



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

PATRICIA MORENA SANCHEZ

**IMPRESSÃO DIGITAL CROMATOGRÁFICA E  
ESPECTROSCÓPICA PARA ANÁLISE DE METABÓLITOS  
DE *Coffea arabica* EM CONDIÇÕES DE DÉFICIT HÍDRICO E  
EXCESSO DE RADIAÇÃO**

---

Londrina  
2015

PATRICIA MORENA SANCHEZ

**IMPRESSÃO DIGITAL CROMATOGRÁFICA E  
ESPECTROSCÓPICA PARA ANÁLISE DE METABÓLITOS  
DE *Coffea arabica* EM CONDIÇÕES DE DÉFICIT HÍDRICO E  
EXCESSO DE RADIAÇÃO**

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado ao Departamento de Química da  
Universidade Estadual de Londrina, como  
requisito à obtenção do título de Mestre em  
Química.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ieda Spacino  
Scarminio

Londrina  
2015

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da  
Universidade Estadual de Londrina**

**Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)**

S211i Sanchez, Patricia Morena.

Impressão digital cromatográfica e espectroscópica para análise de metabólitos de *Coffea arabica* em condições de déficit hídrico e excesso de radiação / Patricia Morena Sanchez. – Londrina, 2015.  
109 f. : il.

Orientador: Ieda Spacino Scarminio.

Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Química, 2015.  
Inclui bibliografia.

1. Química analítica – Teses. 2. Coffea arabica – Teses. 3. Irrigação com déficit hídrico – Teses. 4. Análise de componentes principais – Teses. 5. Cafeeiro – Efeito da radiação – Teses. 6. Metabolômica – Teses. I. Scarminio, Ieda Spacino. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Química. III. Título.

CDU 543

PATRICIA MORENA SANCHEZ

**IMPRESSÃO DIGITAL CROMATOGRÁFICA E ESPECTROSCÓPICA  
PARA ANÁLISE DE METABÓLITOS DE *Coffea arabica* EM  
CONDIÇÕES DE DÉFICIT HÍDRICO E EXCESSO DE RADIAÇÃO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Departamento de Química da Universidade Estadual de Londrina, como requisito à obtenção do título de Mestre em Química.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientador(a): Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ieda Spacino  
Scarminio  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof. Dr. Dionisio Borsato  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof. Dr. Paulo Henrique Março  
Universidade Tecnologia Federal do Paraná - UTFPR

Londrina, 19 de março de 2015

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à minha orientadora Professora Dra. Ieda Spacino Scarminio, não só pela constante orientação neste trabalho, mas sobretudo pela sua amizade, paciência e dedicação.

À minha mãe Solange, meu irmão Rafael e meu namorado Antonio Carlos, pelo apoio e amor.

Aos amigos que fiz no laboratório, Fernanda, Elis, Pedro, Sabrina, Gustavo, Amélia, Fabiano, Guilherme Scheel, Guilherme Santana, Filipe, Galileu por me ajudarem sempre que precisei.

Aos meus amigos Carol, Eliandro, Edison, Aline, que nos momentos de agonia me faziam rir.

Aos amigos do mestrado do ano de 2013.

Aos professores da Pós graduação.

À todo o departamento de Química, professores, técnicos e funcionários.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES/PROAP) pelo apoio no desenvolvimento do trabalho.

Ao Consórcio Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento do Café - CBP&D/Café, à Fundação Araucária e ao CNPq pelo fomento.

SANCHEZ, Patricia Morena. **Impressão digital cromatográfica e espectroscópica para análise de metabólitos de *Coffea arabica* em condições de déficit hídrico e excesso de radiação.** 2015. 109 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2015.

## RESUMO

A produtividade de um cafeeiro, assim como a abundância relativa de metabólitos presentes, está diretamente ligada ao déficit hídrico e quantidade de radiação. Várias regiões do Brasil vêm aumentando os níveis de irrigação devido às mudanças climáticas drásticas, até mesmo onde as chuvas são favoráveis para o cultivo. O conjunto dos metabólitos de uma espécie biológica é chamada metaboloma e é por meio deste que se obtém uma “impressão digital” da planta. Neste estudo, utilizou-se planejamento experimental do tipo centróide-simplex em amostras de *Coffea arabica* de genótipo IAPAR59, extraídas em diferentes proporções de solvente extrator etanol, diclorometano e hexano. Em seguida, os extratos foram analisados utilizando-se técnicas como infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), espectrofotometria no ultravioleta e visível (UV-Vis) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Os dados foram submetidos a métodos quimiométricos, assim, com os perfis metabolômicos dos extratos pôde-se discorrer a cerca de deficit hídrico e radiação excessiva. A abundância relativa de metabólitos foi proporcional a altura da planta, portanto, quanto maior a radiação maior produção de metabólitos para proteção e fotossíntese. O solvente hexano, mesmo com baixa absorvância, contribuiu para a formação da impressão digital, apresentando os três picos característicos de carotenóides:  $\beta$ -criptoxantina, gama-caroteno,  $\beta$ -caroteno, em especial prolicopeno e neurosporeno. Plantações autossombreadas e em excesso de radiação mostraram maiores valores de abundância relativa de metabólitos proporcionalmente às alturas, 40 < 80 < 120 cm, assim como clorofila alfa (principalmente) e beta, extraídas por solventes polares, que aumentam com exposição solar proporcionalmente à taxa fotossintética. Os metabólitos formadores da impressão digital irão depender das interações entre taxas hídrica e radiação .

**Palavras-chave:** Análise de componentes principais. Déficit hídrico. Excesso de radiação. *Coffea arabica*. Métodos quimiométricos.

SANCHEZ, Patricia Morena. **Chromatographic and spectroscopic fingerprinting for analysis of *Coffea arabica* metabolites in conditions of water deficit and excessive radiation**. 2015. 109 f. Dissertation (Master's degree in chemistry) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2015.

## ABSTRACT

The productivity of a coffee tree, as well as the relative abundance of metabolites present, is directly linked to the water deficit and amount of radiation. Various regions of Brazil have increased the irrigation levels due to drastic climate changes, even where rainfall is favorable for cultivation. The set of metabolites of a biological species is called metabolome and it is through this that a "fingerprint" of the plant is obtained. In this study, it was used a simplex centroid experimental planning in samples of *Coffea arabica* of genotype IAPAR59, extracted in different proportions of ethanol extractor solvent, dichloromethane and hexane. After that, the extracts were analyzed using techniques such as Fourier transform infrared (FTIR), spectroscopy in the ultraviolet and visible (UV-Vis) and high performance liquid chromatography (HPLC). Data was submitted to chemometric methods, thereby, with the metabolomic profiles of the extracts it was possible to discuss about the water deficit and excessive radiation. It was found that the relative abundance of metabolite is proportional to the plant height, thus, the higher the radiation, greater the production of metabolites for protection and photosynthesis. The hexane solvent, even with low absorbance contributed to the formation of the fingerprint, presenting three characteristic peaks of carotenoids:  $\beta$ -cryptoxanthin, gamma-carotene,  $\beta$ -carotene, in particular prolycopene and neurosporene. Self-shaded crops with high levels of radiation showed increased concentrations of metabolites in proportion to heights, 40 < 80 < 120 cm. There are  $\alpha$  chlorophyll concentrations (mostly) and  $\beta$ , extracted by polar solvents, which increase with sun exposure in proportion to the photosynthetic rate. Higher concentrations of fingerprint trainers of metabolites will depend on the interactions between the rate of radiation and water.

**Keywords:** Principal component analysis. Water deficit. Excessive radiation. *Coffea arabica*. Chemometric methods.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1.	Espaço experimental limitado aos pontos pertencentes ao triângulo para misturas de três componentes .....	28
Figura 2.	Esquema da seqüência usada na análise multivariada dos dados experimentais, ACP (Análise de Componentes Principais) e AH (Análise Hierárquica).....	30
Figura 3.	Esquema da decomposição da matriz X no produto de duas matrizes.....	32
Figura 4.	Esquema de um dendograma, no eixo horizontal são colocadas as amostras e no eixo vertical a distância entre elas .....	34
Figura 5.	Procedimento experimental utilizado no estudo da impressão digital cromatográfica para análise de metabólitos de Coffea arabica em condições de déficit hídrico e excesso de radiação .....	36
Figura 6.	Planejamento de misturas do tipo centróide-simplex utilizando como solvente extrator: etanol, diclorometano e hexano .....	40
Figura 7.	Seqüência dos procedimentos para obtenção do extrato bruto das folhas de Coffea arabica.....	42
Figura 8.	Triângulo de solvente de seletividade de Snyder .....	44
Figura 9.	Gráfico dos escores CP1 x CP2 para os dados espectrofotométricos no UV-Vis de todas as amostras de Coffea arabica de genótipo IAPAR59, de acordo com o planejamento experimental .....	50
Figura 10.	Gráfico dos loadings CP2 para os dados espectrofotométricos no UV-Vis de todas as amostras de Coffea arabica de genótipo IAPAR59, de acordo com o planejamento experimental .....	51
Figura 11.	Gráfico dos escores CP2 x CP3 para os dados espectrofotométricos no UV-Vis das amostras de Coffea arabica de genótipo IAPAR59, plantas matriz de 40 e 80 cm, de acordo com o planejamento experimental.....	52
Figura 12.	Gráfico dos loadings CP2 x CP3 para os dados espectrofotométricos no UV-Vis das amostras de Coffea arabica de genótipo IAPAR59, plantas matriz de 40 e 80 cm, de acordo com o planejamento experimental.....	53

Figura 13. Espectros de UV-Vis das amostras da folha de Coffea arabica. a) etanol, b) hexano e c) diclorometano puros; d) mistura binária diclorometano:hexano .....	54
Figura 14. Dendrograma baseado nos dados dos espectros do ultravioleta para os extratos de planta matriz, nas alturas de 40 e 80 cm .....	56
Figura 15. Gráfico dos escores CP2 x CP3 para os dados espectroscópicos de FTIR das amostras de Coffea arabica de genótipo IAPAR59, da planta matriz nas alturas de 40 e 80 cm de acordo com o planejamento experimental .....	57
Figura 16. Gráfico dos loadings CP2 x CP3 para os dados espectroscópicos de FTIR das amostras de Coffea arabica de genótipo IAPAR59, da planta matriz nas alturas de 40 e 80 cm, de acordo com o planejamento experimental .....	58
Figura 17. Espectros das análises de FTIR das amostras de planta matriz de a) 40 cm e b) 80 cm respectivamente, da folha de Coffea arabica.....	59
Figura 18. Dendrograma baseado nos dados dos espectros do ultravioleta para os extratos de planta matriz, descritos no planejamento experimental.....	61
Figura 19. Gráfico dos escores CP2 x CP4 para os dados espectrofotométricos no UV-Vis das folhas não irrigadas 40 cm e 80 cm, de acordo com o planejamento experimental .....	62
Figura 20. Gráfico dos loadings CP2 x CP4 para os dados espectrofotométricos no UV-Vis das amostras de Coffea arabica de genótipo IAPAR59, das folhas não irrigadas 40 cm e 80 cm de altura, de acordo com o planejamento experimental .....	63
Figura 21. Espectros das análises de UV-Vis das amostras da folha de Coffea arabica, folhas não irrigadas 40 cm e 80 cm de altura. a) hexano puro e b) mistura ternária etanol:diclorometano:hexano (1/6:1/6:2/3) .....	64
Figura 22. Dendrograma baseado nos dados dos espectros do ultravioleta para os extratos de plantas não irrigadas, descritos no planejamento experimental.....	65

Figura 23. Gráfico dos escores CP2 x CP4 para os dados espectroscópicos no FTIR das amostras de folhas não irrigada nos extratos de 40 e 80cm de altura de acordo com o planejamento experimental.....	66
Figura 24. Gráfico dos loadings CP2 x CP4 para os dados espectroscópicos de FTIR das amostras de Coffea arabica de genótipo IAPAR59, folhas não irrigada nos extratos de 40 e 80 cm de altura, de acordo com o planejamento experimental .....	67
Figura 25. Espectros por análise de FTIR das amostras de plantas não irrigadas da folha de Coffea arabica em duas alturas distintas ( a) 40 cm e b) 80 cm) .....	68
Figura 26. Dendrograma baseado nos dados dos espectros do FTIR para os extratos de folhas não irrigadas em duas alturas distintas (40 e 80 cm) .....	69
Figura 27. Gráfico dos escores CP4 x CP5 dos dados espectrofotométricos no UV-Vis das folhas de Coffea arabica irrigadas em 40, 80 e 120 cm, de acordo com o planejamento experimental.....	70
Figura 28. Gráfico dos loadings CP4 x CP5 dos dados espectrofotométricos no UV-Vis das folhas de Coffea arabica irrigadas em 40, 80 e 120 cm, de acordo com o planejamento experimental.....	71
Figura 29. Espectros das análises de UV-Vis das amostras da folha de Coffea arabica de genótipo IAPAR59 das plantas irrigadas em 40 cm, 80 cm e 120 cm, de acordo com o planejamento experimental. a) diclorometano e b) hexano puros, c) mistura binária diclorometano:hexano (dh) e d) mistura ternária etanol:diclorometano:hexano (1/6:2/3:1/6) .....	72
Figura 30. Dendrograma baseado nos dados dos espectros do UV-Vis para os extratos de folhas irrigadas em seus três estratos (40, 80 e 120 cm de altura), descritos no planejamento experimental.....	74
Figura 31. Gráfico dos escores CP3 x CP4 para os dados de FTIR das folhas irrigadas em 40 cm, 80 cm e 120 cm, de acordo com o planejamento experimental.....	75

Figura 32.	Gráfico dos loadings CP3 x CP4 para os dados espectroscópicos no FTIR das amostras de Coffea arabica de genótipo IAPAR59 das plantas irrigadas em 40, 80 e 120 cm .....	76
Figura 33.	Espectros das análises de FTIR das folhas de Coffea arabica irrigadas em a) 40 cm, b) 80 cm e c) 120 cm, como no planejamento experimental.....	77
Figura 34.	Dendrograma dos espectros do FTIR para as amostras da folha de Coffea arabica de genótipo IAPAR59 de plantas irrigadas em 40, 80 e 120 cm, de acordo com o planejamento experimental .....	78
Figura 35.	Espectros dos cromatogramas (DAD) para Coffea arabica dos extratores em 276nm: a) espectros dos cromatogramas (DAD) de extratos em hexano para as duas alturas em 1,3580 min. b) espectros dos cromatogramas (DAD) de extratos em diclorometano para as duas alturas em 3,9500 min .....	79
Figura 36.	Espectros mais relevantes obtidos para as amostras irrigadas na altura de 40 e 120 cm. a) espectros dos cromatogramas (DAD) em 40 cm de altura com predominância de carotenóides; b) espectros dos cromatogramas (DAD) em 120 cm de altura com predominância de cafeína.....	79
Figura 37.	Gráfico dos escores CP2 x CP3 para os dados espectrofotométricos no UV-Vis das folhas irrigadas e não irrigadas em 40 cm de altura, de acordo com o planejamento experimental.....	81
Figura 38.	Gráfico dos loadings CP2 x CP3 para os dados espectrofotométricos no UV-Vis das folhas irrigadas e não irrigadas em 40 cm de altura, de acordo com o planejamento experimental.....	82
Figura 39.	Espectros UV-Vis das amostras da folha de Coffea arabica de plantas irrigadas e não irrigadas em 40 cm de altura de acordo com o planejamento experimental. a) etanol, b) diclorometano, c) hexano e d) diclorometano:hexano (1:1).....	83
Figura 40.	Dendrograma de dados do UV-Vis para os extratos de plantas irrigadas e não irrigadas em 40 cm de altura, como descritos experimentalmente .....	84

Figura 41. Gráfico dos escores CP3 x CP4 para os dados espectroscópicos no FTIR das amostras de plantas irrigadas e não irrigadas em 40 cm de altura de Coffea arabica de genótipo IAPAR59, de acordo com o planejamento experimental .....	86
Figura 42. Gráfico dos loadings CP3 x CP4 para os dados espectroscópicos no FTIR das amostras de Coffea arabica de genótipo IAPAR59 das amostras de plantas irrigadas e não irrigadas em 40 cm de altura, de acordo com o planejamento experimental.....	87
Figura 43. Espectros por análise de FTIR das amostras da folha de Coffea arabica de plantas irrigadas e não irrigadas, respectivamente, em 40 cm de altura de acordo com o planejamento experimental .....	87
Figura 44. Dendrograma dos dados de espectros FTIR para os extratos de plantas irrigadas e não irrigadas em 40 cm de altura, como no planejamento experimental .....	88
Figura 45. Espectros dos cromatogramas para Coffea arabica em 276nm: a) espectros dos cromatogramas das duas alturas em 1,3670 min. e b) espectros dos cromatogramas das duas alturas em 3,9170 min .....	89
Figura 46. Espectros mais relevantes obtidos para as amostras irrigadas e não irrigadas na altura de 40 cm, respectivamente. a) espectros dos cromatogramas (DAD) para as amostras irrigadas em 40 cm de altura; b) espectros dos cromatogramas (DAD) para as amostras não irrigadas em 40 cm de altura .....	90
Figura 47. Gráfico dos escores CP2 x CP3 para os dados espectrofotométricos no UV-Vis das amostras de Coffea arabica de genótipo IAPAR59, das plantas irrigadas e não irrigada na altura 80 cm, de acordo com o planejamento experimental .....	91
Figura 48. Gráfico dos loadings CP2 x CP3 para os dados espectrofotométricos no UV-Vis das amostras de Coffea arabica de genótipo IAPAR59, de acordo com o planejamento experimental.....	92
Figura 49. Espectros por análise de UV-Vis das amostras da folha de Coffea arabica. a) etanol, b) diclorometano, c) hexano e d) mistura binária etanol:diclorometano .....	94

Figura 50. Dendrograma de espectros do ultravioleta para extratos de folhas irrigadas e não irrigadas em 80 cm de altura, como descritos no planejamento.....	96
Figura 51. Gráfico dos escores CP2 x CP3 de dados espectroscópicos no FTIR das folhas de Coffea arabica irrigadas e não irrigadas na altura de 80 cm, de acordo com o planejamento.....	97
Figura 52. Gráfico dos loadings CP2 x CP3 de dados espectroscópicos no FTIR das amostras de Coffea arabica de genótipo IAPAR59, de acordo com o planejamento .....	99
Figura 53. Espectros por análise de FTIR das amostras de folhas irrigadas e não irrigadas em 80 cm de altura, da folha de Coffea arabica .....	9
Figura 54. Dendrograma baseado nos dados dos espectros de FTIR para os extratos de folhas irrigadas e não irrigadas em 80 cm de altura, como descritos no planejamento experimental .....	100

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\alpha$	Acidicidade
$\beta$	Basicidade
$\pi$	Dipolaridade
$\varepsilon$	Erro experimental
$\Sigma$	Somatória
<b>a.C.</b>	Antes de Cristo
<b>ACN</b>	Acetonitrila
<b>ACP</b>	Análise de componentes principais
<b>AH</b>	Análise Hierárquica
<b>CCD</b>	Cromatografia em camada delgada
<b>CG</b>	Cromatografia gasosa
<b>CLAE</b>	Cromatografia líquida de alta eficiência
<b>CGA</b>	Ácidos clorogênicos
<b>CP</b>	Componente Principal
<b>d</b>	Diclorometano
<b>DAD</b>	Detector com arranjo de fotodiodos
<b>e</b>	Etanol
<b>EC</b>	Eletroforese capilar
<b>FTIR</b>	Infravermelho
<b>H</b>	Hexano
<b>Há</b>	Hectare
<b>H<sub>2</sub>O</b>	Água
<b>HPLC</b>	High Performance/Pressure Liquide Chromatography
<b>LQCN</b>	Laboratório de Quimiometria em Ciências Naturais
<b>P'</b>	Polaridade
<b>UV</b>	Ultravioleta
<b>UV- Vis</b>	Ultravioleta visível
<b>x<sub>d</sub></b>	Medida de interação da acidicidade com o soluto dioxano
<b>x<sub>e</sub></b>	Medida de interação da basicidade com o soluto etanol
<b>x<sub>n</sub></b>	Medida de interação da dipolaridade com o soluto nitrometano

## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO I</b> .....	15
1 INTRODUÇÃO E OBJETIVOS .....	16
<b>CAPÍTULO II</b> .....	26
2 MÉTODOS QUIMIOMÉTRICOS.....	26
2.1 Quimiometria .....	27
2.2 Modelagem de misturas.....	27
2.3 Análise Exploratória de Dados.....	29
2.3.1 Análise de Componentes Principais (ACP).....	31
2.3.2 Análise Hierárquica (AH) .....	33
<b>CAPÍTULO III</b> .....	35
3 DESCRIÇÃO EXPERIMENTAL.....	35
3 Descrição experimental .....	36
3.1 Planta.....	37
3.2 Coleta .....	37
3.3 Secagem.....	38
3.4 Moagem.....	38
3.5 Reagentes .....	38
3.6 Equipamentos.....	38
3.7 Extração.....	39
3.8 Preparo dos extratos.....	39
3.9 Análise por Espectrofotometria no Ultravioleta-Visível (UV-Vis).....	42
3.10 Análise por Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) .....	43
3.11 Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) .....	43
3.11.1 Escolha da fase móvel (FM) .....	43
3.11.2 Preparo das amostras para análise cromatográfica .....	46
3.12 Análise Exploratória dos Dados.....	47
<b>CAPÍTULO IV</b> .....	48
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	49

<b>CAPÍTULO V.....</b>	<b>101</b>
5 CONCLUSÃO.....	102
<b>CAPÍTULO VI.....</b>	<b>103</b>
6 REFERÊNCIAS.....	104



# **CAPÍTULO I**

## **INTRODUÇÃO E OBJETIVOS**

## 1 INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

Escrituras datadas de 900 a.C. relatam que o café, folha e fruto, era usado para fim medicinal: estimulante do sistema nervoso, alívio de dores de cabeça e tosse, auxílio na digestão, reumatismo, febres intermitentes e na cura de vermes em crianças<sup>1</sup>.

O arbusto de *Coffea arabica*, de até 4 m de altura, possui folhas elípticas de cor verde escuro com dimensões de 13,5 cm x 5,0 cm. Os grãos esverdeados de dimensões de 0,88 cm x 0,65 cm são protegidos pelos frutos de tamanho aproximado de 1,5 cm x 1,1 cm até condições favoráveis de germinação<sup>1</sup>.

Espécies vegetais, em geral, possuem um ciclo de desenvolvimento denominado ciclo fenológico, que pode ser anual ou perene. Anual, como o próprio nome sugere, se desenvolve em um mesmo ano e perene desenvolve-se por vários anos. O ciclo fenológico do cafeeiro (*Coffea arabica*) chama-se bienal, pois tem um período de 2 anos para ocorrência das fases vegetativas e reprodutivas em função das condições do ambiente, por isso são de difícil manipulação gênica<sup>2</sup>. Nos meses em que os dias são mais longos, primeiro ano, formam-se ramos vegetativos com gemas axilares nos nós. Quando os dias tornam-se reduzidos, estas gemas transformam-se em gemas reprodutivas, graças ao fototropismo<sup>3</sup>. As gemas começam a se desenvolver e amadurecer quando os dias têm períodos de menos de 13h de luz<sup>4</sup>. Maduras, as gemas entram em dormência preparando-se para florescer. A abertura das flores é influenciada por fatores ambientais como chuva, irrigação e aumento da umidade do ar<sup>5</sup>. O segundo ano então se inicia; formam-se os chumbinhos até o crescimento total, granação e maturação. O envelhecimento vem a seguir, morrem os ramos plagiotrópicos terminais e ocorre a auto-poda<sup>5</sup>. Observou-se queda de dormência dos botões florais de café com diminuição da temperatura, ou a

rápida queda térmica seguida de falta de água, (irrigação/chuva), sinergicamente<sup>6</sup>. Estudos relatam que irrigações frequentes após formação de broto floral resultam em uma maior desuniformidade na floração<sup>7</sup>. Por outro lado, notou-se que a bienalidade no número total de flores, percentual de frutos e ramificações foram mantidos em lavouras irrigadas durante as duas safras<sup>8</sup>.

Não só fatores ambientais como clima, vegetação, hidrografia mas também colheita e preparo são fundamentais para uma boa qualidade da bebida<sup>9</sup>. Visando as exigências do mercado, na busca de produtos de qualidade, principalmente quando refere-se à exportação, a cafeicultura brasileira vem apresentando mudanças para potencializar sua produtividade. Em busca de uma maior lucratividade, os produtores vêm adotando técnicas para o manejo das lavouras, como a mecanização da colheita, adensamento de plantio e até a irrigação, em áreas necessitadas, mas também onde não há déficit hídrico<sup>10</sup>.

Nos últimos anos, a irrigação trouxe um grande avanço à tecnologia, porém, ainda existem controvérsias. A planta necessita de um certo déficit hídrico, não se sabe o quanto exatamente, para florescer uniformemente e sem danos à produção<sup>11</sup>. Nos períodos de carência de água, a folha fornece água aos botões para manter o equilíbrio da planta. Outra questão é se há realmente a necessidade de irrigação em regiões que não sofrem de déficit hídrico<sup>12</sup>. Em excesso, esse déficit, mesmo que de forma progressiva pode afetar todas as atividades metabólicas da planta, como fotossíntese, taxa de crescimento, síntese de proteínas<sup>13</sup>.

Em períodos de seca ou exposição excessiva ao sol, há mudanças nos processos fisiológicos do cafeeiro, já que há a necessidade de adequação ao ambiente<sup>14</sup>. Quando há o reestabelecimento das condições favoráveis, o cafeeiro reage de forma a compensar este déficit gerando uma grande atividade fisiológica.

Uma comparação entre plantas irrigadas e não irrigadas, mostrou não haver diferença no período de florada devido à resistência de cada planta à absorção de água pela raiz<sup>15</sup>. Durante o período de seca, a planta faz uma reserva de nutrientes e metabólitos nos tecidos lenhosos, que contribui para a florada seguinte<sup>16</sup>. O cafeeiro pode ser cultivado em ambientes de pouca intensidade luminosa, ou seja, mais sombreados, pois assim, há a proteção contra altas temperaturas e conseqüentemente a melhoria da qualidade do café<sup>17</sup>. As plantas expostas a dias muito ensolarados podem sofrer de fotoinibição<sup>18</sup>. Esta fotoinibição está ligada às altas temperaturas, pois a raiz não transporta o ferro para o restante da planta, inibindo assim seu crescimento<sup>19</sup>. Porém, o sombreamento excessivo pode afetar negativamente a produção do cafeeiro, ocasionando mudanças fisiológicas, reprodutivas, anatômicas e até afetar o microclima local<sup>20</sup>. Esta característica denomina-se plasticidade fenotípica, pois o cafeeiro tem a capacidade de expressar diferentes fenótipos, de acordo com o ambiente em que se encontra<sup>21</sup>.

Estas técnicas de melhoramento de plantio, tornam-se mais eficazes quando relacionadas a aspectos ambientais, fisiológicos, bióticos e abióticos. Condições hídricas do cafeeiro vão depender do adensamento de plantio utilizado e da sazonalidade. Estudos relatam que quando há espaçamentos tradicionais entre os cafeeiros há uma maior absorção de radiação e conseqüentemente maior transpiração do vegetal. Nos adensamentos de plantio, a resposta é contrária, pois há uma menor absorção da radiação pela planta e por este motivo há um gasto hídrico inferior<sup>22</sup>. Na plantação adensada há um aumento do número de plantas por hectare ( $\text{planta}\cdot\text{ha}^{-1}$ ) e conseqüentemente um número maior de frutos, porém, não há comprovação que sejam de melhor qualidade. As dimensões utilizadas em culturas de café no Brasil passaram de 700 e 800 plantas/ha para um adensamento arquitetural

com dimensões variando de 5.000 a 10.000 plantas/ha<sup>23</sup>. Como o dimensionamento do plantio de café influencia diretamente no desenvolvimento dos metabólitos do vegetal, estudos mostraram que um plantio com densidade variando de 5 a 17 mil plantas/ha melhora a produtividade e reduz custos, considerado-se um maior número de safras<sup>24</sup>. O adensamento, portanto, está diretamente relacionado aos métodos ecofisiológicos do vegetal e sua exposição a limitações ambientais como excesso de luz ou sombreamento. Isto fará folhas e grãos terem entre si uma certa competição pelos nutrientes do solo. O estudo da folha também tem grande importância, já que é a responsável pela produção ou assimilação de vários metabólitos da planta que são distribuídos para os grãos<sup>25</sup>.

O enfoque, portanto, é melhorar cada vez mais a qualidade da bebida, determinada pela composição de metabólitos nos grãos e conseqüentemente nas folhas. Por esse motivo, buscam-se tecnologias para manter ou aumentar a qualidade da colheita, aliando ecofisiologia vegetal e limitação ambiental (déficit hídrico e excesso de radiação).

Os principais metabólitos encontrados no café são representados por aminoácidos, gorduras, carboidratos e ácidos orgânicos. A maior relevância se dá para alguns deles em especial: clorofila, composto de cor verde, com propriedade antioxidante e agente fotossensibilizador<sup>27</sup>, vital para a sobrevivência do vegetal por ser um dos principais pigmentos ativos do processo fotossintético<sup>26</sup>. Na planta, divide-se em duas formas, clorofila alfa e beta. A clorofila alfa geralmente, encontra-se em maior proporção, difere da beta por conter um grupo funcional aldeído em substituição a um grupo metila. A quantidade de clorofila é dada por área foliar. Folhas expostas a maiores taxas de radiação necessitam de uma maior concentração de clorofila para síntese e degradação<sup>28</sup>, se comparadas às plantas sombreadas<sup>29</sup>. Estas, possuem

folhas mais finas e alongadas e tal fisiologia as tornam capazes de utilizar menos luz solar. Quando enzimas degradam a clorofila, observa-se na planta uma cor amarelada.

Os compostos fenólicos possuem anel aromático com um ou mais substituintes hidroxílicos, incluindo seus grupos funcionais. Existem cerca de cinco mil fenóis, dentre eles destacam-se: flavonóides (antocianinas, flavonóis), ácidos fenólicos (ácidos benzóico, cinâmico), antraquinonas e na classe das lactonas a cumarina<sup>30</sup>. Encontram-se em alimentos como frutas, legumes, cereais e leguminosas, em bebidas tais como o vinho, chá e café<sup>31</sup>. Em alimentos, são responsáveis pela cor, adstringência, aroma e estabilidade oxidativa. São essenciais no crescimento e reprodução dos vegetais, além de atuarem como agente antipatogênico e contribuírem na pigmentação. Formam-se em condições de estresse como, infecções por patógenos microbianos, fermentos, radiações UV, deficiência de nutrientes minerais<sup>32</sup>. As folhas cultivadas ao sol apresentam maior concentração de compostos ativos (fenóis, teobromina, cafeína e rutina) quando comparadas com as de sombra. A luz absorvida produz energia, gera radicais livres e induz a danos celulares. Para proteger-se, a planta, exposta diretamente ao sol, produz compostos antioxidantes, aumentando assim o nível de ácidos clorogênicos<sup>33</sup>. Estes metabólitos secundários geram, quando da torrefação do café, o sabor amargo da bebida<sup>34</sup>. Os ácidos clorogênicos (CGA) são oriundos de esterificação de ácidos hidroxicinâmico (p-cumarico, telúrico e cafeico) e ácido quínico<sup>35</sup> (presentes desta forma nas sementes). Possuem propriedades antioxidantes, amplamente encontrados em produtos naturais, previnem doenças cardiovasculares e câncer<sup>36</sup>. No vegetal, contribui para formação de pigmentos, sabor e aroma dos grãos de café, determinando assim, a qualidade da bebida. Os CGA's polimerizam produtos

insolúveis tais como pigmentos castanhos e lignina para defesa das plantas e síntese de componentes da parede celular vegetal. As práticas agrícolas, clima e solo contribuem para a totalidade de CGA em grãos de café verde, que variam de acordo com a espécie e grau de maturação alcançando teores de até 14 % em peso seco<sup>32</sup>. Embora o CGA seja encontrado principalmente nas sementes de café, encontram-se também em suas folhas e polpa, porém em baixa concentração. Níveis mais baixos de CGA influenciam na melhor qualidade da bebida pois são responsáveis pela acidez final, adstringência e amargura<sup>37</sup>. Na polpa, os principais compostos fenólicos são os taninos condensados.

Os carotenóides são corantes naturais das plantas e agem como potentes antioxidantes, fornecendo vitamina A aos alimentos. São compostos lipossolúveis, de estrutura simétrica e acíclica, formados por cadeias de ligações duplas conjugadas, basicamente átomos de carbono e hidrogênio. A quantidade destas ligações é sempre proporcional à ação desses fitoquímicos sobre os radicais livres<sup>38</sup>. Carotenóides encontram-se acumulados nos cloroplastos de plantas verdes, podendo formar complexos não-covalentes com proteínas. Subdividem-se em:  $\alpha$  e  $\beta$ -carotenos (precursor da vitamina A),  $\beta$ -criptoxantina, licopeno, luteína, zeaxantina, violaxantina e neoxantina, entre outros<sup>39</sup>. O licopeno encontra-se também em tecidos humanos, como fígado<sup>40</sup>. Folhas e frutas mantêm constante as concentrações de carotenóides até o início da senescência.

Não menos importante que os demais, as metilxantinas: cafeína e teobromina são metabólitos com funções fisiológicas e farmacológicas no organismo, estimulação do sistema nervoso, do músculo cardíaco, relaxamento muscular e ação diurética<sup>41</sup>. A cafeína possui alta estabilidade térmica, pois sua principal característica, o sabor amargo da bebida, persiste após a torrefação e preparo<sup>42</sup>. Diferentemente, a

teobromina sofre degradação em altas temperaturas liberando substâncias voláteis, derivados de piridina e pirrol, que determinam o sabor da bebida e substâncias precursoras da vitamina B3, niacina<sup>37</sup>.

Para determinação destes metabólitos, tanto primários quanto secundários, é feito uma análise metabolômica, que tem como objetivo obter tantos metabólitos quanto possíveis em uma única etapa, geralmente sem necessidade de purificação do extrato, o que difere dos casos rotineiros<sup>43</sup>. Cada tipo de composto exige uma determinada condição para extração e isso pode gerar problemas na escolha do solvente extrator, pois em uma mesma planta há uma grande heterogeneidade de componentes e de polaridades diferentes<sup>44</sup>.

A alternativa utilizada para a melhor escolha do agente extrator é utilizar o triângulo de seletividade proposto por Snyder<sup>45</sup>. Para extração de metabólitos polares usa-se etanol, metanol ou água, enquanto que para os lipofílicos é comum a utilização de clorofórmio e hexano. Flavonóides geralmente são extraídos em hidrocarbonetos e terpenos em cetonas alifáticas. Escolhe-se os reagentes, puros ou misturas, a fim de maximizar a eficiência da extração, obtendo-se um maior ou menor número de metabólitos, de acordo com o objetivo do estudo<sup>46</sup>. Se a extração é realizada a partir de misturas, realiza-se um planejamento estatístico para escolha dos agentes extratores. Assim, o erro será minimizado e a quantidade de experimentos a serem realizados poderá ser determinada<sup>47</sup>. A mesma importância se dá aos métodos de identificação e separação dos metabólitos extraídos. Para tanto, os químicos utilizam técnicas espectroscópicas na região do infravermelho (FTIR) e espectrofotométricas na região do ultravioleta-visível (UV-Vis). O FTIR mostra os grupos funcionais presentes enquanto o UV-Vis mostra compostos com ligações insaturadas e conjugações<sup>48</sup>. Porém, estas técnicas são muito limitadas para análises

de plantas quando comparadas a outras áreas (indústria de alimento e de bebida, microbiologia, farmacêutica, etc.)<sup>49</sup>. Estas, são mais vantajosas quando aliadas a outras técnicas e utilizadas para substâncias isoladas, em plantas medicinais e em estudos fitoquímicos como ferramenta para construção da impressão digital do vegetal. Existem diferenças sutis nos espectros das plantas dentro da mesma espécie, que passam despercebidas a olho nu e até em regiões de UV. Hoje, técnicas cromatográficas, como cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), cromatografia gasosa (CG), eletroforese capilar (EC) e cromatografia em camada delgada (CCD) vêm sendo aplicadas em análises de qualidade de amostras de plantas<sup>50</sup>, pois através dela pode-se quantificar individualmente os metabólitos secundários e assim gerar uma impressão digital para identificar ou qualificar a amostra em questão.

A obtenção de uma impressão digital cromatográfica está se tornando atualmente, o método mais conveniente e efetivo, por haver a falta de padrões autênticos para identificação dos componentes.

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) separa facilmente alcalóides, álcoois, antibióticos, aromáticos, agrotóxicos e vitaminas<sup>51</sup>, porém, a dificuldade é otimizar a fase móvel para cada amostra<sup>52</sup>. Há a necessidade de informações a respeito das propriedades cromatográficas dos solventes, já que, a finalidade é selecionar os componentes de interesse da amostra e uniformizar os picos no cromatograma<sup>53</sup>. A composição da fase móvel vai afetar na separação dos componentes devido à polaridade e seletividade. A força do solvente de uma mistura eluente e a fração de água na mistura irão determinar as separações. Portanto, é de extrema importância a otimização da fase móvel para obtenção da impressão digital, já que os extratos não passam por fracionamento químico. O uso de planejamentos estatísticos envolvendo misturas no estudo de produtos naturais é hoje exemplificado

na literatura pelo nosso grupo de pesquisa (LQCN)<sup>54</sup>, porém, ainda há falta de padrão para o material vegetal, pois existe muita semelhança entre espécies do mesmo gênero. Logo, a impressão digital é o método que vai fornecer o conjunto de informações químicas das plantas e de produtos naturais por meio de espectros, cromatogramas, todos obtidos por técnicas analíticas<sup>55</sup>. Os compostos importantes, que realmente sofrem modificação com mudanças ambientais podem ser identificados por métodos quimiométricos: planejamento estatístico, análise de superfície de resposta, análise de componentes principais (ACP) e análise hierárquica (AH)<sup>56</sup>, porém há uma quantidade enorme de variáveis nestes processos. O modelo estatístico vai correlacionar todas as amostras com todas as variáveis existentes no estudo. No caso da quimiometria em produtos naturais, as informações químicas relevantes geralmente estarão contidas em uma pequena porcentagem destas variáveis<sup>57</sup>. A escolha, portanto, é baseada em métodos subjetivos, prevalecendo o conhecimento químico e a experiência.

Pelo conjunto destes fatores, associados à importância da impressão digital como mecanismo no controle de qualidade de produtos naturais, este trabalho teve como objetivo avaliar as diferenças existentes entre folhas de mesmo cultivar IAPAR 59, coletadas em diferentes estratos/alturas e taxas de irrigação por impressão digital cromatográfica e espectroscópica para comparar a ecofisiologia vegetal exposta ao estresse hídrico e excesso de radiação.

### **Objetivos específicos**

1) Aplicar métodos quimiométricos de análise multivariada associados a dados cromatográficos e espectroscópicos para análise metabolômica dos extratos das folhas de *Coffea arabica*.

2) Investigar a influência do solvente extrator por planejamento de misturas com três componentes na elaboração dos extratos das folhas de *Coffea arabica*.

3) Utilizar métodos cromatográficos na confirmação da análise exploratória espectroscópica dos extratos das folhas do *Coffea arábica* L.

4) Determinar quais extratos apresentam maior abundância relativa de metabólitos.

# Capítulo II

## MÉTODOS QUIMIOMÉTRICOS



## 2.1 Quimiometria

A Quimiometria surgiu na década de 70, como uma área da química analítica e teve crescimento notório devido ao aprimoramento dos computadores em laboratórios. Utiliza-se de métodos matemáticos e estatísticos multivariados para planejar, selecionar, validar e modelar, otimizar, calibrar, padronizar<sup>58</sup> procedimentos ótimos de medidas e experimentos e extrair o máximo de informação química relevante possível<sup>59</sup>. A eficiência nas operações torna-se limitante quando não há um tratamento de dados adequado.

## 2.2 Modelagem de Misturas<sup>47,60</sup>

Mistura é a junção de ingredientes diferentes para formação de um produto. Suas características irão depender da natureza e das proporções relativas de cada ingrediente e não da quantidade total da mistura. A soma das proporções dos componentes da mistura é 100%. Pode-se escrever para uma mistura de  $q$  componentes:

$$\sum_{i=1}^q x_i = 100\% = 1 \quad (1)$$

onde  $x_i$  representa a proporção do  $i$ -ésimo componente desta mistura. Esta equação possui um grau de liberdade a menos das proporções, portanto, para especificar qual composição possui a mistura, é necessário o conhecimento de apenas as proporções de  $q-1$  componentes. A quantidade do último componente corresponderá ao que falta para completar 100%<sup>47</sup>.

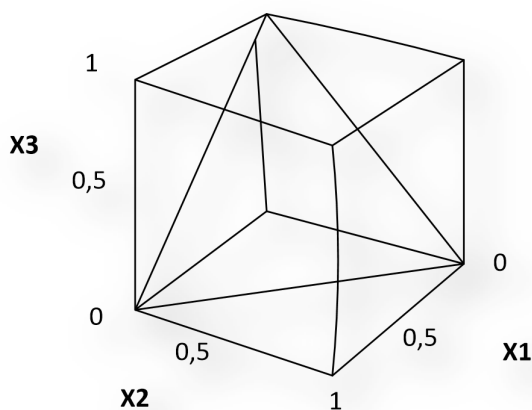
Uma região “simplex” é então obtida do resultado da Equação 1. Esta região é uma configuração espacial que corresponde ao número de dimensões do

espaço mais um. Um dos  $q$  componentes (pontos) assume a proporção 1 e cada um deles representam uma mistura no simplex.

Para sistemas com três fatores independentes, realiza-se experimentos em qualquer ponto dentro do cubo, Figura 1. Quando se trata de uma mistura de três componentes, os experimentos obedecem à equação  $x_1+x_2+x_3=1$ , que define um triângulo equilátero inscrito no cubo, Figura 1.

Na mistura ternária, todas as possíveis composições estarão representadas pelos pontos no triângulo. Os vértices serão componentes puros, as arestas corresponderão às misturas binárias e as misturas ternárias serão os pontos no interior do triângulo<sup>47,60</sup>.

**Figura 1.** Espaço experimental limitado aos pontos pertencentes ao triângulo para misturas de três componentes.



Um polinômio geral (Equação 2) é então ajustado a partir das respostas amostrais obtidas no planejamento, onde  $\hat{y}$  é a resposta prevista pelo modelo,  $\varepsilon$  é o erro experimental, os coeficientes  $b_i^*$  são as respostas medidas para os componentes puros, enquanto os valores de  $b_{ij}^*$  são obtidos a partir de ensaios feitos

com os componentes  $i$  e  $j$  puros e com uma mistura binária de  $i$  e  $j$  em proporções iguais.

$$\hat{y} = \sum_{i=1}^q b_i^* x_i + \sum_{i \leq j}^q \sum_j^q b_{ij}^* x_i x_j + \sum_{i \leq j}^q \sum_{j \leq k}^q \sum_k^q b_{ijk}^* x_i x_j x_k \quad (2)$$

### 2.3 Análise Exploratória de Dados<sup>47,60</sup>

A análise exploratória tem como objetivo analisar os dados para extrair informações que possam relacionar objetos e variáveis. A partir daí pode-se levantar hipóteses e propor modelos não estabelecidos anteriormente.

Os dados multivariados experimentais serão então analisados pelos métodos quimiométricos, a partir da sequência básica ilustrada na Figura 2. O primeiro passo antes de analisar os dados é verificar visualmente a existência de problemas como: variação da linha de base, sobreposição de picos e ruídos. Feito isso, os dados são convertidos em uma matriz  $\mathbf{X}$  (tabela de dados). As amostras (objetos) serão representadas por  $n$  linhas da matriz, enquanto que as variáveis correspondem as  $m$  colunas. Cada valor é uma propriedade medida de uma amostra específica. Em seguida, quando necessário, realiza-se uma pré-seleção das variáveis para definir a melhor região do espectro e/ou cromatograma para que análise multivariada seja feita corretamente.

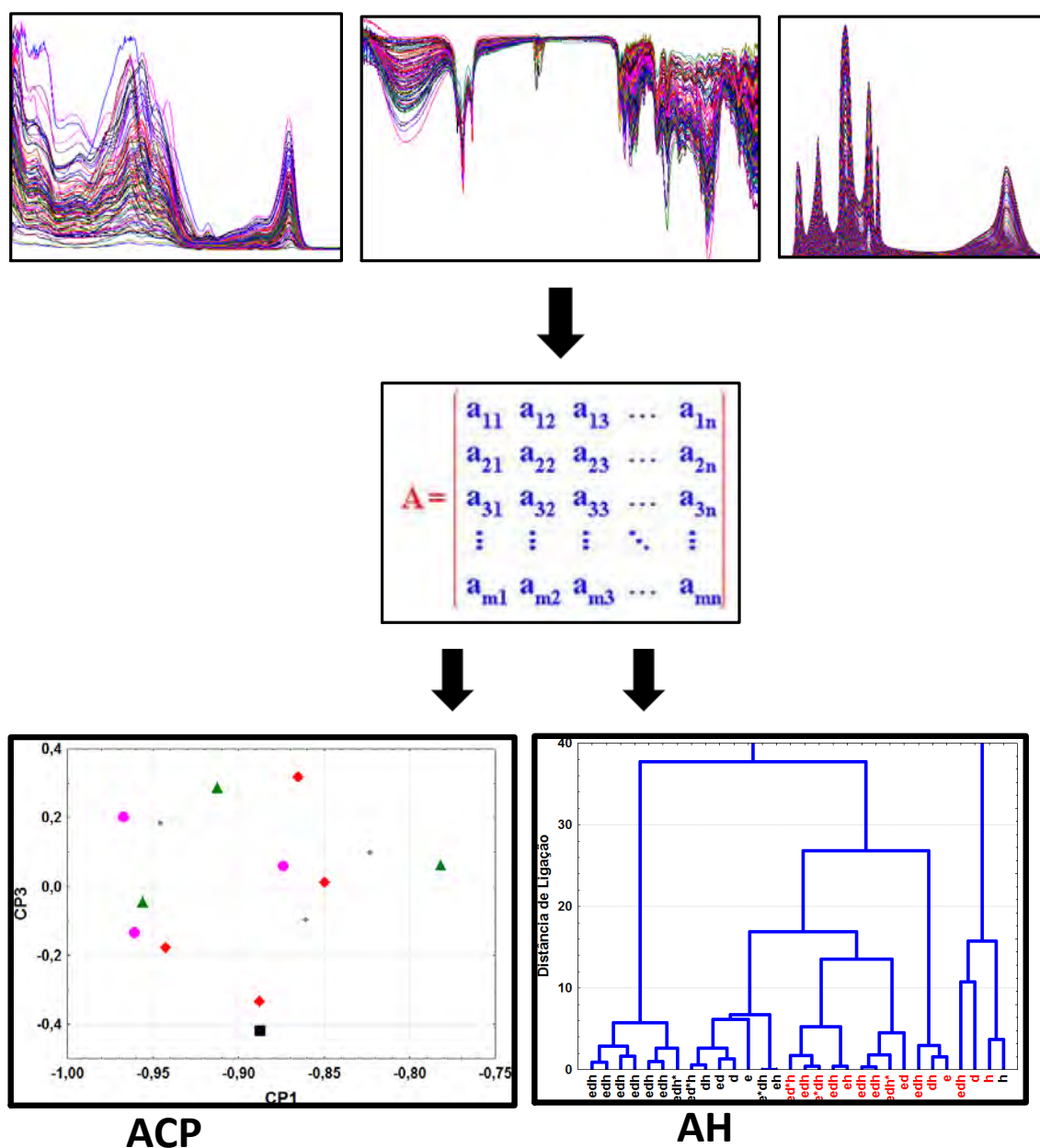
O grupo de amostras deve ser representativo e fornecer informações adequadas, não havendo a necessidade de um conjunto imenso de dados<sup>61</sup>.

Quando os dados gerados contêm muitas variações, como erros aleatórios, sistemáticos ou unidades diferentes, torna-se muito importante não pular a etapa de pré-processamento, já que estes fatores podem comprometer a análise. O

pré-processamento consiste em estratégias matemática dos dados para reduzir ou até remover tais variações<sup>62</sup>.

A seguir, está apresentado a sequência básica dos dois principais métodos de análise exploratória.

**Figura 2.** Esquema da seqüência usada na análise multivariada dos dados experimentais, ACP (Análise de Componentes Principais) e AH (Análise Hierárquica).



### 2.3.1 Análise de Componentes Principais (ACP)

Atualmente esta análise é usada por químicos e até físicos, porém teve seus primórdios nos anos 40 com as ciências sociais. Inclui analisar espectros e seus deslocamentos, deconvolução de bandas e especificar componentes em misturas<sup>63</sup>.

A ACP é uma maneira de reescrever os dados deixando-os de uma forma mais conveniente para a análise, porém sem perder nenhuma informação. Neste método, mudam-se as coordenadas das amostras de eixo com a finalidade de reduzir a dimensão do conjunto de dados por meio de combinações lineares das variáveis originais. A importância de tais variáveis dá-se pelos loadings e para cada objeto existirá um escore. A partir daí pode-se detectar amostras irregulares e distinguir variáveis para modelagem<sup>64</sup>.

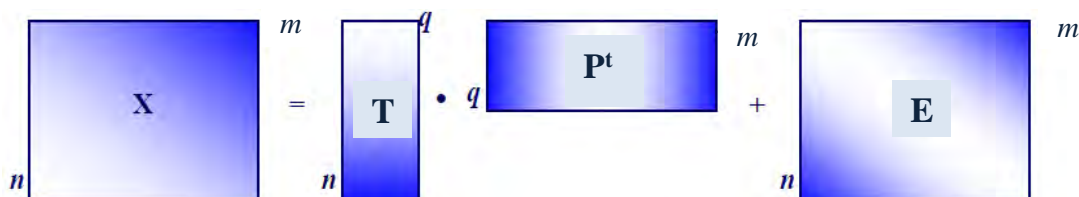
A primeira componente principal (CP) é orientada na direção da maior variância de dados, a segunda CP orienta-se de forma que seja ortogonal à primeira e represente a variância máxima não explicada anteriormente. Portanto, cada CP é obtida em ordem decrescente de variância<sup>65</sup>.

Define-se ACP no espaço das amostras ou das variáveis e sua decomposição é calculada pela diagonalização da matriz de associação  $\mathbf{X}\mathbf{X}^t$  ou da matriz  $\mathbf{X}^t\mathbf{X}$ . A matriz  $\mathbf{X}_{(n \times m)}$  formada, com  $n$  objetos (amostras, compostos químicos, espectros, etc.) e  $m$  variáveis (altura de picos cromatográficos, valores de absorvâncias, etc.) é então decomposta no produto de duas novas matrizes menores<sup>66</sup>.

$$\mathbf{X} (n \times m) = \mathbf{T} (n \times q) \times \mathbf{P}^t (q \times m) + \mathbf{E}(n \times m) \quad (3)$$

Onde **P** é a matriz dos loadings (pesos) das componentes principais, **T** é a matriz dos escores das componentes principais, **E** é a matriz dos resíduos. O sobrescrito t indica a transposta da matriz **P**,  $q$  é um escalar que corresponde à quantidade de componentes principais que serão necessárias para descrever a maior percentagem da variância dos dados (Equação 3). Este comportamento está representado esquematicamente na Figura 3.

**Figura 3.** Esquema da decomposição da matriz **X** no produto de duas matrizes.



Feito este cálculo, os resultados são analisados para interpretar a distribuição das amostras em um gráfico bi ou tridimensional das componentes principais. Pela visão estatística, a importância das variáveis originais escolhidas, será dada as que possuírem maiores valores em módulo de loadings na combinação linear das componentes principais, enquanto que para a química de produtos naturais, o que realmente importa são as informações relevantes.

A matriz **P** (loadings) ou **T** (escores) pode ainda sofrer uma rotação rígida, denominada varimax. Esta rotação tornará máxima a variância dos loadings das CP's porém sem perder a ortogonalidade<sup>67</sup>.

### 2.3.2 Análise Hierárquica (AH)<sup>68,69</sup>

“Análise de agrupamentos” é o nome coletivo dado a um conjunto de técnicas que permitem separar objetos ou variáveis em grupos diferentes. O método mais utilizado de agrupamentos é a análise hierárquica (AH).

A AH interliga as amostras de acordo com suas similaridades, correlações ou distâncias, propagando-os de acordo com as informações fornecidas pelas variáveis, pois agrupamentos naturais são pré-existent no conjunto de dados. Denomina-se dendrograma o gráfico bidimensional que representa a análise hierárquica.

O método matemático utilizado é simples: agrupa-se os pares de amostras (pontos) mais próximos ou mais distantes, no espaço p-dimensional, utilizando-se a distância Euclidiana (Equação 4) e estes são então substituídos por um novo ponto, localizado na metade da distância entre eles.

$$d_{ik} = \left[ \sum_{j=1}^p (x_{ij} - x_{kj})^2 \right]^{1/2} \quad (4)$$

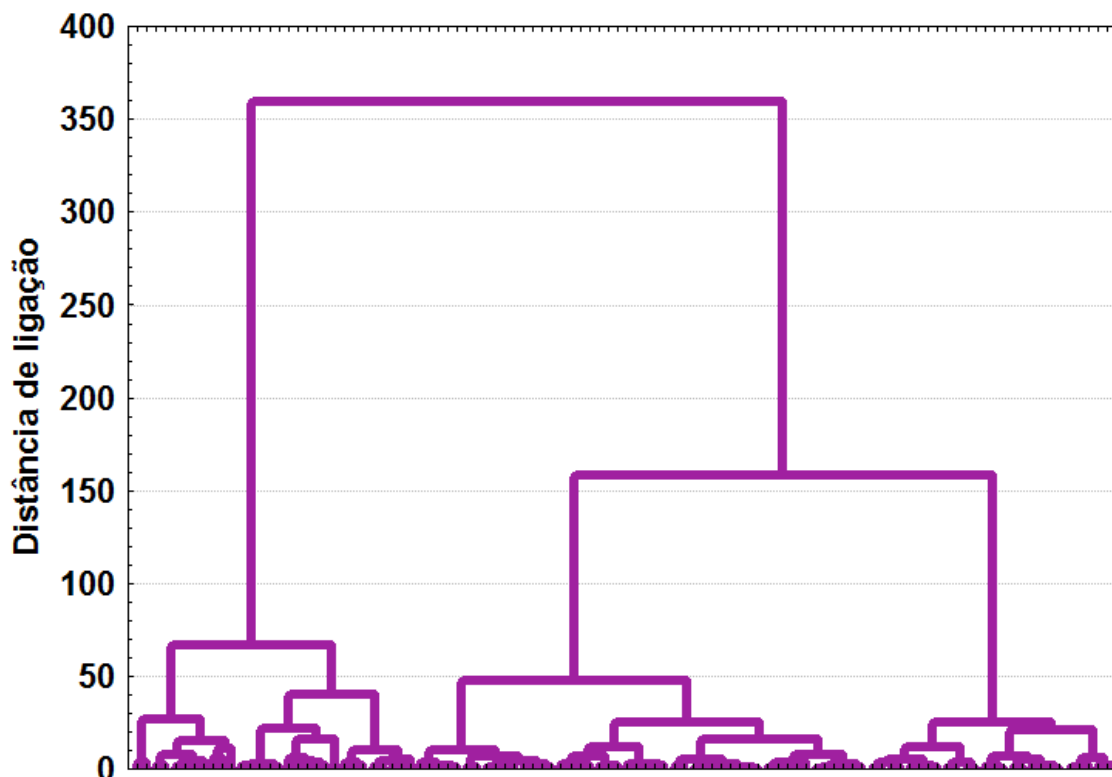
Nesta equação,  $d_{ik}$  é a distância Euclidiana entre os pontos  $i$  e  $k$ . Este procedimento repete-se até que todos os pontos sejam agrupados em um só ponto. Constrói-se então o dendrograma, o eixo horizontal determina as amostras e o eixo vertical a distancia entre elas, Figura 4. Quanto menor a distância entre as amostras, maior será a semelhança. Define-se similaridade pela Equação 5.

$$S_{ik} = \left[ 1 - \frac{d_{ik}}{(d_{ik})_{\text{máx}}} \right] \quad (5)$$

Onde  $S_{ik}$  é a similaridade entre as amostras  $i$  e  $k$  e  $(d_{ik})_{\text{máx}}$  é a máxima distância entre os dois pontos do conjunto no espaço  $p$ -dimensional. Quando  $S_{ik}=1$  as amostras são idênticas, quando  $S_{ik}=0$  dois pontos estão na máxima distância de todo o conjunto.

Esta análise de agrupamentos pode ser complementar à ACP pois há a possibilidade de visualização de semelhanças e diferenças entre as amostras de uma outra maneira, aumentando assim a confiança nos resultados.

**Figura 4.** Esquema de um dendograma, no eixo horizontal são colocadas as amostras e no eixo vertical o grau de similaridade entre elas.



## **CAPÍTULO III**

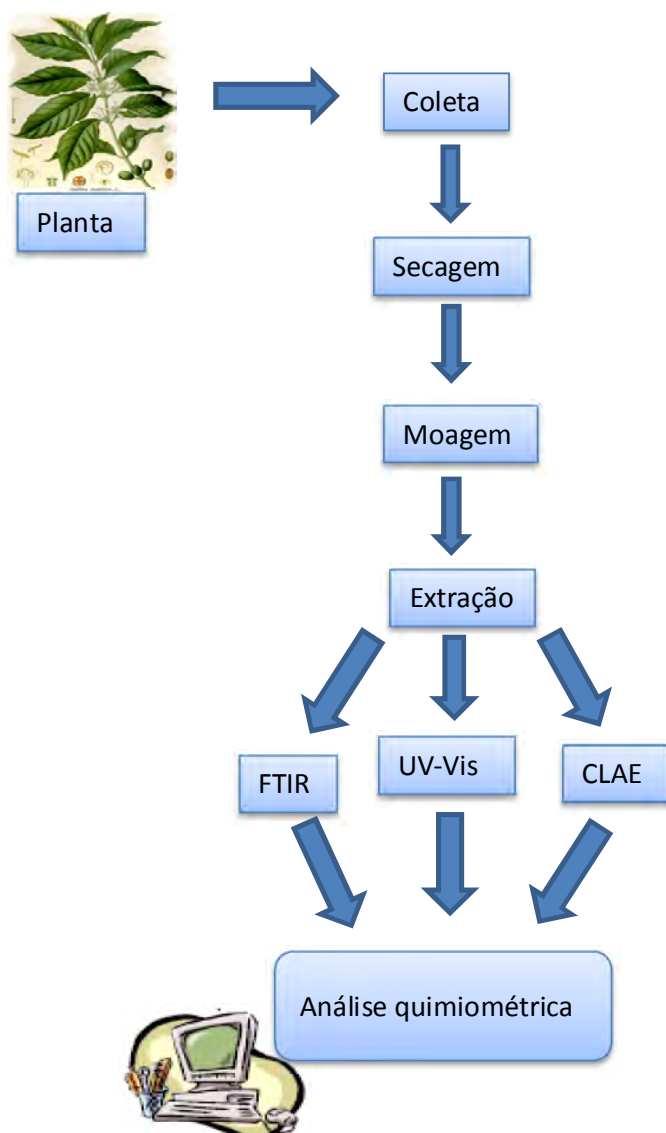
## **DESCRIÇÃO EXPERIMENTAL**



### 3 DESCRIÇÃO EXPERIMENTAL

Neste capítulo serão apresentados os procedimentos experimentais utilizados para avaliar a impressão digital cromatográfica na análise de metabólitos de *coffea arabica* em condições de déficit hídrico e excesso de radiação. O resumo do procedimento experimental está apresentado na Figura 5.

**Figura 5.** Procedimento experimental utilizado no estudo da impressão digital cromatográfica na análise de metabólitos de *Coffea arabica* em condições de déficit hídrico e excesso de radiação.



### 3.1 Planta

A planta utilizada para a realização dos experimentos foi *Coffea arabica* L., popularmente conhecido como café-arábica ou cafeeiro. Tem como características taxonômicas:

- Reino: *Plantae*
- Divisão: *Magnoliophyta*
- Classe: Magnoliopsida
- Ordem: Gentianales
- Família: Rubiaceae
- Gênero: *Coffea*
- Espécie: *Coffea arabica*

### 3.2 Coleta

As folhas de *Coffea arabica* correspondentes ao genótipo Iapar 59, foram coletados em 09 de outubro de 2012, no Instituto Agronômico do Paraná (Londrina). A coleta foi realizada em plantas matrizes (46 anos de idade); plantas de 3 anos de idade, irrigadas (por gotejamento) e não irrigadas. Para verificar a influência da arquitetura da planta e do efeito sol/autossombreamento, a colheita foi estratificada de 40 em 40 cm de altura/estrato do cafeeiro, denominando-se (estrato 1 = 40 cm; estrato 2 = 80 cm e estrato 3 = 120 cm). As amostras foram ensacadas em sacos de papel e transportadas ao Laboratório de Quimiometria em Ciências Naturais da UEL (LQCN).

### 3.3 Secagem

No laboratório as amostras foram distribuídas em bandejas para a secagem sob circulação de ar. A cada 24 h, as folhas eram viradas para permitir a aeração do material. O processo de secagem demorou de 15 a 20 dias dependendo da quantidade de folhas em cada bandeja.

### 3.4 Moagem

Quando totalmente secas, a moagem foi realizada com o auxílio do liquidificador Skymesen TA-02, peneiradas com peneira de plástico para retirada dos cabinhos, embaladas em sacos de plásticos e submetidos a vácuo. O armazenamento foi realizado em *freezer/cooler* Electrolux, modelo H 160, até serem analisadas.

### 3.5 Reagentes

Os reagentes usados para as extrações das folhas de *coffea arabica* foram diclorometano e hexano, ambos p.a (99,5 %) da marca ANIDROL, álcool etílico 95% da marca Êxodo Científica e metanol grau HPLC, J.T. Baker. Para análise por CLAE foram utilizados acetonitrila grau HPLC espectroscópico (99,8%) da marca LiChrosolv e água purificada.

### 3.6 Equipamentos

Os aparelhos e equipamentos utilizados para realização deste trabalho foram: balança analítica Shimadzu AY220, liquidificador Skymesen TA-02, evaporador rotativo FISATON 801, liofilizador Virtis SP Scientific – modelo 4KBTXL-75, banho de ultrassom ultracleaner 1400 Unique; purificador de água Milli-Q Plus,

*freezer/cooler* Electrolux, modelo H 160, espectrofotômetro UV-Vis Thermo Scientific modelo Evolution 60S; espectrômetro Thermo Scientific Nicoletti S10 FTIR, com ATR (attenuated total reflectance) e janela de Ge; cromatógrafo líquido de alta eficiência SPD-M10AV Finnigan Surveyor com detector de arranjo de fotodiodo (DAD) e bomba quaternária Termo-Electro Corporation, coluna C<sub>18</sub> KINETEX, HILIC 100 A de 2,6 micrômetros.

### **3.7 Extração**

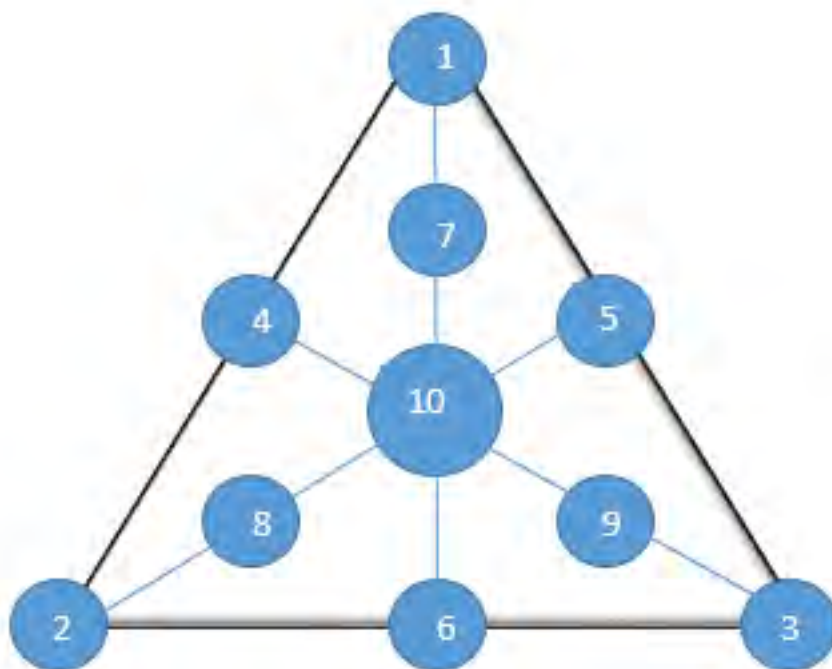
A extração foi feita por técnicas de maceração e remaceração<sup>70</sup>. Na maceração extrai-se a matéria-prima vegetal em recipiente fechado com temperatura ambiente, o período de extração é prolongado e não há renovação do líquido extrator. Nesta operação não ocorre o esgotamento da matéria prima vegetal pois o agente extrator vai tornando-se saturado até atingir um equilíbrio difusional entre o meio extrator e o interior da célula. A remaceração, então, é feita para aumentar a eficiência da extração. O processo é repetido várias vezes (4x neste estudo), utilizando-se o mesmo material e trocando-se apenas o agente extrator.

### **3.8 Preparo dos Extratos**

Para o processo de extração ser bem sucedido é necessário ser feito de maneira cuidadosa, para preservar as substâncias da planta. Geralmente utiliza-se não apenas um único solvente mas misturas de solventes com polaridades diferentes. Porém, o sucesso também dependerá da estabilidade e solubilidade da substância que será extraída<sup>47</sup>. Sendo assim, os extratos e as proporções de cada solvente extrator foram preparados de acordo com o planejamento de misturas de três componentes, do tipo centróide-simplex com três pontos axiais, Figura 6<sup>47</sup>. Este

planejamento é representado por um triângulo equilátero no qual os vértices correspondem aos solventes puros, 1 etanol (e), 2 diclorometano (d) e 3 hexano (h), as arestas 4 (ed), 5 (eh) e 6 (dh) são as misturas binárias de mesma proporção. Os pontos axiais 7 (e\*dh), 8 (ed\*h) e 9 (edh\*) são respectivamente as proporções  $(2/3^*, 1/6, 1/6)$ ;  $(1/6, 2/3^*, 1/6)$  e  $(1/6, 1/6, 2/3^*)$ , seguindo a ordem etanol, diclorometano e hexano. O ponto central 10, feito em sextuplicata, corresponde a mistura ternária de volumes iguais dos três solventes (edh). A Tabela 1 apresenta a composição de cada solvente extrator (matriz do planejamento) com 3 componentes e 15 amostras no total.

**Figura 6.** Planejamento de misturas do tipo centróide-simplex utilizando como solvente extrator: etanol, diclorometano e hexano.



**Tabela 1.** Composição dos solventes extratores

<b>Extratos</b>	<b>etanol</b>	<b>diclorometano</b>	<b>hexano</b>
<b>1 (e)</b>	1	0	0
<b>2 (d)</b>	0	1	0
<b>3 (h)</b>	0	0	1
<b>4 (ed)</b>	1/2	1/2	0
<b>5 (eh)</b>	1/2	0	1/2
<b>6 (dh)</b>	0	1/2	1/2
<b>7 (e*dh)</b>	2/3	1/6	1/6
<b>8 (ed*h)</b>	1/6	2/3	1/6
<b>9 (edh*)</b>	1/6	1/6	2/3
<b>10 (edh)</b>	1/3	1/3	1/3
<b>11 (edh)</b>	1/3	1/3	1/3
<b>12 (edh)</b>	1/3	1/3	1/3
<b>13 (edh)</b>	1/3	1/3	1/3
<b>14 (edh)</b>	1/3	1/3	1/3
<b>15 (edh)</b>	1/3	1/3	1/3

Os extratos foram preparados de acordo com a sequência apresentada na Figura 6. Para cada extrato pesou-se 2,00 g de folhas secas e trituradas. Foram então submetidas à extração por maceração com 60 mL do solvente ou da mistura de solventes conforme as proporções descritas no planejamento experimental da Tabela 1. Estas misturas ficaram em repouso por 24 horas. Após este período, foram então filtradas e submetidas à remaceração realizada mais 4 vezes nas mesmas condições da maceração. Em seguida, foram levados à evaporação num

evaporador rotativo FISATON 801 a uma temperatura de  $(50\pm 2)^{\circ}\text{C}$ . Os extratos concentrados foram levados ao ventilador, para secagem completa e em seguida liofilizados até obter massa praticamente constante. Os extratos liofilizados foram guardados em freezer (*freezer/cooler* Electrolux, modelo H 160) até o momento da utilização.

**Figura 7.** Sequência dos procedimentos para obtenção do extrato bruto das folhas de *Coffea arabica*.



### 3.9 Análise por Espectrofotometria no Ultravioleta-Visível (UV-Vis)

Para a análise por espectrofotometria no UV-Vis, foram pesados 3,00 mg de cada amostra e diluídos em 1,00 mL do solvente extrator, de acordo com o planejamento de misturas (Figura 6) e levados ao banho de ultrassom por 15 min. Em seguida, retirou-se 100  $\mu\text{L}$  e adicionou-se 1900  $\mu\text{L}$  de solvente extrator. Os extratos foram analisados em cubetas de quartzo, com caminho óptico de 1 cm, no espectrofotômetro UV-Visível Thermo Scientific modelo Evolution 60S, acoplado ao *software* Vision Lite e monitorados de 200 a 800 nm.

### 3.10 Análise por Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

Os extratos liofilizados foram analisados no espectrômetro Thermo Scientific Nicoletti S10 FTIR, com ATR e janela de Ge. O modo de medição foi em reflectância (%), com número de *scans* de 60, resolução  $4\text{ cm}^{-1}$  e faixa de comprimento de onda de  $400\text{ a }4000\text{ cm}^{-1}$ .

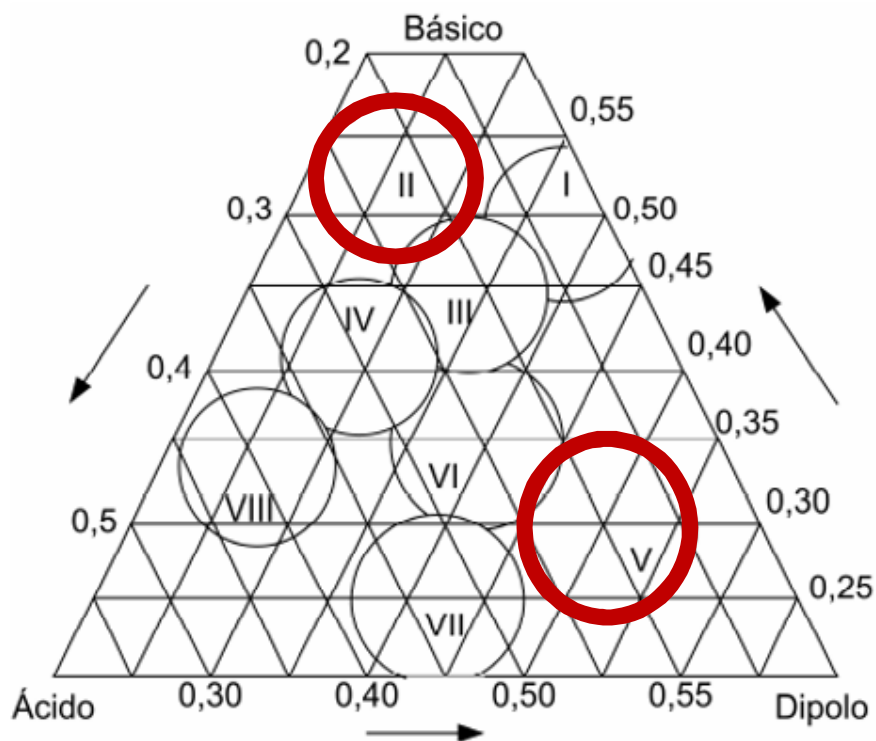
### 3.11 Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

#### 3.11.1 Escolha da fase móvel:

A escolha da fase móvel foi feita de acordo com estudos já realizados pelo grupo LQCN. Segundo o triângulo de seletividade proposto por Snyder, pode-se determinar experimentalmente 4 parâmetros: índice de polaridade ( $P'$ ), basicidade ( $x_e$ ), acidez ( $x_d$ ) e momento dipolar ( $x_n$ ). Estes parâmetros são medidas relativas das forças de interação molecular (dispersivas/polares) do solvente com o soluto e quando em misturas, tornam-se normalizadas com a polaridade total do solvente  $\Rightarrow x_d + x_e + x_n = 1$ . Na classificação original destes parâmetros, Snyder baseou-se em interações de determinados solutos-teste<sup>53</sup>:  $x_d$  = interações do solvente com dioxano,  $x_e$  = interações com o etanol e  $x_n$  = interações com nitrometano.

O gráfico que exhibe os valores de  $x_i$  para diferentes solventes é mostrado no triângulo de seletividade, Figura 8. Os solventes próximos a cada vértice do gráfico possuem predominantemente tal seletividade enquanto solventes dentro do triângulo podem interagir com os três parâmetros. Na tabela 2 encontram-se os grupos selecionados por Snyder, conforme os parâmetros de seletividade normalizados.

**Figura 8.** Triângulo de solvente de seletividade de Snyder.



**Tabela 2-** Separação de grupos determinados por Snyder.

Grupos	Membros
I	Éter alifático (éter dietílico)
II	Álcool alifático (metanol, etanol, octanol, 1- propanol)
III	Derivados de piridina, (tetraidrofurano), sulfóxidos
IV	Glicóis, ácido acético
V	Diclorometano
VI	Éster alifático, cetona, nitrila, dioxano, (acetonitrila)
VII	Hidrocarboneto aromático, composto aromático halogenado, éter aromático, compostos nitro (tolueno)
VIII	Água

Quase dez anos depois, Kamlet<sup>71</sup> desenvolveu um triângulo similar ao de Snyder também baseado em interações polares de solventes, porém com parâmetros mais consistentes. Para observar as mesmas interações, utilizou-se da média de várias sondas solvatocrômicas (solutos), moléculas que mudam de cor quando alguma destas propriedades sofrem alteração em misturas de solventes<sup>72</sup>. Os parâmetros foram denominados  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\pi$ , respectivamente. Estas medidas eliminam a incerteza causada quando utiliza-se apenas um soluto em uma mistura, pois não permite que ocorra o efeito da solvatação preferencial<sup>72</sup>.

Os valores destes parâmetros para cada solvente são derivados da espectroscopia, por isso denominado solvatocrômicos<sup>71</sup>. Assim, as medidas não sofrem influências de outras interações<sup>71</sup>, são específicas para uma interação somente. O grande benefício fornecido pelo triângulo é, portanto, o agrupamento de solventes quimicamente semelhantes (parâmetros de seletividade similares:  $x_e$ ,  $x_d$  e  $x_n$ ), mesmo apresentando diferentes valores de polaridade. Estes agrupamentos ocorrem de acordo com o tipo de interação com os compostos de interesse.

O etanol, por exemplo, possui valores de acidez ( $\alpha$ ) e basicidade ( $\beta$ ) próximos e maiores que o valor de polaridade ( $\pi$ ); encontra-se, portanto, mais acima no triângulo, Figura 8. O diclorometano, como forte doador de prótons e fraco receptor, tem caráter dipolar e por isso encontra-se no eixo acidez-dipolaridade, apresentando maior valor de  $\pi$ . Extrairá, portanto, compostos polares como: éter, éster, sulfeto, sulfóxido, tiól, halogênio, hidroxila, aldeído, cetona, compostos com ligações nitro ( $-\text{NO}_2$ ) e nitrila ( $-\text{CN}$ ). Já o hexano, não se encontra nesta tabela, visto ser um composto apolar e possuir os três parâmetros próximos de zero. Por exemplo, a mistura binária etanol:diclorometano irá possuir forte caráter ácido e dipolar. As misturas que contiverem estes solventes farão interação dipolar, extraindo

consequentemente compostos com tais características. Dos solventes puros, somente o etanol e a água têm a capacidade de apresentar as três interações. Contudo, a água por ser um forte doador de prótons, apresenta um caráter ácido e dipolar e extrai principalmente compostos mais básicos como ésteres, cetonas e aminas. A Tabela 3 apresenta a classificação dos solventes e das misturas de solventes de acordo com os parâmetros de seletividade normalizados<sup>45</sup>.

**Tabela 3:** Classificação dos solventes de acordo com a seletividade normalizada

Solvente/ misturas	Seletividade			
	$\alpha/\Sigma$	$\pi^*/\Sigma$	$\beta/\Sigma$	Polaridade
Etanol	0,39	0,25	0,36	4,30
Diclorometano	0,27	0,73	0,00	3,10
e/d	0,33	0,49	0,18	3,70

Estes valores de  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\pi^*$  para cada solvente puro ou em misturas foram normalizados pela somatória dos valores,  $\alpha + \beta + \pi^* = \Sigma$ . Sendo assim, cada parâmetro expressa uma interação de coeficientes fracionários  $\alpha/\Sigma$  (acidicidade),  $\beta/\Sigma$  (basicidade) e  $\pi^*/\Sigma$  (dipolaridade).

### 3.11.2 Preparo das amostras para análise cromatográfica

As amostras para análise cromatográfica foram preparadas pesando-se 3,00 mg de cada extrato redissolvidos em 1,00 mL de metanol, grau HPLC, J.T. Baker e levadas ao banho de ultrassom. Após diluídas, as amostras foram filtradas em filtro Milipore Millex de 0,22  $\mu\text{m}$ . Deste filtrado, pegou-se 50  $\mu\text{L}$  e diluiu-se em 950  $\mu\text{L}$  (1:20) das misturas de solvente conforme planejamento experimental, Figura 6. As

alíquotas foram então colocadas em eppendorfs e armazenadas em freezer até a leitura. A análise por CLAE foi realizada em cromatógrafo líquido de alta eficiência SPD-M10AV Finnigan Surveyor com detector de arranjo de fotodiodo (DAD) e bomba quaternária Termo-Electron Corporation. A coluna utilizada foi HILIC 100 A de 2,6  $\mu\text{m}$ , o volume de injeção foi de 20  $\mu\text{L}$ , vazão da fase móvel a 0,5  $\text{mL min}^{-1}$  e tempo de análise de 12 min. A detecção foi monitorada nos comprimentos de onda de 276 nm, 290 nm e 325 nm utilizando o *software* Chromquest. A escolha da fase móvel foi baseada no triângulo de Snyder e otimizada de acordo com análises do grupo de pesquisa. Utilizou-se ACN:H<sub>2</sub>O (15:85 v/v).

### **3.12 Análise Exploratória dos Dados**

Para o processamento dos dados obtidos foi utilizado o programa STATISTICA 6.0. Para calcular as componentes principais e o dendrograma foram utilizados métodos quimiométricos de Análise das Componentes Principais (ACP) e Análise Hierárquica (AH).



## **CAPÍTULO IV**

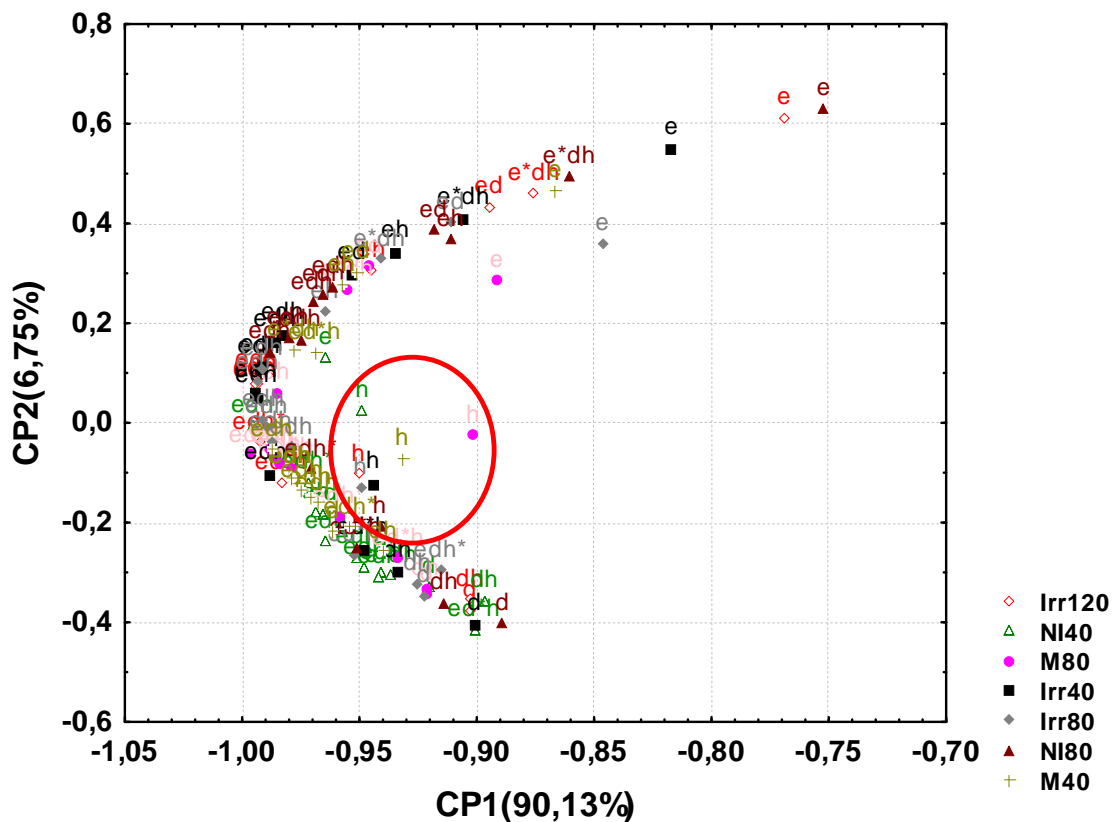
## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A primeira etapa deste trabalho foi submeter as 105 amostras (15 extratos de cada planta: não irrigada em 40, 80 e 120 cm de altura; planta irrigada em 40 e 80 cm e planta matriz em 40 e 80 cm de altura) definidas em uma matriz matemática de 576 linhas por 106 colunas, a um estudo exploratório dos extratos obtidos pelas diferentes misturas de solventes, de acordo com a Figura 6. Realizaram-se então análises pré-estabelecidas para obtenção de respostas através de comparações entre plantas irrigadas, não irrigadas e plantas matriz em diferentes alturas, a fim de identificar regiões discriminatórias e diferenças entre as amostras. Esta matriz foi submetida a ACP (análise de componentes principais).

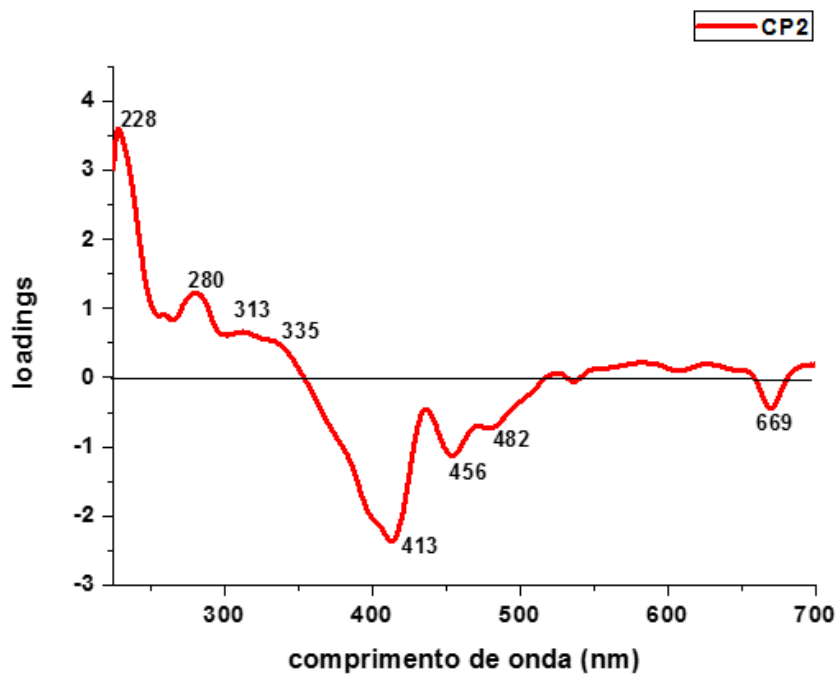
As três primeiras componentes principais (CP) explicam 98,38% da variância total dos dados. Uma análise dos grupos pode ser verificada na projeção da CP1 x CP2, que explica 96,74% da variância total, Figura 9, porém, o que se pode visualizar pelo gráfico dos escores não é uma separação e sim um aglomerado de extratos, que não nos fornece informações químicas suficientes, mostra-nos três regiões distintas, discriminadas pela CP2. A extremidade positiva separa os metabólitos extraídos por etanol puro e suas misturas binárias. Na outra extremidade, região negativa da CP2, encontram-se misturas ternárias de solventes e extratos contendo diclorometano. O grupo circulado, CP2 intermediária, separa os extratos em hexano puro, fato associado à sua polaridade próxima à zero. A CP1, sempre terá a maior variância explicada, nela estarão contidas uma gama de informações, porém, não relevantes para este caso específico. O que observa-se é a polaridade de solventes distribuída ao longo da segunda componente principal.

**Figura 9.** Gráfico dos escores CP1 x CP2 para os dados espectrofotométricos no UV-Vis de todas as amostras de *Coffea arabica* de genótipo IAPAR59, de acordo com o planejamento experimental.



A Figura 10 apresenta os loadings da CP2, com os comprimentos de onda que influenciaram para a separação dos extratos polares. Observa-se, na CP2, que os valores positivos que influenciam na separação dos grupos em etanol, estão localizados no comprimento de onda de 228, 280, 313 e 335 nm, são característicos de ácidos de baixo peso molecular, cafeína, ácidos clorogênicos e compostos fenólicos em geral. Os grupos extraídos em diclorometano estão posicionados na parte negativa da CP2 e influenciados principalmente pelas variáveis com comprimento de onda 413, 456, 482 e 669 nm, que correspondem aos comprimentos de onda característicos dos carotenóides (400-500 nm) e clorofila a (669 nm).

**Figura 10.** Gráfico dos loadings CP2 para os dados espectrofotométricos no UV-Vis de todas as amostras de *Coffea arabica* de genótipo IAPAR59, de acordo com o planejamento experimental.

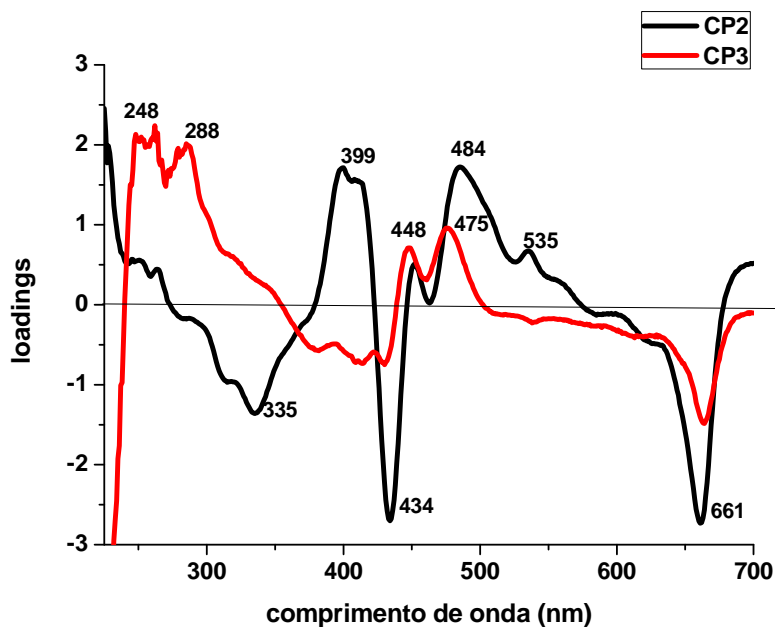


O segundo passo foi dispor os dados espectrais separadamente, para obter uma melhor visualização e assim uma análise mais concisa. Os dados espectrais das folhas da planta matriz (46 anos) em suas duas alturas de 40 e 80 cm foram dispostos em uma matriz de 30 extratos por 576 valores de absorbâncias (comprimentos de onda- nm). Esta matriz foi submetida a ACP e AH.

As três primeiras componentes principais (CP) explicam 98,34% da variância total dos dados, porém, assim exposto anteriormente, como a CP1 explica a projeção dos dados contudo não fornece informações úteis à este estudo, utilizou-se a projeção CP2 x CP3, explicando apenas 6,16% da variância total. A Figura 11 mostra o gráfico dos escores para as duas alturas, 40 cm e 80 cm da planta matriz. Nota-se pelo gráfico dos escores que há formação de grupamentos distintos pelo solvente e dois grupamentos distintos por alturas, com a maior parte dos extratos.



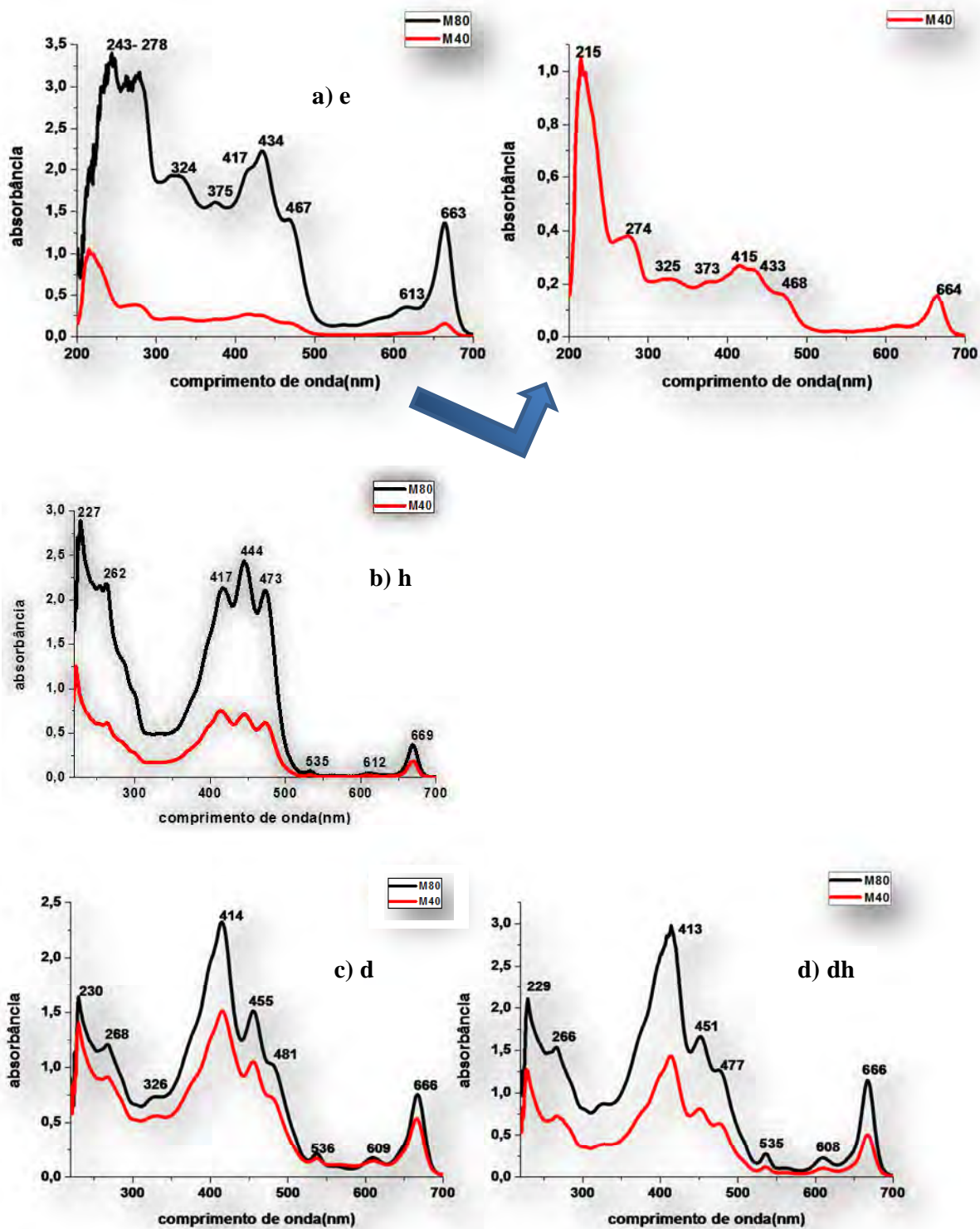
**Figura 12.** Gráfico dos loadings CP2 x CP3 para os dados espectrofotométricos no UV-Vis das amostras de *Coffea arabica* de genótipo IAPAR59, plantas matriz de 40 e 80 cm, de acordo com o planejamento experimental.



Nota-se que os valores positivos da CP2 estão localizados no comprimento de onda de 399, 484 e 535 nm e influenciam na separação dos grupos 2,3,4 (por agente extrator) e do extrato de etanol de altura 40 cm. O extrato etanólico de 80cm de altura, posicionado na parte negativa da CP2, é mais influenciado pelas variáveis com comprimentos de onda 335, 434 nm (carotenóides) e 661 nm (clorofila alfa). Os valores mais positivos da CP3 estão localizados no comprimento de onda de 248 a 288 nm, com dois picos de menor intensidade em 448 e 475 nm, influenciando principalmente na separação do extrato etanólico de 80 cm de altura.

Por meio dos espectros, Figura 13, é possível observar as bandas respectivas de absorção dos metabólitos extraídos em etanol, hexano e diclorometano puros e mistura binária diclorometano:hexano, respectivamente.

**Figura 13.** Espectros de UV-Vis das amostras da folha de *Coffea arabica*. a) etanol, b) hexano e c) diclorometano puros; d) mistura binária diclorometano:hexano.



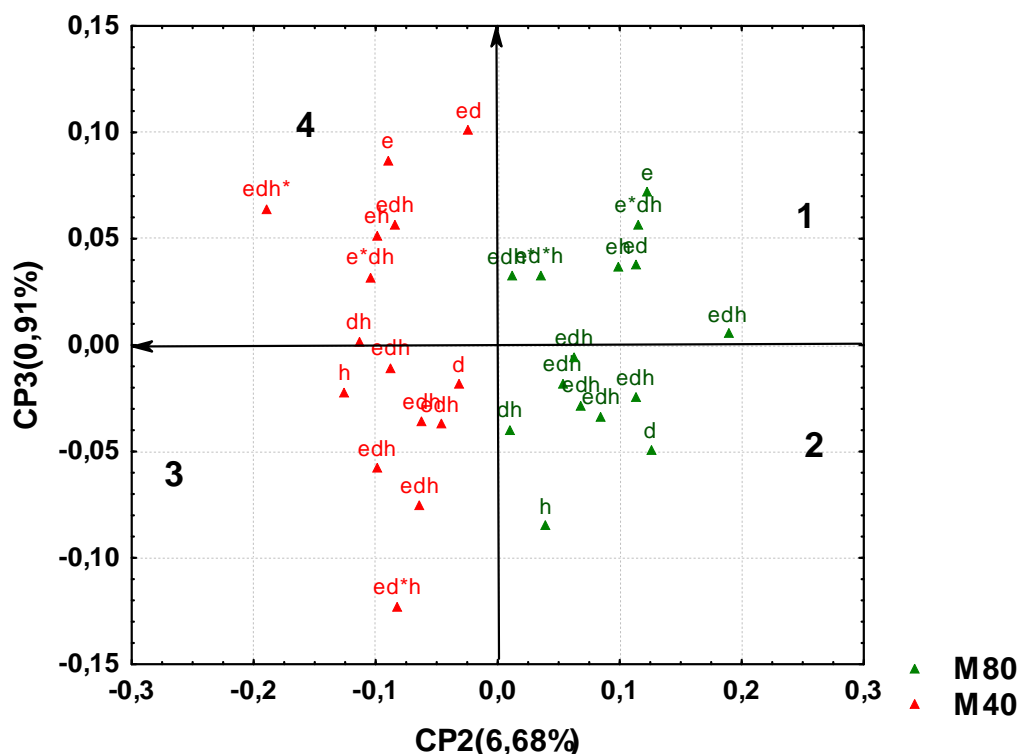
Estes espectros foram escolhidos de acordo com a separação observada na análise de componentes principais. Podemos observar que as análises em UV-Vis foram capazes de extrair os corantes do vegetal. Como observado na literatura, quando se trata do solvente extrator diclorometano, observamos espectros relacionados a alcaloides, já quando o agente é o hexano, extrai-se substâncias mais apolares, como os carotenóides, o que podemos observar na Figura 13b, pela formação característica de 3 picos distintos. Há uma vasta gama de espécies de carotenoides, que se diferenciam de acordo com os comprimentos de onda de cada um dos três picos característicos. Por meio dos dados obtidos e de pesquisas em trabalhos científicos, podemos associar os comprimentos de onda de absorção dos extratos das folhas de planta matriz à prolicopeno e /ou neurosporeno. A faixa de comprimentos de onda pode variar sutilmente de acordo com o solvente extrator<sup>73</sup>. A separação observada com os extratos em etanol puro, pode advir da grande diferença de absorbância observada, com extração de heterosídeos e compostos fenólicos em geral<sup>44</sup>. Nos casos de etanol e diclorometano houve uma ligeira sobreposição dos metabólitos polares: clorofila alfa e beta, ácidos clorogênicos, cafeína, clorofila. Esta sobreposição deve-se ao fato da técnica espectrofotométrica ser uma análise limitada para metabólitos de plantas pois as diferenças na mesma espécie são pequenas e as folhas possuem uma complexa composição<sup>49</sup>. Os metabólitos, podem então passar despercebidos nesta região. Portanto, necessita-se de uma complementação<sup>50</sup>.

Mediante equações estabelecidas na literatura<sup>72,74</sup> identificam-se teores de clorofila alfa, beta e total. Já os tipos de carotenóides são determinados de acordo com o valor de absorbância do pico de maior intensidade. Esta planta, por ser bem mais velha que as demais, pode apresentar maiores quantidades de xantinas (pigmento de cor amarelada) que de clorofila. Observando a Figura13 nota-se que



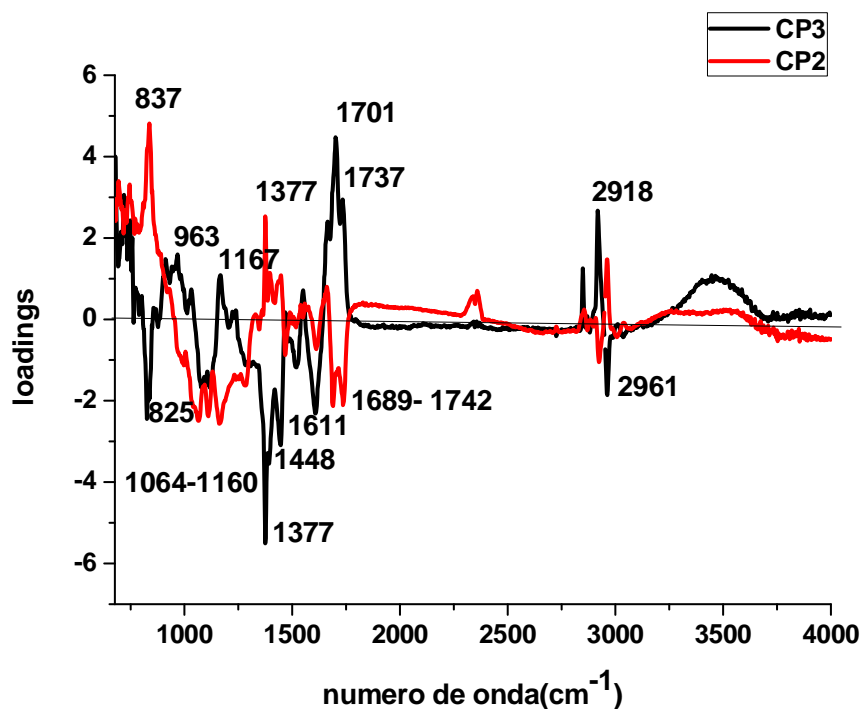
O objetivo foi observar as diferenças entre os extratos de 40 e 80 cm da planta matriz. A Figura 15 mostra a projeção da CP2 x CP3, que explicam apenas 7,58% da variância total, porém fornecem maiores informações químicas para análise no infravermelho. Nota-se pelo gráfico dos escores, a separação das amostras pelos 4 quadrantes. A CP2 é determinante na separação dos dois estratos. Na CP2 positiva situam-se os quadrantes 1 e 2 (planta matriz 80 cm), enquanto que na região negativa encontram-se os quadrantes 3 e 4 (planta matriz 40 cm). A componente 2 separa as alturas de 40 e 80 cm da planta matriz em todos os extratos analisados. A CP3 positiva separa as amostras das duas alturas extraídas em etanol puro e misturas binárias enquanto sua região negativa acomoda extratos em diclometano e hexano puros.

**Figura 15.** Gráfico dos escores CP2 x CP3 para os dados espectroscópicos de FTIR das amostras de *Coffea arabica* de genótipo IAPAR59, da planta matriz nas alturas de 40 e 80 cm, de acordo com o planejamento experimental.



O gráfico dos loadings das variáveis CP2 x CP3, apresenta-se na Figura 16, com os comprimentos de onda mais influentes para a separação dos estratos. Nota-se que a região mais discriminatória para o conjunto das folhas de 40 cm de altura (quadrantes 3 e 4) encontra-se na CP2 negativa e corresponde aos números de onda nas regiões de 1064-1160  $\text{cm}^{-1}$  e 1689-1742  $\text{cm}^{-1}$ . Já o conjunto das folhas de 80 cm (quadrantes 1 e 2), localizados na CP2 positiva, estão discriminados nos números de onda 837  $\text{cm}^{-1}$  e 1377  $\text{cm}^{-1}$ . A CP3 positiva, separa os extratos de etanol puro e suas misturas binárias nos números de onda de 963, 1167, 1701, 1737 e 2918  $\text{cm}^{-1}$ . Já os extratos em diclorometano e hexano puros, encontrados nos quadrantes 2 e 3 são separados pela CP3 negativa e associam-se aos números de onda 825, 1377, 1448, 1611 e 2961  $\text{cm}^{-1}$ .

**Figura 16.** Gráfico dos loadings CP2 x CP3 para os dados espectroscópicos de FTIR das amostras de *Coffea arabica* de genótipo IAPAR59, da planta matriz nas alturas de 40 e 80 cm, de acordo com o planejamento experimental.

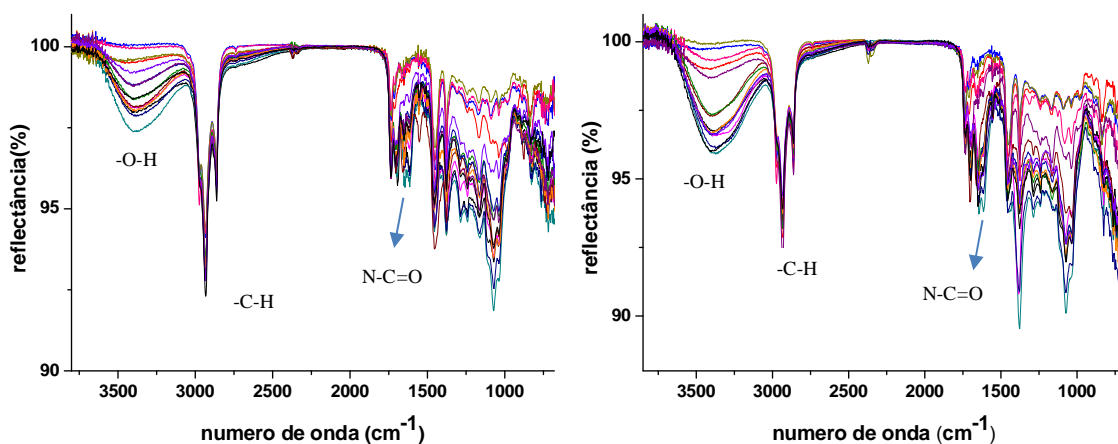


A Figura 17 mostra os espectros no infravermelho dos extratos da planta matriz nas duas alturas de 40 e 80 cm, respectivamente. Os resultados desta análise estão de acordo com a análise UV-Vis. A menor reflectância da planta de 80 cm quando comparada à 40 cm de altura mostra que esta possui uma maior absorção e conseqüentemente uma maior abundância relativa de metabólitos secundários, como observado anteriormente.

a) 40 cm

b) 80 cm

**Figura 17.** Espectros das análises de FTIR das amostras de planta matriz de a) 40 cm e b) 80 cm respectivamente, da folha de *Coffea arabica*



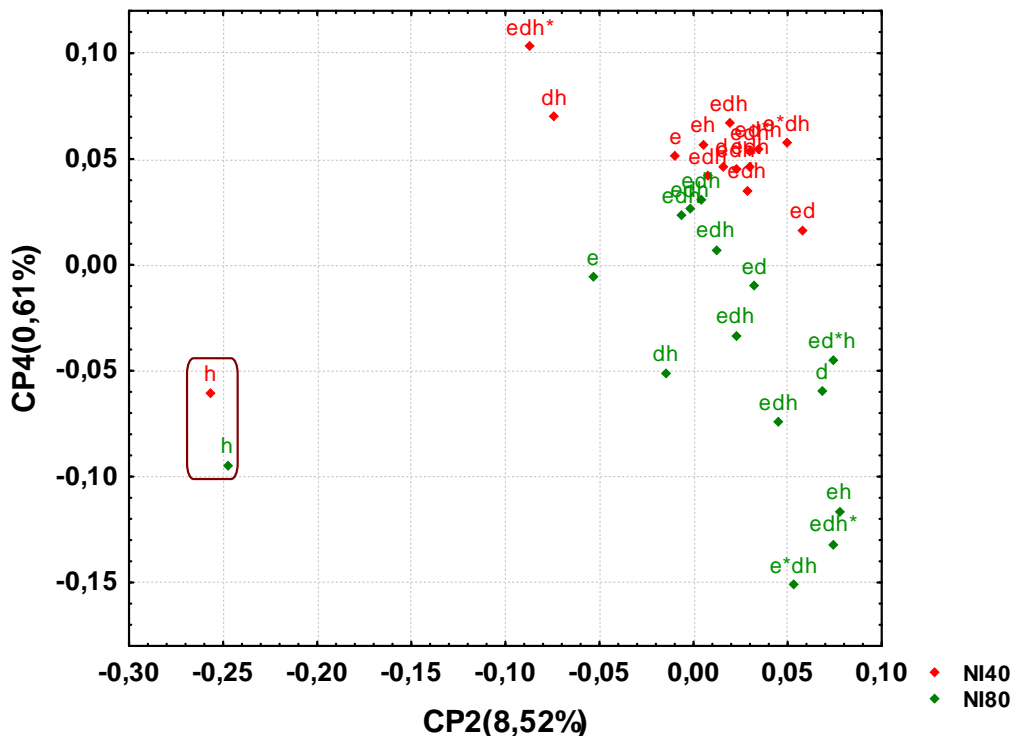
Os extratores da planta matriz em que observou-se diferença foram: hexano puro, mistura binária etanol:diclorometano, mistura binária etanol:hexano, mistura ternária etanol:diclorometano:hexano (2/3;1/6;1/6), (1/6;2/3;1/6). Todas as demais misturas binárias ou ternárias apresentaram-se semelhantes. A região em torno de 3300-3400 cm<sup>-1</sup> corresponde a ligação O-H de álcoois ou fenóis. Todos também possuem a banda de  $\delta$  C-H em torno de 2920 cm<sup>-1</sup>. Em torno de 1680-1630 cm<sup>-1</sup> observamos a banda correspondente a C=O de amidas e entre 1680-1600 cm<sup>-1</sup>

caracteriza-se a banda C=C de alcenos. Em regiões de 1370 a 1380  $\text{cm}^{-1}$  encontramos a banda de deformação fora do plano de  $\text{CH}_3$ . Estes espectros apresentam uma banda característica de estiramento C-O de álcool em torno de 1300-1000  $\text{cm}^{-1}$ . Entre 1000 e 680  $\text{cm}^{-1}$  observamos banda característica de deformação C-H fora do plano. O extrato em hexano puro, mostra um espectro diferente dos demais por possuir uma banda na região de 1730  $\text{cm}^{-1}$ , que corresponde C=O de éster e uma banda em torno de 1450  $\text{cm}^{-1}$ , correspondente a deformação simétrica de  $\text{CH}_3$ . Apesar da banda indicar uma função orgânica éter, polar, a molécula de carotenoide possui uma cadeia longa, com ligações conjugadas que integram sua “espinha dorsal” e influenciam nas características químicas mais apolares. Quando há um agrupamento polar, estes encontram-se em regiões terminais, são cíclicos e algumas vezes apresentam substituintes com oxigênio. Este é o motivo da resposta obtida, que concorda com o UV-Vis apresentado anteriormente, quando se afirma que o hexano extrai substâncias apolares, neste caso, carotenóides<sup>75</sup>.

A Figura 18 mostra a análise hierárquica. Pelo dendograma, na distância de conexão de 20 nota-se a mesma separação de grupos observada pela CP2 x CP3, Figura 15.



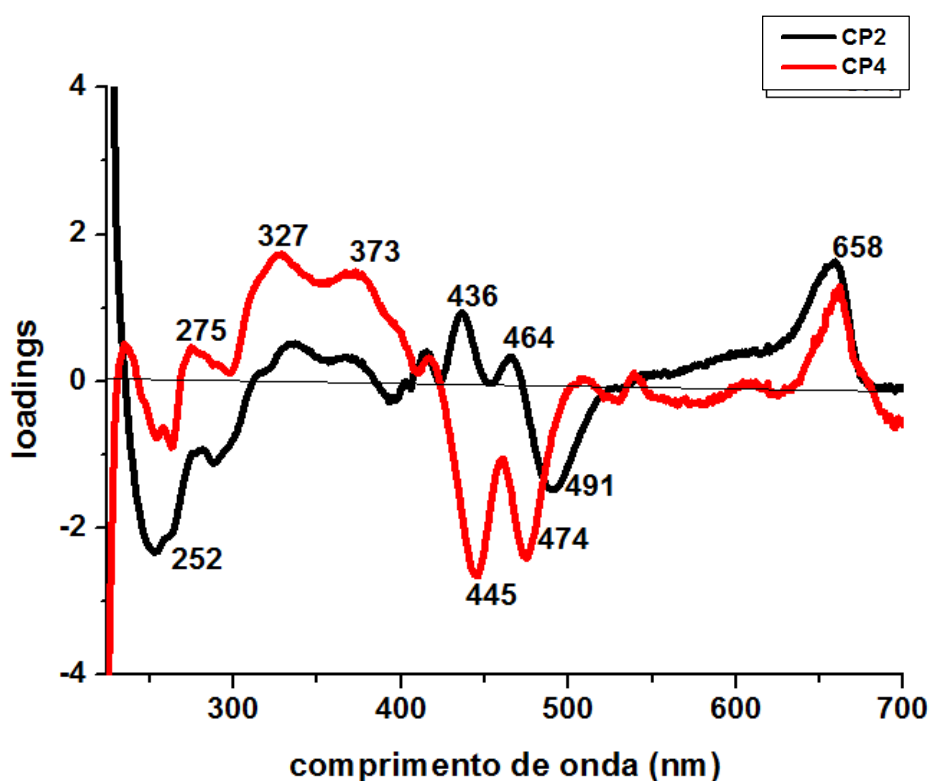
**Figura 19.** Gráfico dos escores CP2 x CP4 para os dados espectrofotométricos no UV-Vis das folhas não irrigadas 40 cm e 80 cm, de acordo com o planejamento experimental.



A Figura 20 apresenta os loadings CP2 x CP4 com os comprimentos de onda que influenciam na diferenciação dos extratos. Os resultados da análise de componentes principais mostram que há diferenças na composição química das amostras de acordo com a altura do estrato e com o solvente extrator hexano. Observa-se que os valores positivos da CP2, localizados no comprimento de onda de 436 a 464 nm não discriminam os estratos, visto que as duas alturas estão dispostas nesta mesma região da componente. A região negativa da CP2, está representada pelo comprimento de onda de 252 nm. Na região positiva da CP4 estão localizados os comprimento de onda de 275, 327 e 373 nm (região correspondente à ácidos clorogênicos e ácido cafeico), que influenciam na separação dos extratos de 40 cm, enquanto que os extratos na altura de 80 cm encontram-se mais dispersos na região

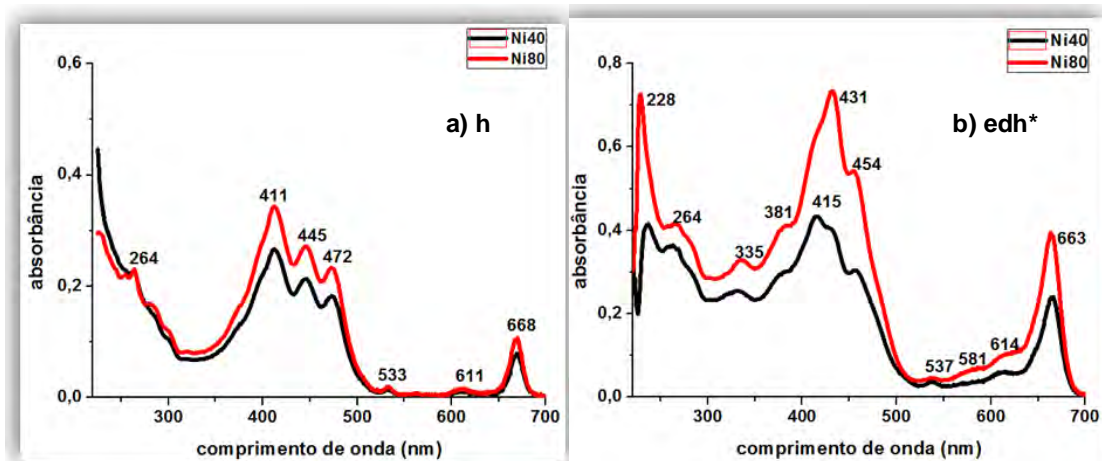
negativa da CP4 e são influenciados pelas variáveis com comprimentos de onda 445 e 474 nm. Nesta região separam-se os extratos em hexano puro das duas alturas e os extratos de 80 cm.

**Figura 20.** Gráfico dos loadings CP2 x CP4 para os dados espectrofotométricos no UV-Vis das amostras de *Coffea arabica* de genótipo IAPAR59, das folhas não irrigadas 40 cm e 80 cm de altura, de acordo com o planejamento experimental.



Por meio dos espectros, Figura 21, é possível observar as bandas respectivas de absorção dos metabólitos extraídos em hexano puro e mistura ternária etanol:diclorometano:hexano (1/6:1/6:2/3), para verificar possíveis diferenças nos extratos com diferentes proporções de hexano.

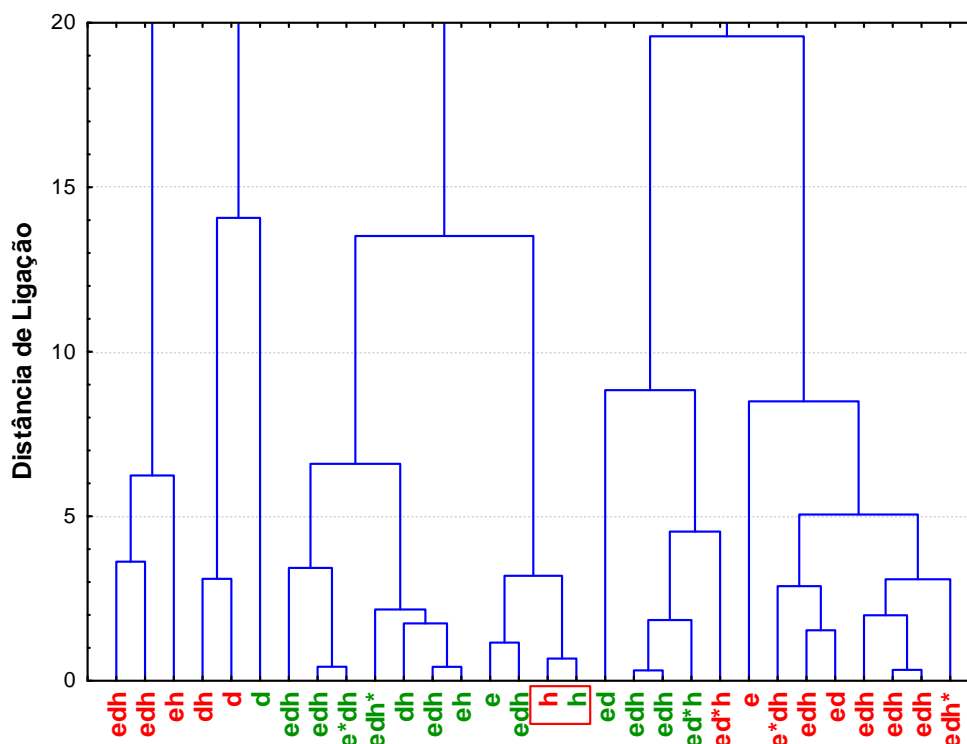
**Figura 21.** Espectros das análises de UV-Vis das amostras da folha de *Coffea arabica*, folhas não irrigadas 40 cm e 80 cm de altura. a) hexano puro e b) mistura ternária etanol:diclorometano:hexano (1/6:1/6:2/3).



À separação ocorrida na análise de componentes principais associa-se a diferença de absorvância observada, porém, como se trata de uma mesma espécie, é singular a obtenção de respostas correlatas. Observando a Figura 21, notam-se pequenas absorções em relação ao hexano puro, praticamente iguais nos dois extratos da planta não irrigada. Estas absorções concordam com os comprimentos de onda observados no gráfico de loadings, relativos aos carotenóides, também na região de prolicopeno e neurosporeno. Nos casos das misturas binárias e ternárias, observa-se uma ligeira fusão de metabólitos: carotenóides, clorofila (alfa e beta), cafeína, ácidos clorogênicos, ácido cafeico; pelo fato de existirem extratores polares. Observa-se, nestes espectros, uma maior absorvância dos extratos de folhas não irrigada em 80 cm de altura, exemplificadas em hexano puro e mistura ternária (etanol:diclorometano:hexano – 1/6:1/6:2/3), enfatizando a resposta obtida em relação à comparação das plantas matriz, quando se trata de altura<sup>72</sup>. Há a proporcionalidade nas relações luminosidade, absorção de metabólitos, produção de energia / radicais livres, danos celulares e defesa<sup>72</sup>.

O dendograma, Figura 22, concorda com o gráfico de escores mostrado na Figura 19. O resultado apresenta-se na Figura 22. No valor de 5 é possível observar os agrupamentos formados na projeção CP2 x CP4 e na distância de 1 observa-se o agrupamento do agente extrator hexano nas duas alturas.

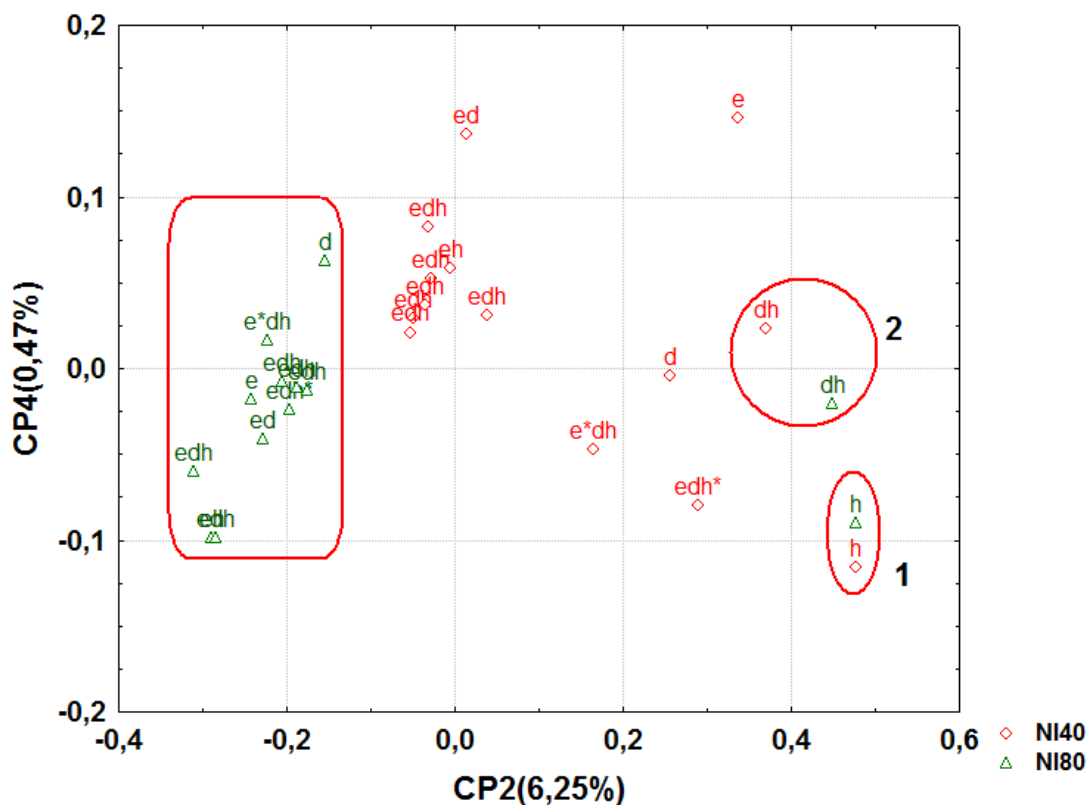
**Figura 22.** Dendograma baseado nos dados dos espectros do ultravioleta para os extratos de plantas não irrigadas, descritos no planejamento experimental.



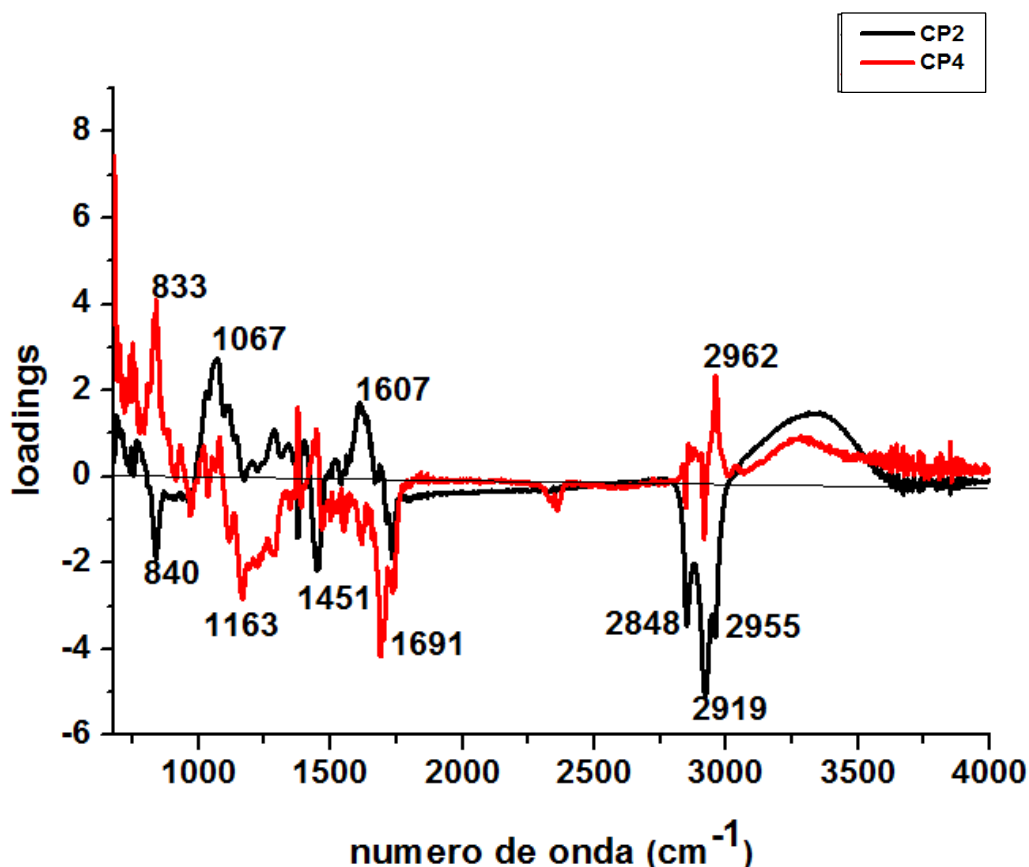
Estes mesmos extratos foram analisados por espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier, com a intenção de observar diferenças entre as alturas de 40 e 80 cm da planta não irrigada e a possível concordância com as análises de UV-Vis. A matriz matemática dos dados, composta de 30 extratos por 1725 valores de reflectância (número de onda-  $\text{cm}^{-1}$ ) foi submetida a ACP e AH. A Figura 23, apresenta a projeção da CP2 x CP4, que explicam 6,67% da variância total, para análise das folhas não irrigadas em suas duas alturas. Nota-se pelo gráfico dos

escores que a componente principal 2 é a responsável pela separação dos extratos. Podemos dividi-la em três regiões: na região negativa da CP2 estão agrupados os extratos da planta não irrigada de 80 cm de altura. Na região intermediária, há um grupo de misturas da planta em 40 cm. Na região mais positiva da CP2 observa-se principalmente agrupamentos por solventes das duas alturas, (mistura diclorometano:hexano e hexano puro). A Figura 24 apresenta o gráfico dos loadings, CP2 x CP4 com os números de onda mais influentes para a separação dos extratos.

**Figura 23.** Gráfico dos escores CP2 x CP4 para os dados espectroscópicos no FTIR das amostras de folhas não irrigada nos extratos de 40 e 80 cm de altura de acordo com o planejamento experimental.



**Figura 24.** Gráfico dos loadings CP2 x CP4 para os dados espectroscópicos de FTIR das amostras de *Coffea arabica* de genótipo IAPAR59, folhas não irrigada nos extratos de 40 e 80 cm de altura, de acordo com o planejamento experimental.



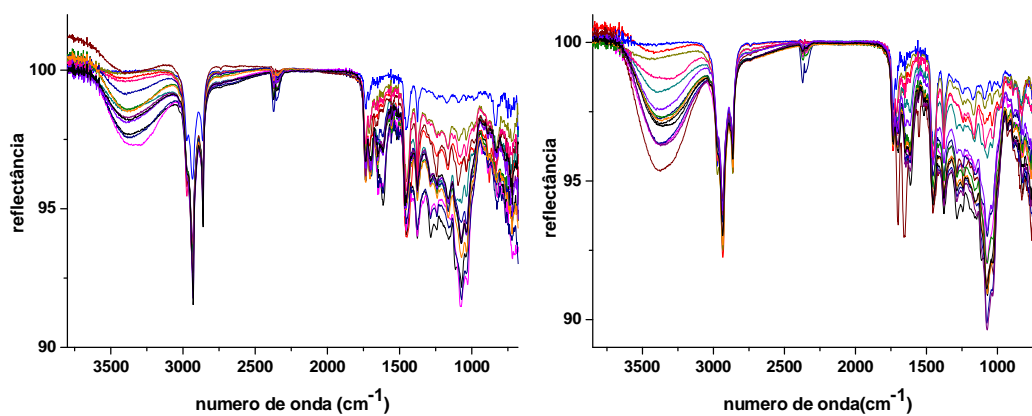
Os resultados da análise de componentes principais mostraram diferenças na composição química das amostras decorrente às alturas. Observa-se que os valores mais positivos da CP2 estão localizados no número de onda de 1067 cm<sup>-1</sup>, correspondente a (νC-O) de éster ou álcool primário e 1607 cm<sup>-1</sup> (função amida) e influenciam na separação por solventes (mistura binária diclorometano:hexano e hexano puro). Os grupos de extratos de 80 cm de altura, posicionados na região negativa da CP2, são mais influenciados pelos número de onda 840; 1451 cm<sup>-1</sup> que refere-se ao estiramento CH<sub>3</sub> assimétrico; 2848, 2919 e 2955 cm<sup>-1</sup>, correspondendo a bandas de δ C-H. A Figura 25 apresenta os espectros dos diferentes extratos

registrados no FTIR para as amostras de plantas não irrigadas em suas duas alturas, 40 e 80 cm, respectivamente.

a) 40 cm

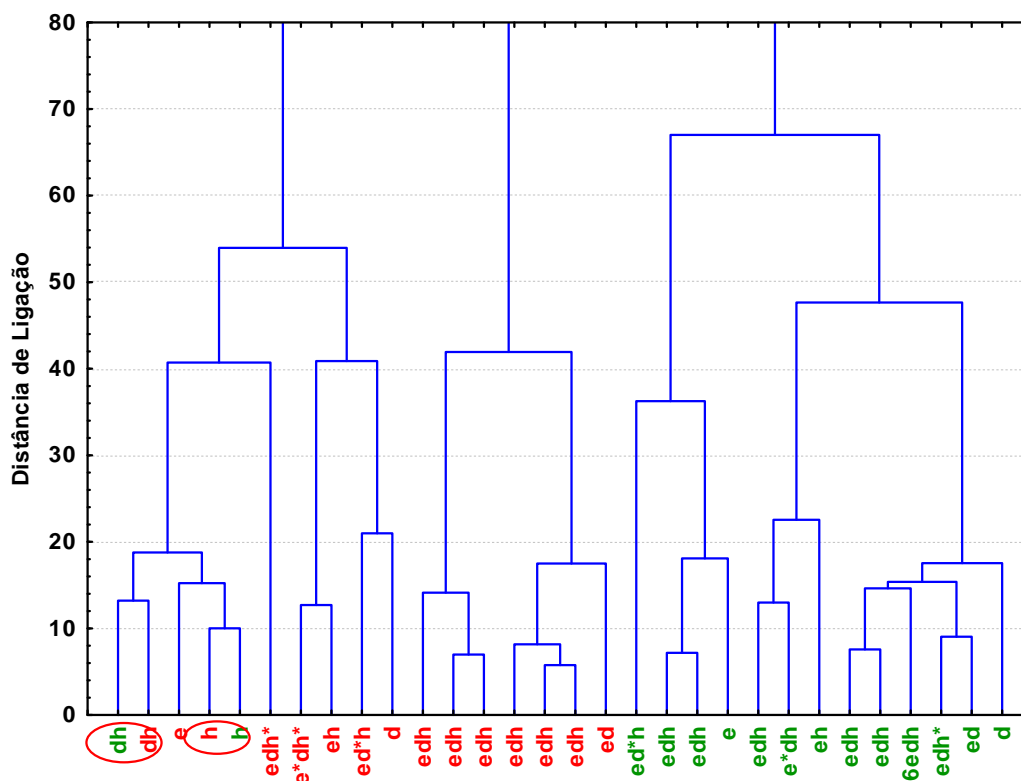
b) 80 cm

**Figura 25.** Espectros por análise de FTIR das amostras de plantas não irrigadas da folha de *Coffea arabica* em duas alturas distintas ( a)40 cm e b) 80 cm).



O dendograma, Figura 26, concordou com o gráfico de escores mostrado na Figura 23, no valor de 20 é possível observar os agrupamentos.

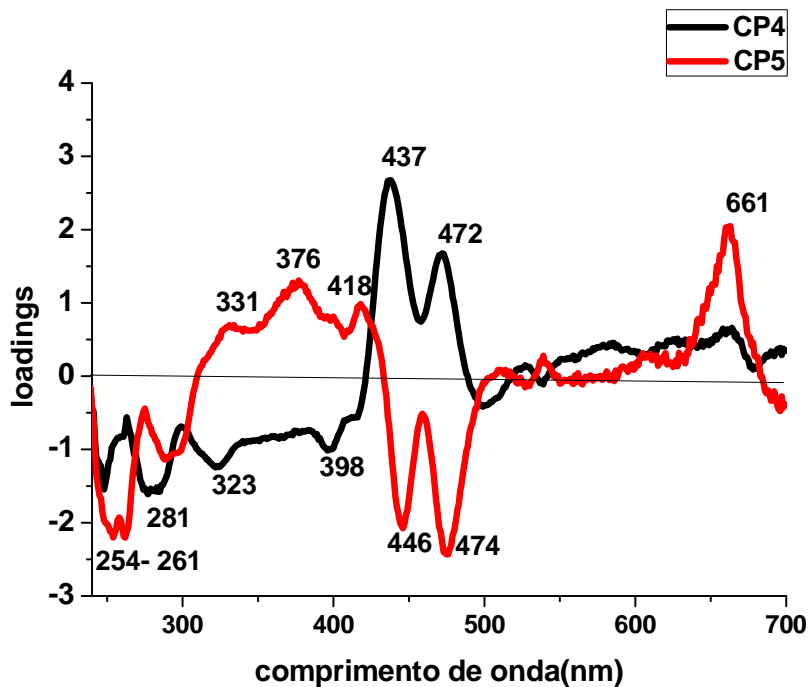
**Figura 26.** Dendrograma baseado nos dados dos espectros do FTIR para os extratos de folhas não irrigadas em duas alturas distintas (40 e 80 cm).



Os dados espectrais de todas as amostras das plantas irrigadas foram dispostos em uma matriz de 45 extratos por 576 valores de absorvâncias (comprimentos de onda - nm). Esta matriz foi submetida à análise de componentes principais ACP e AH. A primeira componente principal (CP) explica 90,97% da variância total dos dados, porém, as informações químicas relevantes nela contidas não se aplicam a este estudo. Para este caso, uma melhor discriminação de dados pode ser verificada na projeção CP4 x CP5, porém, explicam apenas 0,70 % da variância total. A Figura 27 mostra o gráfico dos escores para as três alturas, 40, 80 e 120 cm das plantas irrigadas. A CP4 separa os extratos em 3 regiões. Na CP4 mais positiva encontram-se os extratos preparados em hexano (grupo1), na região mais negativa os extratos preparados em diclorometano e diclorometano:hexano para as



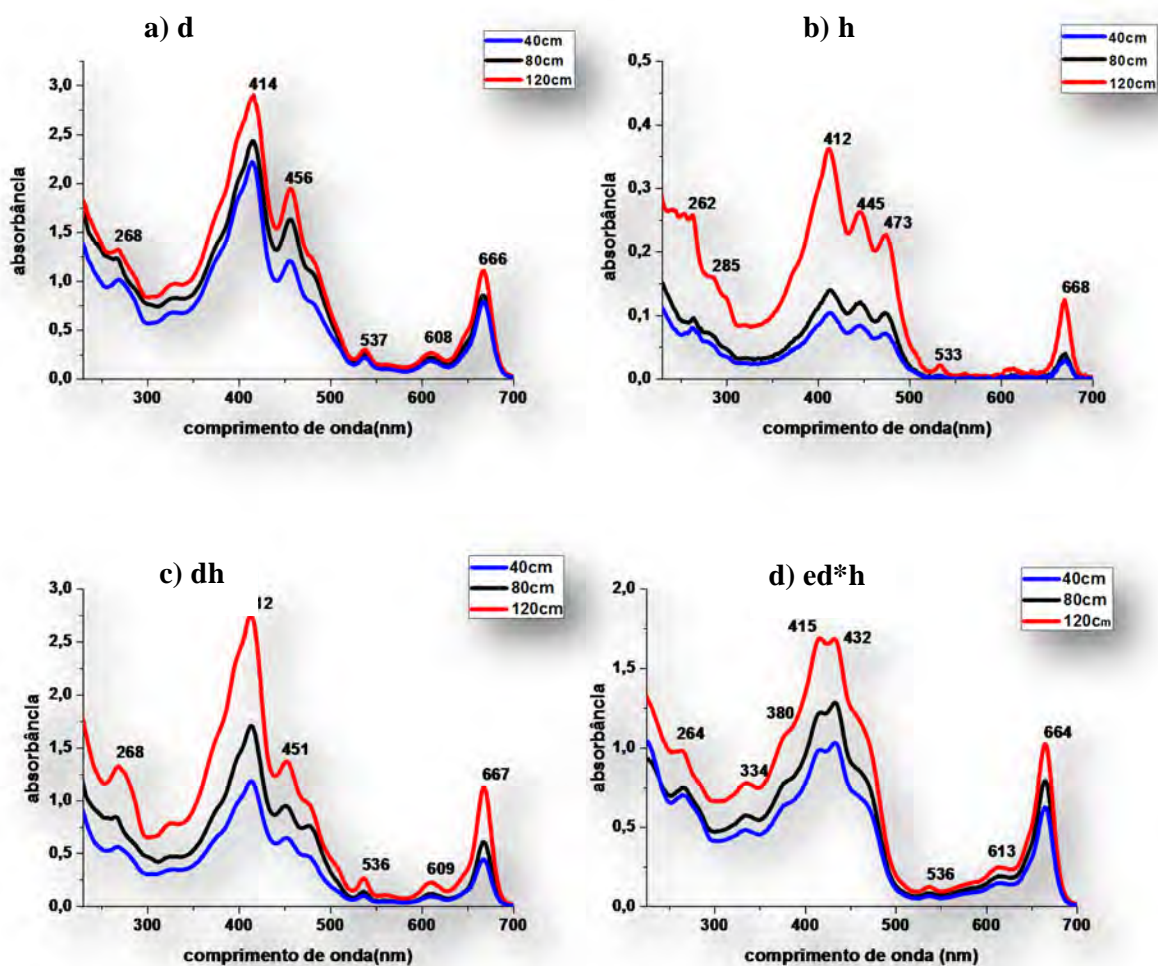
**Figura 28.** Gráfico dos loadings CP4 x CP5 dos dados espectrofotométricos no UV-Vis das folhas de *Coffea arabica* irrigadas em 40, 80 e 120 cm, de acordo com o planejamento experimental.



Observa-se que os valores positivos da CP4 estão localizados no comprimento de onda de 437 e 472 nm e influenciam na separação do grupo 1. Os demais grupos posicionados na parte negativa da CP4, são mais influenciados pelas variáveis com comprimentos de onda 281, 323 e 398 nm. Os valores positivos da CP5, localizados no comprimento de onda de 331, 376, 418 e 661 nm, influenciam na separação dos grupos 2, 3 e 6. Esta região assemelha-se à região observada na análise de folhas não irrigadas e sugerem, portanto, ácidos clorogênicos e ácido cafeico. Já os grupos 1, 4 e 5 encontram-se na região negativa da CP5 e estão associados aos comprimentos de onda de 254-261 nm e 446 e 474 nm. O que se observa é a maior separação das plantas de 120 cm de altura em relação aos outros dois, isso pode ser atribuído a maior altura e maior luminosidade. Com o auxílio dos espectros, Figura 29, é possível observar as respectivas bandas de absorção dos

metabólitos extraídos em diclorometano e hexano puros, mistura binária diclorometano:hexano (1:1) e mistura ternária etanol:diclorometano:hexano (1/6:2/3:1/6), respectivamente, para visualização e comparação dos extratos puros e em misturas.

**Figura 29.** Espectros das análises de UV-Vis das amostras da folha de *Coffea arabica* de genótipo IAPAR59 das plantas irrigadas em 40 cm, 80 cm e 120 cm, de acordo com o planejamento experimental. a) diclorometano e b) hexano puros, c) mistura binária diclorometano:hexano (dh) e d) mistura ternária etanol:diclorometano:hexano (1/6:2/3:1/6).

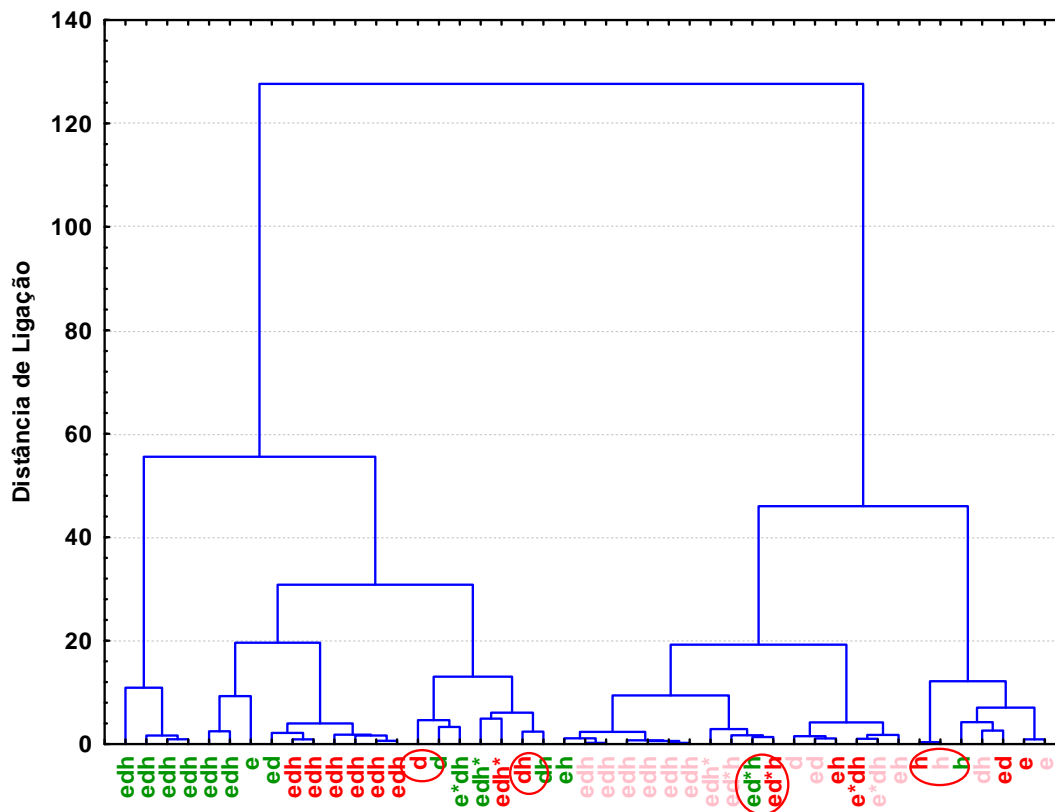


Observando a Figura 29, nota-se que os extratos em hexano puro possuem menor absorção. Os três picos distintos, em torno de 412, 445 e 473 nm são característicos de carotenóides prolicopeno e neurosporeno. Para o diclorometano(d) e mistura binária (dh) novamente há sobreposição nos picos metabólicos, inclusive clorofila alfa e beta e ácidos clorogênicos em menores proporções.

A capacidade de extração do diclorometano se sobrepõe à do hexano, fato este observado pelos espectros d e dh serem praticamente iguais. Ainda na Figura 29, observa-se que para estes agentes extratores, os maiores valores de absorvância sempre são do extrato das folhas de 120 cm, seguidas pelo extrato de 80 cm e a menor absorção observa-se no extrato 40 cm. Assim como na comparação de duas alturas, ao adicionar-se um terceiro extrato observa-se a concordância de ideias. Em 120 cm de altura há maior exposição à radiação solar que 80 cm e ainda maior se comparado à 40 cm de altura. Logo, metabólitos secundários ali presentes estarão em maior quantidade para proteger estas folhas de danos futuros<sup>33</sup>. A quantidade de clorofila, também segue o mesmo parâmetro. Associa-se proporcionalmente à taxa de luminosidade e fotossíntese, pois maiores taxas de radiação necessitam de uma maior concentração de clorofila para síntese e degradação, se comparadas às plantas sombreadas<sup>29</sup>.

O dendograma da análise hierárquica, Figura 30, vai ao encontro do que se observa no gráfico dos escores mostrado na Figura 27. No valor de 10 é possível observar os agrupamentos formados na projeção CP4 x CP5.

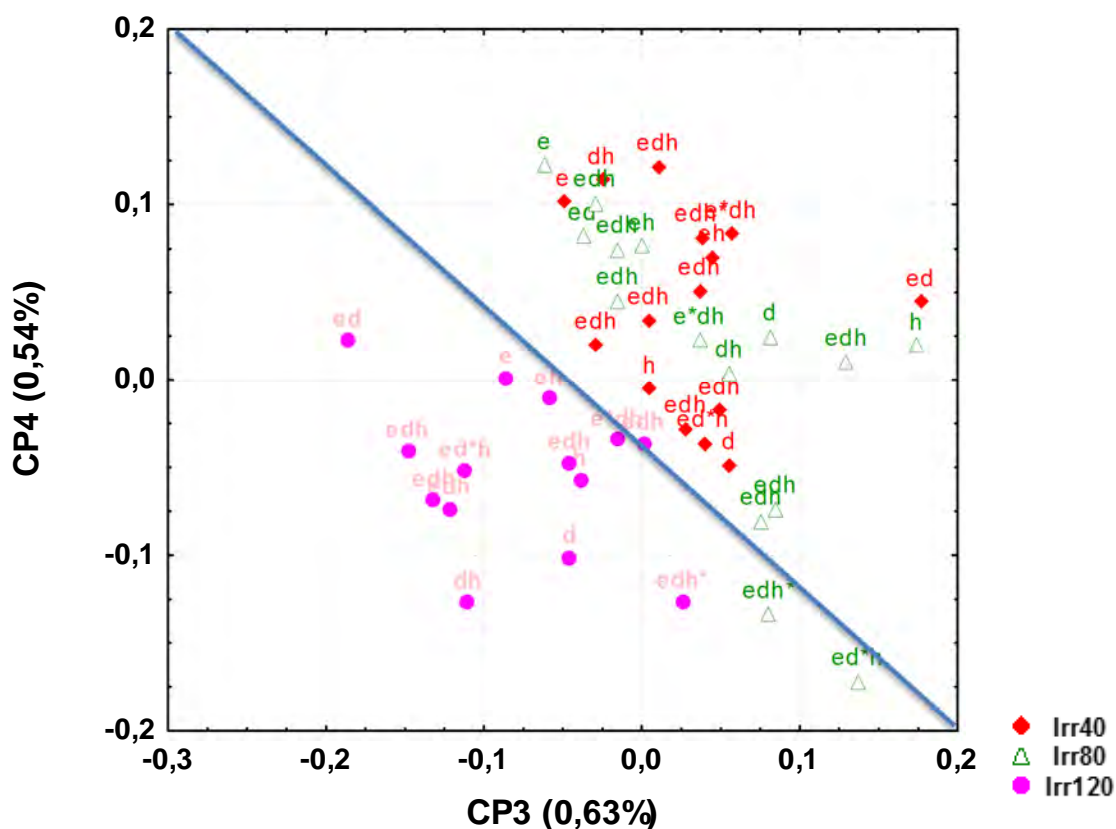
**Figura 30.** Dendrograma baseado nos dados dos espectros do UV-Vis para os extratos de folhas irrigadas em seus três estratos (40, 80 e 120 cm de altura), descritos no planejamento experimental.



Estes extratos foram submetidos à análise por espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier, no intervalo de 400 a 4000  $\text{cm}^{-1}$ . Os dados dos espectros foram dispostos em uma matriz de 45 extratos por 1725 valores de reflectância (os ruídos foram retirados, portanto a faixa utilizada foi de 675-3999  $\text{cm}^{-1}$ ). Esses dados foram submetidos a ACP a AH. A CP1 possui uma maior variabilidade dos dados porém não foi utilizada para este estudo em questão. A Figura 31, mostra a projeção da CP3  $\times$  CP4, que explicam 1,19% da variância total, para análise das folhas irrigadas e seus estratos de plantas em 40, 80 e 120 cm. Assim como observado na análise UV-Vis, os extratos da planta irrigada a 120 cm de altura estão nitidamente separados dos extratos de 40 e 80 cm da mesma planta. Esta separação é diagonal,

implicando que as duas componentes, simultaneamente, são importantes nesta discriminação. O gráfico dos escores CP3 x CP4 apresenta a separação em diagonal negativa onde localizam-se os extratos de plantas irrigadas com 120 cm de altura.

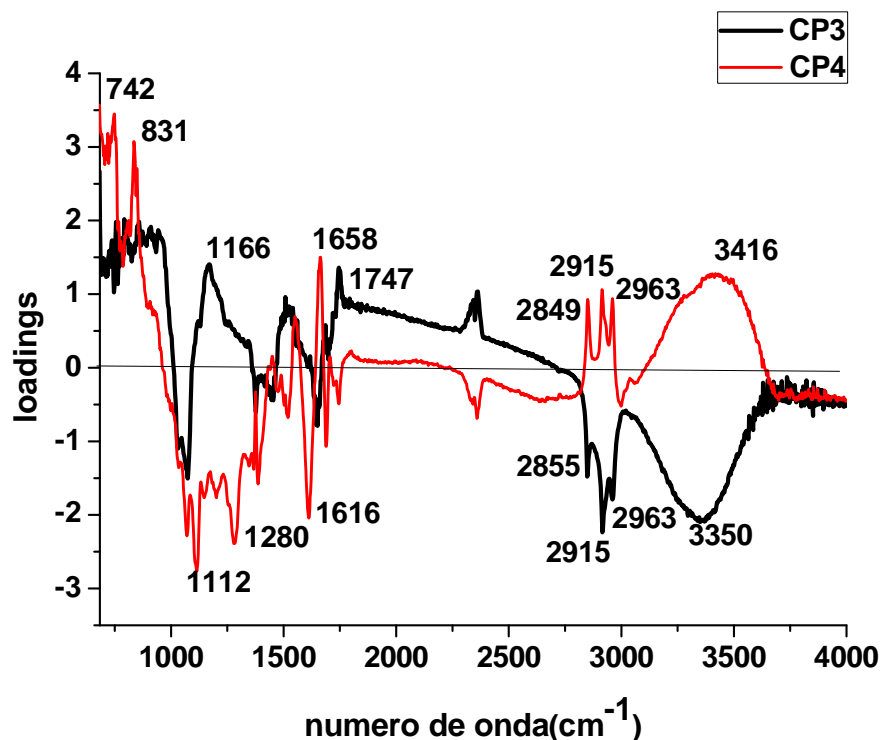
**Figura 31.** Gráfico dos escores CP3 x CP4 para os dados de FTIR das folhas irrigadas em 40 cm, 80 cm e 120 cm, de acordo com o planejamento experimental.



A Figura 32 apresenta o gráfico de loadings CP3 x CP4 para as folhas nos três estratos. Os valores positivos da CP3 estão localizados nos números de onda de 1166 e 1747  $\text{cm}^{-1}$  (1700 a 1630  $\text{cm}^{-1}$ ) compreende deformação axial de grupos carbonilas ( $\nu\text{C}=\text{O}$ ) e influenciam na separação dos extratos das plantas irrigadas de 40 e 80 cm de altura. Os extratos em 120 cm de altura, posicionados na região negativa da CP3, são influenciados pelos números de onda 2855, 2915, 2963  $\text{cm}^{-1}$

(correspondentes a bandas de  $\delta\text{C-H}$ ) e  $3350\text{ cm}^{-1}$  referente à vibração de deformação axial da ligação O-H ( $\nu\text{ O-H}$ ). A maioria dos extratos de 40 e 80 cm encontrados na CP4 positiva são discriminados pelos números de onda em  $742$  e  $831\text{ cm}^{-1}$ . Bandas significativas encontradas abaixo de  $1000\text{ cm}^{-1}$  referem-se à deformação angular fora do plano da ligação C-H de alcenos;  $1658\text{ cm}^{-1}$ , pode ser proveniente de vibrações de deformação axial da ligação C=C de alcenos ( $1670\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$ ) e novamente  $2849$ ,  $2915$ ,  $2963$  e  $3416\text{ cm}^{-1}$ . Já os extratos de 120 cm localizados na CP4 negativa estão relacionadas aos números de onda de  $1112, 1280\text{ cm}^{-1}$  correspondente a deformação axial de C-O e  $1616\text{ cm}^{-1}$ , que pode ser proveniente de vibrações de deformação axial da ligação C=C de alcenos ( $1670\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$ ).

**Figura 32.** Gráfico dos loadings CP3 x CP4 de dados espectroscópicos no FTIR das amostras de *Coffea arabica* de genótipo IAPAR59 das plantas irrigadas em 40, 80 e 120 cm.

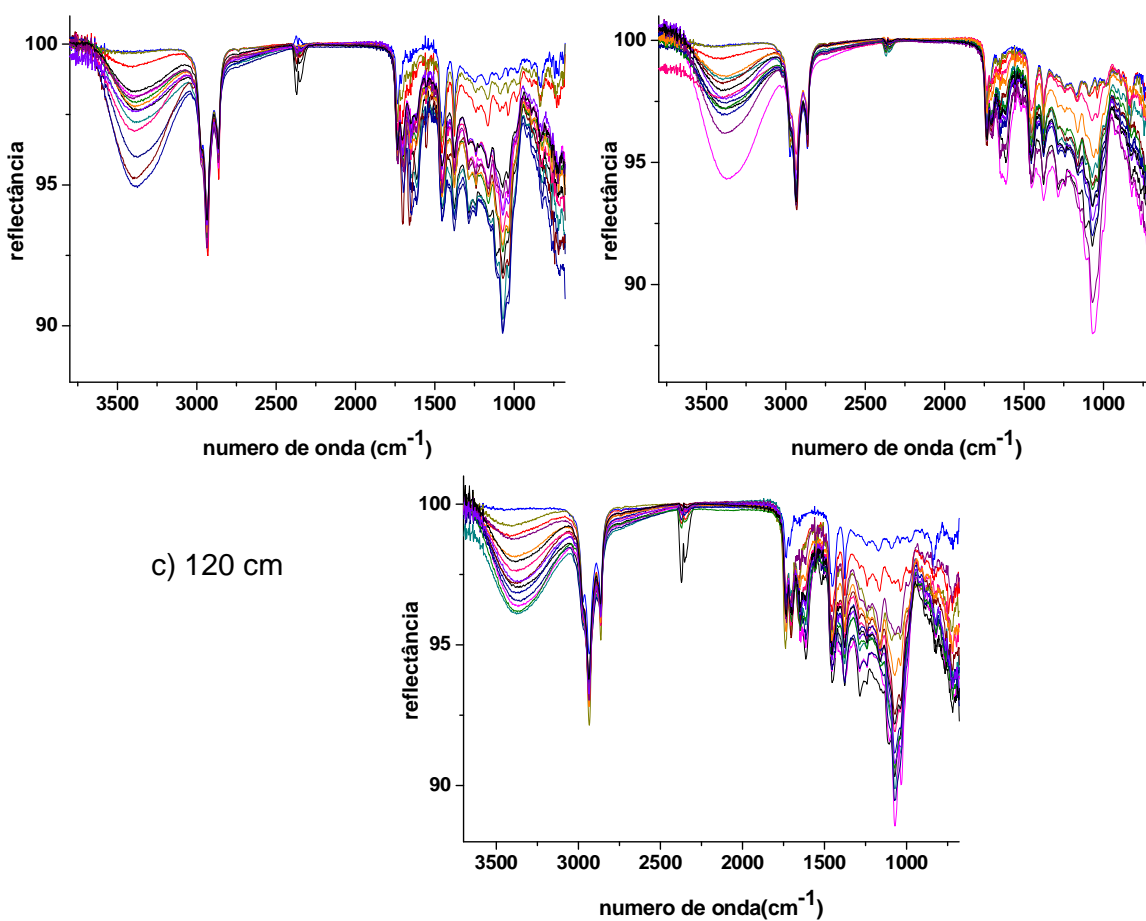


A Figura 33 mostra os espectros de FTIR das amostras irrigadas em 40, 80 e 120 cm, respectivamente.

a) 40 cm

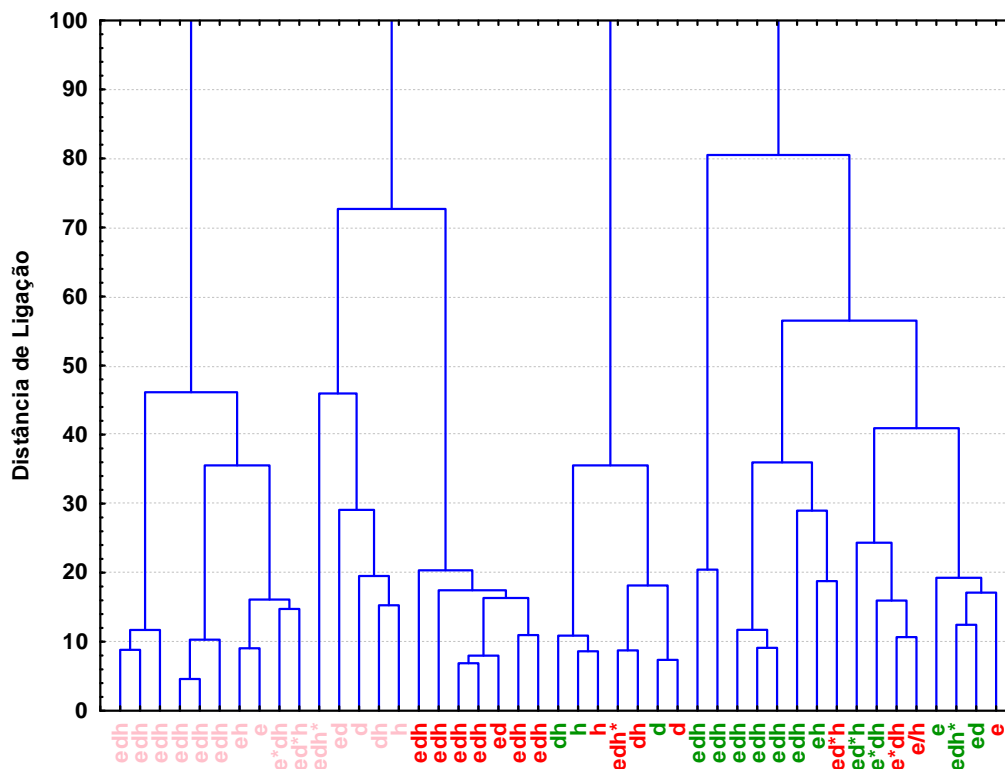
b) 80 cm

**Figura 33.** Espectros das análises de FTIR das folhas de *Coffea arabica* irrigadas em a) 40 cm, b) 80 cm e c) 120 cm, como no planejamento experimental.



O dendograma, Figura 34, complementa o gráfico de escores mostrado na Figura 31. Na distância de ligação próxima a 50 é possível observar dois agrupamentos que compõem os extratos de folhas em 120 cm, como apresentados na projeção CP3 x CP4.

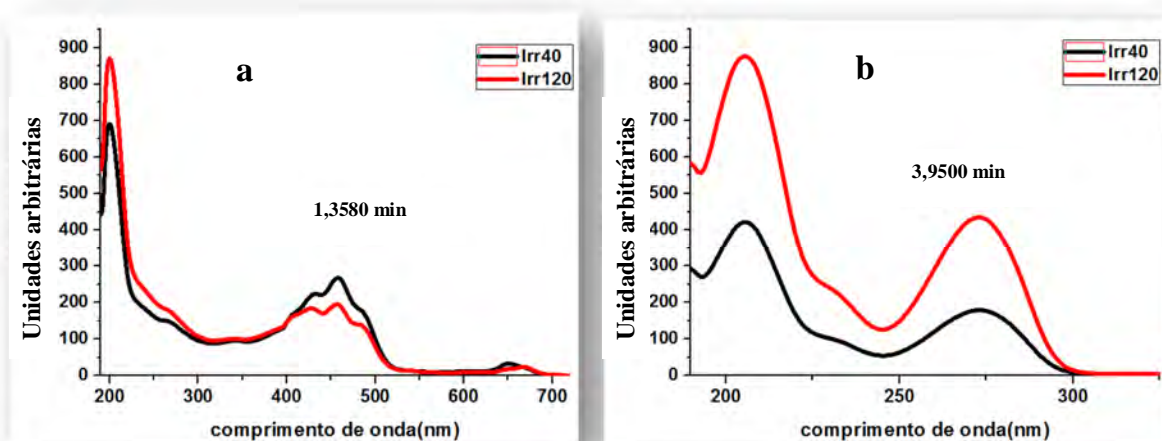
**Figura 34.** Dendrograma dos espectros do FTIR para as amostras da folha de *Coffea arabica* de genótipo IAPAR59 de plantas irrigadas em 40, 80 e 120 cm, de acordo com o planejamento experimental.



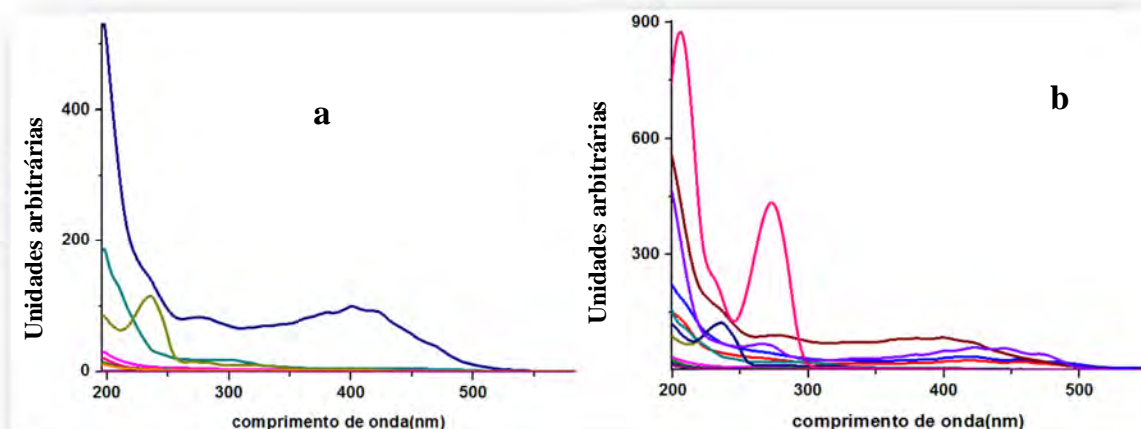
Por meio de ACP's nota-se uma separação das amostras de 120 cm de altura em relação aos outros dois estratos. Este fato não se repete se observarmos apenas os espectros de FTIR por exemplo, justamente pela observação já referida anteriormente, de que estas técnicas precisam de uma complementação pois sozinhas não conseguem fornecer informações mais detalhadas. Portanto, a Figura 35 refere-se aos espectros dos cromatogramas (DAD) das plantas irrigadas em 40 e 120 cm de altura, respectivamente, com o objetivo de analisar as diferenças nas composições dos metabólitos secundários presentes, complementando assim os resultados. Nos extratos em hexano observa-se os perfis de carotenóides, enquanto que nos extratos em diclorometano tem-se os espectros com perfil dos alcaloides (cafeína). A Figura 36 apresenta os espectros mais informativos obtidos para as

amostras irrigadas na altura de 40 e 120 cm. A atenção é voltada para a diferença de absorvância obtida.

**Figura 35.** Espectros dos cromatogramas (DAD) para *Coffea arabica* dos extratores em 276nm: a) espectros dos cromatogramas (DAD) de extratos em hexano para as duas alturas em 1,3580 min. b) espectros dos cromatogramas (DAD) de extratos em diclorometano para as duas alturas em 3,9500 min.



**Figura 36.** Espectros mais relevantes obtidos para as amostras irrigadas na altura de 40 e 120 cm. a) espectros dos cromatogramas (DAD) em 40 cm de altura com predominância de carotenóides; b) espectros dos cromatogramas (DAD) em 120 cm de altura com predominância de cafeína.



A comparação geral observada entre a totalidade de espectros dos cromatogramas (DAD) apresentados anteriormente concordam com as análises UV-Vis e infravermelho quando refere-se aos metabólitos extraídos. O que pode-se observar na Figura 35 é a diferença na altura dos picos. Por volta de 200 nm em 1,3580 min, observamos um pico mais intenso quando trata-se da altura de 120 cm, assim como o pico referente a cafeína, por volta de 276 nm em 3,9170 minutos. Observa-se uma maior intensidade em 40 cm de altura, região de 400-500 nm, com picos característicos de carotenóides, dentre eles  $\beta$ -criptoxantina, prolicopeno, neurosporeno, gama caroteno e  $\beta$ -caroteno<sup>73</sup> em aproximadamente 1,7250 minutos. Na Figura 36 há níveis de concentrações de metabólitos diferentes nas plantas de 40 cm e 120 cm. Por exemplo, a planta de 40 cm tem maior abundância relativa no pico característico de carotenoide, e baixa em cafeína. O oposto é observado para as folhas mais altas (120 cm). Estes valores, associados a uma maior abundância relativa de metabólitos ali presentes estão diretamente relacionados à taxas de luminosidade e de irrigação presentes em cada altura.

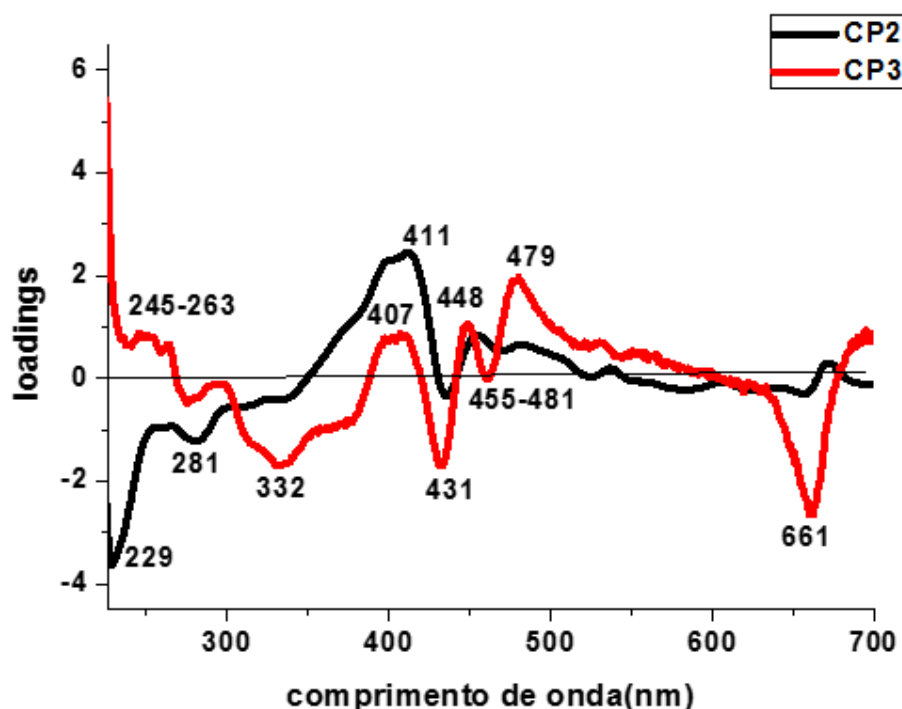
As folhas também foram analisadas em grupos de plantas com mesma altura, irrigadas (Irr) e não irrigadas (Ni), estrato 1 (40 cm). Os dados espectrais das folhas foram dispostos em uma matriz de 30 extratos por 576 valores de absorvâncias (comprimentos de onda- nm). Esta matriz foi submetida a ACP e AH.

A Figura 37 mostra a projeção CP2 x CP3, responsáveis por 8,41% da variância total, as quais fornecem informações químicas mais relevantes para análise das folhas Irr e Ni em 40 cm de altura. Nota-se pelo gráfico dos escores que há formação de 3 grupos distintos. A CP2 é determinante na separação destas plantas. Os metabólitos extraídos da planta não irrigada agrupam-se na região positiva da CP2, enquanto que os extratos da planta irrigada estão na região negativa da CP2.

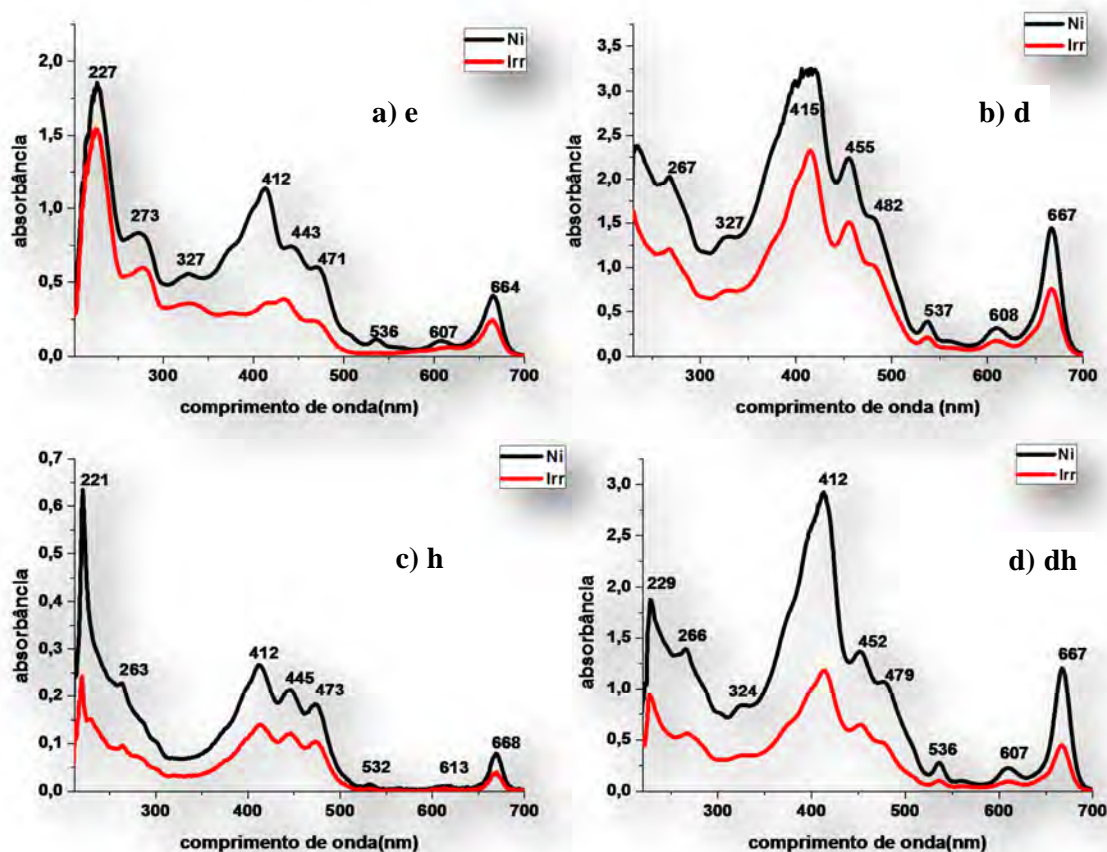


não irrigada. Podemos então, de acordo com a literatura e os comprimentos de onda observados, dizer que nestas folhas irrigadas há maiores valores de abundância relativa de  $\beta$ -criptoxantina. Os metabólitos extraídos das folhas irrigadas, posicionados na parte negativa da CP2, são mais influenciados pelos comprimentos de onda 229 e 281 nm. Os valores positivos da CP3 estão localizados nos comprimentos de onda de 245-263 nm e 407, 448, 479 nm que influenciam na separação dos extratos em hexano puro. Já os demais extratos, em sua maioria, encontram-se na região negativa da CP3 e são influenciados pelos comprimentos de onda de 332, 431 e 661 nm (clorofila alfa). A Figura 39 mostra os espectros dos extratos preparados em etanol, diclorometano, hexano puros e mistura binária diclorometano:hexano (1:1), respectivamente, a título de comparação.

**Figura 38.** Gráfico dos loadings CP2 x CP3 para os dados espectrofotométricos no UV-Vis das folhas irrigadas e não irrigadas em 40 cm de altura, de acordo com o planejamento experimental.



**Figura 39.** Espectros UV-Vis das amostras da folha de *Coffea arabica* de plantas irrigadas e não irrigadas em 40 cm de altura de acordo com o planejamento experimental. a) etanol, b) diclorometano, c) hexano e d) diclorometano:hexano (1:1).

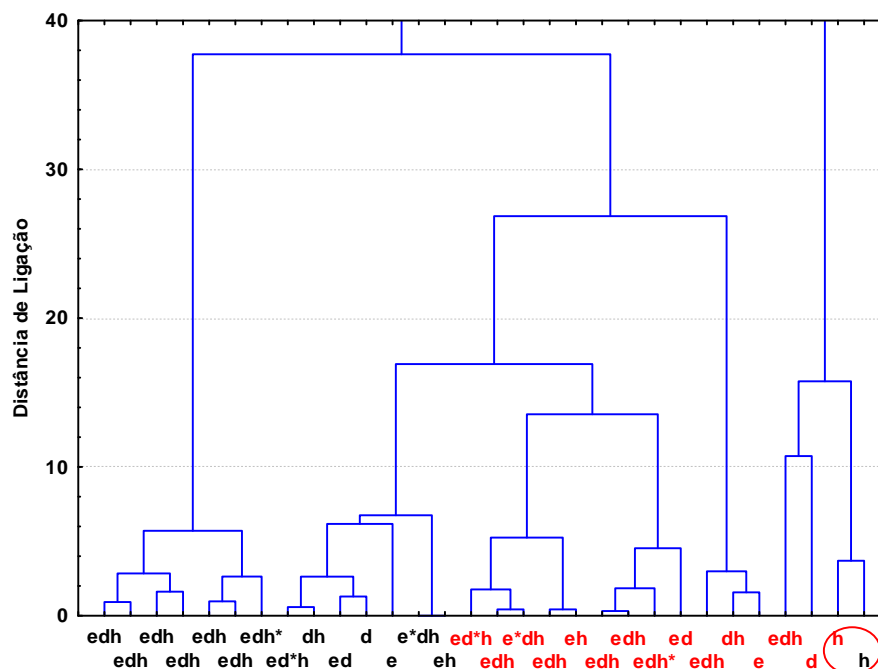


Pôde-se observar as mesmas características obtidas na análise anterior. A separação das componentes principais ocorreu de acordo com o solvente extrator. As análises em UV-Vis também mostraram-se eficazes na extração dos corantes do vegetal, como por exemplo, os três picos distintos, referentes a carotenóides que estão presentes nos espectros de hexano puro, Figura 39. Por se tratar de folhas de uma mesma planta, os comprimentos de onda seguem se repetindo e nos dando a idéia de que em folhas de *coffea arabica* há realmente uma maior absorção de prolicopeno e neurospreno. Observa-se ainda sobreposição dos picos

de carotenóides, clorofila, cafeína e ácidos clorogênicos, quando se trata de etanol, diclorometano e mistura binária diclorometano:hexano (1:1). Comparando os espectros da Figura 39, nota-se que as maiores concentrações destes metabólitos são encontradas nas plantas não irrigadas. Esta relação observada sobre o aspecto irrigação, faz-se coerente. A planta necessita de um certo déficit hídrico, não se sabe o quanto exatamente, para ocorrer uma floração uniforme e sem danos à produção. O que se imagina é que, nestes casos, a folha fornece água aos botões para manter o equilíbrio da planta. Este decréscimo de água na folha pode causar um aumento da abundância relativa de metabólitos ali presentes<sup>11</sup>.

A análise hierárquica apresenta-se na Figura 40. Na distância de 6 é possível observar dois agrupamentos formados pelos extratos de folhas irrigadas e na distância de 4 o agrupamento de extratos em hexano puro, como observados no gráfico de scores CP2 x CP3, Figura 37.

**Figura 40.** Dendrograma de dados do UV-Vis para os extratos de plantas irrigadas e não irrigadas em 40 cm de altura, como descritos experimentalmente.

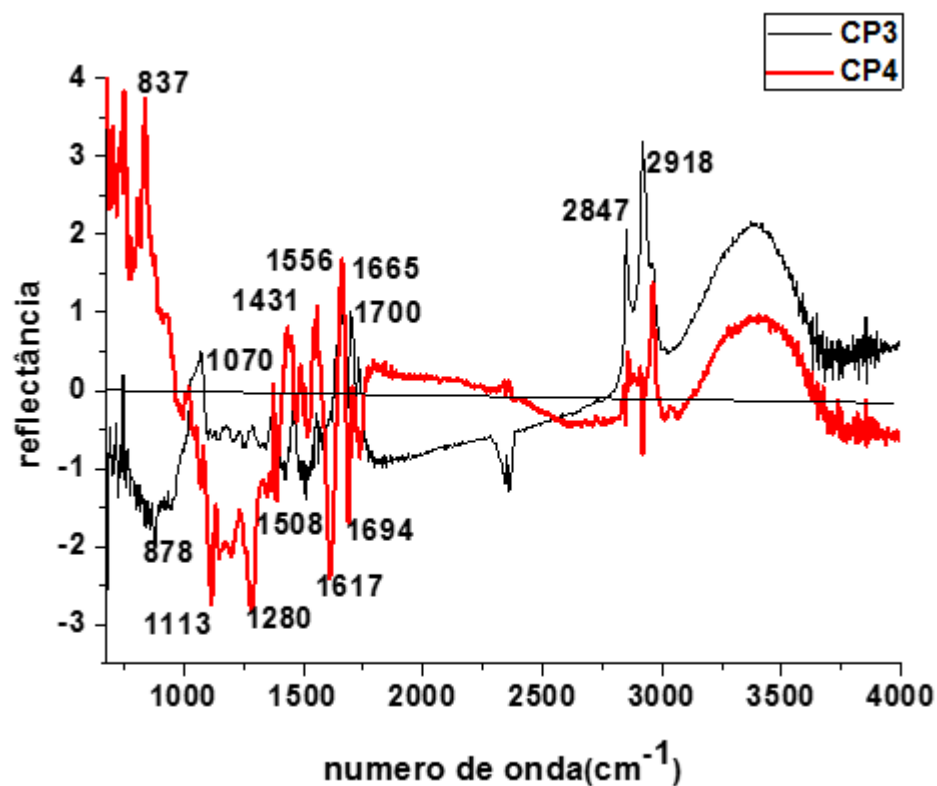


Os extratos também foram analisados por espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier no intervalo de 400 a 4000  $\text{cm}^{-1}$ . A matriz dos dados espectrais foi composta de 45 extratos por 1725 valores de reflectância. Os ruídos foram retirados, portanto a faixa de número de onda utilizada foi de 675-3999  $\text{cm}^{-1}$ . Estes dados foram submetidos a ACP e AH. A Figura 41 mostra a projeção CP3 x CP4, que não possuem maior variabilidade dos dados, apenas 1,66%, porém trazem maior informação química para análise das folhas irrigadas e não irrigadas em 40 cm de altura. Pelo gráfico dos escores nota-se que a componente principal 3 é a responsável pela separação dos extratos. Na CP3 negativa localizam-se os extratos da planta irrigada, enquanto que em sua região positiva observam-se os extratos da planta não irrigada e o agrupamento dos extratos em etanol (Irr e Ni). A CP4 positiva tem uma maior quantidade de extratos irrigados enquanto que na região negativa da CP4 observamos a maior proporção dos extratos não irrigados.

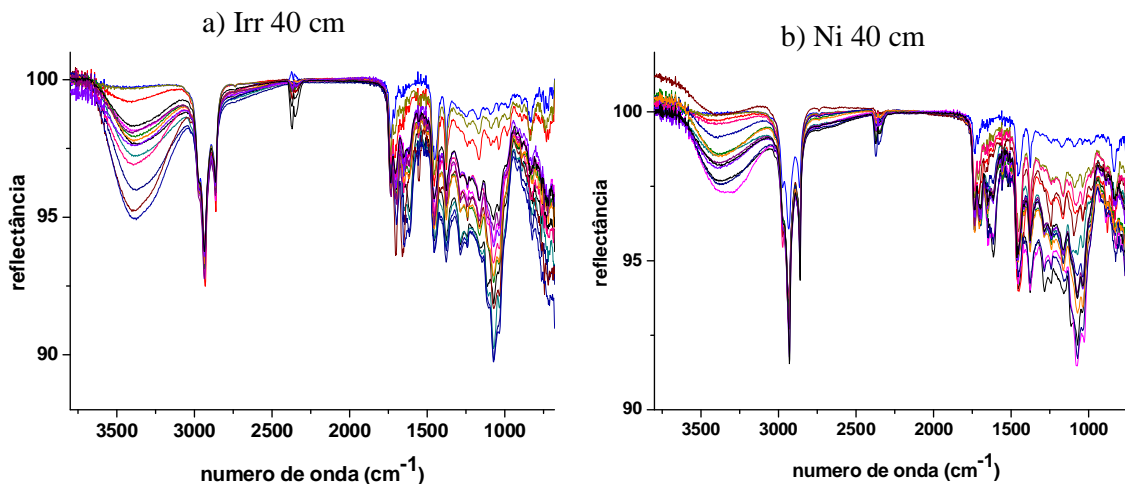
Na Figura 42 observa-se o gráfico de loadings CP3 x CP4. Os valores positivos da CP3 estão localizados nos números de onda de 1070  $\text{cm}^{-1}$  (1060-1080  $\text{cm}^{-1}$  indicam vibrações de deformação axial de  $\nu\text{C-O}$  de éster ou álcool primário), 1700  $\text{cm}^{-1}$  compreende deformação axial de carbonilas ( $\text{C=O}$ ); 2847 e 2918  $\text{cm}^{-1}$  (correspondentes a bandas de  $\delta\text{ C-H}$ ). Estes números de onda influenciam na separação dos extratos da planta não irrigada. Os extratos irrigados, posicionados na região negativa da CP3, são influenciados pelos números de onda 878 e 1508  $\text{cm}^{-1}$ . A maioria dos extratos irrigados, encontrados na CP4 positiva são discriminados pelos números de onda em 837  $\text{cm}^{-1}$ , referentes às vibrações de deformação angular fora do plano da ligação C-H de alcenos e hidrocarbonetos aromáticos (1000-650  $\text{cm}^{-1}$ ); 1431, 1556 e 1665  $\text{cm}^{-1}$ . A CP4 negativa determina números de onda de 1113  $\text{cm}^{-1}$ , banda característica de ésteres (1275-1020  $\text{cm}^{-1}$ ); 1280  $\text{cm}^{-1}$ , característica de fenóis



**Figura 42.** Gráfico dos loadings CP3 x CP4 para os dados espectroscópicos no FTIR das amostras de *Coffea arabica* de genótipo IAPAR59 de plantas irrigadas e não irrigadas em 40 cm de altura, de acordo com o planejamento experimental.

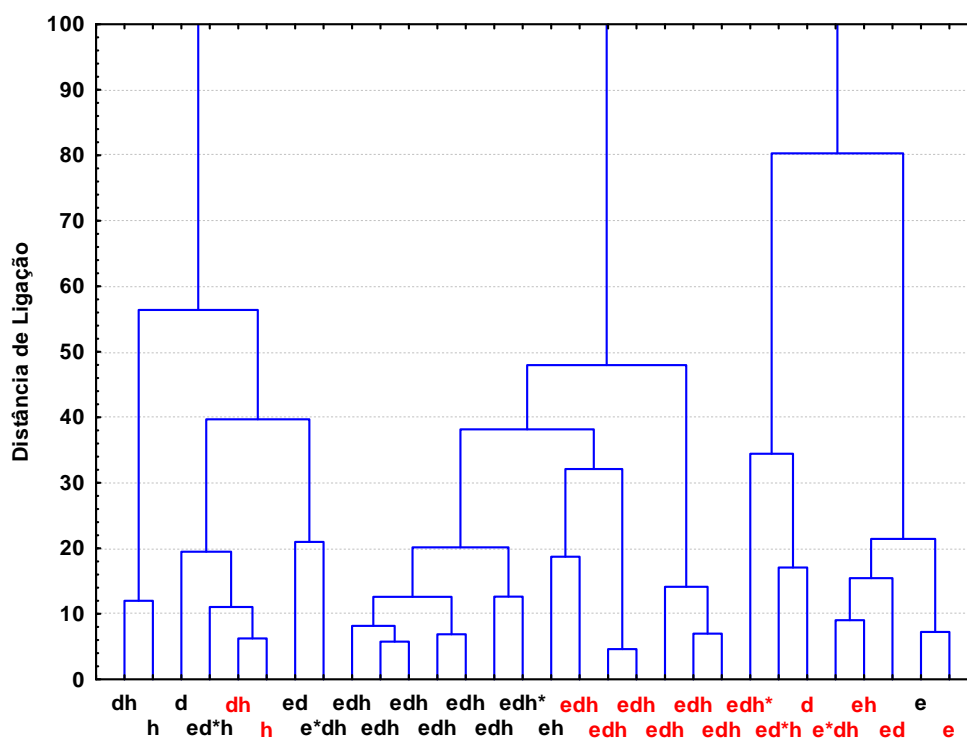


**Figura 43.** Espectros por análise de FTIR das amostras da folha de *Coffea arabica* de a) plantas irrigadas e b) não irrigadas, respectivamente, em 40 cm de altura de acordo com o planejamento experimental.



A Figura 44 apresenta o dendograma da análise hierárquica. No valor de 8 é possível observar o agrupamento em etanol puro, observados na projeção CP3 x CP4.

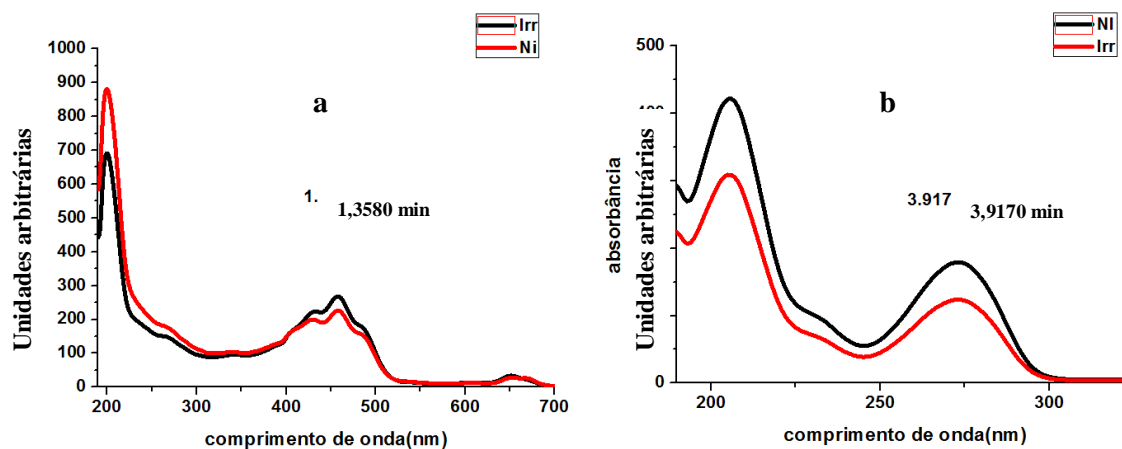
**Figura 44.** Dendograma dos dados de espectros FTIR para os extratos de plantas irrigadas e não irrigadas em 40 cm de altura, como no planejamento experimental.



As CP's mostraram, mais uma vez, a separação dos dados das amostras das plantas irrigadas e não irrigadas. Por meio dos espectros dos cromatogramas (DAD) do extrato de 40 cm foi possível a complementação e análise de diferenças nas composições, assim como os metabólitos secundários presentes em diferentes taxas de irrigação. O que pôde-se observar em relação às folhas é a baixa absorvância de ácidos clorogênicos presentes. Como os espectros de UV-Vis e infravermelho são menos informativos, observa-se a sobreposição geral dos

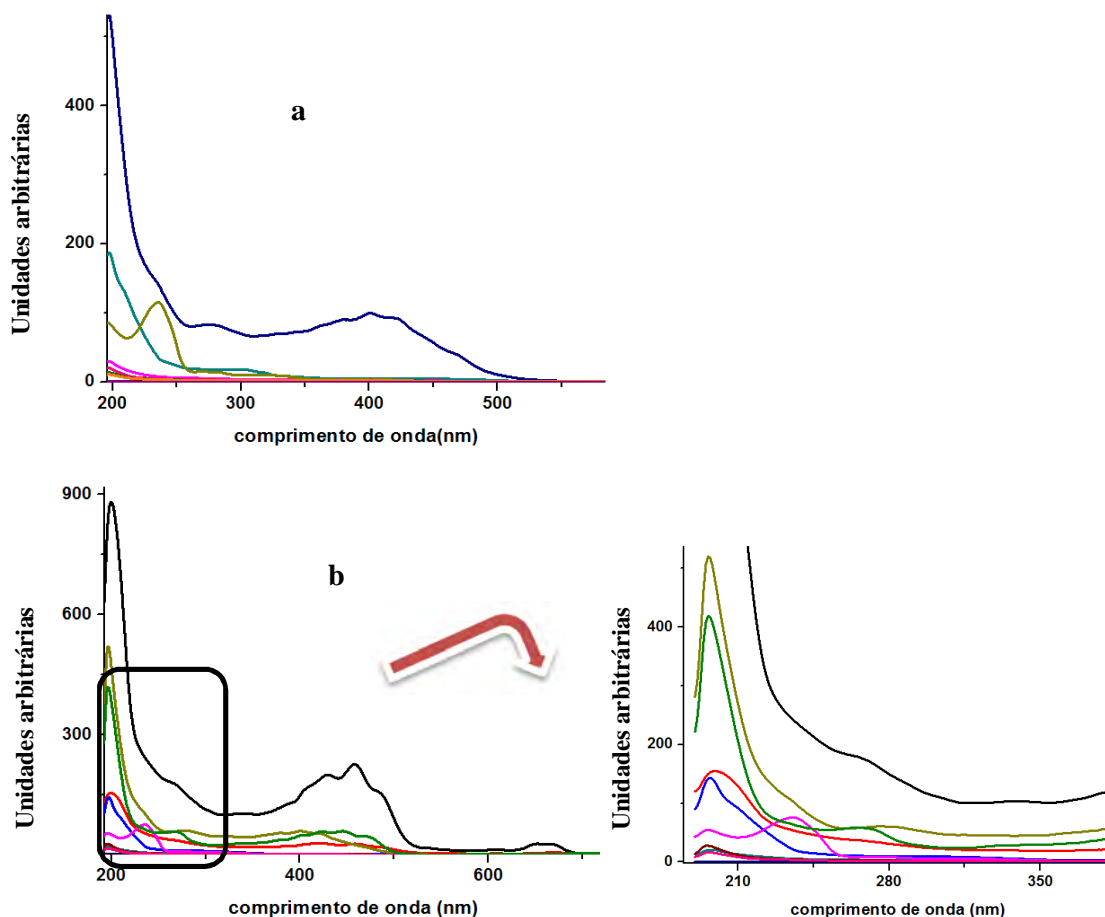
metabólitos polares, em que subentende-se ácidos clorogênicos, já que estudos demonstram sua presença predominantemente em grãos. Porém, quando se faz a cromatografia, o pico característico deste metabólito não é apresentado. Os perfis apresentados nas amostras dos extratos em hexano são de carotenóides, em torno de 400-500 nm, 1,3670 min e perfil dos alcaloides (cafeína) em torno de 272 nm, 3,9170 min, para extratos em diclorometano, Figura 45. Estes espectros de cromatogramas concordaram com as análises espectroscópicas pois mostram uma leve, porém maior valor de unidade arbitrária da planta não irrigada quando comparada ao extrato da planta irrigada. Este fato pode ser associado a uma maior abundância relativa de metabólitos secundários. Caso a raiz absorva muita água (planta irrigada), a síntese de nutrientes e metabólitos das folhas próximas a ela será prejudicada<sup>15</sup>.

**Figura 45.** Espectros dos cromatogramas (DAD) para *Coffea arabica* dos extratores em 276 nm: a) espectros dos cromatogramas (DAD) de extratos em hexano para as duas alturas em 1,3670 min. b) espectros dos cromatogramas (DAD) de extratos em diclorometano para as duas alturas em 3,9170 min.



A Figura 46 apresenta os espectros mais importantes obtidos para as amostras irrigadas e não irrigadas, respectivamente. A atenção é voltada à diferença de absorbância obtida.

**Figura 46.** Espectros mais relevantes obtidos para as amostras irrigadas e não irrigadas na altura de 40 cm, respectivamente. a) espectros dos cromatogramas (DAD) para as amostras irrigadas em 40 cm de altura; b) espectros dos cromatogramas (DAD) para as amostras não irrigadas em 40 cm de altura.

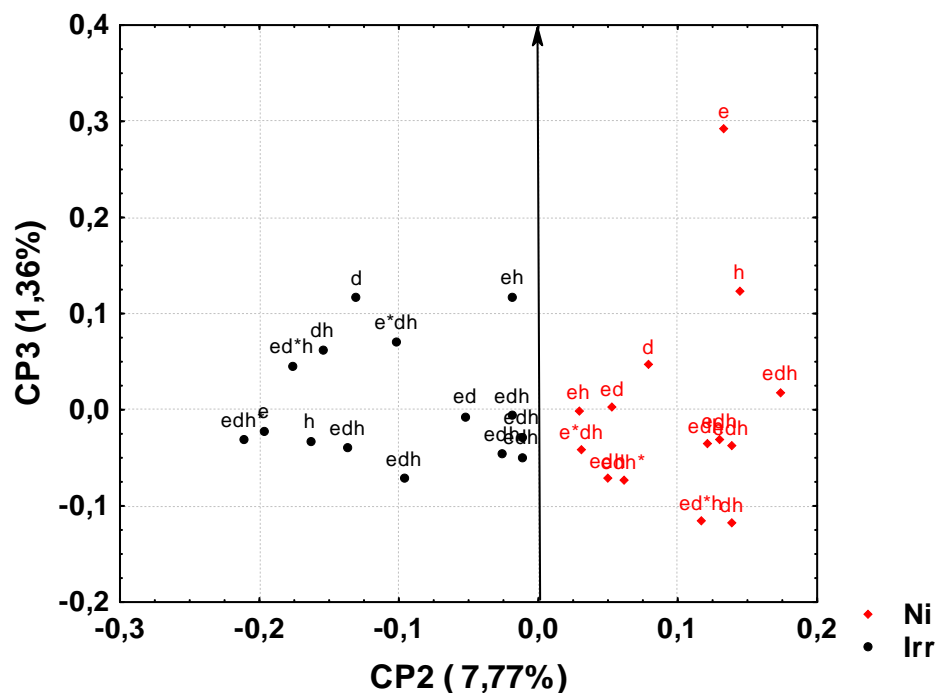


Os metabólitos extraídos na totalidade de espectros dos cromatogramas (DAD), apresentados anteriormente complementam as análises UV-Vis e infravermelho. A diferença na altura dos picos, observada na Figura 46 é notória

quando se trata dos carotenóides; nas plantas irrigadas há maiores valores de unidade arbitrária em aproximadamente 100, enquanto que para as plantas não irrigadas, estes são maiores em torno de 300. Praticamente não se observa diferença entre as duas plantas quando se trata do pico da cafeína.

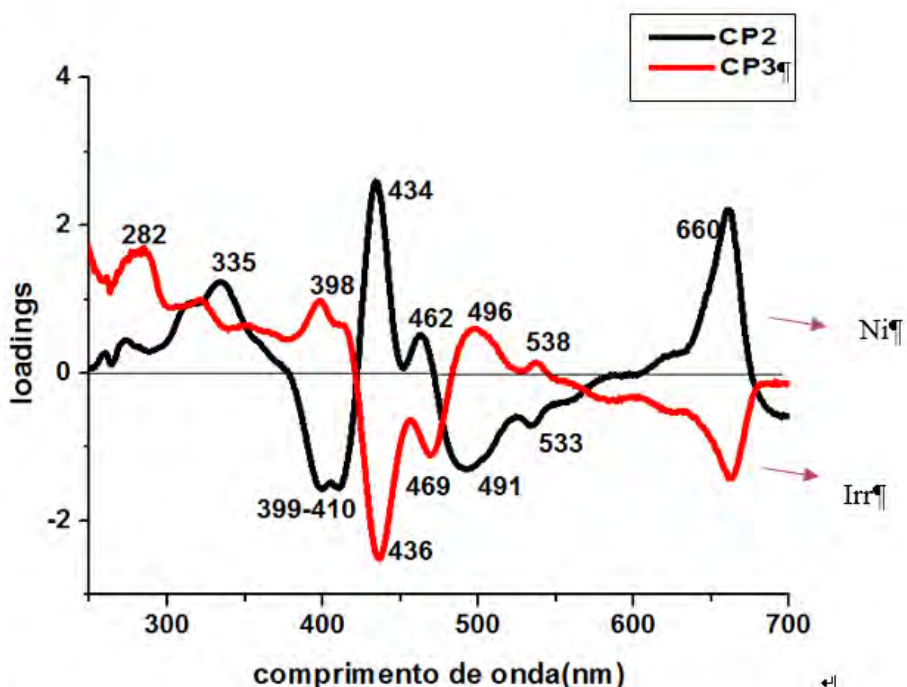
As folhas também foram analisadas em grupos de plantas de 80 cm de altura (Irr e Ni). A matriz matemática, composta por 30 extratos e 576 valores de absorvâncias (comprimentos de onda- nm) foi submetida à ACP e AH. Para não prejudicar a análise, a planta matriz não participou desta comparação, pela grande diferença de idade. Na Figura 47, pode-se observar a projeção da CP2 x CP3, que explicam 9,13% da variância total, para análise das folhas Irr e Ni no segundo estrato (80 cm).

**Figura 47.** Gráfico dos escores CP2 x CP3 para os dados espectrofotométricos no UV-Vis das amostras de *Coffea arabica* de genótipo IAPAR59, das plantas irrigadas e não irrigada na altura 80 cm, de acordo com o planejamento experimental.



Nota-se pelo gráfico dos escores, Figura 47, que a CP2 é determinante na separação dos 2 agrupamentos distintos. Os metabólitos extraídos da planta não irrigada agrupam-se na região positiva da CP2, enquanto que os extratos da planta irrigada estão na CP2 negativa. Na região positiva da CP3, isolado dos demais, observa-se o extrato em etanol puro da planta não irrigada. A distância observada entre este extrato e os demais, pode indicar uma grande diferenciação em determinado(s) metabólito(s). Na região intermediária, há maior quantidade dos extratos das plantas irrigadas e não irrigadas. Na Figura 48 observa-se o gráfico de loadings CP2 x CP3 desta análise.

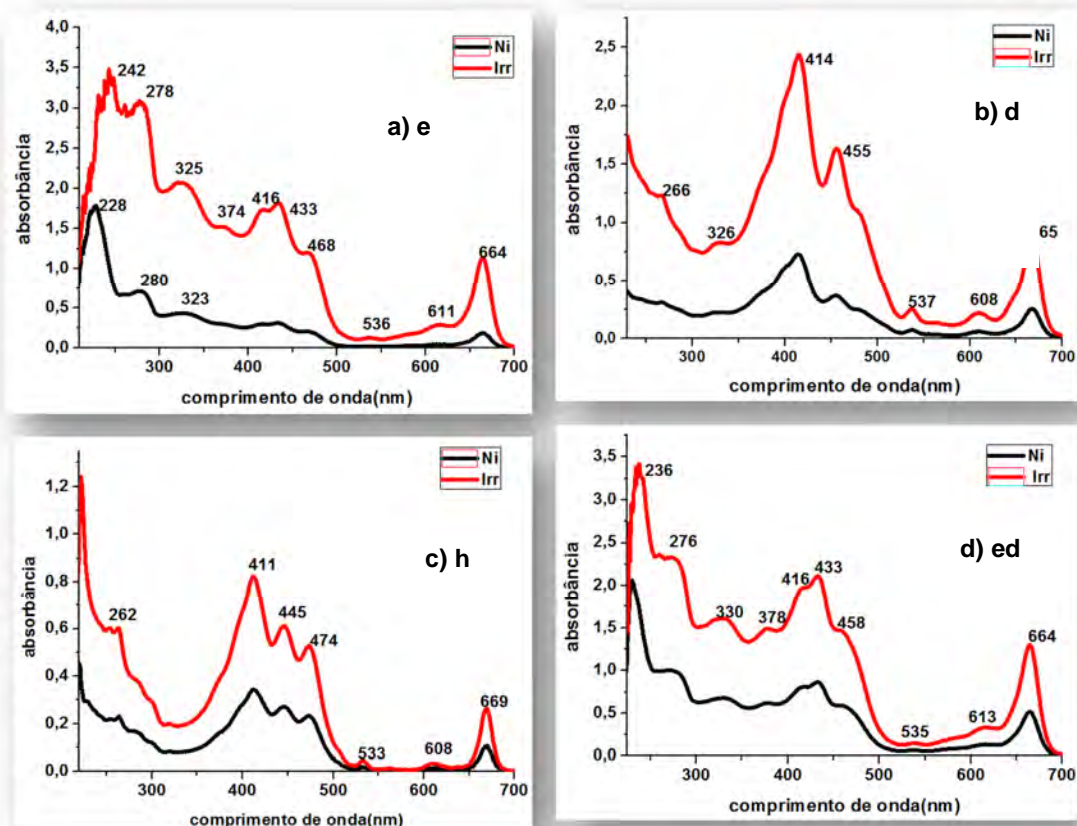
**Figura 48.** Gráfico dos loadings CP2 x CP3 para os dados espectrofotométricos no UV-Vis das amostras de *Coffea arabica* de genótipo IAPAR59, de acordo com o planejamento experimental.



Os valores positivos da CP2 estão localizados no comprimento de onda de 335, 434 e 462 nm e influenciam na separação da planta não irrigada. Os metabólitos extraídos das folhas irrigadas, posicionados na parte negativa da CP2, são mais influenciados pelo comprimento de onda 399-410, 491 e 533 nm. Valores positivos da CP3, localizados no comprimento de onda de 282, 398 e 496 e 538 nm, influenciam o metabólito extraído em etanol puro da planta não irrigada. Já os extratos da região negativa da CP3 são influenciados pelos comprimentos de onda de 436 e 469 nm. A região em comum nas duas componentes principais com comprimentos de onda entre 434/436 nm e 462/469 nm indicam a presença de gama-caroteno.

Mediante os espectros, Figura 49, é possível observar as respectivas bandas de absorção dos metabólitos e as diferenças entre extratos de 80cm das plantas irrigadas e não irrigadas em etanol, diclorometano e hexano puros e mistura binária etanol:diclorometano (1:1), respectivamente.

**Figura 49.** Espectros por análise de UV-Vis das amostras da folha de *Coffea arabica*. a) etanol, b) diclorometano, c) hexano e d) mistura binária etanol:diclorometano.

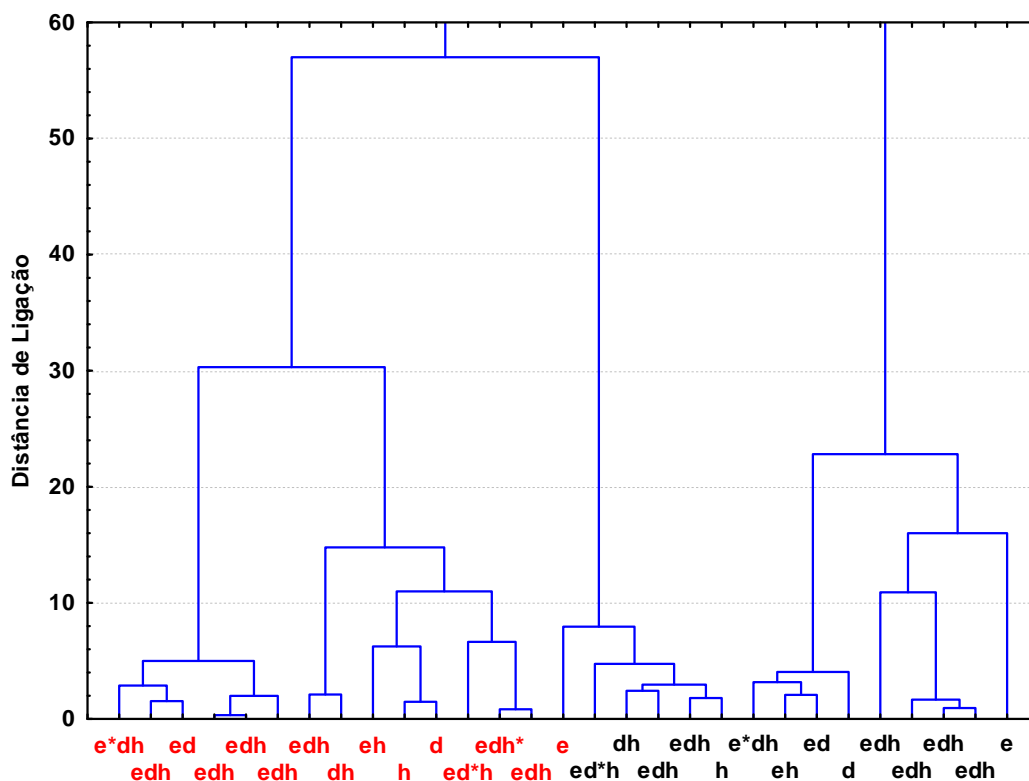


O padrão de similaridade dos espectros, de diferentes amostras, vem se repetindo, pois trata-se de mesmo genótipo de planta. Por exemplo, a Figura 49 mostra novamente que mesmo com uma pequena absorção dos extratos em hexano puro, há a presença dos três picos característicos de carotenóides (400-500 nm). Nesta região, de acordo com os comprimentos de onda observados, podem estar presentes os seguintes pigmentos (carotenoides):  $\beta$ -criptoxantina, prolicopeno, neurosporeno, gama caroteno, e  $\beta$ -caroteno. Quando em mistura, o solvente hexano não exerce grande capacidade extrativa por possuir parâmetros solvatocrômicos próximos a zero; as demais proporções com caráter mais polar que determinarão os

metabólitos a serem extraídos. Tratando-se de diclorometano e misturas em etanol, na região de 230/240 nm, os picos dos metabólitos continuam sobrepostos. De acordo com os espectros, Figura 49, observa-se que em se tratando das plantas em segundo estrato, as maiores concentrações de metabólitos são encontradas nas plantas irrigadas. O que pode-se entender, a partir deste fato, é que a 80 cm de altura do chão a planta apresenta comportamento contrário, quando comparado à altura de 40 cm. Alguns fatores podem ser responsáveis: a raiz da planta irrigada pode estar encharcada, isso prejudicaria o desenvolvimento estrutural e por consequência o desenvolvimento metabólico, por isso, estando o 2º estrato (80 cm) em uma região de concentração hídrica e influência da luz solar “ótimas“, o desenvolvimento geral de seu metabolismo não será comprometido, mantendo constante a produção de metabólitos para proteção do vegetal quando necessário<sup>33</sup>.

A análise hierárquica, Figura 50, distinguiu o grupo de extratos Ni na distância de ligação de 30, assim como o gráfico de escores mostrado na Figura 47.

**Figura 50.** Dendrograma de espectros do ultravioleta para extratos de folhas irrigadas e não irrigadas em 80 cm de altura, como descritos no planejamento.

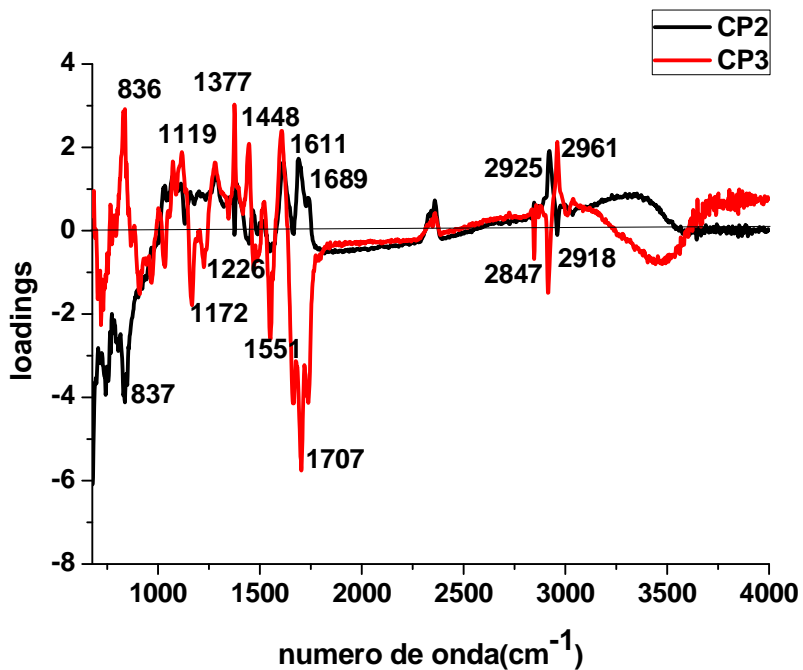


Estes extratos também foram analisados por espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier no intervalo de 400 a 4000  $\text{cm}^{-1}$ , porém a faixa utilizada foi de 675-3999  $\text{cm}^{-1}$ . Os dados dos espectros foram dispostos em uma matriz de 45 extratos por 1725 valores de reflectância e em seguida submetidos a ACP a AH. O objetivo foi observar as diferenças entre os extratos de 80 cm das plantas irrigadas e não irrigadas. A primeira componente principal explica 90,97% da variância total porém a projeção da CP2 x CP3 que explica apenas 7,94%, Figura 51, fornece maior informação para a análise das folhas irrigadas e não irrigadas na altura de 80 cm. Pelo gráfico dos escores nota-se que a componente principal 2 é a responsável pela principal separação dos extratos. Na CP2 positiva distribuem-se a maioria dos extratos da planta irrigada e é possível notar a separação de grupos por solvente



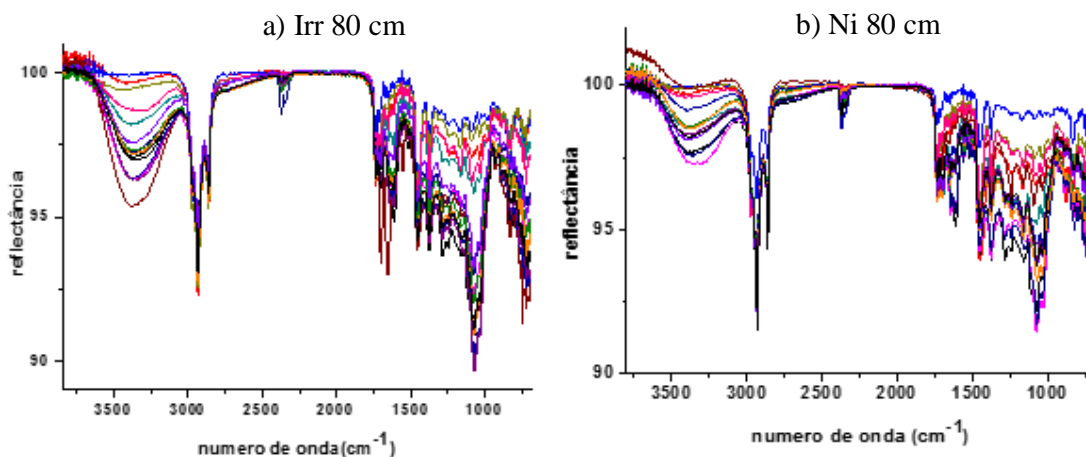
O gráfico dos loadings CP2 x CP3, Figura 52, mostra os comprimentos de onda que mais influenciam na separação dos extratos. Valores positivos da CP2 estão localizados nos números de onda de 1689 e 2925  $\text{cm}^{-1}$  (provenientes das vibrações de deformação axial simétrica e assimétrica de C-H de alcanos (3000-2840  $\text{cm}^{-1}$ )) com picos de baixa intensidade, influenciando na separação dos extratos Irr e dos grupos 1, 2 e 3. Os números de onda de 837  $\text{cm}^{-1}$  que podem ser de vibrações de deformação angular fora do plano da ligação C-H de hidrocarbonetos aromáticos (900-675  $\text{cm}^{-1}$ ) ou alcenos (1000-650  $\text{cm}^{-1}$ ), referem-se aos metabólitos extraídos da planta não irrigada e aos grupos 4 e 5, encontrando-se na região negativa da CP2. Na CP3 positiva localizam-se os agrupamentos por extrato 1, 4 e 5 que podem-se associar aos números de onda de 836  $\text{cm}^{-1}$ , 1119  $\text{cm}^{-1}$  (deformação axial) de C-O, álcoois e fenóis (1260-1000  $\text{cm}^{-1}$ ), ésteres e lactonas (1300-1000  $\text{cm}^{-1}$ ); 1377  $\text{cm}^{-1}$  - deformação angular simétrica da ligação  $\text{CH}_2$  (1467  $\text{cm}^{-1}$ ) ou  $\text{CH}_3$  (1380  $\text{cm}^{-1}$ ) ou deformação angular assimétrica da ligação  $\text{CH}_3$  (1450  $\text{cm}^{-1}$ ); 1611  $\text{cm}^{-1}$ , proveniente de vibrações de deformação axial da ligação C=C de alquenos (1670-1600  $\text{cm}^{-1}$ ) ou de hidrocarbonetos aromáticos mononucleares (1600-1585  $\text{cm}^{-1}$ ) ou banda correspondente à deformação angular simétrica no plano de N-H ( $\delta$  NH) de aminas primárias e secundárias (1650-1580  $\text{cm}^{-1}$ ) e 2961  $\text{cm}^{-1}$  - vibrações de deformação axial simétrica e assimétrica de C-H de alcanos (3000-2840  $\text{cm}^{-1}$ ). Os metabólitos extraídos em diclorometano puro, hexano puro e misturas ternárias encontram-se na CP3 negativa, determinadas pelos números de onda 1172, 1226, 1551, 1707  $\text{cm}^{-1}$  e 2847, 2918  $\text{cm}^{-1}$ .

**Figura 52.** Gráfico dos loadings CP2 x CP3 de dados espectroscópicos no FTIR das amostras de *Coffea arabica* de genótipo IAPAR59, de acordo com o planejamento.



Na Figura 53 encontram-se os espectros com as respectivas bandas de absorção dos metabólitos das plantas irrigadas e não irrigadas, respectivamente.

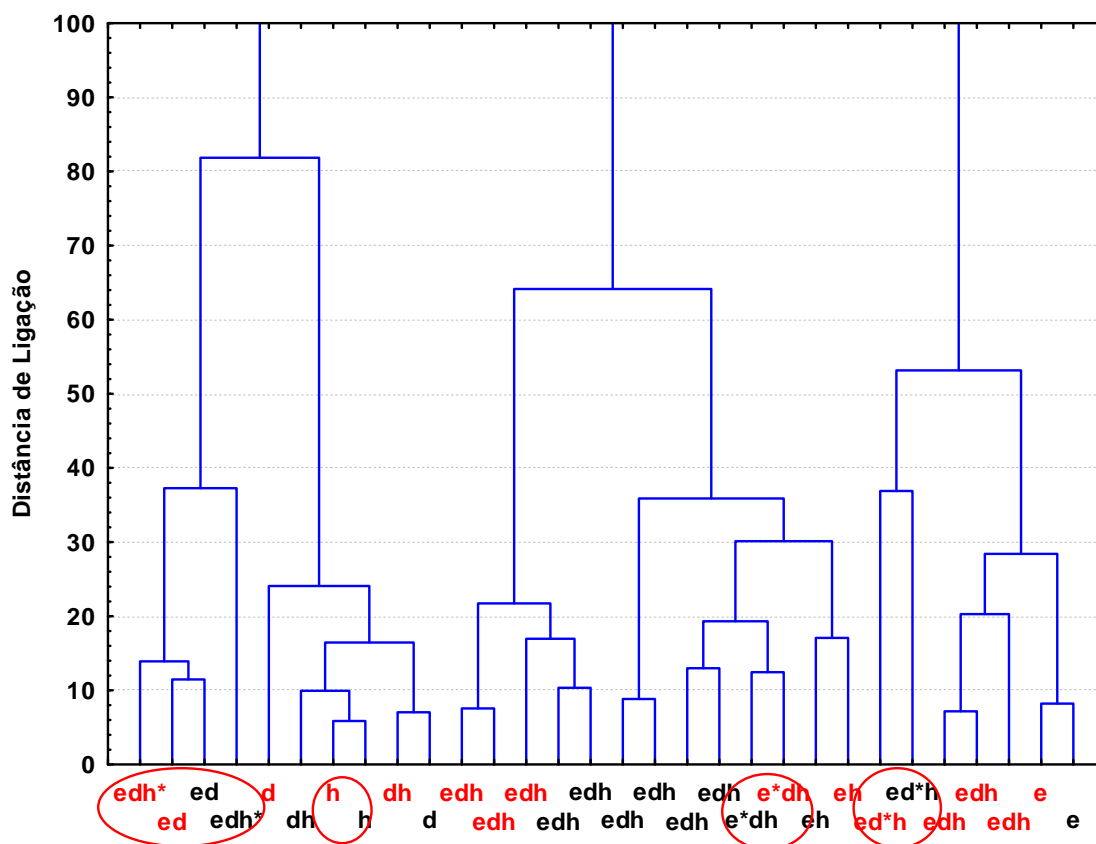
**Figura 53.** Espectros por análise de FTIR das amostras de folhas irrigadas (a) e não irrigadas (b) em 80 cm de altura, da folha de *Coffea arabica*.



Os espectros de infravermelho concordam com as análises UV-Vis, pois mostram uma menor reflectância/menor absorvância da planta irrigada quando comparada a planta não irrigada, ambos em 80 cm. Associa-se este fato à uma maior abundância relativa de um determinado metabólito secundário.

Pela análise hierárquica, Figura 54, observa-se, na distância de ligação máxima de 40 os 5 agrupamentos verificados no gráfico de escores CP2 x CP3, Figura 51.

**Figura 54.** Dendrograma baseado nos dados dos espectros de FTIR para os extratos de folhas irrigadas e não irrigadas em 80 cm de altura, como descritos no planejamento experimental.



A photograph of a coffee branch with green and ripening red and yellow cherries. The branch is covered with large, vibrant green leaves. The cherries are in various stages of ripening, with some being bright green, others yellow, and some showing a red blush. The background is a soft-focus green, suggesting a coffee plantation.

## **CAPÍTULO V**

**CONCLUSÃO**

## 5 CONCLUSÃO

✓ A abundância relativa dos metabólitos nos extratos das cultivares de *Coffea arabica* IAPAR 59 são extremamente dependentes da altura da planta e da taxa de irrigação, porém, deve-se atribuir uma grande importância também ao solvente extrator.

✓ Os principais metabólitos formadores desta impressão digital são os carotenóides:  $\beta$ -criptoxantina, gama-caroteno,  $\beta$ -caroteno, em especial prolicopeno e neurosporeno, extraídos em hexano por interações apolares e clorofila alfa e beta, extraída por solventes polares, (etanol e diclorometano).

✓ Quando compara-se excesso de radiação, o aumento da absorvância dos metabólitos depende da altura,  $40 < 80 < 120$  cm. A analogia é feita considerando-se plantações autossombreadas e em excesso de radiação, já que à 120 cm a planta mais exposta à radiação solar precisa de defesa contra os raios, produzindo assim uma maior quantidade de metabólitos.

✓ A abundância relativa de clorofila também aumenta com maior exposição solar, isso porque a taxa fotossintética é crescente na mesma proporção.

✓ Quando comparadas taxas de irrigação em 1º estrato, as maiores absorvâncias de metabólitos encontram-se nas plantas não irrigadas. A taxa de irrigação, neste caso, foi o fator predominante para obtenção destes resultados, visto que, um pequeno déficit hídrico é importante para o crescimento e desenvolvimento metabólico do cafeeiro.

✓ Quando comparadas taxas de irrigação em 2º estrato, as maiores absorvâncias são obtidas para as plantas irrigadas. A absorção da radiação solar, neste caso, foi predominante para a produção de metabólitos, a fim de proteção vegetal.

A photograph of a coffee branch with green and ripening red and yellow cherries. The branch is covered with large, vibrant green leaves. The cherries are in various stages of ripening, with some being bright green, some yellow, and some red. The background is a soft-focus green, suggesting a dense coffee plantation.

## CAPÍTULO VI

## REFERÊNCIAS

1. GRANER, E. A.; JÚNIOR, C. G. **Manual do Cafeicultor**. São Paulo: Editora da Universidade Estadual de São Paulo, 1967.
2. AMARAL, J. A. T.; RENA, A. B.; AMARAL, J. F. T. Crescimento vegetativo sazonal do cafeeiro e sua relação com fotoperíodo, frutificação, resistência estomática e fotossíntese. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.41, n.3, p. 377-384, março 2006.
3. GOUVEIA, N.M. Estudo da diferenciação e crescimento de gemas florais de *Coffea arabica* L.: observações sobre a antese e maturação dos frutos. 1984. 237f..Dissertação (Mestrado em Biologia) – Instituto de Biologia, UNICAMP, Campinas, SP.
4. CAMARGO, AP. de. Florescimento e frutificação de café arábica nas diferentes regiões (Cafezeiras) do Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.20, n.7, p.831-839, Jul. 1985.
5. CAMARGO, A. P. de; CAMARGO, M. B. P. de; PALLONE FILHO, W. J. Modelo climático-fenológico para determinação das necessidades de irrigação de café arábica na região norte de São Paulo e no Triângulo Mineiro. Campinas, SP: Instituto Agrônomo, 26 p. 2001. ( Boletim técnico IAC, 190).
6. BARROS, R.S.; MAESTRI, M.; COONS, M.P. The physiology of flowering in coffee: a review. **Journal of Coffee Research**, Balehonnur, v.8, n.2-3, p.29-73, 1978.
7. OLIVEIRA, P. M. Florescimento do cafeeiro (*Coffea arabica* L.) sob diferentes frequências de irrigação.2002. 67p. Tese (Doutorado em agronomia)- Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
8. CUSTÓDIO, A. P.; REZENDE, F. C.; FARIA, M. A., MORAIS, A. R.; GUIMARÃES, R. J.; SCALCO, M. S. Florescimento da lavoura cafeeira sob diferentes manejos de irrigação. **Coffee Science**, Lavras, v.7, n.1, p.20-30, 2012.
9. MOLIN. R. N. D.; ANDREOTTI M.; REIS. A. R.; FURLANI JUNIOR. E.; BRAGA. G. C.; SCHOLZ. M. B. S. Caracterização física e sensorial do café produzido nas condições topoclimáticas de Jesuitas, Paraná. **Acta Scientiarum Agronomy**. Maringá, v.30, n.3, p.353-358, July/Sept. 2008.
10. CARVALHO, C. H. M.; et al. COLOMBO. A.; SCALCO. M. S.; MORAIS. A. R. Evolução do crescimento do cafeeiro (*Coffea arabica* L.) irrigado e não irrigado em duas densidades de plantio. **Ciência e Agrotecnologia**. Lavras, v.30, n.2, p.243-250, Mar./Apr. 2006.
11. SOARES, A. R.; RENA. A. B.; MANTOVANI. E. C.; SOARES. A. A.; BATISTA. R.O. Efeito do déficit hídrico sobre a quebra da dormência na floração de uma cultivar de café arábica irrigado por gotejamento. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, Vitória, 2001. Resumos Expandidos... Brasília: EMBRAPA Café, 2001. p.617-624.

12. COELHO, G.; SILVA, A.M. O efeito da época de irrigação e de parcelamentos de adubação sobre a produtividade do cafeeiro em três safras consecutivas. **Ciência e Agrotecnologia**. Lavras, v. 29, n.2, p.400-408, Mar./Apr. 2005.
13. HSIAO, T.C.; ACEVEDO, E.; FERERES, E.; HENDERSON, D. W. Water stress, growth and osmotic adjustment. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London B**. Great Britain, v. 273, p. 479-500, Febr. 1976.
14. JONES, M. M.; TURNER, N.C. Osmotic adjustment in leaves of sorghum in response to water deficit. **Plant physiology**. Maryland, v. 61, n.1, p. 122-126, 1978.
15. GUTIÉRREZ, M. V.; MEINZER, F. C. Estimating Water Use and Irrigation requirements of Coffee in Hawaii **Journal of the American Society of Horticultural Science**. Hawaii, v. 119, n.3, p.652-657. 1994.
16. NEVES, Y.P.; MARTINEZ, H.E.P.; SOUZA, C.M.; CECON, P.R. Crescimento e produção de *Coffea Arabica*, fertilidade do solo e retenção de umidade em sistema agroflorestal. II SIMPÓSIO DE PESQUISA DE CAFÉS DO BRASIL. Vitória, 2001. Resumos Expandidos... Brasília: EMBRAPA Café, 2001. p. 1678-1686.
17. FREITAS, R. B.; OLIVEIRA, L. E. M.; SOARES, A. M.; DELÚ FILHO, N. Influência de diferentes níveis de sombreamento no comportamento fisiológico de cultivares de café (*Coffea arabica* L.). **Ciência e Agrotecnologia**, v.27, n.4, p.804-810, Aug. 2003.
18. NUNES, M.A. RAMALHO, J. D. C.; DIAS, M. A. Effect of nitrogen supply on the photosynthetic performance of leaves from coffee plants exposed to bright light. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.44, n.262, p.893-899, May. 1993.
19. FRANCO, C.M. Estrangulamento do caule do cafeeiro, causado pelo frio. **Bragantia**, Campinas, v.19, p. 514-521, May.1960.
20. MORAIS, H. ; KOGUISHI, M. S. ; CARAMORI, Paulo Henrique ; RIBEIRO, A. M. A. . Avaliação dos componentes de produção de cafeeiros sombreados em diferentes épocas. In: IV Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil, 2005, Londrina - PR. IV Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil, 2005.
21. GOTHARD, K.; NYLI, S. Adaptive Plasticity and plasticity as an adaptation: a selective review of plasticity in animal Morphology and life history. **Oikos**, Lund, v.74, n. 1, p.3-17, 1995.
22. GOMES, R. A.; CARVALHO, C. H. M.; SCALCO, M. S.; CASTANHEIRA, D. T.; ABREU, G. F.; VILLELA, G. M. Características de qualidade do café em diferentes regimes hídrico e densidade de plantio. In: VII Simpósio de Pesquisa dos cafés do Brasil, 2011, Araxá. Resumos Expandidos... Simpósio de Pesquisa dos cafés do Brasil, 2011.
23. ROCHA, A. C.; CEOTTO, O. L.; PREZOTTI, L. C.; Diversos espaçamentos para o plantio de café catuai na região serrana do Espírito Santo. In: SIMPÓSIO DE

- PESQUISAS, 2000, Poço de Caldas. Anais... Simpósio de Pesquisa dos cafés do Brasil, 2000.
24. GUIMARÃES, R. J.; MENDES, A. N. G. Produção de mudas de cafeeiro. In: MENDES, A. N. G.; GUIMARÃES, R. G. (Eds.). **Cafeicultura empresarial: produtividade e qualidade**. Lavras: UFLA- FAEP, 1998. 47. p. 1-60.
  25. GEROMEL, C. FERREIRA, L.P.; BOTTCHER. A.; POT.D.; PEREIRA. L. F. P.; LEROY.T.; VIEIRA, L.G.E.; MAZZAFERA. P.; MARRACCINI. P. Sucrose metabolism during fruit development in *coffea racemosa*. **Annals of Applied Bioligy**. Unicamp, v.152, p.179-187. Mar. 2008.
  26. MA, L.; DOLPHIN, D.; The metabolites of dietary chlorophylls. Rewiew article number 137. **Phytochemistry**, Amsterdam, v.50, p. 195-202. 1999.
  27. MAESTRIN, A. P. J.;NERI. C. R.; OLIVEIRA. K. T.; SERRA. O. A.; IAMAMOTO, Y. Extração e purificação de clorofila *a*, da alga *Spirulina maxima*: um experimento para os cursos de química. **Química Nova**. São Paulo. v.32, n.6, p. 1670-1672, July. 2009.
  28. HE, J.; CHEE, C.W.; GOH, C.J. Photoinhibition of *Heliconia* under natural tropical conditions: the importance of leaf orientation for light interception and leaf temperature. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v. 19, n. 4, p.1238-1248, Apr. 1996.
  29. BRAND, M.H. Shade influences plant growth, leaf color and chlorophyll content of *Kalmia latifolia* L.cultivars. **HortScience**, v.32, n.2, p.206-208, April. 1997.
  30. KING A, YOUNG G. Characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals. **Journal of the American Dietetic Association**. v.99, n.2, p. 213-8, Febr. 1999.
  31. MANACH, C.; SCALBERT, A.; MORAND, C.; RÉMÉSY, C.; JIMÉNEZ, L.; Polyphenols: food sources and bioavailability. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 79, n. 5, p. 727-747, 2004.
  32. FARAH A, DONANGELO C. M. Phenolic compounds in coffee. **Brazilian Journal of Plant Physiology**. v.18, n.1, p. 23-36, Jan./Mar. 2006.
  33. HECK, C. I., M. Schmalko, and E. Gonzalez de Mejia. Effect of growing and drying conditions on the phenolic composition of mate teas (*Ilex paraguariensis*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 8394-8403, Aug. 2008.
  34. LELOUP, V.; LOUVRIER, A., & LIARDON, R. Degradation mechanisms of chlorogenic acids during roasting. **Proceedings of the International Congress of ASIC**. v. 16, p. 192-198, 1995.
  35. CLIFFORD, M.N., RAMIREZ-MARTINEZ, J.R., Chlorogenic acids and purine alkaloids contents of mate (*Ilex paraguariensis*) leaf and beverage. **Food Chemistry**, v.35, p.13–21, 1990.

36. FUJIOKA, K.; SHIBAMOTO, T. Chlorogenic acid and caffeine contents in various commercial brewed coffees. **Food Chemistry**. v. 106, p. 217-221, 2008.
37. TRUGO, L.C.; NOGUEIRA, M. Distribuição de isômeros de ácido clorogênico e teores de cafeína e trigonelina em cafés solúveis brasileiros. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas. v. 23, n.2, p. 296-299, Maio/Ago. 2003.
38. RAO, A.; RAO, L. Carotenoids and human health. **Pharmacological Research**. v. 55, n. 3, p. 207-216, Jan. 2007.
39. HANDELMAN, G.J. The evolving role of carotenoids in human biochemistry. **Nutrition**, v.17, n.10, p.818-822, 2001.
40. SHAMI, N.J. I.E.; MOREIRA, E. A. M. Licopeno como agente antioxidante. **Revista de Nutrição**. Campinas. v.17, n.2, p. 227-236, Apr/Jun. 2004.
41. GRAHAM, D. M. CAFFEINE: its identity, dietary sources, intake and biological effects. **Nutrition Reviews**. v. 36, 4, p. 97-102, Apr. 1978.
42. MORAIS. S. A. L.; AQUINO. F. J. T.; CHANG. R.; NASCIMENTO. E. A.; OLIVEIRA. G. S.; SANTOS, N. C. S. Análise química de café arábica (*Coffea arabica* L.) e grãos pretos, verdes e ardidos (PVA) submetidos a diferentes graus de torração.. **Coffee Science**, Lavras, v. 2, n. 2, p. 97-111, Jul./Dez. 2007.
43. WECKWERTH W.; MORGENTHAL, K. Metabolomics from patterns recognition to biological interpretation. **Drug Discovery Today: Targets**, v.10, n.22, p.1551-1558, 2005.
44. SCARMINIO, I. S., ALMEIDA, A. A.; Statistical mixture design optimization of extraction media and mobile phase compositions for the characterization of green tea; **Journal of Separation Science**, v. 30, p. 414-420, 2007.
45. SNYDER, L. R., KIRKLAND, J. J.; **Introduction to modern liquid chromatography**; 2 ed, New York: Editora John Wiley & Sons Inc,1997.
46. ELLIS, D. I., DUNN, W. B., Metabolomics: current analytical platforms and methodologies, **Trends in Analytical Chemistry**. v. 24, n.4, p.285-294, 2005.
47. NETO, B. B. de, SCARMINIO, I. S., BRUNS, R. E.; **Como fazer experimentos: Pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. Campinas: Editora Unicamp, 2003.
48. LOPES, W.A.; FASCIO, M. Esquema para interpretação de espectros de substâncias orgânicas na região do Infravermelho. **Química Nova**. maio, v. 27, n. 4, p. 670-673, 2004.
49. SIM, C. O.; HAMDAN, M.R.; ISMAIL, Z.; AHMAD, M.N.; Assesment of herbal medicines by chemometrics Assisted Interpretation of FTIR spectra. **Analytica Chimica Acta**, p. 1-14, Jan. 2004.
50. ZHANG. J. L.; CUI. M.; HE. Y.; YU. H. L.; GUO. D. A. Chemical fingerprint and metabolic fingerprint analysis of Danshen injection by HPLC-UV and HPLC-MS

- methods. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v.36, n.5, 1029-1035, Jan. 2005.
51. SNYDER, LLOYD R.; KIRKLAND, JOSEPH J.; GLAJCH, JOSEPH L. **Practical HPLC method development**. 2<sup>th</sup> ed Canadá: John Wiley & Sons, 1997.
  52. HANAI, T. **HPLC A Practical Guide** (RSC Chromatography Monographs), Royal Society of Chemistry, 1 edition. United Kingdom.144p. 1999.
  53. SNYDER. L. R.; CARR, P. W.; RUTAN. S. C.; Solvatochromically based solvent-selectivity triangle. **Journal of Chromatography A**. v.656, n.1-2, p.537-547, 1993.
  54. ALMEIDA. A. A.; SCARMINIO. I. S. Statistical mixture design optimization of extraction media and mobile phase compositions for the characterization of green tea. **Journal of Separation Science** v.30, p.414-420, 2007.
  55. CAO. Y.; WANG L.; Yu X.; Ye, J. Development of the chromatographic fingerprint of herbal preparations Shuang–Huang–Lian oral liquid. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v.41, p.845-846, June. 2006.
  56. NETO, J. M. M., MOITA, G. C. Uma introdução à análise exploratória de dados multivariados. **Química Nova**. v.21, n.4, p.467-469, July/Aug. 1998.
  57. SENA, M.M.; POPPI, R.J.; FRIGHETTO, R.T.S.; VALARINI. P.J. Avaliação do uso de métodos quimiométricos em análise de solos. **Química Nova**, v. 23, n. 4, p. 547- 556, 2000.
  58. OTTO, M.; Chemometrics – Statistics and Computer application in Analytical Chemistry. Weinheim: **Wiley- VCH**. 1999.
  59. BORGES, W.N.; Aplicação de métodos de Reconhecimento de Padrões para classificação de Óleos Vegetais. 2001. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Química, Universidade Federal de Goiás, GO.
  60. JAMES, N. M., JANE, C. M., **Estadística y Quimiometría para Química Analítica**; 4<sup>th</sup>ed; Madrid: Pearson Educación. S.A., 2002.
  61. JOHNSON, A. R.; WICHEM, W. D., **Applied Multivariate Statistical Analysis**, Prentice Hall, 4<sup>th</sup>ed; New Jersey: Upper Saddle River. 1998.
  62. LONNI, A. A. S. G., SCARMINIO, I. S., SILVA, L. M. da C. e, FERREIRA, DALVA T., Differentiation of Species of the Baccharis Genus by HPLC and Chemometric Methods, **Analytical Sciences**. v.19, n.7, p.1013-1017, July. 2003.
  63. BEEBE, K. R.; PELL, R. J.; SEASHOLTZ, M. B. **Chemometrics: A practical guide**, New York: Editora John Wiley & Sons, 1998.
  64. SOARES P. K.; Taxonomia por abordagem metabolômica e métodos quimiométricos para análise e rastreio de plantas do gênero Bauhinia. 2006. 99f. Dissertação (Mestrado em Química), Universidade Estadual de Londrina.

65. MASSART, D. L., DETROYER, A. e HEYDEN, Y. V., Chemometric comparison of recent chromatographic and electrophoretic methods in a quantitative structure- retention and retention-activity relationship context; **Journal of Chromatography A**, v. 986, n.2, p. 227-238, 2003.
66. DETROYER, A., QUESTIER, F., HEYDEN, Y. V. BOROSY, A. P. e GUO, Q.; Exploratory chemometric analysis of the classification of pharmaceutical substances based on chromatographic data; **Journal of Chromatography A**, v. 897, n.1, p. 23-36, Dec. 2000.
67. SOARES. P. K.; Planejamento quimiométrico para otimização do solvente extrator e análise exploratória da impressão digital cromatográfica de Erythrina speciosa Andrews. 2010. Tese (Doutorado em Química), Unicamp, SP.
68. NETO, J. M. M.; MOITA, G. C. Uma introdução a Análise Exploratória de dados Multivariados. **Química Nova**, vol. 21, n.4, p. 467- 469, 1998.
69. MASSART, D., L., VANDEGINSTE, B. G. M., DEMING, S. N., MICHOTTI, Y., KAUFMAN, L., **Chemometrics: a textbook**, 1 ed. Amsterdam: Editora Elsevier, 1988.
70. SIMÕES. C.M.O.; SCHENKEL. E.P.; GOSMANN. G.; MELLO. J.C.P.; MENTZ. L.A.; PETROVICK. P.R.; Farmacognosia: da planta ao medicamento, 5 ed, Porto Alegre, Florianópolis : Ed.Universidade UFRGS/Ed da UFSC, 2003.
71. WANG. H.; BORGUET. E.; EISENTHAL. K. B. Polarity of Liquid Interfaces by Second Harmonic Generation Spectroscopy. **The Journal of Physical Chemistry. A.**, v.101, p.713-718. 1997.
72. SNYDER. L. R., CARR, P. W., RUTAN, S. C., **Journal of Chromatography A.**, v.656, 537p. 1993.
73. SILVA. S. R.; MERCADANTE. A. Z. Composição de carotenóides de maracujá-amarelo (*Passiflora edulis flavicarpa*) in natura. *Ciência e Tecnologia Alimentos*. vol.22, n.3, p. 254-258, 2002.
74. SOUZA. G. S.; SILVA. S. A.; COSMI. F. C.; MORAES. W. B.; CARDOSO. L. C., Determinação de clorofila em folhas de sombra e sol em plantas de jamelão. In: XII INIC, VIII EPG e II INIC Jr, 2008, São José dos Campos. ENERGIA: Geração, uso e conseqüência, 2008.
75. SILVA. M. L.; COSTA. R. S.; SANTANA. A. S.; KOBLITZ. M. G. B. Compostos fenólicos, carotenóides e atividade antioxidante em produtos vegetais. *Semina: Ciências Agrárias*. v.31, n.3, 2010.

### LISTA DE ABREVIATURAS

**$\alpha$**  - Acidez  
 **$\beta$**  - Basicidade  
 **$\pi$** - Dipolaridade  
 **$\epsilon$**  - Erro experimental  
 **$\Sigma$**  - Somatória  
**a.C.** - Antes de Cristo  
**ACN**- Acetonitrila  
**ACP**- Análise de componentes principais  
**AH**- Análise Hierárquica  
**CCD**- Cromatografia em camada delgada  
**CG**- Cromatografia gasosa  
**CLAE**- Cromatografia líquida de alta eficiência  
**CGA**- Ácidos clorogênicos  
**CP**- Componente Principal  
**d**- Diclorometano  
**DAD**- Detector com arranjo de fotodiodos  
**e**- Etanol  
**EC**- Eletroforese capilar  
**FTIR**- Infravermelho



### LISTA DE ABREVIATURAS

**h**- Hexano  
**ha**- Hectare  
**H<sub>2</sub>O**- Água  
**HPLC**- High Performance/Pressure  
 Liquide  
 Chromatography  
**LQCN**- Laboratório de  
 Quimiometria em  
 Ciências Naturais  
**P'** - Polaridade  
**UV**- Ultravioleta  
**UV-Vis**- Ultravioleta visível  
**x<sub>d</sub>** - Medida de interação da  
 acidez com o  
 soluto dioxano  
**x<sub>e</sub>** - Medida de interação da  
 basicidade com o  
 soluto etanol  
**x<sub>n</sub>** - Medida de interação da  
 dipolaridade com o  
 soluto nitrometano

