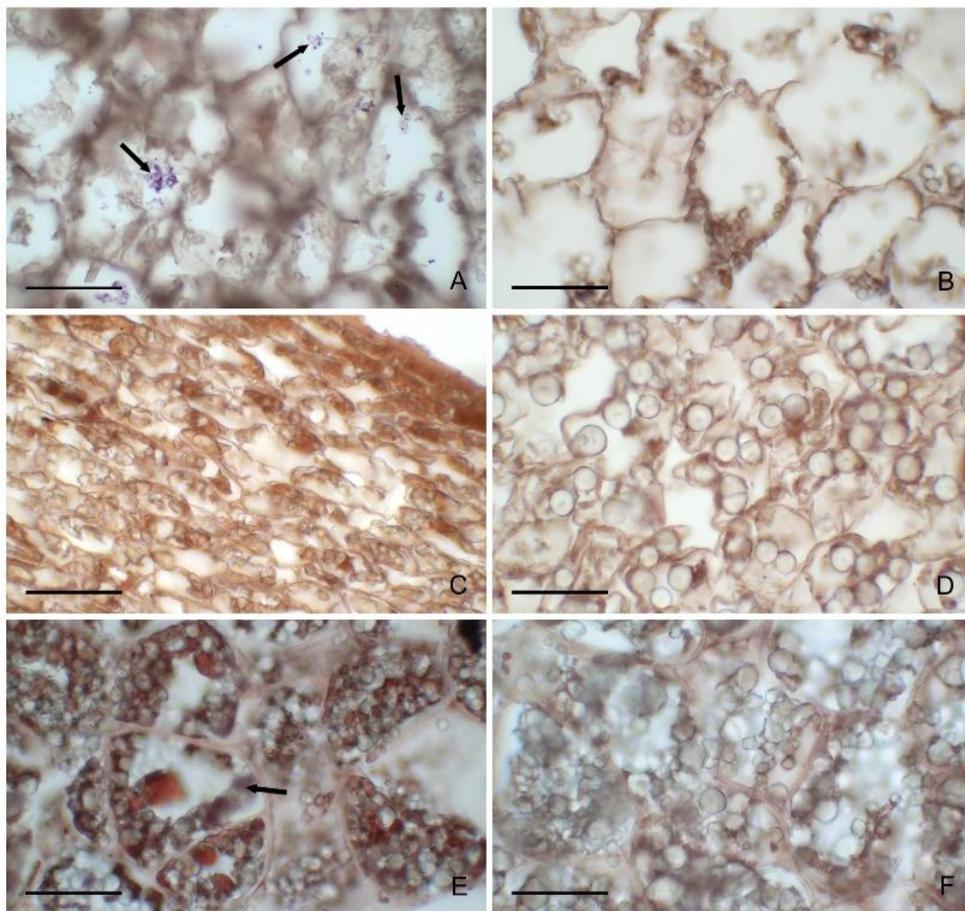


Figura 17. Hibridização *in situ* em seções longitudinais do fruto e semente de *guaraná* com a sonda antisense para o gene *PcCS*. A: Cotilédone da semente verde, coloração púrpura indica a detecção de transcritos (indicada pelas setas). B: Controle (cotilédone verde), hibridização com a sonda sense. C: Tegumento da semente verde. D: Arilo da semente verde. E: Cotilédones da semente em fase intermediária, coloração púrpura indica a detecção de transcritos (indicada pelas setas) F: Cotilédones da semente madura. Barras = 50 µm.

4.6. Clonagem e expressão da cafeína sintase recombinante

A expressão de *PcCS* em *E. coli* BL21-pRil foi eficiente à 37°C (dados não apresentados), sendo que a indução por 4 h com IPTG a 0,1M foi suficiente pra induzir a expressão de quantidades substanciais da proteína (figura 18). Uma banda intensa em gel de eletroforese foi observada no extrato total induzido na posição esperada de massa teórica de 43,7 Kda, considerando a cauda de histidina 6xHis característica da expressão em pET28a (figura 18 - canaleta 2), em comparação com o extrato total de células não induzidas (canaleta 1). A maior parte da proteína recombinante produzida é encontrada no pellet (figura 18 - canaleta 4).

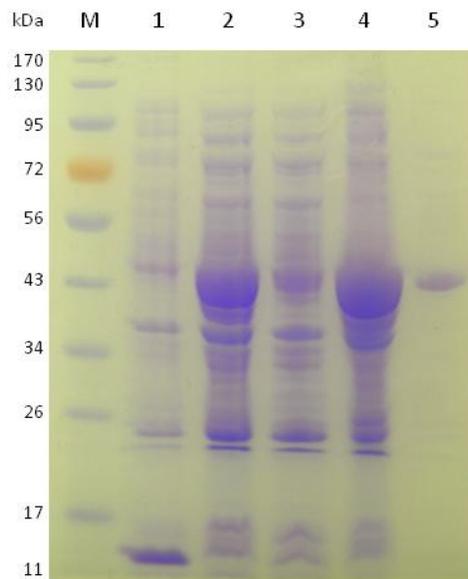


Figura 18. Análise de expressão de *PcCS* em pET28a e purificação da proteína, por SDS-PAGE 12,5%, corado com Coomassie Blue. M = Marcador de massa molecular; 1 = Extrato bruto da bactéria sem indução (controle); 2 = Extrato bruto da bactéria com indução da expressão com IPTG por 4h à 37°C; 3 = Fração induzida solúvel. 4. Fração induzida insolúvel. 5 = Fração de extrato solúvel purificada por cromatografia de afinidade com a resina Ni-NTA agarose.

A produção excessiva de proteínas pode ocasionar a formação de corpos de inclusão, neste caso, a capacidade da maquinaria das células, responsável pelo enovelamento proteico na forma nativa, fica comprometida (Patra *et al.*, 2000). Como o trabalho com reenovelamento de proteínas pode não restaurar a atividade enzimática, optou-se por utilizar a porção solúvel encontrada no sobrenadante

(figura 18 - canaleta 3) e que se mostrou suficiente para purificação da proteína e ensaios de análise funcional.

A proteína PcCS semipurificada por cromatografia de afinidade observado pela intensidade de banda na região esperada possui K_m de 470 μM para teobromina e V_{\max} de 0,02 $\mu\text{M min}^{-1}$.

Nos estudos de funcionalidade (tabela 10), a PcCS produzida em *E. coli* se mostrou capaz de catalisar a reação de metilação de 7-metilxantina para teobromina (3,7-dimetilxantina), bem como de teobromina para cafeína (1,3,7-trimetilxantina). A proteína codificada possui uma massa molecular teórica de 40,1 kDa e pI teórico de 5,14 (<http://ca.expasy.org/>).

Tabela 10. Especificidade por substratos de PcCS recombinante.

Enzima recombinante	Substrato/posição de metilação						Referência
	1-mX/3N	3-mX/1N	7-mX/3N	pX/3N	Tf/7N	Tb/1N	
<i>Teobromina sintase</i>		Atividade relativa (%)					
CaMXMT1	ND	ND	100	5.0	ND	ND	Uefuji <i>et al.</i> , 2003
CaMXMT2	ND	ND	100	5.3	ND	ND	Uefuji <i>et al.</i> , 2003
CTS1	ND	ND	100	1.4	ND	ND	Mizuno <i>et al.</i> , 2003b
BTS1	ND	ND	100	ND	ND	ND	Yoneyama <i>et al.</i> , 2006
ICS1	ND	ND	100	ND	ND	ND	Yoneyama <i>et al.</i> , 2006
PCS1	ND	ND	100	11	ND	ND	Yoneyama <i>et al.</i> , 2006
<i>Cafeína sintase</i>							
CCS1	0.53	0.82	24	100	ND	25	Mizuno <i>et al.</i> , 2003b
CaDXMT1	ND	ND	1.0	100	ND	3.8	Uefuji <i>et al.</i> , 2003
TCS1	5.2	0.4	43.5	100	0.0	7.8	Kato <i>et al.</i> , 2000
PcCS	ND	ND	53	ND	ND	100	Este estudo
Produto	Tf	Tf	Tb	Cf	Cf	Cf	

Atividade relativa apresentada em porcentagem da maior atividade. ND = não detectado. mX = metilxantina, pX = paraxantina, Tf = teofilina, Tb = teobromina. A atividade PcCS recombinante para teobromina é 9 fkat mg^{-1} proteína. Os valores representam médias de triplicatas. Enzimas de *C. arabica* = CTS1, CCS1, CaDXMT1, *C. sinensis* = TCS1, *C. irrawadiensis* = ICS1, *C. ptilophylla* = PCS1 e *T. cacao* = BTS1.

Os produtos da atividade de PcCS foram identificadas e espectrômetro de massa. A formação de cafeína a partir de 7-metilxantina e teobromina confirma a bifuncionalidade de PcCS. Também ficou demonstrada sua maior afinidade por teobromina como substrato, uma vez que na reação utilizando 7-metilxantina como substrato não foi observado acúmulo de teobromina, que foi convertida em cafeína (figura 19).

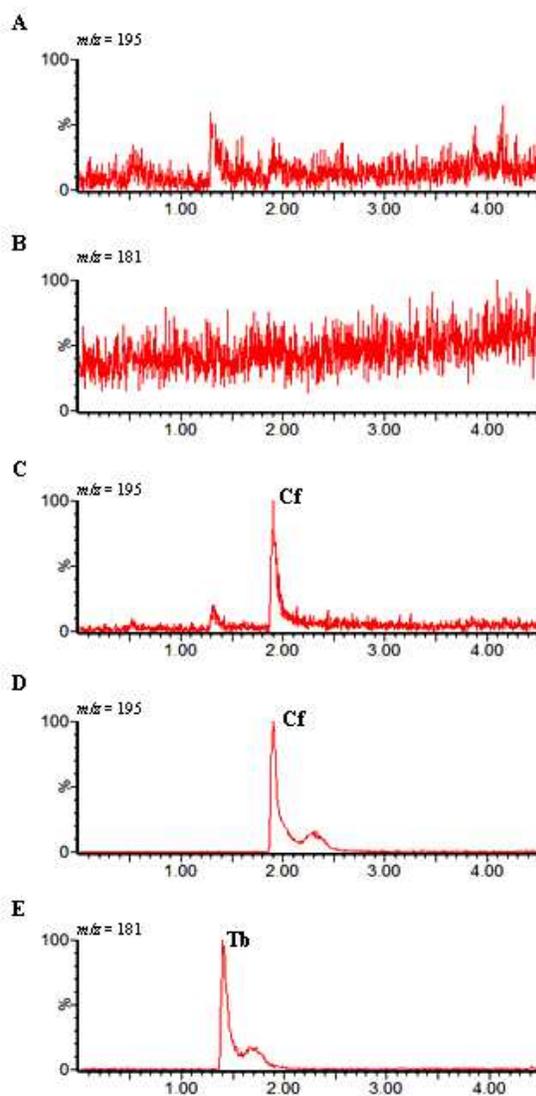


Figura 19. Cromatogramas de análises em UPLC-MS dos produtos da reação enzimática de PcCS com 7-metilxantina como substrato. A = Controle da reação enzimática (sem substrato, 7-metilxantina) com ausência de sinal do íon $m/z = 195$ de cafeína. B = Reação enzimática com ausência do íon $m/z = 181$, característico de teobromina. C = Reação enzimática com sinal do íon $m/z = 195$ de cafeína. D = Padrão de cafeína - íon $m/z = 195$, E = Padrão de teobromina - íon $m/z = 181$.

5. DISCUSSÃO

Distribuição de cafeína nos tecidos de guaraná

Em todos os tecidos e estádios analisados foi detectada a presença de metilxantinas, que mostrou-se variável entre tecidos e estádios de desenvolvimento. Em caule e folha, a teobromina foi a metilxantina majoritária, confirmando estudos prévios em *P. cupana* (Weckerle *et al.*, 2003). Esses autores investigaram o conteúdo de metilxantina em 34 espécies de *Paullinia*, das quais em apenas três foi detectada a presença desses compostos. Das três espécies, *P. cupana* e *P. pachycarpa* apresentam teobromina em maior quantidade no tecidos vegetativos, enquanto que *P. yoco* cafeína era o alcaloide predominante para os tecidos do caule (córtex apical, córtex basal e lenho basal).

Em geral, a biossíntese da cafeína ocorre em tecidos mais novos, como folhas e frutos jovens e botões de florais (Ashihara *et al.*, 2011). Nenhuma cultivar apresentou valores expressivos de cafeína em folhas, mesmo nas mais jovens (figura 7). Deve-se notar porém que teobromina tanto é precursor de cafeína como também produto de degradação desse alcaloide (ver figura 4) (Ashihara *et al.*, 2011; Suzuki & Waller, 1984a, b). O acúmulo de teobromina então poderia estar relacionado não só ao balanço entre biossíntese ou degradação, mas também em relação à medida que cafeína se degradaria, ou seja, via teofilina ou teobromina, como mostrado ocorrer em *C. dewevrei*, que acumula teobromina durante a degradação de cafeína (Mazzafera *et al.*, 1994a).

Ashihara *et al.* (2011) destacam que o acúmulo transiente de teobromina é frequentemente observada no tecido jovem de espécies acumuladoras de cafeína em função da alta taxa de síntese desse último alcaloide. Com o amadurecimento do tecido ocorre diminuição da taxa biossintética, diminuindo o teor de ambos os alcaloides (Mazzafera *et al.*, 1994a). Porém chama atenção em nossos estudos que a expressão de *PcCs* foi muito baixa nos tecidos vegetativos, sendo

possível que apenas esta enzima esteja envolvida na biossíntese de cafeína em guaraná, e que nesses tecidos o acúmulo de teobromina seja consequência de maior expressão de uma TS, conforme discutiremos adiante.

A tendência de maior acúmulo de teobromina em folhas jovens de guaraná também foi detectado por Weckerle *et al.* (2003), em que folhas jovens apresentaram 1,3% desse alcaloide contra 0,028% em folhas adultas. Os mesmos padrões de distribuição de metilxantinas em diferentes estádios de desenvolvimento de folhas também foram encontrados por Oliveira (2010).

O perfil de metilxantinas no caule não foi muito investigado para espécies acumuladoras de cafeína, e o que se observou aqui, tal como em folhas, o teor de teobromina é maior. Mas chama atenção o fato de populações indígenas da Colômbia e Equador consumirem uma bebida rica em cafeína feita preferencialmente a partir do córtex da porção basal do caule de *P. yoco*. Para essa espécie, o conteúdo de cafeína da porção basal é cerca de cinco vezes maior que na porção apical (Weckerle *et al.*, 2003), indicando que assim como observado para sementes de café, com o amadurecimento ocorre o acúmulo de cafeína (Mazzafera *et al.*, 1991; Ashihara *et al.*, 2011). Adicionalmente, em *P. yoco* o córtex da porção basal com 0,450% de cafeína apresenta quase o dobro do que o lenho (Weckerle *et al.*, 2003), corroborando com os dados de Mazzafera (1994) para mate e de Pires (1949) para *P. cupana*, na qual a casca do caule apresenta 1,75%, enquanto que a madeira apenas 0,19%. No caso de *P. cupana*, observamos que apesar do caule acumular preferencialmente teobromina, das cinco cultivares estudadas, quatro apresentaram algum teor de cafeína apenas na parte basal do caule, demonstrando comportamento semelhante ao de café e *P. yoco*.

Em relação a inflorescência, pouco se sabe a respeito da presença de alcaloides purínicos nesse tecido. Em café foram encontrados altos teores de cafeína em flores (Raju & Gopal, 1979). Em *Citrus* foram encontrados alcaloides purínicos apenas nos órgãos masculinos da

flor, o estame. Durante o desenvolvimento das flores de diferentes espécies desse gênero o momento da antese é o que acumula o maior conteúdo de cafeína e em menores proporções teofilina, em órgãos especificamente masculinos, filete, antera e no pólen, em contraste com o botão floral onde não detectada a presença desses metabólitos (Kretschmar & Baumann, 1999).

No guaraná, entre as metilxantinas analisadas, a teobromina foi encontrada em maior concentração na inflorescência, chegando a valores até seis vezes maior que de cafeína (figura 9). Como essas análises foram realizadas em toda a inflorescência, esta inclui botões florais até flores completamente aberta e os vários tipos de flores encontrados em guaranazeiro, como flores pseudo-masculinas (órgão femininos rudimentares) e pseudo-femininas (órgãos masculinos rudimentares), não sendo possível relacionar a presença desses metabólitos com tecidos/órgãos ou estádios de desenvolvimento específicos.

Devido à elevada quantidade de cafeína, a semente de guaraná recebe maior atenção no que se refere a estudos de conteúdo de metilxantinas. Os níveis de cafeína encontrados nos frutos de guaraná das cultivares aqui estudadas (figura 10) estão de acordo com a literatura, que descreve teores entre 2,5 a 6% para sementes e de zero a 1% no pericarpo (Pires, 1949; Maravalhas, 1965; Spoladore, 1987; Baumann *et al.*, 1995; Oliveira, 2010; Ashihara *et al.*, 2011). A predominância de cafeína nas sementes de guaraná em contraste com o acúmulo de teobromina nos demais tecidos sugere uma adaptação às condições de pressão do ambiente, podendo ser uma especiação para defesa de predadores específicos desse tecido (Mithöfer & Boland, 2012; Weckerle *et al.*, 2003). Baumann *et al.* (1995) sugeriram que o fato de aves engolirem as sementes de guaraná sem quebrá-las e, portanto, passarem pelo trato digestivo intactas, estaria relacionado ao alto teor de cafeína. Por outro lado, o arilo, que é rico em açúcares não tem traços de cafeína, é digerido.

Os conteúdos de metilxantinas, de maneira geral, foram elevados no estágio imaturo, tanto em sementes quanto no pericarpo (figura 8). Os testes com o reagente de Wagner nas análises

anatômicas (figura 9) confirmaram a presença maior de alcaloides nas sementes de frutos imaturos. Concordante com os dados do teor de metilxantinas em sementes, a atividade de CS foi intensa no estágio verde quando comparada com os demais (tabela 6). Acúmulo de cafeína em tecidos mais novos tem sido observado em folhas e frutos de café (Clifford & Kazi, 1987; Fujimori e Ashihara, 1994; Mazzafera *et al.*, 1994a; Ashihara *et al.*, 1996a) e tem sido relacionado à uma alta atividade de síntese em comparação a de degradação. Com o amadurecimento, a taxa de biossíntese diminui em proporção a de degradação, caindo os teores de cafeína, conforme também observado aqui. No pericarpo, onde teobromina foi o alcaloide encontrado em maior quantidade, também se observou queda com o amadurecimento, assim como em cacau, o decorrer do desenvolvimento dos frutos coincide com o decréscimo acentuado conteúdo de teobromina em pericarpo (Zheng *et al.*, 2004; Pereira-Caro *et al.*, 2013).

Os baixos valores de teofilina nos frutos de guaraná também foram encontrados por Baltassat *et al.* (1985), que encontraram valores de zero a 0,25% em sementes. No presente trabalho, no pericarpo o conteúdo de teofilina variou entre zero e 0,035%, superando aqueles apresentados por Baumann *et al.* (1995), que não encontraram valores maiores que 0,001%. Uma vez que a degradação de cafeína é bastante efetiva, teofilina é eliminada no sistema (Suzuki & Waller, 1984a, b).

Em folhas de chá, essa degradação ocorre efetivamente em folhas maduras, enquanto que em folhas jovens, quantidades consideráveis de teofilina são recuperadas em *turnover* ativo através da via 3-metilxantina → teobromina → cafeína (Ashihara *et al.*, 1997; Mazzafera, 2004). Uma vez que teofilina é degradada muito mais rapidamente do que a conversão de cafeína em teofilina, essa etapa é limitante para a via, e por isso alta concentração de cafeína é acumulada em tecidos de *C. sinensis* e *C. arabica* (Mazzafera *et al.*, 1994a; Ashihara *et al.*, 1996b; Ashihara e Crozier, 1999a; Ashihara *et al.*, 2011).

Isolamento e caracterização do gene de cafeína sintase em guaraná

A biossíntese de cafeína em plantas é mediada pela atividade de *N*-metiltransferases que atuam nos três passos da via biossintética (Figura 4). A indução e repressão dessas enzimas, sem dúvida, agem como mecanismos de controle primário da via que, por sua vez, possuem um controle secundário, imposto pela disponibilidade de substratos, tais como xantosina e SAM (Ashihara *et al.*, 2011).

Genes codificando para *N*-metiltransferases do metabolismo de metilxantinas foram identificados e isolados principalmente de café e chá (Kato & Mizuno, 2004; Ashihara *et al.*, 2008). Estas metiltransferases apresentam alta similaridade entre si. Teobromina e CS de café (*C. arabica*) possuem mais de 80% de identidade, no entanto, CS de café e chá tem apenas 34% de identidade. Por outro lado a similaridade é quase total entre as MXS. Dessa forma, a similaridade é maior entre enzimas parálogas de uma mesma espécie do que ortólogas para espécies diferentes.

Utilizando informação disponível no programa de sequenciamento de ESTs de guaraná (Ângelo *et al.*, 2008) foi possível montar um *contig* e com base nesta sequência isolamos a sequência gênica de uma metiltransferase de guaraná. A funcionalidade desse gene, denominado *PcCS*, que a caracterizou como uma CS, foi comprovada através da produção de uma proteína heteróloga e testes enzimáticos com diferentes substratos. A enzima é bifuncional, mostrando atividade para 7-metilxantina e teobromina, sendo esta última metilxantina o principal substrato. *PcCS* é expressa predominantemente em frutos imaturos, conforme mostrado por ensaios de qPCR e hibridização *in situ*. Frutos maduros tem reduzida expressão, assim como folhas, caule e raízes.

Os motivos A, B, C e regiões conservadas da *PcCS* são características de *O*-metiltransferases dependentes de SAM (Joshi & Chiang, 1998). O motivo B' e a região YFFF são específicos de uma família específica de metiltransferases, incluindo a CS (Kato & Mizuno, 2004).

A maioria dos membros da família que apresentam o motivo B' catalisa a formação de ésteres metílicos de moléculas pequenas utilizando o SAM como um doador de metil e substratos com um grupo carboxila passível de metilação. Entre outras metiltransferases, também fazem parte desse grupo a ácido salicílico carboxi-metiltransferase, a ácido benzóico carboxi-metiltransferase, ácido jasmônico carboxi-metiltransferase (Mizuno *et al.*, 2003b; Yoneyama *et al.*, 2006; Ishida *et al.*, 2009).

Com base na comparação da sequência traduzida de aminoácidos de *PcCS* com a CS de *C. canephora* (CcDXMT1- DQ422955), que teve sua estrutura cristalográfica definida (McCarthy & McCarthy, 2007), foi possível descartar a possibilidade de *PcCS* estar envolvida no primeiro passo de metilação da via de biossíntese de cafeína (ver figura 4). Dois aspectos importantes para a discriminação de substrato entre xantosina metiltransferase (XMT, metilxantina → 7-metilxantina) e dimetilxantina metiltransferase (DXMT, teobromina → cafeína) podem ser identificados. O primeiro é a presença de Ser-316 em XMT, a qual faz uma ponte de hidrogênio com o grupo hidroxila (O5) de xantosina, sendo que nos demais genes esta serina (Ser-316) é substituída por uma valina (Val) ou asparagina (Asn). O segundo aspecto está relacionado com diferenças conformacionais entre as metiltransferases, com destaque para Tyr-321 em XMT, que é importante para a ligação do hidrogênio com o grupo carboxi de xantosina, enquanto que Tyr-333 em DXMT não contribui diretamente para a ligação do substrato (McCarthy & McCarthy, 2007). Em *PcCS* o resíduo 333 é uma treonina.

Adicionalmente, as sequências de xantosina sintase (XMT) apresentam quase 100% de identidade entre si, enquanto que *PcCS* é apenas 34% semelhante à elas, o que seria o menor valor de identidade de *PcCS* para outra *N*-metiltransferase.

Ainda seguindo a caracterização tridimensional de CcMXMT1, McCarthy & McCarthy (2007) consideraram que os resíduos de aminoácidos são cruciais nas posições 27, 237 e 266 de

MXMT e DXMT de café para o reconhecimento 7-metilxantina ou teobromina. Para o reconhecimento de 7-metilxantina por MXMT os resíduos nestas posições são: Ala-27, Pro-237 e Phe-266; para o reconhecimento de teobromina por DXMT os resíduos são: Phe-27, Ser-237 e Ile-266. Em PcCS o aminoácidos encontrados nas posições 27 (T =treonina), 237 (P = prolina) e 266 (Y = tirosina) não se assemelham com os descritos para MXMT nem DXMT (figura 12). Por outro lado, em chá, TS (PCS1) e CS (TCS1) não apresentam diferenças nestes resíduos, que são 27-V, 237-T e 266-S. Logo, é pouco provável que diferenças nessas posição explique a seletividade entre o substrato para as MXMT e DXMT de diferentes espécies.

De acordo com Andrew McCarthy (comunicação pessoal) PcCS “it's quite different around the active site, especially around Leu-236/Pro-237/Trp-238, but it's hard to say if this is significant?” Em DXMT de café estes resíduos são representados por asparagina (236-N), serina (237-S) e metionina (238-M em *C. arabica*) ou isoleucina (238-I em *C. canephora*). Portanto, se a posição 238 é diferente nestas duas espécies de café, eventualmente as outras duas posições podem ser determinantes no reconhecimento de teobromina. Isto, no entanto, só poderá ser confirmado com a determinação estrutural de PcCS por cristalografia.

A identidade da proteína deduzida PcCS foi maior com TS (entre 44 e 48%) quando comparada com CSs (menores que 35%), o que não possibilita distinguir sua função em relação aos substratos utilizados, pois análises filogenéticas mostraram que as *N*-metiltransferases apresentam maior similaridade entre si dentro de um mesmo gênero do que entre classes funcionais entre espécies diferentes (figura 13) (Yoneyama *et al.*, 2006; Ashihara *et al.*, 2008; Figueiredo *et al.*, 2011). A árvore filogenética obtida com PcCS mostrou seu agrupamento com sequências de *N*-metiltransferases de chá e cacau, espécies acumuladoras tanto de teobromina como de cafeína.

A confirmação de que *PcCS* codifica para uma CS foi obtida através da produção da proteína heteróloga e sua aplicação em ensaios enzimáticos com diferentes substratos. *PcCS* heteróloga apresentou especificidade por 7-metilxantina e teobromina, comprovando ser uma CS bifuncional, como *DXMT1* e *CCS1* de *C. arabica* e *TCS1* de *C. sinensis*. Porém, *PcCS* destaca-se das demais CSs até hoje estudadas por ser a única enzima com maior afinidade por teobromina do que paraxantina, conforme determinado em ensaios enzimáticos *in vitro*. Tanto *TCS1* como *CCS1* e *DXMT1* apresentam maior afinidade para paraxantina como substrato (Kato *et al.*, 2000; Mizuno *et al.*, 2003b; Uefuji *et al.*, 2003). A explicação para tal especificidade poderia ser a diferença encontrada na substituição de alguns aminoácidos posicionados no sítio ativo da enzima, com base na comparação feita com a estrutura da *CcDXMT1*. Curiosamente, paraxantina não é encontrada em tecidos de café e chá, plantas nas quais o metabolismo de cafeína foi mais estudado. Além disso, uma vez que até o momento não se tem relatos de alguma paraxantina sintase, pode-se se afirmar que *in vivo* cafeína é produzida exclusivamente tendo 7-metilxantina e teobromina como precursores.

Em café, são conhecidas pelo menos dois genes codificando para CS, *CaDXMT1* e *CCS1*, mediando tanto a formação de teobromina à partir de 7-metilxantina, como de cafeína a partir de teobromina (Mizuno *et al.*, 2003b; Uefuji *et al.*, 2003). Enquanto *CCS1* é mais expresso em frutos imaturos, mas também em folhas novas (Mizuno *et al.*, 2003b), *CaDXMT1* é expresso exclusivamente em frutos imaturos (Uefuji *et al.*, 2003). Por outro lado, genes identificados *MXS* e *TS* são expressos tanto em frutos como em folhas (Uefuji *et al.*, 2003). Complementando, outras sequências com alta homologia para metiltransferases foram isoladas de café, sem que fossem detalhadamente estudadas, mas mostrando que metiltransferases formam uma família numerosa de genes em café e que, portanto, podem ocorrer várias isoformas atuando na biossíntese de cafeína (Uefuji *et al.*, 2003; Kato & Mizuno, 2004;). Logo, a biossíntese de cafeína em plantas poderia ser

controlada diferencialmente nos vários tecidos em função do gene de CS expresso e certamente em função da disponibilidade e concentração dos substratos (Ashihara *et al.*, 2008).

Assim como as CSs de café, *PcCS* parece ter maior especificidade de expressão para sementes imaturas, sendo que nos outros tecidos analisados (folhas, caule e raízes) o nível de transcritos é baixo (figura 16). No entanto, ainda assim existe um contraste muito grande entre guaraná e café, que é o fato do primeiro acumular cafeína apenas nas sementes, enquanto cafeína acumula em todos tecidos de café, provavelmente em função da expressão de genes codificando para isoformas de CS. Isto, portanto, seria evidência de que uma TS estaria atuando nos outros tecidos de guaraná que não as sementes, e muito pouco *PcCS*, levando ao acúmulo de teobromina. Porém, para se chegar a uma conclusão definitiva sobre as enzimas da via de biossíntese de cafeína em guaraná, seria necessária uma caracterização maior dos genes disponíveis no banco de EST de guaraná e das especificidades aos substratos a partir de proteínas heterólogas, como também através de estudos com precursores de cafeína marcados com isótopos, permitindo estabelecer como se dá o balanço entre a biossíntese e degradação desse alcaloide. De forma complementar, uma abordagem de repressão de *PcCS* poderia contribuir na avaliação de alterações no conteúdo de cafeína e indicar sua real participação no controle de cafeína nos tecidos da planta de guaraná.

6. CONCLUSÃO

A partir dos dados observados no presente trabalho, pode-se concluir que a planta de guaraná apresenta maior acúmulo de teobromina em diferentes órgãos (folhas, caules, inflorescência e pericarpo). Já nas sementes das cinco cultivares de guaraná aqui estudadas (BRS-Amazonas, BRS-CG372, BRSCG-611, BRS-Maués e BRS-Luzéia), cafeína foi o alcaloide encontrado em maior quantidade. Também se observou que tecidos jovens, independente do órgão analisado, foram aqueles que apresentaram maior conteúdo de metilxantinas, havendo decréscimo ao longo do desenvolvimento dos tecidos e órgãos analisados.

Neste trabalho foi possível isolar o gene *PcCS*, cuja expressão é maior em sementes verdes, consonante com a maior atividade da CS neste órgão. Propriedades enzimáticas do produto do gene *PcCS* permitem sua classificação como pertencente à família das *N*-metiltransferases. Ainda, esta enzima é caracterizada como uma CS bifuncional, ao atuar nos dois últimos passos de metilação da biossíntese de cafeína. Embora seja específica para apenas dois substratos, deve-se ressaltar que *PcCS* apresenta maior afinidade enzimática pela teobromina, sendo menor quando se utiliza a 7-metilxantina como substrato. Ainda, o fato de *PcCS* não ter afinidade por paraxantina sugere que esta enzima revela-se diferente de qualquer outra CS já antes caracterizada.

7. LITERATURA CITADA

- ABIR, 2008. Associação Brasileira das Indústrias de Refrigerantes e de Bebidas Não Alcoólicas. Evolução de bebidas não alcoólicas por categorias - 2004 a 2008. Disponível em: www.abir.gov.br
- Albertino, S.M.F., Filho, F.J.N., da Silva, J.F., Atroch, A.L., Galvão, A.K.D.L., 2012. Rooting of guarana cultivar cuttings with fertilization of matrix plants. *Pesq. Agrop. Bras.* 47, 1449-1454.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J., 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215, 403-410.
- Alves, A.B., Bragagnolo, N., 2002. Determinação simultânea de teobromina, teofilina e cafeína em chás por cromatografia líquida de alta eficiência. *Braz. J. Pharm. Sci.* 38, 237-243.
- Anaya, A.L., Cruz-Ortega, R., Waller, G.R., 2006. Metabolism and ecology of purine alkaloids. *Front Biosci* 11, 2354-2370.
- Andersen, C.L., Jensen, J.L., Ørntoft, T.F., 2004. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: A model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res.* 64, 5245-5250.
- Ângelo, P.C.S., Nunes-Silva, C.G., Brígido, M.M., Azevedo, J.S.N., Assunção, E.N., Sousa, A.R.B., Patrício, F.J.B., Rego, M.M., Peixoto, J.C.C., Oliveira Jr, W.P., Freitas, D.V., Almeida, E.R.P., Viana, A.M.H.A., Souza, A.F.P.N., Andrade, E.V., Acosta, P.O.A., Batista, J.S., Walter, M.E.M.T., Leomil, L., Anjos, D.A.S., Coimbra, R.C.M., Barbosa, M.H.N., Honda, E., Pereira, S.S., Silva, A., Pereira, J.O., Silva, M.L., Marins, M., Holanda, F.J., Abreu, R.M.M., Pando, S.C., Gonçalves, J.F.C., Carvalho, M.L., Leal-Mesquita, E.R.R.B.P., Da Silveira, M.A., Batista, W.C., Atroch, A.L., França, S.C., Porto, J.I.R., Schneider, M.P.C., Astolfi-Filho, S., 2008. Guarana (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*), an anciently consumed stimulant from the Amazon rain forest: The seeded-fruit transcriptome. *Plant Cell Rep.* 27, 117-124.
- Angelucci, E., Tocchini, R.P., Lazarine, V.B., Prado, M.A.F., 1978. Caracterização química da semente de guaraná (*Paullinia cupana* var. *sorbilis* Ducke). *Boletim do Instituto de Tecnologia de Alimentos* 56, 183-192.
- Antonelli-Ushirobira, T.M., Yamaguti, E., Uhemura, L.M., Palazzo De Mello, J.C., 2004. Controle de qualidade de amostras de *Paullinia cupana* H.B.K. var. *sorbilis* (Mart.) Ducke. *Acta Farm. Bonaerense* 23, 383-386.
- Ashihara, H., 1993. Purine metabolism and the biosynthesis of caffeine in maté leaves. *Phytochemistry* 33, 1427-1430.
- Ashihara, H., Crozier, A., 1999a. Biosynthesis and catabolism of caffeine in low-caffeine-containing species of *Coffea*. *J. Agric. Food Chem.* 47, 3425-3431.
- Ashihara, H., Crozier, A., 1999b. Biosynthesis and Metabolism of Caffeine and Related Purine Alkaloids in Plants. *Adv. Bot. Res.* 30, 117-205.
- Ashihara, H., Gillies, F.M., Crozier, A., 1997. Metabolism of caffeine and related purine alkaloids in leaves of tea (*Camellia sinensis* L.). *Plant Cell Physiol.* 38, 413-419.
- Ashihara, H., Kato, M., Ye, C.X., 1998. Biosynthesis and metabolism of purine alkaloids in leaves of cocoa tea (*Camellia ptilophylla*). *J. Plant Res.* 111, 599-604.
- Ashihara, H., Kubota, H., 1986. Patterns of adenine metabolism and caffeine biosynthesis in different parts of tea seedlings. *Physiol. Plant.* 68, 275-281.

- Ashihara, H., Monteiro, A.M., Gillies, F.M., Crozier, A., 1996a. Biosynthesis of caffeine in leaves of coffee. *Plant Physiol.* 111, 747-753.
- Ashihara, H., Monteiro, A.M., Moritz, T., Gillies, F.M., Crozier, A., 1996b. Catabolism of caffeine and related purine alkaloids in leaves of *Coffea arabica* L. *Planta* 198, 334-339.
- Ashihara, H., Ogita, S., Crozier, A., 2011. Purine alkaloid metabolism, *In*: Ashihara, H., Crozier, A., Komamine, A. (Eds.), *Plant Metabolism and Biotechnology*. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 163-189.
- Ashihara, H., Sano, H., Crozier, A., 2008. Caffeine and related purine alkaloids: Biosynthesis, catabolism, function and genetic engineering. *Phytochemistry* 69, 841-856.
- Ashihara, H., Suzuki, T., 2004. Distribution and biosynthesis of caffeine in plants. *Front Biosci* 9, 1864-1876.
- Atroch, A.L., 2002. Aspectos gerais da cultura do guaraná. *Foods Food Ingredients J. Jpn.* 204, 53-56.
- Atroch, A.L., 2009. Avaliação e seleção de progênies de meios irmãos de guaranazeiro (*Paullinia cupana* var. *sorbilis* (Mart.) Ducke) utilizando caracteres morfo-agronômicos. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA, Manaus - AM, p. 72.
- Baltassat, F., Darbour, N., Ferry, S., 1985. Purine content of caffeine-containing plant tissues. *Paullinia sorbilis* (guarana). *Plant. Med. Phytother.* 19, 68-74.
- Baumann, T.W., Schulthess, B.H., Hanni, K., 1995. Guarana (*Paullinia cupana*) rewards seed dispersers without intoxicating them by caffeine. *Phytochemistry* 39, 1063-1070.
- Berthelot, Dechastelus, 1840. Chemische Untersuchung des Guarana. *Liebigs Ann.* 36, 90-93.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Cabral, C., 1932. O guaraná: Composição e propriedades das sementes, reprodução e cultura. *Agricultura e Pecuária.* 94, 738.
- Cadet de Gassicourt, C.L., 1817. Sur le Guarana. *J. Pharm. Sci. Accessoires* 6, 259-260.
- Ceplac, 2012. Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira. Guaraná. Disponível em: <http://www.ceplac.gov.br/radar/guarana.htm>
- Clifford, M.N., Kazi, T., 1987. The influence of coffee bean maturity on the content of chlorogenic acids, caffeine and trigonelline. *Food Chem.* 26, 59-69.
- Conab, 2008. Companhia Nacional de Abastecimento. Conjuntura Mensal - Guaraná. Conab, Brasília, p. 2.
- Corrêa, M.P., 1926. Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. Serviço de Informação Agrícola, Rio de Janeiro.
- Czechowski, T., Stitt, M., Altmann, T., Udvardi, M.K., Scheible, W.R., 2005. Genome-wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in *arabidopsis*. *Plant Physiol.* 139, 5-17.
- De Maria, C.A.B., Moreiras, R.F.A., 2007. Cafeína: Revisão sobre métodos de análise. *Quím. Nova* 30, 99-105.
- Ducke, A., 1937. Diversidade dos guaranás. *Rodriguésia* 3, 155-156.
- Embrapa, 2001. 1ª reunião técnica da cultura do guaraná, *In*: Documentos. Embrapa Amazônia Ocidental (Ed.), Manaus-AM, p. 48.
- Embrapa, 2005. Cultura do guaranazeiro no Amazonas. *In*: Sistemas de Produção, 4ª ed. Embrapa Amazônia Ocidental (Ed.), Manaus-AM, Manaus, p. 40.
- Escobar, J.R., 1985. Effective Female Flower Variation Estimate of Guarana Tree *Paullinia-cupana* var. *sorbilis*. *Pesq. Agrop. Bras.* 20, 1365-1371.

- Figueiredo, L.C., Faria-Campos, A.C., Astolfi-Filho, S., Azevedo, J.L., 2011. Identification and isolation of full-length cDNA sequences by sequencing and analysis of expressed sequence tags from guarana (*Paullinia cupana*). *Genet. mol. res.* 10, 1188-1199.
- Fujimori, N., Ashihara, H., 1993. Biosynthesis of caffeine in flower buds of *Camellia sinensis*. *Ann. Bot.* 71, 279-284.
- Fujimori, N., Ashihara, H., 1994. Biosynthesis of theobromine and caffeine in developing leaves of *Coffea arabica*. *Phytochemistry* 36, 1359-1361.
- Furr, M., Mahlberg, P.G., 1981. Histochemical analysis of laticifers and glandular trichomes in *Cannabis sativa*. *J. Nat. Prod.* 44, 153-159.
- Gentry, A.H., 1991. The distribution and evolution of climbing plants., in: Putz, F.E., Mooney, H.A. (Eds.), *The Biology of Vines*. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 3-53.
- Goldim, C.J.E., 1978. Alguns Aspectos da Biologia Reprodutiva do Guaraná (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*) Mart. Ducke. Universidade Federal do Amazonas, Manaus, p. 83.
- Gouet, P., Courcelle, E., Stuart, D.I., Métoz, F., 1999. ESPript: Analysis of multiple sequence alignments in PostScript. *Bioinformatics* 15, 305-308.
- Hammerstone Jnr, J.F., Romanczyk Jnr, L.J., Aitken, W.M., 1994. Purine alkaloid distribution within *Herrania* and *Theobroma*. *Phytochemistry* 35, 1237-1240.
- Heckman, M.A., Mejia, E.G.d., 2010. Energy Drinks: an assessment of their market size, consumer demographics, ingredient profile, functionality, and regulations in the United States. *Compr Rev Food Sci Food Saf.* 9.
- Heckman, M.A., Weil, J., Gonzalez de Mejia, E., 2010. Caffeine (1, 3, 7-trimethylxanthine) in foods: a comprehensive review on consumption, functionality, safety, and regulatory matters. *J. Food Sci.* 75, R77-87.
- Henman, A.R., 1982. Guarana (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*): Ecological and social perspectives on an economic plant of the central Amazon basin. *J. Ethnopharmacol.* 6, 311-338.
- Henman, A.R., 1986. *Vida Natural. O Guaraná: Sua cultura, propriedades, formas de preparação e uso.*, 2^a ed. Global/Ground, São Paulo.
- IBGE, 2011. Levantamento sistemático da produção agrícola – LSPA. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística 24, p. 82.
- Ishida, M., Kitao, N., Mizuno, K., Tanikawa, N., Kato, M., 2009. Occurrence of theobromine synthase genes in purine alkaloid-free species of *Camellia* plants. *Planta* 229, 559-568.
- Johansen, D.A., 1940. *Plant microtechnique*. McGraw-Hill Company Inc., New York.
- Joshi, C.P., Chiang, V.L., 1998. Conserved sequence motifs in plant S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferases. *Plant Mol. Biol.* 37, 663-674.
- Juliano, L.M., Griffiths, R.R., 2004. A critical review of caffeine withdrawal: Empirical validation of symptoms and signs, incidence, severity, and associated features. *Psychopharmacology* 176, 1-29.
- Kato, M., Kaneharu, T., Shimizu, H., Suzuki, T., Gillies, F.M., Crozier, A., Ashihara, H., 1996. Caffeine biosynthesis in young leaves of *Camellia sinensis*: In vitro studies on N-methyltransferase activity involved in the conversion of xanthosine to caffeine. *Physiol. Plant.* 98, 629-636.
- Kato, M., Mizuno, K., 2004. Caffeine synthase and related methyltransferases in plants. *Front Biosci* 9, 1833-1842.
- Kato, M., Mizuno, K., Crozier, A., Fujimura, T., Ashihara, H., 2000. Caffeine synthase gene from tea leaves. *Nature* 406, 956-957.

- Kato, M., Mizuno, K., Fujimura, T., Iwama, M., Irie, M., Crozier, A., Ashihara, H., 1999. Purification and characterization of caffeine synthase from tea leaves. *Plant Physiol.* 120, 579-586.
- Kofink, M., Papagiannopoulos, M., Galensa, R., 2007. Enantioseparation of catechin and epicatechin in plant food by chiral capillary electrophoresis. *Eur. Food Res. Technol.* 225, 569-577.
- Koyama, Y., Tomoda, Y., Kato, M., Ashihara, H., 2003. Metabolism of purine bases, nucleosides and alkaloids in theobromine-forming *Theobroma cacao* leaves. *Plant Physiol. Biochem.* 41, 977-984.
- Kretschmar, J.A., Baumann, T.W., 1999. Caffeine in *Citrus* flowers. *Phytochemistry* 52, 19-23.
- Kuri, C.M.B., 2008. The guaraná industry in Brazil. *Int. Bus. Econ. Res.* 7, 87-98.
- Laemmert, H., Laemmert, E., 1868. Analyses de materia medica brasileira dos productos que forão premiados nas exposições nacionais e na Exposição Universal de Paris em 1867. Laemmert, H. Laemmert, E., Rio de Janeiro-RJ.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods* 25, 402-408.
- Lodewijks, M.P., 1986. Aspects of the growth of Guaraná (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*), a “relatório” for Agro Brahma and the Centro de Pesquisas do Cacau (CEPEC). Dept. of Forestry, Agric. University, Wageningen, p. 25.
- Lunguinho, L.G., 2007. Padrão do florescimento em clones de guaranazeiro (*Paullinia cuapana* var. *sorbilis*). Universidade Federal do Amazonas - UFAM, Manaus-AM, p. 85.
- Lyra, M.B., 1953. Aspectos bromatológicos do guaraná. *Arquivos de Bromatologia* 1, 33-45.
- Maravilhas, N., 1965. Casca do guaraná - matéria-prima para cafeína – método Industrial de extração. In: Estudos sobre o guaraná e outras plantas produtoras de cafeína, in: Química (Ed.). Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), Manaus, pp. 5-11.
- Martius, T.v., 1840. Ueber die Zusammensetzung des Guaranins. *Ann. Chem.* 36, 93-95.
- Mazzafera, P., 1994. Caffeine, theobromine and theophylline distribution in *Ilex paraguayensis*. *Rev. Bras. Fisiol. Veg.* 6, 149-151.
- Mazzafera, P., 2004. Catabolism of caffeine in plants and microorganisms. *Front Biosci* 9, 1348-1359.
- Mazzafera, P., 2012. Which is the by-product: caffeine or decaf coffee?. *Food Energy Secur.* 1, 70-75.
- Mazzafera, P., Baumann, T.W., Shimizu, M.M., Silvarolla, M.B., 2009. Decaf and the steepchase towards decaffito - the coffee from caffeine-free *Arabica* plants. *Trop. Plant Biol.* 2, 63-76.
- Mazzafera, P., Crozier, A., Magalhães, A.C., 1991. Caffeine metabolism in *Coffea arabica* and other species of coffee. *Phytochemistry* 30, 3913-3916.
- Mazzafera, P., Crozier, A., Sandberg, G., 1994a. Studies on the metabolic control of caffeine turnover in developing endosperms and leaves of *Coffea arabica* and *Coffea dewevrei*. *J. Agric. Food Chem.* 42, 1423-1427.
- Mazzafera, P., Wingsle, G., Olsson, O., Sandberg, G., 1994b. S adenosyl-L-methionine:theobromine 1-N-methyltransferase, an enzyme catalyzing the synthesis of caffeine in coffee. *Phytochemistry* 37, 1577-1584.
- McCarthy, A.A., McCarthy, J.G., 2007. The structure of two N-methyltransferases from the caffeine biosynthetic pathway. *Plant Physiol.* 144, 879-889.

- McCusker, R.R., Goldberger, B.A., Cone, E.J., 2003. Caffeine content of specialty coffees. *J. Anal. Toxicol.* 27, 520-522.
- McIlvaine, T.C., 1921. A buffer solution for colorimetric comparison. *J. Biol. Chem.* 49, 183-186.
- Mehr, C.B., Biswal, R.N., Collins, J.L., Cochran, H.D., 1996. Supercritical carbon dioxide extraction of caffeine from guaraná. *J. Supercrit. Fluids* 9, 185-191.
- Meurer-Grimes, B., Berkov, A., Beck, H., 1998. Theobromine, theophylline, and caffeine in 42 samples and products of guarana (*Paullinia cupana*, Sapindaceae). *Econ. Bot.* 52, 293-301.
- Mithöfer, A., Boland, W., 2012. Plant defense against herbivores: Chemical aspects. *Annu. Rev. Plant Biol.* 63, 431-450.
- Mizuno, K., Kato, M., Irino, F., Yoneyama, N., Fujimura, T., Ashihara, H., 2003a. The first committed step reaction of caffeine biosynthesis: 7-methylxanthosine synthase is closely homologous to caffeine synthases in coffee (*Coffea arabica* L.). *FEBS Lett.* 547, 56-60.
- Mizuno, K., Okuda, A., Kato, M., Yoneyama, N., Tanaka, H., Ashihara, H., Fujimura, T., 2003b. Isolation of a new dual-functional caffeine synthase gene encoding an enzyme for the conversion of 7-methylxanthine to caffeine from coffee (*Coffea arabica* L.). *FEBS Letters* 534, 75-81.
- Monteiro, M.Y., 1965. Antropogeografia do guarana, *In: Cadernos da Amazônia*. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus.
- Nagata, T., Sakai, S., 1985. Purine base pattern of *Camellia irrawadiensis*. *Phytochemistry* 24, 2271-2272.
- Nascimento Filho, F.J., Atroch, A.L., Pereira, J.C.R., Araújo, J.C.A.d., 2007. Comunicado técnico: BRS Luzéia: Nova Cultivar para o agronegócio do guaraná no estado do Amazonas. Embrapa Amazônia Ocidental (Ed.), Manaus-AMp. 2.
- Ogawa, M., Herai, Y., Koizumi, N., Kusano, T., Sano, H., 2001. 7-Methylxanthine methyltransferase of coffee plants. Gene isolation and enzymatic properties. *J. Biol. Chem.* 276, 8213-8218.
- Ogita, S., Uefuji, H., Yamaguchi, Y., Nozomu, K., Sano, H., 2003. Producing decaffeinated coffee plants. *Nature* 423, 823.
- Oliveira, E.R.N., 2010. Características morfofisiológicas e bioquímicas de clones de guaraná *Paullinia cupana* Kunt. var. *sorbilis* (Mart.) Ducke cultivados sob plantio comercial. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA, p. 125.
- Patra, A.K., Mukhopadhyay, R., Mukhija, R., Krishnan, A., Garg, L.C., Panda, A.K., 2000. Optimization of inclusion body solubilization and renaturation of recombinant human growth hormone from *Escherichia coli*. *Protein Expression Purif.* 18, 182-192.
- Pereira-Caro, G., Borges, G., Nagai, C., Jackson, M.C., Yokota, T., Crozier, A., Ashihara, H., 2013. Profiles of phenolic compounds and purine alkaloids during the development of seeds of *Theobroma cacao* cv. *trinitario*. *J. Agric. Food Chem.* 61, 427-434.
- Pereira, T.N.S., Sacramento, C.K., 1987. Comportamento floral do guaranzeiro nas condições da Bahia. *Rev. Theobroma.* 17, 201-208.
- Pires, J.M., 1949. Guaraná e cupana. *Sociedade de Agrônomos e Veterinários do Pará* 1, 9-20.
- Polo, S.H.O., 2006. Estrutura e desenvolvimento de sementes de *Paullinia* L. (Sapindaceae). Unicamp, Campinas, p. 118.
- Pura Naik, J., 2001. Improved high-performance liquid chromatography method to determine theobromine and caffeine in cocoa and cocoa products. *J. Agric. Food Chem.* 49, 3579-3583.
- Raju, K.I., Gopal, N.H., 1979. Distribution of caffeine in arabica and robusta coffee plants. *J. Coffee Res.* 9, 83-90.

- Rezaian, M.A., Krake, L.R., 1987. Nucleic acid extraction and virus detection in grapevine. *J. Virol. Methods* 17.
- Sagri, 2010. Guaraná. Secretaria da Agricultura, Irrigação e Reforma Agrária do Estado da Bahia *In: Jornal Correio*. Disponível em: <http://www.seagri.ba.gov.br/noticias.asp?qact=view&exibir=clipping¬id=21790>. Acessado em fev/2012.
- Saitou, N., Nei, M., 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4, 406-425.
- Sakai, W.S., 1973. Simple method for differential staining of paraffin embedded plant material using toluidine blue O. *Stain Technol.* 48, 247-249.
- Saldaña, M.D.A., Zetzl, C., Mohamed, R.S., Brunner, G., 2002. Extraction of methylxanthines from guaraná seeds, maté leaves, and cocoa beans using supercritical carbon dioxide and ethanol. *J. Agric. Food Chem.* 50, 4820-4826.
- Schmidt, F., 1941. O guaraná, sua cultura e indústria. Serviço de Informação Agrícola, Ministério da Agricultura, Rio de Janeiro.
- Sebrae, 2006. Informações de mercado sobre guaraná. Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas.
- Smith, N., Atroch, A.L., 2010. Guaraná's journey from regional tonic to aphrodisiac and global energy drink. *Evidence-based BMC Complementary Altern. Med.* 7, 279-282.
- Souza, A.G.C., Souza, N.R., Silva, S.E.L., Nunes, C.D.M., Canto, A.C., A., C.L.A., 1996. Fruteiras da Amazônia. EMBRAPA-CPAA, Manaus.
- Souza, A.L., 2010. Análise proteômica de semente e pericarpo de guaraná em diferentes estádios de maturação. Universidade Federal do Amazonas - UFAM., Manaus, p. 140.
- Souza, V.C., Lorenzi, H., 2008. Botânica Sistemática - Guia ilustrado para identificação das famílias de angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II. Plantarum, Nova Odessa.
- Spoladore, D.S.B., Milan, M.A.; Sáes, L.A., 1987. Teor de cafeína em sementes matrizes do guaranzeiro. *Bragantia* 46, 425-429.
- Suzuki, T., Waller, G.R., 1984a. Biodegradation of caffeine: Formation of theophylline and theobromine from caffeine in mature *Coffea arabica* fruits. *J. Sci. Food Agric.* 35, 66-70.
- Suzuki, T., Waller, G.R., 1984b. Biosynthesis and biodegradation of caffeine, theobromine, and theophylline in *Coffea arabica* L. fruits. *J. Agric. Food Chem.* 32, 845-848.
- Suzuki, T., Waller, G.R., 1988. Metabolism and analysis of caffeine and other methylxanthines in coffee, tea, cola, guarana and cacao., in: Linskens, H.F., Jackson, J.F. (Eds.), *Analysis of Nonalcoholic Beverages*. Springer-Verlag, pp. 184-220.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S., 2011. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* 28, 2731-2739.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J., 1994. CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22, 4673-4680.
- Uefuji, H., Ogita, S., Yamaguchi, Y., Koizumi, N., Sano, H., 2003. Molecular cloning and functional characterization of three distinct N-methyltransferases involved in the caffeine biosynthetic pathway in coffee plants. *Plant Physiol.* 132, 372-380.
- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., Speleman, F., 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 3.

- Walker, T.H., Char, J.M., Mehr, C.B., Collins, J.L., 2000. The chemistry of guaraná: Guaraná, Brazil's super-fruit for the caffeinated beverages industry, Caffeinated Beverages. American Chemical Society, pp. 305–314.
- Weckerle, C.S., Stutz, M.A., Baumann, T.W., 2003. Purine alkaloids in *Paullinia*. Phytochemistry 64, 735-742.
- Wisniewski, A., 1955. Industrialização do guaraná. Instituto Agronômico do Norte, Belém, pp. 98-99.
- Yoneyama, N., Morimoto, H., Ye, C.X., Ashihara, H., Mizuno, K., Kato, M., 2006. Substrate specificity of N-methyltransferase involved in purine alkaloids synthesis is dependent upon one amino acid residue of the enzyme. Mol. Genet. Genomics 275, 125-135.
- Zheng, X.Q., Koyama, Y., Nagai, C., Ashihara, H., 2004. Biosynthesis, accumulation and degradation of theobromine in developing *Theobroma cacao* fruits. J. Plant Physiol. 161, 363-369.