

INIBIÇÃO DO DESENVOLVIMENTO *IN VITRO* DE EMBRIÕES DE *Coffea* POR CAFEÍNA EXÓGENA¹

STTELA DELLYZETE VEIGA FRANCO DA ROSA², CÍNTIA GUIMARÃES DOS SANTOS³, RENATO PAIVA⁴, PATRÍCIA LEONARDO QUEIROZ DE MELO⁵, ANDRÉ DELLY VEIGA⁶, ADRIANO DELLY VEIGA⁷

RESUMO - A cafeína, alcalóide conhecido como 1,3,7-trimetilxantina, é encontrada em sementes quiescentes de cafeeiro, perfazendo um total de 1,1 a 1,7% em *Coffea arabica* L. e 2 a 3% em *Coffea canephora* Pierre, localizada em sua grande maioria no endosperma, na forma livre no citoplasma das células ou complexada com ácidos clorogênicos. Com função fisiológica em plantas ainda não totalmente esclarecida, a cafeína causa efeito alelopático, seja inibindo a germinação de várias espécies, seja como anti-herbívoro ou como agente pesticida natural. A lenta germinação de sementes de café ainda não foi esclarecida e várias causas são apontadas, como presença do endocarpo, baixa absorção de água e O₂, presença de inibidores naturais e balanço hormonal. Embora sugeridos, estudos sobre a inibição de sementes de cafeeiro por ação da cafeína endógena e ou exógena são escassos. Assim, o presente trabalho teve como objetivo estudar o efeito da cafeína exógena sobre a germinação e o desenvolvimento de embriões de *Coffea arabica* L. e de *Coffea canephora* Pierre. O experimento foi realizado utilizando-se frutos no estágio cereja das cultivares Rubi e Apotã IAC-2258. Após desinfestação dos frutos por 30 minutos de imersão em hipoclorito de sódio (2% i.a.) e lavagem por três vezes em água destilada e autoclavada, os embriões foram retirados e inoculados, de modo asséptico, em placas de petri com meio MS 50%, acrescido de sacarose e suplementado com diferentes concentrações de cafeína (0,00; 0,05; 0,10; 0,15; 0,20; 0,25; 0,30 e 0,40%). Os embriões foram mantidos em sala de crescimento a 27 ± 2°C e densidade de fluxo de fótons de 13 μmol.m⁻².s⁻¹, durante 23 dias, quando foram avaliados comprimento da parte aérea, comprimento de raiz e massa fresca das plântulas. Cinco dias após o cultivo, foram avaliadas a porcentagem de emissão de radículas e cotilédones, computando-se os embriões com cotilédones abertos e radículas expandidas. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado com seis repetições por tratamento, sendo cada repetição constituída por cinco embriões. Concluiu-se que a germinação e o desenvolvimento *in vitro* de embriões de *Coffea arabica* L. e *Coffea canephora* Pierre são afetados por cafeína exógena. O efeito detrimental da cafeína exógena em embriões de *Coffea* é maior nas radículas do que nos cotilédones. Embriões de *Coffea arabica* L. são mais sensíveis aos efeitos negativos da cafeína exógena do que embriões de *Coffea canephora* Pierre. A cafeína pode contribuir para a lenta germinação de sementes e o lento desenvolvimento de plântulas de cafeeiro.

Termos para indexação: café, germinação, alelopatia, inibidor.

INHIBITION OF *IN VITRO* DEVELOPMENT OF *Coffea* EMBRYOS BY EXOGEN CAFFEINE

ABSTRACT – Caffeine, the alkaloid known as 1,3,7 - trimetilxantina, is found in quiescent coffee seeds, amounting to a total of 1.1 to 1.7% in *Coffea arabica* L. and 2 to 3% in *Coffea canephora* Pierre, mostly localized in the endosperm, in the free cytoplasm of cells or complexed with chlorogenic acids. With the physiological function in plants not yet completely understood, caffeine causes an allelopathic effect, either inhibiting germination of a number of species or as an anti-herbivore or a natural pesticide agent. The slow germination of coffee seeds has not yet been

¹ Submetido em 14/09/2005. Aceito para publicação em 30/05/2006 ;

² Pesquisador, Dr., Embrapa Café, Cepecafê/DAG/UFLA, Caixa Postal 37, CEP: 37.200-000, Lavras - MG, sttelaveiga@ufla.br;

³ Doutoranda em Fisiologia Vegetal, UFLA;

⁴ Professor, Dr., DBI/UFLA;

⁵ Aluna de graduação em Agronomia, UFLA;

⁶ Doutorando em Agronomia, UFLA;

⁷ Mestrando em Agronomia, UFLA. adarveiga@yahoo.com.br.

elucidated and several causes are pointed to, such as the presence of the endocarp, low water and O₂ uptake and presence of natural inhibitors and hormonal balance. Although suggested, studies on coffee seed inhibition by the action of endogenous or exogenous caffeine are scarce. Thus, the present study was designed to investigate the effect of exogenous caffeine on both germination and embryo development of *Coffea arabica* L. and *Coffea canephora* Pierre. The experiment was conducted by utilizing seeds from red ripe berries of the cultivars Rubi and Apatã IAC-2258. After disinfecting the berries for 30 minutes by soaking in sodium hypochlorite (2% a.i.) and washing three times in distilled water and autoclaved, the embryos were removed and inoculated in a aseptic manner, in Petri dishes with 50% MS medium with the addition of sucrose and supplemented with different concentrations of caffeine (0.00; 0.05; 0.10; 0.15; 0.20; 0.25; 0.30 and 0.40%). The embryos were maintained in a growth room at 27±20°C and photon flow density of 13 μmol.m⁻².s⁻¹ for 23 days, when shoot length, root length and seedling fresh mass were evaluated. Five days after cultivation, the percentage of radicle emission and that of cotyledons were evaluated, calculating the embryos with open cotyledons and with expanded radicles. A complete randomized experimental design was used six replications per treatment, each replicate consisting of five embryos. It follows that germination and *in vitro* development of embryos of *Coffea arabica* L. and of *Coffea canephora* Pierre are affected by exogenous caffeine. The detrimental effect of exogenous caffeine on *Coffea* embryos is greater on the radicles than on the cotyledons. *Coffea arabica* L. embryos are more sensitive to the negative effects of exogenous caffeine than embryos of *Coffea canephora* Pierre. Caffeine can contribute to the slow seed germination and slow coffee seedling development.

Index terms: coffee, germination, allelopathy, inhibitor.

INTRODUÇÃO

Sementes de cafeeiro possuem diversos alcalóides, tais como cafeína, theobromine, theofiline e paraxantine, além dos ácidos clorogênico, ferúlico, cumárico, cafêico e vanílico (Chou e Waller, 1980; Waller et al., 1986). A cafeína, quimicamente conhecida como 1,3,7-trimetilxantina, é o alcalóide encontrado em maior quantidade em diversos tecidos e órgãos do cafeeiro, principalmente nas sementes, flores e folhas. Segundo Waller et al. (1986), a cafeína é sintetizada no pericarpo, transportada e acumulada no endosperma da semente durante o desenvolvimento do fruto e perfaz de 1 a 2% da massa seca de sementes de cafeeiro ou média de 40mM.

De toda a cafeína presente em sementes quiescentes de *Coffea arabica* L., cultivar Bourbon, somente 0,6% (bs) estão armazenadas no embrião e as restantes 1,4%, no endosperma adjacente. No entanto, durante a germinação, 75% da cafeína da semente é translocada para a plântula em desenvolvimento (aproximadamente 84% nos cotilédones, 14% no hipocótilo e 2% na raiz primária) (Friedman e Waller, 1983a).

Segundo Chaves et al. (2004), a cafeína ocorre livre no citoplasma ou complexada com ácidos clorogênicos, na forma de sais de potássio. Dentan (1985), em estudos sobre

histologia e ultraestrutura de grãos de cafeeiro, utilizando diversas técnicas eletrônicas, detectou formas livres (cristais exagonais) de cafeína no citoplasma e concluiu que sua localização precisa apresentava limitações técnicas, uma vez que ela poderia estar complexada a ácidos clorogênicos no periplasma de células parenquimatosas.

Waldhauser e Baumann (1996) também afirmaram que sementes de cafeeiro acumulam alcalóides, principalmente cafeína e ácidos clorogênicos em forma correlacionada, ou seja, alta concentração de um componente acompanha o acúmulo do outro e uma característica comum destes componentes é que eles interagem físico-quimicamente, formando complexo 1:1.

Embora a função fisiológica da cafeína, assim como de outros alcalóides em plantas, ainda não esteja totalmente esclarecida, diversos estudos indicam que esta age como agente alelopático, anti-herbívoro, molécula armazenadora de nitrogênio ou possível envolvimento com a resistência às doenças (Mazzafera et al., 1996). Apesar de sementes de cafeeiro conterem considerável quantidade de cafeína, vários trabalhos mostraram que durante a germinação, este alcalóide não atuaria como fator nutritivo (Baumann e Gabriel, 1984; Suzuki e Waller, 1987; Mazzafera, 1990).

Está bem documentada na literatura a atuação da cafeína como substância alelopática, inibindo a germinação de sementes ou crescimento de plântulas (Chou e Waller, 1980; Waller et al., 1986; Smyth, 1992; Pereira et al., 2002) ou como agente pesticida natural (Rizvi et al., 1987; Bojo e Mantle, 2000; Chaufoun et al., 2000).

Extratos aquosos de tecidos de plantas de *C. arabica*, como folhas, caules e raízes, inibiram a germinação e o crescimento de radículas de arroz e alface; o crescimento de plântulas de alface foi inibido mesmo em concentrações de 1% dos extratos aquosos, os quais continham cafeína dentre outros constituintes alelopáticos (Chou e Waller, 1980). Segundo os autores, foram identificados nestes extratos diversos componentes como cafeína, theobromine, theofiline, paraxantine e os ácidos clorogênicos, ferúlico, cumárico e caféico, sendo que, exceto este último, todos exibiram efeito alelopático, em uma concentração de 0,01%.

Smyth (1992) utilizou vários compostos do grupo metilxantinas para testar sua relativa eficiência como regulador de crescimento de plântulas de arroz. A cafeína foi o composto que inibiu mais efetivamente o crescimento das plântulas, sendo que 0,05% inibiu 50% do alongamento das plúmulas e 90% das radículas, indicando que as raízes são mais sensíveis do que as folhas, apesar da mesma concentração de cafeína ter se acumulado em ambos os órgãos. Segundo o autor, aparentemente, plúmulas possuem mecanismos mais efetivos do que radículas na manutenção do crescimento na presença de cafeína.

Diversos estudos realizados em laboratório (Baumann e Gabriel, 1984; Friedman e Waller, 1983a; Suzuki e Waller, 1987) demonstraram que sementes de cafeeiro liberam cafeína, podendo, inclusive causar autoinibição durante o processo da germinação. Baumann e Gabriel (1984) concluíram que, após sete dias de embebição, menos do que 1% da cafeína da semente é encontrada no substrato de germinação, indicando a existência de uma forte barreira à difusão na superfície da semente de café; mas mais tarde, após a germinação, quando a radícula já havia penetrado no substrato, uma considerável quantidade de cafeína (22%) é lixiviada para o meio, podendo agir contra predadores.

Friedman e Waller (1983a) estudaram o efeito de cafeína exógena sobre o crescimento de plântulas de cafeeiro originadas da germinação de sementes inteiras e de sementes livres do endocarpo, para identificar, nos tecidos do embrião, os locais de susceptibilidade ou resistência à cafeína e também para especular sobre as possíveis estratégias pelas quais os embriões de café escapam da autotoxidez durante a

germinação. Os autores reportaram que concentração exógena de cafeína de 10mM (quatro a seis vezes menor do que a concentração endógena nas sementes) inibe o crescimento das radículas de *C. arabica* e também as divisões celulares durante a germinação de sementes, indicando que os embriões de café têm maneiras estratégicas para evitar a autotoxidez. Suas observações em sementes germinando na ausência de cafeína exógena indicaram que as divisões celulares nas extremidades das radículas iniciam-se somente após a sua expulsão para fora do endosperma rico em cafeína, pela ação de simples alongamento celular do hipocótilo. A cafeína, inicialmente presente no endosperma, é introduzida nos cotilédones após o início da divisão celular na extremidade da raiz. Portanto, segundo os autores, sementes de café podem escapar dos efeitos da autotoxidez de cafeína endógena, pela separação entre os locais onde a divisão celular está ocorrendo e aqueles onde a cafeína está presente, o que é conseguido, na raiz, pela separação espacial e, nos cotilédones, pela separação temporal. Os autores sugerem, para a cafeína, uma função de protetor natural das sementes de café contra agentes biológicos externos como fungos, bactérias e plantas daninhas.

Estudando a presença de inibidores da germinação no endocarpo e no espermoderma (película prateada) de sementes de cafeeiro, Pereira et al. (2002) verificaram ação inibidora do extrato aquoso de espermoderma na germinação de sementes de alface. Os autores concluíram que a substância inibidora presente no espermoderma é cafeína e que, portanto, este alelopático pode também contribuir para a lenta germinação de sementes de cafeeiro.

Variações nos teores de cafeína em sementes são observadas entre variedades de uma mesma espécie e também entre diferentes espécies de cafeeiro. Mazzafera e Magalhães (1991), em trabalho de determinação dos teores de cafeína em folhas e em sementes de várias espécies do gênero *Coffea*, detectaram, para as espécies de *C. arabica* mais cultivadas, valores entre 0,618% (var. Laurina) até 1,343% (var. Catuaí) e para a espécie *C. canephora*, valores de 1,710% (var. Robusta) até 2,454% (var. Kouillou). Chaves et al. (2004) também detectaram maior teor de cafeína na variedade Robusta, da espécie *C. canephora*, em relação às diversas variedades da espécie *C. arabica*.

Waldhauser e Baumann (1996) também relataram maiores teores de cafeína para *C. canephora* Pierre, de 2 a 3% (com base em massa fresca), do que para *C. arabica* L., de 1,1 a 1,7%. Em estudos para a verificação da lixiviação de potássio, condutividade elétrica e teor de cafeína de grãos de

café arábica e conilon, Fernandes et al. (2000) encontraram teores de cafeína variando entre 0,6 a 1,5% em grãos de café arábica e constataram que grãos de café conilon apresentam teores mais elevados.

A lenta germinação de sementes de cafeeiro ainda não foi esclarecida, embora seja sempre evidenciada em estudos sobre aspectos fisiológicos desta espécie. Têm sido sugeridas como prováveis causas, a presença do endocarpo (Valio, 1976; Rena e Maestri, 1986; Guimarães, 1995), a baixa absorção de água e O₂ (Bendaña, 1962; Rena e Maestri, 1986), a presença de inibidores naturais (Friedman e Waller, 1983b; Waller et al., 1986; Pereira et al., 2002) ou o balanço hormonal (Válio, 1976; Silva et al., 2004).

Em face da escassez de trabalhos sobre a inibição de sementes de cafeeiro por ação da cafeína, o presente estudo foi realizado com o objetivo de verificar o efeito deste alcalóide sobre a germinação e o crescimento de embriões de *C. arabica* L. e *C. canephora* Pierre.

MATERIALE MÉTODOS

Os trabalhos foram realizados no Laboratório de Cultura de Tecidos, do Setor de Fisiologia Vegetal, Departamento de Biologia/UFLA. Foram utilizados como explantes, embriões retirados de frutos no estágio cereja de *C. arabica* L., cv. Rubi, e de *C. canephora* Pierre, cv. Apoatã IAC-2258, coletados nos campos experimentais do Setor de Cafeicultura da Universidade Federal de Lavras.

Os frutos foram desinfestados, por meio da imersão em hipoclorito de sódio (2% i.a.), durante 30 minutos, em seguida lavados três vezes em água destilada e autoclavada e transferidos para placas de Petri esterilizadas, contendo papel de filtro, onde foram cortados para a retirada dos embriões. Os embriões foram, então, inoculados em placas de Petri contendo meio MS 50% (Murashige e Skoog, 1962), acrescido de 3% de sacarose, solidificado com 0,7% de ágar e, após a autoclavagem, suplementado com diferentes concentrações de cafeína. Foram utilizadas as concentrações de 0,00; 0,05; 0,10; 0,15; 0,20; 0,25 e 0,30% para os embriões de *C. arabica* L. e, para os embriões de *C. canephora* Pierre, além destas, acrescentou-se a concentração de 0,40%. O pH do meio foi ajustado em 5,8 e o meio de cultura foi autoclavado a 121°C por 15 minutos.

Depois de inoculados, os embriões foram mantidos em sala de crescimento a 27±2°C e densidade de fluxo de fótons de 13mmol.m⁻².s⁻¹, durante 23 dias, quando foram realizadas as avaliações por meio dos seguintes testes:

Porcentagem de emissão de cotilédones – após cinco dias da inoculação, foram contados os embriões que apresentavam cotilédones emitidos e os resultados expressos em porcentagem.

Porcentagem de enraizamento – após cinco dias da inoculação, foram contados os embriões que apresentavam enraizamento e os resultados expressos em porcentagem.

Avaliação de plântulas – após vinte e três dias de cultivo, foram avaliadas as plântulas, medindo-se comprimento da parte aérea, comprimento da raiz principal e a massa fresca total das plântulas.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com seis repetições por tratamento, sendo cada repetição constituída por cinco embriões. Para as comparações de médias, utilizou-se o teste de Scott Knott a 5% de probabilidade, transformando-se os dados percentuais em $[(\arcsin X \cdot 100^{-1/2}) + 0,5]$. Foram, ainda, realizadas análises de regressões polinomiais para as variáveis e as concentrações de cafeína. Todas as análises foram realizadas por meio do programa Sisvar (Ferreira, 2000).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Pelos resultados obtidos, verificou-se que a germinação e o desenvolvimento *in vitro* de embriões de *C. arabica* L. e *C. canephora* Pierre são afetados por cafeína exógena. Observou-se que, para os embriões de *C. arabica*, as concentrações de cafeína causaram efeitos altamente significativos sobre a porcentagem de enraizamento, comprimento de raiz e de cotilédone e de massa fresca da plântula. Já para os embriões de *C. canephora*, os efeitos foram significativos sobre a porcentagem de enraizamento, comprimento de raiz e massa fresca da plântula, sendo que a emissão e o desenvolvimento dos cotilédones não foram afetados pela adição de cafeína exógena.

Na Figura 1, observa-se que quanto maior a concentração de cafeína exógena, menor é a porcentagem de enraizamento dos embriões, para as duas espécies estudadas. Concentração de cafeína de 0,25% reduziu a zero a porcentagem de enraizamento de embriões de *C. arabica* e a 37% a de *C. canephora*. Já o efeito da cafeína exógena sobre a porcentagem de emissão de cotilédones não foi significativo para ambas espécies. A mesma concentração de cafeína exógena, de 0,25%, também reduziu a zero o comprimento médio de raiz em plântulas de *C. arabica* e de *C. canephora*, aos 23 dias de desenvolvimento (Figura 2).

Com relação à massa fresca das plântulas cultivadas *in*

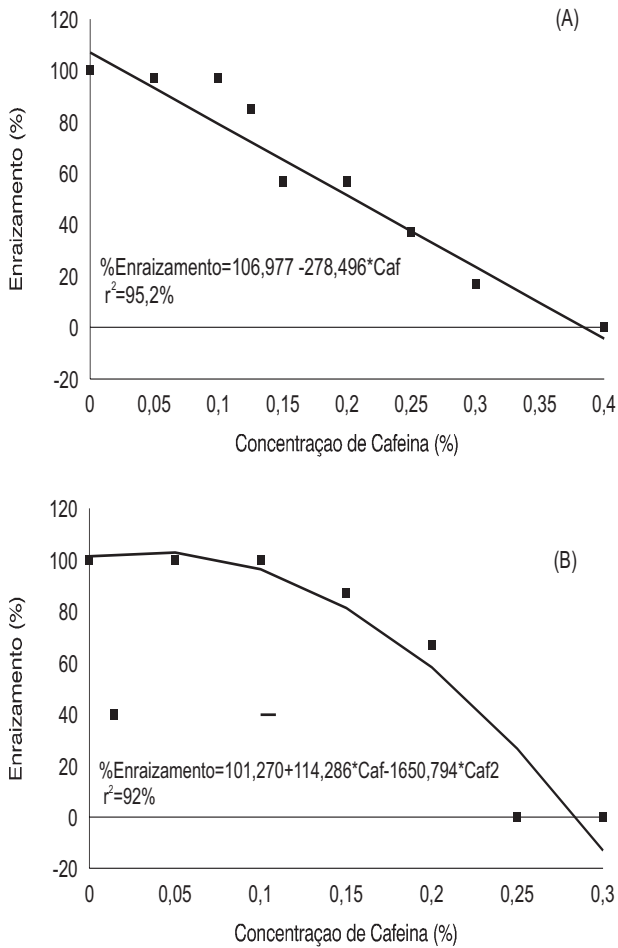


FIGURA 1. Efeito de diferentes concentrações de cafeína exógena na porcentagem de enraizamento de embriões de *Coffea canephora*, cv. Apatã (A) e *Coffea arabica*, cv. Rubi (B), cultivados *in vitro*. Embrapa Café/UFLA, 2005.

in vitro, foi verificado um efeito drástico nos embriões de *C. arabica* (Figura 3), já na concentração mínima de cafeína adicionada ao meio de cultura, ou seja, de 0,05%. Houve um decréscimo de aproximadamente 75% da massa fresca das plântulas cultivadas nesta concentração, reduzindo de 80mg, na ausência de cafeína, para aproximadamente 20mg, na concentração de 0,05%. Já para a espécie *C. canephora*, cujas plântulas apresentaram menores valores de massa fresca, esta mesma redução ocorreu apenas quando foram adicionados 0,40% de cafeína ao meio de cultura, concentração que proporcionou um valor de massa fresca de aproximadamente 6mg.

Estes resultados indicam que embriões de *C. canephora* apresentam menor sensibilidade aos efeitos de cafeína exógena do que embriões de *C. arabica*. Está documentado na literatura que grãos de *C. canephora* possuem maiores concentrações

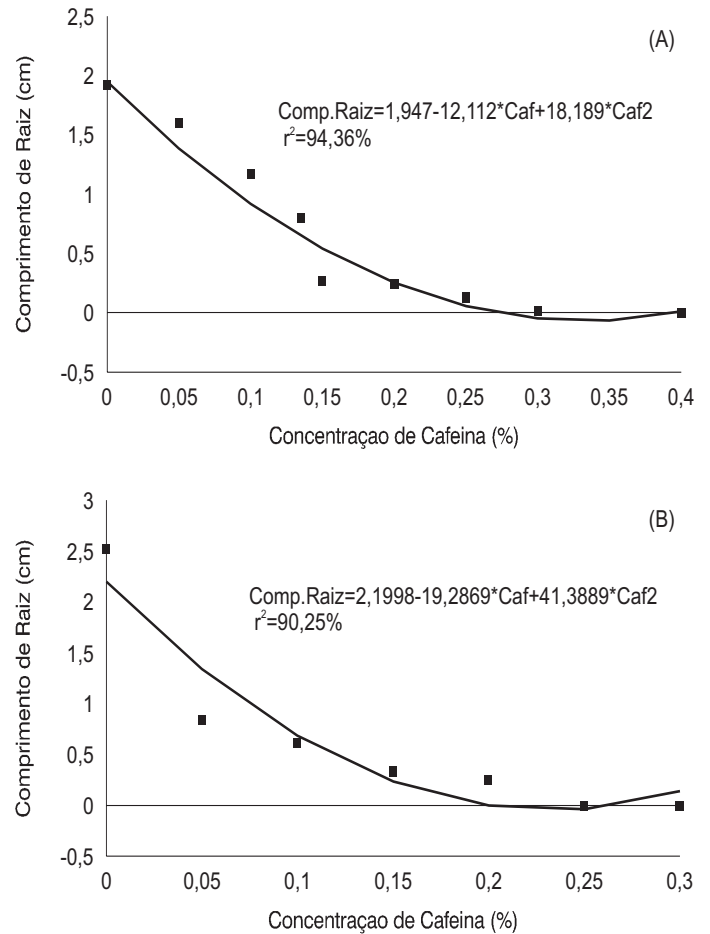


FIGURA 2. Efeito de diferentes concentrações de cafeína exógena no comprimento de raiz de embriões de *Coffea canephora*, cv. Apatã (A) e *Coffea arabica*, cv. Rubi (B), cultivados *in vitro*. Embrapa Café /UFLA, 2005.

endógenas de cafeína do que grãos de *C. arabica* (Mazzafera e Magalhães, 1991; Fernandes et al., 2000; Chaves et al., 2004), mas não foram encontrados relatos de estudos sobre a sensibilidade de sementes ou de embriões de *C. canephora* aos efeitos da cafeína.

Os efeitos da cafeína exógena foram mais drásticos sobre o crescimento das raízes do que da parte aérea das plântulas originadas do cultivo *in vitro* de embriões de café, tanto em *C. arabica* quanto em *C. canephora*. A Figura 4 mostra o aspecto geral de plântulas de *Coffea arabica*, cv. Rubi, cultivadas nas diferentes concentrações de cafeína, onde pode ser observada maior sensibilidade das raízes em relação aos cotilédones. Observou-se que, nas plântulas de *C. arabica* (Figura 4), mesmo na maior concentração de cafeína adicionada ao meio de cultura, houve pequeno desenvolvimento do hipocótilo e da plúmula e, no entanto, não ocorreu

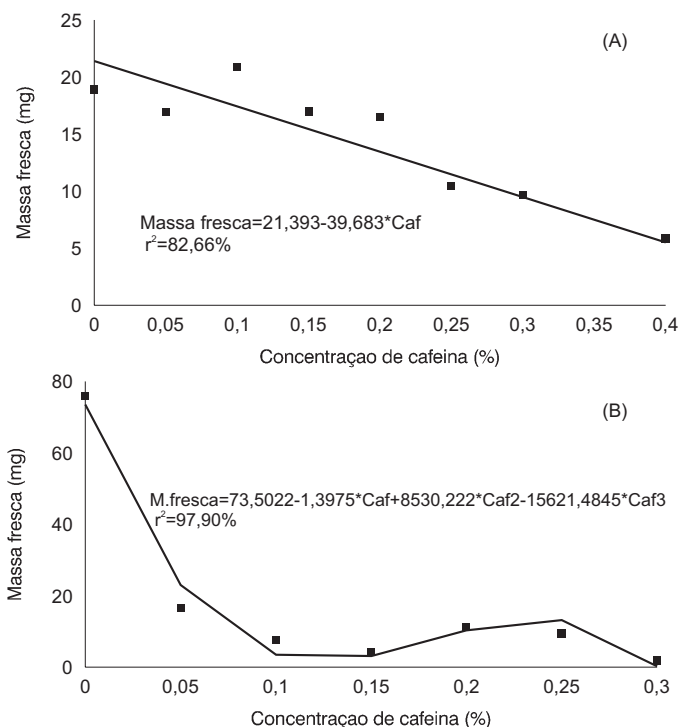


FIGURA 3. Efeito de diferentes concentrações de cafeína exógena na massa fresca de plântulas oriundas de embriões de *Coffea canephora*, cv. Apoatã (A) e *Coffea arabica*, cv. Rubi (B), cultivados *in vitro*. Embrapa Café/ UFLA, 2005.

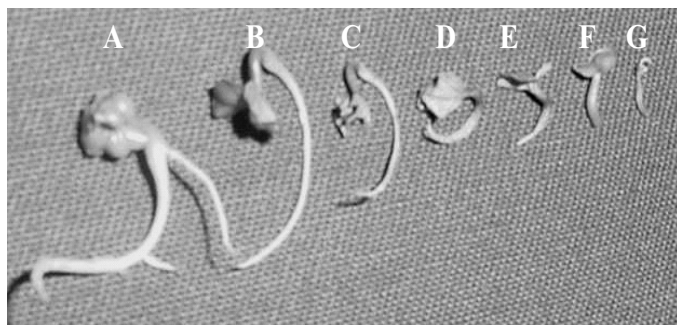


FIGURA 4. Aspecto geral do crescimento de plântulas de *Coffea arabica*, cv. Rubi, originadas de embriões cultivados em diferentes concentrações de cafeína (A) 0,00%; (B) 0,05%; (C) 0,10%; (D) 0,15%; (E) 0,20%; (F) 0,25 e (G) 0,30% aos 23 dias de cultivo. Embrapa Café/Ufla, 2005.

crescimento da radícula. Nos trabalhos desenvolvidos por Smyth (1992), cafeína exógena inibiu a germinação de sementes de arroz, centeio e alface, sendo que os efeitos mais severos foram observados nas raízes, de maneira semelhante

ao que ocorreu nos resultados obtidos para os embriões de sementes de cafeeiro.

Friedman e Waller (1983a) reportaram que a concentração de cafeína exógena de 0,2% inibiu o crescimento das radículas de sementes de *C. arabica* e as divisões celulares. Os autores sugeriram que, durante a germinação de sementes de cafeeiro, os embriões têm maneiras estratégicas para evitar a autotoxicidade, pela separação entre os locais onde a divisão celular ocorre e aqueles onde a cafeína está presente, o que é conseguido, na raiz, pela separação espacial e, nos cotilédones, pela separação temporal. Em seus estudos, nenhuma divisão celular ocorreu antes que o hipocótilo tivesse alcançado um comprimento de 1 a 3mm para fora do endosperma, o que se deu após 5 a 6 dias após o início da embebição, por simples alongamento celular e as divisões celulares na radícula iniciaram-se quando esta já encontrava-se separada espacialmente do endosperma, local de maior acúmulo inicial da cafeína. Já nos cotilédones, as divisões celulares iniciaram-se 9 a 11 dias após o início da embebição e à medida que a cafeína endógena era translocada do endosperma para o embrião (83,8% nos cotilédones, 14,2% no hipocótilo e 2,0% na radícula, após 3-4 semanas da embebição), a mitose era muito reduzida e quase completamente interrompida. Desta forma, Friedman e Waller (1983a) concluem que separações por espaço entre os locais de presença da cafeína na radícula e, por tempo, nos cotilédones, são estratégias das sementes para evitar a autotoxicidade durante a germinação.

Embora esta hipótese possa ser verdadeira, a presença da cafeína nas diversas partes do embrião (0,6% da cafeína total em sementes quiescentes, 83,4% da cafeína total transportada após três a quatro semanas da embebição), poderia contribuir para o lento desenvolvimento observado em plântulas de cafeeiro após a germinação. Friedman e Waller (1983b) sugeriram que os inibidores de germinação ou do crescimento de plântulas podem agir de maneiras diversas, segundo as condições externas, podendo prevenir prematura germinação, quando as sementes ainda estão na planta mãe, estendendo a germinação por um período maior de tempo, ou permitindo que a germinação ocorra somente quando as condições externas são propícias, garantindo o estabelecimento da plântula. Como aproximadamente 75% da cafeína inicialmente contida no endosperma das sementes são mais tarde encontradas no embrião, os autores sugerem uma função de proteção da planta em desenvolvimento, contra um largo espectro de atividade biológica no meio circundante.

Baumann e Gabriel (1984) confirmaram este possível

papel protetor da cafeína, com significância ecológica, durante a fase crítica de crescimento lento de plântulas de cafeeiro contra a germinação de outras espécies concorrentes, pela lixiviação do alcalóide para o solo adjacente e, contra predadores, pelo acúmulo nas diversas partes da plântula em desenvolvimento, ambos por efeito alelopático.

Friedman e Waller (1983a) constataram inibição do crescimento de plântulas, quando as sementes de *C. arabica* foram expostas a uma concentração de 10mM (0,2%) de cafeína e, no presente trabalho, uma concentração de 0,05% de cafeína adicionada ao meio de cultura, reduziu cerca de 80% da massa fresca de plântulas de *C. arabica*. A cafeína adicionada ao meio de cultura causou efeitos negativos ao desenvolvimento das plântulas e, portanto, a cafeína endógena de sementes de cafeeiro pode também contribuir para a sua lenta germinação.

A lenta germinação de sementes de cafeeiro tem sido atribuída a várias prováveis causas, como barreiras físicas ou químicas, presença de inibidores ou balanços hormonais e, provavelmente, todos estes fatores possam contribuir de maneira conjunta. Além disto, a germinação de sementes é um processo complexo, em que inúmeros eventos metabólicos estão envolvidos e diversos fatores atuam simultaneamente, sob um controle genético e ainda sob a interferência de diversos fatores externos. Sementes de cafeeiro são sementes cujos processos fisiológicos e bioquímicos durante a maturação, germinação, dessecação e conservação não estão, ainda, completamente compreendidos e esforços devem ser realizados para o entendimento destes processos. A cafeína é um alcalóide que, comprovadamente, causa efeitos alelopáticos negativos na germinação de sementes e no desenvolvimento de plântulas de diversas espécies e, inclusive, do próprio cafeeiro. A despeito de uma função meramente ecológica para a cafeína em plantas de cafeeiro, pesquisas são ainda necessárias para melhor elucidação dos possíveis papéis deste alcalóide.

CONCLUSÕES

A germinação e o desenvolvimento *in vitro* de embriões de *C. arabica* L. e de *C. canephora* Pierre são afetados pela adição de cafeína exógena.

O efeito detrimental da cafeína exógena em embriões de *Coffea* é maior nas radículas do que nos cotilédones.

Embriões de *C. arabica* L. são mais sensíveis aos efeitos deletérios da cafeína exógena do que embriões de *C. canephora* Pierre.

A cafeína pode contribuir para a lenta germinação de sementes e o lento desenvolvimento de plântulas de cafeeiro.

REFERÊNCIAS

- BAUMANN, T.W.; GABRIEL, H. Metabolism and excretion of caffeine during germination of *Coffea arabica* L. **Plant and Cell Physiology**, Oxford, v.25, n.8, p.1431-1436, 1984.
- BENDAÑA, F.E. Fisiología de los semillos de café. I. Problemas relativos al almacenamiento. **Turrialba**, Turrialba, v.4, n.15, p.93-96, 1962.
- BOJO, A.; MANTLE, P.G. Caffeine: also a fungal metabolite. **Phytochemistry**, Oxford, v.54, n.8, p.937-939, 2000.
- CHAUFON, S.M.; PEREIRA, M.C.; ANGÉLICO, C.L. Efeito da cafeína (1,3,7-trimethylxantina) sobre o crescimento micelial de fungos associados ao café. **Revista Brasileira de Armazenamento**, Viçosa, v.especial, n.1, p.50-53, 2000.
- CHAVES, J.C.D.; MIYAZAWA, M.; BLOCH, M.F.M.; YAMAKAMI, J.K. Estimativa do teor de cafeína nas sementes de café, baseada na sua concentração nas folhas de mudas e de plantas adultas. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v.26, n.3, p.287-292, 2004.
- CHOU, C.H.; WALLER, G.R. Possible allelopathic constituents of *Coffea arabica* L. **Journal of Chemical Ecology**, Dordrecht, v.6, p.643-639, 1980.
- DENTAN, E. The microscopic structure of the coffee bean. In: CLIFFORD, M.N.; WILLSON, K.C. (Ed) **Coffee: botany, biochemistry and production of beans and beverage**. London: Croombelm, 1985. p.284-304.
- FERREIRA, D.F. Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4.0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45., 2000, São Carlos. **Anais...** São Carlos: UFSCar, 2000.p.255-258.
- FERNANDES, S.M.; PEREIRA, R.G.F.A.; PÁDUA, F.R.M.; NERY, F.C.; SILVA, W.A. Lixiviação de potássio, condutividade elétrica e cafeína de grãos de café arábica (*Coffea arabica* L.) e conilon (*Coffea canephora* Pierre). In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 1., 2000, Poços de Caldas. **Resumos Expandidos...** Brasília: Embrapa, 2000.
- FRIEDMAN, J.; WALLER, G.R. Caffeine hazards and their prevention in germinating seeds of coffee (*Coffea arabica* L.). **Journal of Chemical Ecology**, Dordrecht, v.9, p.1099-1106, 1983a.
- FRIEDMAN, J.; WALLER, G.R. Seeds as allelopathic agents. **Journal of Chemical Ecology**, Dordrecht, v.9, n.8, p.1107-1117, 1983b.
- GUIMARÃES, R.J. **Formação de mudas de cafeeiro (*Coffea arabica* L.): efeitos de reguladores de crescimento e remoção do pergaminho na germinação de sementes e do uso de N e K em cobertura, no desenvolvimento de mudas**. 1995. 133f. Tese (Doutorado em Fitotecnia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1995.

- MAZZAFERA, P. Estudo sobre o papel da cafeína em plântulas de café (*Coffea arabica* L.). **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v.13, p.97-102, 1990.
- MAZZAFERA, P.; YAMAOKA-YANO; VITÓRIA, A.P. Para que serve a cafeína em plantas? **Revista Brasileira de fisiologia Vegetal**, Campinas, v.8, n.1, p. 67-74, 1996.
- MAZZAFERA, P.; MAGALHÃES, A.C.N. Cafeína em folhas e sementes de espécies de *Coffea* e *Paracoffea*. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, n.14, p.157-160, 1991.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.15, p.473-497, 1962.
- PEREIRA, C.E.; VON PINHO, E.V.R.; OLIVEIRA, D.F.; SUZUKI, A.L.P. Determinação de inibidores da germinação no espermoderma de sementes de café. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v.24, n.1, p.306-311, 2002.
- RENA, A.B.; MAESTRI, M. Fisiologia do Cafeeiro. In: SIMPÓSIO SOBRE FATORES QUE AFETAM A PRODUTIVIDADE DO CAFEIEIRO, 1986, Poços de Caldas. **Anais...** Piracicaba: POTAFÓS, 1986. p.13-85.
- RIZVI, S.J.H.; RIZVI, V.; MUKERJEE, D. 1,3,7-Trimethylxantine an allelochemical from seeds of *Coffea arabica*: some aspects of its mode of action as a natural herbicide. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.98, p.81-91, 1987.
- SILVA, E.A.A.; TOOROP, P.E.; AELST, A.C.; HILHORST, H.W.M. Abscisic acid controls embryo growth potential and endosperm cap weakening during coffee (*Coffea arabica* L. cv. Rubi) seed germination. **Planta**, New York, v.220, p.251-261, 2004.
- SMYTH, D. Effect of methylxanthine treatment on rice seedling growth. **Journal Plant Growth Regulation**, New York, v.11, p.125-128, 1992.
- SUZUKI, T.; WALLER, G.R. Allelopathy due to purine alkaloids in tea seeds during germination. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.98, p.131-136, 1987.
- VALIO, I.F.M. Germination of coffee seeds. (*Coffea arabica* L.) cv. Mundo Novo. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.27, n.100, p.983-991, 1976.
- WALLER, G.R.; KUMARI, D.; FRIEDMAN, J.; FRIEDMAN, N.; CHOU, C.H. Caffeine Autotoxicity in *Coffea Arabica* L. In: PUTNAN, A.; TANG, C.S. (Ed.). **The Science of Allelopathy**. New York: John Wiley, 1986. p.243-263.
- WALDHAUSER, S.S.M.; BAUMANN, T.W. Compartmentation of caffeine and related purine alkaloids depends exclusively on the physical chemistry of their vacuolar complex formation with chlorogenic acids. **Phytochemistry**, Oxford, v.42, n.4, p.985-996, 1996.

