

# OS RECURSOS GENÉTICOS E O CAFEIRO NATURALMENTE DESCAFEINADO\*

Maria B. SILVAROLLA<sup>1</sup> E-mail: bernadet@iac.sp.gov.br ; Paulo MAZZAFERA<sup>2</sup> e Luiz Carlos FAZUOLI<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centro de Café 'Alcides Carvalho' do Instituto Agrônomo de Campinas, Campinas, SP , <sup>2</sup> Departamento de Fisiologia Vegetal da Unicamp, Campinas, SP.

\* Trabalho realizado com o apoio do Consórcio Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento do Café.

## Resumo:

Visando fornecer subsídios para a utilização de germoplasma silvestre de *Coffea arabica* no melhoramento genético, realizou-se sua caracterização quanto ao teor de cafeína nas sementes, num programa de pré-melhoramento. O banco de germoplasma de café do IAC é bastante representativo, especialmente em acessos de cafeeiros arábicas originários da Etiópia, centro de origem e diversidade do cafeeiro, onde se espera a máxima diversidade genética para a espécie. O interesse em avaliar de maneira sistemática estes materiais resulta do fato de que, a identificação de genótipos com teores de cafeína significativamente baixos facilitaria os trabalhos de melhoramento visando a obtenção de cafeeiros com teores de cafeína naturalmente baixos nas sementes, uma vez que as hibridações ficariam restritas a uma mesma espécie. Considerando-se que o Brasil é o maior produtor mundial de café, os trabalhos de melhoramento genético assumem especial significado, uma vez que proporcionam a agregação de valor ao produto diretamente no campo, refletindo-se em toda a cadeia produtiva. Em linhas gerais, o trabalho envolveu as seguintes fases: coleta individual de uma amostra de frutos de cada planta seguida de seu preparo e extração da cafeína em solução metanólica e posterior dosagem em HPLC. A grande maioria das plantas analisadas apresentou variabilidade para a característica tanto entre como dentro das progênies, porém, de magnitude relativamente baixa. Entretanto, foram identificadas 3 plantas de uma mesma progênie com teores de cafeína da ordem de 0,07%, denominadas AC em homenagem ao Pesquisador Alcides Carvalho, o que as recomenda como base para o desenvolvimento, via melhoramento convencional, de uma nova cultivar com esta característica. Além disso, a descoberta das plantas AC revela o grande potencial de aplicação prática dos recursos genéticos mantidos em Bancos de Germoplasma, reforçando a necessidade de sua preservação e caracterização.

Palavras-chave: cafeína, café, recursos genéticos, *Coffea arabica*, Etiópia.

## THE GENETIC RESOURCES AND THE NATURALLY DECAFFEINATED COFFEE.

### Abstract:

Aiming to provide support for the use of wild germplasm of *Coffea arabica* in coffee breeding programs, the content of caffeine was determined in seeds from plants in a pre-breeding program. The coffee germplasm bank of IAC has several Arabica accessions from Ethiopia, the center of origin and diversity of coffee, from where it is expected wide genetic diversity for this species. The interest to evaluate in a systematic way these coffee accessions results from the fact that the identification of genotypes containing low caffeine would facilitate a breeding program for low caffeine since the hybridizations would be restricted to the same species. Brazil is the biggest coffee producer in the world and genetic breeding research has special importance as it provides aggregation of value to the product coming from the field, influencing the whole productive chain. In summary, this work involves the collection of seeds from each individual in the field, extraction of caffeine in a methanolic solution and then the alkaloid determination by liquid chromatography (HPLC). The analyses showed variability for caffeine among plants of the same progeny as well as among progenies, however, in a low range of variation. Three plants were identified as having approximately 0.07% caffeine in their seeds. They were nominated AC's in homage to the coffee breeder Alcides Carvalho, and they will be used in a conventional breeding program to select productive cultivars containing low caffeine in the seeds. Additionally, the finding of the AC plants reveals the great practical potential for the use of genetic resource from Germplasm banks, supporting the need of preservation and characterization.

Key words: caffeine, coffee, genetic resources, *Coffea arabica*, Ethiopia.

### Introdução

O café arábica (*Coffea arabica*) é a espécie mais cultivada e consumida no mundo em função de sua qualidade de bebida. A popularidade do café como bebida deve-se, em grande parte, ao efeito estimulante decorrente da ação da cafeína. Entretanto, parte de seus consumidores podem apresentar maior sensibilidade orgânica à cafeína, resultando em algum desconforto. Além disso, o café e a cafeína (James, 1991), em particular, foram durante muito tempo responsabilizados por várias doenças no ser humano, fato que gradualmente vem sendo revertido a luz de inúmeras pesquisas, sendo que atualmente as mesmas já destacam os vários efeitos positivos do café para a saúde (Encarnação & Lima, 2003). Para atender o consumidor que apresenta problemas com a cafeína desenvolveu-se o café industrialmente descafeinado, que no entanto perde também alguns atributos de aroma. Vários métodos biotecnológicos também têm sido utilizados para

produção de um cafeeiro livre de cafeína, culminando com a produção de uma planta transgênica de *Coffea canephora* com redução de 50-70% de cafeína nas folhas (Ogita et al., 2003).

Visando não somente atender a demanda por um café com teores de cafeína naturalmente baixos mas também disponibilizar ao cafeicultor uma opção de plantio cujo valor agregado viesse do campo, o Instituto Agronômico de Campinas - IAC - iniciou uma linha de pesquisa objetivando desenvolver um cafeeiro cuja constituição genética condicionasse o reduzido teor de cafeína nas sementes. Entre as diversas estratégias de trabalho possíveis, optou-se por lançar mão de um Banco de Germoplasma bastante representativo em acessos de *C. arabica*, originários da Etiópia, buscando de forma sistemática entre esse germoplasma materiais com reduzido teor de cafeína nas sementes. A FAO (Food and Agriculture Organization of the United States), nos anos de 1964-65, coletou na Etiópia sementes destinadas a formar coleções de campo em diversos países, entre eles a Costa Rica (FAO 1968). O resgate desse germoplasma por aquela organização foi determinado em função da acelerada destruição do habitat natural do cafeeiro arábica, levando a perdas genéticas bastante significativas uma vez que a Etiópia é o centro de origem e diversidade genética da espécie. Posteriormente, o Brasil recebeu sementes das plantas da coleção da Costa Rica originando uma coleção de campo instalada no IAC, onde foi feita a caracterização quanto ao teor de cafeína nas sementes, objeto deste trabalho.

## Material e Métodos

Foram dosados os teores de cafeína nas sementes de cerca de 3000 cafeeiros representando 300 acessos de *C. arabica*, originários da Etiópia, plantados em campos do Centro Experimental de Campinas do IAC. Coletaram-se de cada planta amostras de 30-50 frutos, em estágio de cereja, que após secagem em estufa foram descascados e as sementes ressecadas e submetidas a extração metanólica da cafeína (100 mg/ 5 ml MetOH 80%, 80°C/30 min), seguindo-se de sua dosagem em HPLC. A separação entre cafeína e teobromina foi feita por HPLC usando-se uma coluna C18, eluindo-se a fase móvel em gradiente durante 20 min com 10-80% de metanol em acetato de sódio a 0.5%, pH5. As leituras foram feitas a 280 nm.

Para a cromatografia de camada delgada, os extratos foram corridos juntamente com os padrões em placas de sílica GF254 com clorofórmio:metanol na proporção de 9:1, v/v e as marcas observadas sob luz ultravioleta.

Para testar a deficiência da enzima cafeína sintase infiltrou-se folhas de AC1 e do padrão Mundo Novo sob condições de vácuo com cafeína C14 ou adenina C14 de forma a monitorar sua degradação ou sua conversão em cafeína, respectivamente, nestas plantas. A radioatividade incorporada aos metabólitos foi analisada depois de 4, 21 e 48 horas de incubação utilizando-se do HPLC acoplado ao sistema de detecção de ultravioleta e radioatividade.

## Resultados e Discussão

A grande maioria das plantas analisadas apresentou o teor normal de cafeína para a espécie arábica, ou seja, em torno de 1,2% (Silvarolla et al., 2000). Entretanto, foram identificadas 3 plantas, de uma mesma progênie, cujos teores de cafeína foram da ordem de 0,07%. Essas plantas foram denominadas AC em homenagem ao Pesquisador Alcides Carvalho. Verificou-se que as plantas AC acumularam cerca de  $6.1 \text{ mg g}^{-1}$ , em base seca, de teobromina (fig. 1 a), que é o precursor imediato da cafeína (Ashihara & Suzuki, 2004), indicando que estas plantas podem ser deficientes na enzima cafeína sintase, que atua na passagem da teobromina para cafeína. A cafeína exógena marcada radioativamente foi degradada tanto nas plantas AC como no padrão Mundo Novo (fig. 1b). Encontraram-se traços de radioatividade na teofilina, o primeiro produto da degradação da cafeína, em ambos os casos (dados não apresentados). A teobromina pode ocorrer também como um produto da degradação da cafeína e embora houvesse sido detectada alguma radioatividade na teobromina depois do tratamento, a mesma foi reduzida em ambos os casos (fig. 1b). Estes resultados indicaram ser improvável que o conteúdo naturalmente baixo de cafeína na planta AC1, em relação ao Mundo Novo, ocorresse em decorrência da uma elevada taxa de degradação da cafeína. Quando foi fornecida adenina marcada verificou-se que as folhas da planta AC1 acumularam radioatividade na teobromina, sem que nenhuma radioatividade fosse incorporada a cafeína (fig. 1c). Em contraste, a quantidade de teobromina marcada em folhas de Mundo Novo diminuiu a medida que a marcação incorporava-se a cafeína (fig. 1c). Considerando-se que não se detectou atividade da cafeína sintase em folhas da planta AC1 (Mazzafera et al., 1994) concluiu-se que é provável que tenha ocorrido uma mutação no gene da cafeína sintase nas plantas AC ou que alguma alteração tenha ocorrido em promotor ligado a este gene. Acredita-se que a utilização de técnicas de melhoramento convencional permitirá a transferência dessa característica para cultivares altamente produtivas de *C. arabica*, uma vez que as hibridações ficarão restritas a esta espécie. Estes resultados atestam o valor das contribuições para o melhoramento de plantas advindas de coleções de germoplasma convenientemente mantidas e caracterizadas.

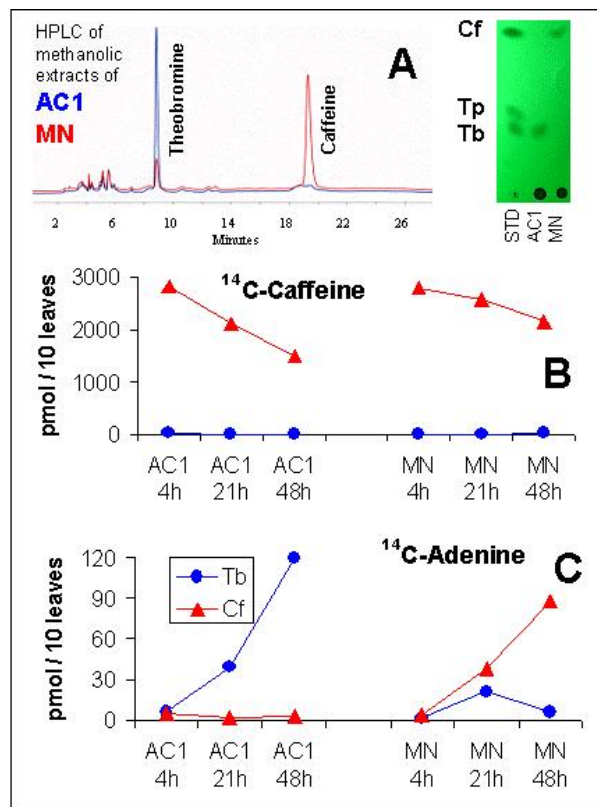


Figura 1 – Produção de cafeína por plantas AC1 (azul) e Mundo Novo (vermelho) de *C. arabica*. **a** – perfis por HPLC (esquerda) e cromatografia de camada delgada de extratos metanólicos de folhas de AC1 e da cultivar MN. Cf, cafeína, tp, teofilina; tb, teobromina e STDs, padrões. **b**, **c**, metabolismo de cafeína C14 exógena (**b**) ou adenina C14 (**c**) em folhas de AC1 e MN para teobromina (círculos) e cafeína (triângulos) (Fonte: Silvarolla, et al., 2004).

### Agradecimentos

Os autores agradecem o auxílio das Técnicas de Laboratório Dulcinéia Pereira de Souza e Rafaela Diniz Munhoz nas análises de cafeína.

### Referências bibliográficas

- Ashihara, H & Suzuki, T. (2004) . Distribution and biosynthesis of caffeine in plants. *Frontiers in Bioscience*, 9:1864-1876.
- Encarnação, R.O. & Lima, D.R. (2003) *O café e a saúde humana*. Brasília: Embrapa Café, 64p. (Documento 1).
- FAO Report: *Coffee mission to Ethiopia 1964-65* (1968) Rome: Food and Agriculture Organization, 200p.
- James, J.E. (1991) *Caffeine and Health*. San Diego: Academic. 428 p.
- 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: 1423-1427.
- Silvarolla, M.B.; Mazzafera, P. & Lima, M.M.A. (2000) Caffeine content of Ethiopian *Coffea arabica* beans. *Genetics and Molecular Biology*. 23:213-215.
- Silvarolla, M.B.; Mazzafera, P. & Fazuoli, L.C. (2004) A naturally decaffeinated arabica coffee. *Nature*, 429:826.
- Ogita, S.; Uefuji, H.; Yamaguchi, Y.; Koizumi, N. & Sano, H. (2003) Producing decaffeinated coffee plants. *Nature*, 423:823.