

**CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO DO ACETATO-<sup>14</sup>C COMO  
PRECURSOR DE AMINOÁCIDOS EM FOLHAS DESTACADAS  
DE CAFÉ (*Coffea arabica* L CULTIVAR MUNDO NOVO)**

*Oswaldo Galvão Brasil*

ENGENHEIRO AGRÔNOMO

Disciplina de Bioquímica do Departamento de Ciências  
Fisiológicas da Faculdade de Ciências Médicas  
e Biológicas de Botucatu

PROF. DR. OTTO J. CROCOMO

— Orientador —

Dissertação apresentada à Escola Superior  
de Agricultura «Luiz de Queiroz» da Uni-  
versidade de São Paulo, para obtenção do  
título de Mestre

PIRACICABA

Estado de São Paulo - Brasil

1975

ã

MARIA APARECIDA

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. OTTO J. CROCOMO, pela orientação, assistência e amizade.

Aos Docentes da Disciplina de Bioquímica da Faculdade de Ciências Médicas e Biológicas de Botucatu, pelo espírito de cooperação e amizade.

Aos funcionários da Disciplina de Bioquímica da Faculdade de Ciências Médicas e Biológicas de Botucatu, pelo auxílio nos laboratórios.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo auxílio financeiro.

Ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA) na pessoa do seu Diretor Professor Dr. ADMAR CERVELINI, pelas facilidades obtidas, nos laboratórios de Bioquímica de Plantas.

À Faculdade de Ciências Médicas e Biológicas de Botucatu (F.C.M.B.B.).

. IV .

C O N T E Ū D O

1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	10
3.1 - Material .....	10
3.2 - Métodos .....	10
3.2.1 - Preparo da resina Dowex 50 x 8 H <sup>+</sup> 100-200 mesh	10
3.2.2 - Preparo da resina Dowex 1 x 8 Cl <sup>-</sup> 100-200 mesh	11
3.2.3 - Instalação do experimento .....	11
3.2.4 - Colheita do material .....	12
3.2.5 - Análise do material .....	12
3.2.5.1 - Determinação do CO <sub>2</sub> radioativo .....	12
3.2.5.2.- Fracionamento da fração solúvel em etanol 80% .....	13
3.2.5.2.1 - Açúcares .....	14
3.2.5.2.2 - Ácidos orgânicos totais .....	14
3.2.5.2.3 - Aminoácidos .....	14
3.2.5.3 - Fracionamento da fra ção insolúvel em etanol 80% .....	16
3.2.5.3.1 - Lipídeos .....	16
3.2.5.3.1 - Proteínas .....	16
3.2.5.3.3. - Resíduo final .....	17

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	19
4.1 - Distribuição do $^{14}\text{C}$ nas diversas frações obtidas .....	19
4.2 - Lipídeos .....	19
4.3 - Açúcares .....	20
4.4 - Ácidos orgânicos .....	20
4.5 - Aminoácidos .....	22
4.6 - Proteínas .....	26
4.7 - Resíduo seco final .....	28
5. CONCLUSÕES .....	29
6. RESUMO .....	30
7. SUMMARY .....	32
8. BIBLIOGRAFIA CITADA .....	34
9. APÊNDICE .....	41

LISTA DE ABREVIATURAS

AMP	- monofosfato de adenosina
ADP	- difosfato de adenosina
ATP	- trifosfato de adenosina
CoA	- CoEnzima A
Ci	- Curie
dpm	- desintegração por minuto
Pi	- fosforo inorganico
NADH <sub>2</sub>	- dinucleotídeo de nicotinamide e adenina reduzida
PPO	- 2,5 diphenyloxazole
POPOP	- 1,4-bis-2(5-phenyloxazolyl)-benzeno

## 1. INTRODUÇÃO

As plantas do ponto de vista nutritivo, podem ser consideradas como fonte primária de nitrogênio para os animais, isto é, todo nitrogênio encontrado no organismo animal tem direta ou indiretamente origem vegetal. As plantas retiram o nitrogênio do solo, geralmente na forma de nitrato, e o converte às formas biologicamente úteis, como amina e amida, por um processo denominado redução assimilatória. O nitrogênio assimilado é na sua maior parte incorporado sob a forma de aminoácidos e proteínas.

Os aminoácidos apresentam dentro do metabolismo celular aspectos dos mais interessantes: são os monômeros da estrutura proteica, participam das vias do metabolismo intermediário de açúcares e ácidos orgânicos, podendo por essas vias contribuir para o metabolismo de lipídeos, chegando até, a produzir energia para a célula quando seu esqueleto carbônico passa a fazer parte do Ciclo de Krebs.

Embora o metabolismo de compostos nitrogenados já tenha recebido extensivas investigações, poucos trabalhos têm sido feitos para comparar as trocas ocorridas nos "pools" de aminoácidos livres e proteicos em folhas.

Para se estudar o comportamento dos aminoácidos em folhas, o acetato se destaca como um composto de grande utilidade, pois o acetil-CoA resultante da ativação do acetato tem um papel metabólico fundamental e seu comportamento bioquímico pode ser estudado facilmente pela técnica de radioisótopos traçadores. O acetil-CoA se

oxidada, por exemplo, no Ciclo de Krebs liberando  $\text{CO}_2$  e  $\text{H}_2\text{O}$  e proporcionando formação de ATP. A unidade acetil pode converter-se rapidamente em açúcares, ou servir como precursor direto na biossíntese de ácidos graxos e esteroides. Os carbonos do acetato do acetil-CoA podem também penetrar nas moléculas de proteínas e ácidos nucleicos.

O uso do acetato marcado nos carbonos 1 e 2 permite uma melhor compreensão de como a molécula de acetato contribui para a formação do esqueleto carbônico de aminoácidos, principal objetivo deste trabalho, onde se procura verificar alguns aspectos do metabolismo de acetato em folhas novas de café (*Coffea arabica* L cv. "Mundo Novo"), planta de interesse econômico e sobre a qual poucos conhecimentos se têm dos processos metabólicos foliares.



## 2. REVISÃO DE LITERATURA

O objetivo desse estudo foi investigar a incorporação do acetato- $^{14}\text{C}$  em aminoácidos. A incorporação da radioatividade dependerá da presença de um sistema enzimático e da quantidade do metabólito. A enzima relativa à fixação primária do acetato é uma enzima de ativação, a acetiltioquinase, que ativa ácido acético a acetil-CoA na presença de CoA, ATP e  $\text{Mg}^{+2}$  e é largamente encontrada em plantas superiores (MILLER & BONNER, 1954 e REBEIZ *et alii*, 1965).

O Ciclo dos Ácidos Tricarboxílicos é aceito como a principal via de oxidação do acetato. Entretanto, estudando interações gênicas a nível bioquímico em *Neurospora crassa* STRAUSS (1955), definiu dois caminhos para oxidação do acetato nesse microrganismo, um normal via ciclo de Krebs e outro que opera em circunstâncias especiais, através de um ciclo de ácidos dicarboxílicos onde o carbono metílico se incorpora em piruvato e acetilmetilcarbimol.

Trigo, ao qual McCONNELL & RAMACHANDRAN (1956) injetaram acetato marcado no caule, apresentou alta atividade nos grãos os quais mostraram incorporação do traçador em proteínas e amido. O carbono metílico do acetato incorporou-se com mais eficiência do que o carbono carboxílico proporcionando uma maior distribuição de  $^{14}\text{C}$  entre os componentes.

McCONNEL & MAZUREK (1956) mostraram que o Ciclo de Krebs está relacionado com síntese de proteína em

glutem de trigo quando a este ministraram acetato marcado. O glutem marcado com acetato- $^{14}\text{C}$  apresentou 16 aminoácidos marcados (*BILINSKI & McCONNELL, 1957a*). Os aminoácidos mais ativos encontrados foram ácido glutâmico, prolina e arginina, seguidos pelos aminoácidos de quatro carbonos: ácido aspártico e treonina, enquanto os aminoácidos de cadeia curta como glicina, alanina, serina e metionina apresentaram média atividade. Os mesmos autores (*BILINSKI & McCONNELL, 1957b*) estudando a contribuição do acetato- $^{14}\text{C}$  para a formação do esqueleto carbônico do ácido glutâmico, ácido aspártico e treonina em trigo, mostraram que a biossíntese de aminoácidos dicarboxílicos é feita via Ciclo de Krebs e que o esqueleto carbônico da treonina parece ter se originado do ácido aspártico.

*BONNE (1957)* estudou o metabolismo de acetato- $^{14}\text{C}$  em mitocôndrios isolados de vegetais e microrganismos. A primeira reação em que se envolveu o acetato é a da sua ativação dando acetil-CoA, marcando todos os componentes do ciclo de Krebs.

Pontas de raízes de milho metabolizam acetato- $^{14}\text{C}$  marcando primeiramente ácidos orgânicos e posteriormente aminoácidos segundo os trabalhos de *Mac LENNAN et alii (1963)* e *HARLEY & BEEVERS (1963)*. No mesmo trabalho, os autores notaram que ao se esgotar a fonte de marcação há uma reversão onde os aminoácidos produzem ácidos orgânicos e também que, aminoácidos ácidos são precursores dos básicos e neutros, numa conversão irreversível.

*COSSINS & SINHA (1964)* trabalhando com "seedlings" de *Helianthus annuus*, compararam o metabolismo de glioxilato- $^{14}\text{C}$  e acetato- $^{14}\text{C}$ . Relataram que o acetato se

transforma em ácidos do ciclo do glioxilato e em açúcares; entretanto, o glioxilato parece estar envolvido em sua maior extensão na biossíntese de aminoácidos do que na síntese de açúcares. Essas diferenças indicam um certo relacionamento com a localização intracelular de enzimas do metabolismo do glioxilato e do acetato. O  $^{14}\text{C}$  do acetato apareceu em glutamina,  $\text{CO}_2$ , açúcares, malato, glicolato, e citrato. O  $^{14}\text{C}$  do glioxilato marcou  $\text{CO}_2$ , glicina, glicolato, serina, resíduos insolúveis e em menores quantidades açúcares, malato, citrato e succinato.

Administrando acetato-2- $^{14}\text{C}$  em escutelo de milho, *OAKS & BEEVERS (1964)* detectaram incorporação de 32% do  $^{14}\text{C}$  em açúcares solúveis e carboidratos.

O metabolismo do acetato foi estudado por *SURVANARAYANAN & McCONNELL (1964)* em trigo atacado por fungos. Os resultados indicaram um aumento da produção de  $^{14}\text{CO}_2$  quando o traçador foi o acetato-1- $^{14}\text{C}$  e uma marcação consideravelmente maior de outros compostos quando o traçador foi o acetato-2- $^{14}\text{C}$ . Dentre os aminoácidos, o ácido glutâmico reteve 40% da atividade dessa fração. A marcação interna do ácido glutâmico evidenciou o funcionamento dos ciclos de Krebs e do glioxilato.

Estudando o metabolismo de acetato-2- $^{14}\text{C}$ , em pontas de raízes de milho, *OAKS (1963, 1965a, 1965b)* relatou o aparecimento de radioatividade nos aminoácidos treonina, valina, leucina, lisina, arginina e prolina.

*WANG & BURRIS (1965)* relataram que os modelos de marcação em folhas de trigo pelos aminoácidos glicina-2- $^{14}\text{C}$ , serina-1- $^{14}\text{C}$  e serina-3- $^{14}\text{C}$  são similares tanto na

presença como na ausência de luminosidade. Observaram que a transformação de glicina em serina é rápida, porém irreversível, e que há uma transferência de serina-2- $^{14}\text{C}$  em serina-1- $^{14}\text{C}$  indicando uma entrada de glicina-2- $^{14}\text{C}$  no ciclo de glioxilato; além disso, açúcares e ácidos orgânicos são marcados a partir de glicina-2- $^{14}\text{C}$ .

*THOMPSON et alii (1966)* estudaram o efeito do teor de água sobre a composição de aminoácidos em folhas destacadas. Considerável proteólise aumentou o nível de aminoácidos na fração não proteica. Entretanto, serina, gama-aminobutírico e metil-cisteína-sulfóxido foram os únicos aminoácidos que se acumularam prolina após acúmulo inicial sofreu um decréscimo nos seus teores.

Estudando a translocação de aminoácidos em raízes, com o auxílio de acetato-2- $^{14}\text{C}$ , *OAKS (1966)* encontrou na fração solúvel em álcool 80%, ácido glutâmico, ácido aspártico e glutamina como os aminoácidos mais ativos. A metade do  $^{14}\text{C}$  da fração insolúvel foi encontrada em ácido glutâmico e ácido aspártico, seguido por serina, glicina, prolina, ácido gama-aminobutírico e leucina. A distribuição do  $^{14}\text{C}$  na raiz não foi equivalente à de outras regiões, indicando que os aminoácidos elaborados em certas regiões não são igualmente acessíveis ao sistema de transporte. A mesma autora (*OAKS, 1967*) relatou uma inibição da síntese do aminoácido asparagina na presença de glicose.

O acetato-1- $^{14}\text{C}$  foi metabolizado por plantas de trigo, aparecendo como primeiro aminoácido marcado o ácido glutâmico, segundo *McCONNELL & MAZUREK (1967)*.

Um estudo dos processos respiratórios usando

acetato- $^{14}\text{C}$  e glucose- $^{14}\text{C}$  foi realizado por *EFFER & RANSON* (1967). Ficou evidenciado que a sequência de pentose-fosfato, glicólise e Ciclo de Krebs são processos ativos da respiração e que acetato- $^{14}\text{C}$  pode oxidar-se via Ciclo de Krebs em condições anaeróbicas; a reoxidação das coenzimas se dá, então, em reações de aminação produzindo aminoácidos a partir de compostos não nitrogenados.

Com o objetivo de analisar o metabolismo do etanol em sementes de ervilha, *CAMERON & COSSING* (1967) utilizaram três compostos marcados: álcool etílico- $^{14}\text{C}$ , acetaldéido- $^{14}\text{C}$  e acetato- $^{14}\text{C}$ . Os dados obtidos foram semelhantes para os três radioisótopos, que após rápida incorporação nos ácidos do Ciclo de Krebs, vão se acumulando nos aminoácidos. Entretanto, relativamente pouco  $^{14}\text{C}$  se fixou em  $^{14}\text{CO}_2$ , o que indicou uma lenta velocidade de caminamento do  $^{14}\text{C}$  no Ciclo de Krebs, acompanhada de rápida remoção para o glutamato.

*STER & O'BRIEN* (1968) hidrolizando proteínas de *Clostridium kluyvieri* crescido em meio de cultura contendo acetato- $^{14}\text{C}$ , mostraram que a distribuição do  $^{14}\text{C}$  nos átomos do ácido glutâmico acentuou a estereoespecificidade da enzima sintetase do citrato.

Trabalhando com folhas destacadas de milho, girassol, feijão e tomate *STEWART et alii* (1966) concluíram que prolina pode ser uma boa reserva de  $\text{N}_2$  pela sua proximidade metabólica e fácil converção a ácido glutâmico, um composto chave no metabolismo de nitrogênio. Além disso, na conversão de prolina para ácido glutâmico são produzidos dois equivalentes de  $\text{NADH} + \text{H}^+$ , tornando a prolina também uma fonte de energia e poder redutor.

*McCONNELL (1969)* empregando compostos marcados com  $^{14}\text{C}$  em trigo demonstrou que ácido glutâmico e glutamina são extensivamente interconvertidos, o mesmo ocorrendo com prolina e ácido glutâmico. Nos ensaios com prolina- $^{14}\text{C}$  o ácido glutâmico proteico apresentava atividade específica maior que a própria prolina. Em contraposição, arginina-5- $^{14}\text{C}$  não originou ácido glutâmico altamente radioativo.

Cultura de tecidos de "Paul's scarlet rose", em cujo meio de crescimento *FLETCHER & BEEVERS (1970)* adicionaram acetato-1- $^{14}\text{C}$ , mostrou que lipídeos,  $\text{CO}_2$ , ácido aspártico, outros aminoácidos e proteínas tornaram-se radioativos. Após o pulso radioativo, glutamato foi o composto de maior atividade até que se esgotasse o acetato-1- $^{14}\text{C}$  do meio. Outro fato observado foi que somente "pools" precursores de proteínas haviam sido marcados, uma vez que nessas se encontrou o complemento do decréscimo da atividade dos aminoácidos.

*HIGGINS & JOHNSON (1970)* ministrando acetato-1- $^{14}\text{C}$  em microrganismos observaram que o reverso da reação de cisão do piruvato pode ocorrer formando piruvato marcado a partir do acetato-1- $^{14}\text{C}$ .

*TARANT & COLMAN (1972)* estudaram a assimilação do acetato- $^{14}\text{C}$  em alga azul *Anabaena flos-aquae* na presença e ausência de luminosidade. A assimilação do  $^{14}\text{C}$  em componentes celulares na ausência de luz comparável à distribuição encontrada durante a fotoassimilação na qual a maior porção acha-se em lipídeos e aminoácidos tais como, ácidos glutâmico, prolina e leucina. Somente 2 a 7% do acetato-1- $^{14}\text{C}$  assimilado é oxidado a  $^{14}\text{CO}_2$  na ausência de

luz e 4 a 5 vezes mais  $^{14}\text{CO}_2$  é oxidado do acetato-1- $^{14}\text{C}$  do que do acetato-2- $^{14}\text{C}$ .

Estudando o metabolismo de acetato-1- $^{14}\text{C}$  e acetato-2- $^{14}\text{C}$  durante a germinação de sementes de café, *BRASIL & CROCOMO (1974)* mostraram que a molécula de acetato- $^{14}\text{C}$  marca lipídeos, ácidos orgânicos, aminoácidos, proteínas e carboidratos. O acetato-2- $^{14}\text{C}$  foi mais eficiente na marcação dos compostos orgânicos do que o acetato-1- $^{14}\text{C}$ . A distribuição da radioatividade dos açúcares mostrou alta atividade no ciclo do glioxilato.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 - Material

O trabalho foi realizado em folhas novas de café (*Coffea arabica* cv. "Mundo Novo") provenientes da germinação de sementes obtidas no Departamento de Agricultura e Horticultura da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, São Paulo.

#### 3.2 - Metodos

##### 3.2.1 - Preparo da resina Dowex 50 x 8 H<sup>+</sup> 100-200 mesh

O processo de preparação das resinas baseou-se nos trabalhos de *HIRS et alii (1954)* e *PLAISTED (1958)*. Esta resina que possui capacidade de 1,2 meq/ml de resina úmida, foi previamente ativada. O processo de preparação e ativação da resina consistiu em se retirar primeiramente as partículas mais finas por decantação. A resina foi transferida para funil de Buchner passando-se cloreto de sódio a 10% até pH neutro. Em seguida lavou-se a resina com água desionizada até reação negativa com nitrato de prata (teste para cloretos). Adicionou-se ácido clorídrico 2 N até reação ácida, seguindo-se outra lavagem com água desionizada até neutralidade. Essas operações foram repetidas três vezes. Finalmente removeu-se a resina para frascos de polietileno em etanol 80%, acondicionando-se em câmara fria para uso posterior.



### 3.2.2 - Preparo da resina Dowex 1 x 8 Cl<sup>-</sup> 100-200 mesh

O processo de preparo das resinas baseou-se nos trabalhos de *HIRS et alii (1954)* e *PLAISTED (1958)*. Esta resina com capacidade de 1,3 meq/ml de resina úmida foi previamente ativada. O processo de preparação e ativação da resina consistiu também em se retirar as partículas mais finas por decantação, transferindo-se posteriormente para funil de Buchner. Lavou-se com solução de formiato de sódio 1,5 N até reação negativa com nitrato de prata (teste para cloretos). Em seguida, lavou-se 40 ml de cloreto de sódio a 10%, e, novamente com formiato de sódio até reação negativa com nitrato de prata. Essas operações foram repetidas três vezes. Finalmente, lavou-se a resina com água desionizada até pH neutro, acondicionando-a em câmara fria para uso posterior.

### 3.2.3 - Instalação do experimento

As sementes de café (*Coffea arabica* cv. "Mundo Novo") foram despulpadas, secas ao sol, lavadas por 10 minutos com solução de hipoclorito de sódio a 10%, arejadas durante uma noite e semeadas em areia esterilizada. As sementes germinaram a 28°C em estufa. Após o aparecimento das folhas cotiledonares, os "seedlings" foram transferidos para casa de vegetação, onde permaneceram até apresentarem 4 pares de folhas. As folhas foram picadas e separadas em 16 lotes de 1,5 g cada um. Cada lote foi colocado em frascos de Katz de 50 ml, juntamente com 10 ml de água destilada permanecendo em ausência de luminosidade por 15 minutos. Foram então adicionados 10 uCi de

acetato-1- $^{14}\text{C}$  em cada um dos oito primeiros frascos e 10 uCi de acetato-2- $^{14}\text{C}$  em cada um dos oito restantes. Os 16 frascos permaneceram em banho metabólico a  $28^{\circ}\text{C}$  em ausência de luz.

### 3.2.4 - Colheita do material

As incubações dos acetato-1- $\text{C}^{14}$  e acetato-2- $\text{C}^{14}$  foram interrompidas nos tempos de 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150 e 180 minutos. As interrupções foram feitas injetando-se HCl 2N em cada frasco nos tempos indicados. A incubação foi continuada por mais 30 minutos a fim de se coletar o  $\text{CO}_2$ , conforme descrito em 3.2.5.1.

### 3.2.5 - Análise do material

O material colhido foi triturado e homogeneisado com etanol 80% em ebulição (10 ml/g pêsso verde) no homogeneizador "Omni-mixer" da Sorvall (16 000 rpm) durante 1 minuto (*CROCOMO et alii, 1970*). Uma centrifugação a 12 500 G desse homogeneizado deu uma fração sobrenadante solúvel e uma fração precipitada insolúvel em etanol 80%.

#### 3.2.5.1 - Determinação do $\text{CO}_2$ radioativo

Durante a incubação nos frascos de Katz, manteve-se dentro de cada frasco um disco de fibra de vidro embebido em solução de hiamina, que absorveu o  $\text{CO}_2$  liberado durante a incubação. Posteriormente colocou-se a hiami-na em solução cintiladora (4 g POP, 10 g POPOP e tolueno

até 1000 ml - NUCLEAR CHICAGO INSTRUCTIONS, sem data), e detectou-se a radioatividade em Cintilador Líquido da Nuclear Chicago Série 720.

### 3.2.5.2 - Fracionamento da fração solúvel em etanol 80%

A fração solúvel foi tratada com igual volume de éter etílico para a extração de pigmentos e lipídeos. Após a lavagem com éter passou-se a fração solúvel por uma coluna de resina Dowex 50 x 8 H<sup>+</sup> com 5 cm de altura em coluna de vidro de 30 x 1 cm, de acordo com *CROCOMO & ROSSI (1957)*. Essa coluna de resina separou primeiramente, com uma eluição de 40 ml de água desionizada, açúcares totais + ácidos orgânicos totais. Numa segunda eluição com 40 ml de hidróxido de amônio 2N, obteve-se aminoácidos da fração solúvel. A primeira fração eluída, constituída de açúcares totais + ácidos orgânicos totais, foi novamente passada por coluna de resina Dowex 1 x 8 Cl<sup>-</sup> com as mesmas dimensões. Uma primeira eluição com 40 ml de água separou a fração açúcares totais e a segunda eluição com ácido fórmico 6 N separou ácidos orgânicos totais, segundo *GUTIERRES (1968)*. As frações açúcares e ácidos orgânicos totais foram evaporados até *secura total* (a 40°C e sob corrente de ar) e retomados em 0,5 ml de água. A fração aminoácidos foi evaporada até *resíduo seco* (a 40°C e sob corrente de ar) e retomada em 0,5 ml de álcool isopropílico a 10% como descrito em *CROCOMO & SILVA (1968)*.

### 3.2.5.2.1 - Açúcares

A determinação quantitativa de açúcares totais foi feita segundo adaptação do método descrito por *DUBOIS e cols. (1967)*. Tomou-se 40 microlitros da fração açúcares totais, transferiu-se para tubo de ensaio contendo 1 ml da solução de fenol em água (50 ug/ml) e adicionou-se 5 ml de ácido sulfúrico concentrado. Após homogeneização o conteúdo foi deixado em repouso por 10 minutos, homogeneizado novamente e colocado a 30<sup>0</sup>C por 15 minutos. Após 15 minutos leu-se a densidade ótica a 485 nm em espectrofotômetro Coleman Jr. II. A conversão da densidade ótica em miligramas foi realizada através de uma curva padrão previamente obtida com glicose e xilulose. A determinação da radioatividade foi feita tomando-se 40 µl da fração açúcares totais e colocando se em 10 ml de solução cintiladora de *BRAY (1960)*.

### 3.2.5.2.2. - Ácidos orgânicos totais

A determinação quantitativa dos ácidos orgânicos totais foi feita através da titulação de 40 µl da fração ácidos orgânicos totais com hidróxido de sódio 10<sup>-3</sup> N, usando-se como indicador o vermelho de fenol segundo *ARZOLA & ARISTIZABAL (1967)*. Na determinação da radioatividade de utilizou-se 40 µl da fração ácidos orgânicos totais em 10 ml de solução cintiladora de *BRAY (1960)*.

### 3.2.5.2.3 - Aminoácidos

A identificação e determinação quantitativa dos

aminoácidos foi feita por cromatografia bidimensional em papel de filtro seguida de espectrofotometria como em *BRASIL et alii* (1972). A cromatografia foi realizada em papel de filtro Whatman nº 3 com os solventes fenol-água (75% peso/vol) na primeira dimensão e butanol-ácido acético-água (90:10:29-vol/vol/vol) na segunda dimensão de acordo com *BROWN & FOWDEN* (1966). Os cromatogramas após cada desenvolvimento foram secos em câmara de secagem da Precision Scientific a 50°C. De cada amostra dois cromatogramas foram obtidos sendo um usado para a determinação quantitativa dos aminoácidos e outro para a determinação da radioatividade. Os aminoácidos foram determinados quantitativamente usando-se o revelador "ninhidrina-cádmio". Após a aplicação do revelador, o cromatograma foi colocado em estufa com atmosfera livre de amônia a 50°C durante uma hora. As manchas foram identificadas com auxílio de cromatograma padrão, recortadas e eluídas em tubos de ensaio com 3 ml de metanol absoluto durante 14 horas em ausência de luz. Procedeu-se a leitura da densidade ótica a 500 nm em um espectrofotômetro Coleman Jr. II. A prolina foi lida a 360 nm. As densidades óticas foram transformadas em microgramas com auxílio de curvas padrões construídas para cada aminoácido. Na determinação da radioatividade recortou-se o local correspondente a cada aminoácido no cromatograma não revelado, eluindo-se em 2 ml de água acidulada, por 12 horas. Do eluído tomou-se 1 ml adicionando-se a 10 ml de solução cintiladora de *BRAY* (1960). A detecção da radioatividade foi feita em Cintilador de Amostra Líquidas da Nuclear Chicago, Série - 720.

### 3.2.5.3 - Fracionamento da fração insolúvel em etanol 80%

#### 3.2.5.3.1 - Lipídeos

A fração insolúvel foi tratada com éter etílico para extração dos lipídeos. Após 3 lavagens e subsequente centrifugação os lipídeos extraídos foram recuperados com a evaporação total do éter sob corrente de ar. A determinação quantitativa dos lipídeos foi feita por pesagem. Para a determinação da radioatividade os lipídeos foram dissolvidos em tolueno até completar 1 ml. Tomou-se então 0,5 ml e juntou-se a 10 ml de solução cintiladora (4 g de PPO, 50 mg POPOP e tolueno até completar 100 ml NUCLEAR CHICAGO INSTRUCTIONS, sem data). A detecção foi realizada em Cintilador de Amostras Líquidas da Nuclear Chicago, Série 720.

#### 3.2.5.3.2 - Proteínas

O resíduo sólido resultante, após a extração dos lipídeos, foi tratado com hidróxido de sódio 0,5 N a quente e centrifugado, operação essa repetida por 3 vezes. Tratando-se o hidróxido de sódio sobrenadante da centrifugação com ácido tricloro acético 20% gelado, foi obtida a precipitação de toda a proteína extraída com hidróxido de sódio 0,5 N que passou a ser a fração proteica. O precipitado proteico foi novamente redissolvido agora em 2 ml de hidróxido de sódio 0,1 N. Para a determinação quantitativa usou-se 40  $\mu$ l dessa solução proteica e seguiu-se o método de *LOWRY et alii (1951)*. Para a determinação da ra

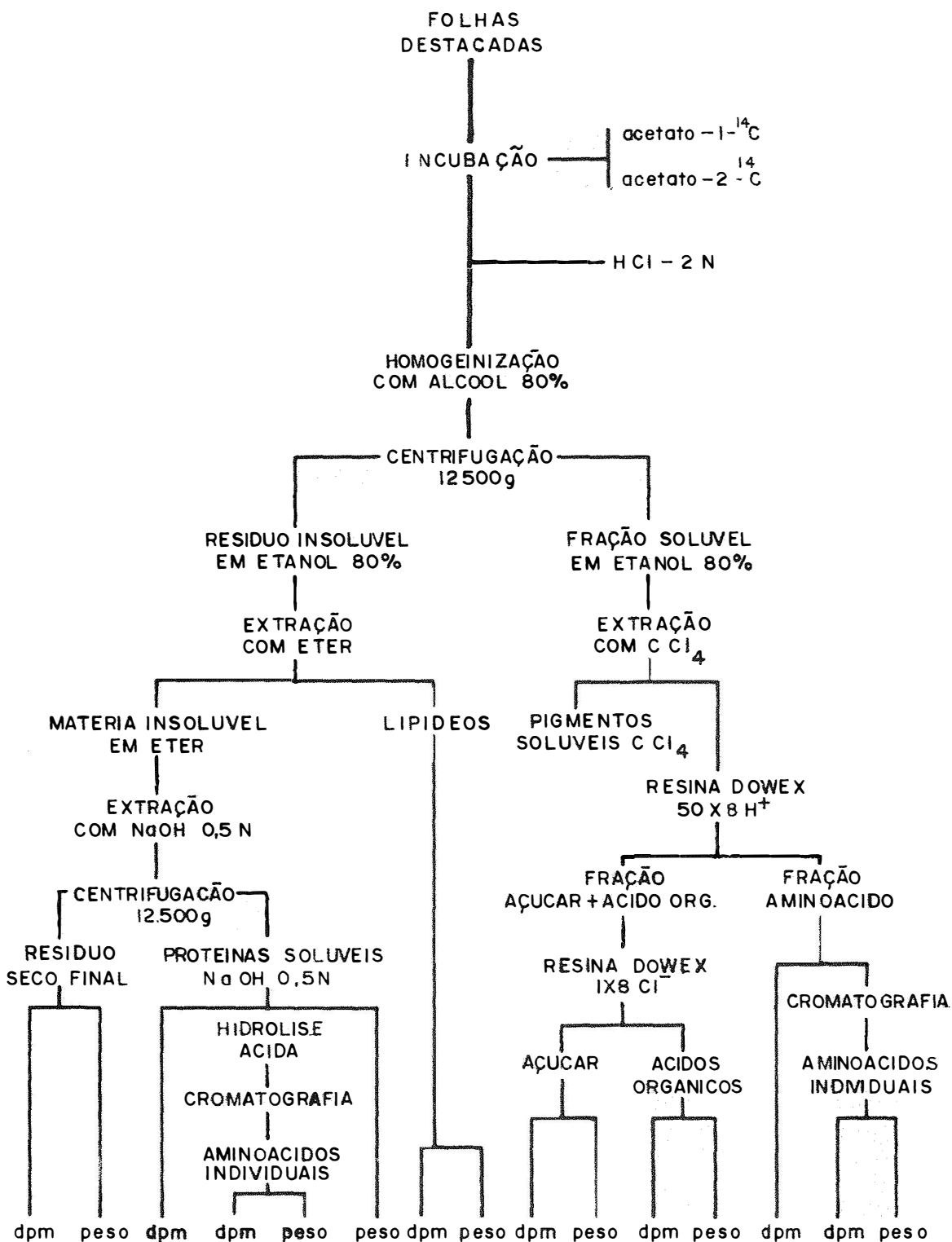
radioatividade tomou-se 40  $\mu$ l da solução proteica e após precipitação com ácido tricloroacético 20% filtrou-se através de filtro "Milipore" que após prévia secagem foi colocado em 10 ml de solução cintiladora (4 g de PPO, 50 mg POPOP e tolueno até 1000 ml (NUCLEAR CHICAGO INSTRUCTIONS, sem data). A detecção da radioatividade foi feita em Cintilador de Amostras Líquidas da Nuclear Chicago, Série 720. Na hidrólise ácida da proteína tratou-se o restante da solução proteica com ácido tricloroacético 20% e centrifugou-se a 12.500 G. Todo o precipitado foi colocado em ampola de vidro, com ácido clorídrico 6N, aquecido à 120°C em estufa termoregulável. Após esse tempo a ampola foi aberta e o conteúdo evaporado até secura total, à 40°C sob corrente de ar. O resíduo seco foi retomado em 1 ml de isopropanol a 10% conforme *BLOK et alii (1955)*. Os aminoácidos foram identificados e determinados por cromatografia em papel de filtro.

#### 3.2.5.3.3 - Resíduo final

O resíduo final após a extração da proteína foi submetido a secagem até peso constante. Após a determinação do peso 10 mg foram tomados e eluídos na solução cintiladora (4 g PPO, 50 mg POPOP e tolueno até 1000 ml - NUCLEAR CHICAGO INSTRUCTIONS, sem data). A detecção da radioatividade foi feita em Cintilador de Amostras Líquidas da Nuclear Chicago - Série 720.

O Gráfico I apresenta um esquema geral do fracionamento a que foram submetidas as amostras.

# ESQUEMA GERAL DO FRACIONAMENTO





## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 - Distribuição do $^{14}\text{C}$ nas diversas frações obtidas

Folhas destacadas de café, (*Coffea arabica* cv. "Mundo Novo") metabolizam acetato-1 e 2- $^{14}\text{C}$ ; transformando-o em seus metabólitos. As Tabelas 1 e 2 mostram a distribuição do  $^{14}\text{C}$  nos diferentes componentes analisados e expressa a radioatividade em porcentagem da atividade administrada.

O metabolismo do acetato em plantas segundo MILLERD & BONNED (1954) e REBEFZ *et alii* (1965), inicia-se com a ativação da molécula pela acetiltioquinase.



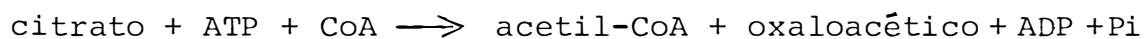
Os dados das Tabelas 1 e 2 revelam alta atividade metabólica nas folhas destacadas. Dioxido de carbono, ácidos orgânicos, aminoácidos, açúcares, lipídeos, proteínas e resíduo final aparecem marcados com  $^{14}\text{C}$ . Esses resultados evidenciam, também que acetato-2- $^{14}\text{C}$  é mais eficiente na marcação de compostos orgânicos do que o acetato-1- $^{14}\text{C}$ , que por sua vez produz uma taxa maior de  $^{14}\text{CO}_2$  libertado.

### 4.2 - Lipídeos

Os dados da Figura 1 mostram que os teores de lipídeos decrescem durante os 180 minutos. Isso indicaria

uma maior taxa de degradação dos lipídeos, devido provavelmente a diminuição dos teores de açúcares pela falta de fotossíntese. Nos lipídeos também ocorrem variação na atividade específica (Figura 2).

Os lipídeos de reserva aparecem como glicerídeos de ácidos graxos superiores (CROOKER & BARTON, 1953). Degradados por lipases produzem glicerol e ácidos graxos. Estes últimos são degradados via Beta-oxidação, fornecendo acetil-CoA, substrato da respiração. NEWCOMB & STUMPF (1953) entretanto, testando vários substratos para síntese de ácidos graxos em amendoim, encontraram o acetato como o mais efetivo substrato marcador de ácidos graxos. Há duas reações extramitoxondriais que sustentam acetil-CoA para a síntese de ácidos graxos que são respectivamente a cisão do citrato e a ação da acetil-tioquinase (MAHLER & CORDES, 1966).



Os dados obtidos e expressos na Figura 2 mostram que há síntese de lipídeos a partir dos acetatos- $^{14}\text{C}$ , e que acetato-2- $^{14}\text{C}$  é mais eficiente na marcação.

Confrontando as Figuras 1 e 2 podemos depreender que nas três primeiras horas, em folhas destacadas, a taxa de degradação é maior que a síntese, uma vez que os teores totais diminuem ao mesmo tempo que os teores de  $^{14}\text{C}$  por miligrama de lipídeos tendem a aumentar.

### 4.3 - Açúcares

A Figura 3 mostra a variação do teor de açúcares totais em folhas destacadas de café. Nota-se aí que há uma tendência de se acumular açúcares nos primeiros 60 minutos do experimento para posteriormente se iniciar um decréscimo. A tendência ao acúmulo pode ser justificada pela interrupção na migração ocorrida ao se destacar as folhas da planta. O posterior decréscimo pode indicar um consumo das reservas pelo processo respiratório, na ausência da fotossíntese. Entretanto, o aumento da atividade específica dos açúcares encontrados na Figura 4 parece indicar que degradação e síntese são simultânea. Esse processo será possível se considerarmos a existência do ciclo do glicolato (BEEVERS, 1961) que poderia usar o acetil-CoA da beta-oxidação de lipídeos para sintetizar açúcares.

### 4.4 - Ácidos Orgânicos

A Figura 5 mostra os teores de ácidos orgânicos de folhas destacadas de café. Nos 45 minutos iniciais houve um acúmulo de ácido orgânico seguindo-se um decréscimo que atingiu um mínimo quando novamente apareceu uma tendência de se acumular.

A atividade específica dos ácidos orgânicos está expressa na Figura 6. Tanto o acetato-1-<sup>14</sup>C como o acetato-2-<sup>14</sup>C como o acetato-2-<sup>14</sup>C mostraram variação semelhante da atividade específica durante o experimento. Houve um acúmulo de <sup>14</sup>C nos primeiros 30 minutos do experimento e um posterior decréscimo do mesmo.

Os teores de ácidos orgânicos bem como os dados das atividades específicas, evidenciaram uma ativa participação das enzimas do Ciclo de Krebs. Este ciclo metabólico, formado por ácidos di e tricarboxílicos pode iniciar-se com a reação de condensação entre o ácido oxaloacético e o acetil-CoA, formando ácidos tricarboxílicos. Outra fonte de carbono para o Ciclo de Krebs é a metabolização do acetil-CoA via ciclo do glioxalato, resultando por esta via num aumento dos ácidos intermediários do Ciclo de Krebs.

*CAMERON & COSSINS (1967)* relatam que em trabalhos realizados em ervilha, acetato- $^{14}\text{C}$  é rapidamente incorporado nos intermediários do Ciclo de Krebs e posteriormente vai se acumular em aminoácidos. Tal fato poderia justificar o decréscimo da atividade dos ácidos orgânicos (Figura 6) mostrando que embora haja grande incorporação de  $^{14}\text{C}$  nos intermediários desse ciclo haveria também uma saída desse carbono para outros compostos, principalmente aminoácidos.

#### 4.5 - Aminoácidos

A fração solúvel em etanol 80%, forneceu os teores e a radioatividade total dos açúcares, ácidos orgânicos e aminoácidos. Esses dados estão representados nas Tabelas 1 e 2. Os aminoácidos acumularam mais  $^{14}\text{C}$  do que os demais compostos, seguidos pelos ácidos orgânicos e finalmente pelos açúcares.

A alta atividade encontrada também nos ácidos orgânicos juntamente com a maior atividade dos aminoácidos, vem de encontro com o fato de que o principal caminho do acetato para a formação de aminoácidos é feita através do Ciclo de Krebs. Vários autores tem constatado a

formação de aminoácidos por essa via, mais especificamente através da aminação de alfacetoglutárico e oxaloacetato. (BONNE, 1957; BILINSKY & McCONNELL, 1957; OAKS & BEEVERS, 1964; CAMERON & COSSINS, 1967).

A via seguida para incorporação de acetato- $^{14}\text{C}$  em aminoácidos seria então a da sua transformação em acetil-CoA que se condensaria com ácido oxaloacético dando citrato. Este por sua vez daria o alfacetoglutarato marcado no carbono 5 se o traçador for o acetato- $1\text{-}^{14}\text{C}$  e, no carbono 4 se o traçador for acetato- $2\text{-}^{14}\text{C}$ . O alfacetoglutarato, se descarboxilando-se, produz succinato que por sua vez se converte em fumarato. Devido à simetria da molécula deste último composto o isótopo será distribuído equitativamente entre os carbonos 1 e 4 se o traçador for o acetato- $1\text{-}^{14}\text{C}$  e entre os carbonos 2 e 3 se o traçador for acetato- $2\text{-}^{14}\text{C}$ . Dessa maneira no fim do primeiro ciclo, o oxaloacetato terá 50% de  $2\text{-}^{14}\text{C}$  incorporado em cada um dos carbonos 2 e 3, e 50% de  $1\text{-}^{14}\text{C}$  incorporados em cada um dos carbonos 1 e 4. O oxaloacetato pode novamente combinar-se com acetil-CoA formando o citrato o qual se converte em oxalossuccinato. Este se descarboxilando perde seu grupo beta carboxílico (correspondente ao grupo alfa-carboxílico do seu precursor oxaloacetato), formando alfacetoglutarato com  $1\text{-}^{14}\text{C}$  nos carbonos 1 e 5, e com  $2\text{-}^{14}\text{C}$  nos carbonos 2, 3 e 4, promovendo a marcação de todos os carbonos do succinato. As voltas subsequentes do ciclo não modificarão mais o modelo de marcação dos carbonos dos ácidos orgânicos.

A maior eficiência do acetato  $2\text{-}^{14}\text{C}$  em marcar os aminoácidos encontrados no presente trabalho são explicados pelo modelo descrito. A tendência do acetato- $1\text{-}^{14}\text{C}$

em marcar os grupos carboxílicos dos aminoácidos pode ser o principal fator da sua menor eficiência na marcação de aminoácidos (*BILINSKI & McCONNELL, 1957b*).

Os teores de aminoácidos livres de folhas destacadas de café estão apresentadas nas Tabelas 3 e 4. Os aminoácidos dosados nas folhas de café foram: ácido aspártico, ácido glutâmico, serina, glicina, treonina, alanina, tirosina, arginina, valina, metionina, leucina, fenil-alanina e prolina.

A diminuição geral encontrada nos teores totais dos aminoácidos parece relacionar-se com alta atividade do ciclo de Krebs, que na ausência de luz recorre a outras fontes de carbono para produção de energia.

Nas Tabelas 5 e 6 estão as atividades específicas dos aminoácidos encontrados nas folhas destacadas e mostram uma grande variação, indicando a alta taxa de interconversão com ácidos orgânicos e possível imobilização em proteínas.

Métodos isotópicos modernos alicerçam o conceito de família de aminoácidos, onde surgem certos compostos como "cabeça" de família tais como glutamato, aspartato, serina e piruvato (*FOWDEN, 1967*). Ácido oxaloacético e alfacetoglutarato convertem-se diretamente por aminação em aspartato e glutamato, fato esse que tornam esses dois aminoácidos importante elo entre o metabolismo de proteínas e de carboidratos (*SPLITSTOESSER, 1967*). A maior atividade específica encontrada no glutamato em relação ao aspartato explica-se pelo fato de que, embora os "pools" de succinato e glutamato estejam envolvidos no metabo-

mo respiratório, frações correspondentes às quantidades de citrato, aconitato, malato e aspartato existentes estariam no máximo em pronto equilíbrio com os "pools" interconversíveis do Ciclo de Krebs (McLENNAN *et alii*, 1963). Por outro lado, glutamato pode dar origem a açúcares, contribuir na formação de clorofila, outros aminoácidos e pode também estar comprometido na sua oxidação a CO<sub>2</sub> (SPLITSTOESSER, 1967).

Alanina tem duas vias de formação: 1) descarboxilação da beta carboxilo de aspartato, e 2) transaminação com o ácido pirúvico. O fato de alanina mostrar uma atividade específica bem maior quando originada de acetato 2-<sup>14</sup>C favorece a idéia de que em folhas destacadas alanina é utilizada preferencialmente via aspartato.

Metionina e treonina podem ser formadas do ácido aspártico via homoserina (MAHLEN & CORDES, 1966). Metionina é ponto final de via metabólica, enquanto treonina pode dar origem a alfacetobutirato e isoleucina. Talvez esse fato justifique a maior atividade específica para a metionina.

O aparecimento de radiatividade na fração açúcares nos leva a crer no funcionamento da via glicolítica em sentido reverso, pelo consumo das reservas de compostos de alta energia de hidrólise. Assim, ácido pirúvico marcado justificaria a síntese da tirosina via ácido shikímico (MAHLER & CORDES, 1966).

O aminoácido prolina é sintetizado diretamente do ácido glutâmico. Entretanto no consumo de prolina pela célula podemos considerar dois caminhos, um via glutama

to Ciclo de Krebs produzindo  $\text{CO}_2$ , e outro na sua incorporação em proteínas (SANE & ZALIK, 1968; McCONNELL, 1969). O decréscimo no teor dos açúcares com o conseqüente decréscimo no teor de prolina, em folhas destacadas, evidenciam uma interrelação desses dois compostos (THOMPSON *et alii*, 1966).

Glicina e serina são dois aminoácidos que podem ser sintetizados a partir de intermediários da via glicolítica mais precisamente o ácido-3-fosfoglicérico. A glicina pode também ser formada pela aminação direta do glioxilato (McCONNELL, 1969). Esses dois aminoácidos são inteiramente interconversíveis em plantas (WILKINSON & DAVIES, 1958; McCONNEL, 1964).

O processo cromatográfico usado para análise dos aminoácidos não possibilitou boa separação de leucina e isoleucina. Portanto a fração "Leucinas" apresentada corresponde na realidade a uma mistura desses dois aminoácidos. A síntese desses aminoácidos se realiza por caminhos diferentes, porém ambos podem ser marcados com  $^{14}\text{C}$  oriundo do Acetato- $^{14}\text{C}$ . Isoleucina pode ser formada via aspartato e leucina via piruvato (MAHLER & CORDES, 1966).

Valina pode ter o mesmo caminho de formação da leucina. O piruvato condensando-se com acetil-CoA forma, alfacetoisovalérico, que por aminação direta, produziria o aminoácido (MAHLER & CORDES, 1966; UMBARGER, 1969).

#### 4.6 - Proteínas

As Figuras 7 e 8 mostram a variação do teor e



da atividade específica das proteínas. Os teores indicam um decréscimo proteico durante os 180 minutos do experimento. Essa tendência pode resultar, ou de um decréscimo da taxa de síntese ou de um aumento da taxa de degradação, ou ambos. Em folhas destacadas parece ser menor a taxa de síntese, pois esta depende da fosforilação de aminoácidos que e sem dúvida diminuída quando o processo ocorre em ausência de luz (*RACUNSEN & ARONOFF, 1954*).

A atividade específica das proteínas mostra em contraposição uma taxa pequena mas contínua de crescimento. Isto pode nos dizer que a taxa de síntese diminui porém não é nula, em folhas destacadas.

Nas Tabelas 7 e 8 estão relacionados os 8 aminoácidos detectados na hidrólise da fração proteica: ácido aspártico, ácido glutâmico, serina, glicina, treonina, alanina, valina, leucina.

A atividade específica dos aminoácidos proteicos estão nas Tabelas 9 e 10. Apenas seis dos aminoácidos encontrados na proteína aparecem marcados.

Os aminoácidos treonina e valina apresentaram-se radioativos na fração aminoácidos livres e não mostraram radioatividade quando oriundos de proteína. Esse fato parece indicar que na síntese de proteínas, treonina e valina derivam de "pools" que não foram marcados. Não podemos deixar de considerar também que, tanto a fosforilação de aminoácidos como a formação de grupos prostéticos, relacionados com o complexo B, necessários para a síntese proteica formam-se principalmente em presença de luz. (*RACUSEN & ARONOFF, 1954*).

#### 4.7 - Resíduo Seco Final

As Figuras 9 e 10 mostram respectivamente os teores e a atividade específica do resíduo seco final. Praticamente não ocorreu variação no teor dessa fração a qual é constituída de carboidratos de alto peso molecular e de componentes insolúveis, que são sintetizados para constituírem a estrutura da célula. Entretanto, o contínuo acréscimo mostrado em sua atividade específica indica que durante o período de incubação houve acúmulo de  $^{14}\text{C}$  nessa fração.

## 5 - CONCLUSÕES

O estudo do metabolismo do acetato- $^{14}\text{C}$  em folhas destacadas de café (*Coffea arabica* L cv. "Mundo Novo") permitiu concluir que tanto o acetato-1- $^{14}\text{C}$  como acetato-2- $^{14}\text{C}$  fornecem esqueleto carbônico para os principais compostos do metabolismo celular, tais como, açúcares, ácidos orgânicos, lipídeos, proteínas e aminoácidos. O aparecimento desses compostos marcados mostra que o acetato, na sua forma ativada está relacionado com todos os processos de síntese que ocorrem na folha.

A alta atividade específica encontrada em ácidos orgânicos e  $\text{CO}_2$ , indica conjuntamente com os processos de síntese, uma utilização do acetato para produção de energia via Ciclo de Krebs. A utilização de acetato através desse Ciclo, e sua possível utilização no reverso da glicolise para produção de glicose e celulose, possibilita a marcação de substratos para a síntese de aminoácidos. Assim, ácido aspártico, metionina, treonina e alanina tiveram sua origem em oxaloacetato; ácido glutâmico prolina e arginina em alfacetoglutárico; glicina e serina em 3-fosfoglicérico; alanina, valina e leucina em piruvato e finalmente tirosina em fosfoenolpiruvico.

Depreende-se dos resultados que realmente a molécula do acetato contribui para a formação das moléculas dos aminoácidos, sendo que o carbono metílico é mais incorporado do que o carbono carboxílico.

## 6 - RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo estudar o acetato- $^{14}\text{C}$  como precursor de aminoácidos em folhas dessecadas de café (*Coffea arabica* cv. Mundo Novo) originárias de plântulas com quatro pares de folhas definitivas.

Lotes de 1,5 grama de folhas foram incubadas com 10  $\mu\text{Ci}$  de acetato- $1\text{-}^{14}\text{C}$  e com 10  $\mu\text{Ci}$  de acetato- $2\text{-}^{14}\text{C}$  na ausência de luminosidade. A interrupção da incubação foi feita com HCl 2N nos tempos de 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150 e 180 minutos. O  $\text{CO}_2$  libertado durante os tempos de incubação foi retido em discos de papel de filtro embebido em hiamina para posterior detecção da radioatividade.

O material colhido nos diversos tempos foi homogeneizado em etanol 80% em ebulição. Esse homogeneizado forneceu duas frações, uma solúvel e outra insolúvel em álcool 80%. A fração solúvel, após cromatografia de troca iônica com resinas Dowex 50 x 8  $\text{H}^+$  e Dowex 1 x 8  $\text{Cl}^-$  originou as frações aminoácidos livres ácidos orgânicos e açúcares. A fração insolúvel foi tratada com éter etílico separando os lipídeos. O tratamento da mesma fração com hidróxido de sódio 0,5N separou proteínas, a qual por hidrólise ácida forneceu os aminoácidos proteicos. O material resultante dessas extrações constituiu o resíduo seco final.

Tréze aminoácidos foram separados por cromatografia bidimensional em papel de filtro: ácido aspártico, ácido glutâmico, serina, glicina, treonina, alanina, tirosina, arginina, valina, metionina, leucina, fenil-alanina

e prolina. A radioatividade dos aminoácidos foi determinada pela eluição dos mesmos de um cromatograma e posterior detecção em cintilador para amostras líquidas da Nuclear Chicago.

Pelos resultados obtidos podemos concluir que acetato- $^{14}\text{C}$  foi metabolizado por Folhas destacadas de café. Tanto acetato-1- $^{14}\text{C}$  como acetato-2- $^{14}\text{C}$  forneceram esqueleto carbônico para os principais compostos do metabolismo celular, tais como, açúcares, ácidos orgânicos, lipídeos, proteínas e aminoácidos. O aparecimento desses compostos marcados indicou que o acetato, na sua forma ativada está relacionado com os processos de síntese da folha. A alta atividade específica encontrada em ácidos orgânicos e  $\text{CO}_2$  mostrou que, conjuntamente com os processos de síntese, ocorreu uma utilização do acetato para produção de energia via ciclo de Krebs. A utilização do acetato via ciclo de Krebs e sua possível utilização no reverso da glicólise para produção de glicose e celulose, possibilitou a marcação de substratos que são vias de síntese de aminoácidos.

Pode-se concluir pelos resultados que a molécula do acetato contribuiu para a formação das moléculas dos aminoácidos, sendo o carbono metílico mais incorporado que o carbono carboxílico.

## 7 - SUMMARY

The objective of the present work was the studying of acetate  $^{14}\text{C}$  as the forerunner of aminoacids in detached leaves of coffee (*Coffea arabica* cv Mundo Novo) from plants of four pairs of definitive leaves.

Amounts of 1.5 gr of leaves were put in a solution of 10  $\mu\text{Ci}$  of acetate  $^{14}\text{C}$  and 10  $\mu\text{Ci}$  of acetate  $2\text{-}^{14}\text{C}$ , out of luminosity. The incubation cut was made by means of HCl with a timing of 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150 and 180 minutes. The released  $\text{CO}_2$  was retained in filter paper discs with hiamine for further radioactivity detection.

The collected material al those scheduled timing was homogenized in 80% ebulition alcohol. This, furnished two fractions, soluble and insoluble in 80% alcohol. The soluble fraction gave origin to free aminoacid fractions, organic acids and sugars, after ionic change cromatography in Dowex 50 x 8  $\text{H}^+$  and Dowex 1 x 8  $\text{Cl}^-$  resines. The insoluble fraction was treated with ether, separating the lipids. The treatment of this same fraction with NaOH 0.5N separated proteins, which through acid hidrolisis, furnished proteic aminoacids. The wasted material - from these extractions became the final dried remainder. Thirteen aminoacids were separated by bidimensional filter paper cromatography: aspartic acid, glutamic acid, serine, threonine, alanine, tyrosine, arginine, valine, methionine, leucine, phenylalamine and proline. The aminoacids radioactivity was deternubed by eluition from a cromatogram and further detection in a Nuclear Chicago Liquid Scintilation Counter.

Through the obtained results, it is possible to conclude that acetate  $^{14}\text{C}$  was metabolized by coffee detached leaves. Both, acetate-1- $^{14}\text{C}$  and acetate-2- $^{14}\text{C}$  furnished carbonic skeleton to the main compounds of cellular metabolism, such as, sugars, organic acids, lipids, proteins and aminoacids. These indicated that the activated acetate was related to the processes of leaf synthesis. - The high specific activity found in organic acids and  $\text{CO}_2$ , showed that, together with the synthesis processes, an utilization of acetate for energetical production via Krebs cycle was done.

The utilization of acetate via the Krebs Cycle and its use in glycolysis reversal to the yield of glucose and cellulose, made possible the coming out of labeled substrates which are pathways to aminoacids synthesis.

The obtained conclusions from the dates show that the acetate molecules contributed for the aminoacids molecules structure, being methylic carbon more incorporated than the carboxylic carbon.

8 - BIBLIOGRAFIA CITADA

ARZOLA, J.D.P. & ARISTIZABAL, G.V. - Análise cromatográfica quantitativa de ácidos orgânicos. Bol. did. Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz". Piracicaba - São Paulo, 1967. 10p.

BEEVERS, H. - Metabolic production of sucrose from fat. Nature London, 191: 433-436, 1961.

BILINSKI, E. & McCONNELL, W.B. - Studies on wheat plants using  $^{14}\text{C}$  compounds. III. The utilization of acetate - for amino acid biosynthesis, Can. J. Biochem. Physiol. Ottawa, 35: 357-363, 1957a.

\_\_\_\_\_ & \_\_\_\_\_ - Studies on wheat plants using  $^{14}\text{C}$  compounds. IV. Distribution of  $^{14}\text{C}$  in glutamic acid, aspartic acid, and threonine arising from acetate-1- $^{14}\text{C}$  and -2- $^{14}\text{C}$ . Can. J. Biochem. Physiol. Ottawa, 35: 365-371, 1957b.

BONE, D.H. - Properties of some higher plant enzymes with special reference to intermediary metabolism. Thesis (PhD University College). London, 1957. 141 p Mimeo.

BRASIL, O.G. & CROCOMO, O.J. - Acetate as carbon source - for amino acids in coffee seedlings. Ciência e Cultura, 26(12): 116-1172, 1974.

\_\_\_\_\_ ; ROSSI, C. & \_\_\_\_\_ - Determinação quantitativa de aminoácidos por cromatografia em papel de filtro pelo método ninhidrina-cádmio. In II Jornada -



Científica da Faculdade de Ciências Médicas e Biológicas de Botucatu - Botucatu - São Paulo. 1972.

BRAY, G.A. - A simple efficient liquid scintillator for counting aqueous solutions in a liquid scintillation counter. Analyt. Biochem. New York, 1: 279-285, 1960.

BROWN, D.H. & FOWDEN, L. - Metabolism of delta-acetylornithine in two leguminous species. Phytochemistry. Oxford, 5: 887-893. 1966.

CAMERON, D.S. & COSSIN, E.A. - Studies of intermediary metabolism in germinating Pea cotyledons. The pathways of ethanol metabolism and the role of the tricarboxylic acid cycle. Biochem. J., Cambridge, 105: 323-331, 1967.

COSSINS, E.A. & SINHA, S.K. - A comparison of  $^{14}\text{C}$  - glyoxylate and  $^{14}\text{C}$  - acetate metabolism in germinating fatty seeds. Biochim. biophys. Acta. New York, 90: 171-173, 1964.

CROCKER, W. & BARTON, L.V. - Physiology of seeds. Vol.28 Waltham, Chronica Botanica Co, 1953.

CROCOMO, O.J.; BASSO, L.C.; BRASIL, O.G. - Formation on N-carbamylputrescine from citruline in Sesamun. Phytochemistry. Osford, 9: 1487-1489, 1970.

\_\_\_\_\_ & ROSSI, C. - Determinação quantitativa de putrescina por cromatografia em papel de filtro. Anais da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz". Piracicaba, São Paulo, 24: 131-140, 1967.

*CROCOMO, O.J. & SILVA, D.M.* - Práticas de Bioquímica de Plantas. Curso de Pós Graduado de Nutrição de Plantas Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz". Piracicaba. São Paulo, 1968. 77 p. Mimeo.

*DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A. & SMITH, F.* - Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Analyt. Biochem. New York, 28(3): 350-356, 1956.

*EFFER, W.R. & RANSON, S.L.* - Respiratory metabolism in Buckwheat seedlings. Pl. Physiol. Washington, 42: 1042-1052, 1967.

*FLETCHER, J.S. & BEEVERS, H.* - Acetate metabolism in cell suspension cultures. Pl. Physiol. Washington, 45: 765-772, 1970.

*FOWDEN, L.* - Aspects of amino acid metabolism in plants. Ann. Rev. Pl. Physiol. Palo Alto, 18: 85-106, 1967.

*GUTIERREZ, H.C.* - Contribuição ao significado fisiológico da relação Ca/K em gergelim (Sesamun indicum L.). Tese (Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz". Piracicaba, São Paulo, 1968. .46 p. Mimeo.

*HARLEY, J.L. & BEEVERS, H.* - Acetate utilization by Maize roots. Pl. Physiol. Washington, 38: 117-123, 1963.

*HIGGINS, T.E. & JOHNSON, M.J.* - Pathways of anaerobic acetate utilization in Escherichia coli and Aerobacter cloacae. J. Bact. Baltimore, 101(3): 885-891, 1970.

HIRS, C.H.; MOORE, W.S.; STEIN, W.H. - The chromatography of amino acids on ion-exchange resins. The use of volatile acids for elution. J. Am. Chem. Soc. Easton, 76: 6063-6065, 1954.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the folin-phenol reagent. J. biol. Chem. Baltimore, 193: 265-275, 1951.

MacLENNAN, D.H.; BEEVERS, H.; HARLEY, J.L. - Compartmentation of acids in plant tissues. Biochem. J. Cambridge, 89: 316-327, 1963.

MAHLER, H.R. & CORDES, E.H. - Biological chemistry. New York, Harper & Row, 1966. 872 p.

McCONNELL, W.B. - Studies on wheat plants using carbon 14 compounds. XXI. The metabolism of glycine-2-<sup>14</sup>C. Can. J. Biochem. Ottawa, 42: 1293-1299, 1964.

\_\_\_\_\_ - Studies on wheat plants using <sup>14</sup>C labeled compounds. XXII. Incorporation into wheat protein. Can. J. Biochem. Ottawa, 47: 19-23, 1969.

\_\_\_\_\_ & MAZUREK, M. - Study of wheat glutan biosynthesis with acetate-<sup>14</sup>C. Biochim. biophys. Acta. New York, 21: 183-185, 1956.

\_\_\_\_\_ & \_\_\_\_\_ - The transport of carbon in wheat plants. Can. J. Biochem. Physiol. Ottawa, 45: 1853-1861, 1967.

- \_\_\_\_\_ & RAMACHANDRAN, L.K. - Acetate metabolism of maturing wheat plants. Can. J. Biochem. Physiol. Ottawa, 34: 180-190, 1956.
- MILLERD, A. & BONNER, J. - Acetate activation and acetoacetate formation in plant systems. Archs. Biochem. Biophys. New York, 49: 343-355, 1954.
- NEWCOMB, E.H. & STUMPF, P.K. - Fat metabolism in higher plants. I. Biogenesis of higher fatty acids by slices of peanuts cotyledons. J. Biol. Chem. Baltimore, 200: - 231-239, 1953.
- NUCLEAR CHICAGO INSTRUCTIONS - Preparations of samples for liquid scintillation counting. Section 140. Chicago. (sem data).
- OAKS, A. - The control of amino acid synthesis in Maize root tips. Biochim, biophys. Acta, New York, 76: 638-641, 1963.
- \_\_\_\_\_ - The soluble leucine pool in Maize root tips. Pl. Physiol. Washington, 40: 142-148, 1965a.
- \_\_\_\_\_ - The effect of leucine on the biosynthesis of leucins in Maize root tips. Pl. Physiol. Washington, 40: 149-155, 1965b.
- \_\_\_\_\_ - Transport of amino acids to the Maize root. Pl. Physiol. Washington, 41: 173-180, 1966.
- \_\_\_\_\_ - Asparagine synthesis in Zea mays. Biochim biophys. Acta. New York, 141: 436-439, 1967.

OAKS, A. & BEEVERS, H. - The glyoxylate cycle in Maize scutellum. Pl. Physiol. Washington, 39: 431-434, 1964.

PLAISTED, P.H. - Clearing amino acid solutions of plant extracts for paper chromatography. Contr. Boyce Thompson Inst. Pl. Res. Menasha, 19: 231-244, 1958.

RACUSEN, D.W. & ARONOFF, S. - Metabolism of soybean leaves. VI. Exploratory studies in protein metabolism. Archs. Biochem. Biophys. New York, 51: 68-78, 1954.

REBEIZ, C.; CASTELFRANCO, P.; BREIENBACH, R.W. - Activation and oxidation of acetic acid- $1-^{14}\text{C}$  by cell free homogenates of germinating Peanut cotyledons. Pl. Physiol. Washington, 40: 286-289, 1965.

SPLITSTOESSER, W.E. - The metabolism of glutamate and leucine by Maize tissues. Phytochemistry Oxford, 6: 933-939, 1967

STERN, J.R. & O'BRIEN, R.W. - Glutamate biosynthesis in anaerobic bacteria. III. The origin of the carboxyl groups of glutamic and aspartic acids isolated from Clorstridium Kluyveri grown on  $1-^{14}\text{C}$  acetate. Biochemistry. New York, 7(1): 372-376, 1958.

STEWART, C.R.; MORRIS, C.J.; THOMPSON, S.F. - Changes in amino acid content of excised leaves during incubation. II. Role of sugar in the accumulation of proline in wic<sub>2</sub>ted leaves. Pl. Physiol., 41: 1855-1890, 1966.

STRAUS, B.S. - Studies of the metabolism of acetate by acetate requiring mutants of Neurospora crassa. Archs. Biochem. Biophys. New York, 55: 77-94, 1955.

- SURYANARAYANAN, S. & McCONNELL, W.B.* - The metabolism of acetate by wheat stem rust uredospores. Can. J. Biochem. Ottawa, 42: 883-888, 1964.
- TARANT, A.A. & COLMAN, B.* - Dark assimilation of acetate -<sup>14</sup>C by anabaena flos-aquae. Can. J. of Botany., 50: 2067-2071, 1972.
- THOMPSON, J.F.; STEWART, C.R. & MORRIS, C.J.* - Changes in aminoacid content of excised. Leaves during incubation. I. The effect of water content of leaves and atmospheric oxygen level. Pl. Physiol., 41: 1578-1584, 1966.
- UMBARGER, H.E.* - Regulation of amino acid metabolism. A. Rev. Biochem. Palo Alto, 38: 323-370, 1969.
- WANG, D. & BURRIS, R.H.* - Carbon metabolism of <sup>14</sup>C labeled aminoacids in wheat leaves. III. Further studies on - the role of serine in glycine metabolism. Pl. Physiol 40: 415-418, 1965.
- WILKINSON, A.P. & DAVIES, D.D.* - Serine- glycine interconversion in plant tissues. Nature. London, 181: 1070-1071, 1958.

9. A P È N D I C E

TABELA 1 - Distribuição do C<sup>14</sup> proveniente do acetato 1-C<sup>14</sup> nas frações de folhas de café, em porcentagem da atividade administrada.

Frações	Minutos							
	15	30	45	60	90	120	150	180
CO <sub>2</sub> libertado durante a incubação								
CO <sub>2</sub>	0,552	0,821	0,377	0,469	0,776	2,853	1,230	2,352
Fração solúvel em etanol 80%								
Açúcares	0,020	0,010	0,041	0,027	0,030	0,010	0,032	0,027
Ácido orgânico	0,098	0,116	0,189	0,178	0,197	0,239	0,201	0,250
Aminoácidos	3,722	3,000	3,856	2,595	4,424	4,121	3,745	4,933
Fração insolúvel em etanol 80%								
Proteínas	0,087	0,074	0,112	0,056	0,100	0,204	0,114	0,136
Resíduo final	0,105	0,132	0,280	0,835	0,248	0,312	0,360	0,356
Lipídeos	0,205	0,218	0,186	0,210	0,271	0,370	0,321	0,340



TABELA 2 - Distribuição do C<sup>14</sup> proveniente do acetato 2-C<sup>14</sup> nas frações de folhas de café em porcentagem da atividade administrada.

Minutos		15	30	45	60	90	120	150	180
CO <sub>2</sub> libertado durante a incubação									
CO <sub>2</sub>		0,040	0,734	0,625	0,932	1,091	0,637	0,941	0,653
Fração solúvel em etanol 80%									
Açúcares		0,038	0,059	0,019	0,218	0,055	0,029	0,045	0,032
Ácido orgânico		0,165	0,085	0,207	0,026	0,122	0,145	0,213	0,138
Aminoácidos		5,502	4,099	4,400	5,164	4,927	8,952	7,308	6,022
Fração insolúvel em etanol 80%									
Proteínas		0,093	0,046	0,118	0,094	0,115	0,261	0,217	0,154
Resíduo final		0,131	0,150	0,164	0,238	0,317	0,342	0,283	0,331
Lipídeos		0,208	0,201	0,258	0,325	0,366	0,396	0,326	0,386

TABELA 3 - Teor de aminoácidos livres das folhas de café, em µg/g de peso verde (acetato-<sup>14</sup>C)

Amino-ácidos	Minutos								
	15	30	45	60	90	120	150	180	
Ácido aspártico	708,0	415,6	708,0	333,3	583,3	333,3	166,6	158,6	
Ácido glutâmico	74,6	54,0	50,6	65,3	65,3	28,3	41,6	41,6	
Serina	100,0	58,0	91,3	66,6	46,6	66,6	56,6	27,5	
Glicina	15,3	10,0	14,6	15,0	12,4	82,0	42,5	67,9	
Treonina	124,6	33,3	83,3	66,6	83,3	60,8	25,0	37,4	
Alanina	166,6	91,3	83,3	100,3	105,0	103,0	91,6	103,0	
Tirosina	40,3	14,1	12,4	12,4	16,2	11,5	2,5	2,5	
Arginina	100,0	24,1	5,8	4,3	11,2	8,3	5,0	4,0	
Valina	56,6	61,6	83,3	81,3	75,0	40,8	68,3	54,1	
Metionina	5,0	9,5	8,8	9,5	3,6	3,3	11,6	4,1	
Leucina	20,6	12,4	8,3	6,4	27,5	32,5	12,0	30,8	
Ø Alamina	11,3	12,4	10,4	8,3	3,8	3,0	2,5	2,5	
Prolina	83,3	116,6	166,6	126,6	91,3	91,6	66,6	50,0	

TABELA 4 - Teor de aminoácidos livres das folhas de café, em µg/g de peso verde (acetato-2-<sup>14</sup>C)

Amino-ácidos	Minutos									
	15	30	45	60	90	120	150	180		
Ácido aspártico	916,6	450,0	650,0	310,0	350,0	316,6	100,0	150,0		
Ácido glutâmico	50,0	29,1	41,6	75,0	56,6	56,6	65,0	33,3		
Serina	66,6	37,4	10,4	68,3	38,3	53,3	48,3	22,5		
Glicina	11,6	12,4	12,0	50,0	12,4	83,3	37,4	66,6		
Treonina	37,4	29,1	76,6	69,1	40,0	63,3	43,3	40,0		
Alanina	60,0	70,8	45,8	91,6	108,3	108,3	116,6	108,0		
Tirosina	35,8	12,5	14,5	12,5	18,7	10,0	5,4	2,6		
Arginina	120,8	28,3	6,0	4,9	5,0	5,0	5,0	3,0		
Valina	50,0	70,1	80,0	79,0	33,3	91,3	70,8	50,8		
Metionina	6,2	8,3	4,1	9,5	5,0	5,0	10,8	5,0		
Leucina	20,8	10,8	7,2	6,5	24,5	30,8	14,5	33,3		
Ø Alanina	10,8	14,1	11,2	4,1	4,1	4,1	4,1	1,8		
Prolina	75,0	100,0	175,0	125,0	105,0	90,8	62,4	40,3		

TABELA 5 - Atividade específica dos aminoácidos livres de folhas de café, em dpm/mg de aminoácidos (acetato- $l$ - $^{14}C$ )

Amino-ácidos	Minutos								
	15	30	45	60	90	120	150	180	
Ácido aspártico	38.370	64.800	57.580	64.100	26.400	83.400	83.800	57.563	
Ácido glutâmico	1.543.750	918.518	2.011.842	716.326	803.571	1.962.352	1.340.800	921.008	
Serina	226.333	402.298	268.978	151.500	785.000	432.000	244.117	1.233.939	
Glicina	589.173	803.333	13.757.142	13.133.333	2.828.877	6.987.179	12.626.666	2.443.133	
Treonina	39.458	79.000	121.200	181.000	197.600	353.618	346.000	320.284	
Alanina	254.800	821.167	2.811.600	296.000	442.666	461.333	1.016.727	1.019.375	
Tirosina	105.451	290.322	537.837	393.048	602.378	695.478	720.000	3.013.333	
Valina	374.882	5.367.027	7.130.800	3.129.918	3.835.111	8.243.464	7.124.000	9.048.000	
Metionina	3.073.333	1.632.867	1.134.615	464.615	10.281.818	475.000	464.210	403.000	
Leucina	893.548	644.385	2.620.000	3.094.594	1.502.222	1.485.333	8.365.384	1.800.000	
Prolina	101.000	17.428	102.800	23.600	18.978	99.636	19.600	27.777	

TABELA 6 - Atividade específica dos aminoácidos livres em folhas de café, em dpm/mg de amino-ácidos (acetato-2-<sup>14</sup>C)

Amino-ácidos	Minutos									
	15	30	45	60	90	120	150	180		
Ácido aspartico	86.581	199.555	53.115	134.888	125.523	103.333	194.666	164.888		
Ácido glutâmico	2.919.333	2.570.938	191.200	269.777	775.294	547.058	299.487	742.000		
Serina	256.000	371.886	698.717	2.328.000	900.869	3.720.000	2.168.000	1.746.666		
Glicina	1.222.857	684.491	2.596.153	372.666	657.754	367.200	279.359	1.180.000		
Treonina	70.284	139.588	500.000	140.732	598.330	200.000	996.153	157.500		
Alanina	2.068.888	1.749.528	2.026.200	1.553.454	1.785.846	1.870.153	1.454.285	1.416.358		
Tirosina	372.439	1.480.000	1.456.332	18.733.333	501.422	853.333	769.704	845.784		
Valina	745.898	1.121.111	958.000	1.347.578	2.007.300	11.614.598	12.455.743	22.179.921		
Metionina	19.167.556	9.792.000	21.520.000	16.251.748	12.042.666	2.689.523	2.228.395	557.333		
Leucina	11.000.000	2.360.000	5.748.666	3.826.666	2.423.580	8.600.000	5.880.640	3.960.000		
Prolina	40.454	32.333	69.798	79.200	40.226	432.000	118.463	97.434		

TABELA 7 - Teor de aminoácidos proveniente da hidrólise ácida de proteínas de folhas de café em ug/mg de proteínas (acetato-1-<sup>14</sup>C)

Amino- ácidos	Minutos							
	15	30	45	60	90	120	150	180
Ácido aspártico	161	169	160	158	136	100	60	66
Ácido glutâmico	74	46	40	31	27	26	27	25
Serina	4	8	3	3	3	3	4	3
Glicina	56	18	11	24	17	16	15	11
Treonina	26	28	34	15	16	6	17	13
Alanina	41	42	34	34	36	26	34	36
Valina	59	63	29	39	33	30	45	38
Leucina	59	46	23	35	39	26	34	31

TABELA 8 - Teor de aminoácidos provenientes da hidrólise ácida de proteínas de folhas decafé em ug/mg de proteínas (acetato-2-<sup>14</sup>C)

Amino- ácidos	Minutos							
	15	30	45	60	90	120	150	180
Ácido aspártico	170	162	175	160	127	83	65	70
Ácido glutâmico	47	43	70	35	46	30	84	62
Serina	9	10	10	9	11	7	7	13
Glicina	18	17	42	28	23	15	12	15
Treonina	16	26	26	15	21	13	7	17
Alanina	32	34	42	32	46	30	41	31
Valina	52	42	40	32	52	47	35	28
Leucina	39	44	60	50	63	61	32	38

TABELA 9 - Atividade específica dos aminoácidos provenientes da hidrólise acida das proteínas de folhas de café em dpm/mg de aminoácido proteico (acetato-l-<sup>14</sup>C)

Amino-ácidos	Minutos									
	15	30	45	60	90	120	150	180		
Ácido aspártico	1.199	1.200	1.000	1.020	490	458	205	134		
Ácido glutâmico	1.836	1.805	1.988	1.345	548	759	348	239		
Serina	5.488	6.488	8.727	4.998	7.580	8.958	19.345	7.999		
Glicina	1.748	1.818	1.799	3.405	5.600	6.400	7.809	5.600		
Alanina	1.100	2.234	3.846	3.450	2.405	2.121	1.998	2.034		
Leucina	2.000	5.714	7.027	9.375	12.533	26.400	47.000	60.000		



TABELA 10 - Atividade específica dos aminoácidos provenientes da hidrólise ácida das proteínas de folhas de café dedpm/mg da aminoácido proteico (acetato- $^{14}\text{C}$ )

Amino-ácidos	15	30	45	60	90	120	150	180
Ácido aspártico	1.535	1.741	1.994	2.000	622	475	208	139
Ácido glutâmico	1.736	1.936	2.034	3.445	1.998	904	409	358
Serina	8.145	8.458	9.101	9.541	7.000	7.548	8.748	8.158
Glicina	2.666	2.894	2.891	3.619	4.950	7.498	6.505	5.594
Alanina	1.000	2.458	4.003	4.508	3.899	3.245	3.100	2.394
Leucina	5.918	6.048	6.958	9.948	21.459	27.100	50.000	64.494

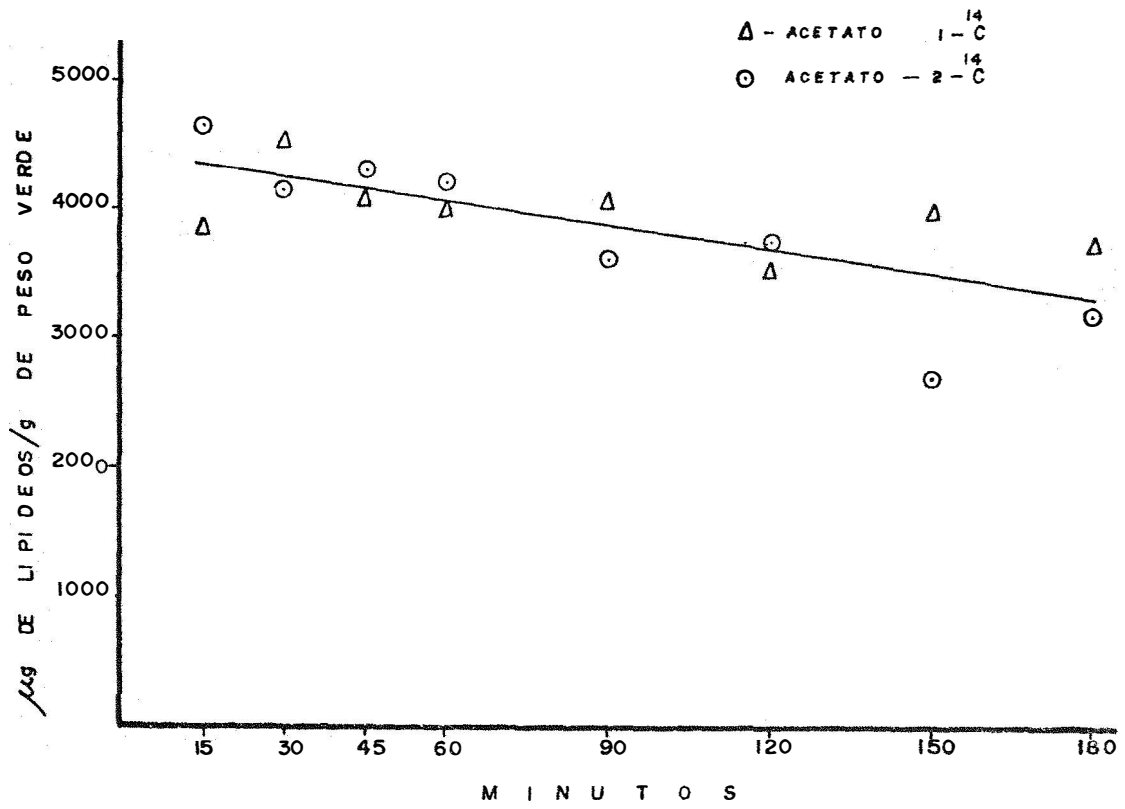


FIGURA I - TEOR DE LIPIDEOS DE FOLHAS DESTACADAS DE CAFÉ.

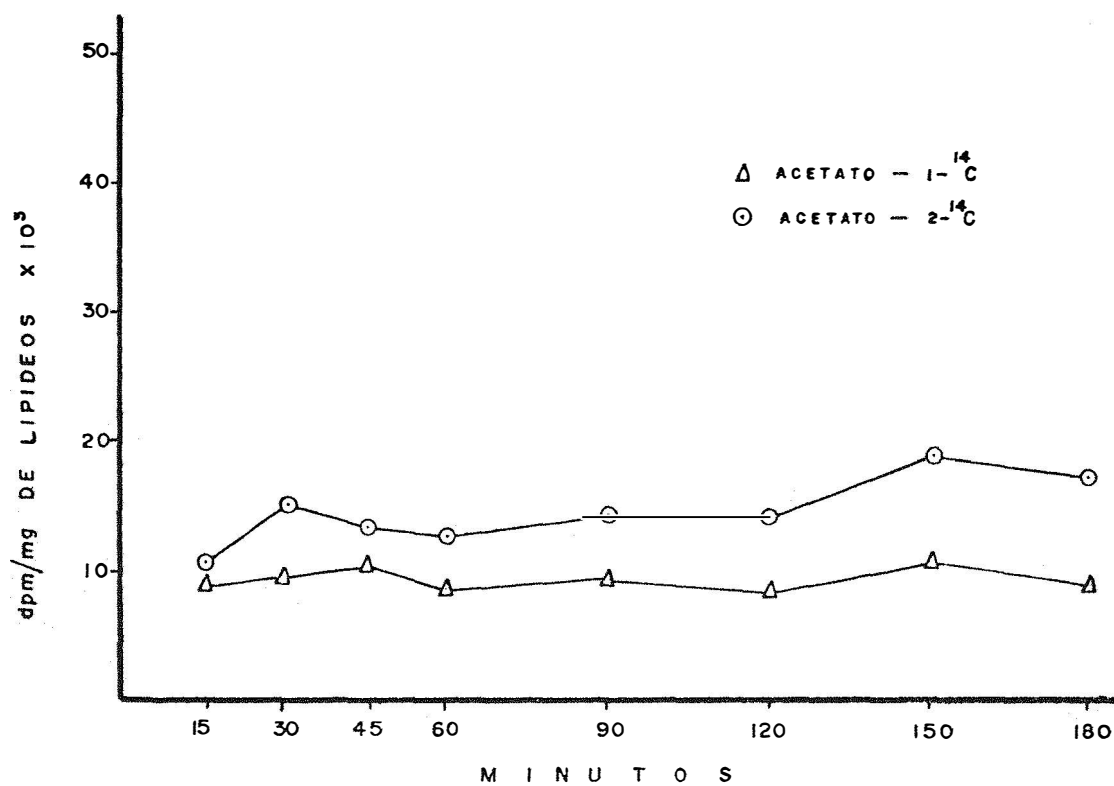


FIGURA 2 - ATIVIDADE ESPECIFICA DE LIPIDEOS DE FOLHAS DESTACADAS DE CAFÉ.

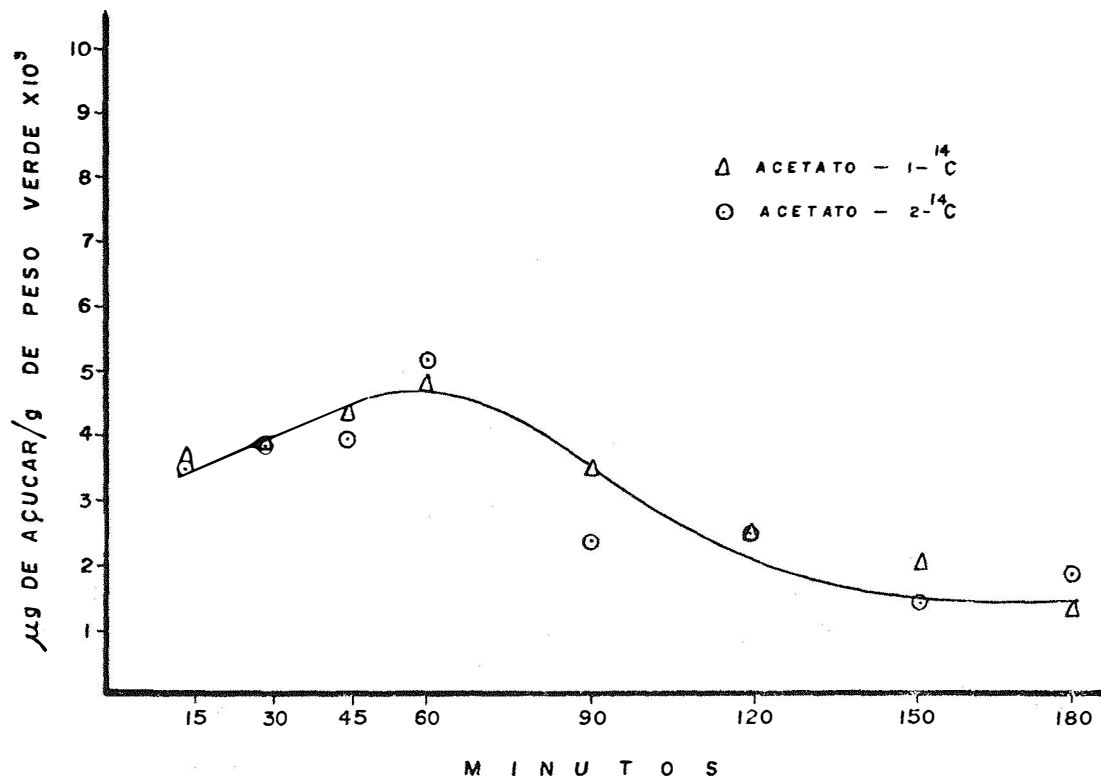
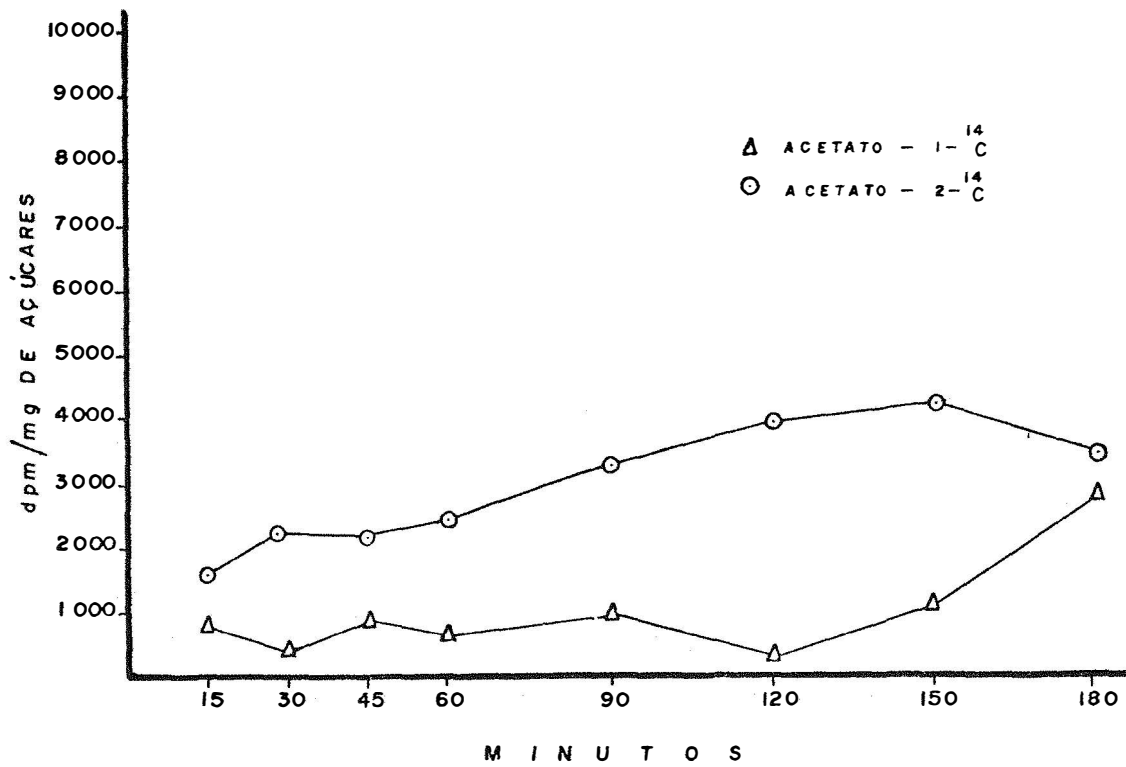


FIGURA 3—TEOR DE AÇÚCARES DE FOLHAS DESTACADAS DE CAFÉ.



**FIGURA 4**— ATIVIDADE ESPECIFICA DE AÇÚCARES DE FOLHAS DESTACADAS DE CAFÉ.

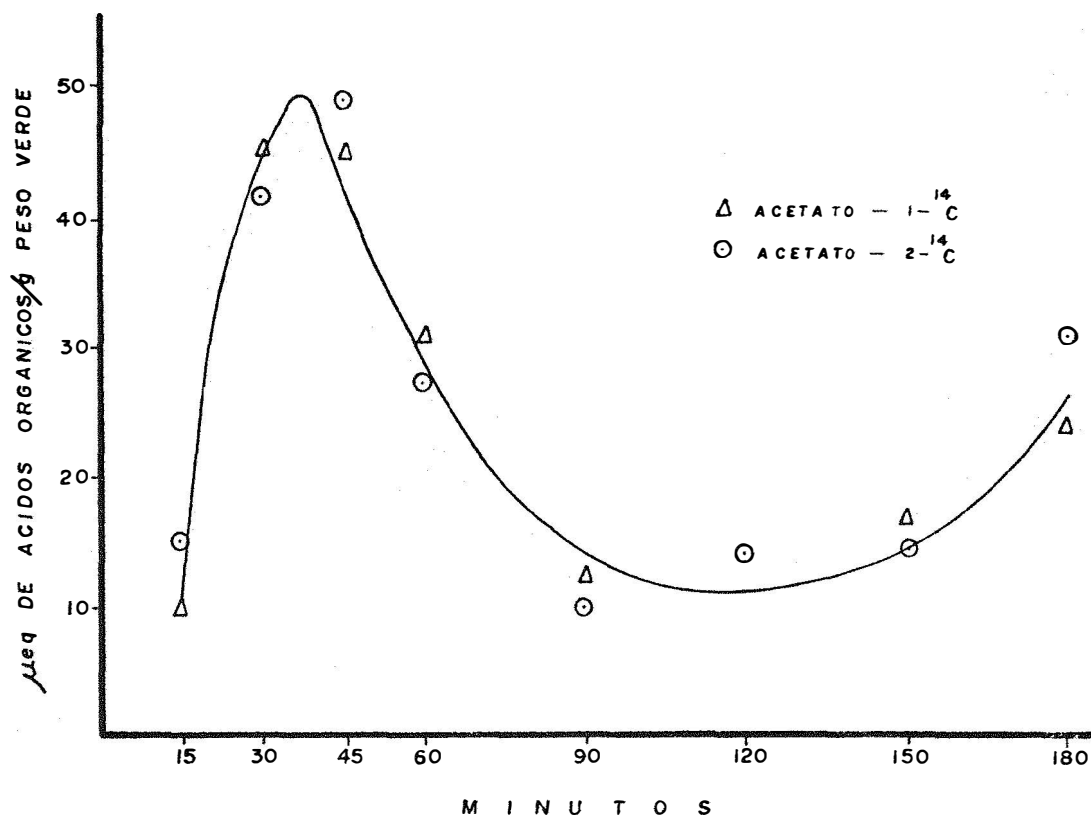


FIGURA 5 - TEOR DE ACIDOS ORGANICOS DE FOLHAS DESTACADAS DE CAFÉ.

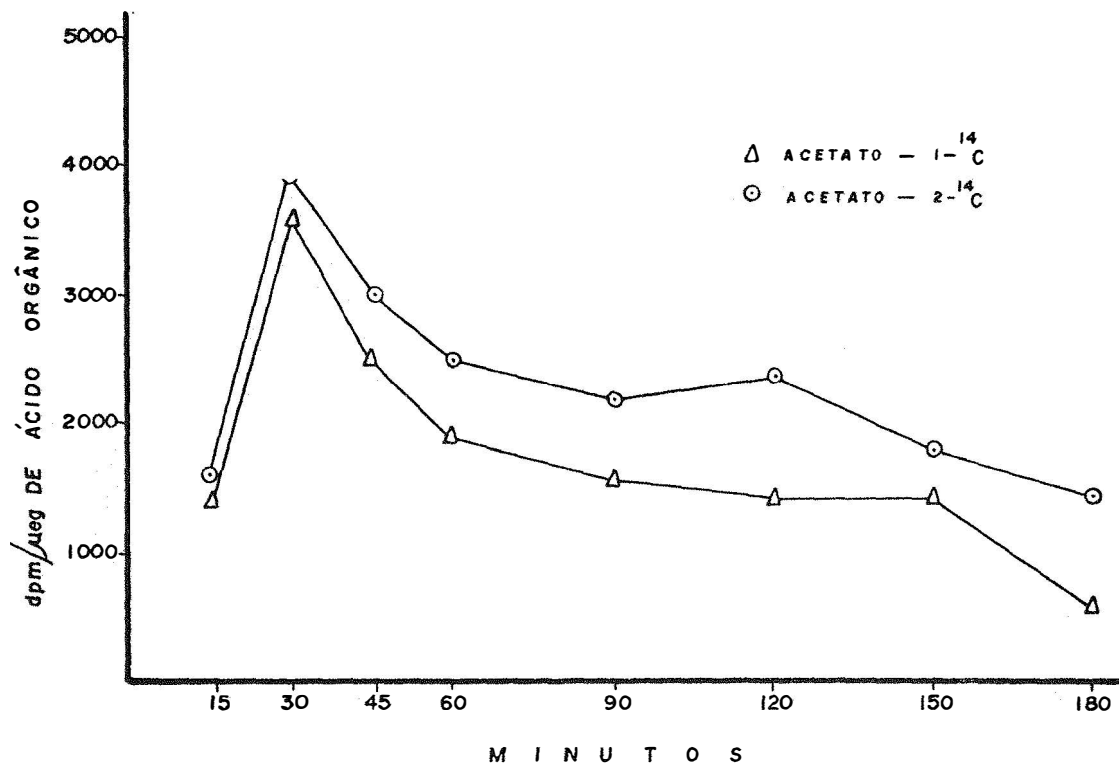


FIGURA 6 - ATIVIDADE ESPECÍFICA DE ÁCIDOS ORGÂNICOS DE FOLHAS DESTACADAS DE CAFÉ.

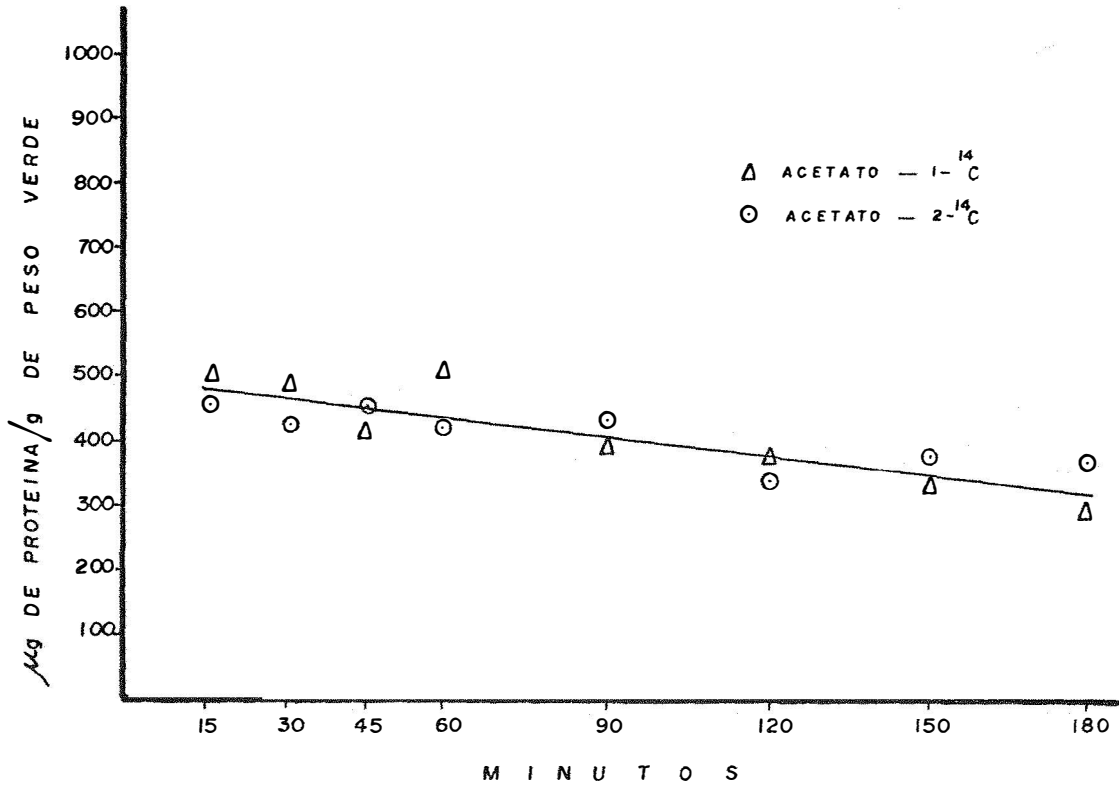


FIGURA 7 — TEOR DE PROTEINAS DE FOLHAS DESTACADAS DE CAFE.



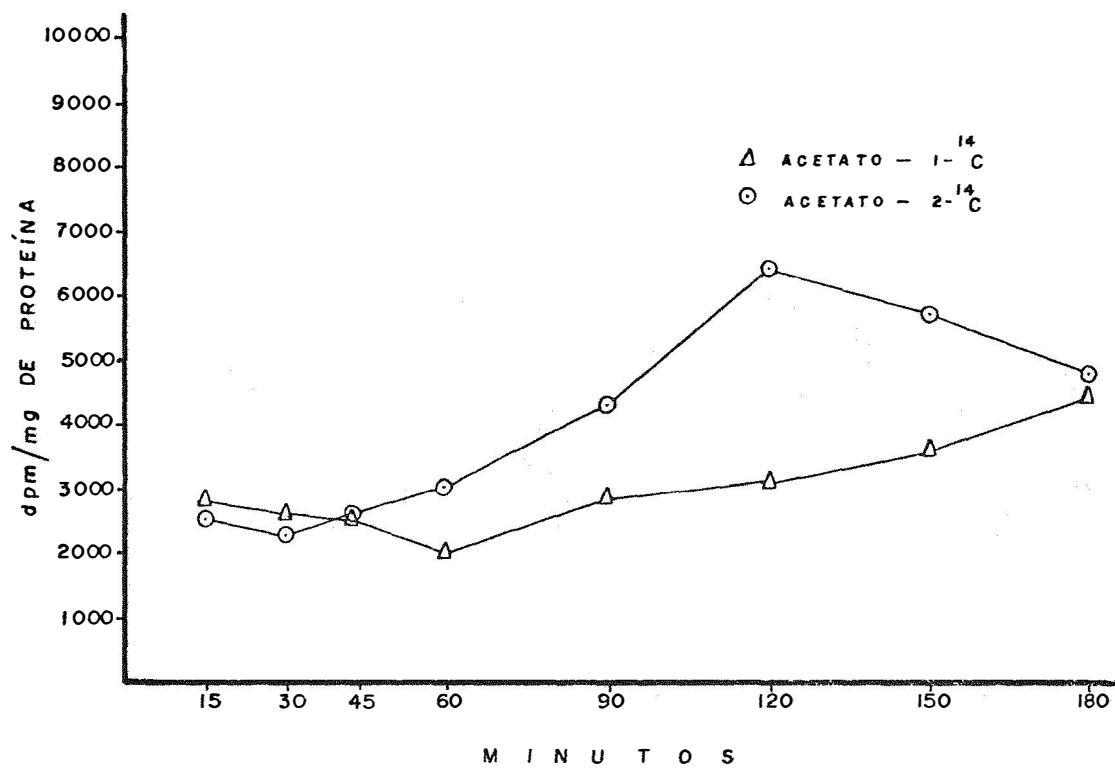


FIGURA 8 - ATIVIDADE ESPECÍFICA DE PROTEÍNAS DE FOLHAS DESTACADAS DE CAFÉ.

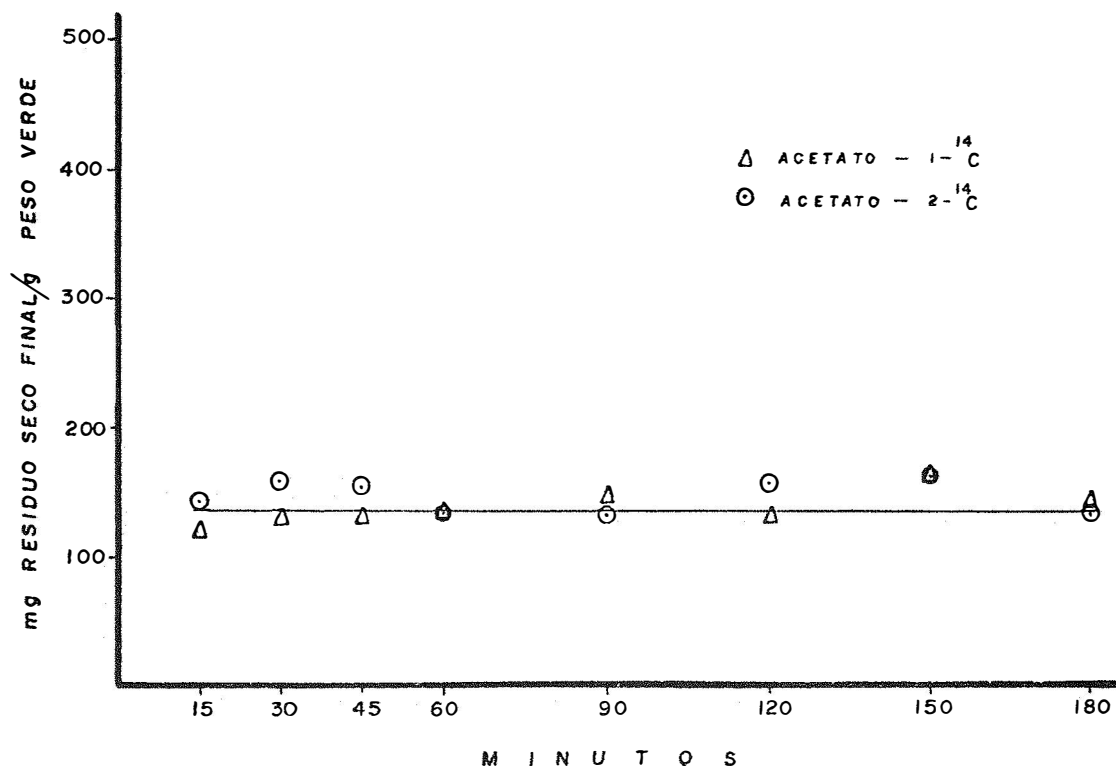
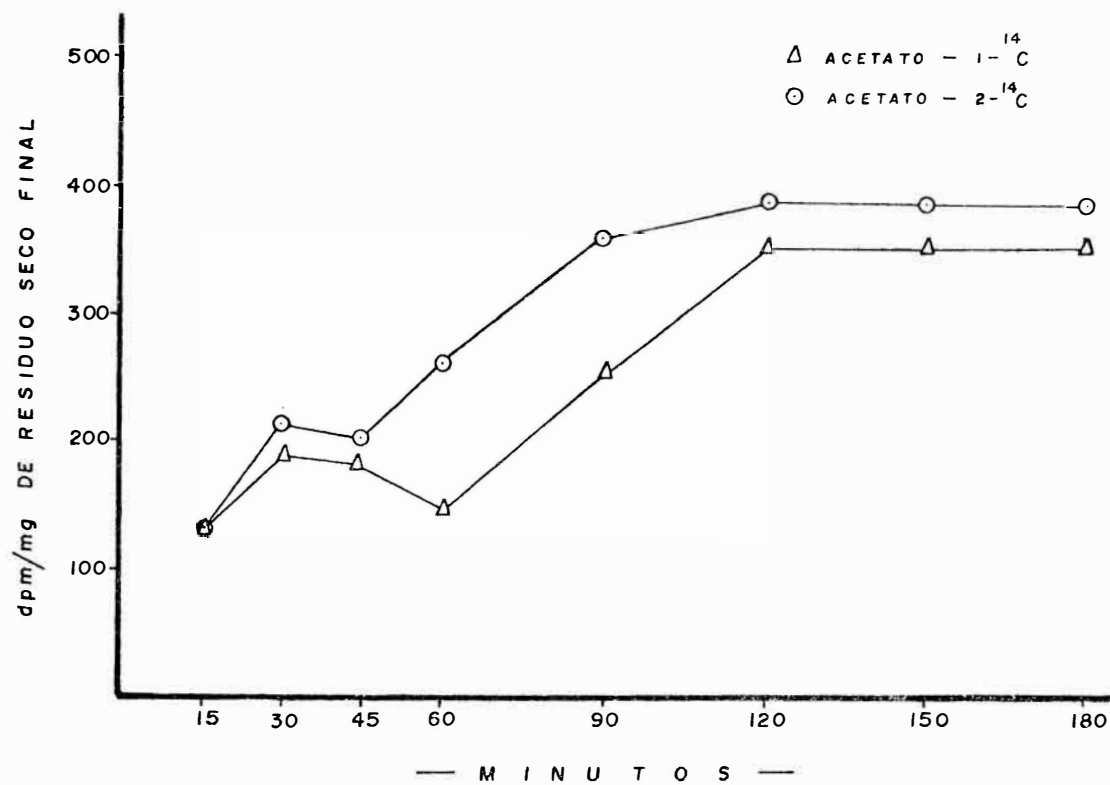


FIGURA 9 - PESO DO RESIDUO SECO FINAL DE FOLHAS DESTACADAS DE CAFÉ.



**FIGURA 10** - ATIVIDADE ESPECIFICA, DO RESIDUO SECO FINAL DE FOLHAS DESTACADAS DE CAFE.