

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



MILTON MASSAO SHIMIZU

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

**CATABOLISMO DE CAFEÍNA, TRIGONELINA E
ESTUDO DE PROTEÍNAS DURANTE A GERMINAÇÃO
DE SEMENTES DE CAFÉ (*Coffea arabica* L.)**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo (a) candidato (a)
Milton Massao Shimizu
e aprovada pela Comissão Julgadora.
30/03/2000

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

Orientador: Prof. Dr. Paulo Mazzafera.

200016402

2000



UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	Unicamp
V.	Sh62c
Ex.	
TOMBO BC	42953
PROC.	16-2.8100
C	☐
D	☒
PREC.	R\$ 11,00
DATA	25/10/00
N.º CPD	

CM-00147067-1

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

Shimizu, Milton Massao
Sh62c Catabolismo de cafeína, trigonelina e estudo de proteínas durante a germinação de sementes de café (*Coffea arabica* L.)/
Milton Massao Shimizu. – Campinas, SP[s.n.], 2000
64f. ilus.

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

1. Café. 2. Aminoácidos. 3. Germinação. 4. Cafeína. I. Mazzafera, Paulo. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Data da Defesa: 30 / 03 / 2000

Banca Examinadora

Titulares:

Prof. Dr. Paulo Mazzafera (Orientador)



Prof. Dra. Cristiana de Noronha Begnami



Prof. Dra. Priscila Fratim Medina



Suplentes

Prof. Dr. Ivani Ferraz Marques Válio

Prof. Dra. Marlene Aparecida Schiavinatto

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais pelo apoio e o carinho nas horas difíceis;

Ao Prof. Dr. Paulo Mazzafera pela orientação;

A minha “irmã” Kátia pela companhia e pela ajuda;

E a todos no departamento (funcionários e alunos) que me ajudaram a completar este meu trabalho.

ÍNDICE

Agradecimentos	i
Introdução Geral	1
Literatura Citada	5

Capítulo I - DEGRADAÇÃO DE CAFEÍNA E TRIGONELINA DURANTE A GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE CAFÉ.

Resumo	10
Summary	11
1. Introdução	12
2. Objetivos	16
3. Material e Métodos	17
3.1. Material vegetal	17
3.2. Dosagem de cafeína, trigonelina e ácido nicotínico por HPLC	17
3.3. 1º Experimento: Trigonelina, ácido nicotínico e cafeína em sementes de café durante a germinação	18
3.4. 2º Experimento: Cafeína, trigonelina e ácido nicotínico no endosperma, embrião e meio de germinação	19
3.5. 3º Experimento: Difusão de trigonelina na semente e no meio	20
3.6. 4º Experimento: Produção de catabólitos de [¹⁴ C-2] cafeína e [¹⁴ C-carboxil]trigonelina	20
3.7. 5º Experimento: Dosagem da atividade da trigonelina demetilase	23
4. Resultados e discussão	25
4.1. 1º Experimento: Determinação de trigonelina, ácido nicotínico e cafeína	25

4.2. 2º Experimento: Cafeína, trigonelina, ácido nicotínico e NAD no endosperma, embrião e meio de germinação	27
4.3. 3º Experimento: Difusão de trigonelina na semente e no meio	34
4.4. 4º Experimento: Produção de metabólitos de cafeína e trigonelina	35
4.5. 5º Experimento: Caracterização da enzima trigonelina demetilase	42
5. Conclusões	46
6. Literatura Citada	47

Capítulo II - COMPOSITIONAL CHANGES OF PROTEINS AND AMINO ACIDS IN GERMINATING COFFEE SEEDS (MUDANÇAS NA COMPOSIÇÃO DE PROTEÍNAS E AMINO-ÁCIDOS DURANTE A GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE CAFÉ).

7. Abstract	53
8. Introduction	53
9. Materials and methods	54
9.1. Plant material and germination	54
9.2. Analyses	54
10. Results	55
11. Discussion	56
12. Acknowledgments	58
13. Resumo	58
14. References	58

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais pelo apoio e carinho nas horas difíceis;

Ao Prof. Dr. Paulo Mazzafera pela orientação;

A minha “irmã” Kátia pela companhia e pela ajuda;

E a todos no departamento (funcionários e alunos) que me ajudaram a completar este meu trabalho.

INTRODUÇÃO GERAL

Várias funções fisiológicas são atribuídas à trigonelina em plantas. Dentre elas, destaca-se como fator de fechamento de folha em planta nictinástica (Ueda *et al.*, 1995); sinal de resposta a estresse oxidativo em plantas (Berglund, 1994; Berglund *et al.*, 1996); osmorregulador em resposta à seca e ao estresse salino (Maestri *et al.*, 1995; Tramontano & Jouve, 1997). Além disso, retarda a fase G2 do ciclo celular em raízes e gemas (Tramontano *et al.*, 1983); induz o gene Nod durante a colonização de raiz de leguminosa por *Rhizobium* (Phillips *et al.*, 1992); e, em cevada, induz a resistência contra *Bacillus subtilis* (Kraska & Schonbeck, 1993).

Apesar de não comprovado, tem sido sugerido que a trigonelina seria uma forma de reserva de ácido nicotínico, e portanto de nicotinamida dinucleotídeo (NAD), em sementes durante a germinação (Blake, 1954; Joshi & Handler, 1962; Bewley & Black, 1994). A maior parte do NAD da célula é utilizado no processo respiratório na mitocôndria, sendo reduzido a NADH, que volta transferindo elétrons para a cadeia transportadora de elétrons durante a fosforilação oxidativa do ADP, gerando ATP. Uma vez que as reservas da semente são utilizadas em parte para gerar energia durante a germinação, a conversão de trigonelina em NAD, via ácido nicotínico, pode ser um importante passo para o estabelecimento da planta em desenvolvimento.

Sementes de café contém trigonelina que é convertida a niacina durante a torrefação (Coultate, 1996). A importância do café como fonte de niacina há muito vem sendo investigada (Carvalho, 1962; Clifford, 1985). Em café, a concentração de trigonelina é comparável a de cafeína, alcançando mais de 1% em algumas espécies (Clifford, 1985; Mazzafera, 1991).

O volume de estudos sobre cafeína, assim como seus produtos de biodegradação, teobromina e teofilina, deve-se ao fato destes alcalóides serem os responsáveis pela principal característica da bebida, a de ser estimulante. A variação no conteúdo desses compostos tem sido amplamente estudada em sementes de diferentes espécies do gênero *Coffea* (Charrier & Berthaud, 1975; Charrier, 1978; Mazzafera & Magalhães, 1991). Os níveis de cafeína (1-3%) normalmente excedem em muito os de teobromina e teofilina em sementes de café, onde este conteúdo está relacionado à razão entre biossíntese e biodegradação deste composto (Mazzafera *et al.*, 1994).

Outros compostos muito estudados em sementes são as proteínas de reserva que são utilizadas durante a germinação como fontes de energia e como fontes de carbono e nitrogênio (Acuña *et al.*, 1999). Em média, a concentração de proteínas em cereais corresponde a 10-15% da matéria seca, enquanto que em leguminosas corresponde a 20-50% (Derbyshire *et al.*, 1976).

As proteínas de reserva são degradadas durante a germinação, suprindo o embrião de nutrientes e servem, principalmente, como fonte de nitrogênio para a síntese de novas proteínas e outros compostos nitrogenados (Derbyshire *et al.*, 1976). Isto é particularmente importante nos estádios iniciais de crescimento do embrião, quando este ainda não consegue ser independente na obtenção dos compostos necessários ao desenvolvimento da plântula.

Para máxima eficiência, as sementes normalmente possuem proteínas com alta porcentagem de aminoácidos ricos em nitrogênio (N), tal como asparagina, glutamina e também arginina (Derbyshire *et al.*, 1976; Payne, 1986; King & Gifford, 1997). Além disso, estas proteínas normalmente possuem quantidades apreciáveis de aminoácidos hidrofóbicos (prolina, leucina e isoleucina), e pequenas de hidrofílicos (lisina, ácidos glutâmico e aspártico), para melhor compactação nos corpúsculos protéicos.

Além dos aminoácidos asparagina e glutamina, vários trabalhos mostram a importância de arginina no metabolismo de N, em sementes em germinação (Payne, 1986; King & Gifford, 1997; Srivastava *et al.*, 1997). A entrada de arginina ocorre via ciclo da uréia, através da enzima arginase.

Poucos estudos foram realizados sobre a composição protéica de sementes de café. Podem ser encontrados dados sobre a composição de aminoácidos, por Ludwig *et al.* (1995); comportamento eletroforético, por Bade & Stegemann (1982), Ludwig *et al.* (1995) e Luthe (1992). Para a análise da composição de aminoácidos, os trabalhos citados utilizaram a fração protéica total e não proteínas específicas.

Luthe (1992) estudou o perfil eletroforético de várias dicotiledôneas, observando a predominância de proteínas do tipo 11S (tipo-legumina). A proteína 11S de café já foi sequenciada (Acuña *et al.*, 1999) e caracterizada em *C. arabica* e *C. canephora* (Rogers *et al.*, 1999). Em estudo molecular da proteína 11S, Marracini *et al.* (1999) observaram que o pico de maior acúmulo de 11S mRNA em café ocorria entre a 18^a e 27^a semanas após a floração, período de expansão do endosperma de *C. arabica*. Essa proteína está presente em sementes de várias espécies de café, caracterizando-se, como a mais abundante (Fig.1), com aproximadamente 50-70 % do total da proteína bruta (Baú, Mazzafera & Santoro, dados não publicados).

No que diz respeito a composição de aminoácidos obtidos por digestão com HCl da fração protéica total de sementes de café, Ludwig *et al.* (1995) mostraram glutamina/ácido glutâmico como os principais aminoácidos, seguidos de asparagina/ácido aspártico, glicina e alanina, sendo estes, 1/3 da concentração dos primeiros.

Em relação a composição de aminoácidos livres, Arnold & Ludwig (1996) analisaram cafés provenientes de vários países, observando certa variação. No entanto, de modo geral,

ácido glutâmico, aspártico, glutamina/asparagina foram encontrados em maior concentração. Arginina, serina, prolina, fenilalanina e alanina também estavam presentes em quantidades apreciáveis, alternando a predominância de acordo com a amostra. Resultados semelhantes foram obtidos recentemente por Mazzafera (dados não publicados), com frações 11S parcialmente purificadas em gel de poliacrilamida.

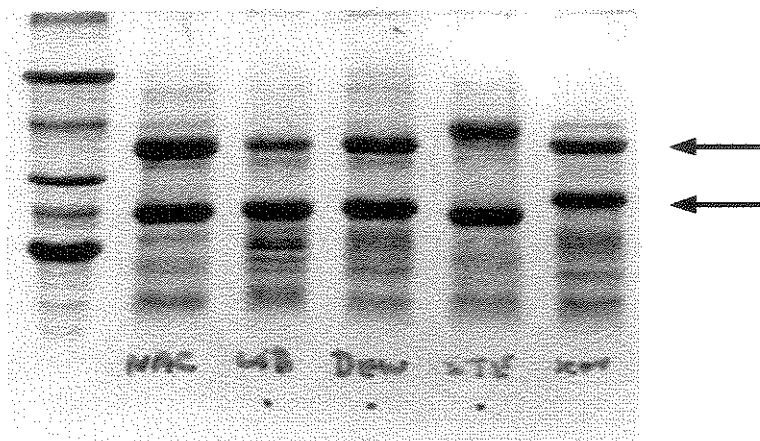


Figura 1. Perfil eletroforético de proteínas de sementes de várias espécies de café. NAC = *C. arabica* cv. Nacional; LIB = *C. liberica*; DEW = *C. dewevrei*; STE = *C. stenophylla*; KOU = *C. canephora* cv. Kouillou. As proteínas à esquerda são marcadores de massa molecular. As setas indicam as sub-unidades da proteína 11S com massas moleculares de ~35kDa (superior) e ~25kDa (inferior).

O presente trabalho propõe um estudo do papel da trigonelina e da cafeína durante a germinação de sementes de café, além de um aprofundamento no estudo sobre as variações e mudanças na composição de aminoácidos e proteínas no endosperma dessas sementes durante a germinação.

LITERATURA CITADA

- Acuña, R.; Bassüner, R.; Beilinson, V.; Cortina, H.; Cadena-Gómez, G.; Montes, V. & Nielsen, N.C., 1999. Coffee seeds contains 11S storage proteins. *Physiol. Plant.*, 105:122-131.
- Arnold, U. & Ludwig, E., 1996. Analysis of free amino acids in green coffee beans II. Changes of the amino acid content in arabica coffees in connection with post-harvest model treatment. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 203, 379-384.
- Bade, H. & Stegemann, H., 1982. Protein patterns of coffee beans. Characterization by one- and two-dimensional electrophoresis. *J. Agron. Crop Sci.*, 151: 89-98.
- Berglund, T., 1994. Nicotinamide, a missing link in the early stress response in eukaryotic cells: a hypothesis with special reference to oxidative stress in plants. *FEBS Lett.* 351:145-149.
- Berglund, T., Kalbin, G., Strid A., Rydström, J. & Ohlsson, A.B., 1996. UV-B and oxidative stress-induced increase in nicotinamide and trigonelline and inhibition of defensive metabolism induction by poly(ADP-ribose)polymerase inhibitor in plant tissue. *FEBS Lett.* 380: 188.
- Bewley, J.D. & Black, M., 1994. *Seeds: Physiology of development and germination.* Plenum Press, New York. 445p
- Blake, C. O., 1954. Niacin metabolism in the corn seedling: the biosynthesis of trigonelline. *Am. J. Bot.* 41:231-238.
- Carvalho, A., 1962. Variability of the niacin content in coffee. *Nature.* 194:1096.

- Charrier, A., 1978. La structure génétique des caféiers spontanés de la région Malgache (Mascarocoffea). Leurs relations avec les caféiers d'origine africaine (Eucoffea). ORSTOM, Paris. 223p.
- Charrier, A. & Berthaud, J., 1975. Variation de la teneur en caféine dans le genre *Coffea*. Café Cacao Thé. 19:251-264.
- Clifford, M.N., 1985. Chemical and physical aspects of green coffee and coffee products. In: Coffee: Botany, Biochemistry and Production of Beans and Beverage. (M.N. Clifford, M.N., K.C. Willson, eds), AVI Publishing Company, Inc., Connecticut, pp. 305-374.
- Coulter, T. P., 1996. Food: the chemistry of its components. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 360p.
- Derbyshire, E.; Wright, D.J. & Boulter, D., 1976. Legumin and vicilin, storage proteins of legumes seeds. Phytochemistry, 15,:3-24.
- Joshi, J. G. & Handler, P., 1962. Metabolism of trigonelline. J. Biol. Chem. 237:3185-3188
- King, J.E. & Gifford, D. J., 1997. Amino acid utilization in seeds of loblolly pine during germination and early seedling growth. I. arginine and arginase activity. Plant Physiol. 113:1125-1135.
- Kraska, T., Schonbeck, F., 1993. About changes in the chromatin structure after resistance induction in *Hodeum-vulgare* L. J. of Phytopathology-Phythologische Zeitschrift.137: 10-14.
- Ludwig, E.; Raczek, N.N. & Kurrock, T., 1995. Contribution to composition and reactivity of coffee protein. IN: Proceedings of the XVI International Scientific Colloquium on Coffee, Kyoto, Japan, pp 359-365.

- Luthe, D.S., 1992. Electrophoretic analysis of seed proteins in the Dycotiledoneae. *Plant Mol. Biol. Rep.* 10:254-262.
- Maestri, M., DaMatta, F. M., Regazzi, A. J., Barros, R. S., 1995. Accumulation of proline and quaternary ammonium compounds in mature leaves of water stressed coffee plants (*Coffea arabica* and *C. canephora*). *J. Hort. Sci.* 70:229-233.
- Marraccini, P., Deshayes, A., Pétiard, V., Rogers, W.J., 1999. Molecular cloning of the complete 11S seed storage protein gene of *Coffea arabica* and promoter analysis in transgenic tobacco plants. *Plant Physiol. Biochem.* 37:273-282.
- Mazzafera, P., 1991. Trigonelline in coffee. *Phytochemistry.* 30:2309-2310.
- Mazzafera, P. & Magalhães, A. C. N., 1991. Cafeína em folhas e sementes de *Coffea* e *Paracoffea*. *Rev. bras. Bot.* 14:157-160.
- Mazzafera, P., Crozier, A. & Sandberg, G., 1994. 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.
- Payne, P.I., 1986. Endosperm proteins. IN: *A Genetic Approach to Plant Biochemistry.* (A.D. Blonstein and P.J. King. eds), Springer-Verlag, New York, pp 205-231.
- Phillips, D. A., Joseph, C. M., Maxwell, C. A., 1992. Trigonelline and stachydrine release from alfafa seeds activate NODD2 protein in *Rhizobium-meliloti*. *Plant Physiol.* 99: 1526-1531.
- Rogers, W. J., Bézard, G., Deshayes, A., Meyer, I., Pétiard, V., Marraccini, P., 1999. Biochemical and molecular characterization and expression of the 11S-type storage protein from *Coffea arabica* endosperm. *Plant Physiol. Biochem.* 37:261-272

- Srivastava, N.; Prakash, D. & Behl, H.M., 1997. Biochemical contents, their variation and changes in free amino acids during seed germination in *Terminalia arjuna*. Int. J. Food Sci. Nutr. 48:215-219.
- Tramontano, W. A. & Jouve, D., 1997. Trigonelline accumulation in salt-stressed legumes and the role of other osmoregulators as cell cycle control agents. Phytochemistry. 44: 1037-1040.
- Tramontano, W. A., Lynn, D.G. & Evans, L.S., 1983. Nicotinic acid and nicotinamide metabolism and promotion of cell arrest in G2 in *Pisum sativum*. Phytochemistry. 22: 343-346.
- Ueda, M., Niwa, M., Yamamura, S., 1995. Trigonelline, a leaf-closing factor of the nictinastic plant, *Aeschynomene indica*. Phytochemistry. 39: 817-819.

CAPÍTULO I

DEGRADAÇÃO DE CAFEÍNA E TRIGONELINA DURANTE A GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE CAFÉ

RESUMO

O café é uma bebida apreciada no mundo inteiro por seu efeito estimulante, sendo preparada pela infusão das sementes torradas, produzidas a partir da planta de mesmo nome. Neste trabalho foi realizada uma análise da variação da concentração de cafeína, trigonelina e seus catabólitos em sementes de café (*Coffea arabica*) durante a germinação. Foi estudada também a enzima trigonelina demetilase, que é responsável pela demetilação da trigonelina a ácido nicotínico. Estes estudos foram realizados com sementes colocadas para germinar em papel de filtro ou ágar em placas de Petri mantidas a temperatura ambiente no laboratório. Sementes foram coletadas durante cinco a seis semanas para as análises e ensaios da enzima. Foram observados aumentos na concentração de trigonelina e do ácido nicotínico nas primeiras semanas, seguidos por uma diminuição contínua. Os níveis de trigonelina, ácido nicotínico e NAD também foram determinados nos embriões, no endosperma e no meio de germinação (ágar). Foi aplicada [^{14}C]trigonelina nas sementes e determinada a radioatividade em ácido nicotínico e NAD. Os resultados obtidos mostraram que a trigonelina é convertida rapidamente para ácido nicotínico e NAD, e isso nos estádios iniciais da germinação. A respeito da cafeína houve uma diminuição nas primeiras semanas, com um aumento posterior. Esta variação parece estar relacionada com a liberação da cafeína no meio de germinação e na biossíntese do embrião. A trigonelina demetilase foi detectada pela primeira vez em sementes de café. A atividade no café foi baixa se comparada com ensaios *in vitro* de outros tecidos vegetais. Determinou-se a melhor atividade a temperatura de 30°C em pH 8,0. A enzima mostrou um k_m de 1,129 mM e V_{max} de 0,157 nmoles de ácido nicotínico / h.mg de proteína.

SUMMARY

The coffee beverage is appreciated worldwide for its stimulant effects and is prepared by the infusion of ground roasted beans produced by a plant of the same name. In this work, an analysis of variation of the concentrations of caffeine, trigonelline and its catabolites was carried out in seeds of coffee (*Coffea arabica*) during germination. The enzyme trigonelline demethylase, responsible for the demethylation of trigonelline to nicotinic acid, was also studied. These studies were carried out in seeds germinating in Petri dishes on filter paper or in agar and maintained in the laboratory at room temperature. For analysis and enzyme assays, seeds were collected every week during five to six weeks. An increase in the concentration of trigonelline and nicotinic acid in the first weeks was observed, followed by a continuous decrease. The contents of trigonelline, nicotinic acid and NAD were also followed in the embryos of germinating seeds, in the endosperm and in the germination medium (agar). In addition, seeds were fed with [^{14}C]trigonelline and radioactivity in nicotinic acid and NAD determined. The results showed that trigonelline is rapidly converted to nicotinic acid and NAD, and that at the early stages of germination. Regarding caffeine there was a decrease over the first weeks, with a subsequent increase. This variation seemed to be related to the release of caffeine into the germinating medium and synthesis in the embryo. Trigonelline demethylase was detected for the first time in coffee. Compared with *in vitro* assays with other plant tissues, the coffee activity was low. It was determined that 30°C and pH 8,0 were optima for activity. The enzyme revealed a k_m of 1,129 mM and a V_{max} of 0,157 nmoles nicotinic acid / h.mg protein.

INTRODUÇÃO

O café, família *Rubiaceae*, é uma planta muito apreciada pela bebida de mesmo nome e difundida em muitos países. São antigas as citações sobre sua utilização, sendo algumas delas encontradas no antigo testamento (Smith, 1985, citado por Clifford & Willson, 1985)

Cafeína, teobromina e teofilina são os alcalóides mais comumente estudados em café. A variação no conteúdo desses compostos tem sido amplamente estudada nas sementes de diferentes espécies do gênero *Coffea* (Charrier & Berthaud, 1975; Charrier, 1978; Mazzafera & Magalhães, 1991) e vários são os trabalhos sobre a sua biossíntese e degradação (Suzuki & Waller, 1984a,b; Suzuki *et al.*, 1992; Mazzafera *et al.*, 1994). Os níveis de cafeína (1-3%) normalmente excedem em muito o de teobromina e teofilina.

O volume de estudos com cafeína justifica-se por ser este alcalóide a substância que dá a característica principal da bebida do café, ou seja, a de ser estimulante. Apesar disto, outro alcalóide, a trigonelina, é encontrada em níveis semelhantes e às vezes superiores aos de cafeína, dependendo da espécie de café em questão, tais como *C. arabica*, *C. canephora*, *C. dewevrei*, *C. liberica*, *C. racemosa* entre outras (MacDonald & Macrae, 1985; Mazzafera, 1991). A trigonelina em si não leva a efeitos fisiológicos acentuados, tais como aqueles da cafeína. Porém, causa algum estímulo no sistema nervoso central, afeta a secreção biliar e estimula a motilidade intestinal. Trigonelina aparentemente não tem efeito sobre a qualidade da bebida do café e a maioria dos estudos, ainda que poucos, são sobre a sua conversão (50-80%) a ácido nicotínico (vitamina niacina) durante a torrefação. A importância da niacina no café como complemento vitamínico há muito vem sendo investigada (Carvalho, 1962)

Apesar de bastante estudada, ainda existe dúvida sobre o papel da cafeína nas plantas que a contém (Mazzafera *et al.*, 1996). Entre as hipóteses que poderiam ser consideradas para um

provável papel fisiológico está a de ser uma reserva de nitrogênio, já que possui quatro átomos desse elemento em sua molécula, perfazendo pouco mais de 28% em peso, representando muito pouco em relação ao conteúdo total de nitrogênio na semente. No entanto, em *C. liberica* e *C. dewevrei* é evidente que durante a germinação ocorre a degradação de cafeína, através de demetilações sequenciais, assim como a formação de ácidos metilúricos, provenientes da oxidação das metilxantinas formadas durante a demetilação da cafeína (Petermann & Baumann, 1983). A formação desse compostos é transiente, ou seja, são formados a partir da cafeína da semente e à medida que esta se exaure, o mesmo acontece a eles. Apesar disto, não foi mostrado que eles tenham participação como provedores de N para a síntese de outros compostos nitrogenados.

Em estudo de Baumann & Gabriel (1984), sementes de *C. arabica* foram germinadas em condições assépticas em ágar. A dosagem de cafeína foi feita no ágar e nas sementes durante os vários dias da germinação. Neste estudo os autores não individualizaram a semente da plântula em formação, para as dosagens de cafeína. Assim, os dados iniciais (0 e 7 dias) seriam relativos somente a sementes embebidas e aqueles mais tardios (28 e 56 dias), com certeza seriam referentes à plântulas (sementes + radículas + folhas cotiledonares em expansão dentro do endosperma). Observou-se que cafeína não tinha sua concentração alterada aos 7 dias, diminuindo em 20% aos 28 dias. Entretanto, aos 56 dias, quando já havia se desenvolvido uma plântula, havia aumento de cafeína, provavelmente devido a síntese de cafeína nas folhas cotiledonares. Observou-se ainda que uma considerável quantidade de cafeína (15 a 20%), da total existente na semente, era excretada no ágar. Os autores seguiram também o conteúdo total de nitrogênio nas sementes e plântulas, observando que mesmo diminuindo a quantidade desse elemento, havia aumento de cafeína. Concluíram, portanto, que cafeína não atuaria como reserva de nitrogênio na semente.

Há evidências de que durante a germinação de sementes, a trigonelina seria convertida a ácido nicotínico pela demetilação provocada pela trigonelina demetilase (Fig. 2), e posteriormente a NAD, servindo assim, como um precursor de reserva para a formação de nucleotídeos de piridina (Joshi & Handler, 1962; Poulton, 1981; Taguchi *et al.*, 1989). A conversão de trigonelina a ácido nicotínico há muito vem sendo investigada (Blake, 1954). A trigonelina agiria sobre a divisão celular, prolongando a fase G2 do ciclo celular e com isso, retardando a divisão celular. Trigonelina também seria uma forma de estoque de ácido nicotínico, pois em quantidades excessivas ele é considerado tóxico para a planta (Tramontano *et al.*, 1983). Mais recentemente, foi proposta uma estreita relação entre nicotinamida e trigonelina em plantas e animais, com referência à primeira ser um sinalizador de defesas contra estresses oxidativos que poderiam causar danos ao DNA (Berglund, 1994). Trigonelina parece também estar ligada a resposta osmorreguladora em leguminosas induzidas a estresse salino (Tramontano & Jouve, 1997).

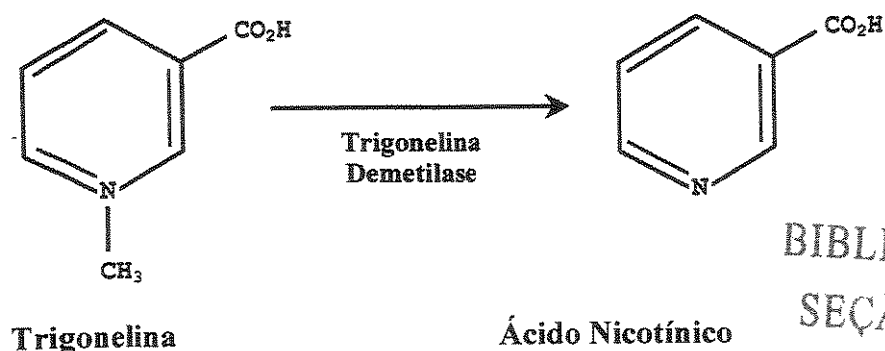


Figura 2: Conversão da trigonelina à ácido nicotínico através da demetilação provocada pela ação da trigonelina demetilase.

Ainda que o estudo de Baumann & Gabriel (1984) tenha sido bastante abrangente, não levou em consideração a distinção de semente e plântula em formação, ou melhor, a folha cotiledonar em expansão no interior da semente. A importância deste fato é que enzimas

poderiam ser liberadas do embrião para a degradação dos compostos de reserva das células do endosperma. Este fenômeno parece acontecer em várias outras plantas durante a germinação de sementes. Foi observado um amolecimento do endosperma ao redor da ponta da radícula em sementes de pimenta (Watkins & Cantliffe, 1983; Watkins *et al.*, 1985), tomate (Groot & Karssen, 1987; Groot *et al.*, 1988; Nonogaki *et al.*, 1992) e *Datura ferox* (Sanchez *et al.*, 1986; Sanchez *et al.*, 1990) decorrente da redução de polissacarídeos devido à atividade de endo- β -mananases. Também mostrou-se que a região frontal (a ponta da radícula) sofria grandes alterações morfológicas em alface (Psaras *et al.*, 1981) e tomate (Nonogaki *et al.*, 1992), indicando que eventos primários ocorrem antes de acontecer a protrusão da radícula.

Investigando este efeito em sementes pré-embebidas ou não, Nonogaki *et al.* (1992) demonstraram, durante a germinação de sementes de tomate, a presença de uma hidrolase de galactomananos na região do endosperma próxima a ponta da radícula. A função da atividade enzimática no local seria o amolecimento do endosperma, facilitando a liberação da radícula através do mesmo.

Portanto, o aproveitamento das reservas da semente seria em parte feito pela hidrólise das mesmas sob a ação de enzimas liberadas do embrião durante a germinação (Bewley & Black, 1994). Um exemplo clássico é a liberação de α -amilase, β -amilase, α -glucosidases e enzimas desramificadoras de amido, na conversão de amido à glicose no endosperma de cereais.

Assim, acreditamos que o acompanhamento da concentração de cafeína e trigonelina durante a germinação de sementes de café, com distinção em uma porção contendo o embrião (proximal) e outra não o contendo (distal), poderia oferecer maiores informações sobre o papel desses dois alcalóides durante o processo.

OBJETIVOS

1. Averiguar se existe mudança de concentração de trigonelina e cafeína quanto à posição na semente, de modo a inferir sobre a sua utilização durante a germinação de sementes de café, até a formação da plântula.
2. Verificar, em relação à trigonelina, a presença de atividade enzimática de trigonelina demetilase, com a formação de ácido nicotínico.
3. Caracterizar a trigonelina demetilase quanto a alguns parâmetros de reação e cinética.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal

Foram usadas sementes de *C. arabica* cv. Mundo Novo, obtidas de frutos maduros (cerejas) colhidos de um cafeeiro plantado em um dos canteiros experimentais do Departamento de Fisiologia Vegetal da Unicamp. Os frutos foram lavados em água corrente, seguido da remoção manual da casca e a retirada da mucilagem do mesocarpo feita por imersão em solução aquosa de NaOH 1M por 1 h. Em seguida as sementes foram lavadas intensamente com água destilada e uma amostra foi usada para a determinação da massa seca, após secagem em estufa a 80°C. Antes de serem colocadas para germinar, as sementes tiveram o pergaminho (endocarpo) retirado, uma vez que este funciona como barreira mecânica, atrasando a germinação das sementes (Válio, 1976).

O índice de germinação obtido foi próximo aos 100% sendo observado protusão da radícula a partir da 2ª semana após a embebição.

Dosagens de cafeína, trigonelina e ácido nicotínico por HPLC

Cafeína, trigonelina e ácido nicotínico foram extraídos do pó resultante da moagem das sementes. Para tanto, 100 mg deste pó acrescidos de 5 mL de água destilada foram colocados em tubos com tampa rosqueável e imersos em banho-maria fervente por 1 h, com agitação ocasional. Após o resfriamento foram adicionados 100 mg de MgO e o sobrenadante recuperado após centrifugação a 10.000 g por 15 min.. Parte do sobrenadante foi reservado, em freezer, para a

dosagem de cafeína e o restante passado em mini-colunas Sep-Pak C18 (Waters), pré equilibradas com metanol, para remoção de compostos que podem interferir na determinação da trigonelina e ácido nicotínico (Trugo & Macrae, 1984; Mazzafera, 1991).

Cafeína foi analisada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) de fase reversa com um cromatógrafo da Shimadzu (modelo LC 10AS). Foi usada uma coluna C18 MICROSORB-MV 100A com 4,6 mm x 150 mm, sendo o solvente de eluição uma solução aquosa de acetato de sódio a 0,5% e pH 5,0 com 15% de metanol, com fluxo de 1 mL/min. A detecção dos compostos eluindo da coluna foi feita em detector de ultravioleta em 254 nm. Trigonelina e ácido nicotínico foram analisados no mesmo sistema de cromatografia, porém com a coluna C18 MICROSORB-MV 100A com 4,6 mm x 250 mm, e o solvente de eluição foi uma solução de ácido acético 0,5%. A detecção no ultravioleta foi feita em 254 nm.

Tanto para cafeína como para trigonelina as áreas obtidas pelo registrador-integrador do HPLC foram comparadas com aquelas de padrões puros, para determinação das concentrações nas sementes.

1º Experimento: Trigonelina, ácido nicotínico e cafeína em sementes de café durante a germinação

Neste experimento, sementes foram colocadas para germinar, com a face plana para baixo, sobre papel de filtro umedecido com água destilada, em caixas plásticas do tipo gerbox. As caixas foram colocadas em sacos plásticos e deixadas temperatura ambiente (~25°C), no laboratório. Após uma semana foram feitas coletas semanais de 7 sementes, repetidas 3 vezes, durante seis semanas consecutivas. Nas coletas, as sementes foram divididas em região proximal (contendo o embrião) e distal (fig. 3), sendo que a partir da terceira semana foi

retirada a radícula emitida antes da divisão em região proximal e distal. Em seguida o material foi seco em estufa a 80°C até peso constante, quando então foi moído finamente em moinho de facas, micro moinho tipo willye, e o pó obtido usado para as dosagens de cafeína, trigonelina e ácido nicotínico por HPLC, conforme descrito anteriormente.

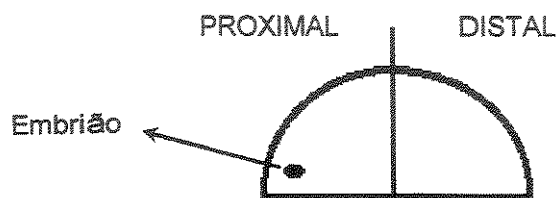


Figura 3: Corte de uma semente de café em região proximal e distal.

2º Experimento: Cafeína, trigonelina e ácido nicotínico e NAD no endosperma, embrião e meio de germinação

Neste experimento acompanhou-se os níveis de cafeína, trigonelina e ácido nicotínico no endosperma, embrião e meio de germinação. NAD foi dosado somente no endosperma contendo o embrião.

As sementes foram colocadas para germinar em placas gerbox reticuladas, sendo que em cada retículo foi colocada uma pequena quantidade de ágar 1%. Cada retículo continha uma semente e em cada amostragem foram feitas 3 repetições compostas de 3 sementes cada uma. Os embriões foram separados das sementes e estas foram divididas em parte proximal (do lado do embrião) e distal. Para a dosagem de trigonelina, ácido nicotínico e cafeína o material foi seco, extraído e analisado por HPLC, como indicado anteriormente. Para a extração de cafeína, trigonelina e ácido nicotínico do meio, o ágar de cada retículo foi colocado em 5 mL de água e triturado em politron. Em seguida a solução foi filtrada em papel

de filtro comum e parte do filtrado foi centrifugado em Eppendorf. O sobrenadante foi utilizado diretamente nas dosagens por HPLC, conforme descrito anteriormente.

Para NAD, a extração e a determinação foi feita de acordo com Berglund *et al.* (1996), sendo o procedimento descrito em detalhes no item “Produção de catabólitos de [^{14}C -2]cafeína e [^{14}C -carboxil]trigonelina”.

3º Experimento: Difusão de trigonelina na semente e no meio

Neste experimento, para verificar se durante a germinação ocorre difusão de trigonelina de um lado para outro da semente (proximal para distal), 0,5 μL de [^{14}C]trigonelina foram colocados do lado proximal da semente. Após a observação de que este volume havia sido absorvido, aplicaram 4 x 1 μL de água no mesmo local. Em seguida, as sementes foram colocadas para germinar em gerbox reticulado, com duas camadas de papel filtro em cada divisão. As sementes foram coletadas em diferentes dias e após serem divididas em lado proximal e distal, foram trituradas em politron, com metanol. Após decantação do resíduo, foram tomadas alíquotas e contada a radioatividade depois da adição do coquetel de cintilação (PPO + metanol + Triton X-100 + Xilol). O papel utilizado na germinação foi lavado 5 x 1 mL de metanol e também contada a radioatividade em uma alíquota.

4º Experimento: Produção de catabólitos de [^{14}C -2]cafeína e [^{14}C -Carboxil]trigonelina

Foi feito um ensaio em que [^{14}C -2]cafeína foi fornecida a sementes e que após absorção, foram colocadas para germinar. A formação de catabólitos de cafeína seria

acompanhada pela determinação de radioatividade em certos compostos conhecidos por estarem envolvidos no catabolismo deste alcalóide em café. Assim, para este ensaio foram coletados frutos maduros de *C. arabica*, despulpados e das sementes retirados os pergaminhos. Cerca de 30 sementes foram pesadas e deixadas em temperatura ambiente para secagem, sendo feito o acompanhamento da perda de peso por 36 h. Quando a média de perda por semente era de aproximadamente 100 mg, as mesmas foram transferidas para placas de gerbox reticuladas, com 25 divisões de 2 x 2 cm. Em cada célula do retículo foi colocada uma gota (20 µL) de solução aquosa de [^{14}C -2]caféina 0.27 µCi (~60.000 cpm) (10 µCi/mmol) produzida pela metilação de [^{14}C -2]xantina (Heftman, 1971), sendo que as sementes colocadas com a face plana sobre as gotas. Para evitar evaporação, as placas foram fechadas, colocadas em bandeja plástica contendo papel de filtro umedecido no fundo e o conjunto foi colocado dentro de saco plástico transparente. Após observação de que o líquido sob as sementes haviam desaparecido, colocou-se 25 µL de água destilada sob elas. Após a absorção da água, as sementes foram transferidas para novas placas reticuladas, onde cada célula havia recebido 1 mL de ágar 1% como meio de germinação. Durante a transferência, as sementes tiveram a face plana pressionada sobre papel de filtro para retirada da [^{14}C -2]caféina não absorvida. Em seguida, as placas com ágar foram fechadas e mantidas em condições ambiente de laboratório para germinação das sementes. Nas placas onde se fez a aplicação de [^{14}C -2]caféina, os retículos foram lavados com 0,5 mL de etanol 80%, que foram transferidos para frasco de cintilação. Após adição de coquetel de cintilação, determinou-se a radioatividade.

Um dia após a colocação das sementes nas placas de germinação, fez-se a primeira coleta. O mesmo foi repetido após 1, 2, 4 e 5 semanas. Cada coleta era constituída de 4 repetições de 5 sementes. As sementes foram divididas em porções proximal e distal, secas em estufa (80°C) e moídas. 200 mg do material moído, acrescidos de 1,5 mL de metanol a 80%

foram colocados em banho-maria fervente por 1 h. Após resfriamento, o material sólido foi eliminado por centrifugação e 800 µL do sobrenadante foram secos 80°C e o resíduo solubilizado em 200 µL de água. Deste extrato foram tomados 20 µL para determinação da radioatividade, após adição de líquido de cintilação, e o restante armazenado em freezer. As análises em HPLC dos catabólitos formados foram feitas conforme Berthou *et al.* (1989), utilizando-se um detector de radioatividade.

Para a avaliação dos metabólitos de trigonelina, foi aplicado em cada lado da semente (proximal e distal) 1 µL de [¹⁴C]trigonelina (4.400.000 cpm/semente), como explicado anteriormente para o ensaio de difusão. Em seguida, as sementes foram colocadas para germinar em placas gerbox e em diferente períodos foram coletadas para análises.

Para a extração dos compostos, o processamento das sementes foi diferente, pois ocorre perda de NAD por aquecimento prolongado. Por isso, ao invés das sementes serem colocadas a 80°C, elas foram secas no ambiente por uma semana e depois moídas em moinho de facas. A extração foi feita de acordo com Berglund *et al.* (1996). O material finamente moído (200 mg) foi extraído em tubo eppendorf por adição de 1 mL de água destilada fervente e resfriado na temperatura ambiente. Após centrifugação e recuperação do sobrenadante, o precipitado foi extraído mais três vezes com 0,5 mL de água destilada (25°C), sendo que os sobrenadantes foram combinados com aquele primeiro da extração com água quente. O material foi liofilizado, solubilizado em 100 µL de água destilada e mantido em freezer para as análises.

Para a determinação da radioatividade em trigonelina, ácido nicotínico e NAD, foram acrescentados a cada amostra 5 µg de padrões de trigonelina, ácido nicotínico e NAD, e aplicados 50 µL em placa cromatográfica de camada delgada de sílica (TLC) com indicador de fluorescência - GF254 (Merk TLC 20x20cm, silicagel 60 F₂₅₄) e desenvolvida com etanol /

0.5 M de acetato de amônio (5:3 v/v). Lateralmente nas placas foram aplicados somente padrões para serem utilizados como referência. Após a corrida e secagem das placas, as manchas visualizadas em UV-254 nm e correspondentes aos compostos referência, aplicados nas laterais, foram raspadas das placas diretamente para frascos de cintilação, e líquido de cintilação adicionado para contagem da radioatividade.

Para as análises do nível endógeno de cafeína e metilxantinas resultantes de sua degradação nos extratos anteriores com [^{14}C -2]cafeína, utilizou-se uma coluna C18 MICROSORB-MV 100A (4,6mm x 250 mm) , usando uma modificação do gradiente proposto por Berthou *et al.* (1989). Como solventes foram usados A) 3,3 mL tetrahydrofurano, 2,7 mL ácido acético, 10 mL de acetonitrila e 984 mL de água destilada; B) 7,5 mL de tetrahydrofurano, 2,75 mL de ácido acético, 75 mL de acetonitrila e 915 mL de água destilada. O gradiente foi de 0% a 80% do solvente B em 60 minutos, com fluxo de 1 mL/min. A detecção em ultravioleta foi em 280 nm. As amostras foram comparadas com uma mistura dos padrões puros.

5º Experimento: Dosagem da atividade da trigonelina demetilase

É conhecido na literatura apenas um trabalho sobre a dosagem dessa enzima em plantas (Taguchi & Shimabayashi, 1983). Desta forma, no presente trabalho empregamos o método utilizado por estes autores. Algumas modificações foram feitas no sentido de evitar a oxidação por fenóis, presentes em grandes quantidades em sementes de café (Clifford & Kazi, 1987). Foi montado um ensaio de germinação de sementes em papel de filtro, semelhante ao descrito anteriormente.

Sementes com 5 ou 6 semanas de germinação, em papel de filtro, foram utilizadas para as dosagens enzimáticas. As sementes foram cortadas em fatias finas e 5 g foram extraídas em

politron com 20 mL de Tampão HEPES 100 mM, pH 7,0 com EDTA 10 mM e 500 mg de PVPP. Foram dados dois pulsos de 15 segundos, separados por 1 minuto em gelo. O material foi deixado em gelo por 15 min antes de ser centrifugado (15.000 rpm / 15 min , 4°C). O sobrenadante foi dessalinizado em colunas PD-10 de Sephadex G25 (Pharmacia), sendo utilizado Tampão HEPES 10 mM pH 8,0 para a eluição. No eluato foi feita dosagem de proteínas com reagente da BioRad e o extrato foi usado para as dosagens de atividade. No meio de reação adicionaram 200 µg de proteína e 1,82 µCi de [¹⁴C]trigonelina e o volume completado para 200 µL com tampão HEPES 10 mM pH 8,5 . Após 120 min à 37°C, adicionou-se 5 µg de ácido nicotínico e os extratos foram aplicados em TLC e os compostos separados com o solvente descrito anteriormente. Depois da corrida, após a secagem da placa, o ácido nicotínico visualizado em UV 254 nm foi raspado e a radioatividade contada em contador de cintilação. A determinação de 120 min como tempo de reação foi baseada em testes prévios com até 180 min. Após a determinação da melhor temperatura e pH de reação, as dosagens começaram a ser feitas a 30°C e com Tampão TRIS pH 8,0.

Para a caracterização do melhor pH utilizou-se tampão fosfato-acetato para os pH's 4 e 5, fosfato para 6, 7 e 8, e TRIS para o pH 9. A melhor temperatura determinada entre 20, 30, 40 e 50°C e o Km e Vmax com diferentes quantidades de substrato.

Após serem feitas estas caracterizações, a enzima teve sua atividade determinada em sementes de diferentes semanas de germinação, tanto na parte proximal como distal.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1º Experimento: Determinações de trigonelina, ácido nicotínico e cafeína

A Fig. 4 apresenta as variações dos conteúdos de ácido nicotínico, trigonelina e cafeína nas porções proximal e distal das sementes de *C. arabica* durante a germinação. Para os dados de trigonelina, a fração proximal possui maior concentração que a distal. Isto também aconteceu para ácido nicotínico e cafeína, sendo raras vezes observado o contrário. Ainda que na maioria dos casos os desvios padrões observados não permitem indicar diferença estatística significativa, a tendência é a mesma para os três compostos e foi obtida nas 3 repetições realizadas em diferentes períodos.

É difícil dizer o por quê destas diferenças entre as duas porções, uma vez que são detectadas desde o início da germinação. De maneira similar a alguns estudos (Watkins & Cantliffe, 1983; Watkins *et al.*, 1985; Sanchez *et al.*, 1986; Groot & Karssen, 1987; Groot *et al.*, 1988; Sanchez *et al.*, 1990; Nonogaki *et al.*, 1992) em café também parece haver a degradação gradual das reservas contidas nas células do endosperma, no que se refere aos açúcares de reserva, em função de enzimas liberadas pelo embrião (Ouguerram, 1989). Segundo este autor, durante a germinação das sementes de café, as células do endosperma entram em colapso apenas quando as reservas são inteiramente mobilizadas, havendo substituição do espaço pelo desenvolvimento do embrião, o que acontece de forma centrífuga. O processo é gradual e demora vários dias.

Assim, se em café ocorre a degradação de cafeína e trigonelina a partir de enzimas liberadas pelo embrião, deveria haver uma redução mais lenta desses compostos na região distal,

havendo a inversão dos conteúdos com o avançar da germinação. Porém, o que se observou foram variações semelhantes. Pelo menos no que diz respeito à trigonelina, os dados das determinações de trigonelina demetilase nas porções proximal e distal poderão indicar se existe alguma diferenciação na degradação deste alcalóide que depende da posição do embrião.

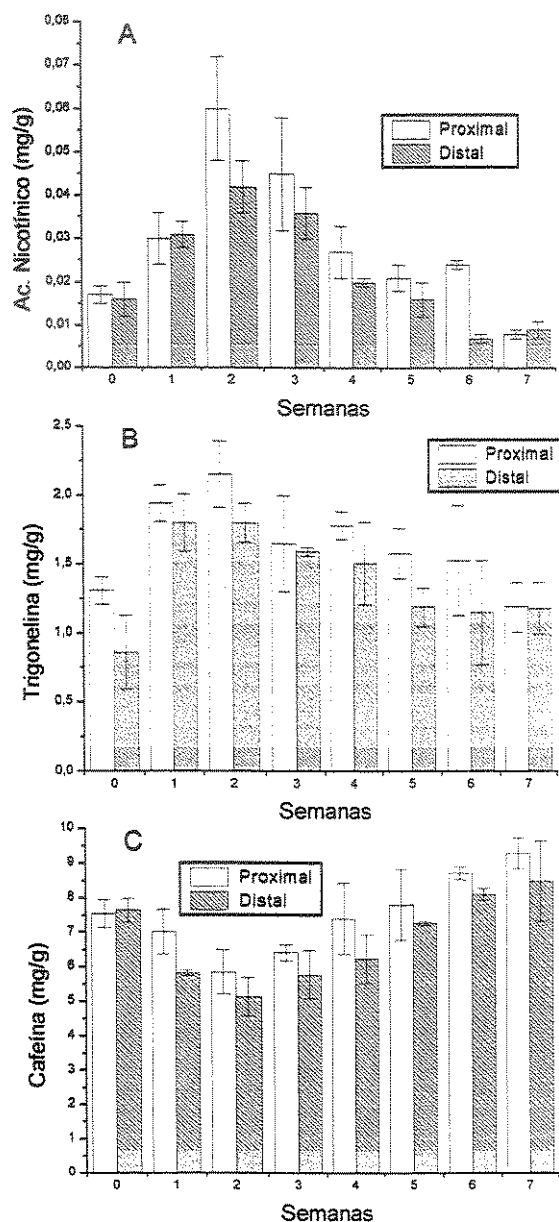


Figura 4. Conteúdo de ácido nicotínico (A), trigonelina (B) e cafeína (C) nas porções proximal e distal de sementes de *C. arabica* em germinação.

Outro fato interessante a ser observado nos dados de cafeína é que, inversamente à trigonelina e ácido nicotínico, ocorreu redução no seu conteúdo para depois aumentar. A redução nesse conteúdo pode ser devida à liberação de cafeína para o meio. Além disso, Baumann & Gabriel (1984) também observaram que sementes de *C. arabica* germinadas em ágar não tinham a concentração de cafeína alterada até o sétimo dia, sendo esta, porém, reduzida ao redor de 20% aos 28 dias. Aos 56 dias após a germinação, quando já havia se desenvolvido uma plântula, ocorria seu aumento.

Os dados de cafeína levam a uma especulação interessante. Por alguma razão, seja ela degradação ou liberação de cafeína para o meio, ocorre redução de cafeína e seguida de aumento. Este aumento deve refletir síntese do alcalóide, o que provavelmente ocorre no embrião, já que o endosperma é tido como um tecido de reserva inativo. Portanto, uma vez que também ocorre aumento de cafeína na porção distal, poderia estar havendo difusão da mesma dentro da semente, da fração proximal para a distal. Isto de fato ocorre, como será mostrado no ensaio com difusão de [^{14}C]trigonelina.

Em relação à trigonelina e ácido nicotínico, pode-se observar que ocorreu aumento, pela ação do embrião, para depois haver redução, provavelmente provocado pela liberação para o meio de germinação, uma vez que ambos os compostos são bastante solúveis em água.

2º Experimento: Cafeína, trigonelina, ácido nicotínico e NAD no endosperma, embrião e meio de germinação

Assim como no experimento anterior, a análise de cafeína nas partes proximal e distal do endosperma mostraram redução no início da germinação, com posterior aumento, sendo que a parte proximal mostrou sempre a tendência de ter maior teor do alcalóide (Fig. 5A). No

embrião, o teor de cafeína aumentou significativamente na quarta semana de germinação (Fig. 5B) e no meio de germinação (ágar) detectou-se significativa quantidade do alcalóide na 1ª semana (Fig. 5C). Se considerarmos que o peso médio de uma semente de café é ~100 mg e que antes da germinação o teor de cafeína na semente seria de 12,5 µg/mg, uma semente possuiria ao redor de 1250 µg de cafeína. Assim, na terceira semana de germinação, quase 10% dessa cafeína foi excretada no meio.

Assim como para cafeína, os dados de trigonelina nas partes proximal e distal (Fig. 6A) repetem o que foi observado no experimento anterior e, neste caso, houve aumento seguido de queda do conteúdo, sendo em geral maiores os valores obtidos para este alcalóide na porção proximal do endosperma.

É interessante observar que no embrião (Fig. 6B) a concentração de trigonelina é maior, praticamente o dobro, do que no endosperma no início da germinação e então, diminui acentuada e mais rapidamente. Apesar do embrião ter sido retirado para as análises no endosperma, esta concentração poderia explicar os maiores teores detectados na parte proximal. A explicação talvez seja a difusão da trigonelina do embrião para o endosperma, durante o processo germinativo, ou mesmo durante a formação da semente. Trigonelina foi liberada em significativa quantidade no meio de germinação (Fig. 6C), mostrando, portanto, sua alta solubilidade e indicando que poderia ser translocada de um lado para o outro da semente, como observado no ensaio de difusão que será mostrado posteriormente.

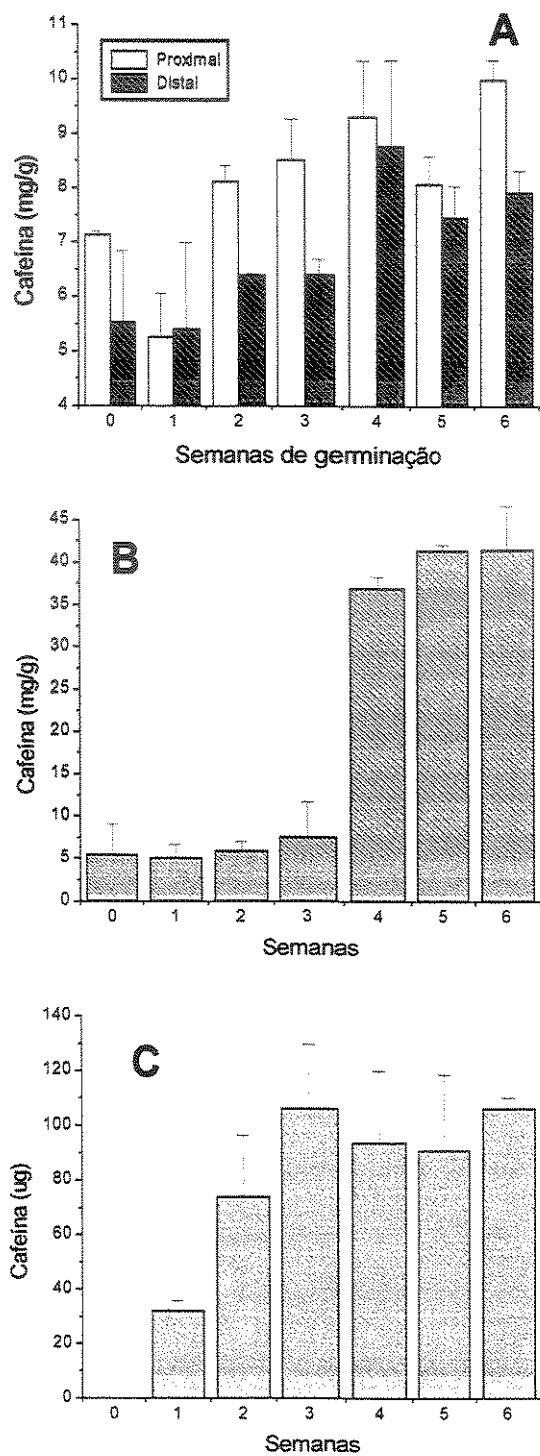


Figura 5. Teor de cafeína nas partes proximal e distal do endosperma (A), no embrião (B) e no meio de germinação (C).

Tanto para o endosperma (proximal e distal) quanto para o embrião, ocorre redução de trigonelina nas últimas semanas de germinação, indicando ter dois destinos: o meio de germinação ou sua degradação na própria semente. A redução de trigonelina no meio de cultura, deveria ser explicada pela presença de microrganismos no mesmo. Apesar de não termos observado crescimento visível, é possível que bactérias possam ter utilizado este alcalóide como fonte de energia. Utilização de trigonelina por bactérias tem sido relatada na literatura (Daglia *et al.*, 1994). O mesmo não ocorreu com cafeína e isto poderia ser explicado pela maior especialização de microrganismos para degradar este alcalóide bem como, apresentar também toxicidade à bactérias e fungos (Yamaoka-Yano & Mazzafera, 1999). A indução de bactérias para desenvolver a capacidade de degradar cafeína é observada somente após longos períodos de cultivo em meio com o alcalóide e apenas algumas bactérias apresentam esta capacidade, em particular, *Pseudomonas putida*. Desta forma estaria justificado o acúmulo de cafeína no meio.

No endosperma, a alternativa mais atraente para o desaparecimento de trigonelina seria a sua conversão a ácido nicotínico, assim como liberação para o meio e posterior degradação por microrganismos. No embrião, a taxa de degradação detectada foi maior para trigonelina. Sugerindo que além da degradação do alcalóide e sua difusão para o meio de cultura, haveria difusão do mesmo também para o endosperma. Além disso, poderia estar havendo uma maior atividade da trigonelina demetilase nessa região.

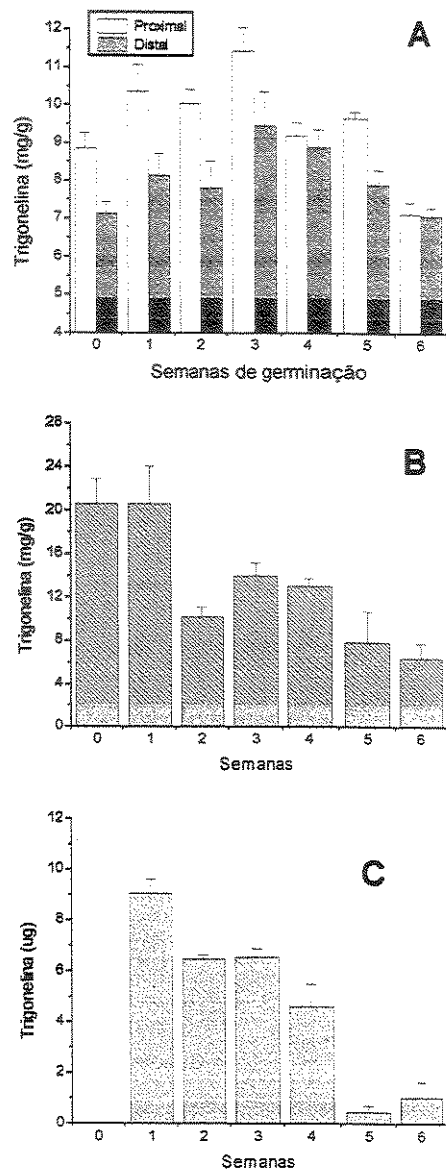


Figura 6. Teor de trigonelina nas partes proximal e distal do endosperma (A), no embrião (B) e liberada para o meio de germinação (C).

A Fig. 7 mostra os dados para ácido nicotínico durante a germinação das sementes de café. Novamente, os dados mostrados anteriormente são confirmados em relação ao conteúdo nas partes proximal e distal das sementes (Fig. 7A). Ácido nicotínico tem sua concentração aumentada no embrião a partir da terceira semana (Fig. 7B), e no meio, aumenta até a 4^o

semana para depois diminuir (Fig. 7C). Para este último caso acreditamos serem válidos os comentários feitos para trigonelina em relação à degradação por microrganismos. É interessante notar que o aumento de ácido nicotínico no endosperma é posterior ao início da diminuição de trigonelina no embrião. De todo o modo, os resultados, em ambos os casos, sugerem a conversão de trigonelina a ácido nicotínico. Finalmente, o desaparecimento desse ácido no endosperma poderia ser devido a sua liberação para o meio de germinação ou ainda sua degradação enzimática.

A Fig. 8 traz os dados do teor de NAD nas partes proximal e distal do endosperma de café. NAD não foi detectado no embrião, provavelmente devido a pequena massa do mesmo. Os dados com endosperma mostram que inicialmente NAD se encontra em concentrações semelhantes nas partes proximal e distal, mas que o seu desaparecimento é muito mais rápido na parte proximal. Os dados de ácido nicotínico e trigonelina sugerem que a queda na concentração de um (trigonelina) poderia estar ligada ao aumento do outro (ácido nicotínico). No entanto, é difícil dizer o mesmo sobre NAD em relação à sua formação a partir destes outros dois compostos. Aparentemente, a não detecção nas semanas finais indicaria uma taxa de utilização bastante rápida, baseado em uma menor concentração na porção proximal já na primeira semana de germinação. Além disto, NAD é muito pouco translocado entre compartimentos celulares, devido a sua baixa solubilidade em membranas. Talvez esta característica explique a diferença de níveis entre as partes proximal e distal, o que evidencia, por outro lado, a clara influência do embrião na variação dos níveis deste composto.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

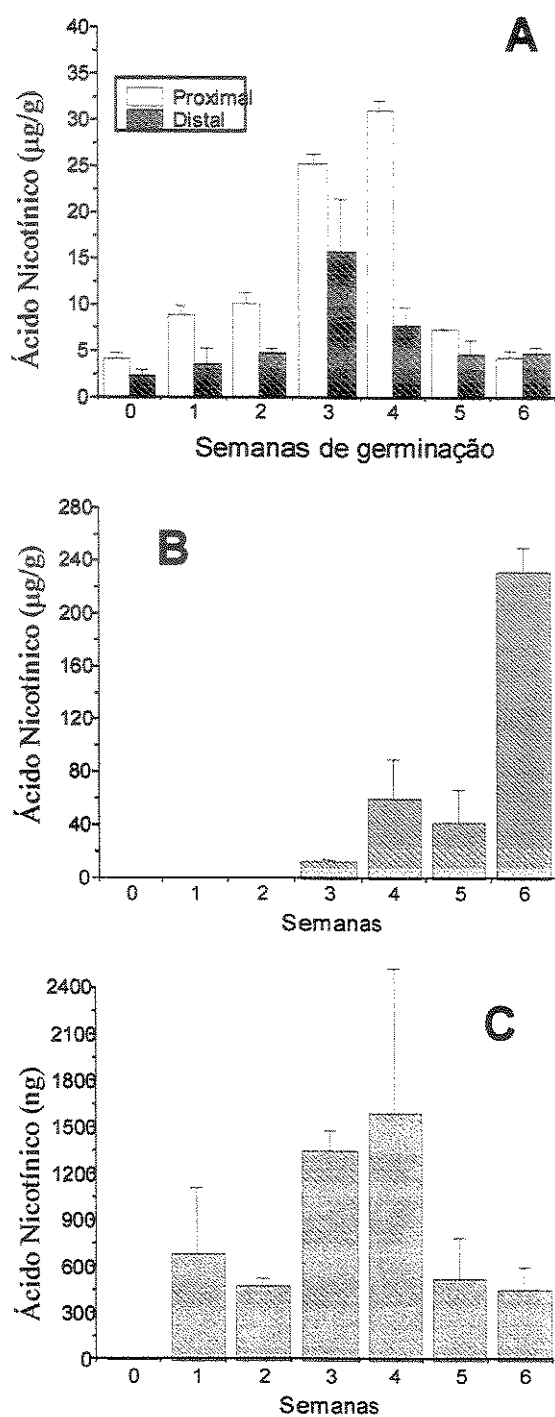


Figura 7. Teor de ácido nicotínico nas partes proximal e distal do endosperma (A), no embrião (B) e liberada para o meio de germinação (C).

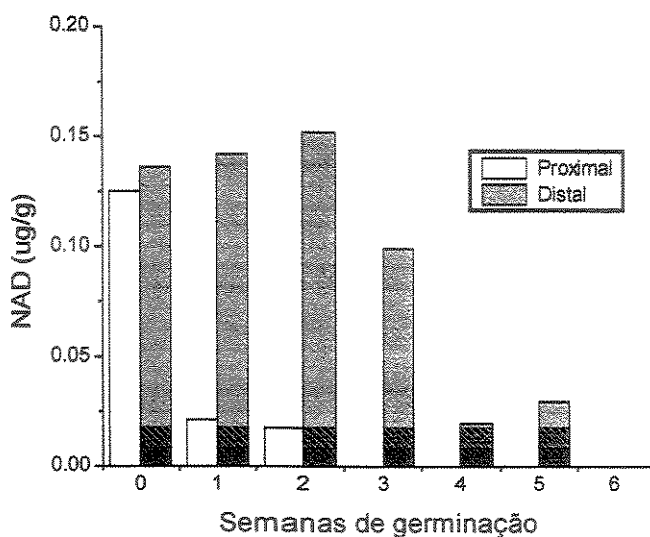


Figura 8. Teor de NAD nas partes proximal e distal do endosperma.

3º Experimento: Difusão de trigonelina na semente e no meio

O ensaio sobre difusão de trigonelina nas sementes foi montado porque no experimento anterior levantou-se a possibilidade de que isto poderia ocorrer e que poderia ser, em parte, responsável pela queda do teor de cafeína nas mesmas. Utilizamos [^{14}C]trigonelina para estudar esta possibilidade. De fato, a difusão de trigonelina ocorre durante a germinação da semente (Fig. 9). Observa-se que após 3-5 dias de germinação, 30 a 35% da radioatividade total detectada estava presente na região distal, que não recebeu [^{14}C]trigonelina. Foi ainda detectada radioatividade no meio de germinação.

Portanto, sendo cafeína mais solúvel em água do que trigonelina, é provável que as pequenas diferenças observadas entre a parte proximal e a distal sejam devidas à biossíntese

no embrião e translocação para a parte distal. Waller *et al.* (1986) mostraram que o teor de cafeína aumentava bastante no embrião de café nos estádios iniciais de germinação.

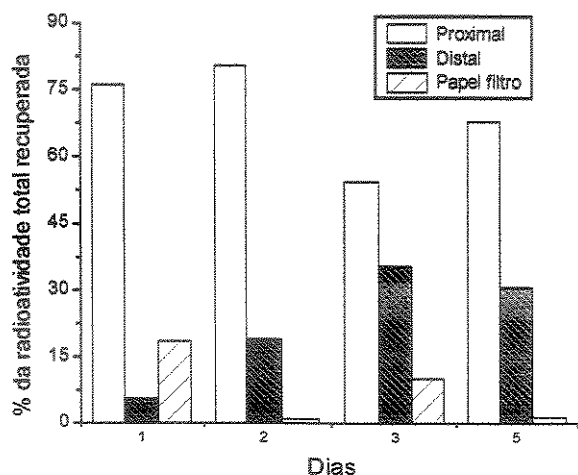


Figura 9. Difusão de [^{14}C]trigonelina na semente de café. Trigonelina marcada foi aplicada apenas na região proximal (do lado do embrião).

4º Experimento: Produção de metabólitos de cafeína e trigonelina

Como indicado em Material e Métodos, a atividade específica da cafeína marcada era baixa, e o ensaio em que foi utilizada para seguir o seu catabolismo não resultou em dados conclusivos. Grande parte da radioatividade foi recuperada na lavagem dos retículos da placa de gerbox, mostrando que ela foi pouco absorvida. Assim, concluímos com estes dados, que as chances de detecção de metabólitos marcados de [^{14}C -2]cafeína por HPLC com detecção da radioatividade seriam bastante problemáticas, devido à sensibilidade do detector de radioatividade. Este equipamento consegue distinguir um pico definido acima de 3.000 cpm.

Levando em consideração que foram fornecidos 60.000 cpm para cada semente, obtendo-se em média 1.500 - 2.000 cpm/g de semente, e que isto poderia representar além de cafeína também seus metabólitos, quantidades muito maiores de cafeína marcada teriam que ser fornecidas às sementes. Mesmo assim, isto não iria garantir uma boa análise, uma vez que aparentemente, a cafeína foi apenas superficialmente absorvida pelas células, dadas as quantidades recuperadas no ágar das placas de germinação. Baumann & Gabriel (1984) observaram que 15 - 20% da cafeína da semente de café era excretada no meio durante os primeiros dias da germinação. Pelos nossos dados, quase 50% da radioatividade fornecida foi recuperada no ágar, o que seria indicativo de que a absorção de [^{14}C -2]cafeína foi bastante superficial, ou seja, apenas pelas primeiras camadas de células do endosperma. Assim, fez-se a dosagem dos níveis endógenos de produtos resultantes da degradação de cafeína. A detecção de metabólitos de cafeína foi feita em HPLC utilizando-se um monitor de UV (Berthou *et al.*, 1989). Das possíveis metilxantinas a serem detectadas, ou seja, teobromina (3,7-dimetilxantina), teofilina (1,3-dimetilxantina), 3- e 7-monometilxantinas, somente a primeira foi detectada. Os dados são mostrados na Fig. 10.

O conteúdo de teobromina nas sementes de café (Fig. 10A) está de acordo com dados anteriores da literatura, para esta espécie (Mazzafera *et al.*, 1991). O que se observou para este alcalóide foi inicialmente uma certa tendência de aumento, seguida de redução e novamente aumento. É interessante notar que teobromina está presente como precursor imediato de cafeína em café, assim como na sua degradação (Suzuki & Waller, 1984a,b; Mazzafera *et al.*, 1994; Ashihara *et al.*, 1996). Portanto, poderíamos especular que o aumento inicial seria devido à degradação de cafeína, na redução, devido à sua utilização na biossíntese, e depois no novo aumento, haveria acúmulo, pois sabe-se que o turnover de cafeína é baixo nos tecidos de

C. arabica (Suzuki & Waller, 1984a,b; Mazzafera *et al.*, 1991, 1994; Ashihara *et al.*, 1996).

Para cafeína, a tendência de aumento foi observada novamente (Fig. 9B).

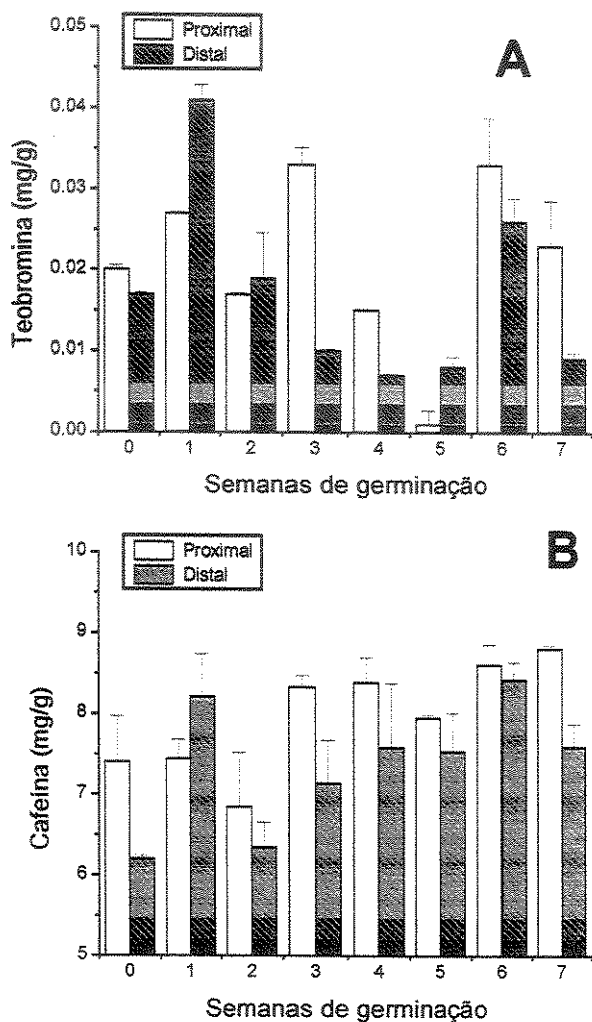


Figura 10. Teor de teobromina (A) e cafeína (B) nas partes proximal e distal do endosperma.

Para investigar a degradação de trigonelina, foi montado um ensaio em que $[^{14}\text{C}]$ trigonelina (4.400.000 cpm) foi fornecida às sementes. Durante a germinação foram feitas amostragens e determinação do nível de radioatividade em trigonelina, ácido nicotínico e

NAD. Para este experimento, utilizou-se etanol:acetato de amônia 0,5 M (5/3, v/v) para a separação destes três compostos em TLC. Outros solventes descritos na literatura não separaram NAD de ácido nicotínico. O solvente utilizado aqui fez com que trigonelina ficasse com Rf menor do que ácido nicotínico e este menor do que NAD. Isto foi bastante adequado, porque se a degradação de trigonelina é baixa, como foi mostrado pelos ensaios das dosagens endógenas, trigonelina ficando acima dos outros compostos poderia deixar uma cauda de radioatividade, que poderia mascarar as radioatividades reais de ácido nicotínico e NAD. Este solvente também foi usado na separação de trigonelina e ácido nicotínico marcados nos ensaios enzimáticos.

Levando-se em consideração a quantidade fornecida de [^{14}C]trigonelina por semente, a Fig. 11 mostra que já na primeira semana de germinação, boa parte dela já havia sido degradada e, como NAD mostra radioatividade em níveis semelhantes, utilizada na síntese do nucleotídeo.

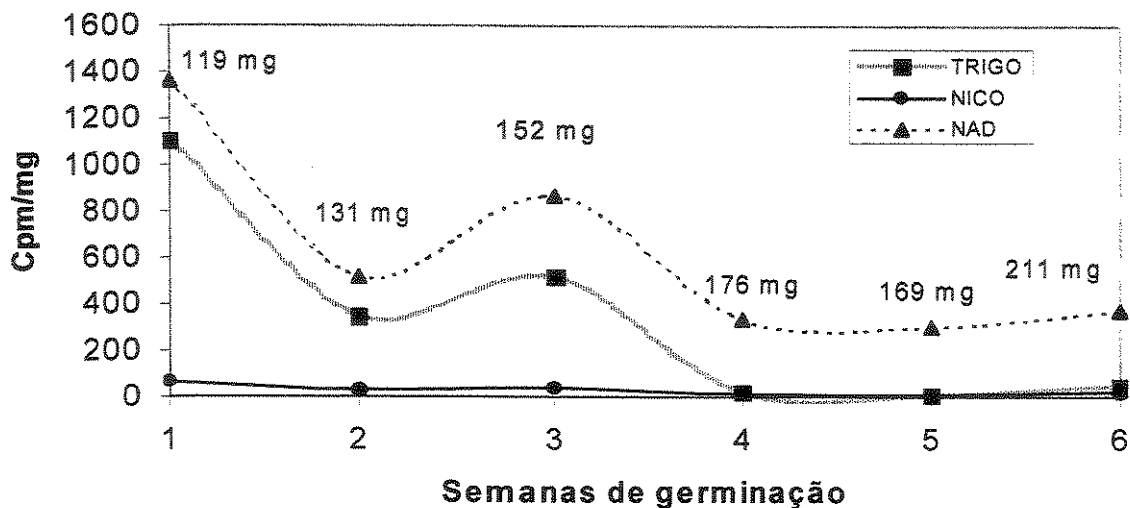
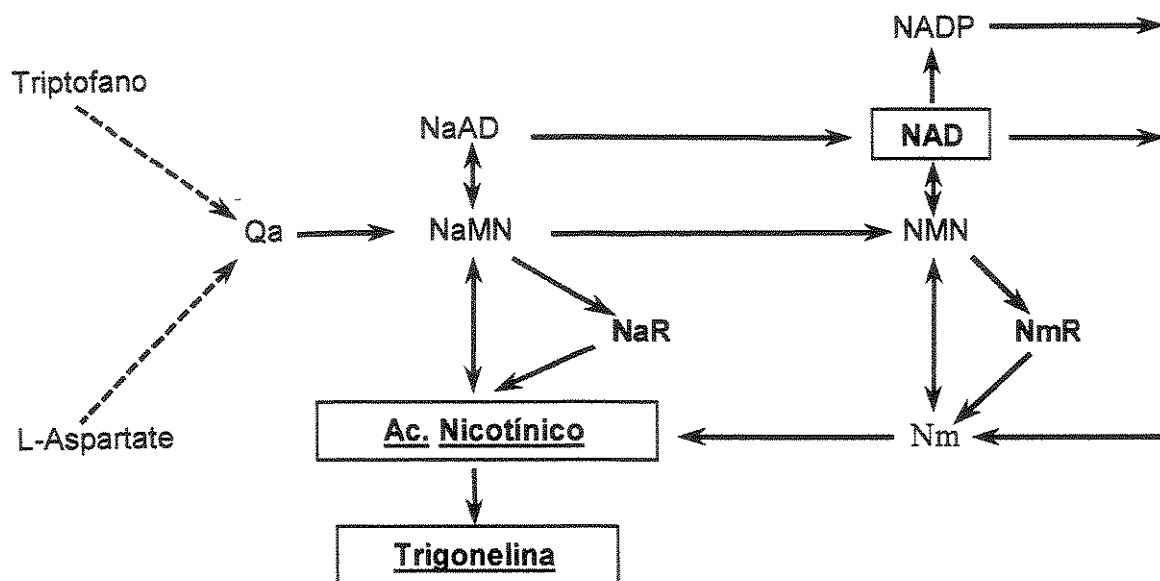


Figura 11. Radioatividade em trigonelina (TRIGO), ácido nicotínico (NICO) e NAD durante a germinação de sementes que receberam [^{14}C]trigonelina. Os valores em mg nas datas das amostragens indicam os pesos médios das sementes.

Porém, deve-se levar em consideração também que parte poderia ter sido difundida para o meio de germinação. A radioatividade em trigonelina diminuiu mais rapidamente do que em NAD. É curioso notar que em nenhum momento houve acúmulo significativo de radioatividade em ácido nicotínico, indicando seu rápido catabolismo. Na terceira semana observa-se um aumento de radioatividade nos três compostos.

Apesar de indicarem a conversão de trigonelina em NAD, os dados desta figura são aparentemente discordantes daqueles das Figs. 6A e 7A, onde observou-se aumento nas concentrações de trigonelina e ácido nicotínico nas sementes até a terceira semana de germinação, para depois diminuir. Uma possível explicação seria a de que ocorre síntese de trigonelina, ao mesmo tempo em que ocorre sua degradação, como mostra o esquema de Magni *et al.* (1999) a seguir, com base, principalmente, em estudos com microrganismos:



Abreviaturas: Qa = quinolinato; NaMN = nicotinato mononucleotídeo, NaR = nicotinato ribosídico; NaAD = deamido-NAD; NMN = nicotinamida mononucleotídeo; NmR = nicotinamida ribosídico; Nm = nicotinamida

Uma outra maneira de abordar estes dados seria através do cálculo da atividade específica de trigonelina, ácido nicotínico e NAD durante a germinação. Porém, isto não foi possível utilizando-se as sementes do ensaio com trigonelina marcada, pois cada semente constituiu uma repetição restando muito pouco material para a dosagem dos níveis endógenos em HPLC. No entanto, uma vez que as determinações de trigonelina e ácido nicotínico foram bastante semelhantes nos ensaios anteriores, e considerando que as sementes utilizadas nos experimentos eram provenientes da mesma planta, utilizamos os dados médios de concentração no endosperma dos ensaios anteriores e os de radioatividade (Fig. 11) para calcular a atividade específica (Fig. 12).

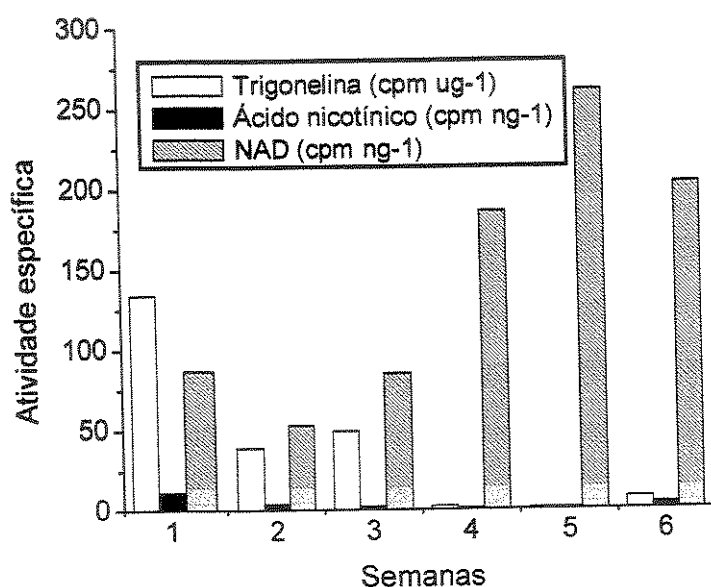


Fig. 12. Atividade específica (cpm/mg ou µg de substância) em sementes germinando.

Deve-se chamar atenção que para poderem ser incluídos no mesmo gráfico, os dados de trigonelina foram apresentados em cpm/ μ g, enquanto que para ácido nicotínico e NAD em cpm/ng. Assim, se na mesma escala, os dados de trigonelina seriam 1000 vezes menores. A princípio isto demonstra que a quantidade de trigonelina é massivamente maior do que ácido nicotínico e NAD, confirmando os dados das Figs. 5, 6 e 7, que mostram que trigonelina tem concentração aproximadamente 1000 vezes maior do que ácido nicotínico.

A Fig. 12 também mostra que apesar das Figs. 6 e 7 indicarem aumento de trigonelina e ácido nicotínico na terceira semana de germinação, a atividade específica cai continuamente. Caso houvesse degradação constante de trigonelina e ácido nicotínico, o esperado seria a manutenção da atividade específica ao longo da germinação. Porém o observado é a queda da mesma. Sugerindo assim, que exista diluição do pool das formas radioativas destes compostos, ou em outras palavras, que exista aumento de trigonelina e ácido nicotínico não marcados em relação às formas marcada com ^{14}C . Como é muito pouco provável que ocorra degradação diferencial entre formas marcadas e não marcadas, o mais provável é que ocorra a síntese de trigonelina e ácido nicotínico, havendo diluição da forma radioativa.

A atividade específica de NAD, no entanto, é estável nas semanas iniciais. Porém, cabe lembrar que usamos os dados médios entre porções proximal e distal, e que ao contrário de trigonelina e ácido nicotínico, em que houve bastante semelhança entre as regiões proximal e distal, houve queda acentuada de NAD logo nas primeiras semanas na região proximal e manutenção na porção distal (Fig. 8). Assim, os dados estáveis de atividade específica para NAD nas quatro primeiras semanas devem ser interpretados com bastante cautela. Verificando que a queda de NAD na parte proximal foi bastante acentuada, é razoável admitir que a atividade específica para esta parte da semente seria bem maior do que na distal. Na quarta semana, porém, o teor de NAD é bastante reduzido em ambas as partes da semente, mas a

atividade específica ainda é semelhante a das semanas anteriores. Assim, esta semana em particular poderia representar a transição entre baixa atividade específica das primeiras semanas na parte proximal, para alta nas semanas finais. De qualquer forma, a alta atividade específica nas semanas finais mostram o grande fluxo de radioatividade de trigonelina para NAD.

5º Experimento: Caracterização da enzima trigonelina demetilase

Trigonelina demetilase mostrou melhor atividade com pH 8,0 e à 30°C (Fig. 13A-B). A atividade de trigonelina demetilase em café foi baixa, mas próxima aos níveis detectados por Taguchi & Shimabayashi (1983) em tecidos de várias plantas, como gemas de alfafa, folhas de bambu, sementes de ervilha, gemas de soja e frutos de pimentão com valores variando de 0,057 (alfafa) até 0,76 nmoles de ácido nicotínico/h.mg proteína (pimentão). Cebola (bulbo) e acículas de Pinus apresentaram os maiores valores, de 1,99 e 5,57, respectivamente. A enzima não foi detectada em trevo, folhas de ervilha e broto de beterraba. Pelos dados da Fig. 13C, onde utilizou-se pH 8,0 e 30°C, os valores observados foram aproximadamente 0,10 - 0,13 nmoles de ácido nicotínico/h.mg proteína

Taguchi & Shimabayashi (1983) também investigaram a enzima em tecidos de animais e utilizaram fígado de sapo para sua caracterização. Determinou-se que o melhor pH para a enzima era 8,5 e um k_m de 2,77 mM. A enzima foi inibida por metais como Fe e Hg. Certa inibição também foi observada com 2-mercaptoetanol, razão pela qual não o incluímos em nossos ensaios. Para as sementes de café aqui estudadas, determinou-se k_m de 1,129 mM e V_{max} de 0,157 nmoles ácido nicotínico / h.mg proteína.

Trigonelina demetilase aumentou durante as primeiras semanas de germinação,

tendendo a estabilizar nas últimas semanas (Fig. 13C), o que de certa forma é consistente com a estabilização da concentração de trigonelina e ácido nicotínico nas semanas finais de germinação. Estas medidas foram feitas com as sementes inteiras, sem distinção entre partes proximal e distal. Assim, sementes da 5^a e 6^a semanas do experimento de determinação de trigonelina, ácido nicotínico e NAD (Figs. 6, 7 e 8) foram utilizadas para a determinação de trigonelina demetilase em suas porções proximal e distal (Tabela 1). Neste caso não foi removido o embrião.

Os dados mostram não existirem diferenças entre as partes proximal e distal nas duas semanas estudadas, mas como mostrado anteriormente, existe aumento de uma semana para outra. É curioso notar que se o embrião desempenhasse um papel importante na degradação de trigonelina, deveria haver diferenças entre as porções proximal e distal. No entanto, pode-se argumentar que se as medidas de atividades tivessem sido feitas em semanas anteriores, talvez isto pudesse ter sido observado. Porém, os dados do conteúdo de trigonelina durante a germinação (Fig. 6) mostram que houve queda do alcalóide em ambas as porções e com padrão bastante semelhante. Apesar do endosperma ser um tecido praticamente morto (Lopes & Larkins, 1993), pode existir a possibilidade da presença de enzimas, como é observado para polifenoloxidase (Amorim & Melo, 1991).

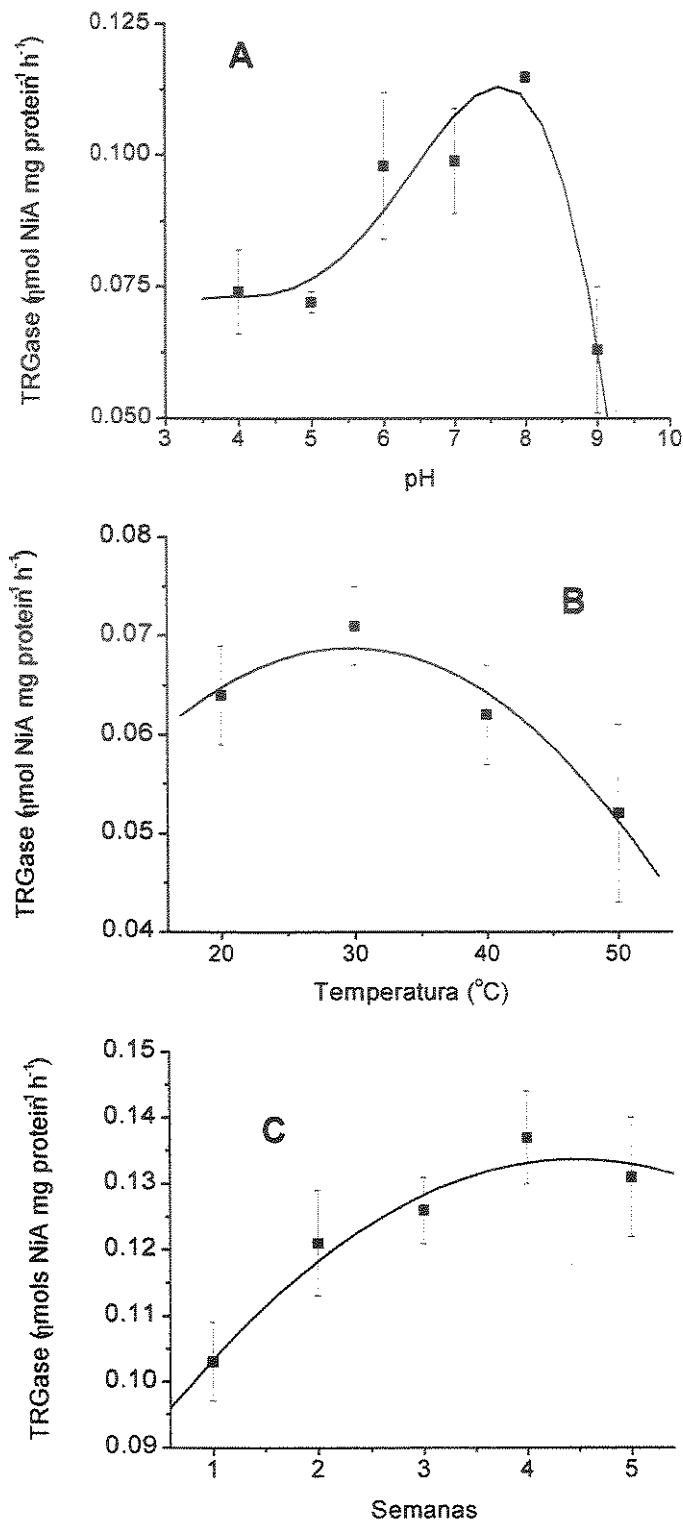


Figura 13. Determinação do pH ótimo (A), temperatura ótima (B) para trigonelina demetilase e atividade durante a germinação das sementes de café (C). Dados expressos em nmoles ácido nicotínico formado/h.mg proteína. Médias de 3 repetições.

Tabela 1. Atividades de trigonelina demetilase (μ moles de ácido nicotínico/h.mg proteína) nas porções distal e proximal de sementes de café na quinta e sexta semana de germinação.

	5ª Semana*	6ª Semana
Proximal	0,147 $\pm$ 0,001	0,164 $\pm$ 0,004
Distal	0,134 $\pm$ 0,001	0,166 $\pm$ 0,008
Média	0,140 B	0,165 A

Médias de três repetições. (letras diferentes indicam significância estatística a $P \leq$

0,05

CONCLUSÕES

A trigonelina é degradada durante o transcorrer do processo de germinação da semente de café, sendo definitivamente utilizada para a formação de NAD. Os dados comparativos de trigonelina endógena e marcada com ^{14}C , no entanto, indicam que durante a germinação da semente de café também ocorre sua síntese já nos primeiros dias de germinação, paralelamente a sua degradação, havendo uma renovação constante da concentração deste alcalóide. Desta forma, apesar dos dados mostrarem claramente um provável papel para trigonelina durante a germinação, eles não explicam porque ela é sintetizada e o seu nível mantido nos tecidos da planta.

Ácido nicotínico, assim como trigonelina, é degradado também, e sua baixa radioatividade indica uma rápida conversão a NAD.

Quanto à cafeína, os dados aqui apresentados não permitem concluir sobre sua participação como fornecedora de N durante a germinação da semente de café. O fato de haver liberação acentuada para o meio, coincidindo com a queda da concentração na semente, logo seguido de aumento (síntese), sugere que se tem algum papel, este é pequeno. Estudos com folhas mostram que cafeína tem baixa taxa de degradação. Assim, em sementes germinando é provável que o mesmo ocorra.

A enzima trigonelina demetilase foi detectada pela primeira vez em café. A enzima teve baixa atividade *in vitro*, mostrando maior atividade em pH 8,0, temperatura ótima de 30°C e k_m de 1,129 mM e V_{max} de 0,157 nmoles ácido nicotínico/h.mg proteína.

LITERATURA CITADA

- Amorim, H. V. & Melo, M., 1991. IN: Significance of enzyme in non-alcoholic coffee beverage (P.F. Fox, ed), Food Enzymology Vol. 2. Elsevier Applied Science, pp. 189-209.
- Ashihara, H., Monteiro, A. M., Moritz T., Gillies, F. M. & Crozier, A., 1996. Catabolism of caffeine and related purine alkaloids in leaves of *Coffea arabica* L. *Planta* 198:334-339.
- Baumann, T. W. & Gabriel, H., 1984. Metabolism and excretion of caffeine during germination of *Coffea arabica* L. *Plant Cell Physiol.* 25:1431-1436.
- Berglund, T., 1994. Nicotinamide, a missing link in the early stress response in eukaryotic cells: a hypothesis with special reference to oxidative stress in plants. *FEBS Lett.* 351:145-149.
- Berglund, T., Kalbin, G., Strid A., Rydström, J. & Ohlsson, A. B., 1996. UV-B and oxidative stress-induced increase in nicotinamide and trigonelline and inhibition of defensive metabolism induction by poly(ADP-ribose)polymerase inhibitor in plant tissue. *FEBS Lett.* 380: 188.
- Berthou, F., Ratanasavanh, D., Riche, C., Picart, D., Voirin, T. & Guillouzo, A., 1989. Comparison of caffeine metabolism by slices, microsomes and hepatocyte cultures from adult human liver. *Xenobiotica.* 19:401-417.
- Bewley, J. D. & Black, M., 1994. Seeds: Physiology of development and germination. Plenum Press, New York. 445p.
- Blake, C. O., 1954. Niacin metabolism in the corn seedling: the biosynthesis of trigonelline. *Am. J. Bot.* 41:231-238.

- Carvalho, A., 1962. Variability of the niacin content in coffee. *Nature*. 194:1096.
- Charrier, A., 1978. La structure génétique des caféiers spontanés de la région Malgache (Mascaro*Coffea*). Leurs relations avec les caféiers d'origine africaine (Eu*Coffea*). ORSTOM, Paris. 223p.
- Charrier, A. & Berthaud, J., 1975. Variation de la teneur en caféine dans le genre *Coffea*. *Café Cacao Thé*. 19:251-264.
- 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.
- Clifford, M. N. & Willson K. C., 1985. Coffee: botany, biochemistry and production of beans and beverage. The AVI Publishing Company, Inc., Connecticut, 457p.
- Daglia, M., Cuzzoni, M. T., Dacarro, C., 1994. Antibacterial activity of coffee? relationship between biological activity and chemical markers. *J. Agric. Food Chem.* 42: 2273-2277.
- Groot, S. P. C. & Karssen, C. M. (1987). Gibberellins regulate seed germination in tomato by endosperm weakening: a study with gibberellin-deficient mutants. *Planta*. 171:525-531.
- Groot, S. P. C., Kieliszewska-Rokicka, B., Vermeer, E. & Karssen, C. M. (1988). Gibberellin-induced hydrolysis of endosperm cell walls in gibberellin-deficient tomato seeds prior to radicle protusion. *Planta*. 174:500-504.
- Heftman, E., 1971. Synthesis of caffeine-2-¹⁴C. *J. Leb. Comp.* 7:463-465.
- Joshi, J. G. & Handler, P., 1962. Metabolism of trigonelline. *J. Biol. Chem.* 237:3185-3188.
- Lopes, M. A. & Larkins, B. A., 1993. Endosperm origin, development, and function. *Plant Cell*. 5:1383-1399.

- MacDonald, I. A. & Macrae, R., 1985. The determination of aminoacids in coffee products. IN: XI Colloque Scientifique International sur la Chimie du Café, Lomé, Togo, p333-340
- Magni, G., Amici, A., Emanuelli, M., Paffaelli, N. & Ruggieri, S., 1999. Enzymology of NAD⁺ synthesis. Adv. in Enzymol. 73: 135-182.
- Mazzafera, P., 1991. Trigonelline in coffee. Phytochemistry. 30:2309-2310.
- Mazzafera, P., Crozier, A., Magalhaes, A. C., 1991. Caffeine metabolism in *Coffea arabica* and other species of coffee. Phytochemistry. 30:3913-3916.
- Mazzafera, P., Crozier, A. & Sandberg, G., 1994. 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.
- Mazzafera, P. & Magalhães, A. C. N., 1991. Cafeína em folhas e sementes de *Coffea* e *ParaCoffea*. Rev. Bras. Botânica. 14:157-160.
- Mazzafera, P., Yamaoka, Y., D. M. & Vitória, A. P., 1996. Para que serve a cafeína em plantas? Rev. Bras. Fisiol. Veg. 8:67-74.
- Nonogaki, H., Matsushima, H. & Morohashi, Y., 1992. Galactomannan hydrolizing activity develops during priming in the micropylar endosperm tip of tomato seeds. Physiol. Plant. 85:167-172.
- Ouguerram, A., 1989. Formation et digestion des parois cellulaires de réserves à mannanes du café (*Coffea arabica* L.). Ann. Sci. Natur., Botanique, 13^e sér., 10: 111.
- Petermann, J. B. & Baumann, T. W., 1983. Metabolic relations between methylxanthines and methyluric acids in *Coffea* L. Plant Physiol. 73:961-964.

- Poulton, J. E., 1981. Transmethylation and demethylation reactions in the metabolism of secondary plant products. IN The Biochemistry of Plants (E.E. Conn, ed). Vol. 7. Secondary Plant Products, Academic Press, Inc., New York. pp. 667-723.
- Psaras, G., Georghiou, K. & Mitrakos, K., 1981. Red-light-induced endosperm preparation for radicle protrusion of lettuce embryos. Bot. Gaz. 142:13-18.
- Sanchez, R. A., Miguel, L. & Mercuri, O., 1986. Phytochrome control of cellulase activity in *Datura ferox* L. seeds and its relationship with germination. J. Exp. Botany. 37:1574-1580.
- Sanchez, R.A., Sunell, L., Labavitch, J. M. & Bonner, B. A., 1990. Changes in the endosperm cell walls of two *Datura* species before radicle protusion. Plant Physiol. 93:89-97.
- Suzuki, T., Ashihara, H. & Waller, G. R., 1992. Purine and purine alkaloid metabolism in *Camellia* and *Coffea* plants. Phytochemistry. 31:2575-2584.
- 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.
- Taguchi, H. & Shimabayashi, Y., 1983. Findings of trigonelline demethylating enzyme activity in various organisms and some properties of the enzyme from hog liver. Biochem. Biophys. Res. Commun. 113:569-574.

- Taguchi, H., Nishitani, H., Okumura, K., Shimabayashi, Y., Iwai, K., 1989. Biosynthesis and metabolism of trigonelline in *Lemna paucicostata* 151. *Agric. Biol. Chem.* 53: 2867-2871.
- Tramontano, W. A. & Jouve, D., 1997. Trigonelline accumulation in salt-stressed legumes and the role of other osmoregulators as cell cycle control agents. *Phytochemistry.* 44: 1037-1040.
- Tramontano, W. A., Lynn, D.G. & Evans, L. S., 1983. Nicotinic acid and nicotinamide metabolism and promotion of cell arrest in G2 in *Pisum sativum*. *Phytochemistry.* 22: 343-346.
- Trugo, L. C., Macrae, R., 1984. A study of the effect of roasting on the chlorogenic acid composition of coffee using HPLC. *Food Chem.* 15: 219-227.
- Válio, I. F. M., 1976. Germination of coffee seeds (*Coffea arabica* L. cv. *Mundo Novo*). *J. Exp. Bot.* 27:983-991.
- Waller, G. R., Kumari, D., Friedman, J., Friedman, N., Chou, C. H., 1986. The Science of Allelopathy. IN: Caffeine autotoxicity in *Coffea arabica* L. (A.R. Putnam & C.-S. Tang, eds). John Willey & Sons. New York, pp. 243-269.
- Watkins, J. T. & Cantliffe, D.J., 1983. Mechanical resistance of the seed coat and endosperm during germination of *Capsicum annum* at low temperature. *Plant Physiol.* 72:146-150.
- Watkins, J. T., Cantliffe, D.J., Huber, D.J. & Nell, T.A., 1985. Gibberellic acid stimulated degradation of endosperm in pepper. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 1110:61-65.
- Yamaoka-Yano, D. M. & Mazzafera P., 1999. Catabolic pathway of caffeine and purification of a xanthine oxidase responsible for methyluric acid production in *Pseudomonas putida* L. *Revista de Microbiologia.* 30: 62-70.

CAPÍTULO II

COMPOSITIONAL CHANGES OF PROTEINS AND AMINO ACIDS IN GERMINATING COFFEE SEEDS¹

(MUDANÇAS NA COMPOSIÇÃO DE PROTEÍNAS E AMINOÁCIDOS DURANTE A GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE CAFÉ)

¹ Trabalho aceito para publicação no *Brazilian Archives of Biology and Technology*.

Compositional Changes of Proteins and Amino Acids in Germinating Coffee Seeds

Milton Massao Shimizu and Paulo Mazzafera*

Departamento de Fisiologia Vegetal, Instituto de Biologia, CP 6109, Universidade Estadual de Campinas, 13083-970, Campinas, SP, Brazil

ABSTRACT

Endosperm is the main reserve tissue in coffee seeds. Coffee (Coffea arabica L.) seeds were germinated for six weeks and qualitative and quantitative changes in amino acids and proteins were investigated. The total content of free amino acids were reduced during germination, however, protein content remained constant. SDS-PAGE profiles showed that legumin-like proteins became less stained in the last weeks. Asparagine, glutamic acid, aspartic acid, alanine and lysine were the major free amino acids, although serine and glutamine were also significant. Except for tyrosine, which increased with germination, all other amino acids were reduced. Analysis of the amino acid composition of the total soluble protein showed glutamic acid/glutamine and glycine as the main amino acids. However, other amino acids such as leucine, aspartic acid/asparagine, alanine, lysine, serine were also found in reasonable amounts.

Key words: Amino acids; *Coffea arabica*; endosperm; germination; protein; seeds

INTRODUCTION

In seeds, proteins accumulate in organelles called protein-bodies, being isolated from uncontrolled proteolysis by proteinases. Upon germination, by action of endo and exoproteinases, small peptides and amino acids generated by cleavage of the storage proteins may remain in the storage tissue or translocated to the developing plant (Callis, 1995). Because they are destined for food use most of the studies concerning protein composition have been carried out in seeds of cereals and legumes, such as wheat, maize, soybean, rice and beans (Payne, 1986). In legumes, seed proteins accumulate in the cotyledon, while endosperm is the main storage organ in cereals. The main storage proteins in legumes are globulins, whereas cereal grains are rich in prolamines and glutelins (Payne, 1986; Müntz, 1998).

Protein mobilization during seed germination is well documented mostly for legumes and cereals (Derbyshire *et al.*, 1976; Callis, 1995; Chiou *et al.*, 1997; Ferreira *et al.*, 1995; Müntz, 1998) although information is also available for

other species (Elmore and Paul, 1980; Garcia-Agustin and Primo-Millo, 1989; Garcia-Agustin and Primo-Millo, 1990; King and Gifford, 1997; Srivastava *et al.*, 1997).

More than 95% of dry mass of the coffee seed is endosperm tissue and besides galactomanan and lipids, which account approximately for 30% and 10%, respectively, proteins are present in considerable amount, averaging 10-14% in *Coffea arabica* (Clifford, 1985). Amino acids (~0.5-2%), caffeine (~1.2%) and trigonelline (~1%) are other nitrogenous compounds found in the coffee seeds. Although proteins may contribute to the development of the flavour of the coffee beverage, knowledge of their composition is rather scarce. Electrophoretic profiles were studied by a few authors (Centi-Grossi *et al.*, 1969; Amorim and Josephson, 1975; Bade and Stegemann, 1982; Luthe, 1992; Ludwig *et al.*, 1995). In a preliminary study, Centi-Grossi *et al.* (1969) made an attempt to discriminate species according to the electrophoretic profile of the albumin fraction extracted from coffee seeds. Bade and Stegemann (1982) analyzed proteins from seeds of different

* Corresponding author

coffee species aiming differentiate them according to the profiles obtained with several electrophoretic systems. Amorim *et al.* (1975) tried to correlate electrophoretic protein profile of coffee seeds with the quality of the beverage. Luthe (1992) analyzed the protein profiles of several dicotyledonous species, including *C. arabica*. Two main bands were observed in denaturing polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and because of their resemblance to the molecular weight of the acidic (a) and basic (b) subunits of legumins, the author classified them as components of legumin-like proteins. Using SDS-PAGE and gel filtration to determine the molecular weight of the native proteins we have observed that each band is probably composed of six subunits, supporting Luthe's suggestion (Bau, Mazzafera and Santoro, unpublished data). Ludwig *et al.* (1995) fractionated soluble proteins of coffee seeds according to the classification of Osborne (1924) observing the presence of albumin (15%) and globulin (85%) type proteins. Two main bands were also observed in SDS-PAGE gels. Recently, Acuña *et al.* (1999) confirmed 11S proteins as the main storage proteins in coffee seeds.

Most studies on coffee germination have dealt with preservation of the seed viability (Ellis *et al.*, 1990) and to our knowledge, only two followed compositional changes during the process, in which the biological role of caffeine was investigated in germinating coffee seeds (Friedman and Waller, 1983; Baumann and Gabriel, 1984). In this paper we have examined the quantitative and qualitative changes of proteins and amino acids during the germination of coffee seeds.

MATERIALS AND METHODS

Plant material and germination: Seeds of *C. arabica* cv. Mundo Novo were obtained from mature fruits from a tree growing locally. The fruits were manually depulped and after 48 h the seeds were rubbed against each other and rinsed with water several times until the mucilage adhered to the endocarp was removed. Then they were left to dry at room temperature (25-28°C) to a moisture content of 12% and the endocarp manually removed. Only seeds flat on one side and curved on the other were kept. Seeds displaying any visible

damage were discarded. Germination of these seeds in the conditions described below was 100%.

Seeds positioned with the flat side facing down were germinated in Petri dishes with water soaked filter paper at 20°C and in the dark. Every second day, the seeds were transferred to new Petri dishes and seeds showing any contamination by microorganisms were removed.

Analyses: During six weeks 30 seeds were sampled each time from the Petri dishes and used for the analysis. Dry seeds were also analyzed. After drying at room temperature (25-28°C) for a week, reaching on average a moisture of 10%, the seeds were sliced into thin layers, transferred to Erlenmeyer flasks containing 100 ml hexane and defatted at room temperature for two days in a rotatory shaker. The hexane was removed by leaving the seeds for several hours in a fume hood. Then they were finely ground to a powder in a ball mill.

Proteins were extracted in a mortar with a pestle (4°C) with 100 mM sodium borate buffer, pH 8.0, containing 50 mM diethyldithiocarbamic acid, 50 mM ethylenediaminetetraacetic acid, 0.3 M sodium chloride, 2% ascorbic acid, in a proportion of 200 mg / 3 ml. The extract was centrifuged and the pellet re-extracted with the same buffer. The supernatants were pooled and the protein concentration determined using a ready-to-use BioRad reagent (Bradford, 1976). Electrophoretic protein profiles were obtained by subjecting reduced proteins to discontinuous SDS-PAGE (Laemmli, 1970), with 17% of acrylamide in the main gel. Proteins were stained with Coomassie Brilliant Blue R.

For the determination of the amino acid composition of the soluble proteins of the coffee seeds, powder of ungerminated seeds was extracted three times with borate buffer, as described above, and precipitated with $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (20-80% saturation). The proteins were dialyzed against deionized water (4°C, 24 h and 4 changes), and hydrolyzed with 6 N HCl at 105°C for 24 h. The extract was dried, solubilized in a small volume of deionized water, filtered (0.2 mm) and used for the determination of the amino acid composition by high-performance liquid chromatography (HPLC) with fluorescence detection (Jarret *et al.*, 1986). Free amino acids were extracted from the seed

powder (50 mg / 2 ml) with methanol-chloroform-water - 12:5:3, v/v/v (Bielek and Turner, 1966). The extracts were left one week at 4°C, with occasional agitation. Then 0.5 ml chloroform and 0.75 ml of distilled water were added and the extract agitated vigorously. After quick centrifugation for separation of phases, aliquots were taken from the upper methanolic-aqueous phase, dried with a N₂ stream, solubilized in deionized water, filtered in 0.2 µm filters and used for quantitative (Cocking and Yemm, 1954) and qualitative determinations in HPLC (Jarret *et al.*, 1986).

Except for the determination of amino acid composition of coffee proteins, for which two replicates were made, all other data presented are means of four replicates.

RESULTS

Radicle protrusion started after two weeks the seeds were put to germinate in Petri dishes. At the end of the experiments the roots were on average two centimeters long. They were separated and not considered for analysis. Since germination was carried out at 20°C, in the last sampling the cotyledonary leaves were still poorly developed inside of the seeds. Therefore, at this stage, the main tissue was still endosperm. Optimum temperature for coffee seed germination has been found to be between 25-30°C (Baumann and Gabriel, 1984; Ellis *et al.*, 1990).

During the first two weeks of germination, the total amino acids content was reduced in the germinating coffee seeds (Table 1). During the 3rd and 4th weeks, the levels were restored to those of ungerminated seeds, followed by a marked decrease during the two last weeks. The total protein content followed the same pattern of the amino acids until the 4th week. However, in the 5th and 6th weeks, the content was increased (Table 1).

Qualitative analysis of ungerminated seeds showed, in descending order, that asparagine, glutamic acid, aspartic acid, alanine and lysine were the major free amino acids (Table 2). Serine and glutamine were also found in considerable amounts. These amino acids represented approximately 80% of the total amino acids detected during the whole sampling period. Similar

to the colorimetric determinations, the sum of the amino acids detected by HPLC showed a decrease with germination, however, in this case, this was observed since the first week. Tyrosine and glutamine were exceptions, since there was an increase of the first, while the second showed at the 6th week similar content of ungerminated seeds.

Table 1. Total free amino acid and soluble protein contents of coffee seeds during germination.

Germination time (weeks) ^a						
0	1	2	3	4	5	6
Amino Acids (mg/g)						
9.2 (0.5)	8.0 (0.1)	7.9 (0.2)	9.7 (0.1)	8.8 (0.5)	6.2 (0.1)	5.4 (0.5)
Proteins (mg/g)						
65.9 (0.9)	65.1 (1.8)	63.0 (1.0)	65.1 (2.4)	62.6 (1.6)	66.1 (3.6)	65.5 (1.2)

^a Data are means of four replicates. Numbers in parenthesis are standard errors.

Table 2. Free amino acids variations during germination of coffee seeds.

Amino Acid	Germination time (weeks) ^a						
	0	1	2	3	4	5	6
Asp	1.5	2.2	1.4	2.0	1.9	0.9	0.6
Glu	2.0	1.2	1.1	1.0	1.4	0.9	0.4
Asn	2.3	1.6	1.4	1.3	1.6	0.4	0.2
Ser	0.7	0.6	0.7	0.7	0.9	0.6	0.3
Gln	0.6	0.3	0.4	0.2	0.6	0.5	0.4
His	0.2	0.1	0.1	0.1	0.2	0.1	0.1
Gly	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
Thr	0.1	0.1	0.2	0.1	0.1	0.1	0.1
Arg	0.3	0.2	0.2	0.3	0.3	0.4	0.1
Ala	1.1	0.8	1.1	1.2	0.8	0.5	0.4
Tyr	0.4	0.6	0.9	0.8	0.6	0.5	0.5
Met	0.3	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.1
Val	0.2	0.2	0.3	0.3	0.2	0.2	0.1
Phe	0.5	0.3	0.3	0.2	0.2	0.1	0.1
Iso	0.2	0.2	0.2	0.2	0.1	0.1	0.1
Leu	0.2	0.2	0.2	0.2	0.1	0.1	0.1
Lys	1.1	0.6	0.5	0.5	0.6	0.6	0.5
Total	12	9.5	9.2	9.3	9.9	6.1	4.0

^a Means of four replicates. Standard errors were not higher than 20% of the mean values.

Fig. 1A shows an electrophoretic profile of proteins extracted from ungerminated seeds deffated with hexane in a Soxhlet apparatus for 24 h. Two main bands corresponding to 23.9 and 35.7 kDa predominated. These proteins are also seen in Fig. 1B, which shows electrophoretic profiles of germinating seeds, however, the gel lacks definition probably because seeds in this case were deffated with hexane at room temperature and not in a Soxhlet apparatus. This was done because these samples were also used for amino acids extraction and heating could change their composition (Arnold and Ludwig, 1996).

Although total protein content showed little variation (Table 1), electrophoretic profile showed significant alterations (Fig. 1B). During the germination, the 23.9 and 35.7 kDa bands decreased in intensity (indicated by arrows in lane 0) and proteins with low molecular weights were more stained or started to be visible only at later stages of germination. However, the most noticeable observation in the protein profile was a strongly stained band of approximately 30.5 kDa observed at the 4th week (indicated by arrow). This band could be already seen in extracts from the 3th week, however, at week 5th it became very faint. Since this band was observed in all four replicates, contamination by microorganisms was ruled out as a possibility.

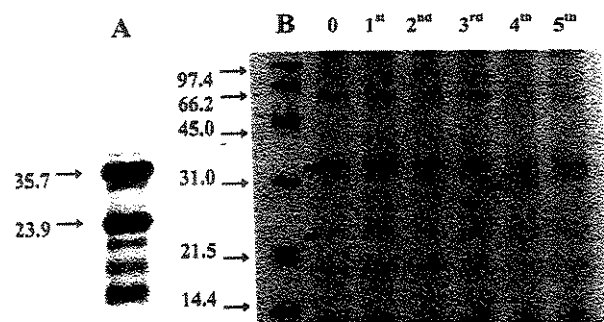


Fig. 1. Electrophoretic profile of proteins extracted from (A) ungerminated seeds deffated with hexane in a Soxhlet apparatus for 24 h and (B) germinating seeds deffated with hexane at room temperature. Numbers at left indicate molecular markers (kDa).

Glutamic acid/glutamine and glycine were the major amino acids of the coffee seed proteins (Fig. 2). However, amino acids such as leucine, aspartic acid/asparagine, alanine, lysine, serine were also found in reasonable amounts. Compared with the

most abundant free amino acids and week 0 (Table 2), only glycine and leucine were not common.

DISCUSSION

Proteins constitute the major nitrogen reserve in the coffee seeds, representing approximately 60 % of the total nitrogen (Clifford, 1985). For other nitrogenous compounds, such as caffeine, there is no proof of its significance as a nitrogen storage molecule in coffee (Baumann and Gabriel, 1984; Suzuki and Waller, 1986; Mazzafera, 1990).

SDS-PAGE profile of proteins of coffee seeds showed the two main bands previously observed by other authors (Bade and Stegemann, 1982; Luthe, 1992; Ludwig *et al.*, 1995; Acuña *et al.*, 1999). During germination there was a decrease of these bands indicating that they were hydrolyzed. However, total protein content, as indicated by the colorimetric estimates did not show significant alteration. This may be explained by the appearance of small polypeptides, as degradation products, as well as by the synthesis of other proteins. In their study on the physiological role of caffeine, Baumann and Gabriel (1984) observed reduction of proteins in the coffee seeds. However, as these authors presented the data per seed fresh weight, they are not comparable with those presented here.

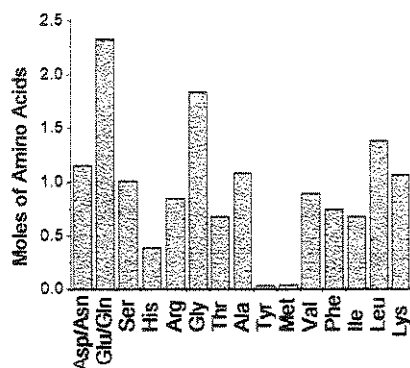


Fig. 2. Amino acid composition of total soluble coffee seed proteins.

The amino acid composition of the total protein

fraction of ungerminated coffee seeds obtained in this study is in agreement with a previous study (Ludwig *et al.*, 1995). The same was observed for free amino acids (Clifford, 1985; Arnold and Ludwig, 1996), although the lysine contents determined here were a little higher. However, depending on the seed origin, lysine content may vary significantly (Arnold and Ludwig, 1996).

Seed storage proteins are rich in asparagine and glutamine, which have higher proportion of nitrogen in the molecule (Payne, 1986). Unfortunately, the acid-hydrolysis used for the determination of the amino acid composition of the proteins of coffee seeds did not allow differentiation between these amino acids and their acidic forms, since glutamine is converted into glutamate. The composition of the total seed protein showed the predominance of glutamate, representing 16% of the amino acids. Assuming that most of the glutamate detected was in fact glutamine, one might expect increase of free glutamine during germination. However, for this amino acid as well as for asparagine it was observed a decrease for the whole germination period. In spite of that, it is interesting to observe that asparagine was the major free amino acid in ungerminated seeds and that there was an increase of aspartate in the first four weeks. As asparagine and glutamine are the main amino acids transported in coffee seedlings (Mazzafera and Gonçalves, 1999), it is probable that glutamine generated by hydrolysis of storage proteins is either translocated to the seedling or converted to asparagine, by nitrogen transfer to aspartate. Other possibility is that these amino acids are used for the synthesis of new proteins.

Endosperm is the storage tissue in coffee seeds. In mature seeds a small embryo is situated near one end of the curved side of the seed. Upon germination, the cotyledonary leaves develop inside of the seed, occupying the space released by the inner part of endosperm as the reserves are hydrolyzed. Since in viable seeds there is a close contact between endosperm and embryo cells (Dentan and Illy, 1985; Begnami, 1998), it is expected that nutrients migrate from one to the other. Under optimal germinating conditions, the cotyledonary leaves expand out of the endosperm after 7-9 weeks, when the endosperm reserves are almost entirely exhausted. At this stage, the

cotyledonary leaves are almost fully developed in size, indicating that their growth inside of the seed was supported by the endosperm reserves. Released cotyledons are green and become a nutrient source for the developing leaves.

The majority of the studies on protein mobilization in germinating seeds was carried out in legumes and cereals (Derbyshire *et al.*, 1976; Bewley and Black, 1994; Callis, 1995). In legume seeds, which have cotyledons as the main storage tissue, following protein hydrolysis, it is observed an increase of the amino acid contents, which in turn are transported to the growing seedling. In many species the endosperm grows rapidly in the early stages of seed formation, becoming senescent before maturity, since it is used as food source during seed development (Payne, 1986). In cereals, as well as in coffee, endosperm continues to develop and becomes the major reserve tissue of the seed. However, differently of coffee, in cereals the endosperm reserves are hydrolyzed very rapidly during germination in order to guarantee seedling establishment.

Depending on the plant species the embryo is not necessary for the protein breakdown since some studies showed proteolytic activity in excised endosperm seeds (Harvey and Oaks, 1974; Adams and Novellie, 1975). This indicates that proteinases synthesized during seed maturation are stored and become active on germination. In some cases, activation follows degradation of proteinase inhibitors (Callis, 1995). However, for many plant species proteinases are *de novo* synthesized during germination (Rogers *et al.*, 1985; Mitsunashi and Minamikawa, 1989; Cervantes *et al.*, 1994). Evidence from angiosperm and gymnosperm species support this as a general mechanism for most of the plant species (Shutov and Vaintraub, 1987; Callis, 1995).

Apparently, manans and lipids in the coffee endosperm are hydrolyzed by enzymes excreted by the cotyledons, since mobilization of these reserves seems to start from the embryo positioned in one side of the seed (Ouguerram, 1989). Ultrastructural analysis of dry coffee seeds showed that the endosperm and cotyledons are rich in protein bodies (Dentan and Illy, 1985; Begnami, 1998). However it is not known if during germination proteinases are released by the embryo or if they are already present in the endosperm cells.

Questions like this and others regarding proteinases action are under investigation in our laboratory in order to know how proteins are mobilized during the germination of coffee seed.

ACKNOWLEDGMENTS

M.M.S. thanks CNPq for a Master's thesis fellowship and P.M. for a research fellowship. This work was partially supported by FAPESP-São Paulo (Grant 97/01926-0).

RESUMO

Endosperma é o principal tecido de reserva em sementes de café. Sementes de café (*Coffea arabica* L.) foram germinadas por seis semanas e as alterações qualitativas e quantitativas de aminoácidos e proteínas foram investigadas. O conteúdo total de aminoácidos livres reduziu durante a germinação, no entanto, o conteúdo de proteínas permaneceu constante. Perfis eletroforéticos de proteínas em SDS-PAGE mostraram que proteínas do tipo legumina foram menos coradas nas últimas semanas. Asparagina, ácido glutâmico, ácido aspártico, alanina e lisina foram os principais aminoácidos, apesar de que serina e glutamina também estavam presentes em quantidades significativas. Exceto tirosina, a qual aumentou durante a germinação, todos os outros aminoácidos tiveram redução em sua concentração. A análise aminoácídica da fração de proteína solúvel total mostrou que ácido glutâmico/glutamina e glicina eram os principais aminoácidos presentes. No entanto, outros aminoácidos, tais como leucina, ácido aspártico/asparagina, alanina, lisina e serina, também foram encontrados em quantidades expressivas.

REFERENCES

- Acuña, R.; Bassüner, R.; Beilinson, V.; Cortina, H.; Cadena-Gómez, G.; Montes, V. & Nielsen, N.C. (1999). Coffee seeds contains 11S storage proteins. *Physiol. Plant.*, **105**, 122-131.
- Adams, C.A. & Novellie, L. (1975). Acid hydrolases and autolytic properties of protein bodies and spherosomes isolated from ungerminated seeds of *Sorghum bicolor* (Linn.) Moench. *Plant Physiol.*, **55**, 7-11.
- Amorim, H.V. & Josephson, R.V. (1975). Water-soluble protein- and non-protein components of Brazilian green coffee beans. *J. Food Sci.*, **40**, 1179-1185.
- Arnold, U. & Ludwig, E. (1996). Analysis of free amino acids in green coffee beans II. Changes of the amino acid content in arabica coffees in connection with post-harvest model treatment. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, **203**, 379-384.
- Bade, H. & Stegemann, H. (1982). Protein patterns of coffee beans. Characterization by one- and two-dimensional electrophoresis. *J. Agron. Crop Sci.*, **151**, 89-98.
- Baumann, T.W. & Gabriel, H. (1984). Metabolism and excretion of caffeine during germination of *Coffea arabica* L. *Plant Cell Physiol.*, **25**, 1431-1436.
- Begnami, C.N. (1998). Alterações estruturais, ultraestruturais e bioquímicas durante a perda de viabilidade em sementes de *Coffea arabica* cv. Catuaí Vermelho. Ph.D. Thesis, State University of Campinas - Brazil.
- Bewley, J.D. & Black, M. (1994). Seeds: Physiology of development and germination. (2nd edition) New York, USA, Plenum Press.
- Bialesk, R.L. & Turner, N.A. (1966). Separation and estimation of amino acids in crude plant extracts by thin layer electrophoresis and chromatography. *Anal Biochem.*, **17**, 278-282.
- Bradford, M.N. (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.
- Callis, J. (1995). Regulation of protein degradation. *Plant Cell.*, **7**, 845-857.
- Centi-Grossi, M.; Tassi-Micco, C. & Silano, V. (1969). Albumin fractionation of green coffee seed varieties by acrylamide gel-electrophoresis. *Phytochemistry*, **8**, 1749-1751.
- Cervantes, E.; Rodriguez, A. & Nicolás, G. (1994). Ethylene regulates the expression of a cysteine proteinase gene during germination of chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Plant Mol. Biol.*, **25**, 207-215.
- Chiou, R.Y.-Y.; Ku, K.-L. & Chen, W.-L. (1997).

- Compositional characterization of peanut kernels after subjection to various germination times. *J. Agric. Food Chem.*, **45**, 3060-3064.
- Clifford, M.N. (1985). Chemical and physical aspects of green coffee and coffee products. In: *Coffee: Botany, Biochemistry and Production of Beans and Beverage*. eds M.N. Clifford, M.N., K.C. Willson. AVI Publishing Company, Inc., Westport, Connecticut, USA, pp. 305-374.
- Cocking, E.C. & Yemm, E.W. (1954). Estimation of amino acids by ninhydrin. *Biochem. J.*, **58**, xii-xiii.
- Dentan, E. & Illy, A. (1985). Étude microscopique de grains de café matures, immatures et immatures fermentés arabica Santos. Proceedings of the XI International Scientific Colloquium on Coffee, Lomé, Togo, pp 341-350.
- Derbyshire, E.; Wright, D.J. & Boulter, D. (1976). Legumin and vicilin, storage proteins of legumes seeds. *Phytochemistry*, **15**, 3-24.
- Ellis, R.H.; Hong, T.D. & Roberts, E.H. (1990). An intermediate category of seed storage behaviour? I. Coffee. *J. Exp. Bot.*, **41**, 1167-1174.
- Elmore, C.D. & Paul, R.N. (1980). Light and nitrogen affect storage protein mobilization in germinating cottonseed. *Crop Sci.*, **20**, 435-443.
- Ferreira, R.B.; Melo, T.S. & Teixeira, A.N. (1995). Catabolism of the seed storage proteins from *Lupinus albus*: fate of globulins during germination and seedling growth. *Austr. J. Plant Physiol.*, **22**, 373-381.
- Friedman, J. & Waller, G.R. (1983). Caffeine hazards and their prevention in germinating seeds of coffee (*Coffea arabica* L.). *J. Chem. Ecol.*, **9**, 1099-1106.
- Garcia-Agustin, P. & Primo-Millo, E. (1989). Ultrastructural and biochemical changes in cotyledon reserve tissues during germination of citrus seeds. *J. Exp. Bot.*, **40**, 383-390.
- Garcia-Agustin, P. & Primo-Millo, E. (1990). Changes in some nitrogenous components during the germination of citrus seeds. *Scient. Horticult.*, **43**, 69-81.
- Harvey, B.M.R. & Oaks, A. (1974). The hydrolysis of endosperm protein in *Zea mays*. *Plant Physiol.*, **53**, 453-457.
- Jarret, H.W.; Coosky, K.D.; Ellis, B. & Anderson, J.M. (1986). The separation of *o*-phthalaldehyde derivatives of amino acids by reversed-phase chromatography on octylsilica column. *Anal. Biochem.*, **153**, 189-198.
- King, J.E. & Gifford, D.J. (1997). Amino acid utilization in seeds of loblolly pine during germination and early seedling growth. I. aarginine and arginase activity. *Plant Physiol.*, **113**, 1125-1135.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural protein during the assembly of head of bacteriophage T₄. *Nature*, **227**, 680-684.
- Ludwig, E.; Raczek, N.N. & Kurrock, T. (1995). Contribution to composition and reactivity of coffee protein. Proceedings of the XVI International Scientific Colloquium on Coffee, Kyoto, Japan, pp 359-365.
- Luthe, D.S. (1992). Electrophoretic analysis of seed proteins in the *Dicotyledoneae*. *Plant Mol. Biol. Rep.*, **10**, 254-262.
- Mazzafera, P. (1990). Estudo sobre o papel da cafeína em plântulas de café (*Coffea arabica* L.). *Rev. bras. Bot.*, **13**, 97-102.
- Mazzafera, P. & Gonçalves, K.V. (1998). Nitrogen compounds in the xylem sap of coffee. *Phytochemistry*, **50**, 383-386.
- Mitsubishi, W. & Minamikawa, T. (1989). Synthesis and posttranslational activation of sulfhydryl-endopeptidase in cotyledons of germinating *Vigna mungo* seeds. *Plant Physiol.*, **89**, 274-279.
- Müntz, K. (1998). Deposition of storage proteins. *Plant Mol. Biol.*, **38**, 77-99.
- Osborne, T.B. (1924). The vegetable proteins. Monographs in Biochemistry. London, UK, Longmans, Green and Co.
- Ouguerram, A. (1989). Formation et digestion desparois cellulaires de réserves à mannanes du café (*Coffea arabica* L.). *Ann. Scien. Natur. - Botanique.*, **10**, 111-133.
- Payne, P.I. (1986). Endosperm proteins. In: *A Genetic Approach to Plant Biochemistry*. eds A.D. Blonstein, P.J. King. Springer-Verlag, New York, USA, pp 205-231.
- Rogers, J.C.; Dean, D. & Heck, G.R. (1985). Aleurain: a barley thiol protease closely related to mammalian cathepsin H. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **82**, 6512-6516.
- Shutov, A.D. & Vaintraub, I.A. (1987). Degradation of storage proteins in germinating seeds. *Phytochemistry*, **26**, 1557-1566.

- Srivastava, N.; Prakash, D. & Behl, H.M. (1997). Biochemical contents, their variation and changes in free amino acids during seed germination in *Terminalia arjuna*. *Int. J. Food Sci. Nutr.*, **48**, 215-219.
- Suzuki, T. & waller, G.R. (1986). Total nitrogen and purine allaooids in the tea plant throughout the year. *J. Sci. Food Agric.*, **37**, 862-866.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE