

Formação de ácidos orgânicos, açúcares e lipídeos a partir de acetato ^{14}C em folhas de café*

OSWALDO GALVÃO BRASIL**, OTTO JESUS CROCOMO***

ABSTRACT

The acetate ^{14}C metabolism was studied in detached coffee leaves (*Coffea arabica* L. cv. 'Mundo Novo'). The leaves were incubated in 10 μCi of acetate-1- ^{14}C and 10 μCi of acetate-2- ^{14}C out of luminosity. Incubation was interrupted adding HCl after 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150 and 180 minutes. One insoluble fraction and one soluble (80% ethanol) fraction were obtained. Ion exchange chromatography separated the sugar from the organic acids fraction.

Coffee detached leaves used acetate- ^{14}C to synthesize organic acids, sugar and lipids.

The high activity in organic acid and CO_2 indicated that acetate was used via the Krebs cycle.

Introdução

OS processos metabólicos foliares são de particular interesse para bioquímicos e fisiologistas. Através da elucidação das várias vias de síntese e degradação de diferentes compostos pode-se conhecer melhor aqueles processos.

A molécula do acetato pode contribuir para estudos de metabolismo pois ela participa da formação de inúmeros compostos orgânicos.

O ciclo dos ácidos tricarbóxicos é aceito como a principal via de oxidação do acetato. Entretanto, estudos de interações gênicas a nível bioquímico em *Neurospora crassa* definiram 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 dicarbóxicos onde o carbono metílico se incorpora em piruvato e acetilmetilcarbinol (12).

Neste trabalho estudou-se, em folhas destacadas de café (*Coffea arabica* L. cv 'Mundo Novo'), o metabolismo do acetato ^{14}C com ênfase especial a açúcares, ácidos orgânicos e lipídeos. Procurou-se esclarecer como a molécula de acetato contribui através dos processos metabólicos ocorridos nas folhas, para a formação desses compostos.

Materiais e métodos

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, foram transferidas 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 no escuro por 15 minutos. Foram então adicionados 10 μCi de acetato-1- ^{14}C em oito frascos e 10 μCi de acetato-2- ^{14}C nos oito restantes. Os 16 frascos permaneceram em banho metabólico a 28°C em ausência de luz.

As incubações dos acetato-1- ^{14}C e acetato-2- ^{14}C 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 CO_2 .

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 CO_2 liberado durante a incubação. Posteriormente colocou-se a hiamina em solução cintiladora constituída de 4 g POP, 10 g POPOP e tolueno até 1000 ml (11) e detectou-se a radioatividade em Cíntilador Líquido.

O material sólido colhido foi triturado e homogeneizado com etanol 80% em ebulição (10 ml/g

* Recebido para publicação em 3 de março de 1980

** Departamento de Bioquímica do Instituto Básico de Biologia Médica e Agrícola do "Campus" de Botucatu-UNESP Caixa Postal 505. 18610. RUBIAO JÚNIOR-S P. Brasil.

*** Seção de Bioquímica do Centro de Energia Nuclear na Agricultura CENA/ESAIQ/USP. 13.400 Piracicaba S. P. Brasil.

peso verde) (8). Uma centrifugação a 12.500 G desse homogeneizado deu uma fração sobrenadante solúvel e uma fração precipitada insolúvel 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 com 5 cm de altura em coluna de vidro de 30 x 1 cm (7). Essa coluna de resina separou primeiramente, com uma eluição de 40 ml de água desionizada, açúcares totais + ácidos orgânicos totais. Essa fração foi novamente passada por coluna de resina Dowex 1 x 8 Cl 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 (9). 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 determinação quantitativa de açúcares totais foi feita segundo adaptação descritas por Brasil e Crocomo (3). A determinação da radioatividade foi feita tomando-se 40 μ l da fração açúcares totais e colocando-se em 10 ml da solução cintiladora de Bray (4).

A determinação quantitativa dos ácidos orgânicos totais foi feita através da titulação de 40 μ l da fração ácidos orgânicos totais com hidróxido de sódio 10⁻³ N, usando-se como indicador o vermelho do fenol (1). Na determinação da radioatividade utilizou-se 40 μ l da fração ácidos orgânicos totais em 10 ml de solução cintiladora (4).

A fração insolúvel foi tratada com éter etílico para extração dos lipídeos. Após três 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 adicionou-se 10 ml de solução cintiladora para leitura.

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 para leitura da radioatividade.

Resultados e discussão

Os dados das Cuadros 1 e 2 revelam alta atividade metabólica nas folhas destacadas. Dióxido de carbono, ácidos orgânicos, aminoácidos, açúcares, lipídeos, proteínas e resíduo final aparecem marcados com ¹⁴C. Esses resultados evidenciam, também que acetato-2-¹⁴C é mais eficiente na marcação de compostos orgânicos do que o acetato-1-¹⁴C que por sua vez produz uma taxa maior de ¹⁴CO₂ libertado.

A Figura 1 mostra 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 1).

Cuadro 1.—Distribuição do ¹⁴C proveniente do acetato 1-¹⁴C nas frações de folhas de café, em porcentagem da atividade administrada

Minutos Frações	15	30	45	60	90	120	150	180
CO ₂ libertado durante a incubação								
CO ₂	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	3,00	3,856	2,595	4,124	4,121	3,745	4,933
Fração insolúvel em etanol 80%								
Proteínas	0,087	0,071	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

Cuadro 2.—Distribuição do ^{14}C proveniente do acetato $-2\text{-}^{14}\text{C}$ nas frações de folhas de café em porcentagem da atividade administrada.

Mínutos Frações	15	30	45	60	90	120	150	180
CO ₂ libertado durante a incubação								
CO ₂	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

Os lipídeos de reserva aparecem como glicerídeos de ácidos graxos superiores (6). Degradados por lipases produzem glicerol e ácidos graxos. Estes últimos são degradados via Beta-oxidação, fornecendo acetil-CoA, substrato da respiração. Newcomb e Stumpf (10), 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 extramitocondriais que sustentam acetil-CoA para a síntese de ácidos graxos que são respectivamente a cisão do citrato e a ação da acetil-tioquinase.

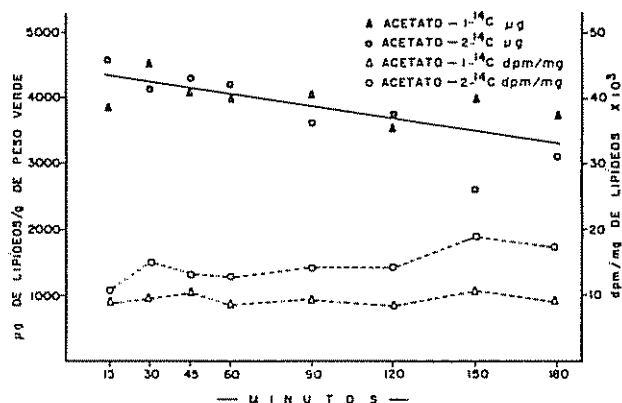


Fig 1—Teor e atividade específica de lipídeos de folhas destacadas de café.

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

Confrontando os gráficos da Figura 1 podemos deprender 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}C por miligramo de lipídeos tendem a aumentar.

A Figura 2 mostra a variação do teor e da atividade específica de açúcares totais em folhas destacadas de café. Nota-se aí que há uma tendência de se

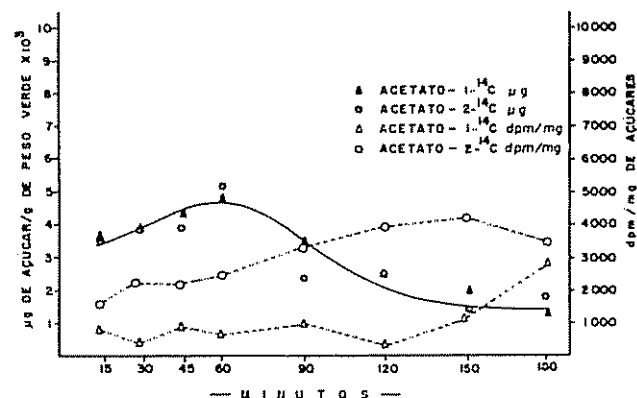


Fig 2—Teor e atividade específica de açúcares de folhas destacadas de café.

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 (Figura 2) parece indicar que degradação e síntese são simultâneas. Esse processo será possível se considerarmos a existência do ciclo do glioxilato (2) que poderia usar o acetil-CoA da beta-oxidação de lipídeos para sintetizar açúcares.

A Figura 3 mostra os teores e a atividade específica de ácidos orgânicos de folhas destacadas de cafeeiro. Nos 45 minutos iniciais houve um acúmulo de ácidos orgânicos seguindo-se um decréscimo que atingiu um mínimo quando novamente apareceu uma tendência de se acumular. Tanto o acetato-1- 14 C como o acetato-2- 14 C mostraram variação semelhante da atividade específica durante o experimento. Houve um acúmulo de 14 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.

Pode-se constatar em trabalhos realizados com ervilha que acetato- 14 C é rapidamente incorporado nos intermediários do Ciclo de Krebs e posteriormente vai se acumular em aminoácidos (5). Tal fato poderia justificar o decréscimo da atividade dos ácidos orgânicos não ocorreu variação no teor dessa fração a cos (Figura 4) mostrando que embora haja grande

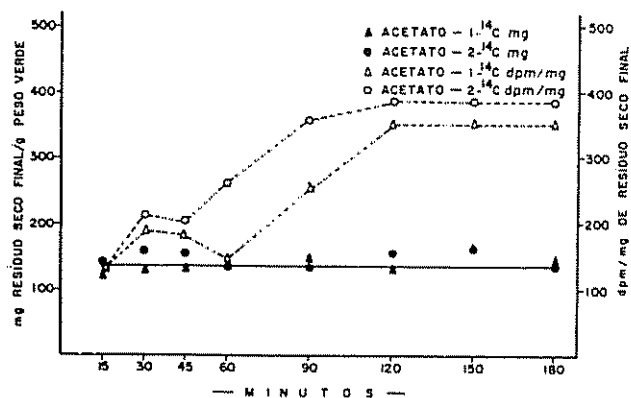


Fig. 4.—Peso e atividade específica do resíduo seco final de folhas destacadas de café.

incorporação de 14 C nos intermediários desse ciclo haveria também uma saída desse carbono para outros compostos, principalmente aminoácidos.

A Figura 4 mostra respectivamente os teores e a atividade específica do resíduo seco final. Praticamente 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 C nessa fração.

Conclusões

O estudo do metabolismo do acetato- 14 C em folhas destacadas de café (*Coffea arabica* L. cv 'Mundo Novo') permitiu concluir que tanto o acetato-1- 14 C como acetato-2- 14 C fornecem carbono para os principais compostos do metabolismo celular, tais como, açúcares, ácidos orgânicos e lipídeos.

A alta atividade específica encontrada em ácidos orgânicos e CO_2 , indica conjuntamente com os processos de síntese, uma utilização do acetato para produção de energia via Ciclo de Krebs.

O modelo de distribuição do acetato-1- 14 C e -2- 14 C mostra que o carbono metílico é mais incorporado que o carbono carboxílico.

Resumo

O presente trabalho teve como objetivo estudar o metabolismo do acetato- 14 C em folhas destacadas de cafeeiro (*Coffea arabica* cv 'Mundo Novo').

As folhas foram incubadas com 10 μCi de acetato-1- 14 C e com 10 μCi de acetato-2- 14 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 CO_2 libertado durante a incubação foi retido em discos de papel de filtro embebido em hiamina para posterior detecção da radioatividade.

Após a incubação o material, homogeneizado em etanol 80% em ebulição, forneceu duas frações, uma solúvel e outra insolúvel. A fração solúvel por cromatografia de troca iônica originou as frações ácidos

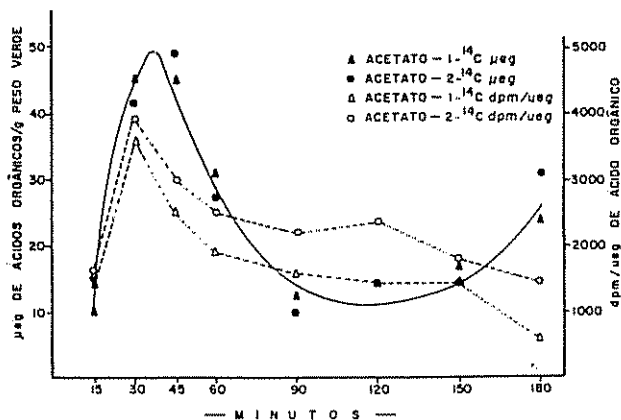


Fig. 3.—Teor e atividade específica de ácidos orgânicos de folhas destacadas de café.

orgânicos e açúcares. A fração insolúvel tratada com éter etílico separou os lipídeos.

O acetato- ^{14}C foi metabolizado pelas folhas des-tacadas de cafeeiro fornecendo o carbono para ácidos orgânicos, açúcares e lipídeos. A atividade dos ácidos orgânicos e do CO_2 mostrou que ocorreu também utilização do acetato para produção de energia via Ciclo de Krebs.

Resumen

Este trabajo tiene como objetivo estudiar el metabolismo del acetato ^{14}C en hojas separadas de café (*Coffea arabica* L. cv. 'Mundo Novo'). Las hojas fueron incubadas con $10 \mu\text{Ci}$ de acetato-1 ^{14}C y con $10 \mu\text{Ci}$ de acetato-2- ^{14}C en ausencia de luz. La interrupción de la incubación fue hecha con HCL 2N después de pasados 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150 y 180 minutos. El CO_2 liberado durante la incubación fue retenido en discos de papel de filtro embebido en hiamina para una posterior detección de radioactividad.

Después de la incubación, el material, homogeneizado en etanol 80% en ebullición, proporcionó dos fracciones, una soluble y otra insoluble. La fracción soluble dio lugar, por cromatografía de intercambio iónico, las fracciones ácidos orgánicos y azúcares. La fracción insoluble tratada con éter etílico separó los lípidos.

El acetato- ^{14}C fue metabolizado por las hojas separadas de la planta de café, proporcionando el carbono para los ácidos orgánicos, azúcares y lípidos. La actividad de los ácidos orgánicos y del CO_2 mostró que también ocurrió una utilización del acetato para la producción de energía vía el ciclo de Krebs

Literatura citada

- 1 ARZOLA, J. D. P., ARISTIZABAL, G. V. Análise cromatográfica quantitativa de ácidos orgânicos. Boletín Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz". Piracicaba, São Paulo, 1967. 10 p.
- 2 BEEVERS, H. Metabolic production of sucrose from fat. *Nature* 191: 433-436. 1961.
- 3 BRASIL, O. G. e CROCOMO, O. J. Acetate as carbon source for amino acids in coffee seedlings. *Ciência e Cultura*, 26 (12): 1116-1117. 1974.
- 4 BRAY, G. A. A simple efficient liquid scintillator for counting aqueous solutions in a liquid scintillation counter. *Analytical Biochemistry* 1: 279-285. 1960.
- 5 CAMERON, D. S. e COSSIN, E. A. Studies of intermediary metabolism in germinating Pea cotyledons. The pathways of ethanol metabolism and the role of the tricarboxylic acid cycle. *Biochemistry Journal* 105: 323-33. 1967.
- 6 CROCKER, W. e BARTON, I. V. Physiology of seeds. Vol. 28. Waltham, Chronica Botanica 1953.
- 7 CROCOMO, O. J. e ROSSI, C. Determinação quantitativa de putrescina por cromatografia em papel de filtro. *Anais da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"* 24: 131-140. 1967.
- 8 CROCOMO, O. J.; BASSO, I. C. e BRASIL, O. G. Formation of N carbamylputrescine from citruline in *Sesamum*. *Phytochemistry* 9: 1487-1489. 1970.
- 9 GUTIERREZ, H. C. Contribuição ao significado fisiológico da relação Ca/K em gergelim (*Sesamum indicum* L.). Tese - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, São Paulo, 1968. 46 p. Mimeo.
- 10 NEWCOMB, E. H. e STUMPF, P. K. Fat metabolism in higher plants. I. Biogenesis of higher fatty acids by slices of peanuts cotyledons. *Journal of Biological Chemistry* 200: 231-239. 1953.
- 11 NUCLEAR CHICAGO INSTRUCTIONS. Preparations of samples for liquid scintillation counting. Section 140. Chicago. (sem data).
- 12 STRAUS, B. S. Studies of the metabolism of acetate by acetate requiring mutants of *Neurospora crassa*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 55:77-91. 1955.

Reseña de Libros

SITTIG, MARSHALL. Incineration of industrial hazardous wastes and sludges. Park Ridge, N. J., 1979. 348 p. (Pollution Technology Review Nº 63). US\$ 48 net.

La incineración, desde el punto de vista industrial, es un proceso controlado que usa la combustión para convertir un desecho en un material menos voluminoso, menos tóxico, o menos nocivo. Esta definición es más amplia que la oficial y la etimológica (reducción a cenizas), que toma en cuenta sólo un producto de la combustión, sin mencionar otros importantes como el agua (entre los líquidos) y el dióxido de carbono (entre los gases), y otros de menor volumen pero que preocupan más, debido a sus efectos ambientales, que contienen azufre, nitrógeno y los elementos halógenos. Cuando los productos de la combustión en un proceso de incineración contienen compuestos indeseables, se requiere un proceso secundario de pos-combustión (principalmente para quemar gases), purificación, o infiltración, para bajar las concentraciones a niveles aceptables, antes de liberarlos a la atmósfera.

Este libro está diseñado especialmente para suministrar consejos y ayuda a las industrias para que cumplan estrictamente las reglas vigentes y proyectadas de la Ley de Recuperación y Conservación de los Recursos (RCRA) de los Estados Unidos y cuyo cumplimiento está a cargo de la Environmental Protection Agency (EPA). Estas disposiciones, así como la prohibición de ciertos aditivos a los alimentos, son seguidos por muchos de los países del Tercer Mundo y algunos de los industriales. Trata la obra de la incineración de desechos sólidos y líquidos y procesos similares (como la pirolisis), en forma tal que las operaciones se conduzcan con la atención apropiada para la destrucción completa de los materiales tóxicos, la purificación eficiente de los gases, y el tratamiento de los líquidos de lavado. Se basa en varios estudios producidos por varias reparticiones gubernamentales, o encargados por estas a organismos de investigación, y completados con las descripciones de las patentes pertinentes.

Se tratan ligeramente también alternativas para la eliminación de desechos, como rellenos sanitarios, esparcimiento a tierras, descomposición natural, y su eliminación en los océanos y en pozos profundos. La mayor parte de estos sistemas alternativos son objeto de sendos libros de Noyes Data.

Se examinan los tipos de desechos que se puede incinerar, con amplias listas de productos orgánicos e inorgánicos (sales de mercurio, hidrazina) susceptibles al proceso. Se presentan los requerimientos legales, los factores para seleccionar los sistemas de incineración, la preparación previa del material y los tipos de incineradores (la parte más extensa de la obra). Se presentan al final listas de las fuentes bibliográficas usadas, e índices de patentes, inventores y compañías que poseen esas patentes. La tabla de contenido es bastante detallada y puede servir de índice de materias.

JACOBS, WILLIAM P. Plant Hormones and Plant Development. Cambridge University Press Cambridge, London, New York, Melbourne 1979, 339 p.

Se han escrito muchos libros sobre hormonas y desarrollo de plantas. En parte son textos sofisticados, con muchos detalles o simposios, en parte textos simples para estudiantes. Aunque el presente libro aparentemente es apenas uno más en la lista, al leerlo cuidadosamente se nota que se empleó un enfoque bastante diferente del tema. Si usualmente el lector se enfrenta apenas con la o las opiniones vigentes en el momento de publicarse el libro, tal vez sea confrontado con unas teorías aparentemente elaboradas y conclusivas, lo que puede resultar en distorsiones por tratarse de tópicos "fijados" o "congelados", como expresó el autor en el prefacio. Según él, la ciencia se encuentra en un estado fluido, sujeto a cambios constantes e innovaciones en la interpretación de los resultados de investigación.

Esta es la principal razón que indujo al autor a salir de la presentación rutinaria y utilizar un estilo dinámico, en el sentido de repasar para cada tópico la literatura, desde el descubrimiento o comienzo hasta las hipótesis más avanzadas. Esta revisión histórica permite al lector asimilar mejor las opiniones actuales, si se perciben como una secuencia lógica del pensamiento. De este modo el texto resulta sumamente ameno y se lee casi como una novela, desde el descubrimiento hasta el conocimiento actual de cada tópico.

El énfasis de la obra ocurre al abordar, el autor, el descubrimiento de las hormonas de las plantas vasculares y cómo tales hormonas controlan y coordinan el desarrollo de esas plantas, en su fisiología y anatomía, las áreas de mayor experiencia del autor. Las discusiones de los diferentes aspectos están basadas solamente en trabajos publicados, considerados por el autor de la más alta calidad científica. La combinación de la discusión crítica de experimentos y el desarrollo histórico de las hipótesis resultó en la falta de suficiente espacio para tratar en detalle todos los aspectos de la acción de las hormonas. Por esta razón el autor indica otros textos específicos para profundizar en el tema.

El libro está dirigido a estudiantes graduados y de posgrado. Debido a su fácil lectura y comprensión de la materia es un texto muy recomendable que consta de 11 capítulos: 1) Polaridad, fototropismo y descubrimiento de la auxina; 2) La acción de la luz en el fototropismo; 3) La naturaleza química de la auxina endógena; 4) Otros efectos de la auxina sobre el desarrollo; 5) La base bioquímica de la acción de la auxina; 6) Desarrollo de hojas y yemas y citocininas; 7) Hormonas de floración y giberelinas; 8) Abscisión y ácido abscísico; 9) Movimiento de hormonas; 10) Raíces y hormonas; 12) Retrospecto. Unas 870 referencias, un índice de autores y uno de materias completan este valioso libro.

I. MULLER
CATIE, TURRIALBA
COSIA RICA