



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

PEDRO HENRIQUE HATUMURA

**EFEITO DO SOLVENTE NA SEPARAÇÃO DE
METABÓLITOS SECUNDÁRIOS EM EXTRATOS DE GRÃOS
DE *Coffea arabica***

Londrina
2014

PEDRO HENRIQUE HATUMURA

**EFEITO DO SOLVENTE NA SEPARAÇÃO DE
METABÓLITOS SECUNDÁRIOS EM EXTRATOS DE GRÃOS
DE *Coffea arabica***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Química.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ieda Spacino Scarminio.

Londrina
2014

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

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

H366e Hatumura, Pedro Henrique.

Efeito do solvente na separação de metabólitos secundários em extratos de grãos de *Coffea arabica* / Pedro Henrique Hatumura. – Londrina, 2014.
73 f. : il.

Orientador: Ieda Spacino Scarminio.

Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Estadual de Londrina,
Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Química, 2014.
Inclui bibliografia.

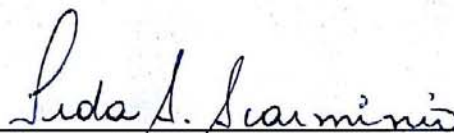
1. Química analítica – Teses. 2. Extração por solventes – Teses. 3. Análise cromatográfica – Teses. 4. Café arábica – Teses. 5. Café – Análise espectral – Teses. 6. Quimiometria – Teses. I. Scarminio, Ieda Spacino. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Química. III. Título.

CDU 543

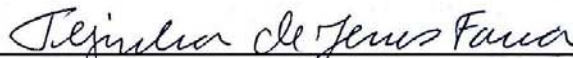
PEDRO HENRIQUE HATUMURA

**EFEITO DO SOLVENTE NA SEPARAÇÃO DE METABÓLITOS
SECUNDÁRIOS EM EXTRATOS DE GRÃOS DE *Coffea arabica***

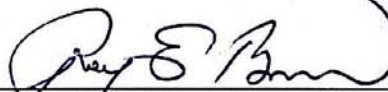
BANCA EXAMINADORA



Profa. Dra. Ieda Spacino Scarminio
Universidade Estadual de Londrina
Orientadora



Profa. Dra. Terezinha de Jesus Faria
Universidade Estadual de Londrina



Prof. Dr. Roy Edward Bruns
Universidade Estadual de Campinas

Londrina, 28 de Fevereiro 2014.

AGRADECIMENTOS

- Em especial à Professora Dra. Ieda Spacino Scarminio pela excelente orientação, sempre com muita amizade, paciência, bom humor, dedicação e disposição em acompanhar integralmente todo o trabalho.
- A professora Dra Isabel Cristina Sales Fontes Jardim pela colaboração neste trabalho.
- A minha mãe pelo amor incondicional e por todo apoio.
- Ao meu irmão Paulo e minha cunhada Carol, conselheiros de toda hora.
- Aos amigos de laboratório Amélia, Elis, Fabiano, Fernanda, Filipe, Galileu, Guilherme, Guilherme Santana, Gustavo, Patricia, Sabrina.
- Ao colega de mestrado Márcio pelo auxílio na cromatografia em coluna aberta.
- A todos os amigos do mestrado, principalmente a turma de 2012.
- A todos os professores do Programa de Pós Graduação de Química.
- A todo o Departamento de Química, professores, técnicos e funcionários.
- A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES/PROAP) pelo apoio no desenvolvimento do trabalho.

HATUMURA, Pedro Henrique. **Efeito do solvente na separação de metabólitos secundários em extratos de grãos de *coffea arabica***. 2014. 73 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2014.

RESUMO

O efeito do solvente na separação dos metabólitos em extratos de grãos crus de duas cultivares de cafés, Bourbon e IPR 108 foi investigado em cromatografia de coluna aberta. Com o objetivo de estudar a influência dos parâmetros solvatocrômicos α , β e π foram utilizadas quatro fases móveis de mesma polaridade. Métodos quimiométricos de análise hierárquica (AH) e análise de componentes principais (ACP) foram aplicados aos cromatogramas (CLAE) e espectros (UV-DAD-CLAE). Os resultados mostraram que a maior eficiência no fracionamento foi obtida usando a fase móvel ternária acetona-diclorometano-etanol (32:36:32 v/v/v) na cromatografia de coluna. A análise dos espectros dos cromatogramas UV-DAD-CLAE de ambas cultivares mostraram maior diversidade de perfis de espectros quando o extrato foi eluído com a fase ternária. Deste modo, tanto a análise de cromatogramas quanto a dos espectros mostraram a vantagem de se utilizar fases móveis ternárias. Além disso, ficou evidenciado a separação entre as frações das diferentes fases móveis, indicando que as características do solvente (α , β e π) são importantes na separação dos diferentes metabólitos.

Palavras chaves: Bourbon. IPR 108. *Coffea arabica*. Parâmetros solvatocrômicos. Fracionamento cromatográfico. Métodos quimiométricos.

HATUMURA, Pedro Henrique. **Effect of the solvent on the separation of secondary metabolites in extracts of *Coffea arabica* grain.** 2014. 73 p. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2014.

ABSTRACT

The effect of the solvent on the separation of metabolites in extracts of raw coffee beans of two cultivars, Bourbon and IPR 108 was investigated with open column chromatography. With the aim of studying the influence of the solvatochromic parameters α , β and π four mobile phases with the same polarity were used. Chemometric methods of hierarchy analysis (HA) and principal component analysis (PCA) were applied to chromatograms (HPLC) and spectra (HPLC-DAD-UV). The results showed that the highest efficiency in fractionation was achieved using the ternary mobile phase acetone-dichloromethane-ethanol (32:36:32 v / v / v) in column chromatography. The spectral analysis of the HPLC-DAD-UV chromatograms of both cultivars showed greater diversity of spectral profiles when the extract was eluted with the ternary phase. Thus, both the analysis of the chromatograms and the spectra showed the advantage to using the ternary mobile phase. Furthermore, the separation between the fractions of different mobile phases was evident, indicating that the characteristics of the solvent (α , β and π) are important in the separation of different metabolites.

Key words: Bourbon. IPR 108. *Coffea arabica*. Solvatochromic parameters. Fractionation. Chemometric methods.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** – Fotografias das duas cultivares de cafés estudados Bourbon e IPR 108.....22
- Figura 2** – Esquema do procedimento para o preparo do extrato bruto.....25
- Figura 3** – Procedimento do fracionamento em coluna aberta com a composição das fases móveis utilizadas, onde ac = acetona, di = diclorometano e et = etanol.....26
- Figura 4** – Triângulo de seletividade de Snyder, com seus oito grupos representados por círculos em vermelho.....27
- Figura 5** – Triângulo onde cada aresta representa um dos parâmetros solvatocrômicos e cada ponto representa um dos três solventes selecionados.....28
- Figura 6** – Triângulo onde cada aresta representa um dos parâmetros solvatocrômicos e cada ponto representa uma das quatro fases móveis selecionadas.....31
- Figura 7** – Cromatogramas obtidos por CLAE, na fase móvel ACN:H₂O:MeOH (26:51:23 v/v/v), das 40 frações resultantes do fracionamento cromatográfico dos extratos das cultivares IPR 108 (a) e Bourbon (b) nas quatro fases móveis estudadas34
- Figura 8** – Dendrograma dos cromatogramas obtidos por CLAE, na fase móvel ACN:H₂O:MeOH (26:51:23 v/v/v), das frações da cultivar Bourbon Mostrando as frações das diferentes fases móveis.....35
- Figura 9** – Dendrograma dos cromatogramas obtidos por CLAE, na fase móvel ACN:H₂O:MeOH (26:51:23 v/v/v), das frações da cultivar Bourbon Mostrando as frações das diferentes fases móveis.....36
- Figura 10** – Gráfico dos escores CP1xCP2xCP4 dos cromatogramas obtidos por CLAE, na fase móvel ACN:H₂O:MeOH (26:51:23 v/v/v), das frações da cultivar Bourbon38
- Figura 11** – Gráfico dos loadings dos cromatogramas obtidos por CLAE, na fase móvel ACN:H₂O:MeOH (26:51:23 v/v/v), da cultivar Bourbon38

- Figura 12** – Gráfico dos escores CP1xCP2xCP3 dos cromatogramas obtidos por CLAE, na fase móvel ACN:H₂O:MeOH (26:51:23 v/v/v), das frações da cultivar IPR 108.....40
- Figura 13** – Gráfico dos loadings dos cromatogramas obtidos por CLAE, na fase móvel ACN:H₂O:MeOH (26:51:23 v/v/v), da cultivar IPR 10840
- Figura 14** – Gráfico dos escores da CP2xCP3 dos espectros UV-DAD-CLAE dos cromatogramas obtidos das frações em coluna aberta da cultivar Bourbon em quatro fases distintas: acetona, acetona-diclorometano, diclorometano-etanol e acetona-diclorometano-etanol42
- Figura 15** – Gráfico dos loadings dos espectros UV-DAD-CLAE dos cromatogramas obtidos das frações em coluna aberta da cultivar Bourbon em quatro fases distintas: acetona, acetona-diclorometano, diclorometano-etanol e acetona-diclorometano-etanol43
- Figura 16** – Conjunto de espectros das frações dos cromatogramas obtidos por UV-DAD-CLAE, das fases móveis: (a) acetona (b) acetona-diclorometano, (c) diclorometano-etanol e (d) acetona-diclorometano-etanol da cultivar Bourbon. Onde o retângulo vermelho mostra a área ampliada no canto superior direito do gráfico44
- Figura 17** – Conjunto de perfis de espectros de maior absorvância dos cromatogramas obtidos por UV-DAD-CLAE, das fases móveis: (a) acetona (b) acetona-diclorometano, (c) diclorometano-etanol e (d) acetona-diclorometano-etanol da cultivar Bourbon45
- Figura 18** – Gráfico dos escores da CP2xCP3 dos espectros UV-DAD-CLAE dos cromatogramas obtidos das frações em coluna aberta da cultivar IPR 108 em quatro fases distintas: acetona, acetona-diclorometano, diclorometano-etanol e acetona-diclorometano-etanol46

Figura 19	– Gráfico dos loadings dos espectros UV-DAD-CLAE dos cromatogramas obtidos das frações em coluna aberta da cultivar IPR 108 em quatro fases distintas: acetona, acetona-diclorometano, diclorometano-etanol e acetona-diclorometano-etanol.....	47
Figura 20	– Conjunto de espectros das frações dos cromatogramas obtidos por UV-DAD-CLAE, das fases móveis: (a) acetona (b) acetona-diclorometano, (c) diclorometano-etanol e (d) acetona-diclorometano-etanol da cultivar IPR 108. Onde o retângulo vermelho mostra a área ampliada no canto superior direito do gráfico.....	48
Figura 21	– Conjunto de perfis de espectros de maior absorvância dos cromatogramas obtidos por UV-DAD-CLAE, das fases móveis: (a) acetona (b) acetona-diclorometano, (c) diclorometano-etanol e (d) acetona-diclorometano-etanol da cultivar IPR 108.....	49
Figura 22	– Conjunto de espectros das frações dos cromatogramas obtidos por UV-DAD-CLAE, da fase móvel acetona-diclorometano da cultivar Iapar 59. Onde o retângulo vermelho mostra a área ampliada no canto superior direito do gráfico.....	51
Figura 23	– Conjunto de espectros das frações dos cromatogramas obtidos por UV-DAD-CLAE, da fase móvel acetona-diclorometano-etanol da cultivar IPR 101. Onde o retângulo vermelho mostra a área ampliada no canto superior direito do gráfico.....	51
Figura 24	– Gráfico dos escores CP1xCP2 dos cromatogramas obtidos por CLAE, na fase móvel ACN:H ₂ O:MeOH (26:51:23 v/v/v), das frações e uma amostra não fracionada da cultivar Bourbon.....	53
Figura 25	– Gráfico dos escores CP1xCP2 dos cromatogramas obtidos por CLAE, na fase móvel ACN:H ₂ O:MeOH (26:51:23 v/v/v), das frações e uma amostra não fracionada da cultivar IPR 108.....	53
Figura 26	– Dendrograma dos cromatogramas obtidos por CLAE das frações das duas cultivares (IPR 108 e Bourbon). Na fase móvel acetona.....	55

Figura 27	– Dendrograma dos cromatogramas obtidos por CLAE das frações das duas cultivares (IPR 108 e Bourbon). Na fase móvel acetona-diclorometano.....	55
Figura 28	– Dendrograma dos cromatogramas obtidos por CLAE das frações das duas cultivares (IPR 108 e Bourbon). Na fase móvel diclorometano-etanol.....	56
Figura 29	– Dendrograma dos cromatogramas obtidos por CLAE das frações das duas cultivares (IPR 108 e Bourbon). Na fase móvel acetona-diclorometano-etanol.....	56
Figura 30	– Gráfico dos escores (CP1xCP2) com os cromatogramas dos duas cultivares na fase móvel acetona.....	57
Figura 31	– Gráfico dos Loadings da CP1 e CP2 dos cromatogramas das frações das duas cultivares na fase móvel acetona.....	58
Figura 32	– Gráfico dos escores (CP1xCP2) com os cromatogramas das duas cultivares na fase móvel acetona-diclorometano.....	59
Figura 33	– Gráfico dos Loadings da CP1 e CP2 dos cromatogramas das frações das duas cultivares na fase móvel acetona-diclorometano.....	59
Figura 34	– Gráfico dos escores (CP1xCP2) com os cromatogramas das duas cultivares na fase móvel diclorometano-etanol.....	61
Figura 35	– Gráfico dos Loadings da CP1 e CP2 dos cromatogramas das frações das duas cultivares na fase móvel diclorometano-etanol.....	61
Figura 36	– Gráfico dos escores (CP1xCP2) com os cromatogramas das duas cultivares na fase móvel acetona-diclorometano-etanol.....	62
Figura 37	– Gráfico dos Loadings da CP1 e CP2 dos cromatogramas das frações das duas cultivares na fase móvel acetona-diclorometano-etanol.....	62
Figura 38	– Gráfico dos escores (CP1xCP2) com os cromatogramas das duas cultivares nas quatro fases móveis.....	63
Figura 39	– Gráfico dos Loadings da CP1 e CP2 dos cromatogramas das frações das duas cultivares nas quatro fases móveis.....	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Propriedades solvatocrômicas e polaridade dos solventes utilizados.	27
Tabela 2 – Propriedades solvatocrômicas e polaridade das fases móveis utilizadas	30
Tabela 3 – Resultados obtidos da análise de perfis de espectros do cultivar Bourbon	49
Tabela 4 – Resultados obtidos da análise de perfis de espectros do cultivar IPR 108	50

SIGLAS

α	Acidicidade
β	Basicidade
π	Dipolaridade
φ	Fração de volume de um solvente em uma mistura
ac	Acetona
ACN	Acetonitrila
ACP	Análise de componentes principais
AH	Análise Hierárquica
CCD	Cromatografia em camada delgada
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CP	Componente Principal
DAD	Detector com arranjo de fotodiodos
di	Diclorometano
et	Etanol
f	Fração
H ₂ O	Água
MeOH	Metanol
nf	Amostra de cultivar de café não fracionada
P	Polaridade
PFP	Pentafluorofenil
UV	Ultravioleta
x_d	medida de interação da acidicidade com o soluto dioxano
x_e	medida de interação da basicidade com o soluto etanol
x_n	medida de interação da dipolaridade com o soluto nitrometano

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	MATERIAIS E MÉTODOS	20
2.1	Cultivares de <i>Coffea arabica</i> Analisados	21
2.2	Reagentes	22
2.3	Equipamentos	22
2.4	Procedimento Experimental	23
2.5	Preparo do Extrato Bruto.....	23
2.6	Preparação da Coluna Cromatográfica	24
2.7	Cromatografia em Camada Delgada (CCD)	29
2.8	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	30
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
4	CONCLUSÃO	65
	REFERÊNCIAS	68

A detailed botanical illustration of a plant. The main stem is vertical and bears several large, lanceolate green leaves with prominent veins. At the top of the stem, there is a cluster of five bright red, elongated berries. Further down the stem, there are small, light purple flowers. At the bottom of the illustration, there is a single, larger purple flower and a small, reddish-orange fruit or seed pod.

Introdução

1 INTRODUÇÃO

O café arábica é uma das várias espécies pertencentes ao gênero *Coffea* e se destaca comercialmente por gerar uma bebida de maior qualidade [1]. A qualidade da bebida, principalmente o sabor e o aroma, depende dos constituintes químicos presentes no grão cru, dos quais se destacam os compostos fenólicos, ácidos, aldeídos, cetonas, aminoácidos e açúcares [2].

Os metabólitos podem ser divididos em metabólitos primários, que estão evidentemente envolvidos nas rotas de degradação e síntese das macromoléculas em qualquer ser vivo [3], e especializados (secundários) que são geralmente encontrados em plantas [4], frequentemente atuando na defesa do vegetal contra patógenos e herbívoros ou funcionando como atrativo para polinizadores [5]. Os metabólitos especializados também têm importância comercial para a medicina terapêutica, pois grande parte destes compostos apresenta propriedades medicinais [6-8]. Eles também podem ser úteis na tentativa de se isolar um metabólito ou grupo de metabólitos com diferentes estruturas ou um grupo de novos metabólitos [9-12].

Para obter uma boa separação dos metabólitos especializados, geralmente se utilizam técnicas de cromatografia líquida. Muitas vezes, devido a grande complexidade de metabólitos encontrados no café, é necessária a combinação de mais de uma técnica para a obtenção de uma boa separação [13]. Duas técnicas muito utilizadas são a cromatografia em coluna aberta e a cromatografia líquida de alta eficiência. Em ambas, a separação é governada pela fase móvel, que geralmente é composta por uma mistura de solventes. Existem várias razões para se utilizar misturas de solventes ao invés de solventes puros na cromatografia líquida, sendo a mais importante a versatilidade em variar a seletividade afetando assim as

separações. A composição da mistura de solventes empregada é um grau de liberdade adicional à escolha dos diversos solventes. Os vários solutos a serem separados “interagem” de forma diferente os componentes da mistura de solventes, assim se distribuem diferentemente entre a fase estacionária e a móvel [14]. Além disso, quanto maior a quantidade de solventes orgânicos na fase móvel, maior será a habilidade de manipular a retenção e a seletividade do sistema cromatográfico [15]. Este fato também aumenta a complexidade da mistura, dificultando a interpretação de seus resultados ou influenciando os mesmos através de efeitos como a solvatação preferencial [14]. A escolha dos solventes e a composição dos mesmos na fase móvel são fundamentais para se obter uma melhor separação dos componentes da mistura. Esta tarefa é bem complexa e demorada, para tal, precisa-se de uma metodologia rápida e eficiente que consiga abranger as diferentes seletividades dos solventes. A partir da descoberta feita por Berthelot e Péan de Saint-Gilles, em 1862, de que os solventes influenciam o processo da reação [16], surgiu um interesse em entender como de fato os solventes poderiam influenciar as reações. No ano de 1903, Stobbe revisando os resultados obtidos por outros pesquisadores da época classificou os solventes em duas classes: apróticos (receptores de prótons) e próticos (doadores de prótons) [17]. Em seguida houve a revelação da solvatação preferencial, grande responsável pelos efeitos do meio, a qual ocorre em misturas de solventes e é resultante das forças intermoleculares entre solvente e soluto [18]. Nela, a espécie de interesse “prefere” se solvatar em um dos componentes da mistura de solventes, formando uma camada de solvatação distinta do restante da solução [19,20]. Com isso se tornou fundamental a busca por uma maneira de estudar e quantificar estas interações, tarefa trabalhosa devido à natureza complexa das mesmas. Um conceito que ajuda neste trabalho é a

polaridade, o poder de solvatação do solvente. Mas a quantificação deste não é tão simples, por isso escalas empíricas são comumente utilizadas para esta tarefa [21,22]

A primeira escala de polaridade foi de Grunwald e Winstein [23] chamada de Y, depois veio a de Kosower [24]. Kosower propôs a utilização de sondas solvatocrômicas para arquitetar sua escala Z. Estas sondas (geralmente corantes) recebem este nome devido ao efeito do solvatocromismo, onde uma espécie química sensível a solvatação sofre modificações na sua banda de absorção na região do visível e ultravioleta [25,26]. Deste modo, iniciou-se uma busca por novas escalas e novas sondas que fossem mais adequadas para a quantificação da polaridade. Entre as várias escalas desenvolvidas, duas se destacam: a escala $E_t(30)$ de Dimroth e Reichardt e a escala α , β e π de Kamlet e Taft. Dimroth e Reichardt estudaram várias sondas e tiveram o melhor resultado com a de número trinta $E_t(30)$, por isso o seu nome. A sonda trinta demonstrou um forte efeito de solvatocromismo e, devido as suas bandas solvatocrômicas aparecerem na região do visível, ela é de fácil percepção [25].

Diferentes da maioria das escalas que são baseadas em um parâmetro, Kamlet e Taft se apoiaram em três parâmetros das interações polares dos solventes: α (acidicidade), β (basicidade) e π (dipolaridade). Parâmetros similares já tinham sido utilizados por Snyder [27]. Em 1974 ele introduziu o primeiro triângulo de seletividade de solventes, baseado em constantes de distribuição relatadas por Rohrschneider [28]. Snyder utilizou diferentes solutos-teste para estudar as três interações, a acidicidade que era medida com dioxano (x_d), a basicidade que era medida com etanol (x_e) e a dipolaridade que era medida com nitrometano (x_n). Desta forma, Snyder separou mais de oitenta solventes em oito grupos. Quase dez anos

depois Kamlet, quantificou os mesmos parâmetros, entretanto, ele se utilizou de sondas solvatocrômicas para calcular as mesmas interações e as chamou de parâmetros solvatocrômicos. Uma das vantagens da abordagem solvatocrômica é que seus valores são derivados da espectroscopia, assim sendo, suas medidas são específicas para apenas uma interação, ou seja, elas não sofrem influência de outras interações [29]. Além disso, Kamlet utilizou nas suas medidas a média de várias sondas (solutos), o que elimina a incerteza causada pelo efeito da solvatação preferencial que pode ocorrer quando se utiliza apenas um soluto numa mistura de solventes e assegura uma correlação estatística válida [26]. Ademais Kamlet, com o objetivo de quantificar apenas as interações soluto-solvente, escolheu sondas que não tivessem interações específicas [30]. Por conseguinte, os valores obtidos por Kamlet se mostram, argumentativamente, melhores que os de Snyder, o que pode ter influenciado no atual crescimento do interesse da abordagem solvatocrômica e no desenvolvimento de novas sondas [31-33].

Na CLAE, geralmente se utiliza o sistema de classificação de Snyder para escolher os solventes da fase móvel. O mesmo não acontece com a cromatografia líquida em coluna aberta, onde a escolha é geralmente baseada na polaridade. No entanto para uma quantificação adequada da polaridade dos solventes é necessário a utilização dos parâmetros utilizados por Snyder e Kamlet, pois interações específicas do soluto com o solvente, como as ligações de hidrogênio, são essenciais na escolha da fase móvel.

Após a obtenção dos dados experimentais, a análise dos mesmos não é simples, por isso é necessário a utilização de métodos de análise exploratória. Com eles é possível identificar modelos de associação no grupo de dados, e conceber ligações entre variáveis e objetos, tornando possível a detecção de objetos

singulares ou o agrupamento dos mesmos. Dentro destes, dois métodos se destacam, a análise de agrupamentos hierárquica (AH) e a análise de componentes principais (ACP). A primeira se utiliza da similaridade entre dois pontos baseada na distância entre eles no espaço multidimensional, para analisar agrupamentos de forma hierárquica do conjunto de dados. Enquanto a segunda, aplica combinações lineares das variáveis originais para reduzir a dimensionalidade do agrupamento de dados, com isso simplificando a análise destes sem que ocorra grande perda de informações [34].

Devido à heterogeneidade dos metabólitos, bem como a diferença nas suas polaridades, o sucesso da separação cromatográfica irá depender da escolha do solvente usado no método de separação. Por outro lado, cada método analítico consiste de conjuntos específicos de condições experimentais, sendo assim, para encontrar as condições ótimas numa amostra complexa, um caminho efetivo é combinar técnicas analíticas com métodos quimiométricos.

Considerando a importância da escolha dos solventes que compõem a fase móvel, suas interações e o fato de ser raro encontrar trabalhos na literatura que exploram o efeito da fase móvel na separação de metabólitos em cromatografia em coluna aberta, este trabalho teve como objetivo: avaliar o efeito do solvente na separação de metabólitos especializados em cultivares de *Coffea arabica*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Comparar quatro fases móveis de mesma polaridade, usando solventes puros e misturas de solventes para cromatografia de coluna aberta na separação das diferentes classes de metabólitos.

2) Utilizar métodos quimiométricos de análise multivariada associados a dados cromatográficos para análise das classes dos diferentes metabólitos.

A detailed botanical illustration of a plant. The main stem is upright and bears several large, lanceolate green leaves with prominent veins. At the top of the stem, there is a cluster of five bright red, oval-shaped berries. Near the base of the plant, there is a single, small, light purple flower with five petals and a central stamen. The entire illustration is set against a plain white background.

*Materialis
e
métodos*

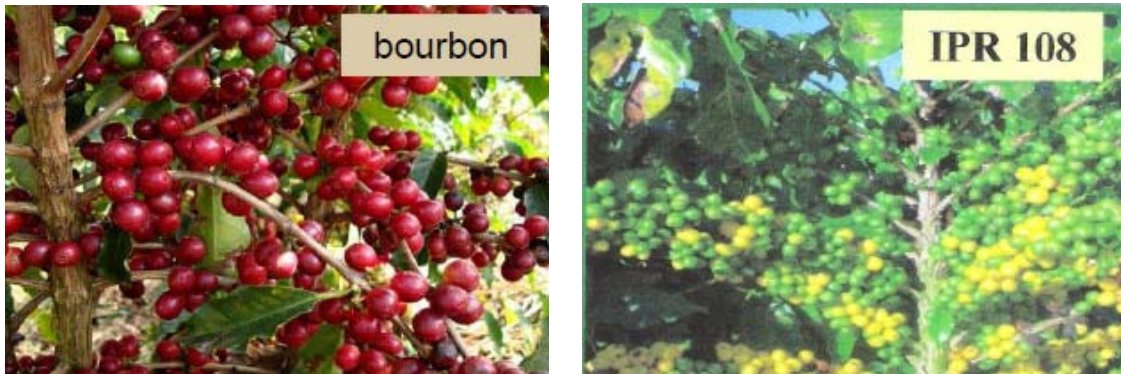
2 MATERIAIS E MÉTODOS

Num estudo prévio do nosso grupo de pesquisa [35] um planejamento de mistura centroide simplex para os solventes: acetato de etila, diclorometano, etanol e hexano; foi usado para a escolha do sistema extrator de grãos crus de café do tipo arábica de diferentes cultivares. A escolha da fase móvel para CLAE foi feita utilizando o mesmo tipo de planejamento, mas com os solventes: água, acetonitrila e metanol. O extrator mais eficiente foi a mistura binária diclorometano:etanol (1:1 v/v), e a fase móvel mais eficiente para análise em CLAE foi água:ACN:MeOH (51:26:23 v/v/v), sendo assim estas condições foram utilizados neste trabalho.

2.1 Cultivares de *Coffea arabica* Analisados

Foram analisadas duas cultivares de *Coffea arabica*: Bourbon e IPR108 . Na cultivar Bourbon não há cruzamento, a cultivar IPR 108 originou-se do cruzamento cultivar Iapar59 x (Catuaí x Icatu). A cultivar Iapar 59 originou-se do cruzamento entre *Coffea arabica*, Villa Sarchi 971/10 e o Híbrido de Timor 832/2. A Figura 1 mostra as fotografias das duas cultivares de cafés estudados. Duas cultivares IPR101 e IAPAR 59 foram usadas como amostras de validação.

Figura 1 - Fotografias das duas cultivares de cafés estudadas Bourbon e IPR 108.



2.2 Reagentes

Os reagentes utilizados foram Álcool etílico comercial dR, Acetona P.A. F Maia 99,5%, Diclorometano P.A. F Maia 99,5%, Acetonitrila e Metanol grau cromatográfico Vetec, água ultrapura Milli-Q.

2.3 Equipamentos

Os equipamentos e aparelhos utilizados foram: balança Analítica Shimadzu AY220, evaporador rotativo Fisaton 801, aparelho de ultrason Labstore Maxiclean 800, moinho de disco Perten-3600, peneira Granutest ABNT 25 abertura em mm 0,71, espectrofotômetro UV-VIS Genesys 2 Thermo Spectronic, purificador de água Millipore Plus, cromatógrafo líquido de alta eficiência SPD-M10AV Finnigan Surveyor com detector de arranjo de fotodiodo (PDA) Termo-Electro Corporation, coluna de vidro de 30x2,5 cm, folhas de alumínio pré-revestidas Macherey-Nagel silica gel 60

com indicador fluorescente UV₂₅₄ de 5x20 cm, coluna Phenomenex 100 x 4,60 mm Kinetex 2,6 micrômetros PFP 100 A.

2.4 Procedimento Experimental

A maceração, operação na qual a extração da matéria prima vegetal é realizada durante um período prolongado e sem renovação do líquido extrator, usualmente é aplicado na extração dos constituintes químicos existentes nas plantas. Devido à saturação do líquido ou ao estabelecimento de um equilíbrio difusional entre o meio extrator e o interior da célula, ela não conduz ao esgotamento da matéria prima vegetal. Para aumentar a eficiência da extração, neste trabalho, optamos pelo método de remaceração, ou seja, a operação da maceração é repetida várias vezes utilizando o mesmo material renovando-se apenas o líquido extrator.

2.5 Preparo do Extrato Bruto

Primeiramente, os grãos crus dos cafés foram imersos em nitrogênio líquido para torná-los friáveis e com isso facilitar a sua moagem. Após a moagem, o material vegetal foi peneirado.

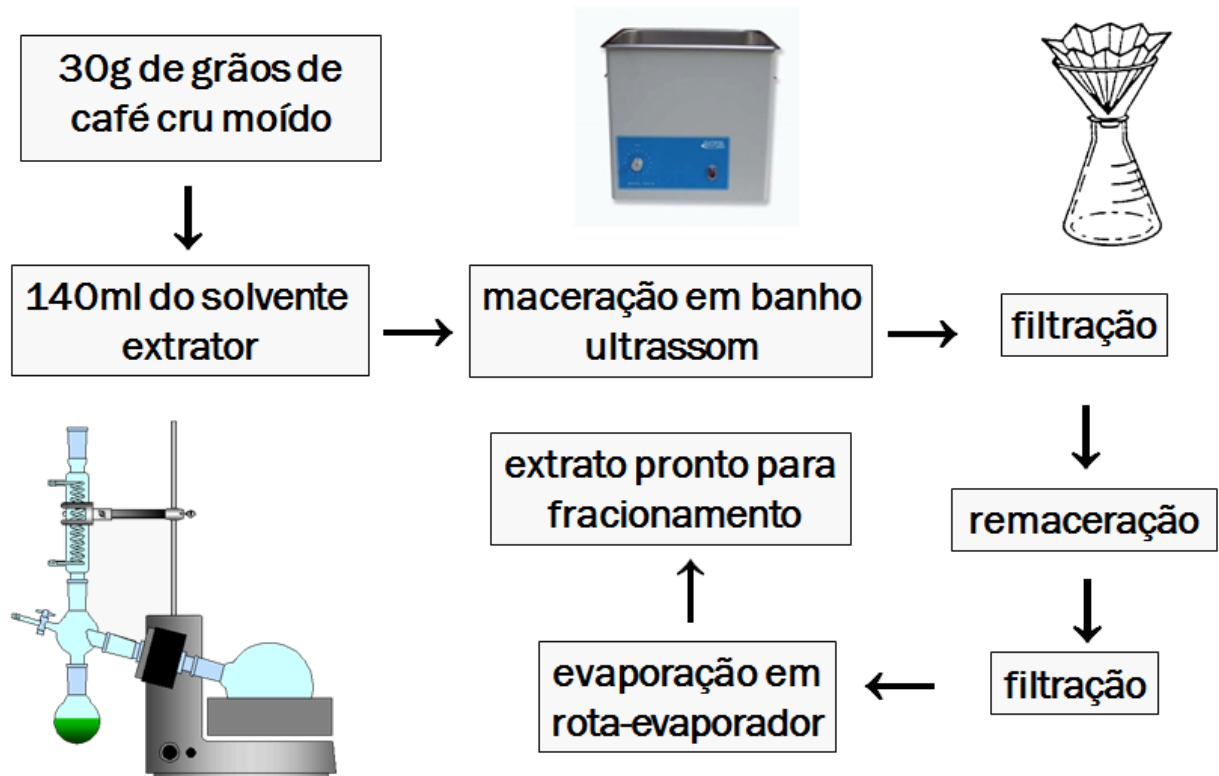
A Figura 2 mostra o desenvolvimento experimental. Para cada amostra de café foram pesados 30 g de café cru moído e adicionaram-se 140 mL da mistura de

solvente (diclorometano:etanol 1:1 v/v). Em seguida, o material foi levado ao banho ultrassom e a cada 15 minutos trocava-se a água do banho para evitar o aquecimento do mesmo, e a cada 30 minutos a amostra era filtrada e novamente colocada uma porção da mistura extratora, repetindo-se o processo 29 vezes. As misturas obtidas foram levadas ao evaporador rotativo, onde os solventes foram evaporados. Os extratos obtidos foram armazenados em frascos e colocados sob o ventilador para retirar-se todo o solvente ainda presente na amostra, até peso constante.

2.6 Preparação da Coluna Cromatográfica

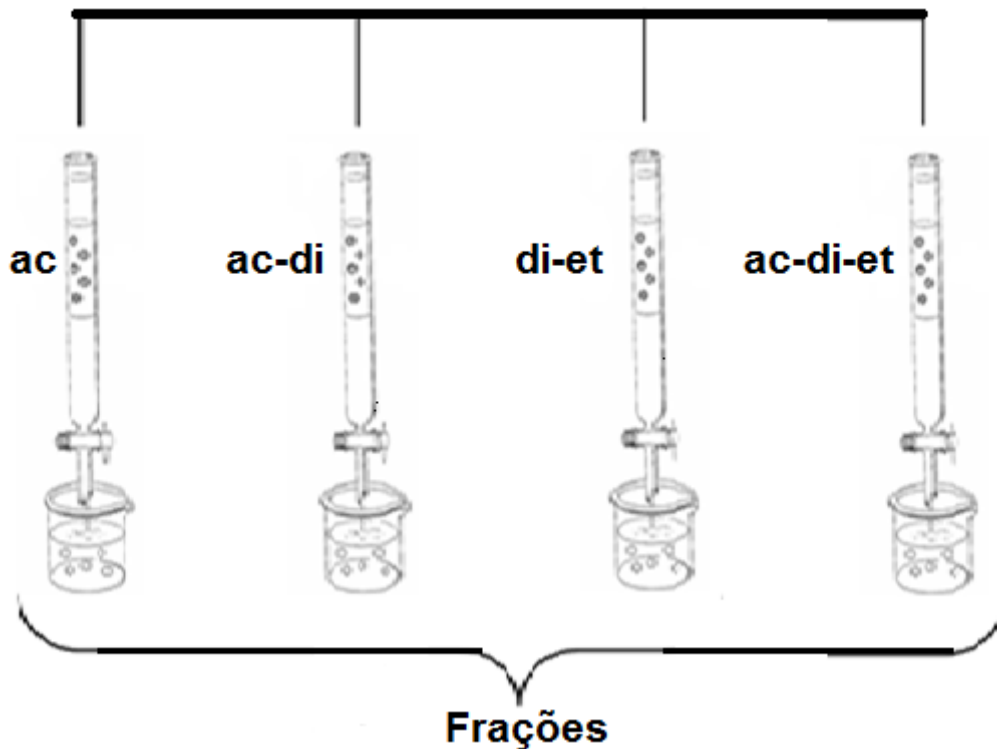
Um grama do extrato bruto seco foi macerado juntamente com um grama de sílica até ficar um pó bem fino. Em seguida a amostra foi colocada no topo da coluna de vidro de 30x2,5 cm, que foi previamente preenchida e empacotada lentamente com 30g de sílica gel 60 (0,2 – 0,5 mm). Para fixar esta coluna foi utilizado um suporte para buretas. Quatro colunas foram preparadas para cada cultivar de café, seguindo este procedimento. Cada coluna foi eluída com uma fase móvel de composição diferente e de mesma polaridade. A figura 3 mostra o esquema deste procedimento.

Figura 2 – Esquema do procedimento para o preparo do extrato bruto.



A escolha das fases móveis foi baseada na classificação de solventes de Snyder, sendo escolhidos para a composição das mesmas, três solventes de diferentes grupos do triângulo de seletividade de Snyder, como mostra a Figura 4. Baseado em modificadores orgânicos muito utilizados neste tipo de análise, foram selecionados o etanol (grupo II), o diclorometano (grupo V) e a acetona (grupo VI). Para gerar maior mudança na seletividade, os solventes devem pertencer a diferentes grupos da classificação de Snyder.

Figura 3 – Procedimento do fracionamento em coluna aberta com a composição das quatro fases móveis utilizadas, onde ac = acetona, di = diclorometano e et = etanol.



Na Tabela 1 temos os valores das propriedades solvatocrômicas, normalizados para que a somatória dos mesmos seja um. Construindo-se um triângulo com as propriedades solvatocrômicas em suas arestas e colocando-se os três solventes dentro do mesmo, como mostra a Figura 5, ficam evidentes as diferentes características solvatocrômicas de cada solvente.

Figura 4 – Triângulo de seletividade de Snyder, com seus oito grupos representados por círculos em vermelho.

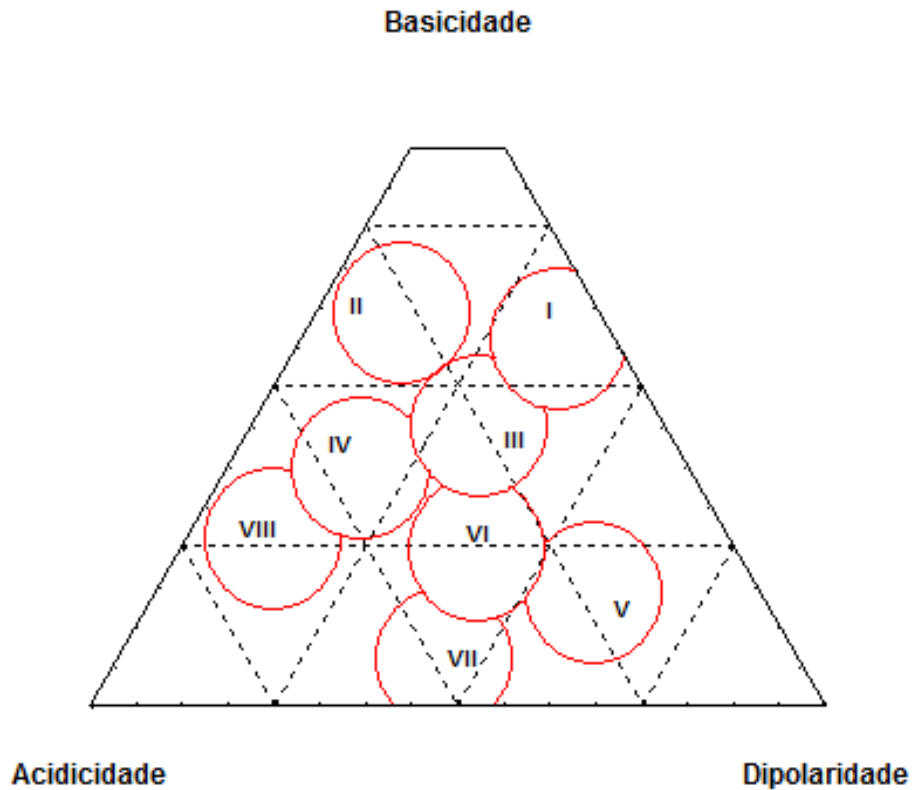
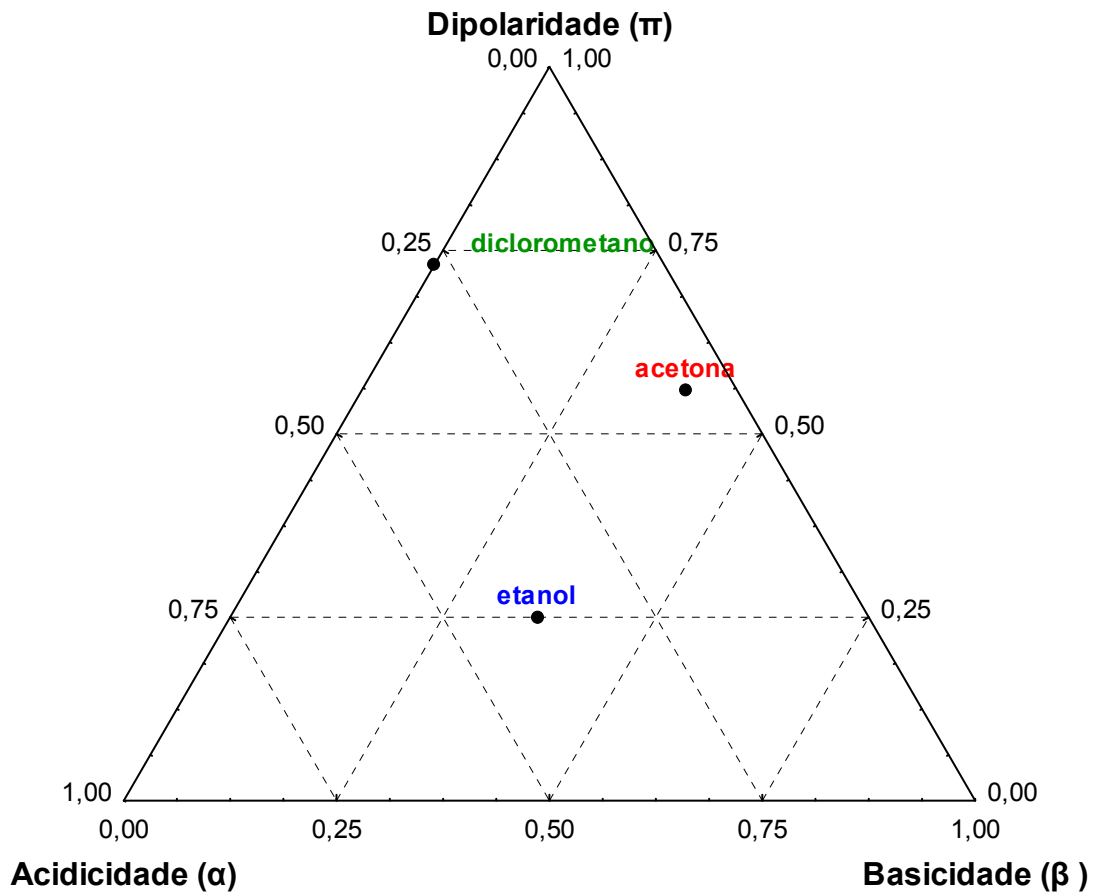


Tabela 1 – Valores dos parâmetros solvatocrômicos dos solventes

Solvente	Acidicidade (α)	Basicidade(β)	Dipolaridade (π)	Polaridade
acetona	0,06	0,38	0,56	5,1
diclorometano	0,27	0	0,73	3,1
etanol	0,39	0,36	0,25	4,3

Figura 5 – Triângulo onde cada aresta representa um dos parâmetros solvatocrômicos e cada ponto representa um dos três solventes selecionados.



Com o objetivo de comparar os parâmetros solvatocrômicos, e não a polaridade, foram escolhidas composições das fases móveis que tivessem a mesma polaridade. Para esse cálculo utilizou-se a equação dada por:

$$P' = \varphi_a P_a + \varphi_b P_b + \varphi_c P_c$$

onde φ_a , φ_b e φ_c representam as frações dos volumes dos solventes “a”, “b” e “c” de uma mistura ternária, P_a , P_b e P_c são os valores de polaridade destes solventes puros e P' é a polaridade da mistura.

Considerando que a acetona pura tem polaridade de 5,1 as proporções para as misturas foram calculadas para uma polaridade final de mesmo valor. Conseqüentemente, a razão das misturas foi: acetona-diclorometano (58:42 v/v), diclorometano-etanol (52:48 v/v) e a mistura ternária acetona-diclorometano-etanol (32:36:32 v/v/v).

A Tabela 2 mostra os valores das propriedades solvatocrômicas, normalizados para que a somatória dos mesmos seja um, das quatro fases móveis escolhidas. Construindo-se um triângulo com as propriedades solvatocrômicas em suas arestas e colocando-se as quatro fases móveis dentro do mesmo, como mostra a Figura 6, podemos observar as características solvatocrômicas de cada fase móvel.

Em cada coluna foram recolhidos 20 frações de cada extrato em frascos de vidros de 7 mL. Em seguida, estes foram colocados sob ventilação para retirar-se todo o solvente presente no frasco, até peso constante.

2.7 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

As amostras foram aplicadas em cromatoplasmas na forma de solução, pois os solventes têm grande volatilidade e após a aplicação são eliminados. Foram utilizados tubos capilares para as aplicações. As aplicações foram feitas em faixa horizontal uniforme nas cromatoplasmas que tinham medida de 10 cm de comprimento. Em seguida, as placas foram colocadas na câmara de eluição, onde ocorre o contato com a fase móvel. A detecção das mesmas foi feita por borrifamento de vanilina sulfúrica.

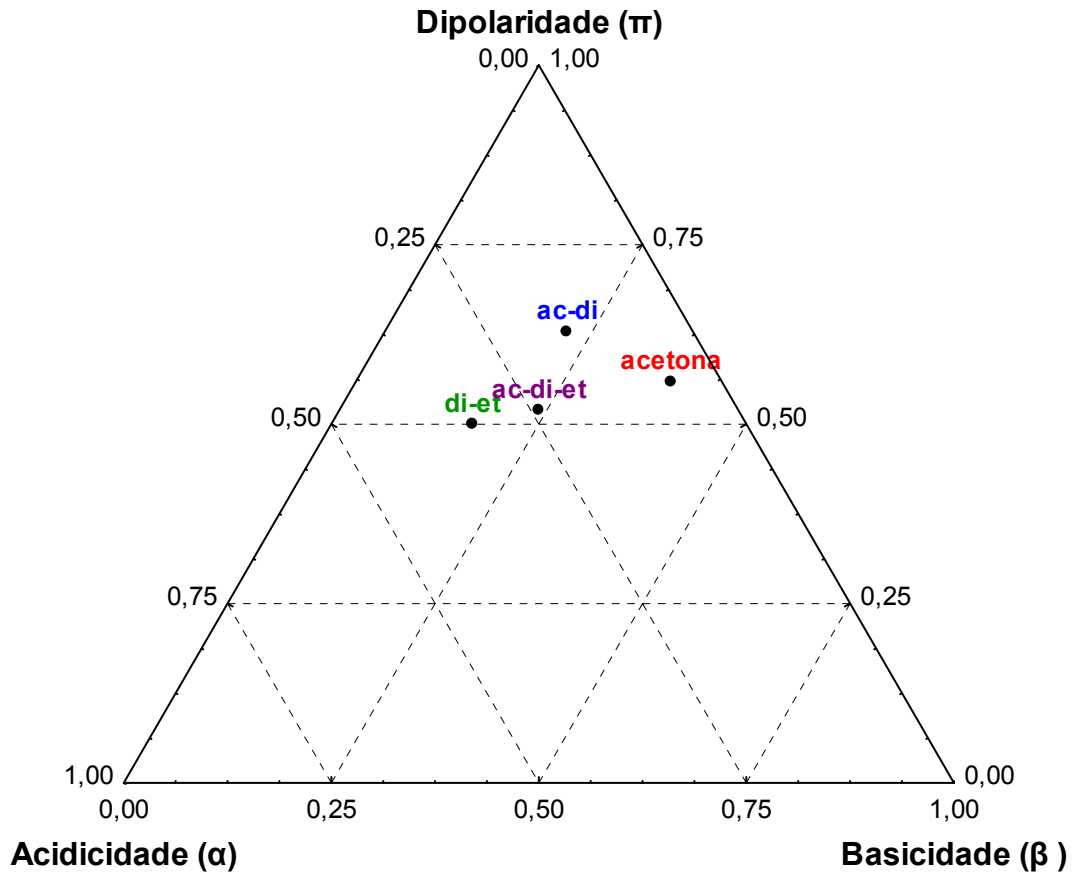
Tabela 2 – Valores dos parâmetros solvatocrômicos das fases móveis

Fase móvel	Acidicidade (α)	Basicidade(β)	Dipolaridade (π)	Polaridade
acetona	0,06	0,38	0,56	5,1
ac-di	0,15	0,22	0,63	5,1
di-et	0,33	0,17	0,5	5,1
ac-di-et	0,24	0,24	0,52	5,1

2.8 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

As vinte frações de cada fase móvel foram numeradas de um a vinte em ordem crescente de eluição, destas foram selecionadas dez, as de número par, para análise em CLAE. Em seguida elas foram diluídas em 6 mL da sua respectiva fase móvel e em seguida retirou-se 20 μ L desta, que a seguir foram diluídos em 11,98 mL da mistura ternária de solventes (ACN:H₂O:MeOH 26/51/23 v/v/v) que, em estudo anterior³⁵, demonstrou ser a fase móvel mais eficaz para a análise de metabólitos nas amostras de café. Antes da injeção no equipamento, as amostras foram filtradas em filtro Milipore Millex com 0,22 μ m. A vazão da fase móvel foi 1 mL/min e cada cromatograma foi monitorado nos comprimentos de onda 210, 254 e 280 nm.

Figura 6 – Triângulo onde cada aresta representa um dos parâmetros solvatocrômicos e cada ponto representa uma das quatro fases móveis selecionadas



A botanical illustration of a plant, likely a species of Salvia. The illustration shows a central stem with several large, lanceolate, green leaves. At the top of the stem, there is a cluster of five bright red, elongated berries. Below the berries, there are small, light purple flowers. At the bottom of the stem, there is a single, elongated, reddish-brown fruit or seed. The entire illustration is set against a white background.

*Resultados
e
discussão*

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nesta etapa do trabalho investigamos a variação composicional das frações recolhidas dos extratos de café por CLAE e métodos quimiométricos.

A Figura 7 mostra os cromatogramas dos extratos preparados em diclorometano-etanol (1:1 v/v) dos dois tipos de café no tempo de retenção de 0 a 8 min. Devido à dificuldade de analisar visualmente os resultados obtidos, os métodos quimiométricos de análise de componentes principais e análise hierárquica (AH) foram usados para auxiliar a interpretação dos resultados.

Para a análise hierárquica construiu-se uma matriz de 40x960 (40 cromatogramas/amostras por 960 variáveis/absorvâncias nos diferentes tempos de retenção) das frações obtidas em coluna aberta para as cultivares Bourbon e IPR 108 em quatro fases distintas: acetona, acetona-diclorometano (58:48, v/v), diclorometano-etanol (58:48 v/v) e acetona-diclorometano-etanol (32:36:32 v/v/v). Nenhum pré-processamento foi utilizado.

O dendrograma usando o método de Ward para as amostras de café da cultivar Bourbon está apresentado na Figura 8. Este dendrograma mostra que na distância de ligação de 1200 existem três grupos, dois deles contendo acetona e o terceiro formado pelos extratos eluídos na mistura binária diclorometano-etanol. Diminuindo a distância em torno de 600, as frações eluídas em diclorometano-etanol ainda permanecem num mesmo grupo, seguido pelas amostras eluídas em acetona, que forma o segundo maior grupo, lado direito do dendrograma. Por esta figura, fica evidente que os cromatogramas das frações provenientes da mistura binária acetona-diclorometano e acetona-diclorometano-etanol são menos similares.

Figura 7 – Cromatogramas obtidos por CLAE, na fase móvel ACN:H₂O:MeOH (26:51:23 v/v/v), das 40 frações resultantes do fracionamento cromatográfico do extrato das cultivares IPR 108 (a) e Bourbon (b) nas quatro fases móveis estudadas.

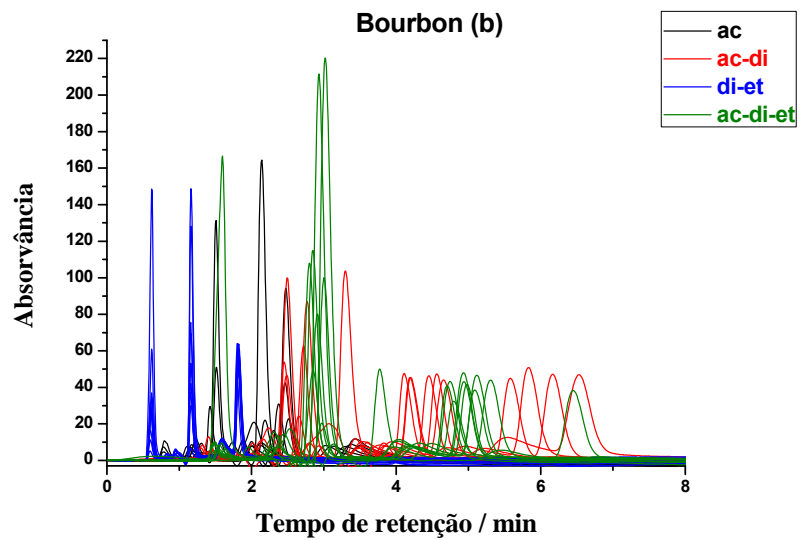
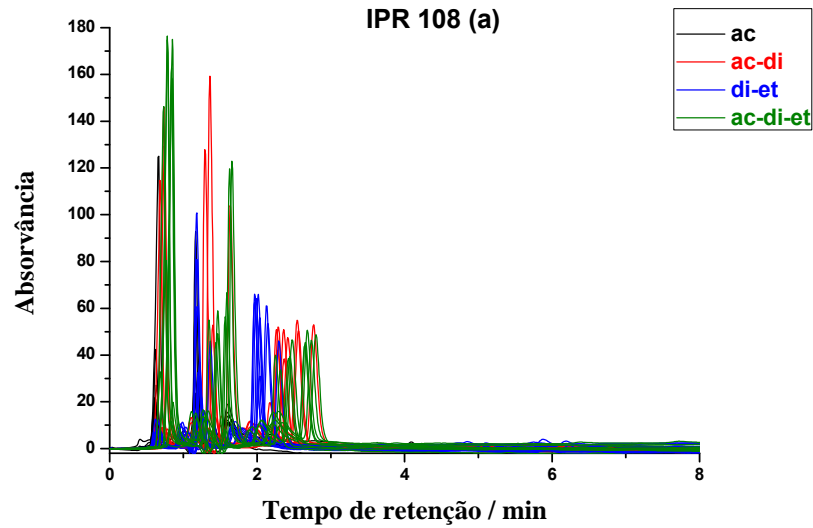
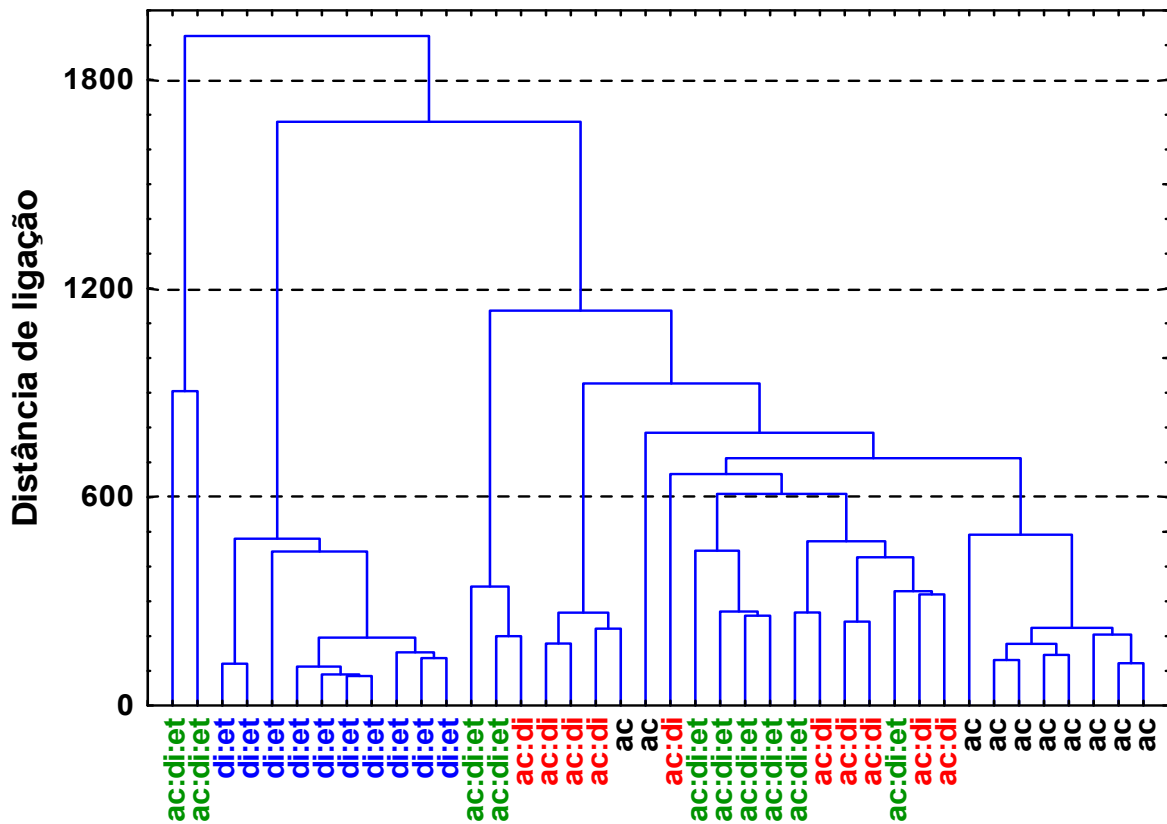
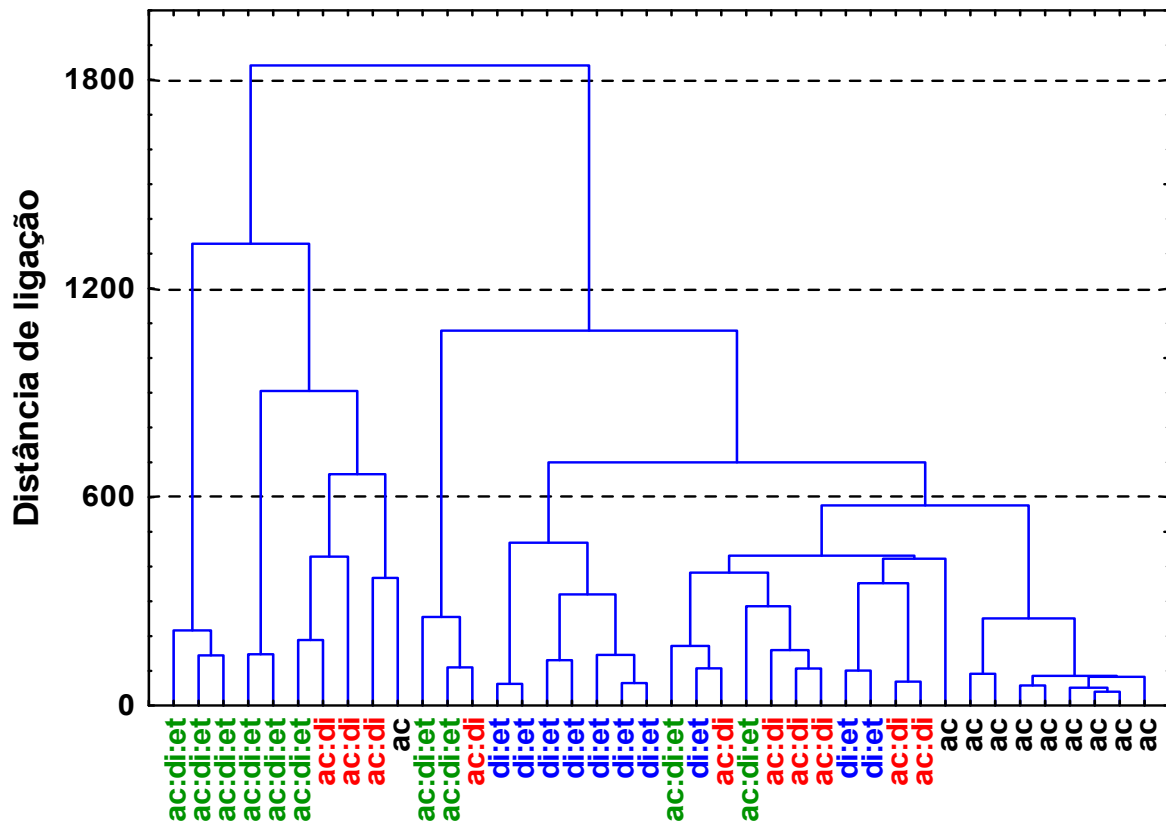


Figura 8 – Dendrograma dos cromatogramas obtidos por CLAE, na fase móvel ACN:H₂O:MeOH (26:51:23 v/v/v), das frações da cultivar Bourbon. Mostrando as frações das diferentes fases móveis.



A Figura 9 mostra o dendrograma para as amostras de café da cultivar IPR 108. Nesta Figura na distância de ligação em torno de 600, situa-se o maior agrupamento, no extremo direito do dendrograma contendo as amostras das frações obtidas na fase móvel acetona, sendo o segundo maior grupo as amostras eluídas em diclorometano-etanol, enquanto as frações eluídas em acetona-diclorometano e a mistura ternária acetona-diclorometano-etanol também apresentam menor similaridade.

Figura 9 – Dendrograma dos cromatogramas obtidos por CLAE, na fase móvel ACN:H₂O:MeOH (26:51:23 v/v/v), das frações da cultivar IPR 108. Mostrando as frações das diferentes fases móveis.



Para a análise das componentes principais foi usada a mesma matriz da análise hierárquica, 40×960 (40 cromatogramas/amostras por 960 variáveis/idades de absorvâncias nos diferentes tempos de retenção) das frações obtidas em coluna aberta para as cultivares Bourbon e IPR108 em quatro fases distintas: acetona, acetona-diclorometano, diclorometano-etanol e acetona-diclorometano-etanol. Nenhum pré-processamento foi utilizado.

Para a cultivar Bourbon as quatro primeiras componentes principais explicam 56% da variância total contida nos dados, sendo que a primeira explica 22%, a segunda 16%, a terceira 11% e a quarta 7%. A Figura 10 mostra o gráfico dos escores das componentes CP1×CP2×CP4, que apresentaram mais informações químicas, mostrando que a CP3, apesar de ter maior variância que a CP4, não

contribui com informações químicas relevantes das amostras. Pela Figura observamos que as frações eluídas em diclorometano-etanol ($\alpha = 0,33$ e $\beta = 0,17$) ficam bem discriminadas na parte mais positiva da CP1, enquanto que as frações em acetona estão localizadas mais próximas da parte negativa da CP1 e menos positiva da CP2 ($\alpha = 0,06$ e $\beta = 0,38$). A CP1 parece estar relacionada aos parâmetros solvatocrômicos acidez e basicidade. As frações provenientes de acetona-diclorometano e acetona-diclorometano-etanol distribuem-se ao longo da CP4.

A Figura 11 mostra o gráfico dos “loadings” para as quatro primeiras componentes principais. Na CP1 os “loadings” mais positivos ocorrem no tempo de retenção até dois minutos, sendo assim, quanto mais positivo na CP1 maior a polaridade dos metabólitos, ao contrário, na CP2, quanto mais negativo maior a polaridade. Na CP4 maiores valores de “loadings” positivos ou negativos ocorrem depois de 2 minutos, implicando em menor polaridade que aqueles em relação a CP1 e CP2.

Figura 10 – Gráfico dos escores CP1xCP2xCP4 dos cromatogramas obtidos por CLAE, na fase móvel ACN:H₂O:MeOH (26:51:23 v/v/v), das frações da cultivar Bourbon.

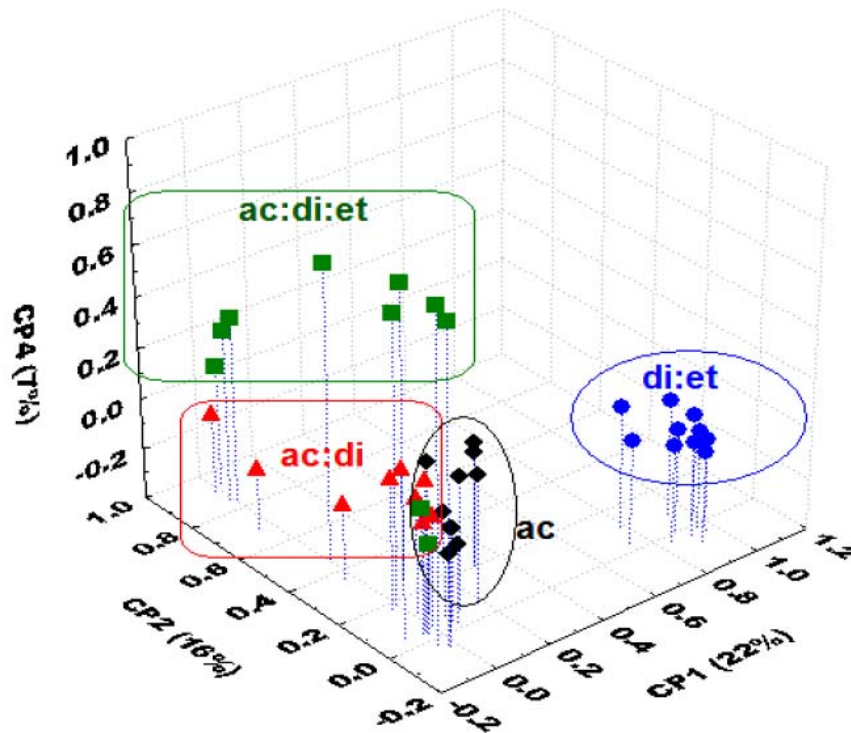
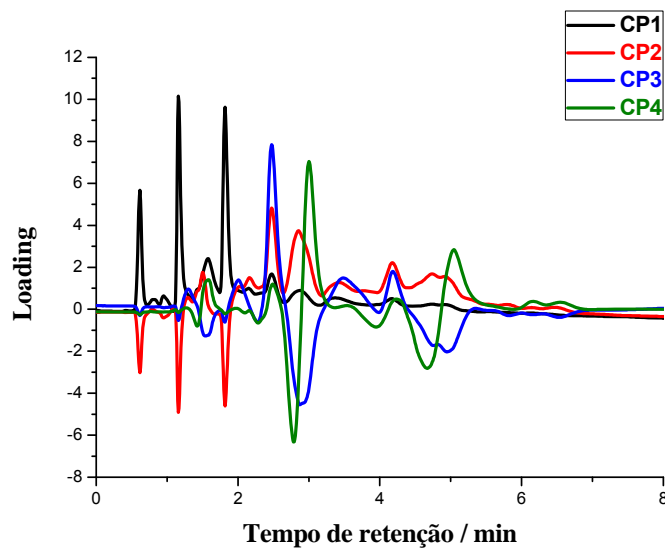


Figura 11 - Gráfico dos loadings dos cromatogramas obtidos por CLAE, na fase móvel ACN:H₂O:MeOH (26:51:23 v/v/v), das frações da cultivar Bourbon.



A Figura 12, análise de componentes principais para a cultivar IPR 108, mostrou que as três primeiras componentes principais explicam 54% da variância total contida nos dados, sendo que a primeira explica 32%, a segunda 13% e a terceira 9%. O gráfico dos escores da CP1×CP2×CP3 mostra três grupos distintos, as frações eluídas em acetona sozinha, as frações eluídas em diclorometano:etanol e o terceiro grupo das amostras contendo acetona e diclorometano. Mais uma vez, parece que as frações foram discriminadas pela basicidade, as frações diclorometano:etanol com $\alpha = 0,33$ e $\beta = 0,17$, as frações em acetona com $\alpha = 0,06$ e $\beta = 0,38$ e as frações acetona:diclorometano e acetona:diclorometano:etanol com valores $\alpha = 0,24$ e $\beta = 0,24$ e $\alpha = 0,15$ e $\beta = 0,22$, respectivamente. Tanto para as frações da cultivar Bourbon, quanto IPR 108 as fases móveis acetona e diclorometano-etanol mostraram o maior agrupamento entre suas frações, enquanto as misturas acetona-diclorometano e acetona-diclorometano-etanol apresentam maior variação.

A Figura 13 mostra o gráfico dos loadings para as três primeiras componentes principais. Na CP1 os “loadings” mais negativos ocorrem no tempo de retenção até dois minutos, sendo assim, quanto mais negativo na CP1 maior a polaridade dos metabólitos, na CP2, temos os loadings negativos e positivos antes dos dois minutos, enquanto a CP3 apresenta o seu loading mais positivo próximo de dois minutos, implicando em menor polaridade em relação aqueles da CP1 e CP2.

Figura 12 – Gráfico dos escores CP1xCP2xCP3 dos cromatogramas obtidos por CLAE, na fase móvel ACN:H₂O:MeOH (26:51:23 v/v/v), das frações da cultivar IPR 108.

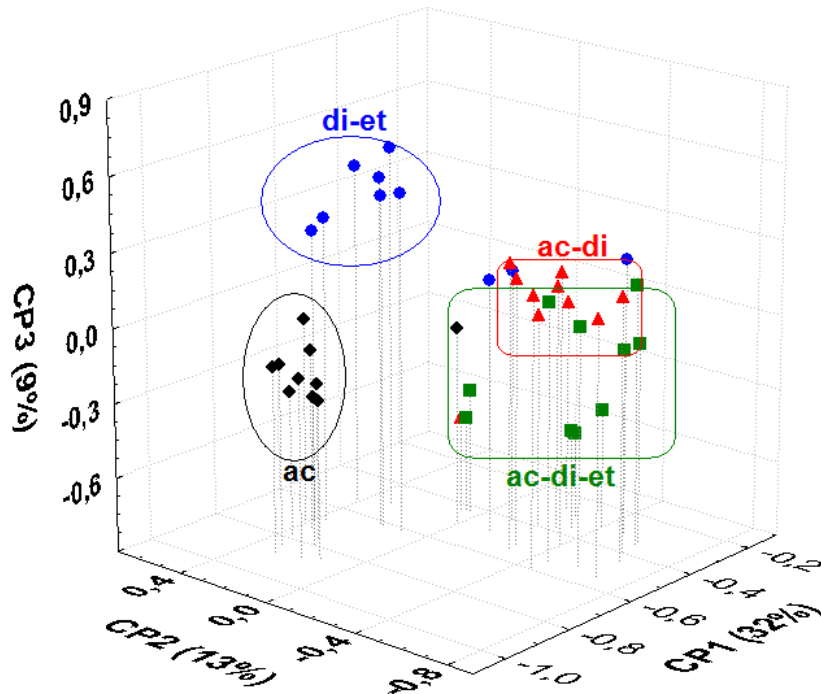
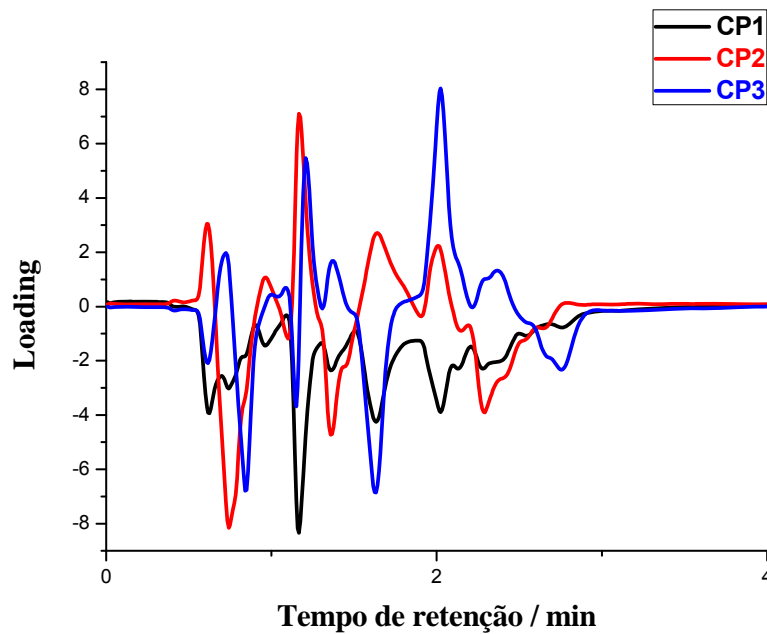


Figura 13– Gráfico dos loadings dos cromatogramas obtidos por CLAE, na fase móvel ACN:H₂O:MeOH (26:51:23 v/v/v), das frações da cultivar IPR 108.

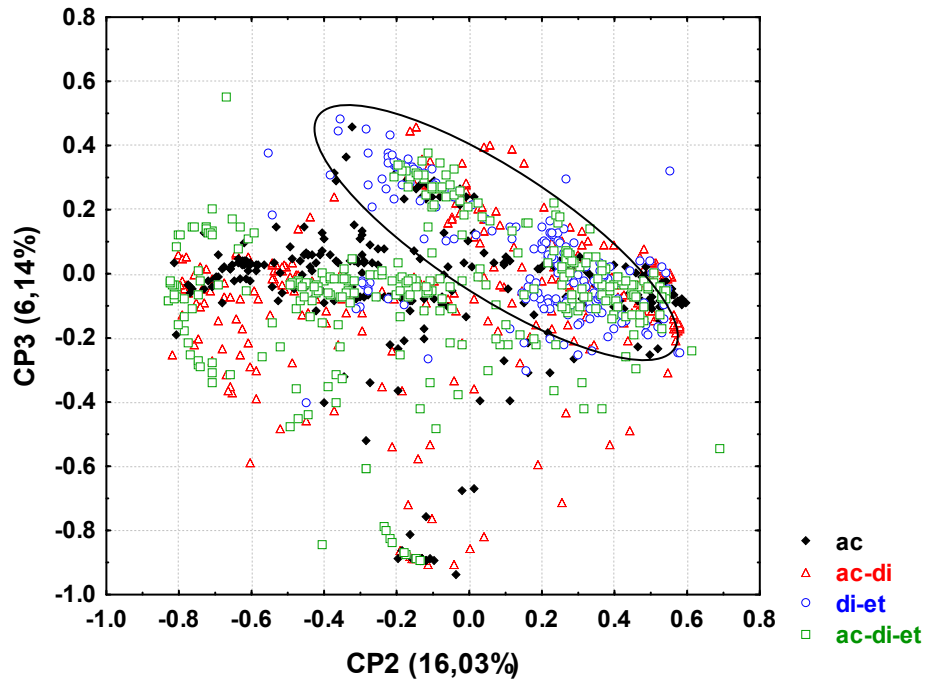


Embora os cromatogramas tenham mostrado uma separação entre as fases, bem como na mesma fase, eles não trazem informações sobre os metabólitos na ausência de padrões. Para explorar as diferenças entre os metabólitos, os espectros UV-DAD-CLAE foram comparados. Para esta análise foram usados os espectros de cada pico de dez cromatogramas escolhidos em cada fase eluída em coluna aberta, totalizando quarenta cromatogramas para cada cultivar.

Para a cultivar Bourbon esta análise resultou em 1124 espectros, distribuídos em acetona (296), diclorometano:etanol (189), acetona:diclorometano (319), e na mistura acetona:diclorometano:etanol (320) em 161 comprimentos de onda (190 a 350 nm). As três primeiras componentes principais explicam 88,4% da variância total dos dados, sendo que a primeira explica 66,3%, a segunda 16,0% e a terceira 6,1%.

A Figura 14 mostra o gráfico das componentes principais CP2×CP3. Observa-se na Figura que as amostras eluídas em acetona estão mais espalhadas na CP2. Com o auxílio do gráfico dos loadings na Figura 15 observa-se que as amostras localizadas na região positiva da CP2, têm maior contribuição da absorção em 200 nm e negativa de interesse estrutural em 211 nm. Na CP3, quanto mais negativo maior a contribuição da absorção em 269 nm, enquanto que na CP3 positiva a maior contribuição é da absorção no comprimento de onda de 208 nm. As amostras eluídas em diclorometano-etanol estão mais agrupadas numa diagonal da CP2 e CP3 enquanto que as demais estão bem espalhadas na Figura. Observam-se na CP2, dois sinais intensos em 195 nm e 200 nm. Observando as Figuras 14 e 15 parece que os espectros das frações acetona-diclorometano, diclorometano-etanol e a mistura ternária dentro da elipse, apresentam bandas mais intensas em 208 nm e 211 nm em relação às amostras eluídas em acetona.

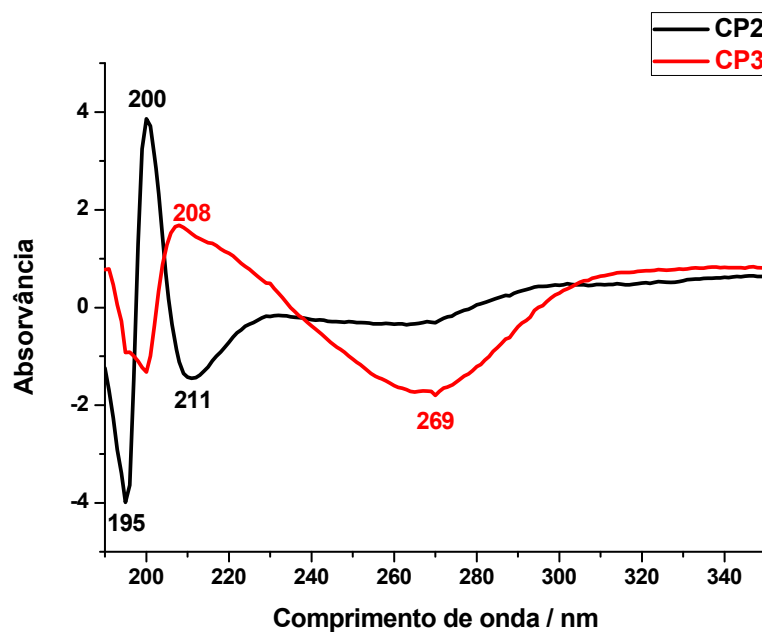
Figura 14 – Gráfico dos escores da CP2×CP3 dos espectros UV-DAD-CLAE dos cromatogramas obtidos das frações em coluna aberta da cultivar Bourbon em quatro fase distintas: acetona, acetona-diclorometano, diclorometano-etanol e acetona-diclorometano-etanol. A elipse evidencia o agrupamento dos espectros da fase móvel diclorometano:etanol.



A absorção no ultravioleta longínquo, isto é abaixo de 200 nm está associado à presença de grupos insaturados ou átomos com pares de elétrons não compartilhados. Os hidrocarbonetos saturados que não tem estes elementos estruturais absorvem abaixo de 200 nm [36]. Esta região não tem significância para estudo estrutural de compostos orgânicos. No entanto, acima de 200 nm, a excitação dos elétrons dos orbitais p e d e os orbitais π , particularmente os sistemas π conjugados, oferecem espectros de fácil medição e informativos. Já a transição $n \rightarrow \sigma^*$ (150-250 nm) refere-se a uma transição eletrônica de um orbital n não ligante para um orbital antiligante σ^* . Esta transição acontece com moléculas que contêm N, O e S. Transições $\pi \rightarrow \pi^*$ e $n \rightarrow \pi^*$ são as duas transições mais importantes para os espectros UV, porque os picos de absorção para estas transições caem dentro da

região típica do espectro UV [36]. Espectros com moderada absorção entre 250-290 nm indica a existência de benzeno ou anel heterocíclico. Isto significa que amostras com CP3 negativo com absorção em 269 nm possui um benzeno ou anel heterocíclico.

Figura 15 – Gráfico dos loadings dos espectros UV-DAD-CLAE dos cromatogramas obtidos das frações em coluna aberta da cultivar Bourbon em quatro fases distintas: acetona, acetona-diclorometano, diclorometano-etanol e acetona-diclorometano-etanol.



Para explorar as diferenças entre os espectros e comparar com os resultados da análise de componentes principais, todos os espectros de cada fração também foram analisados e estão apresentados na Figura 16. Interessante notar que as frações em acetona e a mistura acetona-diclorometano apresentam o mesmo perfil de espectros, embora a mistura apresente maior número de espectros com absorção em 208 nm. Estes espectros com absorção em torno de 265 a 272 têm características de ácidos fenólicos de baixo peso molecular. Este resultado parece consistente com a análise dos cromatogramas, onde o parâmetro solvatocrômico que separou as frações da acetona foi a basicidade. As amostras eluídas em

diclorometano-etanol e acetona-diclorometano-etanol apresentaram maior número de diferentes espectros que a acetona e acetona:diclorometano, sendo que a mistura ternária apresentou maior número de diferentes perfis de espectros. A fase móvel diclorometano-etanol foi a que separou os espectros com perfil dos alcaloides (cafeína) e da sacarose [37,38], como pode ser observado no espectro da Figura 17. Ademais, mesmo apresentando um número de espectros (189) menor do que a acetona (296), esta fase mostrou uma maior diversidade de perfis de espectros, enquanto a fase móvel ternária foi a que apresentou a maior variedade de espectros.

Figura 16 – Conjunto de espectros das frações dos cromatogramas obtidos por UV-DAD-CLAE, das fases móveis: (a) acetona, (b) acetona-diclorometano, (c) diclorometano-etanol e (d) acetona-diclorometano-etanol da cultivar Bourbon. Onde o retângulo vermelho mostra a área ampliada no canto superior direito do gráfico.

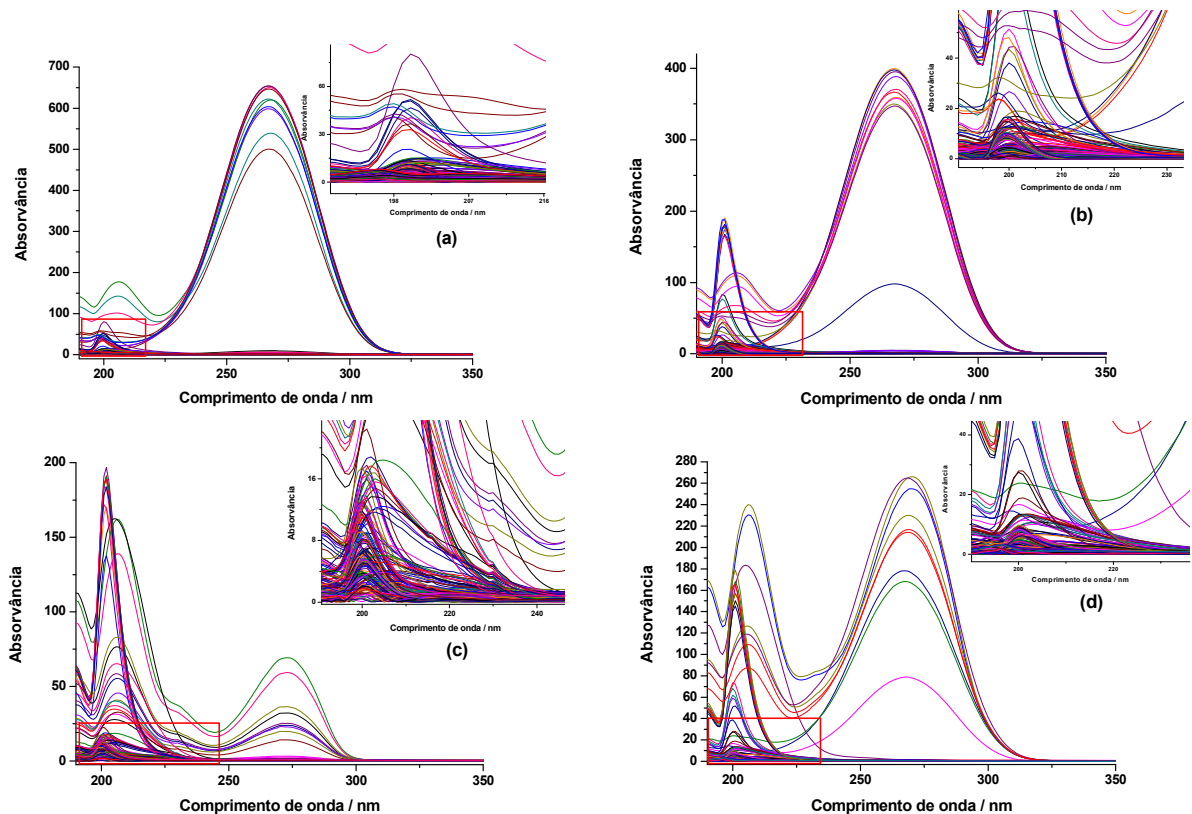
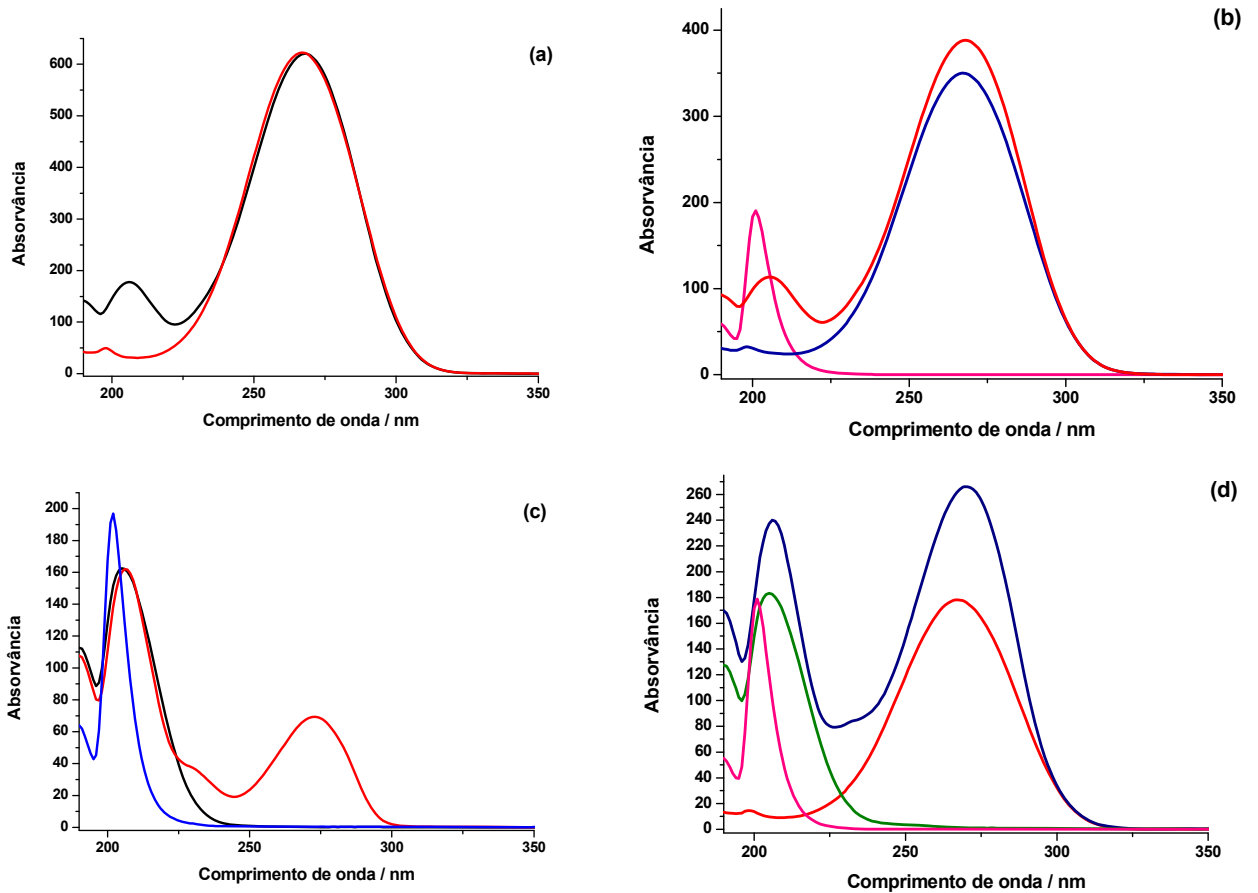


Figura 17 – Conjunto de perfis de espectros de maior absorvância dos cromatogramas, obtidos por UV-DAD-CLAE, das fases móveis: (a) acetona, (b) acetona-diclorometano, (c) diclorometano-etanol e (d) acetona-diclorometano-etanol da cultivar Bourbon.



Para a cultivar IPR 108 esta análise resultou em 1094 espectros, distribuídos em acetona (214), diclorometano:etanol (368), acetona:diclorometano (256), e na mistura acetona-diclorometano-etanol (256) em 161 comprimentos de onda (190 a 350 nm). As três primeiras componentes principais explicam 90,9% da variância total dos dados, sendo que a primeira explica 73,1%, a segunda 11,1% e a terceira 6,7%.

A Figura 18 mostra o gráfico das componentes principais CP2xCP3 do conjunto de espectros dos cromatogramas das frações das quatro fases móveis da cultivar IPR 108. Nele é possível observar um menor espalhamento na CP3 da fase

móvel acetona. Com o auxílio do gráfico dos loadings na Figura 19 observa-se que as amostras localizadas na região positiva da CP2, têm maior contribuição da absorção em 200 nm e negativa de interesse estrutural em 211 nm. Na CP3, quanto mais negativo maior a contribuição da absorção em 208 nm, enquanto que na CP3 positiva a maior contribuição é no comprimento de onda de 265 nm. Observando as Figuras 18 e 19 conclui-se que os espectros das frações acetona-diclorometano, diclorometano-etanol e a mistura ternária apresentam bandas mais intensas em 208 nm em relação às amostras eluídas em acetona.

Figura 18 – Gráfico dos escores CP2xCP3 dos espectros UV-DAD-CLAE dos cromatogramas obtidos das frações em coluna aberta da cultivar IPR 108 em quatro fases distintas: acetona, acetona-diclorometano, diclorometano-etanol e acetona-diclorometano-etanol.

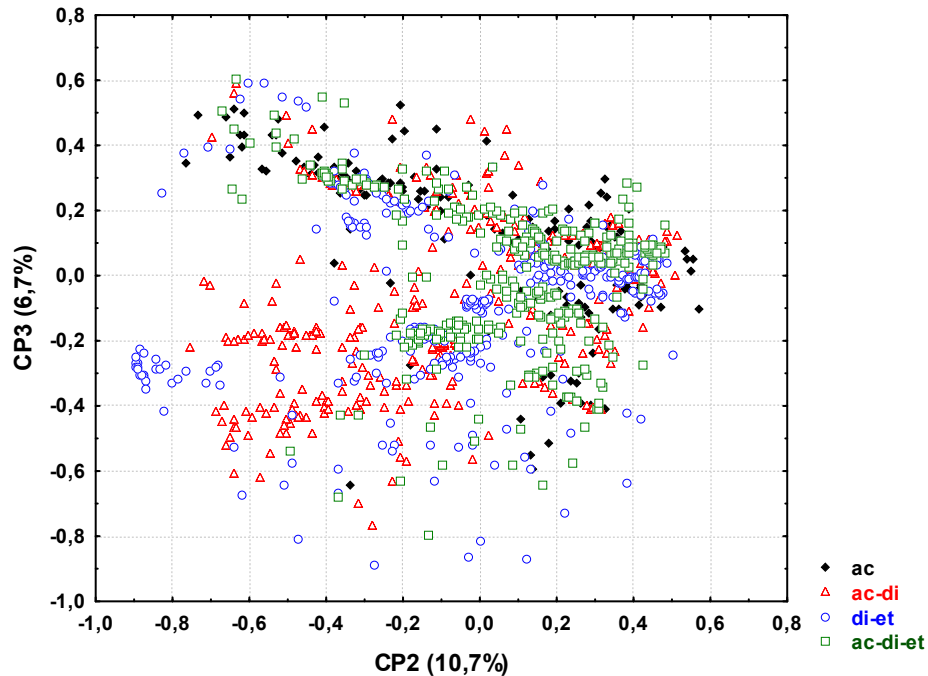
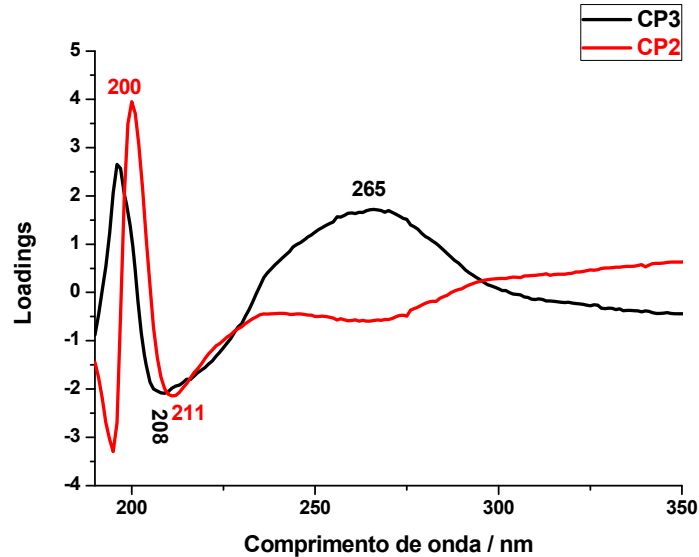


Figura 19 - Gráfico dos loadings dos espectros UV-DAD-CLAE dos cromatogramas obtidos das frações em coluna aberta da cultivar IPR 108 em quatro fases distintas: acetona, acetona-diclorometano, diclorometano-etanol e acetona-diclorometano-etanol.



Para explorar as diferenças entre os espectros e comparar com os resultados da análise de componentes principais, todos os espectros de cada fração estão apresentados na Figura 20. Interessante notar que as frações em acetona e a mistura acetona-diclorometano, assim como na cultivar Bourbon, apresentam o mesmo perfil de espectro, embora a mistura apresente um maior número de espectros com absorção em 208 nm. Este resultado parece consistente com a análise dos cromatogramas, onde o parâmetro solvatocrômico que separou as frações da acetona foi a basicidade. As amostras eluídas em acetona-diclorometano-etanol apresentaram maior número de diferentes espectros que as outras três fases móveis. A fase móvel diclorometano-etanol foi a que separou os alcalóides, principalmente a cafeína e a sacarose, como pode ser observado na Figura 16.

As Tabelas 3 e 4 mostram o resumo dos resultados da análise dos espectros das duas cultivares. As fases móveis acetona e acetona:diclorometano apresentaram um maior número de espectros na cultivar Bourbon, enquanto a fase

móvel diclorometano:etanol mostrou um maior número de espectros no cultivar IPR 108 e a mistura ternária revelou o mesmo número de espectros nas duas cultivares. Os tipos de perfis de maior absorvância encontrados nas duas cultivares foi bastante semelhante, como se observou nas Figuras 17 e 21. Assim como é possível notar que a fase móvel ternária foi a que obteve maior número de perfis distintos nas duas cultivares, mostrando um melhor fracionamento que as outras fases, já que se obteve uma maior diversidade de espectros. Este resultado já era esperado já que esta mistura possui uma maior heterogeneidade de tipos de interações que ela pode realizar com a amostra. Na fase móvel acetona, obtivemos perfis de ácidos nos perfis de maior absorvância. Este resultado já era esperado devido à alta basicidade deste solvente.

Figura 20 – Conjunto de espectros das frações dos cromatogramas, obtidos por UV-DAD-CLAE, das fases móveis (a) acetona, (b) acetona-diclorometano, (c) diclorometano-etanol e (d) acetona-diclorometano-etanol da cultivar IPR 108. Onde o retângulo vermelho mostra a área ampliada no canto superior direito do gráfico.

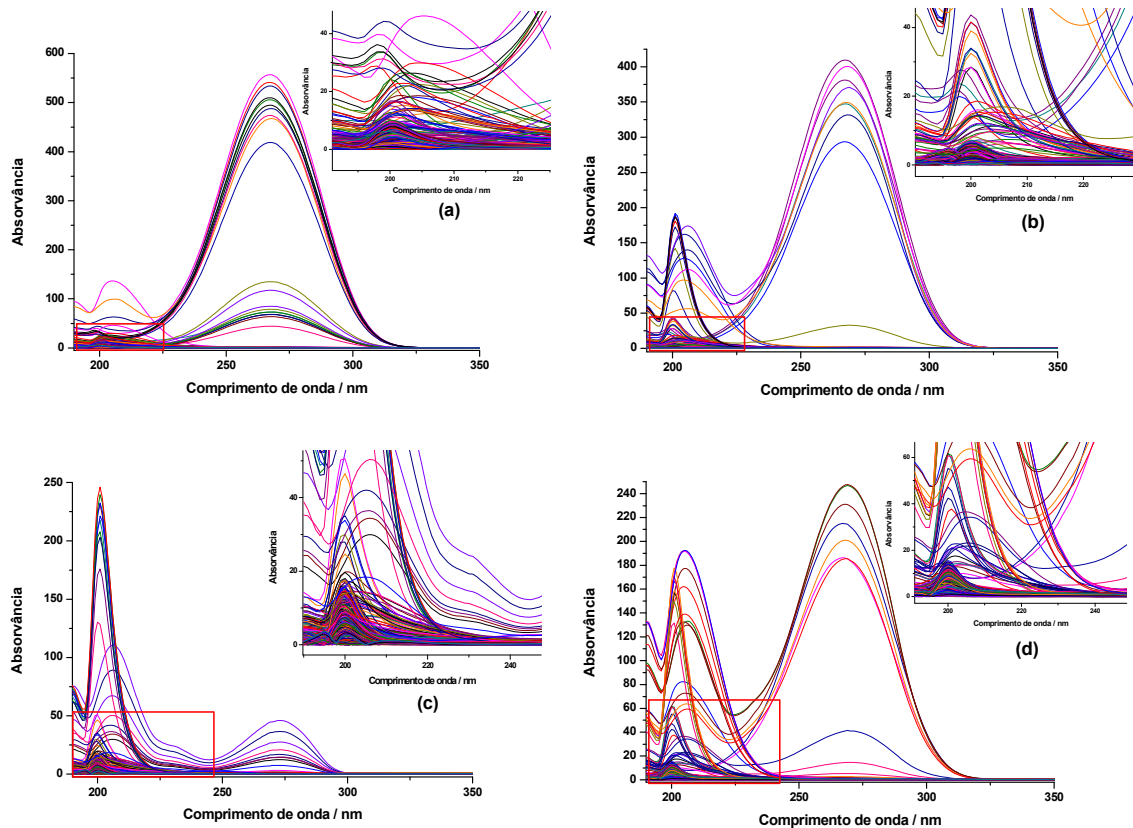


Figura 21 – Conjunto de perfis de espectros de maior absorvância dos cromatogramas obtidos por UV-DAD-CLAE, das fases móveis (a) acetona, (b) acetona-diclorometano, (c) diclorometano-etanol e (d) acetona-diclorometano-etanol da cultivar IPR 108.

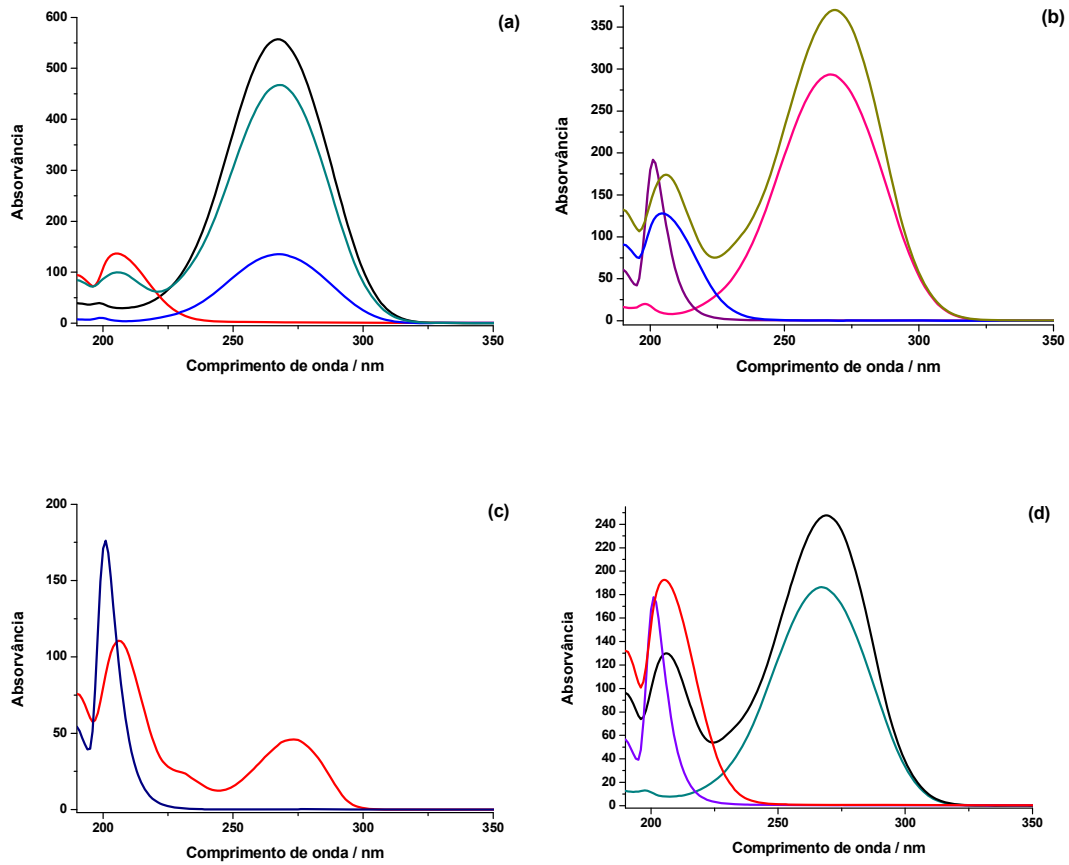


Tabela 3 – Resultados obtidos da análise de perfis de espectros da cultivar Bourbon

Fase móvel	Número de espectros	Perfis de maior absorvância encontrados
ac	296	ácidos
ac:di	319	ácidos e açúcares
di:et	191	cafeína e açúcares
ac:di:et	256	ácidos e açúcares

Tabela 4 – Resultados obtidos da análise de perfis de espectros da cultivar IPR 108

Fase móvel	Número de espectros	Perfis de maior absorvância encontrados
ac	214	ácidos
ac-di	256	ácidos e açucares
di-et	368	cafeína e açucares
ac-di-et	256	ácidos e açucares

Com o proposito de validar os resultados obtidos pela análise dos espectros, selecionaram-se duas outras amostras de cultivares de café arábica Iapar 59 e IPR 101. Os extratos foram preparados da mesma maneira, extrações exaustivas com a mistura diclorometano:etanol (1:1 v/v). Em seguida o extrato foi fracionado em cromatografia em coluna aberta. As fases móveis selecionadas para o fracionamento foram: acetona-diclorometano (58:42 v/v) para o Iapar 59 e a mistura ternária acetona-diclorometano-etanol (32:36:32 v/v/v) para o IPR 101. A análise em CLAE foi novamente realizada na fase móvel otimizada ACN:H₂O:MeOH (26:51:23 v/v/v).

A Figura 22 mostra que os espectros obtidos da cultivar Iapar 59 na fase móvel acetona-diclorometano apresentaram resultados semelhantes aqueles obtidos das cultivares Bourbon e IPR 108, espectros com absorção entre 265 e 272 nm, perfil característico de ácidos fenólicos de baixo peso molecular e espectros com absorvância em 200 nm. Este último pode ser atribuído à sacarose, com um valor de absorvância menor do que os encontrados nas outras cultivares.

Na Figura 23 encontram-se os espectros obtidos da cultivar IPR 101 na mistura ternária acetona-diclorometano-etanol. Eles apresentaram resultados análogos aqueles obtidos das cultivares Bourbon e IPR 108, com espectros com máximo em 201, 205 e 268 nm. Estes resultados mostram que os perfis de espectros de diferentes cultivares de café arábica, obtidos pelo fracionamento

cromatográfico na mesma fase móvel não apresentam muita variação, apenas alteram seus valores de absorvância.

Figura 22 – Conjunto de espectros das frações dos cromatogramas obtidos por UV-DAD-CLAE, da fase móvel acetona-diclorometano da cultivar Iapar 59. Onde o retângulo vermelho mostra a área ampliada no canto superior direito do gráfico.

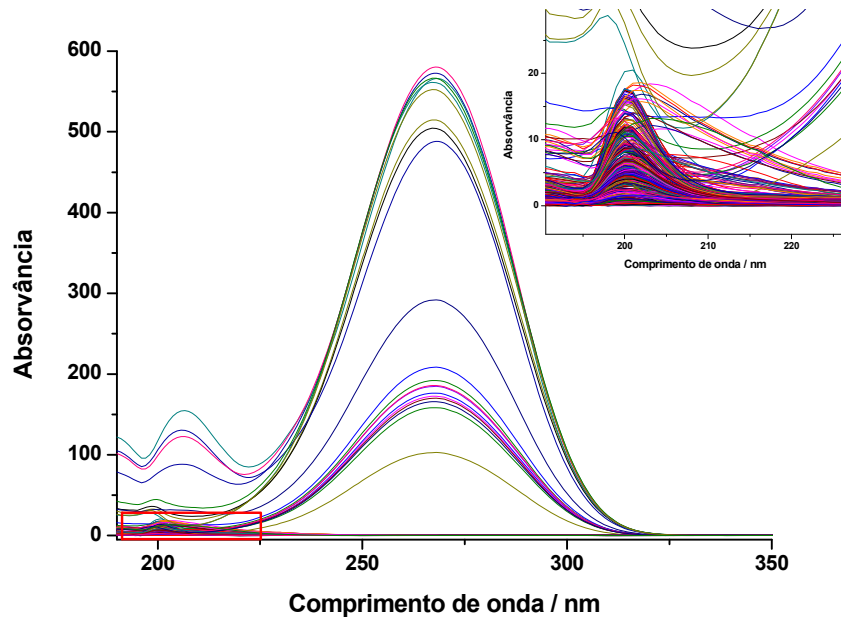
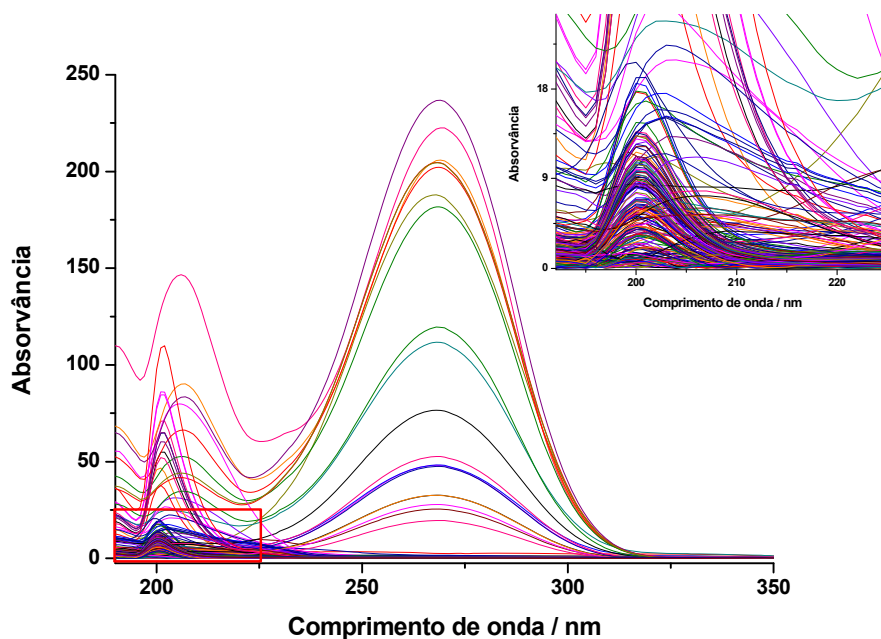


Figura 23 – Conjunto de espectros das frações dos cromatogramas obtidos por UV-DAD-CLAE, da mistura ternária acetona:diclorometano:etanol (32:36:32 v/v/v) da cultivar IPR 101. Onde o retângulo vermelho mostra a área ampliada no canto superior direito do gráfico.



Para comparar os efeitos dos solventes em um extrato não fracionado, preparou-se uma amostra utilizando a mesma metodologia (extração exaustiva na fase extratora diclorometano-etanol (1:1 v/v), sem o fracionamento, indo direto para a análise em CLAE na fase otimizada ACN:H₂O:MeOH (26:51:23 v/v/v).

A Figura 24 mostra o gráfico dos escores das componentes principais CP1xCP2 com variância acumulada de 38,1% dos quarenta cromatogramas das frações do extrato da cultivar Bourbon nas quatro fases móveis utilizadas na cromatografia em coluna aberta e uma amostra não fracionada. Observa-se na Figura que o extrato não fracionado está localizado próximo das frações da fase móvel diclorometano-etanol, mostrando que o cromatograma do extrato não fracionado é similar aos extratos fracionados no mesmo solvente extrator.

A Figura 25 apresenta o gráfico dos escores das componentes principais CP2xCP3 com variância acumulada de 22% dos quarenta cromatogramas das frações do extrato da cultivar IPR 108 nas quatro fases móveis utilizadas na cromatografia em coluna aberta e uma amostra não fracionada. Observa-se na Figura que o extrato não fracionado, assim como na Figura 24, está localizado próximo das frações da fase móvel diclorometano-etanol, mostrando, novamente, que o cromatograma da amostra não fracionada é similar aos extratos fracionados no mesmo solvente extrator.

Figura 24 – Gráfico dos escores CP1xCP2 dos cromatogramas obtidos por CLAE, na fase móvel ACN:H₂O:MeOH (26:51:23 v/v/v), das frações e uma amostra não fracionada da cultivar Bourbon.

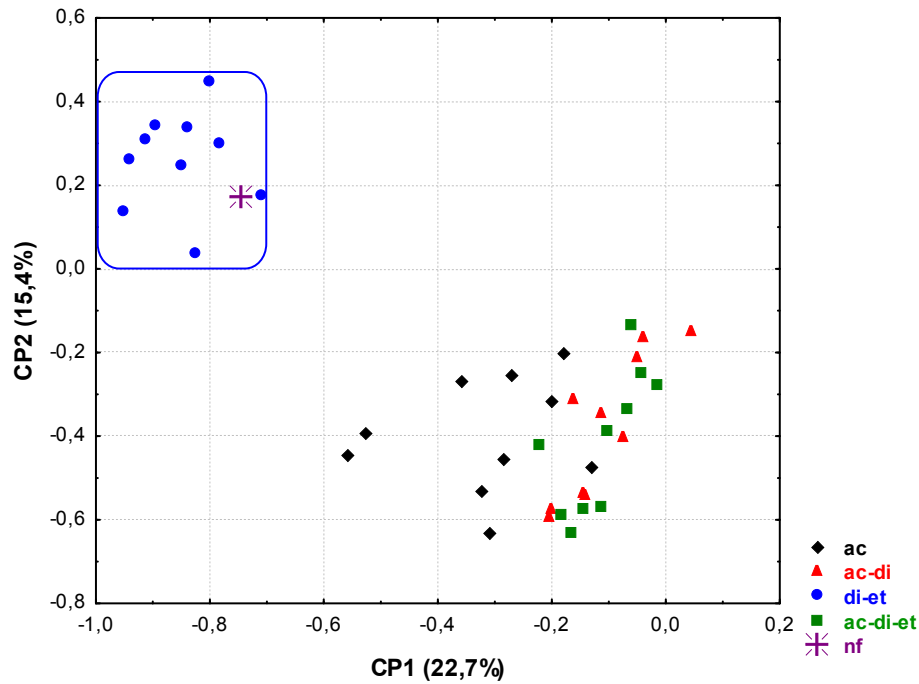
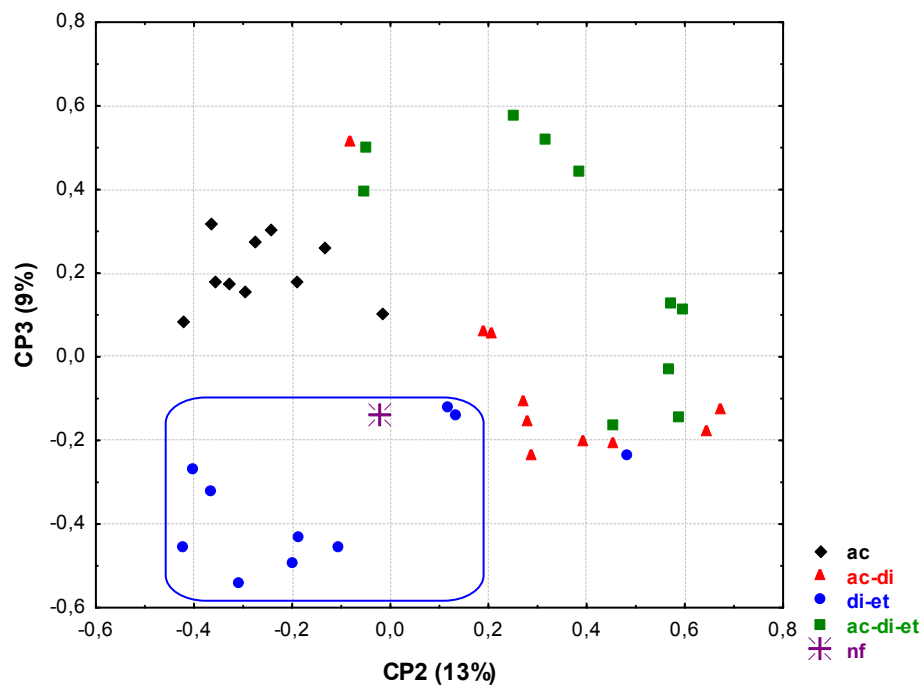


Figura 25 – Gráfico de escores CP2xCP3 dos cromatogramas obtidos por CLAE, na fase móvel ACN:H₂O:MeOH (26:51:23 v/v/v), das frações e uma amostra não fracionada da cultivar IPR 108.



Com o objetivo de comparar os cromatogramas das duas cultivares Bourbon e IPR 108 em cada fase, construiu-se uma matriz de 20x960 (10 cromatogramas/amostras de cada cultivar por 960 variáveis/absorvâncias nos diferentes tempos de retenção), a qual foi utilizada para ACP e AH.

As Figuras 26, 27, 28 e 29 apresentam os dendogramas das análises hierárquicas dos cromatogramas das frações das cultivares IPR 108 e Bourbon das quatro fases móveis do fracionamento cromatográfico.

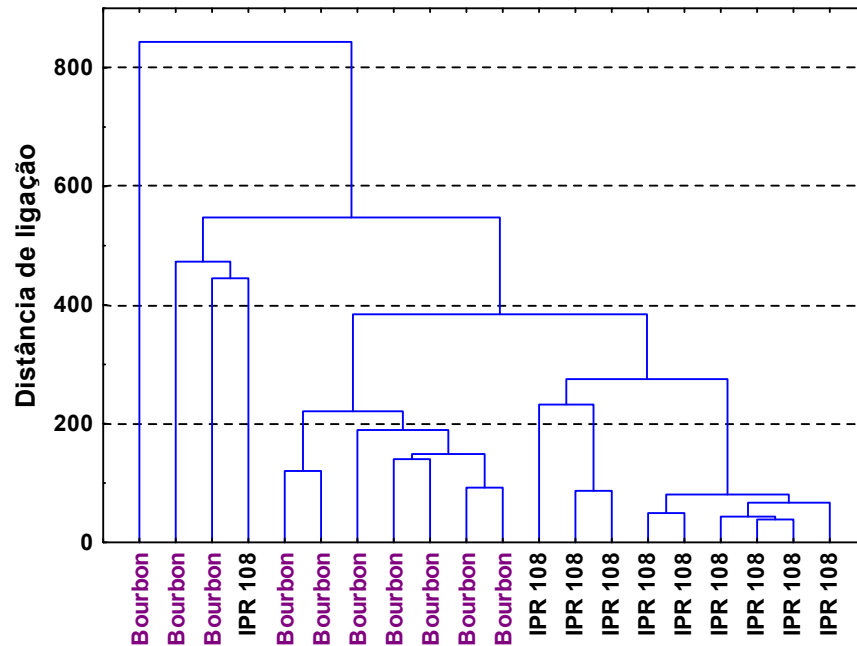
O dendrograma da Figura 26, das frações na fase móvel acetona, mostra dois grupos na distância de ligação próxima de 380, um contendo os extratos da cultivar Bourbon e outro da cultivar IPR 108. Quatro frações, uma do IPR 108 e três do Bourbon, ficaram fora destes grupos.

A Figura 27 mostra o dendrograma dos cromatogramas das frações na fase móvel acetona-diclorometano. Analisando a Figura, observa-se menor similaridade nos cromatogramas em relação à fase móvel acetona, uma vez que não ocorreu formação de grandes grupos.

O dendrograma da Figura 28, das frações na fase móvel diclorometano-etanol, mostra a formação de dois grandes grupos na distância de ligação acima de 600, um grupo das frações do Bourbon e outro da cultivar IPR 108. Na distância de ligação de 400 as amostras da cultivar Bourbon estão distribuídas em dois grupos e uma amostra sozinha, enquanto que para a cultivar IPR 108, as frações estão distribuídas em três grupos.

A Figura 29 mostra o dendrograma das frações na mistura ternária acetona-diclorometano-etanol. Observa-se que não houve formação de dois grandes grupos da mesma cultivar nas frações da acetona. Esta fração parece ter mais diversidade de cromatogramas, implicando em maior diversidade de metabólitos.

Figura 26 – Dendrograma dos cromatogramas obtidos por CLAE das frações das duas cultivares (IPR 108 e Bourbon) na fase móvel acetona.



As Figuras 30, 32, 34 e 36 mostram o gráfico de escores dos cromatogramas das frações das duas cultivares, enquanto as Figuras 31, 33, 35 e 37 apresentam os loadings dos mesmos, todos nas suas respectivas fases móveis.

Figura 27 – Dendrograma dos cromatogramas obtidos por CLAE das frações das duas cultivares (IPR 108 e Bourbon) na fase móvel acetona-diclorometano.

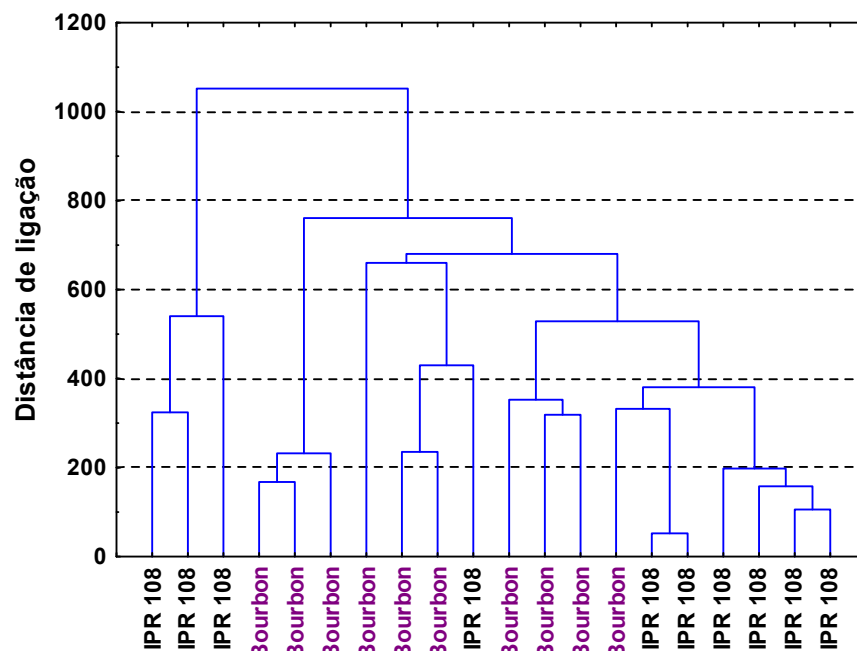


Figura 28 – Dendrograma dos cromatogramas obtidos por CLAE das frações das duas cultivares (IPR 108 e Bourbon), na fase móvel diclorometano-etanol.

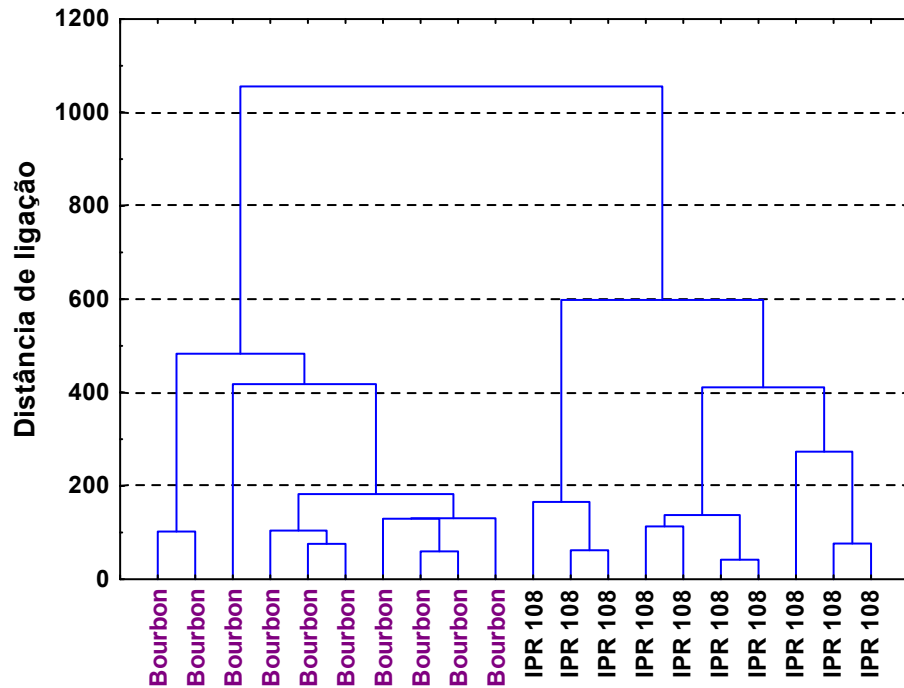
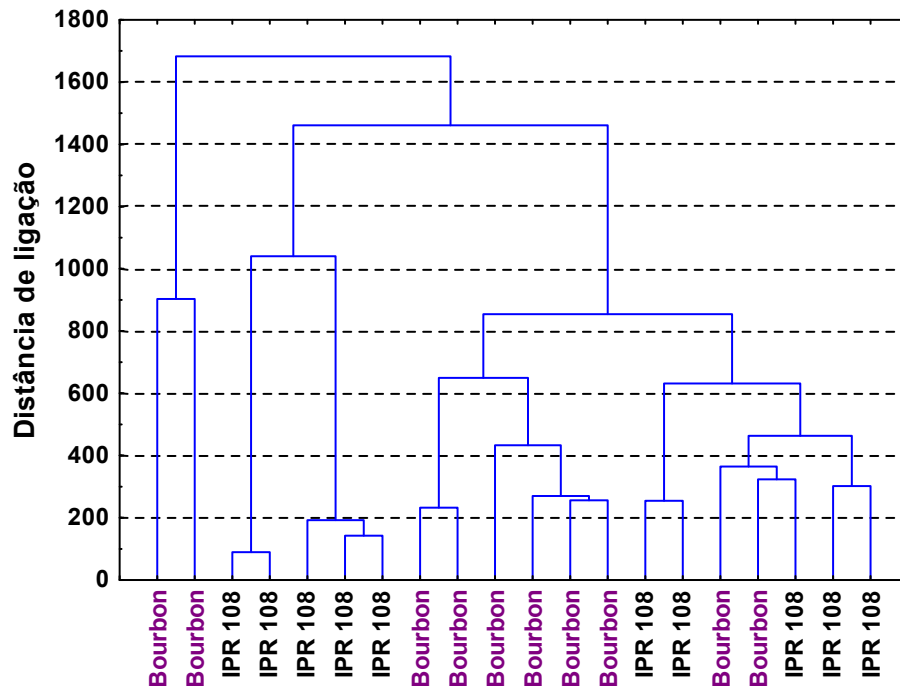
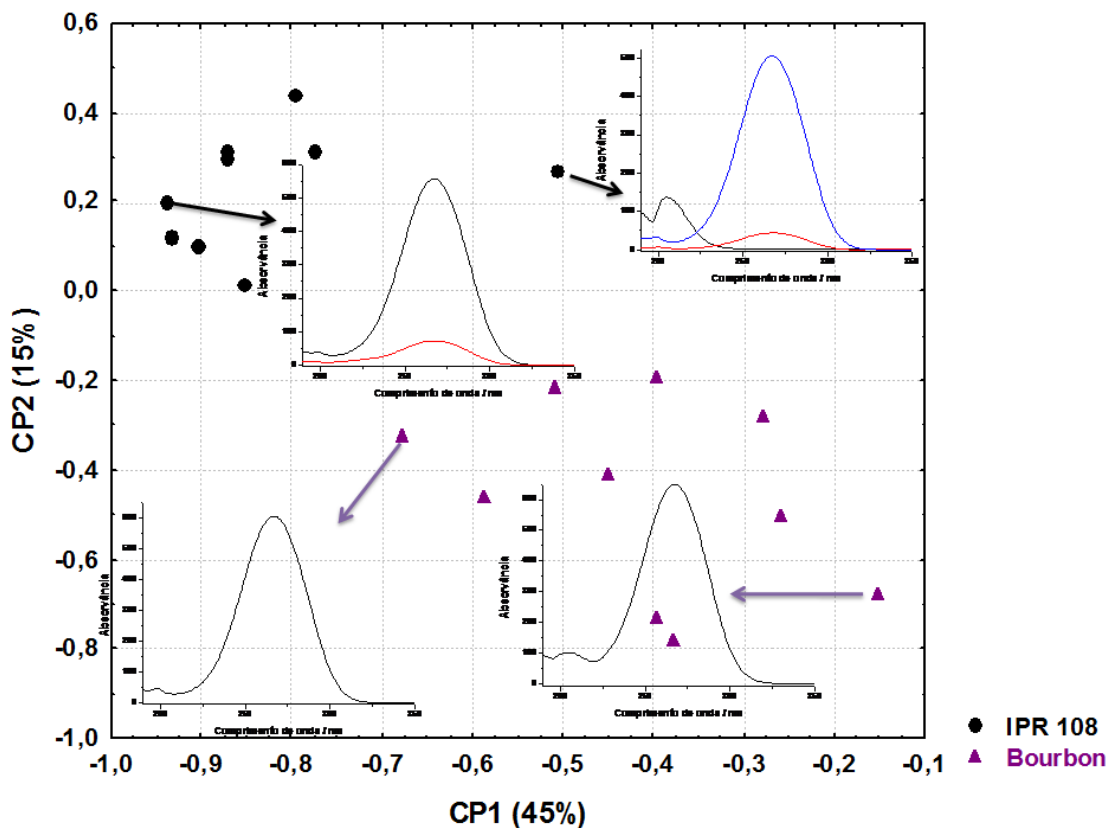


Figura 29 – Dendrograma dos cromatogramas obtidos por CLAE das frações das duas cultivares (IPR 108 e Bourbon). Na fase móvel acetona-diclorometano-etanol.



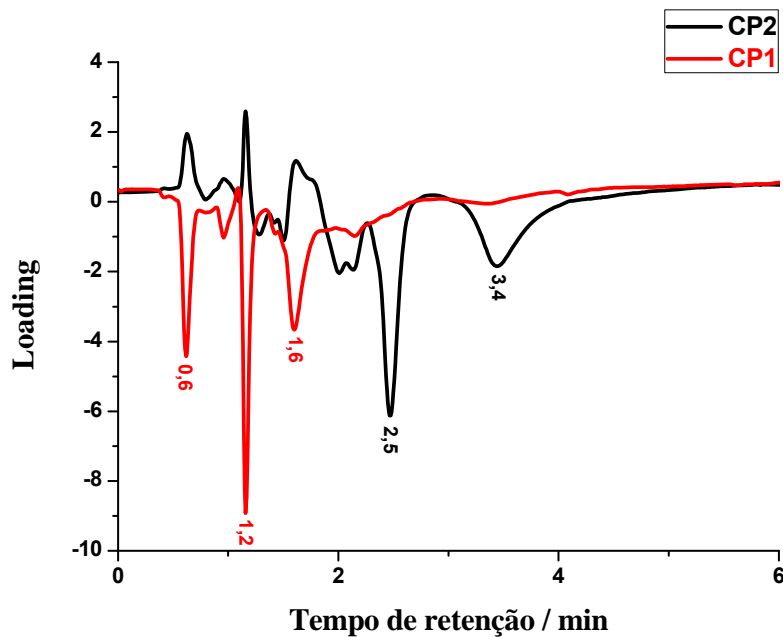
A Figura 30 mostra o gráfico dos escores da CP1xCP2 dos cromatogramas das frações em acetona que contém 60% de variância. Além disso, ela destaca os diferentes perfis de espectros encontrados em algumas frações. Esta figura mostra que as frações dos extratos da cultivar Bourbon são discriminadas das frações da cultivar IPR 108 na CP2. As frações da cultivar IPR 108 estão mais agrupadas na CP1, salvo por uma fração que fica mais deslocada para direita na CP1, esta apresenta um espectro com um perfil com máximo em 205 nm que a discrimina das outras frações. As frações da cultivar Bourbon ficam mais espalhadas na CP1, onde as frações mais a direita da CP1 apresentam um espectro com um pico em 205 nm que as discrimina das frações mais a esquerda da CP1. Estes resultados são consistentes com aqueles da análise hierárquica (Figura 26).

Figura 30 – Gráfico dos escores (CP1xCP2) com os cromatogramas das frações das duas cultivares, na fase móvel acetona. Em destaque os perfis de espectros encontrados em determinadas frações indicadas por setas.



Observando o gráfico dos loadings da Figura 31, as amostras localizadas na região negativa da CP2 são discriminadas por metabólitos com tempos de retenção de 2,5 e 3,5 minutos.

Figura 31 – Gráfico dos Loadings da CP1 e CP2 dos cromatogramas das frações das duas cultivares na fase móvel acetona.



A Figura 32 mostra o gráfico dos escores da CP1xCP2 dos cromatogramas das frações em acetona-diclorometano que contém 36% de variância acumulada. Nesta fase móvel os cromatogramas são menos similares que aqueles em acetona. A CP1 separa a maioria das amostras do Bourbon com loadings maiores que -0,2; enquanto que as amostras do IPR 108 são discriminadas por apresentar os loadings menores que -0,2. Três amostras da cultivar Bourbon ficaram isoladas na região negativa das CP1 e CP2 e apresentam um espectro com uma absorvância em 205 nm não presente nas outras frações desta cultivar. A cultivar IPR 108 apresentou um maior espalhamento nas suas frações e mostrou três tipos de perfis nos seus espectros. Estes resultados são consistentes com os da análise hierárquica (Figura 27) Observando o gráfico dos loadings da Figura 33, as amostras localizadas na

região negativa da CP1 são discriminadas por metabólitos com tempos de retenção de 0,7; 1,4; 2,4; 2,5; e 4,2 minutos.

Figura 32 – Gráfico dos escores (CP1xCP2) com os cromatogramas das frações das duas cultivares, na fase móvel acetona-diclorometano.

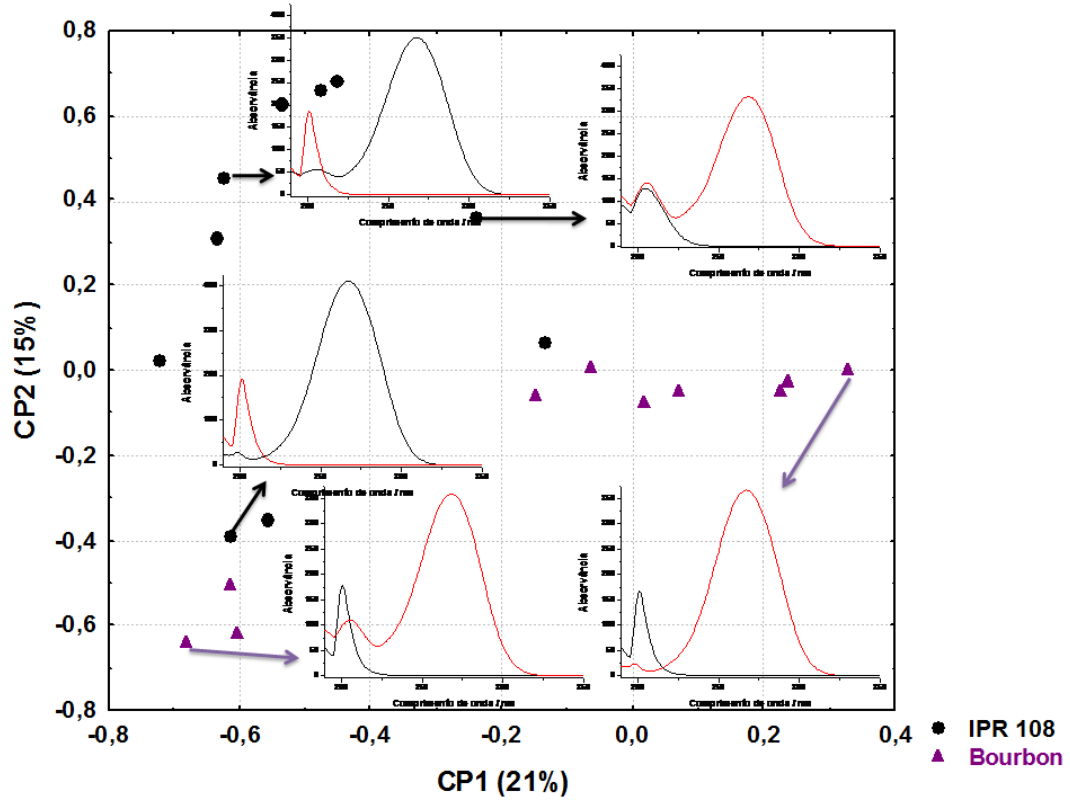
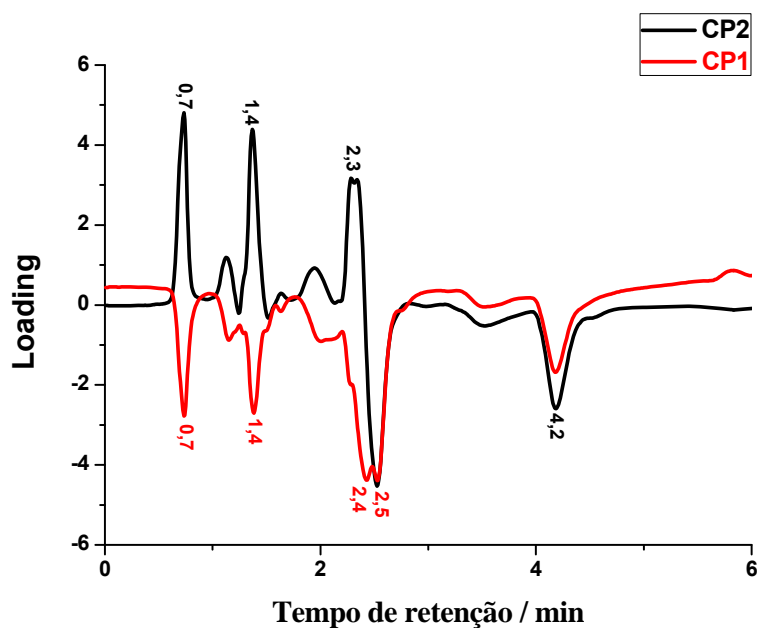


Figura 33 – Gráfico dos Loadings da CP1 e CP2 dos cromatogramas das frações das duas cultivares na fase móvel acetona-diclorometano.



A Figura 34 mostra o gráfico dos escores da CP1xCP2 dos cromatogramas das frações em diclorometano-etanol que contém 68% de variância acumulada. Nesta fase móvel os cromatogramas são menos similares que aqueles em acetona. A CP1 separa as amostras do Bourbon com loadings maiores que 0,4; enquanto que as amostras do IPR 108 são discriminadas por apresentar os loadings menores que 0,4. Uma fração da cultivar Bourbon ficou mais separada das outras, mais a esquerda da CP1, e apresentou em seu espectro um perfil diferente, semelhante a sacarose, com absorvância em 205 nm [37]. A cultivar IPR 108 não apresentou espectros com perfis diferentes entre suas frações e obteve um espalhamento maior na CP2 que o Bourbon. Estes resultados são consistentes com os da análise hierárquica (Figura 28). Observando o gráfico dos loadings da Figura 35, as amostras localizadas na região negativa da CP1 são discriminadas por metabólitos com tempos de retenção de 0,6; 1,2 e 1,8 minutos.

A Figura 36 mostra o gráfico dos escores da CP1xCP2 dos cromatogramas das frações em acetona-diclorometano-etanol que contém 41,8% de variância acumulada. Nesta fase móvel os cromatogramas das duas cultivares tiveram um maior espalhamento. A CP1 separa a maioria das amostras do Bourbon com loadings menores que -0,2; enquanto que as amostras do IPR 108 são discriminadas por apresentar os loadings maiores que -0,2. As duas cultivares parecem ter se separado em três grupos e mostram três variações de espectros. Estes resultados são consistentes com os da análise hierárquica (Figura 28). Observando o gráfico dos loadings da Figura 37, as amostras localizadas na região negativa da CP1 são discriminadas por metabólitos com tempos de retenção de 2,9 e 5,0 minutos.

Figura 34 – Gráfico dos escores (CP1xCP2) com os cromatogramas das frações das duas cultivares, na fase móvel diclorometano-etanol.

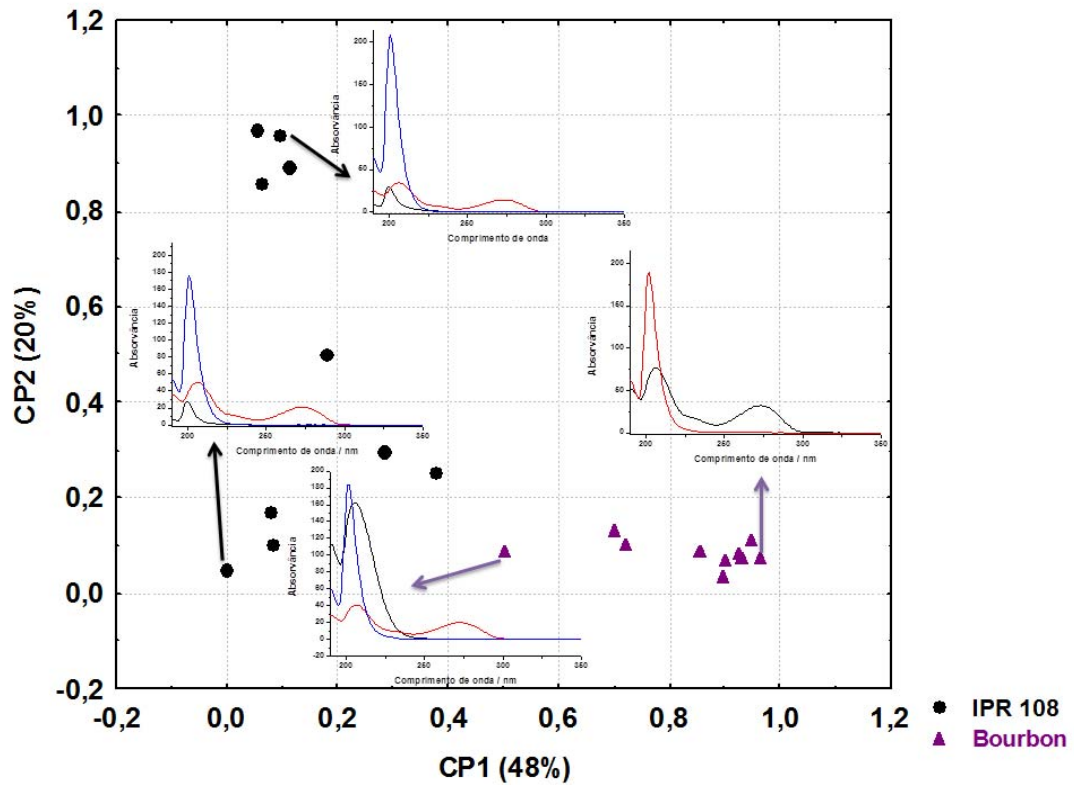


Figura 35 – Gráfico dos Loadings da CP1 e CP2 dos cromatogramas das frações das duas cultivares na fase móvel diclorometano-etanol.

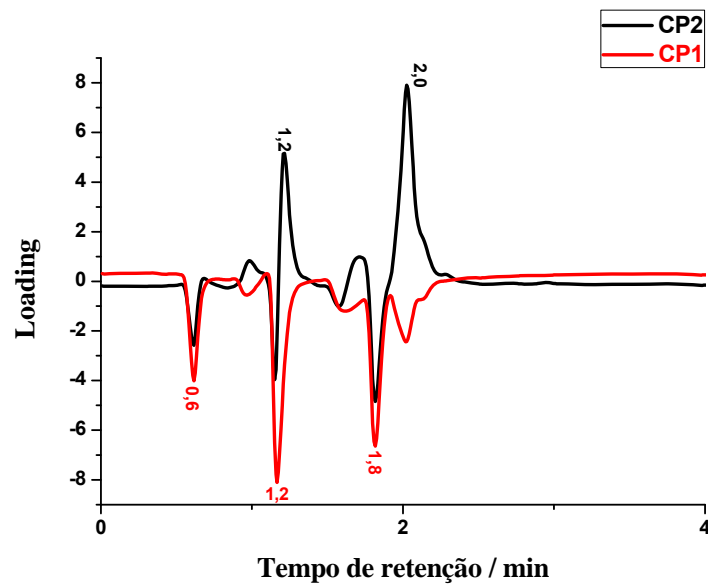


Figura 36 – Gráfico dos escores (CP1xCP2) com os cromatogramas das frações das duas cultivares, na fase móvel acetona-diclorometano-etanol.

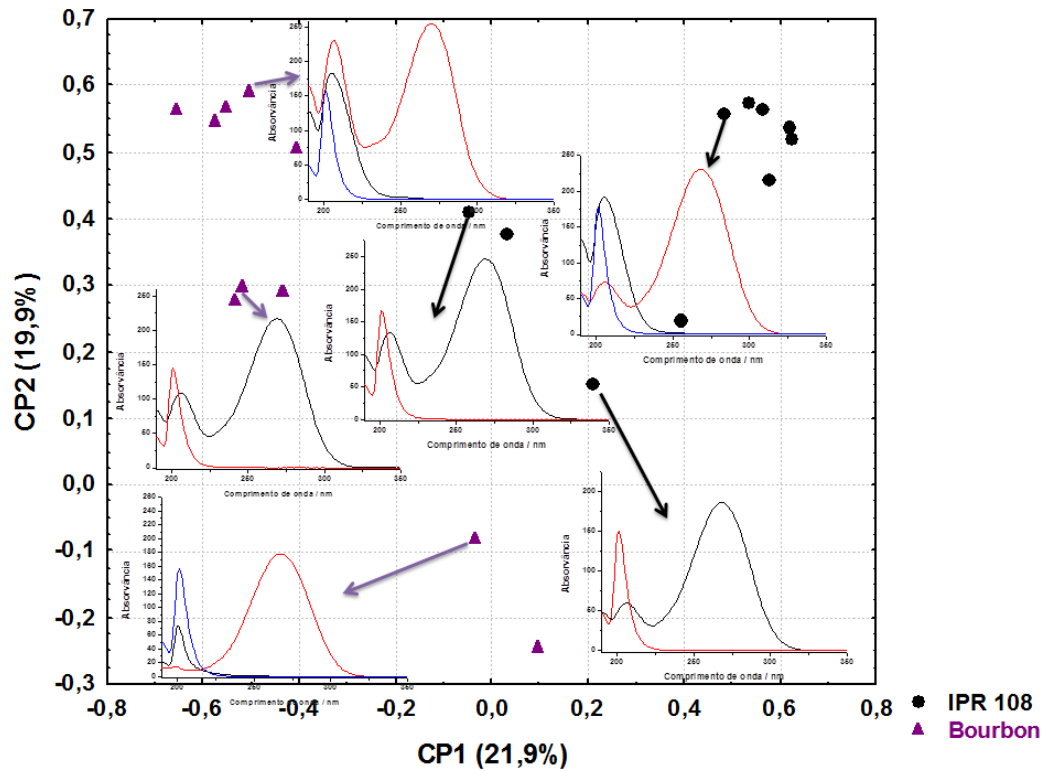
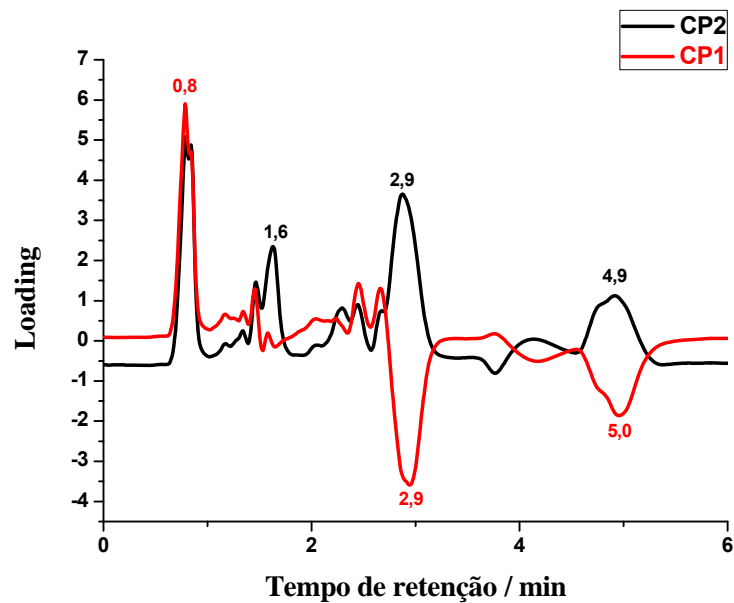
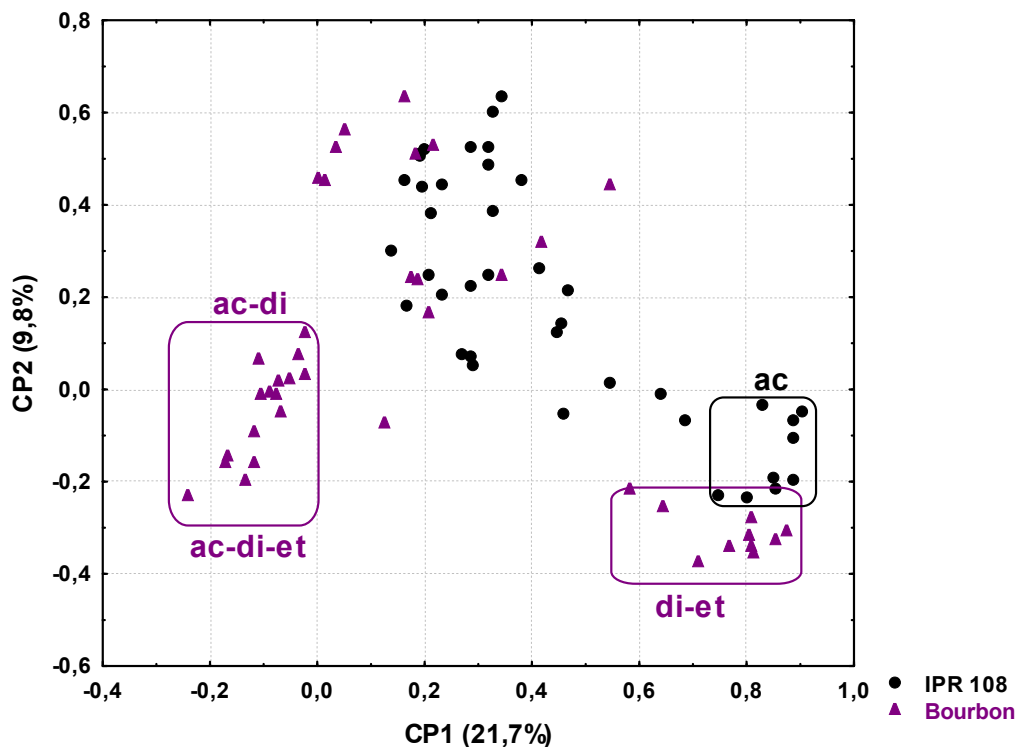


Figura 37 – Gráfico dos Loadings da CP1 e CP2 dos cromatogramas das frações das duas cultivares na fase móvel acetona-diclorometano-etanol.



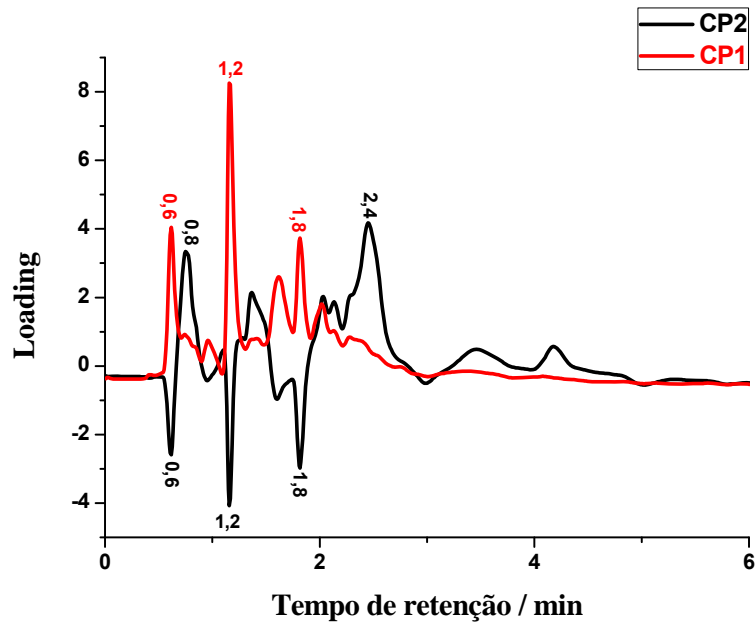
A Figura 38 mostra o gráfico de escores CP1xCP2, com os cromatogramas de todas as fases móveis das duas cultivares, que contém 31,5% de variância acumulada. Diferente das análises das fases móveis isoladas aqui a discriminação das duas cultivares não ficou evidente, mostrando que a similaridade entre as cultivares é maior do que entre as fases móveis. As frações da cultivar Bourbon tiveram um maior espalhamento nas duas componentes principais (CP1 e CP2). As duas fases de maior espalhamento na cultivar Bourbon, acetona-diclorometano e a mistura ternária, se concentraram na região negativa da CP1 discriminando-se das outras frações. A fase móvel de menor espalhamento na cultivar Bourbon, diclorometano-etanol, ficou agrupada na parte mais positiva da CP1, bem próxima das frações da fase móvel de menor espalhamento da cultivar IPR 108, a acetona. O restante das frações de ambas as cultivares ficou distribuído na região central da CP1.

Figura 38 – Gráfico dos escores (CP1xCP2) com os cromatogramas das duas cultivares nas quatro fases móveis.



Observando o gráfico dos loadings da Figura 39, as amostras localizadas na região positiva da CP1 são discriminadas por metabólitos com tempos de retenção de 0,6; 1,2; 1,6 e 1,8 minutos.

Figura 39 – Gráfico dos Loadings da CP1 e CP2 dos cromatogramas das duas cultivares nas quatro fases móveis



A detailed botanical illustration of a plant. The central stem is upright and bears several large, lanceolate green leaves with prominent veins. At the top of the stem, there is a cluster of five bright red, elongated berries. Further down the stem, a small, light purple flower is visible. At the bottom of the illustration, there is a single, larger purple flower and a single red berry. The entire illustration is set against a plain white background.

Conclusão

4 CONCLUSÃO

Com a utilização dos métodos quimiométricos associados aos cromatogramas, foi possível discriminar um mesmo extrato submetido ao fracionamento em coluna aberta usando quatro fases móveis diferentes, mas com a mesma polaridade. O efeito dos solventes ficou mais evidente na análise da cultivar IPR 108, demonstrando a importância dos parâmetros solvatocrômicos na escolha da fase móvel. Outro aspecto também observado foi a diferença de variação entre as frações dentro de cada fase móvel. As fases móveis acetona-diclorometano-etanol e acetona-diclorometano apresentaram uma maior variação em ambas as cultivares enquanto o solvente acetona e a mistura diclorometano-etanol mostraram pouca variação nos cromatogramas das duas cultivares. Este resultado mostra que as misturas de acetona-diclorometano-etanol e acetona-diclorometano foram mais eficientes no fracionamento, uma vez que forneceram uma maior diversidade de cromatogramas.

A análise dos espectros UV-DAD-CLAE mostrou que nas diferentes fases móveis foram obtidos diferentes perfis de espectros, enquanto que as fases iguais em diferentes cultivares forneceram espectros similares. A mistura ternária apresentou uma maior variação de perfis de espectros, enquanto a fase móvel acetona mostrou pouca variabilidade nas duas cultivares, confirmando assim a vantagem de se utilizar uma fase ternária em relação a solventes puros.

Outra análise realizada foi a adição do cromatograma de uma amostra não fracionada aos cromatogramas das fases móveis fracionadas. O resultado obtido mostrou que a amostra não fracionada ficou posicionada no gráfico dos escores (em

ambas as cultivares), dentro da região da fase móvel diclorometano-etanol, o solvente em que ela foi extraída.

A comparação entre os cromatogramas das duas cultivares mostrou através da análise hierárquica que a cultivar Bourbon apresentou maior variabilidade em seus cromatogramas e a análise de componentes principais evidenciou uma discriminação das duas cultivares nas quatro fases móveis. Mostrou também que a diferença entre os cromatogramas das cultivares é menor do que a diferença entre dos cromatogramas nas diferentes fases móveis.

Conclusão geral: Os resultados mostraram que as características dos solventes (α , β e π) foram importantes na separação dos diferentes metabólitos nas duas cultivares.

A detailed botanical illustration of a plant. The central stem is upright and bears several large, lanceolate green leaves with prominent veins. At the top of the stem, there is a cluster of five bright red, elongated berries. Further down the stem, there are small, light purple flowers. At the bottom of the illustration, a single, larger purple flower is shown in detail, highlighting its structure. The entire illustration is set against a plain white background.

Referências

REFERÊNCIAS

1. LOPES, L. M. V. Avaliação da qualidade de grãos crus e torrados de cultivares de cafeeiro (*Coffea arábica* L.) Larvas: UFLA, 2000. p. 95.
2. FARAH, A.; DONANGELO, C. M. Phenolic compounds in coffee. *Braz. J. Plant Physiol.*, v.18, p. 23, 2006.
3. DIXON, R. A. Natural products and plant disease resistance. *Nature*, v.411, p. 843, 2001.
4. CHALLIS, G. L.; HOPWOOD, D. A. Synergy and contingency as driving forces for the evolution of multiple secondary metabolite production by *Streptomyces* species. *National Academy of Science of the United States*, v. 100, p. 14555, 2003.
5. ENGEL, S.; JENSEN, P. R.; FENICAL, W. Chemical ecology of marine microbial defence. *J. of Chem. Ecology*, v. 28, p. 1971, 2002.
6. GURIB-FAKIN, A. Medicinal plants: tradition of yesterday and drugs of tomorrow. *Mol. Aspects Med.*, v. 27, p. 1, 2006.
7. ENDT, D. V., KIJNE, J. W., MEMELINK, J. Transcription factors controlling plant secondary metabolism: what regulates the regulators? *Phytochemistry*, v. 61, p. 107, 2002.
8. BARBOSA, P. S., ABREU, S. A., BATISTA, E. F., GUILHON, M. S. P. et al. Glutarimide alkaloids and terpenoids from *Croton pullei* var. *glabrior* Lanj. *Biochem. Syst. Ecol.*, v. 35, p. 887, 2007.
9. FERNANDEZ-GARCIA, E., IMHOF, M., SCHLICHOTHERLE-CERNY, H., BOSSET, J. O., NUNEZ, M. Terpenoids and benzenoids in La Serena cheese made at different seasons of the year with *Cynara cardunculus* extract as coagulant. *Int. Dairy J.*, v. 18, p. 147, 2008.

10. LENDL, A. et al. Phenolic and terpenoid compounds from *Chione venosa* (sw.) Urban var. *venosa* (Bois Bandé). *Phytochemistry*, v.66, p. 2381, 2005.
11. SIMONEIT, B. R. T., OTTO, A., WILDE, V. Novel phenolic biomarker triterpenoids of fossil laticifers in Eocene brown coal from Geiseltal. *Org. Geochem.*, v. 34, p. 121, 2003.
12. OTTO, A., SIMONEIT, B. R. T. Chemosystematics and diagenesis of terpenoids in fossil conifer species and sediment from the Eocene Zeitz formation. *Geochim. Cosmochim. Acta*, v. 65, p. 3505, 2001.
13. SOARES, D. X., SCARMINIO, I. S., BRUNS, R. E. Mixture designs for exploring class diversity and metabolite fingerprint: an efficient column chromatographic strategy. *Anal. Chim. Acta*, v. 702, p. 288, 2011.
14. MARCUS, Y. *Solvent mixtures: Properties and selective solvation*. New York: Marcel Dekker, 2002.
15. BILLIET, H. A. H., GALAN, L. Selection of mobile phase parameters and their optimization in reversed-phase liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, v. 485, p. 27, 1989.
16. BERTHELOT e PÉAN DE SAINT-GILLES apud VENTURINI, C. G. *Estudos do comportamento de corantes solvatocrômicos em soluções de ciclodextrinas*. 2005. 77f. Tese (Mestrado em Química) - Departamento de Química, Universidade Regional de Blumenau, Blumenau.
17. STOBBE apud FREITAS, A. R. *Estudo da interação de blenda de policloropreno e borracha natural (PCP/NR) com FeCl₃.6H₂O em solução*. 140f. Tese (Doutorado em Química) - Departamento de Química, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2010.

18. BUCKINGHAM, A. D.; FOWLER, P. W.; HUTSON, J. M. Theoretical studies of van der Waals molecules and intermolecular forces. *Chem. Rev.*, v. 88, p. 963, 1988.
19. TOSELLI, N. B. et al. Solvent effects on the vibrational structure of the ultraviolet spectra of cyanoaromatics. The influence of electron-donor-acceptor (EDA) interactions-II. Studies in binary solvent mixtures. *Spectrochim. Acta A.*, v. 44, p. 829, 1988.
20. GHONEIM, N. Study of the preferential solvation of some betaine dyes in binary solvent mixtures. *Spectrochim. Acta A.*, v. 90, p. 5660, 1968.
21. NUNES, N. G. C. Caracterização das interações soluto (ou substrato)-solvente-solvente em misturas ternárias. 400f. Tese (Doutorado em Química) - Departamento de Química e Bioquímica, Universidade de Lisboa, Lisboa, 2010.
22. OLIVEIRA, G. S. Caracterização espectroscópica e por modelagem mecânico-quântica, de compostos com potencial aplicação em dispositivos ópticos não-lineares. 108f. Tese (Mestrado em Química) –Instituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2009.
23. GRUNWALD, E.; WINSTEIN, S. The Correlation of Solvolysis Rates. *J. Am. Chem. Soc.* V.70, p. 846, 1948.
24. Kosower, E.M., The effect of solvent on spectra. *Journal of the American Chemical Society.* 80 (1958) 3253.
25. VENTURINI, C. G. *Estudos do comportamento de corantes solvatocrômicos em soluções de ciclodextrinas. 2005.* 77f. Tese (Mestrado em Química) - Departamento de Química, Universidade Regional de Blumenau, Blumenau.
26. SNYDER, L. R., CARR, P. W., RUTAN, S. C. Solvatochromically based solvent-selectivity triangle. *J. Chromatogr A.*, v. 656, p. 537, 1993.

27. SNYDER, L. R. Classification of the solvent properties of common liquids. *J. Chromatogr.*, v. 92, p. 223, 1974.
28. ROHRSCHEIDER, L. Solvent characterization by gas-liquid partition coefficients of selected solutes. *Anal. Chem.*, v. 45, p. 1241, 1973.
29. KAMLET, M. J., et al. Linear solvation energy relationships. 23. A comprehensive collection of the solvatochromic parameters, π^* , α , and β , and some methods for simplifying the generalized solvatochromic equation. *J. Org. Chem.*, v. 48, p. 2877, 1983.
30. VIEIRA, L. M. C. *Estudos electroquímicos e espectroscópicos de compostos orgânicos com potencial aplicação em óptica não-linear. 2004.* 111f. Tese (Mestrado em Química) – Departamento de Química, Universidade do Minho, Braga.
31. AZIZI, S. N., CHAICHI, M. J., YOUSEFI, M. Investigation of solvent effects on UV-vis absorption spectra of dihydroxybenzene derivatives by solvatochromic parameters *Spectrochim. Acta A*, v. 73, p. 101, 2009.
32. BUDAG, R., et al. Quality analysis of automotive fuel using solvatochromic probes. *Fuel*, v. 85, p. 1494, 2006.
33. WYATT, V. T., et al. Determination of solvatochromic solvent parameters for the characterization of gas-expanded liquids. *J. Supercrit. Fluid.*, v. 36, p. 16, 2005.
34. NETO, B. B., SCARMINIO, I. S., BRUNS, R. E. 25 anos de Quimiometria no Brasil. *Quim. Nova*, v. 29, p. 1401, 2006.
35. MOREIRA, I., SCHEEL, G., HATUMURA, P. H., SCARMINIO, I. S. Efeito do solvente na extração de ácidos clorogênicos, cafeína e trigonelina em *Coffea arabica*. *Quim. Nova*, v. 37, p. 39, 2014.

36. KALSI, P. S. Spectroscopy of organic compounds. 6^a ed. Nova Deli, India: New Age International, 2004. 652 p.
37. KOUTCHMA, T. N., FORNEY, L. J., MORARU, C. I. *Ultraviolet Light in Food Technology: Principles and Applications*. Boca Raton: CRC Press, 2009. 278 p.
38. CONSTANTINO, L. V. *Desenvolvimento e validação de método cromatográfico para análise de açúcares livres em café verde*. 2013. 58 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Departamento de Química, Universidade Estadual de Londrina, Londrina.